



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER  
Pós-Graduação Strictu Sensu em Oncologia

PAULA SABBO BERNARDO

ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DO COMPOSTO LQB-118 E DO  
PAPEL DO MIR-210 NA RADIORRESISTÊNCIA E NA CLASSIFICAÇÃO  
DOS ASTROCITOMAS

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Ciuvalschi Maia

Co-orientadora: Profa. Dra. Leila Maria Cardão Chimelli

Rio de Janeiro

2016



**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**  
**Pós-Graduação Strictu Sensu em Oncologia**

PAULA SABBO BERNARDO

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DO COMPOSTO LQB-118 E DO  
PAPEL DO MIR-210 NA RADIORRESISTÊNCIA E NA CLASSIFICAÇÃO  
DOS ASTROCITOMAS**

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Oncologia. Área de concentração: Pesquisa Translacional com ênfase em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Ciuvalschi Maia

Co-orientadora: Leila Maria Cardão Chimelli

Rio de Janeiro

2016



**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**  
**Pós-Graduação Strictu Sensu em Oncologia**

**PAULA SABBO BERNARDO**

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DO COMPOSTO LQB-118 E DO  
PAPEL DO miR-210 NA RADIORRESISTÊNCIA E NA CLASSIFICAÇÃO  
DOS ASTROCITOMAS**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Raquel Ciuvalchi Maia**

**CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Leila Maria Cardão Chimelli**

Rio de Janeiro, 30 de Outubro de 2014

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

Profa. Dr. José Andrés Morgado Díaz

Profa. Dra. Aurea Echevarria Aznar Neves Lima

Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto

Profa. Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba– Suplente Interno

Profa. Dr. Luiz Eurico Nasciutti– Suplente Externo

RIO DE JANEIRO

Março 2016

*Àqueles que são a minha vida:  
Jorge, Valéria e Lucas.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pela minha vida e por sempre abençoar meus caminhos e escolhas. Que a cada dia que passa me faz sentir seu imenso amor por nós.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, por entenderem meus artigos espalhados, por me buscarem as várias vezes que fiquei até tarde no laboratório e por acreditarem que o meu projeto um dia vai mudar a história dos pacientes com glioma. Obrigada por serem a minha base e a minha vida, meu trampolim nos momentos de desânimo.

Ao meu irmão pela amizade, pela paciência, por assistir a todas as minhas apresentações e me ajudar a melhorar, por tudo.

À minha orientadora, Dra. Raquel C. Maia, por ter confiado na minha capacidade de desenvolver esse trabalho. Obrigada por acreditar em mim, por apoiar minhas ideias e me orientar desde a iniciação científica. Não teria chegado até aqui sem seu apoio, dedicação e todas as oportunidades de crescimento que você proporcionou.

À minha co-orientadora, Dra. Leila Chimelli, pelo auxílio com a classificação e análise histopatológica das amostras tumorais. Por me ajudar a compreender melhor a patologia complexa dos gliomas.

À Giselle de Faria por me introduzir no desafiador mundo dos gliomas e pelas colaborações.

Ao Gustavo Guimarães, meu primeiro aluno de Iniciação Científica e amigo, por ter me ensinado tantas coisas com seu jeito metódico com os experimentos. Que a nossa parceria se fortaleça cada vez mais.

Ao Dr. Paulo Costa, Dr. Chaquip Netto e a Dra. Camila Buarque por terem cedido os compostos sintéticos LQBs.

Aos funcionários do Laboratório do Fracionamento por toda ajuda com os experimentos de irradiação, sempre dispostos a colaborar.

À Karina Lani por sempre atender sorrindo nossos pedidos para aquisição dos experimentos no citômetro quando o nosso tinha algum problema.

Aos funcionários da secretaria da Pós-Graduação, Andreia, Danielle e Rodrigo, por todo auxílio.

Ao José Antônio Oliveira e ao Marcio Christiani, médicos do serviço de Neurocirurgia do INCA, pelo auxílio fundamental para o contato com os pacientes e obtenção das amostras de sangue periférico.

À Cintia, Secretária da Chefia da Neurocirurgia, aos neurocirurgiões, anestesistas, equipe do centro cirúrgico e equipe de enfermagem da neurocirurgia por toda a boa vontade e auxílio na obtenção das amostras dos pacientes. Agradeço por participar das discussões nas reuniões semanais do Serviço de Neurocirurgia.

Aos pacientes por terem aceitado tão gentilmente participar desse estudo com a esperança e a vontade de ajudar outras pessoas futuramente.

Aos amigos do laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Aline, Claudete, Carol, Danielle, Deborah, Flavia, Fernanda, Gabriel, Gabi, Gustavo, Lauana, Luciano, Marcela, Mariana, Marcos, Michelle, Paloma, Patrícia, Rebeca, Roberta 01, Roberta 02, Roberta 03, Tandressa, Thaís e Viviane, meus queridos hematólogos, pelos momentos de descontração nesses nove anos, e pelas discussões científicas.

À Dr. Claudete Klumb, pelas discussões científicas proveitosas e pelas perguntas de “advogada” que nos fazem pensar.

À Flavia, minha Miguxa, pelo auxílio com os experimentos de citometria de fluxo, por me ensinar a “pilotar” o citômetro e pelas caronas às 05h30min para o laboratório.

À Paloma Souza por todo auxílio com a difícil missão de conversar com os pacientes e obter a assinatura do termo de consentimento, que tantas vezes nos deixa com o coração apertado.

À Thais Hancio, a feia mais querida, por me ceder garrafas, fazer lisados, contar células. Muito obrigada por sempre estar disposta a me ajudar nos diversos favores super exploradores.

À amiga Fernanda Costas, por toda ajuda sempre, pelas discussões e sugestões. Por ser minha amiga, minha colaboradora, por ter essa objetividade e clareza que tornam os problemas mais simples.

À amiga Marcela Robaina, companheira nessa caminhada desde a Faculdade. E aqui estamos, nos formamos, passamos na seleção de mestrado, defendemos o Mestrado juntas, adiamos a qualificação juntas e para manter a tradição, defenderemos a tese na mesma semana. Obrigada pelo apoio e amizade pelas histórias para contar.

À amiga Michelle Xavier, uma pessoa tão doce e que acredita tanto na bondade do ser humano que nos contagia. Com sua alegria radiante, torna meus dias de trabalho mais leves.

Ao meu namorado, Felipe, por sempre me incentivar e tentar entender o que são microRNAs e gliomas. Por me acompanhar nos finais de semana de trabalho e pela companhia nos trens do dia a dia.

À Soraya e Kelly, por serem amigas e confidentes, por acompanharem a minha jornada há mais de 14 anos, pela amizade e apoio em todos os momentos da minha vida.

Aos desenvolvedores do site Sci-hub que me permitiu ter acesso aos artigos mais recentes.

Ao Ministério da Saúde/INCA, a Capes e a FAPERJ pela bolsa de doutorado.

Ao INCT para controle do câncer, Ministério da Saúde, Fundação do Câncer, Programa de Oncobiologia, FAPERJ, CNPq e INCA pelo apoio financeiro.

*Para tudo há um tempo, para cada coisa  
há um momento debaixo do céu:  
tempo de nascer e tempo de morrer;  
tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou.  
(Ecl 3, 1-2)*

ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DO COMPOSTO LQB-118 E DO PAPEL DO  
miR-210 NA RADIORRESISTÊNCIA E NA CLASSIFICAÇÃO DOS ASTROCITOMAS

Paula Sabbo Bernardo

RESUMO

O glioblastoma (GB) é um astrocitoma agressivo e letal e os pacientes possuem uma sobrevida média de 14 meses. O tratamento baseia-se em cirurgia seguida por radioterapia e quimioterapia com temozolamida (TMZ). As altas taxas de recidiva e progressão tumoral estão relacionadas à resistência ao tratamento. O desenvolvimento de novas terapias mais efetivas é extremamente importante. O objetivo desse estudo foi analisar o papel do miR-210 na resposta ao novo composto sintético LQB-118 e na radiorresistência, *in vitro*, e na classificação dos astrocitomas. Para tal, a atividade antitumoral de quatro novos compostos sintéticos, LQB-118, LQB-223, LQB-266 e LQB-268 foi avaliada por MTT na linhagem derivada de GB, U251-MG. O LQB-118 apresentou maior redução da viabilidade celular, sendo comparado a TMZ em outras linhagens celulares de GB, A172 e T98G, causando efeitos similares ao observado na linhagem U251-MG. O LQB-118 induziu perda de adesão e morte celular avaliada por exclusão por azul de tripan, pela marcação de anexina V/PI por citometria de fluxo e pela redução da expressão pró-caspase-7 por Western blotting. A TMZ não induziu morte celular, demonstrando a superioridade do tratamento com o LQB-118. Este composto reduziu os níveis proteicos de ERK e AKT e aumentou a expressão do miR-210, enquanto a TMZ reduziu a fosforilação de ERK de forma menos intensa, sugerindo regulação da expressão gênica pelo composto. Sabendo-se que os microRNAs são reguladores da expressão gênica e o miR-210 apresenta um papel controverso na literatura, o entendimento do seu papel na resposta ao tratamento do GB é clinicamente relevante. Para tal, os níveis de expressão do miR-210 foram modulados e não foi observada alteração no perfil de radiorresistência, tampouco alteração da susceptibilidade ao composto LQB-118 na linhagem U251-MG. Por outro lado, a inibição do miR-210 reduziu a viabilidade celular na linhagem A172, mas não alterou os níveis de morte celular induzidos pelo tratamento com radiação ionizante. Outra abordagem importante no estudo de novas estratégias terapêuticas é a associação entre tratamentos. Nesse estudo, a associação de LQB-118 com radiação ionizante promoveu redução da viabilidade celular de forma sinérgica apenas na linhagem U251-MG. Efeito similar foi observado na combinação da TMZ com a radiação ionizante quando adicionados concomitantemente. Além disso, a expressão do miR-210 foi avaliada em quinze amostras de sangue periférico de pacientes com astrocitoma. Os pacientes com GB apresentaram níveis maiores de expressão em relação aos menores graus. Cinco pacientes tiveram evolução para o óbito e, apesar do pequeno número amostral, estes possuíam uma expressão mais elevada de miR-210. O composto LQB-118 é potencialmente um agente promissor para o tratamento do GB. Apesar do miR-210 não ser responsável pela radiorresistência, sua inibição contribuiu para a redução da proliferação celular, além de sua expressão ser mais elevada em amostras de plasma de pacientes com GB e em amostras de pacientes que evoluíram ao óbito.

**Palavras-chave:** astrocitomas, novos compostos antitumorais, temozolamida, LQB-118, microRNAs, radiorresistência.

## ABSTRACT

Glioblastoma (GB) is the most common astrocytoma and one of the most aggressive and lethal human malignancies. Patients present a median survival of 14 months. Surgery followed by radiotherapy and chemotherapy with temozolomide (TMZ) are the first line treatment. Recurrence and tumor progression are related to treatment resistance and occurs in the majority of cases. Thus, development of more effective therapies becomes essential. The aim of this study was to understand the role of miR-210 in response to treatment with new synthetic compound, LQB-118, and to ionizing radiation, *in vitro*. Furthermore, evaluate miR-210 importance in astrocytomas' classification. To this end, U251-MG cell line was used to analyze the antitumoral activity of new synthetic compounds (LQB-118, LQB-223, LQB-266 and LQB-268) by MTT. LQB-118 demonstrated the highest effect on cell viability and its effect was further evaluated in two more cell lines (T98G and A172) in comparison to TMZ. These cells demonstrated results similar to U251-MG cells. LQB-118 induced cell detachment and cell death assessed by trypan blue exclusion assay, by induction of annexin V labeling and reduction of pro-caspase-7 levels by flow cytometry and Western blotting, respectively. Moreover, TMZ did not significantly induce cell death, pointing out the superiority of LQB-118. In front of this, LQB-118 effect was evaluated in cell survival pathways AKT, ERK and microRNAs expression: miR-7, miR-143 and miR-210. LQB-118 reduced ERK1/2 and AKT expression, and enhanced miR-210 expression, suggesting gene expression regulation by the compound. TMZ only slightly reduced ERK1/2 phosphorylation. As microRNAs are regulators of gene expression and miR-210 has a controversial role in literature, understanding its role in GB treatment response is clinically relevant. Thereafter, inhibition or overexpression of miR-210 did not induce changes in radioresistance profile, not even modulated the susceptibility of U251-MG cells to LQB-118. However, inhibition of miR-210 followed by ionizing radiation reduced cell viability in A172 cells, but was not able to induce cell death. Other important therapeutic strategy is the use of treatment associations. The association of LQB-118 with ionizing radiation, concomitantly or 24 hours before radiation, reduced cell viability synergistically in the U251-MG cell line. Similar effect was observed with TMZ and ionizing radiation combination concomitantly. Despite this, there was no effect on cell death induction as observed for LQB-118. Moreover, fourteen peripheral blood samples were obtained from patients with astrocytoma for miR-210 expression. GB patients' plasma samples had higher miR-210 levels in comparison to lower astrocytomas grades. Among the cases studied, five patients died. Besides the small sample size, this group expressed higher levels of miR-210. Although miR-210 is not responsible for radioresistance, its inhibition contributed to reduction of cell proliferation. In addition, miR-210 expression is higher in GB patients' samples and in samples of patients who died. Finally, the compound LQB-118 is a promising agent for GB treatment.

**Keywords:** astrocytoma, new antitumoral compounds, temozolomide, LQB-118, microRNAs, radioresistance.

## ÍNDICE

I) INTRODUÇÃO .....	20
1.1) Gliomas.....	20
1.1.1) Glioblastoma (GB).....	23
1.1.2) Tratamento .....	27
1.2) Novos compostos sintéticos com atividade antitumoral.....	30
1.3) Vias de sinalização celular .....	32
1.4) microRNAs.....	36
1.4.1) miRNAs e câncer .....	39
1.4.2) miR-7 .....	41
1.4.3) miR-143 .....	43
1.4.4) miR-210 .....	45
II) JUSTIFICATIVA .....	50
III) OBJETIVOS .....	51
3.1) Objetivo geral .....	51
3.2) Objetivos específicos.....	51
IV) DESENHO EXPERIMENTAL .....	52
V) METODOLOGIA .....	53
5.1) Cultura de células .....	53
5.2) Quimioterápicos e novos compostos .....	51
5.3) Radiação ionizante .....	54
5.4) Ensaio de viabilidade celular .....	55
5.5) Exclusão por azul de tripan .....	55
5.6) Determinação da apoptose pelo ensaio de Anexina V/PI .....	56
5.7) Análise do Ciclo Celular pela quantificação do conteúdo de DNA .....	56
5.8) Análise da expressão proteica por <i>Western blotting</i> .....	56
5.8.1) Imunomarcação .....	57
5.9) Detecção dos níveis de expressão dos miRNAs por QT-PCR .....	58

5.10) Superexpressão e inibição do miR-210 .....	59
5.11) Interação entre os fármacos e a radiação ionizante .....	60
5.12) Pacientes .....	61
5.12.1) Detecção de hemólise nas amostras de sangue periférico .....	61
5.12.2) Extração de miRNA proveniente do plasma.....	62
5.13) Análise estatística.....	63
VI) RESULTADOS.....	65
6.1) Avaliação da citotoxicidade após tratamento com diversos compostos e quimioterápicos nas linhagens celulares de GB .....	65
6.1.1) Os novos compostos LQB-118 e LQB-223 possuem maior efeito sobre a viabilidade celular na linhagem U251-MG .....	65
6.1.2) O novo composto LQB-118 reduz a viabilidade nas linhagens T98G e A172 de forma mais significativa do que a TMZ .....	65
6.1.3) O composto LQB-118 induz morte celular .....	67
6.1.4) LQB-118 induz morte celular por apoptose e tem efeito sobre o ciclo celular dependente da linhagem celular .....	70
6.2) Estudo do mecanismo de ação do novo composto sintético LQB-118.....	78
6.2.1) LQB-118 reduz a fosforilação de ERK1/2 e de Akt .....	78
6.2.2) LQB-118 aumenta a expressão do miR-210 .....	78
6.2.3) A modulação da expressão do miR-210 não altera a sensibilidade ao tratamento com LQB-118.....	80
6.3) Estudo do perfil de radiorresistência das linhagens de GB e do papel do miR-210.....	83
6.3.1) Modulação dos níveis de expressão do miR-210 não altera o perfil de radiorresistência .....	84
6.4) LQB-118 e TMZ possuem efeito sinérgico quando associados à radiação ionizante na linhagem U251-MG.....	88
6.5) Avaliação da expressão do miR-210 em amostras de sangue periférico de pacientes ..	93
VII) DISCUSSÃO .....	101
VIII) CONCLUSÕES.....	106

IX) PERSPECTIVAS .....	106
X) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	107
XI) ANEXOS .....	134
11.1) Carta de aprovação do projeto pelo CEP do INCA .....	134
11.2) TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	135
11.3) Artigos publicados .....	138
11.4) Artigos submetidos à publicação .....	139
11.5) Artigos em preparo para a submissão .....	140

#### LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Tabela 1.1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma.	21
Tabela 6.1	Características dos 17 pacientes do Serviço de Neurocirurgia do INCA (Janeiro/2014 - Outubro/2015)	94
Figura 6.2	Características gerais de 17 pacientes com astrocitoma do Serviço de Neurocirurgia do INCA, incluídos no estudo.	95

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Alterações moleculares e classificação de gliomas de baixo grau.	23
Figura 1.2	Fluxograma das vias moleculares conduzindo ao desenvolvimento de glioblastoma primário e secundário.	25
Figura 1.3	Esquema resumido das alterações genéticas observadas na patogênese dos subtipos de glioblastoma.	27
Figura 1.4	Estrutura química dos compostos sintéticos, LQB-118, LQB-223, LQB-266 e LQB-268.	32
Figura 1.5	Esquema simplificado das vias de sinalização de PI3K/Akt e MAPKs.	35
Figura 1.6	Esquemas mostrando as vias de biogênese de microRNAs.	39
Figura 1.7	Esquema mostrando as principais moléculas e vias reguladas pelo miR-7.	43
Figura 1.8	Esquema mostrando as principais moléculas e vias reguladas pelo miR-143.	44
Figura 1.9	Esquema mostrando as principais moléculas e vias reguladas pelo miR-210.	49
Figura 4.1	Desenho experimental do estudo	52
Figura 5.1	Estrutura química dos quimioterápicos, TMZ e BCNU, e dos compostos sintéticos, LQB-118, LQB-223, LQB-266 e LQB-268.	54
Figura 5.2	Desenho experimental das etapas da superexpressão e da inibição do miR-210.	60
Figura 6.1	Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT na linhagem U251-MG.	66
Figura 6.2	Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT.	67
Figura 6.3	Perda de adesão e morte celular induzida por LQB-118.	68
Figura 6.4	Perda de adesão e morte celular induzida por TMZ.	69
Figura 6.5	Indução de apoptose avaliada por marcação da anexinaV/PI.	71

Figura 6.6	Indução de apoptose avaliada por marcação da anexinaV/PI.	72
Figura 6.7	Fragmentação do DNA avaliado por citometria de fluxo.	73
Figura 6.8	Perfil do ciclo celular avaliado por citometria de fluxo.	74
Figura 6.9	Apoptose avaliada pela expressão de pró-caspase 7 por <i>Western blotting</i> .	75
Figura 6.10	Indução de apoptose avaliada por marcação da anexina V/PI.	76
Figura 6.11	Indução de apoptose avaliada por marcação da anexina V/PI.	77
Figura 6.12	Expressão de ERK1/2 e Akt avaliada por <i>Western blotting</i> .	78
Figura 6.13	Expressão de miRNAs avaliada por PCR em tempo real.	79
Figura 6.14	Padronização da superexpressão e inibição do miR-210 por QT-PCR.	80
Figura 6.15	Viabilidade celular avaliada pelos ensaios de MTT e contagem de células na linhagem U251-MG	81
Figura 6.16	Expressão do miR-210 e da marcação por anexina V/PI após superexpressão do miR-210 na linhagem U251-MG.	82
Figura 6.17	Expressão do miR-210 e marcação por anexina V/PI após inibição do miR-210 na linhagem U251-MG.	83
Figura 6.18	Expressão do miR-210, marcação por anexina V/PI e fragmentação do DNA após inibição do miR-210 na linhagem U251-MG.	85
Figura 6.19	Expressão do miR-210, marcação por anexina V/PI e fragmentação do DNA após superexpressão do miR-210 na linhagem U251-MG.	86
Figura 6.20	Expressão do miR-210, marcação por anexina V/PI, ciclo celular e contagem de células após inibição do miR-210 na linhagem A172.	87
Figura 6.21	Associação de LQB-118 ou TMZ com radiação ionizante na linhagem U251-MG.	89
Figura 6.22	Associação de LQB-118 ou TMZ com radiação ionizante na	90

	linhagem A172.	
Figura 6.23	Associação de LQB-118 ou TMZ com radiação ionizante na linhagem T98G.	91
Figura 6.24	Esquemas representativos dos principais resultados obtidos na parte do estudo desenvolvida <i>in vitro</i> .	92
Figura 6.25	Curva padrão de hemólise.	96
Figura 6.26	Hemólise nas amostras de plasma de pacientes com gliomas.	97
Figura 6.27	Hemólise nas amostras de plasma dos doadores.	98
Figura 6.28	Expressão do miR-210 nas amostras de plasma provenientes de pacientes com astrocitoma.	99
Figura 6.29	Expressão do miR-210 nas amostras de plasma separadas entre pacientes vivos e óbitos.	100

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
2-HG	$\alpha$ -hidroxiglutarato
Ac	Anticorpo
AcMo	Anticorpo monoclonal
ACNU	Nimustina
Ago	Proteína argonauta
ATCC	American Type Culture Collection
ATRX	<i><math>\alpha</math>-thalassemia/mental retardation-syndrome-X linked</i>
BAD	Promotor de morte associado à Bcl-2
Bcl-2	<i>B- cell lymphoma 2</i>
BCNU	1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosuréia (carmustina)
BHE	Barreira hemato-encefálica
bp	par de bases
BSA	Albumina sérica bovina
Caspase	Cisteína aspartato proteases
CCNU	Lomustina
CDDP	Cisplatina
CDK/Cdc	Ciclina dependente de quinase
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de ética em pesquisa
C <sub>T</sub>	Ciclo limite
DGCR8	<i>DiGeorge critical region 8</i>
DMEM/F12	Meio de Dulbecco modificado por Eagle: Mistura Nutriente F-12
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
dsRNA	RNA de dupla fita
EFNA3	<i>Ephrin A3</i>
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidérmico
ELK1	<i>ETS (E26 transformation-specific or E-twenty-six) domain transcription factor</i>
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
ER	Receptor de estrogênio
ERK	<i>Extracelular signal regulated kinase</i>
ESCC	Carcinoma de células escamosas de esôfago
FAK	Quinase de adesão focal
Fas	Fas (receptor de superfamília TNF, membro 6)
Fas-L	Ligante Fas (superfamília TNF, membro 6)
FDA	Food and Drug Administration

FGFRL1	Receptor de fator de crescimento de fibroblasto - <i>like</i> 1
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FOX	<i>Foxhead Box</i>
FS	Fosfatidil serina
G0	Gap 0
G1	Gap 1
G2/M	Gap 2/ Mitose
GBM	Glioblastoma
GDP	Guanosina difosfato
GPDL1	Glicerol-3-fosfato desidrogenase 1- <i>like</i>
GSK3	Glicogênio sintase quinase 3
GSLC	<i>Glioblastoma Stem-like cell</i>
GTP	Guanosina trifosfato
HDM4	Humam double minute 4
HeLa	Linhagem celular de câncer de cérvix
HER-2	Receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2
HIF	Fator induzido por hipóxia
HK2	Hexoquinase 2
HRP	Enzima peroxidase de rábano silvestre
HUVEC	Células endoteliais de veia de cordão umbilical humana
<i>IAP</i>	Proteína inibidora da apoptose
IDH	Isocitrato desidrogenase humana
IGF-1R	Receptor de fator de crescimento similar a insulina tipo 1
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPPN	Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais
IRS1/2	<i>Insulin receptor substrate 1 /2</i>
ISCU	<i>Iron sulfur cluster protein</i>
JNK	c-Jun N-terminal quinase
KLF4	<i>Kruppel-like factor 4</i>
LLC	Leucemia Linfóide Crônica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
LNN	linfonodo
LOH	Perda de heterozigose
LQB	Laboratório de Química Bio-orgânica
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MDR	Resistência a múltiplas drogas
MGMT	<i>O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
MMP	Metaloproteinase
mRNA	RNA mensageiro
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MRP	Proteína relacionada a multirresistência
MTIC	5-(3-metilriazeno-1-il)imidazol-4-carboxamida
MTT	Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
<i>MYC</i>	Homólogo de oncogene viral v-myc de mielocitomatose

MYO6	Miosina 6
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina H <sup>+</sup>
NFκB	Fator nuclear de potencializador do gene do polipeptídeo kappa leve em células B
NMT	N-miostil transferase
NOX2	NADPH oxidase 2
NSCLC	Câncer de pulmão não pequenas células
OMS	Organização Mundial de Saúde
PACT	Proteína ativadora de PKR
Pak1	<i>p21-activated Kinase 1</i>
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PCV	Protocolo contendo procarbazina, CCNU e vincristina
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PDGF-R	Receptor de fator de crescimento derivado de plaqueta
PI	Iodeto de propídeo
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinase
PIP2	Fosfatidilinositol (4,5) P <sub>2</sub>
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5) P <sub>3</sub>
PKB	Proteína quinase B
PKR	Proteína quinase R
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina ( <i>phosphatase and tensin homolog</i> )
PUC	Pontifícia Universidade Católica
<i>Ras</i>	Homólogo de oncogene viral de sarcoma de rato v-ras
RCL	<i>Risc loading complex</i>
RIF	Razão da média de intensidade de fluorescência
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RM	Ressonância magnética
RNA	Ácido ribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotação por minuto
RTK	Receptor tirosina quinase
S	Síntese
SDHD	Subunidade D do complexo succinato desidrogenase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de Sódio
SFB	Soro fetal bovino
SIRT 1	Sirtuína 1
SNC	Sistema Nervoso Central
SNPs	Polimorfismo de nucleotídeo único
SOX2	<i>SRY (sex determining region Y)-like box</i>
STR	Repetição curta em tandem
TBS	Salina tamponada com Tris
TBST	TBS Tween

TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-1,2-diaminometano
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TKI	Inibidor de tirosina quinase
TMZ	Temozolamida
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
TRBP	<i>TAR RNA binding protein</i>
™	Marca registrada
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UTR	<i>Untranslated region</i>
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGF-R	Receptor de fator de crescimento do endotélio vascular
VM26	Teniposídeo
XIAP	Inibidor de apoptose ligado ao X
XPO	Exportina

## I) INTRODUÇÃO

### 1.1) Gliomas

Gliomas são tumores do sistema nervoso central (SNC) e podem ser: astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas ou tumores mistos (como os oligoastrocitomas), dependendo do tipo de célula glial de origem. Os gliomas representam aproximadamente 27% de todas as neoplasias do SNC e 80% dos tumores malignos (OSTROM *et al.*, 2015). 17.000 novos casos são diagnosticados por ano nos Estados Unidos (DESJARDINS *et al.*, 2009; OMURO E DEANGELIS 2013). Segundo estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) para o ano 2016, serão diagnosticados 5.440 casos novos de câncer do (SNC) em homens e 4.830 em mulheres no Brasil. Estima-se um risco de 5,50 casos novos a cada 100 mil homens e 4,68 casos para cada 100 mil mulheres (Tabela 1.1). Entretanto, existem poucos estudos brasileiros sobre a incidência, prevalência e mortalidade dos tumores do SNC, na maioria das vezes, os estudos não diferenciam os diferentes tipos de tumores. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os gliomas em quatro graus de malignidade, onde o grau I é caracterizado por baixa taxa proliferativa e pela possibilidade de cura com ressecção cirúrgica. O grau II é caracterizado por alta capacidade de infiltrar o parênquima cerebral com atipia citológica. Alguns tumores de grau II tendem a progredir para graus mais elevados de malignidade. O grau III apresenta evidências histopatológicas de malignidade, como atipia nuclear, alta atividade mitótica e anaplasia. O grau IV, além das características anteriores, apresenta extensas áreas de necrose e/ou proliferação microvascular (angiogênese) e estão associados à rápida progressão da doença, culminando com um desfecho fatal (LOUIS *et al.*, 2007).

Os astrocitomas representam 75% dos gliomas e são divididos em: astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III) e o mais agressivo, o glioblastoma (GB), outrora chamado glioblastoma multiforme (GBM - grau IV) (ROUSSEAU *et al.*, 2008). Os GBs podem ser primários ou secundários. Os GBs primários, também chamados *de novo*, não apresentam evidência clínica ou histopatológica de uma lesão precursora de menor grau ao diagnóstico. O GB secundário é caracterizado pela progressão da doença, isto é, transformação de astrocitomas de menor grau para um maior grau (OHGAKI E KLEIHUES, 2005a; FURNARI *et al.*, 2007). Os GBs primários e secundários são idênticos histopatologicamente, porém são entidades distintas da doença que se desenvolvem a partir de alterações moleculares diferentes e, atualmente acredita-se que a partir de precursores distintos (OHGAKI E KLEIHUES 2013).

**Tabela 1.1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma\*.**

Homens			Mulheres		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%	Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%	Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%	Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%	Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%	Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

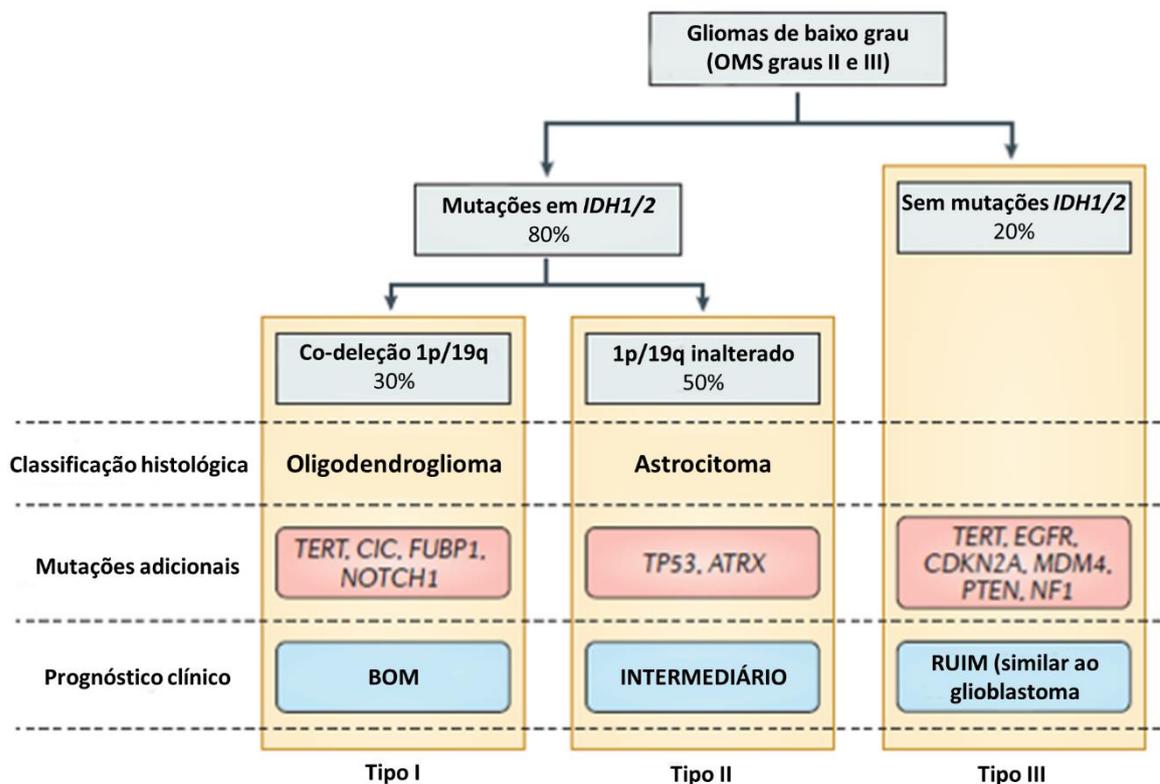
\*Números arredondados para múltiplos de 10.

O conjunto de tumores do sistema nervoso central (SNC) ocupam a décima posição, tanto em homens quanto em mulheres. Fonte: Estimativas - Incidência de câncer no Brasil do Instituto Nacional de câncer (INCA) de 2016.

Apesar dos esforços, o diagnóstico da doença ainda é baseado apenas em exames de imagem, principalmente ressonância magnética (RM). Os exames são realizados em indivíduos com suspeita de lesão intracraniana devido a alterações clínicas inespecíficas como mudança de personalidade, deficiências neurológicas, convulsão, dores de cabeça frequentes (WELLER 2011). Após a confirmação de uma neoplasia cerebral, a classificação é feita por análise histopatológica da biópsia do tumor ou após a ressecção cirúrgica do mesmo (ROSSEAU *et al.*, 2008). Os astrocitomas possuem grande heterogeneidade intra- e intertumoral, o que acarreta significativa controvérsia sobre a classificação histopatológica desses tumores. O critério histológico para a classificação não mudou significativamente desde a classificação da OMS de 2000, demonstrando a necessidade de marcadores moleculares para esses tumores. De acordo com a classificação de 2007, a identificação de anomalias moleculares deve complementar o diagnóstico histológico, além de auxiliar na classificação mais adequada e na compreensão da etiologia pouco conhecida desses tumores (ROSSEAU *et al.*, 2008). Em 2008, foram descritas mutações no gene *IDH1* em amostras de GB (PARSONS *et al.*, 2008). Eles observaram que as mutações se correlacionavam com pacientes mais jovens e com maior sobrevida. As IDHs são enzimas que participam da respiração celular, atuando na conversão do isocitrato em  $\alpha$ -ketoglutarato e  $\text{CO}_2$  liberando o NADH, uma etapa crucial do ciclo de Krebs (PRENSNER E CHINNAIYAN 2011). Muitos avanços foram feitos nas últimas duas décadas na identificação de alterações moleculares, e a identificação de alterações em *IDH1/2* (isocitrato desidrogenases), *ATRX* (do inglês,  *$\alpha$ -thalassemia/mental-retardation-syndrome-X-linked*), *TP53* e co-deleções de 1p/19q têm desempenhado um papel importante na classificação e prognóstico dos astrocitomas. *ATRX* é um gene relacionado ao remodelamento da cromatina e segregação de cromossomos na meiose. Alterações na sua expressão estão relacionadas a anormalidades características no

desenvolvimento. No câncer, podem estar associadas à instabilidade genômica, pois as mutações podem causar alongamento dos telômeros e alteração no padrão de metilação do DNA (HABERLER E WÖHRER 2014). Mutações no gene *IDH1* são muito comuns nos graus II e III (>80%), tanto em astrocitomas quanto em oligodendrogliomas, mas raras em GB primário (<5%) e ausentes no astrocitoma pilocítico (OHGAKI E KLEIHUES 2013). Mutações em *ATRX* e *TP53* são frequentes em astrocitomas graus II e III (86% e 94%, respectivamente), e raramente encontradas em oligodendrogliomas, enquanto codeleção de 1p/19q são frequentes em oligodendrogliomas (>75%) e raras em outros tumores (KIM *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2012, WELLER *et al.*, 2013). Sendo assim, essas mutações são consideradas mutuamente exclusivas e capazes de auxiliar na classificação dos gliomas (OMS graus II e III), diferenciando oligodendrogliomas (*IDH+*, codeleção 1p/19q) e astrocitomas (*IDH+*, *ATRX+* e *TP53+*). Estes tumores possuem um precursor comum e, muitas vezes, somente a classificação histopatológica não é capaz de diferenciá-los inequivocamente (OHGAKI E KLEIHUES, 2013; HABERLER E WÖHRER 2014; LOUIS *et al.*, 2014). Os gliomas difusos que não apresentam mutação em *IDH1/2*, *TP53* e perda de 1p/19q são chamados triplo negativos, representam 7% dos casos e são pouco compreendidos (KIM *et al.*, 2010). Pacientes com mutação em *ATRX* e *IDH1/2* apresentam prognóstico intermediário e pacientes que não possuem mutação em *IDH1/2* apresentam um pior prognóstico e acredita-se uma evolução mais rápida para GB (WIESTLER *et al.*, 2013; HABERLER E WÖHRER 2014). Esses estudos têm demonstrado como a classificação molecular associada à histopatológica pode aprimorar o diagnóstico, além de favorecer a compreensão da gliomagenese. Recentemente, mutações em *TERT* também foram descritas em gliomas (KILLELA *et al.*, 2013). *TERT* é o gene que codifica a telomerase, responsável pelo alongamento dos telômeros. Essas mutações são encontradas em 40% dos gliomas, sendo mais frequentes em oligodendrogliomas (72%) e GBs (69%) (YUAN *et al.* 2016). Os astrocitomas (graus II e III) apresentam apenas 24% dos casos com mutação em *TERT* (YUAN *et al.* 2016). Alguns estudos observaram que pacientes que possuem mutações em *TERT*, não apresentam mutações em *ATRX* (BRAT *et al.*, TCGA, 2015; CECCARELLI *et al.*, 2016). Acredita-se que esse fenômeno esteja associado ao fato de mutações em *ATRX*, frequentes nos astrocitomas de baixo grau, também levarem ao alongamento dos telômeros. Além disso, mutações em *TERT* são raras em GBs secundários e estão associadas a pior prognóstico (YUAN *et al.* 2016; Ceccarelli *et al.*, 2016). Estudo desenvolvido por Eckel-Passow e colaboradores (2015), dividiu os gliomas em grupos baseados nas mutações em *IDH*, *TERT* e co-deleção 1p/19q, eles observaram que os grupos mais frequentes são triplo-positivos (compostos principalmente por oligodendrogliomas), *TERT* positivos (compostos principalmente por

GBs) e *IDH* positivos (compostos principalmente por astrocitomas graus II e III), que também apresentam mutações em *ATRX* e *TP53*. A Figura 1.1 mostra as alterações moleculares identificadas nos gliomas e a relação com a classificação de gliomas de baixo grau.



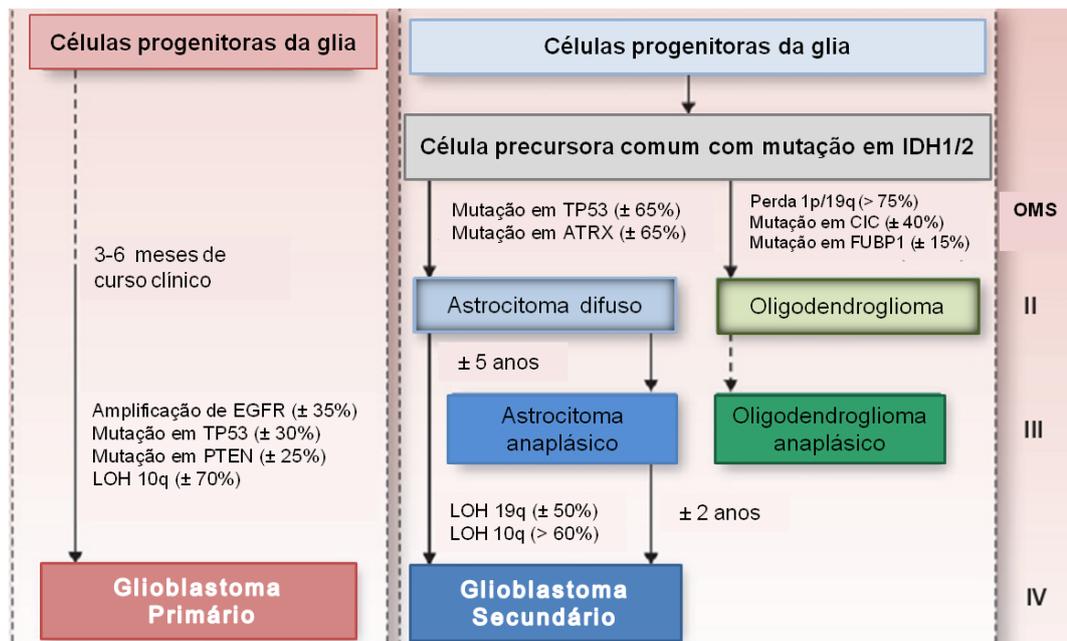
**Figura 1.1. Alterações moleculares e classificação de gliomas de baixo grau.** Diagnóstico integrado que engloba características moleculares, histopatológicas e a classificação da OMS. Adaptado de Wen e Reardons (2015).

Apesar dos avanços na identificação de marcadores moleculares, estes ainda não são utilizados na prática clínica devido à dificuldade em converter os dados moleculares em informação clínica relevante para o tratamento dos pacientes (LOUIS *et al.*, 2014). Todavia, Louis e colaboradores (2014) publicaram um “*guideline*” para diagnóstico integrado contendo a classificação da OMS, características histopatológicas e alterações moleculares, assinalando para uma classificação mais apropriada desses tumores.

### 1.1.1) Glioblastoma (GB)

O GB é o tumor cerebral primário maligno mais frequente (46,1%), representa 55-82% dos gliomas e de 12-15% de todos os tumores do SNC, dependendo da população estudada (OHGAKI E KLEIHUES, 2005b; OMURO E DEANGELIS 2013, OSTROM *et al.*, 2015). Nos Estados Unidos, a incidência é de 3.2 novos casos por 100.000 habitantes por ano (WELLER 2011, OSTROM *et al.*, 2015). Segundo o levantamento realizado pelo *CBTRUS Statistical Report* dos Estados Unidos são esperados 12.120 novos casos em 2016 e apenas

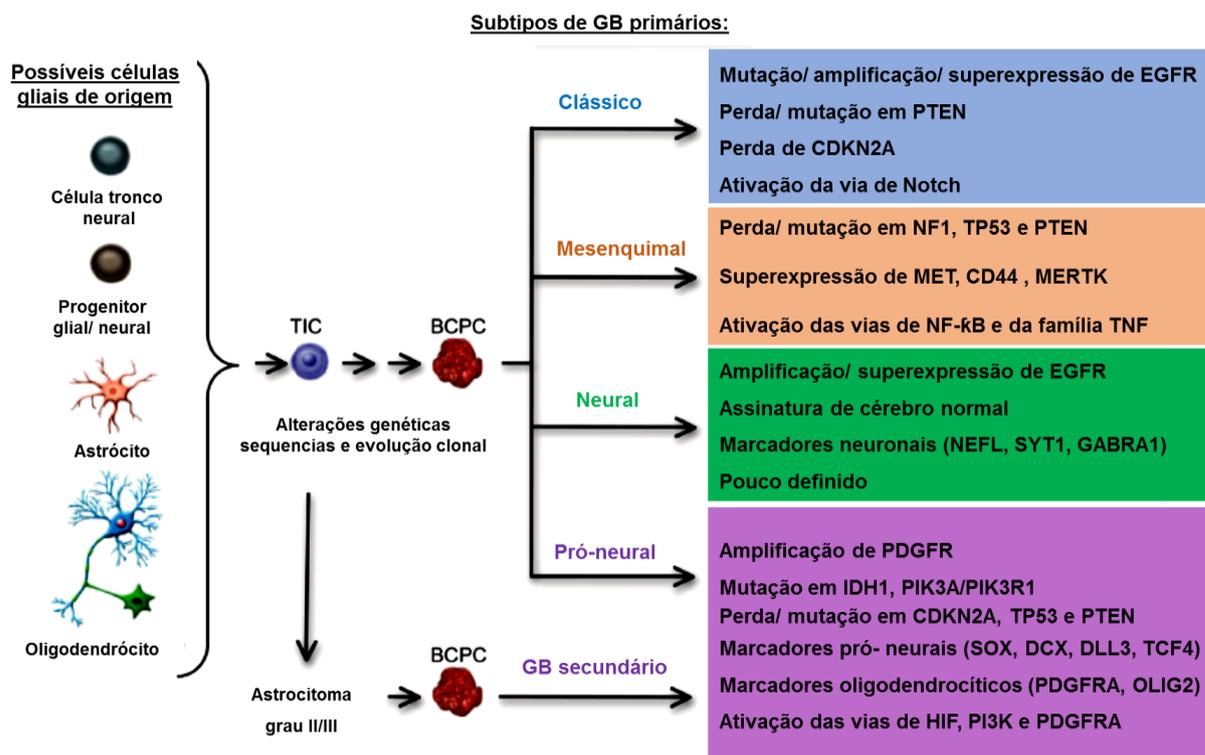
5,1% dos pacientes sobrevivem 5 anos após o diagnóstico (OSTROM *et al.*, 2015). O GB acomete principalmente adultos com idade média de 62 anos, variando entre 40-80 anos (OHGAKI AND KLEIHUES 2005b). A idade dos pacientes é o principal fator preditivo de sobrevida, onde pacientes idosos apresentam menor sobrevida. Os GBs primários acometem pacientes com idade média mais elevada (65 *versus* 45 anos) e possuem sobrevida média menor (4,7 *versus* 7,8 meses) quando comparados com os GBs secundários (OHGAKI E KLEIHUES 2007; FURNARI *et al.*, 2007). As primeiras alterações moleculares caracterizadas em GB foram: perda de heterozigose (LOH) do cromossomo 10q (LOH 10q), mutações em *TP53* e amplificação de EGFR (receptor de fator de crescimento epidérmico) (WATANABE *et al.*, 1996). LOH 10q é a alteração genética mais frequente em GBs primários e secundários e ocorre em 60-80% dos casos, apresentando associação com sobrevida mais curta (OHGAKI E KLEIHUES 2005 b). Mutações em *TP53* são mais frequentes em GB secundários quando comparados com os primários (65% *versus* 30%), enquanto superexpressão de EGFR (amplificação e/ou mutação) é encontrada principalmente em GB primário (60% *versus* 10%) (OHGAKI *et al.*, 2004; OHGAKI E KLEIHUES 2007). Posteriormente, mutações em *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) foram identificadas como mais frequentes em GBs primários comparados com os secundários (25% *versus* 4%). Entretanto, essas alterações não eram capazes de distinguir os GB primários dos secundários. Com a descoberta das mutações em *IDH1/2*, principalmente em *IDH1*, quase exclusivamente em GB secundário, foi possível compreender um pouco melhor a gliomagenese e melhor caracterizar esses subtipos (PARSONS *et al.*, 2008; OHGAKI E KLEIHUES 2013). Mutações em *IDH1* fornecem o prognóstico favorável para pacientes com GB em relação a pacientes com *IDH1* selvagem (3,8 anos *versus* 1,1 ano) (PARSONS *et al.*, 2008). Mutações em *IDH1/2* têm sido descritas em LMA e gliomas, e associadas à formação de um oncometabolito a  $\alpha$ -hidroxiglutarato (2HG) que promove alterações epigenéticas (PRENSNER E CHINNAIYAN 2011). Um estudo observou hipermetilação do DNA em astrócitos humanos transfectados com *IDH1* mutante, sugerindo que a mutação é suficiente para obter o efeito de hipermetilação observado nos GBs com mutação em *IDH* (TURCAN *et al.*, 2012). Visto que mutações em *IDH1* são consideradas eventos precoces no desenvolvimento dos gliomas difusos e, conseqüentemente, do GB secundário, precedendo deleção de 1p/19q e mutações em *TP53*, alterações epigenéticas emergem como importantes fatores no desenvolvimento desses tumores (OHGAKI E KLEIHUES 2013, WELLER *et al.*, 2013). A Figura 1.2 mostra o fluxograma das alterações moleculares envolvidas no desenvolvimento de GB primários e secundários.



**Figura 1.2 Fluxograma das vias moleculares conduzindo ao desenvolvimento de glioblastoma primário e secundário.** Glioblastoma primário se desenvolve *de novo*, sem uma lesão precursora pré-existente. Por outro lado, o glioblastoma secundário se desenvolve a partir de uma lesão menos maligna e, é caracterizado pelo acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. Algumas alterações são significativamente diferentes entre os glioblastomas primários e secundários. Adaptado de Ohgaki e Kleihues, 2013.

Parsons e colaboradores (2008) também demonstraram que algumas vias são frequentemente alteradas no GB como p53 (64%), RB1 (68%) e PI3K/PTEN (50%). Além disso, as mutações encontradas em cada amostra tumoral afetavam apenas um membro de cada via, sugerindo que são alterações mutuamente exclusivas (PARSONS *et al.*, 2008). O projeto “The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network” publicou em 2008 uma análise molecular de amostras de GB e observou valores similares ao estudo de PARSONS e cols. (2008), com alterações somáticas nas vias de RB (66%), p53 (70%) e RTK (59%). Além disso, 74% das amostras apresentaram alterações nas três vias, sugerindo que sejam determinantes para a patogênese do GB. Recentemente, uma divisão molecular dos GBs em 4 subtipos denominados proneural, neural, clássico e mesenquimal (Figura 1.3), foi proposta, baseando-se, principalmente, em alterações em PDGFRA, IDH1, EGFR e NF1, a partir de dados do TCGA (VERHAAK *et al.*, 2010; VAN MEIR *et al.*, 2010). O subtipo clássico é caracterizado por amplificação do cromossomo 7 e perda do 10, presentes em 95% dos casos. Altos níveis de amplificação de EGFR associados ao cromossomo 7 são frequentes nesse subtipo e raros nos demais. As amplificações de EGFR estão associadas as alterações em CDKN2A em 94% dos casos. Esse subtipo não possui alterações em NF1, PDGFRA, IDH1 e TP53. O subtipo mesenquimal é caracterizado por alterações em NF1. NF1 (neurofibromatose

1) é um gene supressor tumoral, envolvido na patogênese da neurofibromatose. 54% das amostras estudadas possuíam alterações em *NF1* e algumas co-mutações em *NF1* e *PTEN*. Esse subtipo apresenta marcadores mesenquimais como MET e superexpressão de genes das vias de TNF e NF-κB, provavelmente devido à alta necrose e ao infiltrado inflamatório. O subtipo proneural é caracterizado principalmente por mutações pontuais em *IDH1* e alterações em PDGFRA. Além dessas alterações, possuiu mutações e perda de heterozigidade em *TP53*, marcadores característicos do desenvolvimento pró-neural e marcadores oligodendrocíticos, tornando esse subtipo atípico. Está associado a melhor prognóstico, menor idade e a maioria dos casos são GBs secundários, o que está de acordo com a presença de mutações em *IDH1*. O subtipo neural possui marcadores neuronais, sendo similar ao cérebro normal, mas é o subtipo menos caracterizado. Um estudo realizado por Lin e colaboradores (2014) agrupou 941 casos de gliomas e mostrou que 33% seriam proneurais, 15% neurais, 20% clássicos e 32% mesenquimais, onde os dois últimos apresentaram pior sobrevida. Além disso, mostraram que a maioria dos gliomas graus II e III pertencem ao subtipo neural e, a maioria dos GBs (75%) aos subtipos mesenquimal e clássico, sendo este último de pior prognóstico. Apesar desse estudo ter mostrado uma correlação dos subtipos com prognóstico, outros grupos não observaram a mesma correlação (VERHAAK *et al.*, 2010, KIM *et al.*, 2011). Utilizando os dados sobre microRNAs em GB do TCGA, foi realizada uma divisão em 5 subgrupos, que apresentaram maior correlação com a sobrevida do que os subtipos baseados nas alterações gênicas (KIM *et al.*, 2011). Os subgrupos chamados de oligoneural, radial e astrocítico se correlacionaram com proneural, clássico e mesenquimal, respectivamente. Entretanto, de 20 a 50% dos GBs classificados geneticamente, foram realocados na divisão por microRNAs. O subtipo oligoneural apresentou melhor prognóstico e pacientes mais jovens. O subtipo astrocítico apresentou maior benefício com o tratamento com radiação e temozolamida (TMZ), além de apresentar superexpressão das JAK/STAT e NF-κB. Esse estudo sugeriu que os microRNAs são ferramentas importantes para a subclassificação dos GBs, permitindo um prognóstico mais acurado. Nesse contexto, compreender os fatores genéticos e epigenéticos envolvidos na patogênese dos gliomas é essencial para o desenvolvimento de terapias-alvo e para prever resposta ao tratamento, definindo qual grupo de pacientes se beneficiará de um determinado tratamento.



BCPC = brain cancer–propagating cells (células propagadoras do câncer)  
TIC = tumor initiating cells (células iniciadoras do tumor)

**Figura 1.3 Esquema resumido das alterações genéticas observadas na patogênese dos subtipos de glioblastoma (GB).** Algumas células do cérebro sofrem alterações genéticas, que levam a uma população de células tumorais de iniciação (TICs), que acumulam mais alterações genéticas e epigenéticas e se tornam células propagadoras do câncer (BCPC). Estas são responsáveis pela formação do GB. Adaptado de Van Meier *et al.*, 2010.

### 1.1.2) Tratamento

Atualmente, o esquema terapêutico completo consiste em ressecção tumoral cirúrgica máxima seguida por um curso de radioterapia (em torno de 60 Gy) por seis semanas com concomitante tratamento sistêmico com temozolamida (TMZ) na dose de 75mg/m<sup>2</sup> diariamente. Tal esquema é seguido por tratamento adjuvante por seis meses com TMZ administrado por cinco dias a cada 28 dias (STUPP *et al.*, 2005; OMURO E DEANGELIS 2013). Diversos estudos sugerem que a extensão da ressecção tem valor prognóstico (SANAI *et al.*, 2008). Entretanto, apesar dos avanços das técnicas utilizadas, a cirurgia não é capaz de promover a cura devido à alta capacidade das células tumorais em infiltrar o parênquima cerebral, promovendo uma sobrevida média de 12 meses (DRESEMANN 2010). A radioterapia fracionada com uma dose total de 54 a 60 Gy é realizada em frações de 1,8-2Gy e aumenta a sobrevida em torno de 3 meses (WELLER 2011; OMURO E DEANGELIS 2013). O papel do uso de quimioterápicos na sobrevida de pacientes com GB ainda é controverso,

diversos estudos não observaram diferença significativa em relação ao tratamento com a radioterapia devido, em parte, a dificuldade de acesso dos agentes citotóxicos ao SNC e quimiorresistência. Após um estudo clínico multicêntrico realizado por Stupp e cols. (2005), a TMZ foi aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) como tratamento de primeira linha do GB. O estudo comparou radioterapia isoladamente com o tratamento associando a radioterapia com a TMZ e mostrou que o uso de TMZ reduziu o risco de morte em 37%, aumentou a sobrevida em 2,5 meses e apresentou baixa toxicidade e alta tolerabilidade. A sobrevida global foi de 98% em 5 anos no grupo com TMZ contra 1,9% no grupo com radioterapia apenas. Todos os subgrupos clínicos se beneficiaram do tratamento combinado, incluindo pacientes idosos (60-70 anos). Apesar de o tratamento combinado aumentar a sobrevida, após 28 meses de seguimento, 84% dos pacientes evoluíram para o óbito (STUPP *et al.*, 2005; STUPP *et al.*, 2009).

A TMZ é um derivado da imidazotetrazina, absorvido rapidamente por via oral, capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE). A TMZ é transformada em condições fisiológicas na substância ativa MTIC (5-(3-metiltriazeno-1-il)imidazol-4-carboxamida), a qual possui atividade citotóxica. O MTIC atua como um agente alquilante, transferindo grupos metil ao DNA (NAJMAN E GADELHA, 2002). Dentre as lesões causadas no DNA, a metilação da guanina na posição O<sup>6</sup> representa apenas 5% dos adutos formados, mas é a responsável pela atividade citotóxica do fármaco (FRIEDMAN *et al.*, 2000). A formação de adutos pode levar a mutagênese e a *crosslinks* que levam ao bloqueio da replicação do DNA. A O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) é uma proteína de reparo de dano no DNA que remove esses adutos da posição O<sup>6</sup> da guanina, culminando com a proteção das células (PEGG *et al.*, 1990; ESTELLER *et al.*, 2004). Essa reação possui um custo energético elevado por consumir uma molécula de MGMT por lesão reparada, portanto a eficiência do reparo depende diretamente da quantidade de moléculas disponíveis e da taxa de síntese de novas proteínas (ESTELLER *et al.*, 2004). A administração diária de agentes alquilantes é capaz de reduzir os níveis de MGMT disponíveis, sensibilizando ao tratamento (BOBOLA *et al.*, 2010) e alguns estudos sugerem que tratamento prolongado com TMZ teria uma maior eficácia (Tolcher *et al.*, 2003). Entretanto, estudos clínicos que investigaram a superioridade do tratamento prolongado em relação ao tratamento padrão, falharam em comprovar essa superioridade (GILBERT *et al.*, 2013, BRADA *et al.*, 2010). O tratamento com TMZ é realizado nos pacientes independente do *status* de MGMT (JANSEN *et al.*, 2010). Alguns estudos clínicos têm mostrado que pacientes com o promotor de MGMT metilado se beneficiam ainda mais do tratamento com TMZ, sendo considerado um fator de melhor prognóstico (HEGI *et al.*, 2005, Gilbert *et al.*, 2013). Outros estudos têm mostrado que

metilação de MGMT é um fator de melhor prognóstico, independente do tratamento com TMZ (GERSTNER *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2011), inclusive em resposta a radioterapia (RIVERA *et al.*, 2010) e que os pacientes se beneficiam do tratamento com outros agentes alquilantes (ESTELLER *et al.*, 2000; MARTINEZ *et al.*, 2002; PAZ *et al.*, 2004; EVERHARD *et al.*, 2006). Sabendo-se que a TMZ aumenta a sobrevida em apenas 2,5 meses, o custo-benefício do tratamento com TMZ gera controvérsia entre especialistas (LINZ 2008; WOLFF *et al.*, 2008). A TMZ é bem tolerada pelos pacientes, apresentando menor toxicidade associado ao tratamento. Antes da TMZ, agentes alquilantes como as nitrosuréias, lomustina (CCNU), carmustina (BCNU) e nimustina (ACNU) e inibidores de topoisomerase como etoposídeo eram utilizados no tratamento do GB (WOLFF *et al.*, 2008). Um estudo mostrou que CCNU promove um aumento de 5,3 meses na sobrevida de pacientes com gliomas de alto grau (GB em sua maioria, 72%), ACNU, um aumento de 8,9 meses e BCNU não promoveu nenhum ganho detectável (WOLFF *et al.*, 2008). Um estudo clínico de fase III comparou regimes quimioterápicos adjuvantes após a radioterapia e mostrou que o tratamento com ACNU e teniposídeo (VM26) apresentou sobrevida média de 17,3 meses, 25% de sobrevida em 2 anos e toxicidade similar à apresentada pelo TMZ (WELLER *et al.*, 2003). Outro estudo retrospectivo comparando TMZ com BCNU, mostrou que a sobrevida global média foi maior no grupo TMZ (15,9 meses) em relação ao grupo BCNU (11,5 meses) ( $p < 0,02$ ). Entretanto, a sobrevida livre de doença não apresentou diferença. Bevacizumab associado à irinotecano foi utilizada como terapia de salvamento nos pacientes do grupo TMZ. Quando esses pacientes foram retirados da análise de sobrevida, não houve diferença entre os grupos, sugerindo que a maior sobrevida apresentada pelo grupo TMZ pode estar associada à terapia de salvamento e não a maior eficácia do fármaco (VINJAMURI *et al.*, 2009).

Outra dificuldade no tratamento dos GBs são as recidivas. Não existe protocolo padrão estabelecido, o tratamento pode ser cirúrgico, novas sessões de radioterapia seguida ou não por quimioterapia, dependendo das características clínicas e individuais do paciente e do tratamento recebido inicialmente. Aproximadamente 20-25% dos pacientes se beneficiam de uma nova cirurgia, sendo uma abordagem limitada dependendo da localização do tumor que pode comprometer áreas responsáveis por funções vitais (WELLER 2011; NIYAZI *et al.*, 2011). A quimioterapia, quando utilizada, é baseada nas nitrosuréias, em inibidores de topoisomerase como etoposídeo e teniposídeo ou em diferentes regimes contendo TMZ (DRESEMMAN 2010). Vários estudos tentam avaliar o valor de quimioterápicos convencionais como cisplatina (CDDP), o protocolo PCV (procarbazona, CCNU e vincristina), mas a eficácia encontrada é baixa e, é observada frequente toxicidade hematológica (GLASS *et al.*, 1997; SCHMIDT *et al.*, 2006; VAN DER SPEK *et al.*, 2008).

Em geral, o uso de quimioterapia atinge taxas de resposta inferiores a 15%, com benefício menor do que 3 meses de sobrevida (DRESEMANN 2010). As altas taxas de recidiva e progressão tumoral estão relacionadas a vários mecanismos de quimio e radiorresistência. Estudo realizado em pacientes com glioma de alto grau recidivado que não receberam quimioterapia previamente observou maior sobrevida livre de progressão no grupo de pacientes que receberam tratamento com TMZ por 5 dias do que pacientes que receberam o protocolo PCV ou TMZ por 21 dias (Brada *et al.* 2010). Novas investigações são necessárias para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficientes, pois apesar dos avanços obtidos até o momento, praticamente todos os pacientes apresentam progressão da doença ou recidiva e evoluem para o óbito (DRESEMANN 2010; NIYAZI *et al.*, 2011).

Estudos clínicos randomizados tentam mostrar o papel dos novos agentes alvo-específicos. Os inibidores de EGFR (cetuximabe, erlotinibe, gefitinibe, nimotuzumab) não apresentaram benefícios na maioria dos estudos (DESJARDINS *et al.*, 2009; NIYAZI *et al.*, 2011, WESTPHAL *et al.*, 2015). O inibidor de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), bevacizumabe (anticorpo monoclonal humanizado) apresentou 30% de resposta observada por exames de imagem e sobrevida livre de progressão encorajadora, tendo sido aprovado para uso em GB recidivado em alguns países (DESJARDINS *et al.*, 2009; WELLER 2011). Estudo clínico de fase III observou que o tratamento com bevacizumabe associado ao tratamento de primeira-linha aumentou a sobrevida livre de progressão, manteve a qualidade de vida dos pacientes com GB, mas não alterou a sobrevida global e aumentou os efeitos adversos (CHINOT *et al.*, 2014). Uma nova modalidade de tratamento está sendo testada baseada na administração de campos elétricos alternados, de baixa intensidade e frequência intermediária (200kHz) denominada TTFields (*tumor- treating fields*). Esse tratamento possui atividade antimetabólica que interrompe a divisão celular, levando a parada de ciclo celular e apoptose. Esse tratamento associado ao tratamento padrão com radioterapia e TMZ aumentou a sobrevida global e a sobrevida livre de progressão de maneira significativa (STUPP *et al.*, 2015).

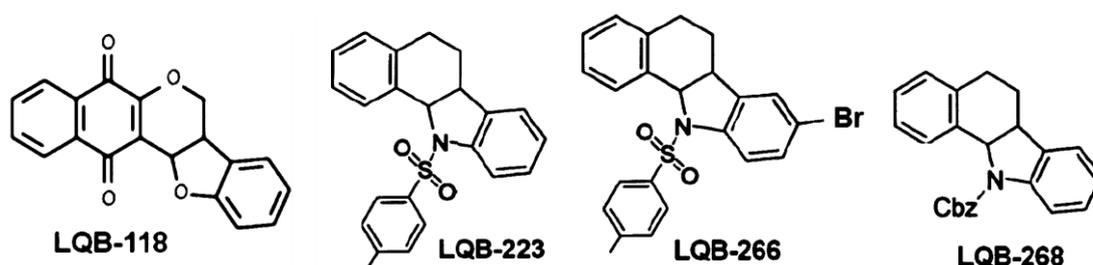
Apesar dos esforços e dos avanços obtidos no tratamento do GB que levaram ao aumento da sobrevida e melhora da qualidade de vida, a maioria dos pacientes evolui para o óbito. Diante desse cenário, nosso grupo tem estudado novos compostos com atividade antitumoral como potenciais agentes para o tratamento do GB.

## **1.2) Novos compostos sintéticos com atividade antitumoral**

Esforços têm sido empregados para o desenvolvimento de novos compostos com atividade antitumoral com menores efeitos adversos e com alta eficácia para o tratamento do

câncer. Nesse contexto, um novo grupo de moléculas foi sintetizado no Laboratório de Química Bio-orgânica (LQB), do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais (IPPN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob a coordenação do Prof. Paulo R. R. Costa. Esses compostos sintéticos denominados LQBs são relacionados estruturalmente ao lapachol (2-hidroxi-3-prenil-1,4-naftoquinona), uma naftoquinona. As naftoquinonas são encontradas amplamente na natureza e apresentam funções fisiológicas em plantas e animais e seus metabólitos secundários, como o lapachol, apresentam atividade antitumoral. Os novos compostos LQBs foram sintetizados pela primeira vez através de hibridização das naftoquinonas (lapachol) com o pterocarpano LQB-79 (um produto natural de isoflavonóides) e calafugina (DA SILVA *et al.*, 2002; COSTA, 2009). Dentre os compostos, a pterocarpanquinona, LQB-118 e o aza-deoxi-pterocarpano, LQB-223 (11a-N-Tosyl-5-deoxi-pterocarpano) apresentaram maior atividade antitumoral (NETTO *et al.*, 2010; BUARQUE *et al.*, 2011). O LQB-223 surgiu a partir de uma otimização do composto LQB-118. Primeiramente, foi sintetizado um composto dual, contendo os motivos quinona e fenilsulfonamida, com alta atividade antineoplásica (BUARQUE *et al.*, 2011). Em seguida, para avaliar se a sulfonamida era importante para a função antineoplásica desse composto, o radical quinona foi retirado, dando origem a compostos com baixa atividade. Entretanto o carbo-análogo, LQB-223, apresentou alta atividade antineoplásica, sendo a maior atividade observada entre os compostos testados em linhagens tumorais, como os LQBs, 266 e 268 (BUARQUE *et al.*, 2011; BUARQUE *et al.*, 2015). O LQB-223 possui atividade antineoplásica em linhagens leucêmicas com perfil de resistência a múltiplas drogas (MDR) (BUARQUE *et al.*, 2014), inibe a enzima topoisomerase I de *Plasmodium falciparum* e possui atividade anti-malarial em camundongos (CORTOPASSI *et al.*, 2014). O LQB-118 possui atividade anti-leishmaniose *in vitro* e *in vivo*, além da intensa atividade antineoplásica (RIBEIRO *et al.*, 2013, COSTA *et al.*, 2014). LQB-118 pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) através da redução do motivo paraquinona por enzimas mitocondriais, formando ânion superóxido, culminando em estresse oxidativo (NETTO *et al.*, 2010; SALUSTIANO *et al.*, 2010; DE SÁ BACELAR *et al.*, 2013). Nosso grupo demonstrou o efeito antitumoral do LQB-118 em amostras de sangue periférico de pacientes com LMA e em linhagens celulares de leucemias de origem mielóide com perfil MDR (MAIA *et al.*, 2011, DE SOUZA REIS *et al.*, 2013). O composto LQB-118 induziu morte celular por apoptose através da via intrínseca e da via de estresse de retículo endoplasmático e reduziu a expressão das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) XIAP e Survivina, sobrepujando os mecanismos de resistência (MAIA *et al.*, 2011; DE SOUZA REIS *et al.*, 2013; DE SÁ BACELAR *et al.*, 2013). Além disso, LQB-118 modulou a expressão e localização de diversos fatores de

transcrição como FOXO3a, FOXM1 e NF- $\kappa$ B, e inibiu a expressão de Akt, uma das proteínas reguladora desses fatores de transcrição, além de não possuir efeito tóxico para medula óssea de camundongos (NESTAL DE MORAIS *et al.*, 2014; DE FARIA *et al.*, 2015). Apesar do potencial antitumoral em neoplasias hematológicas, pouco é conhecido sobre o papel desses compostos em tumores sólidos e seu mecanismo de ação. Um estudo recente mostrou que o composto LQB-118 reduziu a expressão do mRNA de Myc e das ciclinas B1 e D1 e induziu a expressão de p21, promovendo parada de ciclo celular em G2/M, fenômeno que não foi observado em modelos de neoplasias hematológicas. Além da indução de morte celular e inibição da proliferação na linhagem celular de câncer de próstata PC3 (MARTINO *et al.*, 2014). Sabendo-se que o LQB-118 modula diversos fatores de transcrição que regulam morte e proliferação celular, entender a regulação de vias de sinalização ascendentes a esses fatores é importante para elucidação do mecanismo de ação do composto. Além disso, já foi demonstrado pelo nosso grupo que o LQB-118 promove alterações epigenéticas através da inibição dos miRNAs, miR-9 e miR-21, em linhagens de LMC (DE FARIA *et al.*, 2015). Dessa forma, a compreensão da regulação dessas vias pelo LQB-118 pode fornecer novas perspectivas para o tratamento dos gliomas.



**Figura 1.4** Estrutura química dos compostos sintéticos, LQB-118, LQB-223, LQB-266 e LQB-268.

### 1.3) Vias de sinalização celular

Diversas vias de sinalização regulam processos como proliferação, metabolismo, diferenciação, motilidade e morte celular e os RTKs são ativadores dessas vias. Conforme supracitado, alterações nesses receptores e vias de sinalização de sobrevivência celular são frequentes no gliomas, levando a ativação exacerbada ou, até mesmo, constitutiva dessas vias (PARSONS *et al.*, 2008; TCGA 2008). As vias de PI3K/Akt e MAPKs (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*) são amplamente estudadas no câncer e, mutações e ampliações nos receptores, nas proteínas mediadoras e inativação de reguladores dessas vias favorecem o crescimento e sobrevivência tumoral (DE LUCA *et al.*, 2012). As vias de PI3K/Akt e MAPKs regulam uma à outra através de *crosstalks*. Acredita-se que, fisiologicamente, um dos papéis

dessas interligações entre as vias é, em situações de escassez de fatores de crescimento, levar a uma amplificação do sinal de sobrevivência e proliferação celular (AKSAMITIENE *et al.* 2012). Por outro lado, em altas concentrações, pode ocorrer uma inibição da sinalização, evitando uma ativação exacerbada dessas vias. Essa inter-regulação é mediada por mecanismos de retroalimentação positiva e negativa, além da amplificação do sinal (AKSAMITIENE *et al.*, 2012). Dentre os mecanismos de retroalimentação positiva estão a ativação de PI3K que leva ao recrutamento de proteínas adaptadoras capazes de ativar Ras, que por sua vez é capaz de ativar PI3K (AKSAMITIENE *et al.*, 2012). Por outro lado, Akt inibe Raf, e ERK, e fosforila proteínas adaptadoras que recrutam PI3K, inibindo sua ativação, formando uma alça de retroalimentação negativa (DE LUCA *et al.*, 2012). As vias de PI3K e MAPK possuem diversos alvos em comum, os fatores de transcrição cMyc, NF- $\kappa$ B e membros da família FoxO, a proteína pró-apoptótica BAD, o GSK3 (glicogênio sintase quinase 3), demonstrando a redundância dessas vias (MENDOZA *et al.*, 2011), conforme ilustrado na Figura 1.5.

A via de PI3K tem como principal mediador, a proteína Akt também chamada de PKB (proteína quinase B). A PI3K está associada aos receptores de membrana e quando ativada gera PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5 - trifosfato), promovendo a ativação de Akt. A Akt é uma serina treonina quinase e sua ativação depende da fosforilação de resíduos de serina e treonina na molécula. A Akt possui mais de 40 alvos que estão envolvidos com promoção da sobrevivência celular através da inibição da apoptose, indução de proliferação celular, angiogênese. A inativação dessa via é mediada, principalmente, por PTEN que promove a conversão de PIP3 em PIP2 (fosfatidilinositol 4,5 - bifosfato) através da sua função de fosfatase.

A via das MAPKs consiste de uma cascata de fosforilação e ativação baseada em uma tríade de quinases. A via é ativada por fatores de crescimento, citocinas, hormônios, os quais se ligam aos seus receptores tirosina quinase (RTKs), que recrutam proteínas adaptadoras intracelulares capazes de ativar GTPases. A GTPase mais estudada é a Ras, que torna-se ativa quando ligada a GTP e inativa quando ligada à GDP. Uma vez ativa, ela dispara a cascata das MAPKs, mediando a fosforilação da MAP quinase quinase quinase (MAPKKK), que fosforila e ativa uma MAP quinase quinase (MAPKK), que por fim, leva a fosforilação dual nos resíduos de tirosina e treonina de uma quinase final ou efetora (MAPK) (MENDOZA *et al.*, 2011.) As MAPK efetoras se ligam ao substrato e fosforilam resíduos de treonina e serina. Essas vias são reguladas por fosfatases que inativam as quinases através da desfosforilação. Existem três vias principais das MAPKs: p38, JNK (do inglês, *c-Jun N-terminal kinase*) e ERK (do inglês, *extracellular signal-regulated kinase*). A via de ERK é constituída por Ras

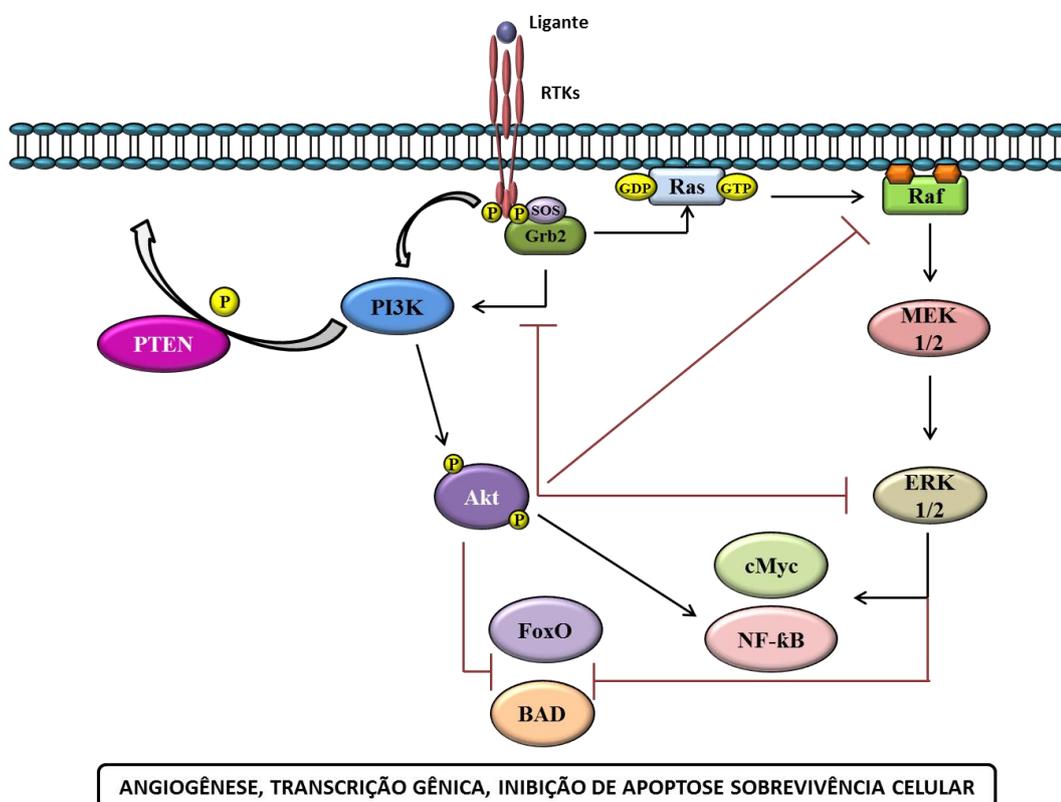
(GTPase) - Raf (MAPKKK) – MEK (MAPKK) – ERK (MAPK). Uma vez ativada, ERK é capaz de fosforilar proteínas citoplasmáticas, além de translocar para o núcleo levando a ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B, cMyc e inibição de membros da família de fatores de transcrição FoxO (MENDOZA *et al.*, 2011).

As vias de PI3K/Akt e MAPK são ativadas por diversos fatores de crescimento como EGF, PDGF e VEGF através da ativação de seus receptores (EGFR, PDGFR e VEGFR). A frequente mutação em PTEN e superexpressão de EGFR e PDGFR nos GBs contribui para a constante ativação dessas vias de sinalização, estando envolvidas com a resistência ao tratamento. Mutações em EGFR e PDGFRA são importantes para a nova subclassificação proposta para os GBs, mostrando a importância dessas vias (VERHAAK *et al.*, 2010). Além disso, 50% dos pacientes possuem mutações na via PI3K/Akt e 69% em vias associadas a RTKs (Parsons *et al.*, 2008; TCGA, 2008). A ativação da via de MAPKs e PI3K/Akt está associada a um pior prognóstico em diversas neoplasias, incluindo câncer de mama, leucemia mielóide aguda, carcinoma gástrico e adenocarcinoma ductal pancreático (NAM *et al.*, 2003; MIN *et al.*, 2003; SCHMITZ *et al.*, 2004; YAMAMOTO *et al.*, 2004; WONG *et al.*, 2007). Estudos demonstraram correlação significativa entre os níveis de fosforilação de Akt e pior prognóstico em amostras de pacientes com glioma tratados com radioterapia, além de ser um fator independente de pior prognóstico (CHAKRAVARTI *et al.*, 2004; SUZUKI *et al.*, 2010). Mutações em PI3K são fatores de pior prognóstico em gliomas difusos com mutação em *IDH*, *ATRX* e *TP53* (DRAAISMA *et al.*, 2015). Inibidores de EGFR, PI3K e Akt são capazes de sensibilizar linhagens de GB, inibindo a proliferação celular (LI *et al.*, 2009; CHAUTARD *et al.*, 2010). A inibição da via de Akt é capaz de induzir apoptose, inibir a formação de neuroesferas, a invasividade e motilidade de células-tronco tumorais, além de sensibilizar ao tratamento com TRAIL, o que não foi observado para a via das MAPKs (SHRADER *et al.*, 2007; EYLER *et al.*, 2008). Entretanto, o uso de inibidores de EGFR e PDGFR, isoladamente, para o tratamento dos GBs têm apresentado resultados modestos nos estudos clínicos (WONG *et al.*, 2007; NIYAZI *et al.*, 2011).

Inibidores de PI3K muitas vezes não são capazes de induzir apoptose, sugerindo que a inibição de uma única via pode conduzir a ativação de vias alternativas, visto que a interação entre as vias promove um sistema compensatório, permitindo evasão da apoptose (FAN E WEISS 2011). Estudos em câncer de mama mostraram que o bloqueio de MEK e de EGFR levou a ativação de Akt, assim como a inibição de Akt levou a ativação de ERK mediada pela ativação de HER-2. Além disso, a inibição de MEK, HER-2 e PI3K, em associação, teve um maior efeito antitumoral do que os tratamentos isolados (NORMANNO *et al.*, 2006; SERRA *et al.*, 2011). Um estudo desenvolvido por Cong e colaboradores (2013) mostrou que o uso de

inibidores de MEK e PI3K, concomitantemente, reduziu a viabilidade celular de linhagens de GB. Estudos *in vivo* mostraram que Ras e Akt, isoladamente, não são capazes de promover a formação de GB, entretanto a associação de ativação constitutiva de Raf e de Akt é capaz de induzir gliomagenese (LO 2010). Combinação de erlotinibe (inibidor de EGFR) com sorafenib (inibidor de múltiplas quinases, VEGFR2, PDGFR e RAF) e de erlotinibe com U0126 (inibidor de MEK) possuem efeito sinérgico em células iniciadoras de gliomas em culturas 3D (SHINGU *et al.*, 2016). Estratégias que combinam a inibição das vias de ERK e PI3K, simultaneamente, têm se mostrado mais eficiente para o tratamento dos gliomas.

Além do envolvimento de Akt e ERK na regulação de proteínas citoplasmáticas e fatores de transcrição, a ativação dessas quinases é capaz de alterar o perfil de expressão de diversos microRNAs, podendo também, ser regulada pelos mesmos (ZHOU *et al.*, 2010).



**Figura 1.5. Esquema simplificado das vias de sinalização de PI3K/ Akt e MAPKs.** As vias são ativadas por receptores tirosina quinase (RTKs), que disparam uma cascata de sinalização mediada por proteínas quinases que fosforilam diversos substratos citoplasmáticos e nucleares tais como fatores de transcrição, promovendo a proliferação celular, inibição de apoptose e angiogênese. No esquema estão representadas as interações de retroalimentação positiva e negativa entre as vias e alguns dos alvos compartilhados por ambas as vias.

#### 1.4) microRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes, possuem de 18-24 nucleotídeos de tamanho, que inibem a expressão gênica no nível pós-transcricional. Eles se ligam aos RNAs mensageiros (mRNAs) alvo inibindo a sua tradução. O mesmo miRNA possui diversos mRNAs alvos, alterando a expressão de diversas proteínas, direta e indiretamente. Esses miRNAs estão envolvidos em diversos processos celulares como a regulação da apoptose, diferenciação e proliferação celular e encontram-se desregulados em diversas doenças, como o câncer (DRAKAKI E ILIOPOULOS, 2009). Os miRNAs foram descritos pela primeira vez em 1993 no nematódeo *Caenorhabditis elegans* por Lee e colaboradores. Apenas em 2002, um estudo realizado por Calin e cols. em leucemia linfóide crônica associou diretamente os miRNAs ao câncer. Atualmente, cerca de 1400 microRNAs foram identificados em humanos e acredita-se que mais de 60% dos mRNAs são regulados por miRNAs, podendo ser a maior forma de regulação pós-transcricional identificada (JANSSON E LUND; 2012). Os miRNAs são considerados mecanismos epigenéticos, os quais constituem uma forma especial de regulação da expressão gênica que complementa a regulação associada à sequência do DNA. As modificações epigenéticas são consideradas reversíveis por não alterarem a sequência de nucleotídeos no DNA (USHIJIMA, 2005; RANDO, 2006). O termo epigenética foi introduzido na década de 1940 por Conrad e Waddington e inclui, além dos miRNAs, a metilação do DNA e as modificações das histonas.

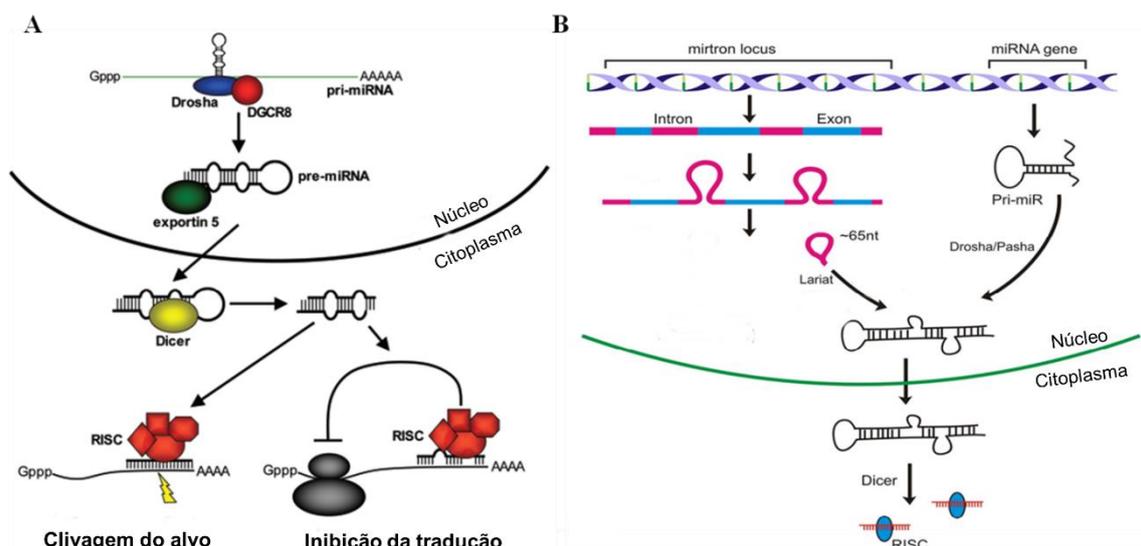
Os genes que codificam os miRNAs são transcritos, principalmente, pela RNA polimerase II (DALMAY 2008). Entretanto, miRNAs codificados por longos *clusters* são transcritos pela RNA polimerase III (WINTER *et al.*, 2009). miRNAs estão localizados em regiões intrônicas, intergênicas ou, até mesmo, em exóons. O transcrito primário é chamado pri-miRNA e possui um CAP na região 5' terminal e é poliadenilado na região 3' terminal de forma similar aos mRNAs. Muitas vezes os pri-miRNAs contêm diversos miRNAs maduros em forma de *clusters*. Os pri-miRNAs são clivados ainda no núcleo pela endonuclease, RNase tipo III, Drosha, e o produto da clivagem é um ou mais (em caso de *clusters*) miRNAs precursores (pre-miRNAs) (GREGORY E SHIEKHATTAR, 2005). A enzima Drosha forma um complexo nuclear chamado de microprocessador com a proteína DGCR8 (DiGeorge critical region 8) que possui domínio de ligação ao RNA dupla fita e é essencial para o processamento dos miRNAs pela Drosha (IORIO E CROCE 2012). Os pre-miRNAs possuem a forma de um grampo e são exportados para o citoplasma pela exportina 5 (XPO5). No citoplasma, esses precursores são clivados por outra endonuclease, RNase III Dicer, dando origem a um miRNA fita dupla (duplex miRNA). O processamento citoplasmático pela Dicer é mediado por um complexo de proteínas chamado RLC (RISC loading complex) composto

pela própria Dicer, pela proteína de ligação ao RNA dupla fita TRBP, pela proteína PACT (protein activator of PKR), e pelo componente central, as proteínas argonauta (Ago), principalmente Ago2. Embora não seja essencial para a função endonucleásica de Dicer, TRBP e PACT estabilizam Dicer e auxiliam no recrutamento de Ago2 (WINTER *et al.*, 2009). Após clivagem do pre-miRNA pela Dicer, o complexo se dissocia do miRNA maduro, agora fita dupla. A fita funcional do miRNA é incorporada, pelas proteínas Ago, no complexo proteico efetor chamado complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), guiando o complexo até o mRNA alvo. A ligação do miRNA às proteínas Ago é dependente de ATP e mediada pela maquinaria de chaperonas, HSC70/HSP90 (IWASAKI *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2015). Para formar esse complexo as fitas do miRNA maduro tem que ser separadas, uma será a fita guia funcional e a outra a fita passageira, que é degradada, também tratada como miRNA\* (estrela). Essa separação pode ser feita por helicases ou, em alguns casos, as proteínas Ago clivam a fita passageira, ativando RISC. A seleção da fita funcional depende de estabilidade termodinâmica dos pares de base nas regiões terminais da dupla fita, a fita de miRNA com menor estabilidade na região terminal 5' é carregada pelo RISC, enquanto a outra é degradada (WINTER *et al.*, 2009). Contudo, esse processo não é completamente compreendido, e estudos têm mostrado que a fita estrela do miRNA pode ser funcional (YANG *et al.*, 2011). O miRNA maduro associado ao RISC se liga às mRNAs que possuem sequências complementares (sítio alvo do miRNA), predominantemente na região 3'UTR (do inglês, *untranslated region*). Se o miRNA for capaz de se anelar ao sítio alvo com pareamento praticamente perfeito (raro em mamíferos), RISC irá promover a clivagem do mRNA alvo através da clivagem do CAP e/ou da calda poli-A (deadenilação). Se o pareamento for imperfeito ocorrerá a inibição da tradução ou desestabilização do mRNA (DALMAY 2008; GREGORY E SHIEKHATTAR, 2005). As proteínas Ago são essenciais para a biogênese e atividade dos miRNAs e são as proteínas efetoras no complexo RISC. A degradação, desestabilização ou inibição da tradução do mRNA é mediada por Ago. Além disso, o aumento dos níveis do mRNA alvo de um determinado miRNA, leva ao aumento da associação do miRNA ao RISC, o que se correlaciona positivamente com maior inibição do mRNA (FLORES *et al.*, 2014).

Pouco é conhecido sobre a meia-vida e degradação desses RNAs e diversos estudos tentam elucidar esses mecanismos. Li e cols (2013) demonstraram que miRNAs mais estáveis possuem um rápido *turnover* e, miRNAs mais instáveis possuem um *turnover* lento, sugerindo que miRNAs com rápida produção, possuem rápido *turnover* e, miRNAs com produção lenta, possuem *turnover* lento. Além disso, a estabilidade dos miRNAs é regulada por diversos fatores como quantidade e tipo de nucleotídeos que formam o miRNA, fatores de

transcrição e RNAs alvo, todos atuando de maneira tipo celular-dependente. A estabilidade exerce papel importante na regulação da função dos miRNAs. Recentemente, foi demonstrado que a maioria dos miRNAs possuem uma meia-vida maior do que 18 horas, apresentando um *turnover* lento (GUO *et al.*, 2015). Cerca de 12% dos miRNAs apresentam um *turnover* rápido, apresentando meia-vida entre 1 hora e 4 horas, a maioria desses miRNAs pertence aos miRNAs\*. Além disso, existem isoformas do mesmo miRNA com meia-vida diferentes. Em alguns casos, as isoformas mais abundantes apresentam menor meia-vida e as isoformas menos abundantes apresentam maior estabilidade (GUO *et al.*, 2015). Tanto as isoformas de rápida degradação quanto as mais estáveis são encontradas associadas a Ago. Entretanto, a associação a HSP90 independe da meia-vida, mas nem todos os miRNAs dependem de HSP90 para ligação a Ago (GUO *et al.*, 2015).

Além da via canônica de biogênese descrita acima, atualmente têm sido descritas outras vias de formação dos miRNAs como os miRtrons (Fig. 1.6). Alguns pré-miRNAs estão localizados em íntrons de genes que codificam proteínas, e são produzidos a partir de pequenos íntrons em grampo chamados miRtrons. Os miRtrons são resultado de *splicing* e desramificação do mRNA. A maquinaria de processamento do mRNA define o final do miRtron e após sua linearização pela enzima *Lariat debranchase* ele adota a estrutura de grampo característica dos pre-miRNAs. Nessa via, não há etapa de processamento por Drosha, mas o pre-miRNA formado também é exportado para o citoplasma pela XPO5, então, seguindo o mesmo curso da via canônica (KROL *et al.*, 2010). Os miRtrons constituem 5-10% dos genes de miRNAs em invertebrados e vertebrados, mas são expressos em níveis bem menores do que o miRNAs da via canônica (OKAMURA *et al.*, 2008).



**Figura 1.6. Esquemas mostrando as vias de biogênese de microRNAs.** (A) Esquema descrevendo a via canônica de formação dos miRNAs. (B) Esquema mostrando as diferenças entre a via canônica de biogênese dos miRNAs e a geração dos miRtrons. Adaptado de NAQVI *et al.*, 2009.

#### 1.4.1) miRNAs e câncer

No estudo das neoplasias, os miRNAs assim como os genes e proteínas têm sido classificados em supressores tumorais ou oncogênicos, os oncomiRs (ZHANG *et al.*, 2007). Estudos demonstraram que deleções em regiões gênicas que codificam miRNAs que regulam a expressão de oncogenes, de proteínas inibidoras da apoptose, levam à redução da expressão desses miRNAs considerados supressores tumorais. Por outro lado, ampliações em regiões que codificam miRNAs que regulam genes supressores tumorais, proteínas pró-apoptóticas, levam a superexpressão desses oncomiRs (CALDAS E BRENTON 2005; FARAZI *et al.*, 2011). Estudos com modelos animais mostraram relação causal entre a desregulação da expressão de miRNAs e o desenvolvimento de tumores (KUMAR *et al.*, 2007; IORIO E CROCE, 2012). Atualmente, estudos tem relacionado os miRNAs com a resistência ao tratamento em diversas neoplasias (WEIDHAAS *et al.*, 2007; VISIONE E CROCE 2009; POGRIBNY *et al.*, 2010, MAGEE *et al.*, 2015). Diversos miRNAs têm sido descritos como moduladores da quimio e radiorresistência nos gliomas (KOSHKIN *et al.*, 2013; LOW *et al.*, 2013; TEZCAN *et al.*, 2014), como fatores indicadores de prognóstico e a desregulação desses pequenos RNAs possui implicações clínicas (MIZOGUCHI *et al.*, 2013; KOSHKIN *et al.*, 2013; LOW *et al.*, 2014). Resultados, *in vitro* e *in vivo*, sugerem que os miRNAs são eficientes para o tratamento do câncer, sendo potenciais alvos terapêuticos, mas ainda existe uma grande lacuna entre as informações dos miRNAs da pesquisa básica e as suas aplicações clínicas (IORIO E CROCE 2011; ODJÉLÉ *et al.*, 2012; HERMANSEN E KRISTENSEN,

2013). Diversas ferramentas têm sido criadas para reexpressar miRNAs regulados negativamente, assim como, para inibir miRNAs superexpressos, de forma a restabelecer a homeostase dessas moléculas no organismo. Em 2013, teve início o primeiro estudo clínico de fase I para testar um mimético de miR-34a em pacientes com câncer de fígado não operável, permitindo avaliar a segurança do medicamento, a distribuição sistêmica e efeitos independentes dos alvos diretos desse miRNA (FAROOQI *et al.*, 2015).

Os miRNAs além de apresentarem novas perspectivas para o tratamento de diversos tipos tumorais, se apresentam como potenciais biomarcadores para auxiliar na classificação e diagnóstico dos astrocitomas, visto que os exames de imagem e a histopatologia não são suficientes para distinguir precisamente os gliomas. Conforme descrito anteriormente, uma subclassificação foi proposta para os GB em neural, proneural, mesenquimal e clássica de acordo com marcadores genéticos. A partir dessa classificação, diversos estudos têm mostrados que os miRNAs também possuem uma assinatura complementando essa subclassificação ou estratificando em grupos de alto e baixo risco, de melhor ou pior prognóstico (YAN *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2014; BARBANO *et al.*, 2014). Estudos realizados em amostras de pacientes, comparando a expressão de miRNAs nos astrocitomas com amostras de indivíduos saudáveis, detectaram diversos miRNAs diferencialmente expressos, dentre eles, o miR-210 (MALZKORN *et al.*, 2009; RAO *et al.*, 2010; WUCHTY *et al.*, 2011, LI *et al.*, 2013a). Além disso, Rao e colaboradores foram capazes de diferenciar astrocitoma anaplásico de GB com uma acurácia de 94,8%, baseados na expressão de 23 miRNAs. Niyazi e colaboradores (2011) conseguiram com uma assinatura de 30 miRNAs separar os pacientes com GB em dois grupos de acordo com a sobrevida: curta e longa e outro estudo baseado em 10 miRNAs separaram em grupo de alto e baixo risco (SRINIVASAN *et al.*, 2011).

A descoberta de miRNAs circulantes tornou-se uma grande promessa científica, pois apresentam grande estabilidade na circulação e resistência à estocagem, às condições extremas de pH, ao aquecimento e descongelamento e à degradação enzimática, sendo considerados potenciais biomarcadores não invasivos (GILAD *et al.*, 2008; MITCHELL *et al.*, 2008). Diversos estudos sugerem que os miRNAs circulantes são derivados da morte celular, de microvesículas e da via de sinalização célula-célula através de transferência por exossomos (VALADI; 2007; KOSAKA, 2010, DE SOUZA *et al.*, 2015). Além disso, miRNAs podem ser transferidos entre as células de gliomas e células adjacentes através de *gap junctions* (KATAKOWSKI; 2010). Os miRNAs circulantes têm se tornado ferramentas para o diagnóstico (CHAKRABORTY *et al.*, 2016), possuem papel prognóstico (CHENG *et al.*, 2011; CHO *et al.*, 2011), no monitoramento dos efeitos terapêuticos e também na predição de recorrência em diversas neoplasias como melanoma (MA *et al.*, 2012; STARK *et al.*,

2015). Os miRNAs são detectáveis no sangue periférico em níveis equivalentes ao observado nas amostras do tumor (MITCHEL *et al.*, 2008; SKOG *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2013b). Diferentes miRNAs foram detectados no plasma de pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células com elevada taxa de sensibilidade (SHEN *et al.*, 2011). Um estudo avaliando miRNAs do sangue periférico de 20 pacientes com GBM, identificou uma assinatura específica composta por 52 miRNAs (ROTH *et al.*, 2011). Outro estudo também identificou diferença marcante entre o perfil de expressão dos miRNAs no soro dos pacientes quando comparado com amostras controle de indivíduos saudáveis antes e após a retirada cirúrgica dos tumores (YANG *et al.*, 2012).

Dentre os miRNAs avaliados nesses estudos, alguns são objeto de estudo do nosso grupo em linhagens celulares, como os miRNAs associados a progressão dos gliomas e resistência ao tratamento, miR-7, miR-143 e miR-210. O miR-7 é considerado um miRNA supressor tumoral encontrado em altos níveis no cérebro normal e inibido em amostras de GB, enquanto o miR-210 encontra-se superexpresso nos gliomas de alto grau e em condições de hipóxia. Esses miRNAs regulam vias de proliferação celular e proteínas envolvidas com a regulação do ciclo celular, sendo importantes alvos no tratamento dos gliomas.

#### **1.4.2) miR-7**

O miR-7 é considerado um supressor tumoral e encontra-se regulado negativamente em neoplasias como câncer de pulmão, urotelial e GB (KEFAS *et al.*, 2008; VEERLA *et al.*, 2009; XIONG *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2011). Ele é codificado por genes localizados nas regiões intrônicas, que originam o pri-miR-7-1 e o pri-miR-7-3, e na região intergênica, que origina o pri-miR-7-2. Um estudo separou alguns tipos tumorais em *clusters* pela expressão diferencial de miRNAs, dentre eles o miR-7 foi considerado característico do SNC (CHOU *et al.*, 2010). Corroborando esse dado, sua expressão é maior no cérebro do que em outros tecidos normais como mama e pulmão (GAUR *et al.*, 2007; WEBSTER *et al.*, 2009).

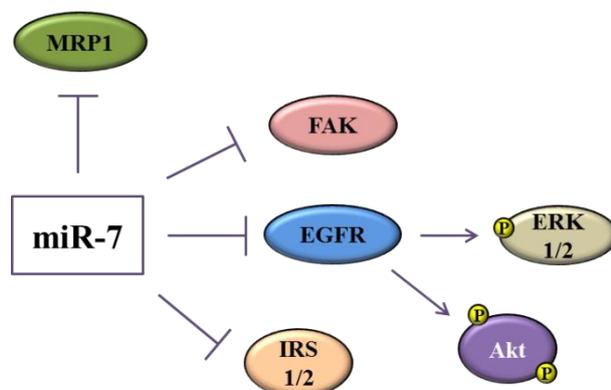
O miR-7 regula diretamente a expressão de EGFR, Raf1 (uma das proteínas da via de EGFR), IGF-1R e a via de Akt de maneira dependente e independente de EGFR, esta última através da inibição direta das proteínas IRS1 e IRS2 (*insulin receptor substrate 1 /2*) (KEFAS *et al.*, 2008; WEBSTER *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2014). Estudos mostraram que a superexpressão do miR-7 aumenta a apoptose através da inibição de Bcl-2 e survivina (proteínas anti-apoptóticas) e ativação das caspases 3 e 7, reduz a viabilidade celular, migração e a invasividade de linhagens de GB (LU *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013), de câncer de pulmão e de câncer de mama (REDDY *et al.*, 2008; KEFAS *et al.*, 2008). Essas alterações são mediadas pela inibição de FAK (quinase de adesão focal), pela redução da

expressão da metaloproteinases (MMPs) 2 e 9 e de Pak-1 (*p21-activated Kinase 1*), e pela redução da fosforilação de ERK e Akt através da ligação e inibição direta de EGFR pelo miR-7 (REDDY *et al.*, 2008; KEFAS *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2011; XIONG *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2013). miR-7 inibe formação de colônia e metabolismo da glicose através da inibição de IGF-1R e pAkt em linhagens de GB ( WANG *et al.*, 2014). Em tumor de ovário, miR-7 está inibido em amostras de metástase em relação ao tumor primário e sua indução inibe migração, invasão e reverte a transição epitélio-mesenquimal (EMT) (ZHOU *et al.*, 2014). Além disso, miR-7 é capaz de inibir a proliferação celular de células HUVEC, angiogênese, crescimento tumoral e formação de metástase, *in vivo*, em modelo de neuroblastoma, GB e câncer de pulmão não pequenas células (NSCLC) (LU *et al.*, 2011; XIONG *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2013; BABAE *et al.*, 2014).

Contudo, os dados sobre a atuação do miR-7 como supressor tumoral têm gerado controvérsias na literatura. O miR-7 é induzido por EGFR através da via Ras/ERK/Myc e sua superexpressão aumenta a quimiorresistência *in vitro*, e a proliferação celular e o crescimento tumoral *in vivo*, aumentando o potencial oncogênico de células de câncer de pulmão (CHOU *et al.*, 2010; HONG *et al.*, 2016). Esses estudos sugerem que possa existir uma via de regulação entre EGFR e miR-7 e o seu balanço irá determinar o papel do miRNA como supressor tumoral ou como um fator oncogênico. Outra explicação se baseia no fato de EGF (fator de crescimento epidérmico - ligante de EGFR) ser capaz de estimular apenas o precursor pre-miR-7-1, sugerindo que talvez a via ativada dependa do precursor induzido. O tecido tumoral apresenta maiores níveis de expressão de miR-7 do que o tecido normal adjacente em amostras de adenocarcinoma e de carcinoma de células escamosas (CHOU *et al.*, 2010). Estudo em câncer de mama mostrou que a expressão de miR-7 se correlaciona positivamente com o tamanho tumoral, grau patológico e menor tempo para formação de metástase distante em amostras de pacientes positivos para receptor de estrogênio e negativos para linfonodos (ER+/LNN-) (FOEKENS *et al.*, 2008). Outro estudo mostrou que miR-7 induz proliferação e migração celular em linhagens de tumores de origem epitelial e formação de tumor com redução de p21 e aumento de ciclina D1, *in vivo*, através da inibição direta do supressor tumoral KLF4 (MEZA-SOSA *et al.*, 2014). Além de ser fator de pior prognóstico em câncer colorretal (SUTO *et al.*, 2015)

No contexto de resistência ao tratamento, a superexpressão de miR-7 é capaz de sensibilizar linhagens de câncer de mama ao tratamento com trastuzumabe (HUYNH E JONES, 2014), além de radiosensibilizar linhagens de câncer de mama, câncer de pulmão e GB que possuem EGFR e a via de PI3K/Akt ativadas (LEE *et al.*, 2011). Estudo com as linhagens de câncer de mama, MCF-7 e MCF-7/CDDP (resistente à cisplatina; CDDP), mostrou que a

última apresenta níveis 2,3 vezes menores de miR-7. A bomba de efluxo MRP1 é um dos alvos do miR-7 e a superexpressão do mesmo é capaz de reduzir os níveis de MRP1, sensibilizando a linhagem de câncer de mama resistente a cisplatina ao tratamento (POGRIBNY *et al.*, 2010). Além disso, amostras de câncer de pulmão com altos níveis de miR-7 possuem baixos níveis de MRP1 e melhor prognóstico (LIU *et al.*, 2015).



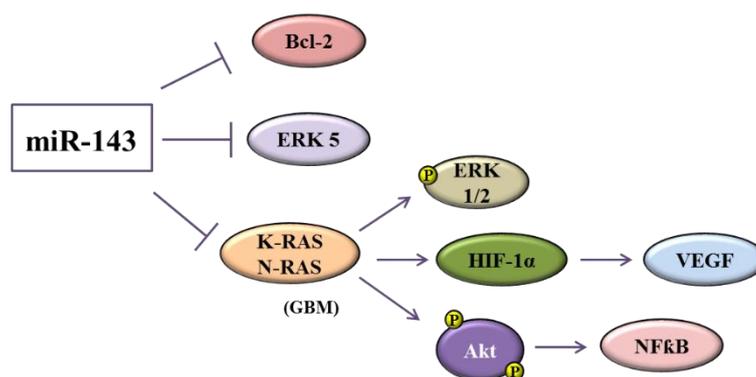
**Figura 1.7 Esquema mostrando as principais moléculas e vias reguladas pelo miR-7.** miR-7 inibe diretamente, pela ligação ao RNA mensageiro codificante dessas proteínas, a expressão de MRP1, FAK, EGFR e IRS1/2 entre outros alvos não ilustrados na figura. Além disso, miR-7 inibe indiretamente a fosforilação de ERK1/2 e Akt. Figura representativa desenvolvida por Paula Sabbo.

### 1.4.3) miR-143

O miR-143 tem sido considerado um supressor tumoral por estar inibido em diversos tipos de câncer como câncer cervical, gástrico, cólon, próstata e carcinoma de nasofaringe (TAKAGI *et al.*, 2009, CHEN *et al.*, 2009). O miR-143 está localizado em um cluster bicistrônico com o miR-145 no braço longo do cromossomo 5 (5q33.1) e possui diversos alvos validados: K-RAS, ELK1, MYO6, Bcl-2, ERK5 e IGF-IR (KENT *et al.*, 2014). Estudos mostraram sua inibição tanto em linhagens celulares quanto em amostras tumorais, em comparação com tecido normal (LUI *et al.*, 2007; SZCZYRBA *et al.*, 2010). Deste modo, induzir a expressão de miR-143 reduz a proliferação celular em linhagens celulares de câncer de cólon através da inibição de ERK5, além de bloquear a tumorigênese em modelos de câncer gástrico, pancreático e carcinoma cervical, *in vitro* e *in vivo* (TAKAGI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2008, KENT *et al.*, 2009). Akao e colaboradores (2010) demonstraram que após estabelecimento do tumor em modelos de câncer de cólon em camundongos, tratamento intravenoso com miR-143 reduziu o volume tumoral. Expressão ectópica de miR-143 regula negativamente as vias de Ras-MAPK, PI3K-Akt e TGF- $\beta$  e inibe diretamente IGF-1R e Bcl-2, re-sensibilizando células de câncer gástrico resistentes a cisplatina (KENT *et al.*, 2014; ZHUANG *et al.*, 2015). Expressão de miR-143 em linhagens de câncer colorretal com

mutação em K-RAS sensibiliza essas células ao tratamento com plactaxel, mas esse efeito não é observado em linhagens com K-RAS selvagem (FEI *et al.*, 2015).

Existem poucos relatos na literatura sobre o papel do miR-143 em gliomas. Estudos demonstraram que o miR-143 está inibido em amostras de astrocitoma graus II, III e IV em relação ao cérebro normal, sugerindo ser um evento precoce na gliomagenese (ZHAO *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014). Pacientes com GB que têm uma maior expressão do miR-143 apresentam um aumento de 2,4 meses na sobrevida (LEE *et al.*, 2013). A expressão do miR-143 em GSLC (*Glioblastoma stem-like cells*) derivadas de linhagens celulares, inibe a glicólise através da inibição direta da hexoquinase 2 (HK2), reduzindo a viabilidade celular e a formação de neuroesferas em hipóxia, mas não em normóxia, além de inibir a formação de tumores *in vivo* (ZHAO *et al.*, 2013). Wang e colaboradores (2014) demonstraram que N-RAS é um alvo direto de miR-143. A superexpressão desse miRNA reduz a expressão de p-ERK1/2, p-Akt, HIF-1 $\alpha$ , VEGF e modula a localização de NF- $\kappa$ B, de maneira N-RAS dependente, promovendo a inibição da proliferação, migração, invasão, angiogênese e sensibilizando as linhagens ao tratamento com TMZ, *in vitro*, e reduzindo o tamanho tumoral, *in vivo*. Por outro lado, um estudo criou subpopulações altamente invasivas a partir de linhagens celulares de GB. Ao caracterizar essas linhagens, os miRNAs, miR-143 e miR-145 encontravam-se superexpressos e a inibição de ambos, mas não de cada um, separadamente, foi capaz de reverter em 50% a capacidade invasiva dessas linhagens (KOO *et al.*, 2012). Esses dados demonstraram um importante papel do miR-143 na invasividade, contradizendo os estudos que mostram o seu papel como supressor tumoral.



**Figura 1.8 Esquema mostrando as principais moléculas e vias reguladas pelo miR-143.** miR-143 inibe diretamente, pela ligação ao RNA mensageiro codificante dessas proteínas, a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, de Ras e de ERK5 entre outros alvos não ilustrados na figura. Além disso, miR-143 inibe indiretamente a expressão de HIF-1 $\alpha$ , VEGF, NF $\kappa$ B e a fosforilação de ERK1/2 e Akt. Figura representativa desenvolvida por Paula Sabbo.

#### 1.4.4) miR-210

O miR-210 exerce um papel crítico na resposta a hipóxia (baixas concentrações de oxigênio), sendo induzido diretamente por HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  tanto em células tumorais quanto em células normais (KULSHRESHTHA *et al.*, 2007; FASANARO *et al.*, 2008; JACOBS *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2014). Estudos mostraram que existe uma alça de regulação positiva entre HIF-1 $\alpha$  e o miR-210 (PUISSÉGUR *et al.*, 2011; KELLY *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2015). O miR-210 exerce papel citoprotetor em cardiomiócitos em hipóxia, reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Ele é induzido nos cardiomiócitos por mecanismos dependentes de HIF mediados também por p53, e por mecanismos independentes de HIF, pela ativação de Akt (MUTHARASAN *et al.*, 2011). Além do papel em resposta a hipóxia, o miR-210 é importante na regulação da produção de anticorpos por células B (MOK *et al.*, 2016). miR-210 é regulado por Oct-2 mediante ativação de células B e camundongos deficientes nesse miRNA apresentam produção de auto-anticorpos com o aumento da idade, acarretando perda de mecanismos inibitórios para controlar a resposta imune (MOK *et al.*, 2016). Esses dados demonstram que o miR-210 exerce funções importantes em condições fisiológicas e está envolvido em diversos processos celulares como metabolismo mitocondrial, angiogênese, apoptose, regulação do ciclo celular e mitose. Ele possui diversos alvos caracterizados: EFNA3 (*Ephrin A3*), FGFRL1 (Receptor de fator de crescimento de fibroblasto - *like 1*), NMT (N-miostil transferase), E2F3, GPDL1 (Glicerol-3-fosfato desidrogenase 1- *like*) e ISCU (*Iron Sulfur Cluster Protein*) (FASANARO *et al.*, 2008; GIANNAKAKIS *et al.*, 2008; CHAN *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; FAVARO *et al.*, 2010; TSUCHIYA *et al.*, 2011; KELLY *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2012).

No câncer, o miR-210 está superexpresso na maioria dos tumores sólidos e associado com pior desfecho clínico e menor sobrevida em câncer de pulmão, pancreático, cabeça e pescoço, sendo marcador independente de pior prognóstico em câncer de mama (CAMPS *et al.*, 2008; GEE *et al.*, 2010; GREITHER *et al.*, 2010; DEVLIN *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014; LAI *et al.*, 2014a; LAI *et al.*, 2014b; OSUGI *et al.*, 2015). O miR-210 encontra-se superexpresso em estágios avançados de câncer de pulmão (PUISSÉGUR *et al.*, 2011) e em amostras de carcinoma adenocortical (ÖZATA *et al.*, 2011). O miR-210 está associado a pior sobrevida global e sobrevida livre de recidiva, ao menor tempo para surgimento de metástase a distância e a genes que fornecem uma assinatura de hipóxia, em câncer de mama (CAMPS *et al.*, 2008; FOEKENS *et al.*, 2008; ROTHÉ *et al.*, 2011). Por outro lado, miR-210 encontra-se deletado em 50% das linhagens celulares e em 64% dos casos de câncer epitelial de ovário (GIANNAKAKIS *et al.*, 2008), encontra-se regulado negativamente em carcinoma de células escamosas de esôfago (ESCC) e se correlaciona positivamente com o grau de diferenciação

do tumor (TSUCHIYA *et al.*, 2011, CHEN *et al.*, 2014). Outro estudo demonstrou que o miR-210 é um fator independente de impacto positivo no prognóstico de câncer de pulmão (EILERTSEN *et al.*, 2014). Entretanto, não se sabe se a superexpressão do miR-210 é uma causa ou consequência da progressão tumoral, visto que a hipóxia é uma condição frequente nos tumores sólidos e um indutor direto da expressão do miR-210. Modelos animais demonstraram que a superexpressão de miR-210 retarda a formação do tumor (HUANG *et al.*, 2009; HE *et al.*, 2013). He e colaboradores (2013) sugerem que inicialmente o miR-210 é expresso em resposta a hipóxia, inibindo a proliferação celular e induzindo apoptose, então o tumor se torna tolerante ao crescente nível de miR-210 e se adapta ao microambiente hipóxico.

Assim como o seu papel como fator prognóstico, o papel na regulação da proliferação celular, do ciclo celular e da apoptose também é controverso (Qin *et al.*, 2014). Estudos mostram que a superexpressão de miR-210 inibe apoptose, aumenta a proliferação, a migração e a invasividade celular, em linhagens celulares de câncer de mama, carcinoma cervical e em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), além de promover angiogênese através da inibição de EFN3, estando associada à maior agressividade do tumor (CHENG *et al.*, 2005; KULSHRESHTHA *et al.*, 2007; FASANARO *et al.*, 2008; GREITHER *et al.*, 2010; ROTHÉ *et al.*, 2011). A expressão de miR-210 leva a inibição de Bcl-2 e aumento da autofagia em linhagens de câncer colorretal (SUN *et al.*, 2015). Mesmo com a inibição de Bcl-2, a expressão de miR-210 contribui para a radiorresistência. A inibição desse miRNA induz apoptose, reduz proliferação e sensibiliza a radiação ionizante (YANG *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2015). Além disso, superexpressão do miR-210 está associada a fibrose e enteropatias induzidas por radiação (HAMAMA *et al.*, 2014). Em linhagens celulares de câncer de pulmão, superexpressão do miR-210 causou inibição do metabolismo mitocondrial, produção de ROS e radiorresistência, sugerindo que o miR-210 poderia sustentar radiorresistência mesmo em normóxia (GROSSO *et al.*, 2013). miR-210 foi considerado um marcador de hipóxia crônica, mas não um alvo terapêutico em câncer de próstata, visto que a inibição de miR-210 não sensibilizou as células ao tratamento com radiação (QUERO *et al.*, 2011). Foi mostrado que o miR-210 regula a progressão do ciclo celular através da inibição de MNT (antagonista de cMyc), promovendo a ativação de cMyc (ZHANG *et al.*, 2009). Por outro lado, a expressão ectópica de miR-210 em linhagens de tumor de cabeça e pescoço inibiu a iniciação do crescimento tumoral *in vivo* e não teve efeito sobre a apoptose e a proliferação celular (HUANG *et al.*, 2009). Tsuchiya e cols. (2011) mostraram que a indução de miR-210 não foi capaz de inibir MNT, mas que FGFR1 é um alvo direto de miR-210 em linhagens celulares de ESCC. FGFR1 promove a proliferação celular e sua inibição induz

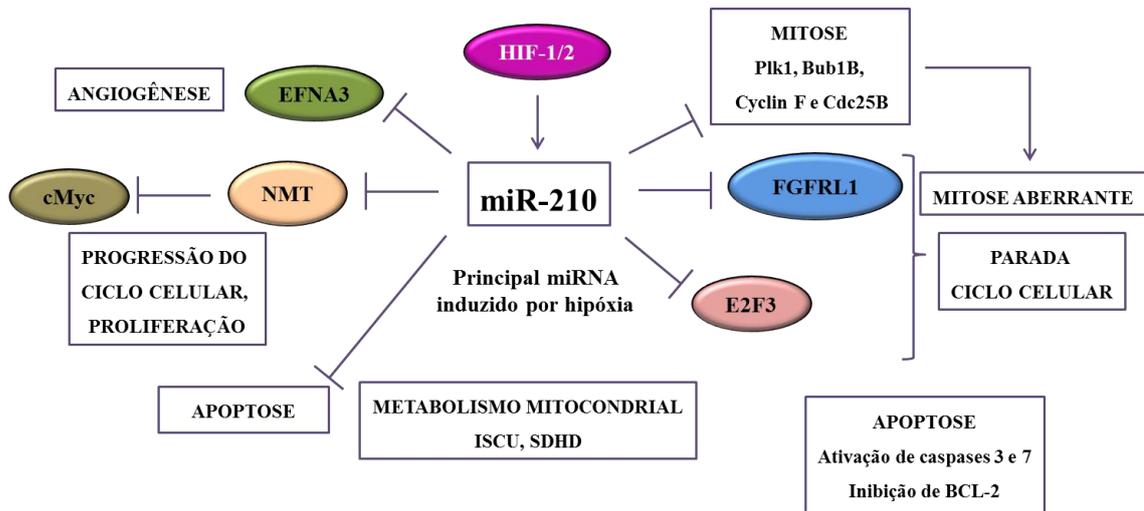
parada de ciclo celular, ou seja, a superexpressão de miR-210 está associada a parada de ciclo celular. Corroborando esses relatos, miR-210 inibiu genes relacionados à mitose (Plk1, Bub1B, Cyclin F e Cdc25B), induzindo parada em G2/M e mitose aberrante tanto em hipóxia quanto normóxia em linhagens celulares de diferentes tipos de carcinoma (PUISSÉGUR *et al.*, 2011; NAKADA *et al.*, 2011; HE *et al.*, 2013). miR-210 induziu morte celular através da regulação negativa de Bcl-2 em uma linhagem celular murina de neuroblastoma (CHIO *et al.*, 2013). Apesar do miR-210 estar superexpresso em estágios avançados do câncer de pulmão, ele é capaz de ativar as caspases 3 e 7 e inibir a viabilidade celular em linhagens celulares em normóxia, enquanto apresenta efeitos opostos em hipóxia (PUISSÉGUR *et al.*, 2011). O miR-210 inibe a expressão da SDHD (subunidade D do complexo succinato desidrogenase) e a ISCU, essenciais para o funcionamento da cadeia de transporte de elétrons, alterando o metabolismo mitocondrial e a resposta celular em condições de estresse.

Existem poucos relatos na literatura sobre o papel do miR-210 nos gliomas. Sabe-se que está envolvido com a progressão tumoral, que sua expressão aumenta com o aumento do grau de malignidade, além de ser considerado um fator de pior prognóstico (MALZKORN *et al.*, 2009; LAI *et al.*, 2014a; LAI *et al.*, 2014b; BARBANO *et al.*, 2014). O miR-210 encontra-se superexpresso nos GBs em relação aos oligodendrogliomas e ao cérebro normal e o promotor do gene que o codifica está metilado nos oligodendrogliomas, podendo distinguir esses tipos de gliomas (LAGES *et al.*, 2011; LAI *et al.*, 2014a). O miR-210 faz parte dos grupos de miRNAs importantes para a subclassificação dos GBs (KIM *et al.*, 2011; BARBANO *et al.*, 2014). Em linhagens celulares, um estudo demonstrou que a expressão ectópica de miR-210, em hipóxia ou privação de soro ou em associação com TMZ, induz proliferação celular (AGRAWAL *et al.*, 2014). A inibição do miR-210 em condições de hipóxia reduz a proliferação celular, radiorresistência e induz apoptose em células tronco de GB (YANG *et al.* 2014). Entretanto, Lee e colaboradores (2015) demonstraram que a superexpressão de miR-210 sensibiliza linhagens de GB resistentes a TMZ pela inibição de uma chaperona da via de resposta ao estresse de retículo endoplasmático.

Recentemente foi demonstrado que o miR-210 detectável no plasma e soro dos pacientes com câncer é um potencial biomarcador para diagnóstico e fator independente de pior prognóstico em diversas neoplasias como câncer de mama, pulmão, bexiga, melanoma, LMA e GB (JUNG *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2015; ONO *et al.*, 2015; TANG *et al.*, 2015; LAI *et al.*, 2015). Nas amostras de pacientes com câncer de bexiga, além do miR-210 estar superexpresso nas amostras em relação aos indivíduos saudáveis, também tem expressão reduzida após a cirurgia, e esses níveis voltam a aumentar em casos de recidiva, demonstrando o papel no acompanhamento da resposta ao tratamento (YANG *et al.*, 2015).

Pacientes com melanoma metastático apresentam níveis elevados de miR-210, além disso os pacientes apresentam aumentam dos níveis de miR-210 circulante 3 meses antes da recidiva, podendo identificar precocemente os casos de recidiva (ONO *et al.*, 2015). miR-210 foi considerado um marcador para detecção precoce de carcinoma renal, além de se correlacionar com a expressão nas amostras tumorais incluídas em parafina (IWAMOTO *et al.*, 2014; FEDORKO *et al.*, 2015). O miR-210 apresentou um maior acurácia na detecção do carcinoma quando associado ao miR-378 e seus níveis foram significativamente diminuídos 3 meses após a cirurgia, entretanto não houve diferença na sobrevida global quando o papel do miR-210 foi avaliado (FEDORKO *et al.*, 2015). Jung e colaboradores (2012) demonstraram correlação positiva entre a resistência ao tratamento com trastuzumabe e a expressão de miR-210 tanto em linhagens celulares quanto em amostras de sangue periférico dos pacientes com câncer de mama, além de também observar redução nos níveis de miR-210 após cirurgia, podendo ser um fator importante para predizer e monitorar resposta ao tratamento. Além disso, a expressão de miR-210 também se correlacionou com metástase nos linfonodos.

O miR-210 atua de maneira tecido ou célula dependente que não é completamente compreendida, provavelmente dependente dos níveis de expressão das moléculas alvo num dado contexto celular (HE *et al.*, 2013). Uma vez que os dados da literatura sugerem que em hipóxia, o miR-210 apresenta um efeito oncogênico e, em normóxia, um papel supressor tumoral (PIUSSÉGUR *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011), a concentração de oxigênio pode ser determinante para a ação do miR-210, visto que ele é um regulador do metabolismo mitocondrial.



**Figura 1.9 Esquema mostrando as principais moléculas e vias reguladas pelo miR-210.** miR-210 é o principal miRNA induzido por hipóxia e transcrito por HIF-1/2. Ele exerce um papel dual no câncer dependendo do tipo celular estudado através da regulação do metabolismo mitocondrial, apoptose, ciclo celular e mitose. Ele induz angiogênese através da inibição de EFNA3; inibe diretamente NMT, proteína inibidora de cMyc, levando à ativação de cMyc, promovendo proliferação e progressão do ciclo celular. miR-210 regula diversos alvos da via de apoptose, culminando com inibição da apoptose e contribuindo para o seu papel oncogênico. Por outro lado, miR-210 inibe diretamente a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, e promove, indiretamente, a ativação das caspases 3 e 7. Além da regulação de diversas proteínas reguladoras da mitose e da inibição direta de FGFR1, levando a parada do ciclo celular e um perfil supressor tumoral. Figura representativa desenvolvida por Paula Sabbo.

## **II)JUSTIFICATIVA**

Apesar dos esforços empregados, pacientes com GB continuam refratários ao tratamento e apresentam uma taxa de sobrevida muito baixa. Portanto, o desenvolvimento de novos compostos com atividade antitumoral com menores efeitos adversos e com alta eficácia para o tratamento tem sido preconizados no estudo da doença. Além disso, entendimento dos mecanismos responsáveis pela resposta desfavorável ao tratamento e a busca por biomarcadores para uma classificação mais adequada dos astrocitomas são fatores importantes para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e para a definição de grupos de pacientes que se beneficiarão de um determinado tratamento. O diagnóstico diferencial dos astrocitomas é baseado apenas em exames de imagem e na classificação histopatológica, o que pode levar a um diagnóstico equivocado, dificultando a definição de subtipos de pacientes.

Diante desse cenário, nosso grupo tem testado a atividade de novos compostos sintéticos com potencial antitumoral, juntamente com o estudo do fenômeno de resistência e identificação de marcadores tumorais. Nesse contexto, os microRNAs têm sido implicados em diversas vias de sinalização celular, além de apresentarem expressão diferencial entre tecidos normais e tecidos neoplásicos, podendo auxiliar na identificação e classificação dos astrocitomas, e prognóstico dos pacientes. Considerando-se os relatos da literatura que mostram um papel dual do miR-210 na tumorigênese e na resistência ao tratamento em diversos tumores, elucidar o papel do miR-210 na radiorresistência e sua implicação no mecanismo de ação de novos compostos com atividade antitumoral é relevante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes para o GB.

### **III) OBJETIVOS**

#### **3.1) Objetivo geral**

Analisar o mecanismo de ação de novos compostos sintéticos e o papel do miRNA, miR-210, na classificação dos gliomas e na resposta a radiação ionizante em linhagens celulares de glioblastoma.

#### **3.2) Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito dos compostos LQB-118, LQB-223, LQB-266 e LQB-268 e dos quimioterápicos BCNU e TMZ sobre a viabilidade celular da linhagem U251-MG;
- Avaliar a citotoxicidade do composto LQB-118 nas linhagens celulares A172, T98G e U251-MG em comparação com a TMZ;
- Analisar a expressão das proteínas Akt e ERK1/2 e das suas formas fosforiladas mediante o tratamento com LQB-118 em comparação com a TMZ na linhagem U251-MG;
- Analisar a expressão dos miRNAs, miR-7 miR-143 e miR-210 mediante o tratamento com o composto LQB-118 em comparação com a TMZ na linhagem celular U251-MG;
- Analisar o efeito sobre a viabilidade e morte celular da combinação de LQB-118 ou TMZ com a radiação ionizante nas linhagens celulares A172, T98G e U251-MG;
- Avaliar se a superexpressão ou inibição do miR-210 é capaz de modular a sensibilidade da linhagem celular U251-MG aos tratamentos com radiação ionizante e LQB-118;
- Avaliar se a inibição do miR-210 é capaz de sensibilizar a linhagem A172 ao tratamento com radiação ionizante;
- Analisar a expressão do miRNA, miR-210 no sangue periférico de pacientes com gliomas de diferentes graus e se existe associação com a classificação dos tumores.

#### IV) DESENHO EXPERIMENTAL

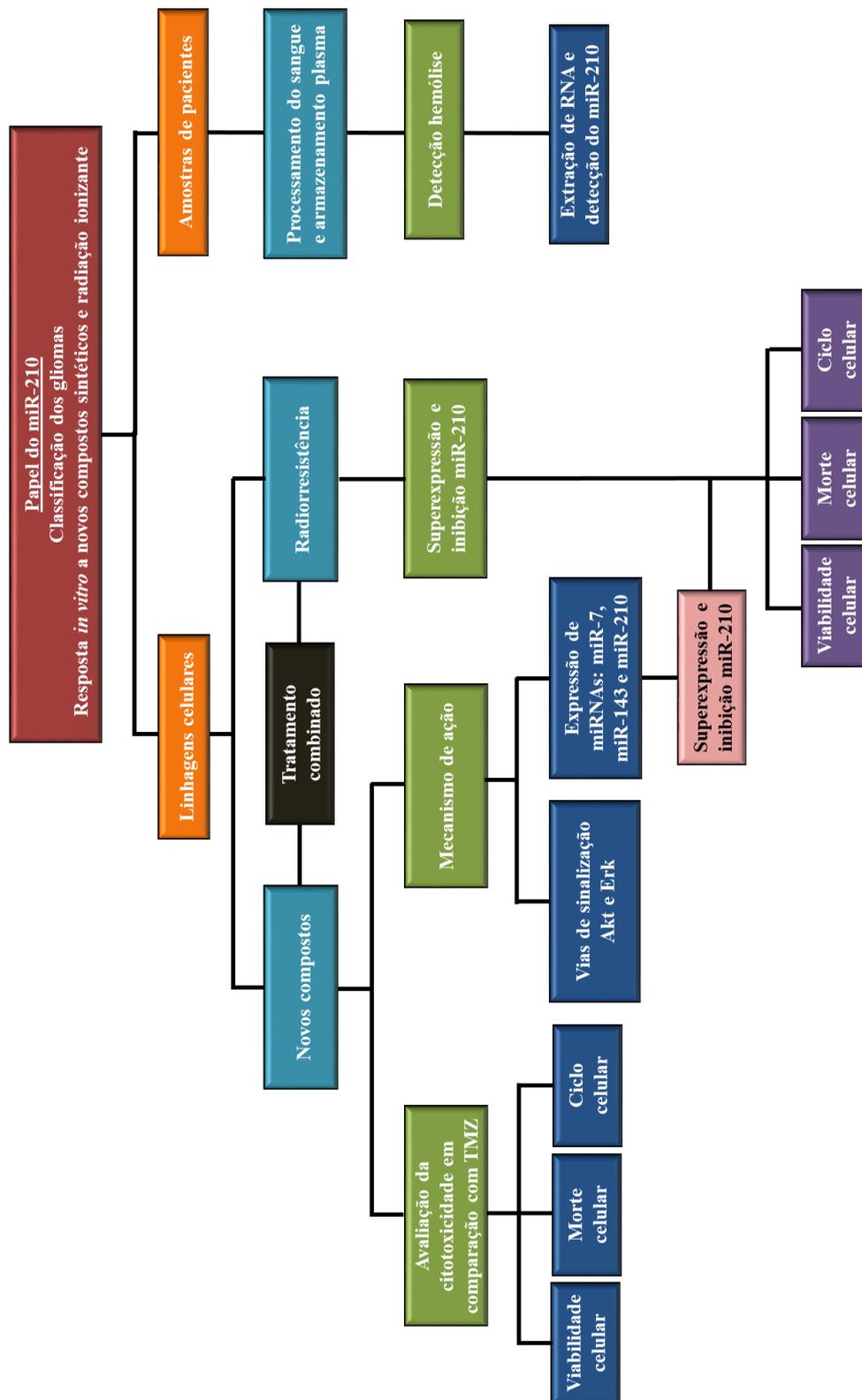


Figura 4.1 Desenho experimental do estudo.

## V) METODOLOGIA

### 5.1) Cultura de Células

As linhagens celulares humanas derivadas de GB, U251-MG, A172 e T98G foram utilizadas para o desenvolvimento desse estudo. As linhagens selecionadas apresentam características moleculares distintas. A linhagem U251-MG possui a variante III do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFRvIII), mutação que leva a ativação constitutiva do receptor, mutação em *TP53* e *PTEN*. A linhagem A172 possui EGFR e *TP53* selvagem, e mutação em *PTEN*. A linhagem T98G possui EGFR selvagem, *TP53* e *PTEN* mutadas. A linhagem U251-MG possui o promotor de MGMT metilado (Yu *et al.*, 2004; Lee *et al.* 2016) As linhagens A172 e T98G não apresentam metilação no promotor de MGMT, entretanto a linhagem A172 possui baixos níveis de mRNA (Ueda *et al.*, 2004; He *et al.*, 2015). As linhagens foram cultivadas em monocamada em meio DMEM-F12 (GIBCO® *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*) suplementado com L-glutamina (GIBCO®), 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, GIBCO®), penicilina (100UI/mL) e estreptomicina (0,1mg/mL). As células foram mantidas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

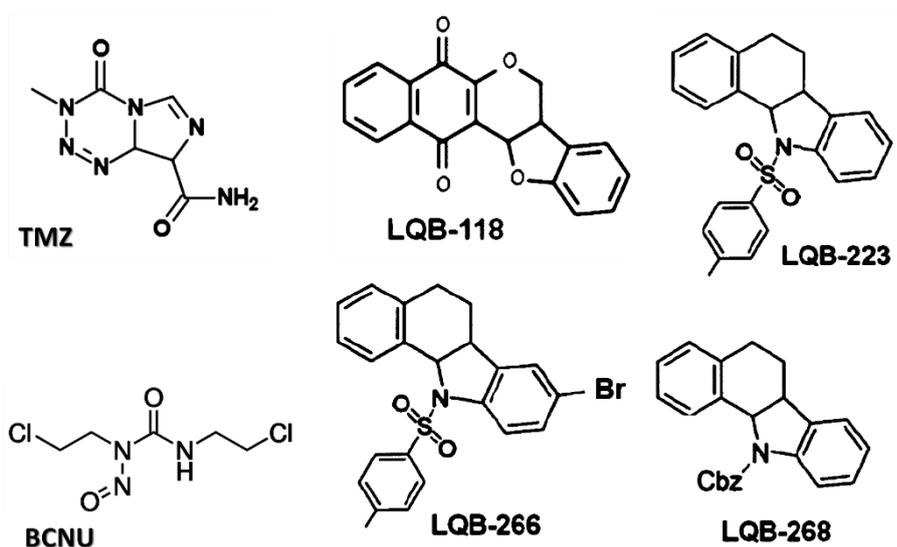
A identidade das linhagens foi confirmada pelo perfil de STR (*short tandem repeats*). O perfil STR da linhagem U251-MG foi realizado pela empresa Progenética e o perfil das linhagens A172 e T98G pelo Laboratório de Diagnósticos por DNA - DECOL - IBRAG - Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ. Os perfis de STR foram comparados com informações disponíveis no banco de dados do DSMZ e do ATCC. Além disso, testes de verificação de micoplasma são realizados periodicamente pelo grupo, garantindo a qualidade dos resultados obtidos com as linhagens.

Para a realização dos experimentos, células em 70-90% de confluência foram utilizadas. As células foram lavadas por duas vezes com PBS (*phosphate buffer saline*), desgrudadas da garrafa com auxílio de tripsina 0,125% (Amersham Life Science) por 3 minutos na estufa, e SFB foi utilizado para inativação da tripsina. As células foram contadas, plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^4$  células/ 0,32cm<sup>2</sup> e deixadas aderir por 18-24 horas. Então, os fármacos foram adicionados nas concentrações de interesse e as células foram incubadas para posterior análise nas diversas metodologias.

### 5.2) Quimioterápicos e novos compostos

Foram utilizados no estudo os quimioterápicos temozolamida (TMZ) e carmustina (BCNU) e os novos compostos sintéticos LQBs (Laboratório de Química Bio-orgânica). Os novos compostos LQB-118 (pterocarpanquinona), LQB-266 e LQB-268 foram sintetizados

pelo laboratório de Química Bio-orgânica no Instituto de Pesquisa de Produtos Naturais (IPPN) na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e cedido pelo Professor Paulo Costa para o desenvolvimento desse estudo (NETTO *et al.*, 2009; NETTO *et al.*, 2010). O composto LQB-223 (11a-N-tosyl-5-deoxy-pterocarpano) foi sintetizado na Pontifícia Universidade Católica (PUC) e cedido pela Professora Camila Buarque (BUARQUE *et al.*, 2011). A TMZ (ITF chemical, Brasil) e os compostos foram estocados em pó em uma câmara de vácuo a temperatura ambiente. TMZ foi diluída em DMSO (0,01%) imediatamente antes do uso. Os LQBs foram diluídos em DMSO e armazenados a -20°C por até duas semanas. O BCNU (Becenun® - Bristol-Myers-Squibb) foi diluído em 10% de álcool etílico e mantido a -20°C. Os veículos (DMSO e álcool) foram utilizados como controles em todos os experimentos, utilizando a concentração encontrada na condição com maior concentração de fármaco.



**Figura 5.1. Estrutura química dos quimioterápicos, TMZ e BCNU, e dos compostos sintéticos, LQB-118, LQB-223, LQB-266 e LQB-268.**

### 5.3) Radiação ionizante

Para o tratamento com radiação ionizante, as células foram irradiadas no irradiador IBL 437C® Irradiator - type H, a temperatura ambiente. Este irradiador utiliza como fonte de emissão de radiação gama, o Césio 137. As doses de 4Gy e 8Gy de radiação ionizante foram selecionada para a realização dos experimentos da associação entre radiação ionizante e LQB-118 e para a transfecção com miR-210, respectivamente. A escolha das doses baseou-se em resultados anteriores do grupo que demonstraram que as linhagens celulares utilizadas no estudo são resistentes a dose de 4Gy, mas apresentam respostas diferentes quando expostas à dose de 8Gy, sendo uma dose indicada para estudar mecanismos de resistência ao tratamento.

#### **5.4) Ensaio de viabilidade celular**

A linhagem de glioblastoma U251MG foi exposta a concentrações empregadas clinicamente e a superdoses dos quimioterápicos TMZ e BCNU, e a diferentes concentrações dos novos compostos LQBs para avaliação da viabilidade celular por MTT. O MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio) é um sal de tetrazólio de coloração amarela, substrato da desidrogenase mitocondrial. Esta enzima reduz o sal, formando cristais chamados cristais de formazana, os quais são dissolvidos em DMSO, exibindo uma coloração violeta, que é quantificada por espectrofotometria. Essa reação ocorre somente em células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983). As linhagens A172 e T98G foram tratadas apenas com TMZ e LQB-118 para avaliação da viabilidade celular.

As células foram plaqueadas conforme descrito anteriormente utilizando placa de 96 poços contendo 200 µL por poço e as células foram incubadas com os fármacos por 24, 48 e 72h. As concentrações dos compostos utilizadas foram 1,5, 3,0, 6,0, 9,0 e 12,0 µM de LQB-118 e 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10,0 µM de LQB-223, LQB-266 e LQB-268. As concentrações de TMZ foram 5,0, 25,0, 50,0, 100,0, 250,0, 500,0 e 1000,0 µM e de BCNU foram 5,0, 10,0, 50,0, 100,0, 230,0 e 460,0 µM. Quatro horas antes de terminar os tempos estabelecidos, foram adicionados 10 µg /mL de MTT. As placas foram mantidas na estufa pelas quatro horas restantes. Para análise do ensaio, foram retirados 180 µL do sobrenadante e adicionados 150 µL de DMSO, solubilizando os cristais. A placa de 96 poços foi lida pelo espectrofotômetro (ELISA - Beckman Coulter DTX800 multimode detector) utilizando o comprimento de onda de 492 nm. Os resultados foram analisados através da seguinte fórmula: [(Absorbância das células tratadas / Absorbância das células não tratadas) x 100]. As concentrações finais e tempos foram obtidos através da média de três experimentos independentes com quatro replicatas para cada concentração.

#### **5.5) Exclusão por azul de tripan**

As células foram incubadas com 50,0 e 1000µM de TMZ e 6,0 e 12,0µM de LQB-118 por 24 e 48 horas. Após incubação, azul de tripan (4mg/mL) foi adicionado. Então, as células foram contadas em microscópio ótico utilizando uma câmara de Neubauer. As células azuis, que perderam a integridade da membrana plástica, permitindo a entrada do corante, caracterizam as células mortas. As células não coradas foram consideradas células viáveis. A porcentagem de células vivas foi calculada em relação ao controle, o qual foi considerado 100%. E a quantidade de células mortas foi calculada em relação ao total de células (vivas e mortas) presentes em cada condição.

### **5.6) Determinação da apoptose pelo ensaio de Anexina V/PI**

A inversão da fosfatidil serina (FS) da face interna para a face externa da membrana plasmática é um dos eventos característicos da apoptose. Existe uma família de proteínas que possuem a capacidade de se ligar a fosfolipídios da membrana plasmática de forma dependente de cálcio chamada anexina. A anexina V é capaz de se ligar a FS, sendo um indicativo de morte celular por apoptose. A exposição de FS foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando anexina V ligada a um fluorocromo (Alexa 488) (Invitrogen™). O iodeto de propídeo (PI) é um marcador de ácidos nucleicos, utilizado para diferenciar a morte celular não apoptótica (anexinaV<sup>-</sup>, PI<sup>+</sup>). Desta forma, as células anexinaV<sup>+</sup>, PI<sup>-</sup> e anexinaV<sup>+</sup>, PI<sup>+</sup> foram consideradas como células em apoptose. As células foram incubadas com os fármacos TMZ e LQB-118 por 24, 48 e 72 horas. Após os tempos de incubação, as células foram incubadas com uma solução de anexina V diluída 50 vezes em tampão de ligação (contendo cálcio) por 15 minutos ao abrigo da luz. No momento da leitura no citômetro de fluxo (Cyan ADP-DAKO) adicionou-se 10µL de PI. A leitura foi efetuada nos canais FL-1 (530nm) para a anexina V e FL-3 (para o PI. Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra, sendo os dados analisados pelo programa Summit v4.3.

### **5.7) Análise do Ciclo Celular pela quantificação do conteúdo de DNA**

A avaliação do conteúdo de DNA para análise do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo nas linhagens celulares A172 e T98G após tratamento com 6,0, 9,0 e 12,0 µM de LQB-118 por 24 horas. Ao término do período de tratamento com o composto, as células foram soltas da garrafa por ação da tripsina, lavadas com PBS e fixadas com etanol 70% gelado por até 1 semana. Posteriormente, as células fixadas foram lavadas com PBS e incubadas *overnight* com 500 µL de uma solução 1:1 de RNase (ribonuclease A 100 µg/ml diluída em tampão citrato 40mM) e PI (iodeto de propídeo, 50 µg/ml diluído em tampão citrato 4mM e 0,3% Triton X-100). Ao término da incubação, um total de 10000 eventos foi adquirido por amostra no citômetro de fluxo (FACSCALIBUR, BD) no canal FL3 para avaliação do conteúdo de DNA. Para análise dos dados adquiridos foi utilizado o programa Summit v4.3.

### **5.8) Análise da expressão proteica por *Western blotting***

As amostras foram preparadas com a linhagem U251-MG após tratamento com 6,0 e 12 µM de LQB-118 e 50,0 e 100,0 µM de TMZ por 24 e 48 horas. O lisado contendo extrato total das células foi preparado utilizando o tampão de extração da Invitrogen™. As amostras

foram submetidas à quantificação das proteínas utilizando o kit *DC protein assay* (BIO-RAD) segundo o método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), de acordo com instruções do fabricante. Após 15 minutos de incubação as absorbâncias foram lidas em um comprimento de onda de 620 nm. Foram utilizados 30 µg de proteína para a eletroforese unidimensional em gel SDS-PAGE (do inglês, *sodium dodecyl sulfate-poliacrylamide gel electrophoresis*), separando as proteínas de acordo com seu peso molecular (kDa). O gel de resolução (*resolving gel*) foi utilizado na concentração de 12% de acrilamida e o gel de empilhamento (*stacking gel*) na concentração de 4%. As amostras foram aplicadas de maneira que sempre havia no gel um poço preenchido pelo padrão de peso molecular Rainbow (Amersham Biosystems/GE Healthcare). A eletroforese realizada a 150V por aproximadamente 1 hora. Após eletroforese as bandas protéicas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond<sup>TM</sup> ECL, Amersham Biosciences) utilizando-se tampão contendo Tris 25 mM, Glicina 193 mM e 20% de metanol. A transferência foi realizada em cuba úmida a 100 V por 2 horas. Após transferência a membrana foi lavada com TBS +Tween 0,2% - TBST (Tris -HCl, pH 8,0 10 mM, NaCl 150 mM e Tween-20 0,2%). Para verificar se a transferência foi eficiente, as membranas foram coradas com Vermelho de *Ponceau* (0,1% de *Ponceau S*, 5% de Ácido Acético glacial, água Milli-Q q.s.p. 50 mL). O corante tem alta afinidade por proteínas e cora as bandas na membrana, indicando que a transferência foi bem sucedida.

### 5.8.1) Imunomarcção

Para imunomarcção das proteínas alvo, foram utilizados anticorpos específicos para detecção por Western *blotting*. Primeiramente, as membranas foram bloqueadas por 1 hora com uma solução contendo TBST e 5% de leite em pó desnatado. Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo (Ac) primário. Os Ac que detectam proteínas não fosforiladas foram diluídos em TBST com 5% de leite em pó desnatado e, os Ac que detectam a forma fosforilada das proteínas foram diluídos em TBST com 0,5% de leite em pó desnatado. Os Ac primários utilizados nesse estudo foram:

- AcMo anti-pro-caspase-7 (clone MCH3101, R&D Systems®) na diluição 1:1000
- AcMo anti-Akt total (Cell Signaling Technology®) na diluição 1:500
- AcMo anti-Akt fosforilada (Ser473) clone 193H12 (Cell Signaling Technology®) na diluição 1:500
- AcMo anti-ERK total (p44/42MAPK) (clone 137F5, Cell Signaling Technology®) na diluição 1:1000;

-AcMo anti-ERK fosforilada (Tyr185/pY187, clone 15H10L7, Invitrogen™) na diluição 1:1000

Os endógenos utilizados foram:

- AcMo (anticorpo monoclonal) anti  $\beta$ -actina (Sigma) na diluição 1:3000.

- AcMo anti-HSC70 (Santa Cruz) na diluição 1:1000

No dia seguinte, as membranas foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos com TBST e incubadas com o AcMo secundário diluído em TBST + leite 5% desnatado por 1h.

Os anticorpos secundários usados foram:

- AcMo anti-coelho (Anti-Rabbit IgG) fornecido pelo Kit ECL (GE Healthcare®), diluído 1:1000.

- AcMo anti-camundongo (HRP-Rat Anti-Mouse IgG) fornecido pelo Kit ECL (GE Healthcare®) diluído 1:1000.

Por fim, as membranas foram lavadas 3 vezes por períodos de 10 minutos com TBST. Todo o procedimento foi realizado em temperatura ambiente e sob leve agitação. As bandas das proteínas foram detectadas no aparelho cDigit, utilizando-se o Kit ECL Prime (Amersham Biosciences) de acordo com as especificações do fabricante. O software Image StudioLite Versão 3.1 foi utilizado para captura das imagens pelo aparelho *C-Digit Blot Scanner* e para análise dos dados.

### **5.9) Detecção dos níveis de expressão dos miRNAs por QT-PCR**

Para avaliação da expressão dos miRNAs, miR-7, miR-143 e miR-210 foram utilizadas as concentrações de 12,0  $\mu$ M de LQB-118 e 50,0  $\mu$ M de TMZ por 24 horas de incubação. Foi realizada a extração de RNA total por Trizol® (Invitrogen™), seguindo instruções do reagente. O RNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo scientific) e armazenado a -80°C. A síntese de cDNA foi feita com 100ng de RNA, utilizando-se o Kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems®). Para cada alvo é realizada a síntese de um cDNA específico utilizando os iniciadores fornecidos. Os iniciadores para síntese de cDNA a partir de miRNAs, apresentam uma estrutura em grampo que aumenta a especificidade da reação. Para cada reação para síntese de cDNA é feito um Mix em tubo estéril, formando uma solução final de 7 $\mu$ L. A esse mix é adicionado 3 $\mu$ L de iniciador (*5X RT primer*) e 5  $\mu$ L de RNA da amostra de interesse. Então o

tubo foi centrifugado e colocado no termociclador (*Peltier Thermal Cycler* (PTC-100) Bio-Rad) para a reação de síntese. A reação teve início com as seguintes condições: 30 minutos a 16°C, seguido de 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85° e 4°C ∞. Após o término da reação, a amostra foi armazenada a -20°C.

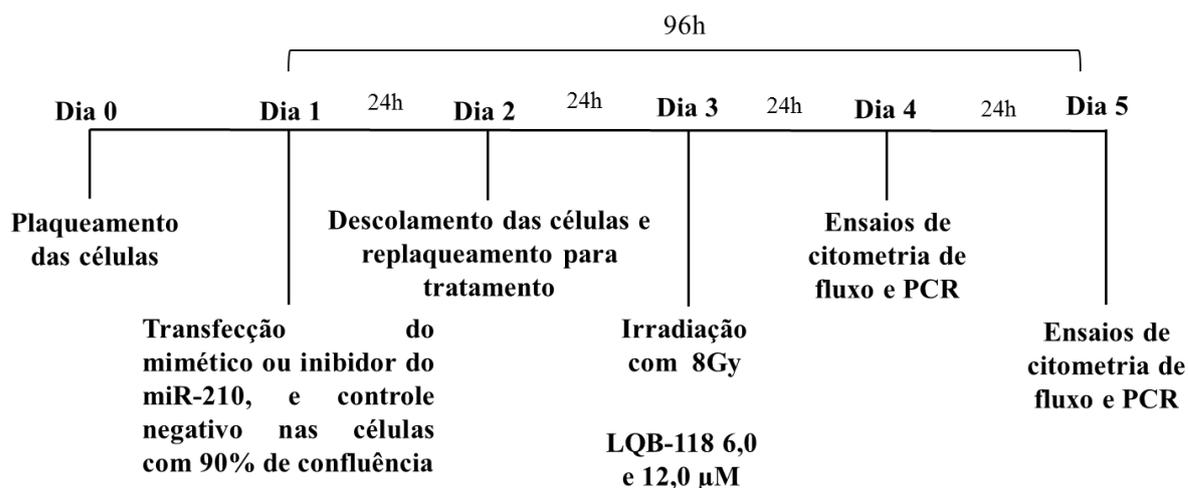
Em seguida, a amplificação do miRNA maduro foi realizada por QT-PCR em tempo real. Foram utilizadas sondas para os miRNAs e RNU6B (TaqMan RNU6B – controle endógeno comercial). Para a expressão do miR-210, a expressão de miR-143 foi utilizada como normalizador juntamente com o RNU6B. As sondas foram obtidas pela *Applied Biosystems* (TaqMan® MicroRNA Assays). Empregou-se uma reação de volume final 10 µL no poço, contendo 0,5 µL de sonda (20X *TaqMan Gene Expression Assay*, *Applied Biosystems*), 5 µL de Master Mix (2X *TaqMan Universal Mix*), 3,25 µL de água livre de RNase e DNase e 1,25 µL de cDNA. QT-PCR foi desenvolvido no equipamento StepOne™ Real-Time PCR System.

### **5.10) Superexpressão e inibição do miR-210**

Para avaliar a eficiência de transfecção dos agentes de transfecção: Lipofectamina® RNAiMAX e Lipofectamina®2000 (ambas Invitrogen™), foi utilizado o *Silencer® Cy™ 3-labeled negative control siRNA* (Ambion®), um RNA controle fluorescente que permite monitorar a entrada dos RNAs nas células por citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência. A eficiência de transfecção foi avaliada por citometria de fluxo 24 horas após a transfecção e a Lipofectamina® 2000 foi selecionada para a transfecção do mimético e do inibidor (antagomiR) do miR-210.

Para superexpressão do miR-210 foi utilizado o reagente miRVana™ miRNA Mimic – (*Applied Biosystems*) para hsa-miR-210 e como controle negativo mirVana™ miRNA Mimic negative control (*Applied Biosystems*). Para inibição do miR-210 foi utilizado o reagente miRVana™ miRNA Inhibitor – (*Applied Biosystems*) para hsa-miR-210 e como controle negativo mirVana™ miRNA Inhibitor negative control (*Applied Biosystems*). As células foram plaqueadas com meio DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB e sem antibiótico, e deixadas aderir *overnight* antes da transfecção. Para obter uma alta eficiência de transfecção é necessário utilizar passagem baixa da linhagem celular (até 5 passagens) e com uma confluência de, aproximadamente, 90%. A lipofectamina foi diluída em OPTIMEM (*Gibco*®) e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o mimético (60nM), o inibidor (90nM) e os controles negativos (60 e 90 nM, respectivamente) foram diluídos em OPTIMEM e delicadamente misturados com a lipofectamina 2000, na proporção de 1:1. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 20 minutos e, então, adicionada à placa de

cultura. As placas foram incubadas em atmosfera úmida à 37°C por 24 horas. Após a transfecção, as células foram desprendidas da placa por ação da tripsina, replaqueadas e deixadas aderir *overnight*. Após o período de adesão, as células foram tratadas com 6,0 e 12µM de LQB-118 ou expostas a 8Gy de radiação ionizante para avaliar se o miR-210 é capaz de alterar a sensibilidade da linhagem U251-MG à apoptose analisada pelo ensaio de anexina V/PI por citometria de fluxo. Para análise da eficácia da superexpressão e da inibição do miR-210 foi utilizado QT-PCR (Figura 3.2).



**Figura 5.2. Desenho experimental das etapas da superexpressão e da inibição do miR-210.** Primeiramente as células são plaqueadas, então transfectadas por 24 horas. Posteriormente, são replaqueadas e tratadas para a realização dos ensaios funcionais.

### 5.11) Interação entre os fármacos e a radiação ionizante

TMZ ou o composto LQB-118 foram empregados em associação com a radiação ionizante em três formas diferentes para avaliar a viabilidade e a morte celular. Em primeiro lugar, a linhagem celular foi tratada com 50,00µM de TMZ ou 6,00µM de LQB-118 em associação com 4Gy de radiação ionizante, ao mesmo tempo, e incubados por 48 horas. Na segunda forma, as células foram tratadas primeiramente com os fármacos, TMZ ou LQB-118, durante 24 horas. Após este tempo, a radiação foi adicionado por mais 24 horas. Na última forma, as células foram inicialmente tratadas com a radiação ionizante durante 24 horas. Após este período, a TMZ ou o composto LQB-118 foram adicionados por mais 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de exclusão por azul de tripan e a morte celular foi avaliada pela marcação com anexina V/PI por citometria de fluxo. Para avaliar se o efeito da combinação foi aditivo, sinérgico ou antagônico, utilizamos uma taxa de interação (R) proposta por Fischell e colaboradores em 2005. Não foi possível utilizar o índice de combinação, pois seria necessária a realização de uma curva dose-efeito que atingisse inibição

completa da viabilidade.

A taxa é calculada segundo a fórmula a seguir, onde se  $R < 0,8$  existe um efeito sinérgico, se  $0,8 < P < 1,2$ , há um efeito aditivo e, se  $R > 1,2$  existe um efeito antagônico.

$$R = \frac{\text{Porcentagem de células vivas combinação ( composto + radiação)}}{\text{Porcentagem células vivas (composto isolado) x Porcentagem células vivas (radiação isolada)}}$$

## 5.12) Pacientes

Para o estudo das amostras de sangue periférico foram selecionados pacientes, com suspeita diagnóstica de astrocitoma, matriculados entre Janeiro/2014 e Outubro/2015. Os dados demográficos e as características clínicas dos pacientes na apresentação inicial da doença foram obtidos análise dos prontuários dos pacientes na intranet. Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do INCA registrado sob o número 115/13.

Os critérios utilizados para inclusão das amostras tumorais no estudo foram: 1) confirmação do diagnóstico em exame histopatológico, 2) disponibilidade da amostra biológica coletada em qualidade e quantidade adequadas para os testes laboratoriais, 3) a assinatura do paciente, ou de seu representante legal, do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), 4) idade maior que 18 anos.

Foram excluídas do estudo: a) amostras cuja qualidade de preservação se apresentou insatisfatória, b) amostras que apresentaram hemólise, c) amostras dos pacientes cujo diagnóstico não foi confirmado.

Após obtenção do TCLE dos pacientes com gliomas (ou de seus representantes legais) foram coletados 5 ml de sangue periférico, os quais foram centrifugados a 2000 rpm por 15 minutos e o plasma aliquoteado em tubos eppendorfs, e estocados a  $-20^{\circ}$ , para posterior ensaio de detecção da expressão dos miRNAs.

O TCLE foi aplicado aos pacientes internados na enfermaria do Serviço de Neurocirurgia após o estabelecimento do diagnóstico clínico-radiológico. Conforme descrito no mesmo, a amostra de sangue periférico foi obtida antes da ressecção cirúrgica do tumor. Em paralelo, foram coletados 5 mL de sangue periférico de doadores saudáveis, os quais foram submetidos aos mesmos procedimentos adotados para as amostras plasmáticas dos pacientes.

### 5.12.1) Detecção de hemólise nas amostras de sangue periférico

Durante a coleta da amostra de sangue periférico pode ocorrer o rompimento das hemácias (hemólise), ocasionando a liberação de hemoglobina e outros componentes celulares

no plasma/soro. Diversos estudos têm mostrado que a hemólise pode interferir na detecção de miRNAs circulantes (Kirschner *et al.*, 2011; Pritchard *et al.*, 2012; Kirschner *et al.*, 2013; Fortunato *et al.*, 2014; Tiberio *et al.*, 2014). Além disso, se o miRNA de interesse também é expresso por células sanguíneas, a hemólise vai alterar os níveis de expressão do miRNA alvo. Existem algumas formas de detectar e compensar a hemólise, tais como: utilizando kits capazes de quantificar a hemoglobina, utilizando miRNAs descritos como liberados em hemólise como normalizadores e a avaliação da absorbância da amostra em 414nm, característica da presença de hemoglobina. Em nosso estudo, a presença de hemólise foi detectada por absorbância nos comprimentos de onda de 414, 541, 576 e 375nm em espectrofotômetro utilizando o aparelho NanoDrop™ 1000 (Thermo scientific) na configuração UV-Vis. Contudo, amostras com lipemia também apresentam aumento da absorbância em 414 nm, podendo ser um fator de confundimento (Kirschner *et al.*, 2011; Fortunato *et al.*, 2014). Diante disso, além do comprimento de onda de 414 nm, os comprimentos de onda de 541 e 576 nm também foram selecionados, visto que amostras com hemólise também apresentam picos nesses comprimentos de onda. Para minimizar a influência da lipemia, Fortunato e cols (2014) utilizaram a razão  $A_{414}/A_{375}$ , sabendo-se que a absorbância em 375 nm não é influenciada por lipemia. Nesse estudo, o ponto de corte da razão  $A_{414}/A_{375} < 1,4$  foi estabelecido, sendo as amostras consideradas sem hemólise. Além disso, o ponto de corte utilizado em outros estudos para a  $A_{414nm}$  é de 0,2 baseado em curvas de diluição de uma amostra sabidamente com hemólise (Kirschner *et al.*, 2011 e 2013). Uma curva padrão de hemólise foi feita em nosso estudo e o ponto de corte de  $A_{414nm} < 0,4$  foi estabelecido em associação com a razão  $A_{414}/A_{375} < 1,4$ , conforme descrito adiante na seção de resultados. Ou seja, para serem consideradas com hemólise as amostras tinham que apresentar os dois pontos de corte estabelecidos. As amostras que apresentaram hemólise foram excluídas do estudo.

### **5.12.2) Extração de miRNA proveniente do plasma**

A extração dos miRNAs do plasma das amostras de sangue periférico dos pacientes e dos doadores saudáveis foi realizada a partir do Kit *miRNeasy Serum/Plasma* (Qiagen) com algumas adaptações no protocolo do fabricante, conforme descrito a seguir.

Primeiramente, o plasma dos pacientes e doadores foi descongelado em gelo e misturado invertendo o tubo. Foi realizada uma centrifugação de 5000g por 10min a 4°C, para retirada de componentes celulares que podem influenciar a detecção do miRNA de interesse. O plasma foi recolhido em tubo estéril e 250µL de amostra foram utilizados. 1mL de Qiazol foi adicionado ao plasma, misturado em vórtex e incubado por 10 minutos a temperatura

ambiente (TA). Nesse momento, o spike-in foi adicionado (o estoque encontra-se na concentração de  $2 \times 10^{10}$  cópias /  $\mu\text{L}$ , para uso é realizada uma diluição de 100 vezes e 10  $\mu\text{L}$  são utilizados por amostra, sendo utilizado  $2 \times 10^9$  cópias por amostra). O spike-in é um miRNA vendido comercialmente que mimetiza um miRNA bem conservado de uma espécie não humana. Nesse estudo o miRNA, cel-miR-39, de *C. elegans* foi utilizado (Qiagen). Esse mimético funciona como um controle da eficiência da sua extração e como normalizador, por isso deve ser adicionado antes do início da extração propriamente dita. Após a inclusão do mimético, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, os tubos invertidos rapidamente por 30 segundos e incubados por 3 minutos a TA. Os tubos foram centrifugados a 12000g por 15 minutos a 4°C, uma fase aquosa foi formada na parte superior da amostra e transferida para um tubo limpo com cuidado para não contaminar com as camadas inferiores. Volume de etanol equivalente a 1,5 vezes o volume obtido de fase aquosa foi adicionado à amostra e misturado com o uso de pipeta. 700  $\mu\text{L}$  de amostra, incluindo precipitado, foram colocados na coluna de purificação do kit e centrifugados a 13000 rpm por 30 segundos a TA. Esse procedimento foi repetido até que toda a amostra que sobrou no tubo anterior tivesse passado pela coluna. A seguir, o tampão RWT (700  $\mu\text{L}$ ) foi adicionado à coluna de purificação e, mais uma etapa de centrifugação a 13000 rpm por 30 segundos a TA foi realizada. A coluna de purificação foi lavada duas vezes com 500  $\mu\text{L}$  de tampão RPE. Posteriormente, 500  $\mu\text{L}$  de etanol 80% foram adicionados à coluna e centrifugados a 13000 rpm por 2 minutos a TA. Para secar a coluna, esta foi centrifugada na velocidade máxima por 5 minutos com a tampa aberta. Por fim, para aumentar o rendimento do RNA, a eluição foi realizada com 12  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase em duas centrifugações na velocidade máxima por 1 minuto. O RNA foi estocado a -80°C.

A síntese de cDNA foi realizada com 3,0  $\mu\text{L}$  de RNA, e a amplificação do miRNA foi realizada utilizando-se 2,5  $\mu\text{L}$  de cDNA. As reações de síntese de cDNA e de PCR foram realizadas conforme descrito no item 5.9. As sondas e primers utilizados para detecção dos miRNAs são inventoriadas e disponíveis comercialmente pela Applied Biosystems by Life Technologies. As análises da expressão dos miRNAs foram realizadas utilizando o software DataAssist™ Software v3.01 e a expressão do endógeno, miR-16, e do spike-in, cel-miR-39, foram utilizadas como normalizadores. A mediana de expressão do alvo miR-210 entre as amostras foi utilizada para a confecção dos gráficos representativos.

### **5.13) Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa *GraphPad Prism 5.0*. Os testes estatísticos utilizados foram ANOVA seguido pelo pós-teste Bonferroni e o teste *t-student*.

Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$  em relação ao controle e ao veículo. O valor de  $p$  referente ao veículo é mostrado nos gráficos. Os resultados de expressão gênica foram analisados pelo método do  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , observando-se uma eficiência de reação igual ou maior que 95%. Devido ao pequeno número amostral, não foi realizada análise estatística dos dados provenientes de amostras de pacientes.

## **VI) RESULTADOS**

### **6.1) Avaliação da citotoxicidade após tratamento com diversos compostos e quimioterápicos nas linhagens celulares de GB**

O efeito dos novos compostos sintéticos LQBs sobre a viabilidade celular foi avaliado por diferentes metodologias e comparado com o quimioterápico utilizado clinicamente, TMZ, nas linhagens U251-MG, T98G e A172.

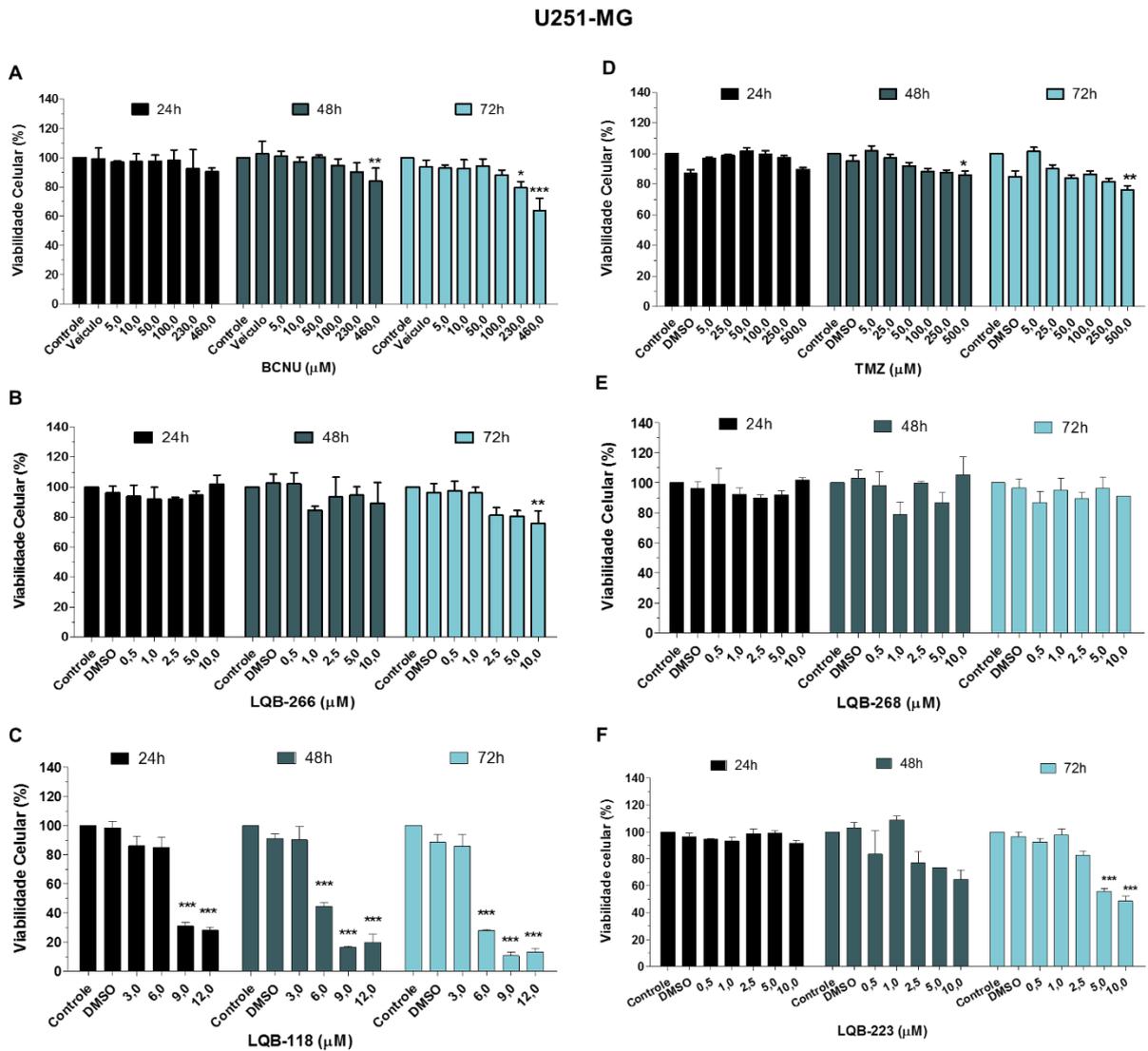
#### **6.1.1) Os novos compostos LQB-118 e LQB-223 possuem maior efeito sobre a viabilidade celular na linhagem U251-MG**

Os fármacos TMZ, BCNU e os compostos LQB-118, LQB-223 e LQB-266 foram capazes de reduzir de forma significativa a viabilidade celular da linhagem U251-MG pelo ensaio de MTT (Figura 6.1). O composto LQB-266 reduziu a viabilidade celular cerca de 20% após 72h de tratamento com a concentração de 10  $\mu$ M, enquanto as demais concentrações não alteram a viabilidade celular de maneira significativa. O composto LQB-268 não alterou a viabilidade celular de forma estatisticamente significativa, apresentando valores similares ao controle e ao veículo. Os compostos LQB-118 e LQB-223 apresentaram maior efeito sobre a viabilidade celular do que os quimioterápicos TMZ e BCNU. A concentração de 6,0  $\mu$ M de LQB-118 reduziu a viabilidade celular em 50% após 48 horas de tratamento (Figura 6.1C). A concentração de 10,0  $\mu$ M de LQB-223 causou essa mesma redução em 72 horas (Figura 6.1F), enquanto os demais tratamentos não promoveram tal efeito. Apenas a superdose de 460,0  $\mu$ M de BCNU reduziu a viabilidade em 40% (Figura 6.1A). O composto LQB-118 induziu maior redução da viabilidade celular na linhagem estudada, sendo selecionado para dar continuidade ao estudo, em comparação a TMZ, em um painel ampliado de linhagens.

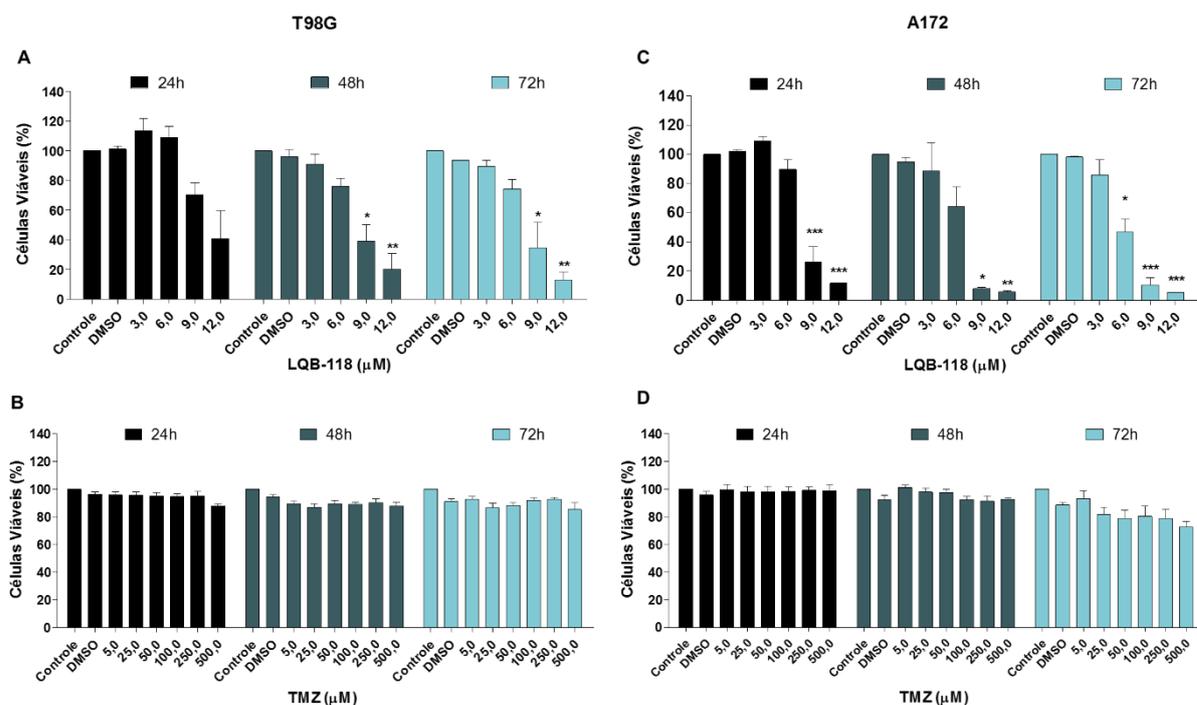
#### **6.1.2) O novo composto LQB-118 reduz a viabilidade nas linhagens T98G e A172 de forma mais significativa do que a TMZ**

Posteriormente, o ensaio de MTT foi realizado nas linhagens celulares T98G e A172. O composto LQB-118 inibiu significativamente a viabilidade celular nas concentrações de 9,0 e 12,0  $\mu$ M após 48h e 72h de tratamento. Nessas concentrações foi possível observar 80% de redução da viabilidade celular após 72 horas de tratamento em ambas as linhagens. A concentração de 6,0  $\mu$ M reduziu a viabilidade celular em, aproximadamente, 50% na linhagem A172 após 72 horas de tratamento (Figura 6.2 A e C). O quimioterápico TMZ

reduziu a viabilidade celular em, no máximo, 18% em ambas as linhagens após 72h de tratamento (Figura 6.2 B e D).



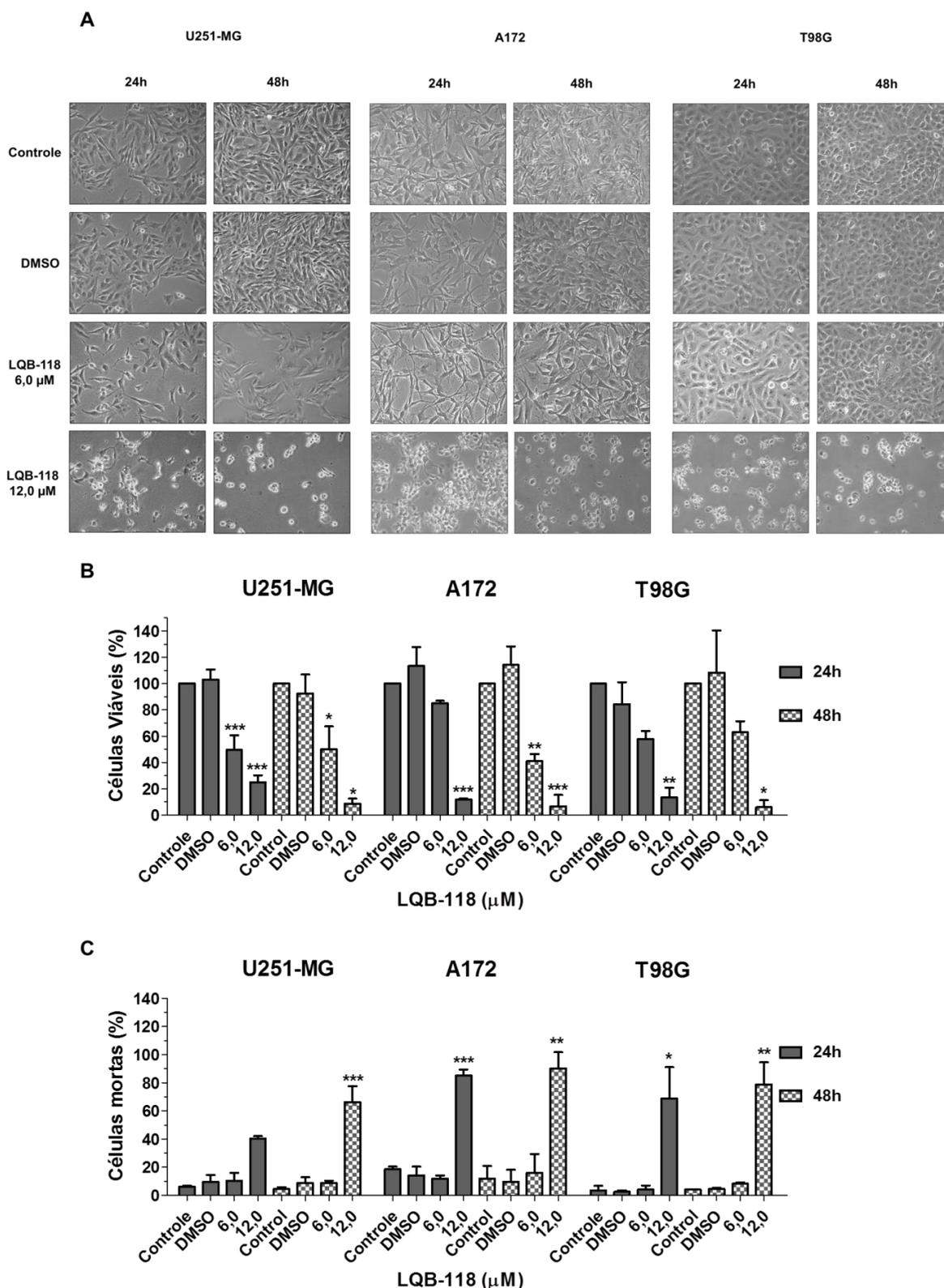
**Figura 6.1. Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT na linhagem U251-MG.** Percentagem de células viáveis após incubação com diferentes concentrações de (A) BCNU, (B) TMZ, (C) LQB-118, (D) LQB-266, (E) LQB -268 e (F) LQB-223 avaliadas por 24, 48 e 72 horas. Média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. TMZ = temozolomida; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figura 6.2. Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT.** Porcentagem de células viáveis das linhagens T98G (A, B) e A172 (C, D) após incubação com diferentes concentrações de (B, D) TMZ, (A, C) e LQB-118 avaliadas por 24, 48 e 72 horas. Média de três experimentos independentes ± desvio padrão. TMZ = temozolomida; \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001.

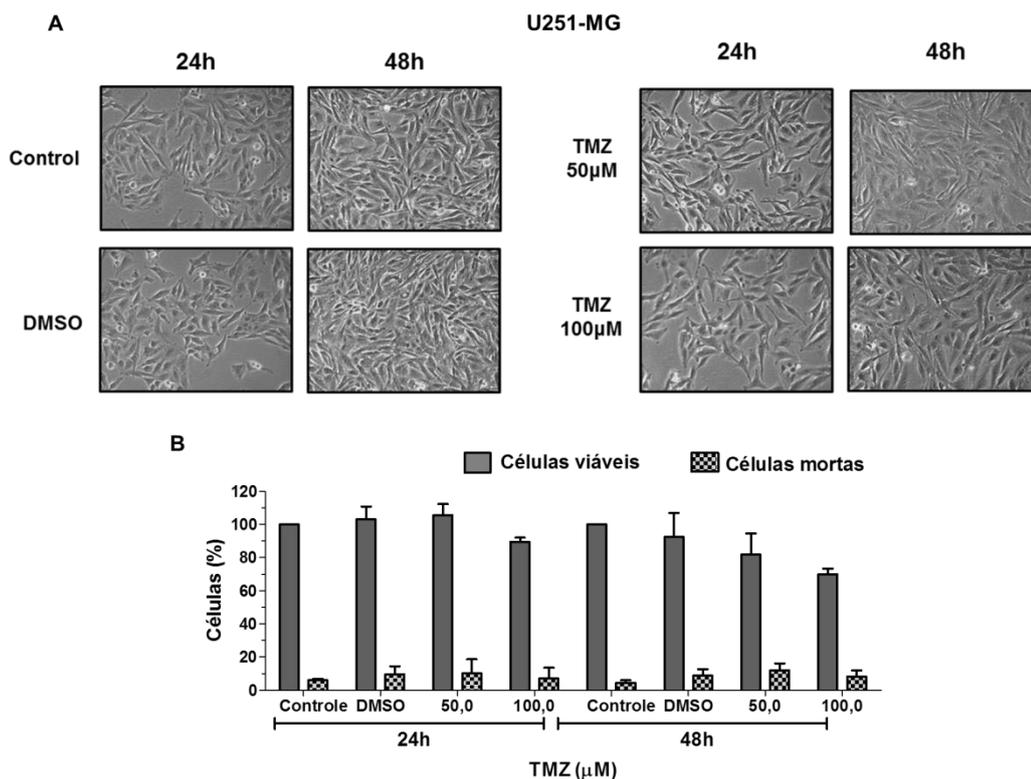
### 6.1.3) O composto LQB-118 induz morte celular

Visto que o novo composto reduziu a viabilidade celular, o passo seguinte foi avaliar o potencial de indução de morte celular pela perda de ancoragem à garrafa de cultura e por exclusão por azul de tripan nas linhagens, U251-MG, A172 e T98G. A concentração de 12,0μM de LQB-118 promoveu perda de adesão das células à garrafa de cultura em todas as linhagens estudadas (Figura 6.3A). Após 24 horas de tratamento, LQB-118 6,0 μM reduziu significativamente a quantidade de células viáveis apenas na linhagem U251-MG, enquanto a concentração de 12,0 μM reduziu a quantidade de células viáveis em mais de 70% em todas as linhagens estudadas. Após 48 horas de tratamento, LQB-118 6,0 e 12,0 μM reduziram a viabilidade em, aproximadamente, 50% e 90%, respectivamente, em todas as linhagens (Figura 6.3B). Entretanto, apenas a concentração de 12,0 μM resultou em aproximadamente 70% células coradas por azul de tripan (Figura 6.3C).



**Figura 6.3. Perda de adesão e morte celular induzida por LQB-118.** Células das linhagens U251-MG, A172 e T98G foram tratadas com 6,0 e 12,0 μM de LQB-118 por 24 e 48 horas. (A) Fotomicrografia mostrando alterações morfológicas observadas após o tratamento. As imagens foram obtidas em microscópio óptico com ampliação de 10 vezes. Porcentagem de viabilidade celular (B) e morte celular (C) avaliadas pelo ensaio de exclusão do azul de tripan. Média de três experimentos ± desvio padrão. \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

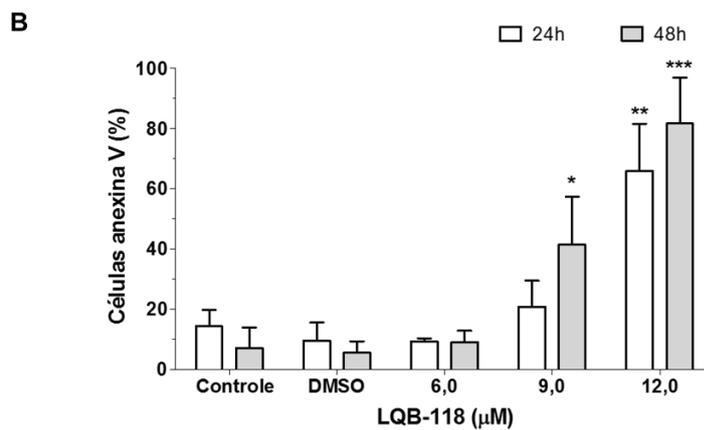
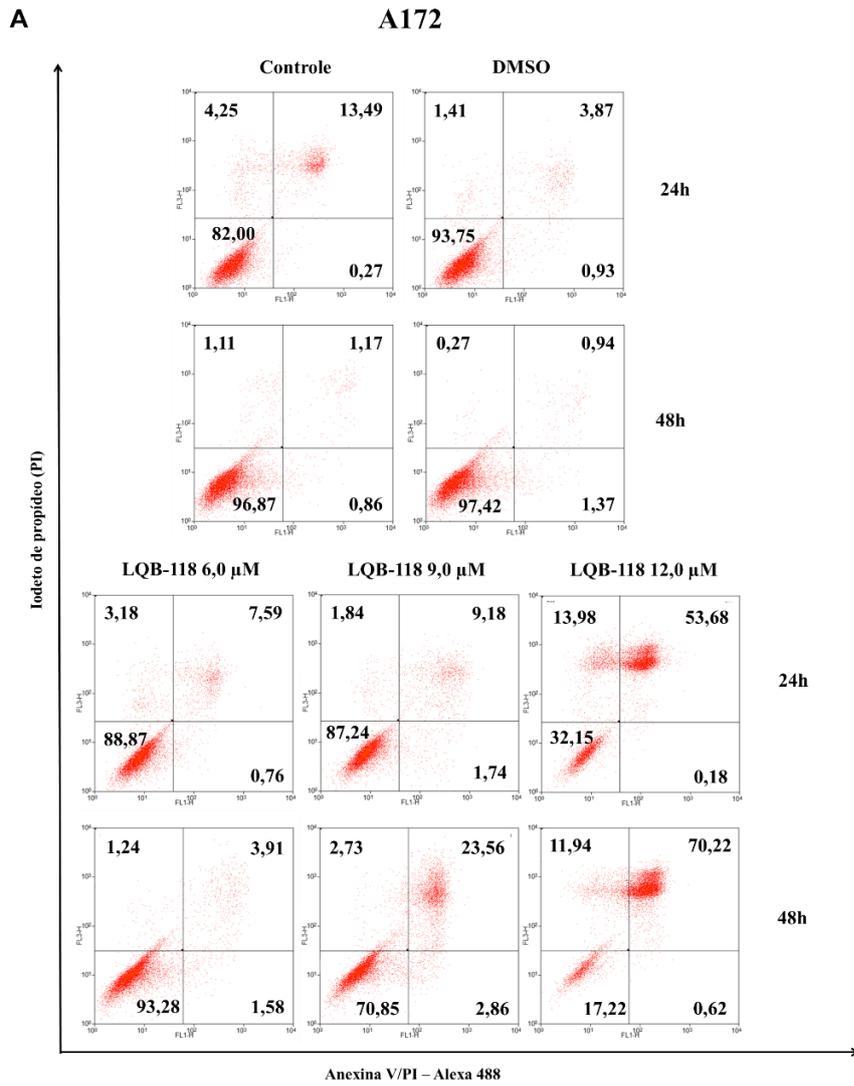
A fim de comparar o efeito observado pelo composto LQB-118 com o quimioterápico utilizado no tratamento clínico, a linhagem U251-MG foi tratada com 50,0 e 100,0  $\mu\text{M}$  de TMZ para avaliar a perda de ancoragem à garrafa de cultura e exclusão por azul de tripan (Figura 6.4). As concentrações de 50,0  $\mu\text{M}$  (concentração plasmática) e 100,0  $\mu\text{M}$  não induziram perda de adesão (Figura 6.4A), nem morte celular pelo ensaio de exclusão por azul de tripan (Figura 6.4B). Esse dado corrobora os achados do ensaio de MTT, demonstrando que o LQB-118 possui um efeito citotóxico maior do que a TMZ na linhagem U251-MG.



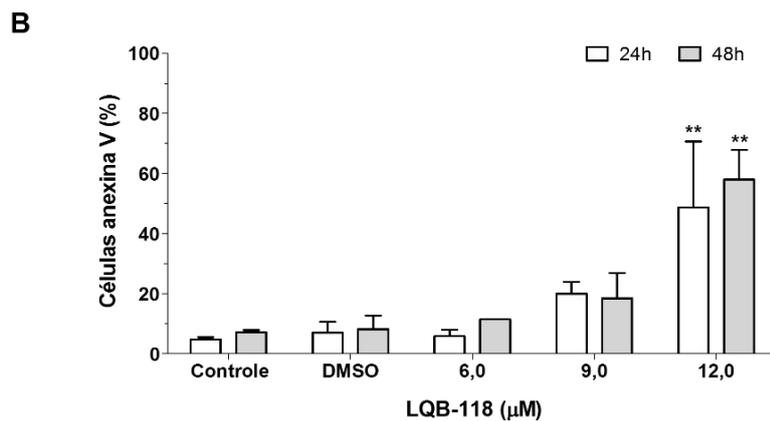
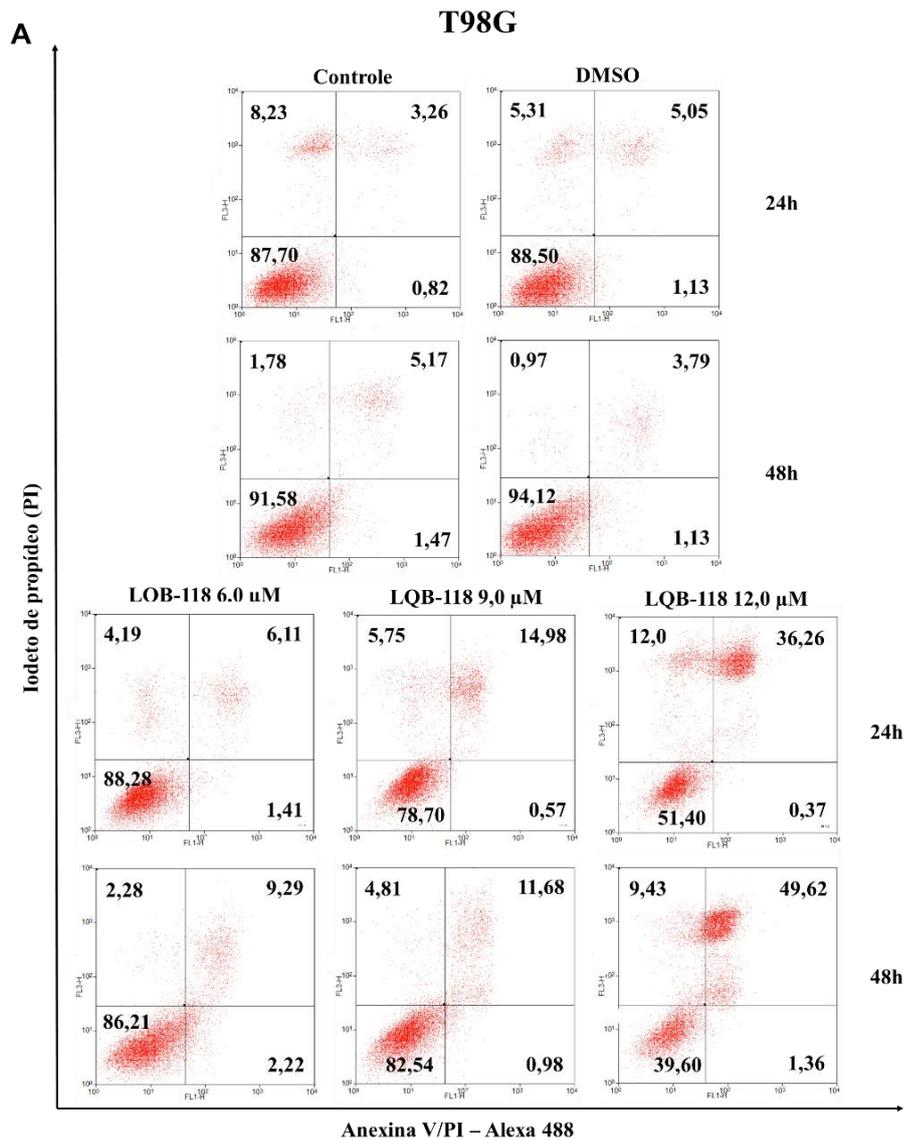
**Figura 6.4. Perda de adesão e morte celular induzida por TMZ.** Células da linhagem U251-MG foram tratadas com 50,0 e 100,0  $\mu\text{M}$  de TMZ por 24 e 48 horas. (A) Fotomicrografia mostrando alterações morfológicas observadas após o tratamento. As imagens foram obtidas em microscópio óptico com ampliação de 10 vezes. (B) Porcentagem de viabilidade e morte celular avaliada pelo ensaio de exclusão do azul de tripan. Média de três experimentos  $\pm$  desvio padrão. TMZ=temozolamida

#### **6.1.4) LQB-118 induz morte celular por apoptose e tem efeito sobre o ciclo celular dependente da linhagem celular**

A fim de investigar se o composto LQB-118 é capaz de induzir morte celular por apoptose, a exposição de fosfatidilserina foi avaliada pelo ensaio de anexina V/PI nas linhagens A172 e T98G (Figuras 6.5 e 6.6). Na linhagem A172, a concentração de 6  $\mu\text{M}$  não induziu exposição de fosfatidilserina. Após 24 e 48 horas de tratamento, 9,0  $\mu\text{M}$  de LQB-118 induziu 20% e 40% de marcação com anexina V, enquanto 12,0  $\mu\text{M}$  induziu 60% e 80%, respectivamente (Figura 6.5). Na linhagem T98G, apenas a concentração de 12 $\mu\text{M}$  induziu exposição de fosfatidilserina de forma significativa com 50% e 60% das células marcadas após 24 e 48 horas de tratamento com LQB-118, respectivamente (Figura 6.6).

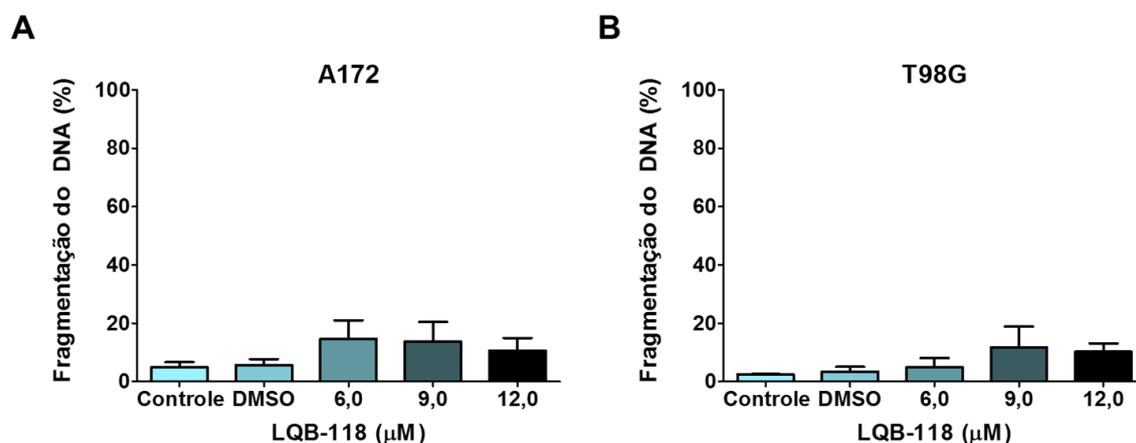


**Figura 6.5. Indução de apoptose avaliada por marcação da anexina V/PI.** A linhagem A172 foi tratada com 6,0, 9,0 e 12,0 μM de LQB-118 durante 24 e 48 horas para avaliação da marcação com anexina V/PI por citometria de fluxo. (A) Histograma representativo. (B) Gráfico com média de três experimentos independentes ± desvio padrão (células anexina V<sup>+</sup> = anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> e anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

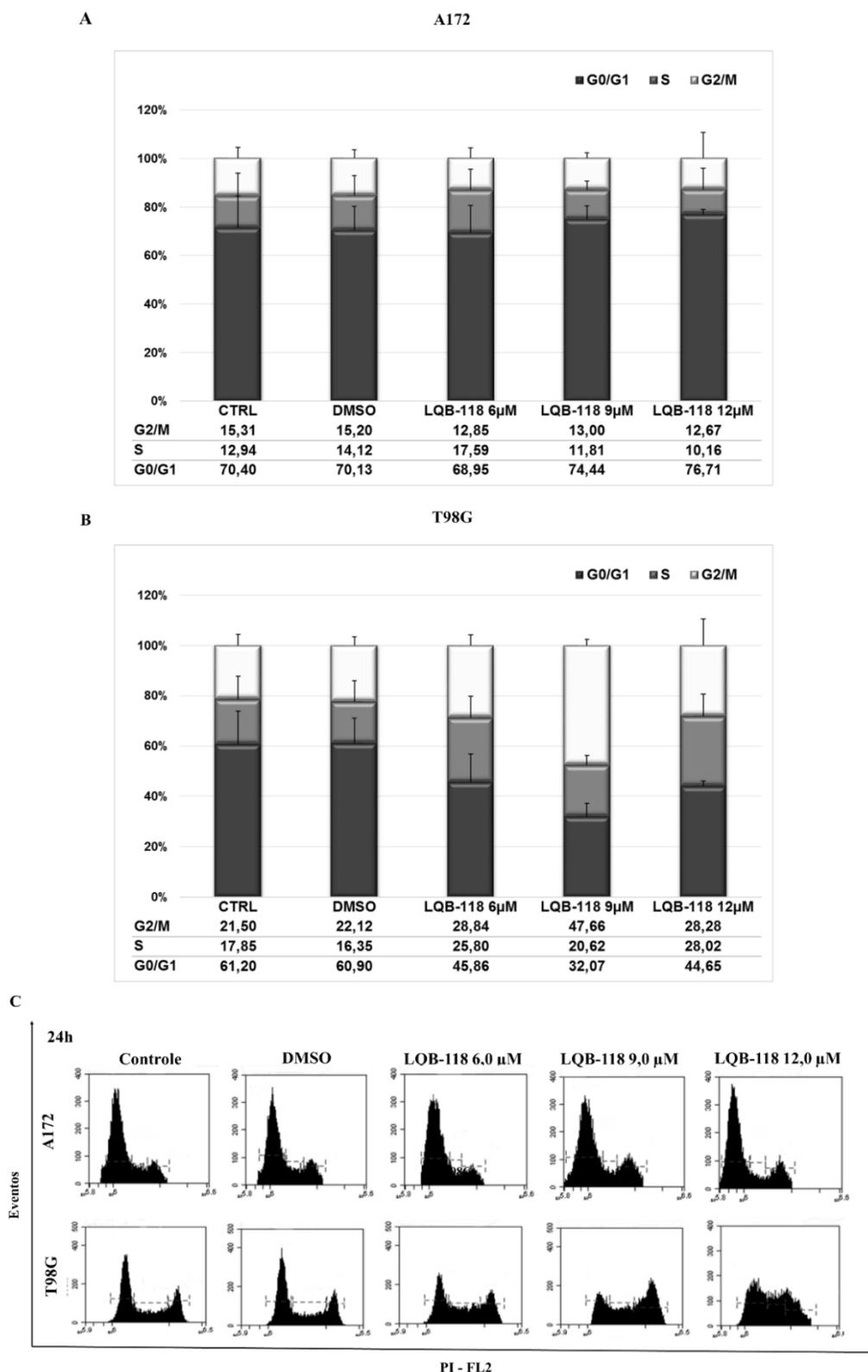


**Figura 6.6. Indução de apoptose avaliada por marcação de anexina V/PI.** A linhagem T98G foi tratada com 6,0, 9,0 e 12,0 μM de LQB-118 durante 24 e 48 horas para avaliação da marcação com anexina V/PI por citometria de fluxo. (A) Histograma representativo. (B) Gráfico com média de três experimentos independentes ± desvio padrão (células anexina V<sup>+</sup> = anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> e anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). \*\* p < 0,01

Além disso, a fragmentação do DNA e o perfil do ciclo celular também foram avaliados após 24 horas de tratamento com LQB-118 nas linhagens A172 e T98G (Figura 6.7 e 6.8). Apesar da elevada marcação por anexina V/PI após 24 horas de tratamento com 12  $\mu\text{M}$ , ambas as linhagens não apresentaram fragmentação do DNA estatisticamente significativa, atingindo 10% de fragmentação nas concentrações mais elevadas de 9 e 12  $\mu\text{M}$  (Figura 6.7). A análise do ciclo celular mostrou que o composto LQB-118 não altera o perfil do ciclo celular na linhagem A172, apresentando apenas um modesto aumento de 6% das células em G0/G1 após tratamento com 12  $\mu\text{M}$  (Figura 6.8 A e C). Contudo, o composto promoveu redução das células em G0/G1 na linhagem T98G em todas as concentrações estudadas e um aumento de 22% para 47,7% das células em G2/M com a concentração de 9  $\mu\text{M}$ , porém esse acúmulo não foi observado nas demais concentrações (Figura 6.8 B e C).

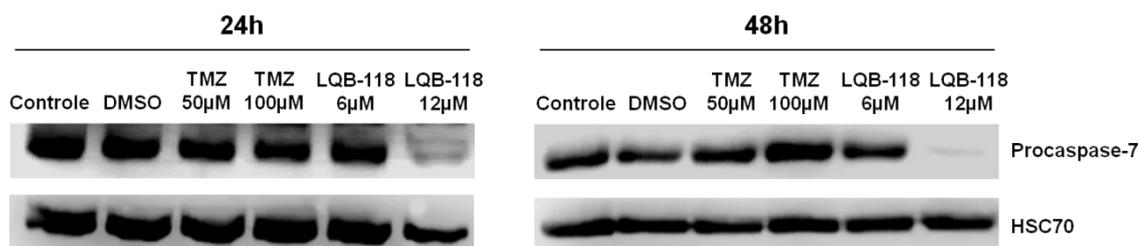


**Figura 6.7. Fragmentação do DNA avaliado por citometria de fluxo.** As linhagens A172 (A) e T98G (B) foram tratadas com 6,0, 9,0 e 12,0  $\mu\text{M}$  de LQB-118 durante 24 horas para avaliação do conteúdo de DNA e presença de fragmentação (sub G0/G1). Média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.



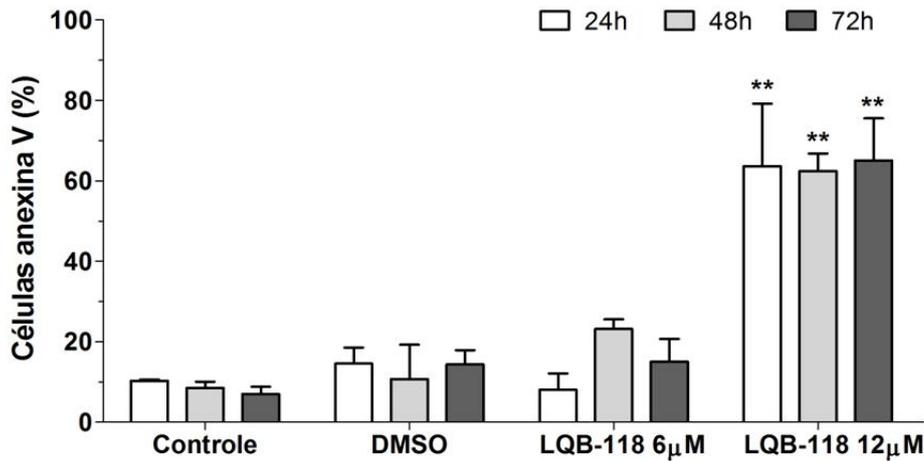
**Figura 6.8. Perfil do ciclo celular avaliado por citometria de fluxo.** As linhagens A172 (A) e T98G (B) foram tratadas com 6,0, 9,0 e 12,0 µM de LQB-118 durante 24 horas para avaliação do conteúdo de DNA. (A, B) Gráficos de barras demonstrando a distribuição do ciclo celular nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular. Média de três experimentos independentes ± desvio padrão. (C) Histogramas representativos.

Na linhagem U251-MG, comparamos a indução de apoptose pelos tratamentos com LQB-118 e com TMZ através dos ensaios de anexina V/PI por citometria de fluxo e expressão de pró-caspase-7 por *Western blotting*. O LQB-118 12,0  $\mu\text{M}$  induziu 55% de marcação por anexina V em 24, 48 e 72 horas ( $p < 0.001$ ) e redução da expressão de pro-caspase-7, sugerindo ativação desta caspase (Figuras 6.9 e 6.10). A concentração de 6,0  $\mu\text{M}$  não induziu nenhuma alteração significativa. TMZ não induziu marcação por anexina, tampouco alterou a expressão da pro-caspase-7 (Figuras 6.9 e 6.11).

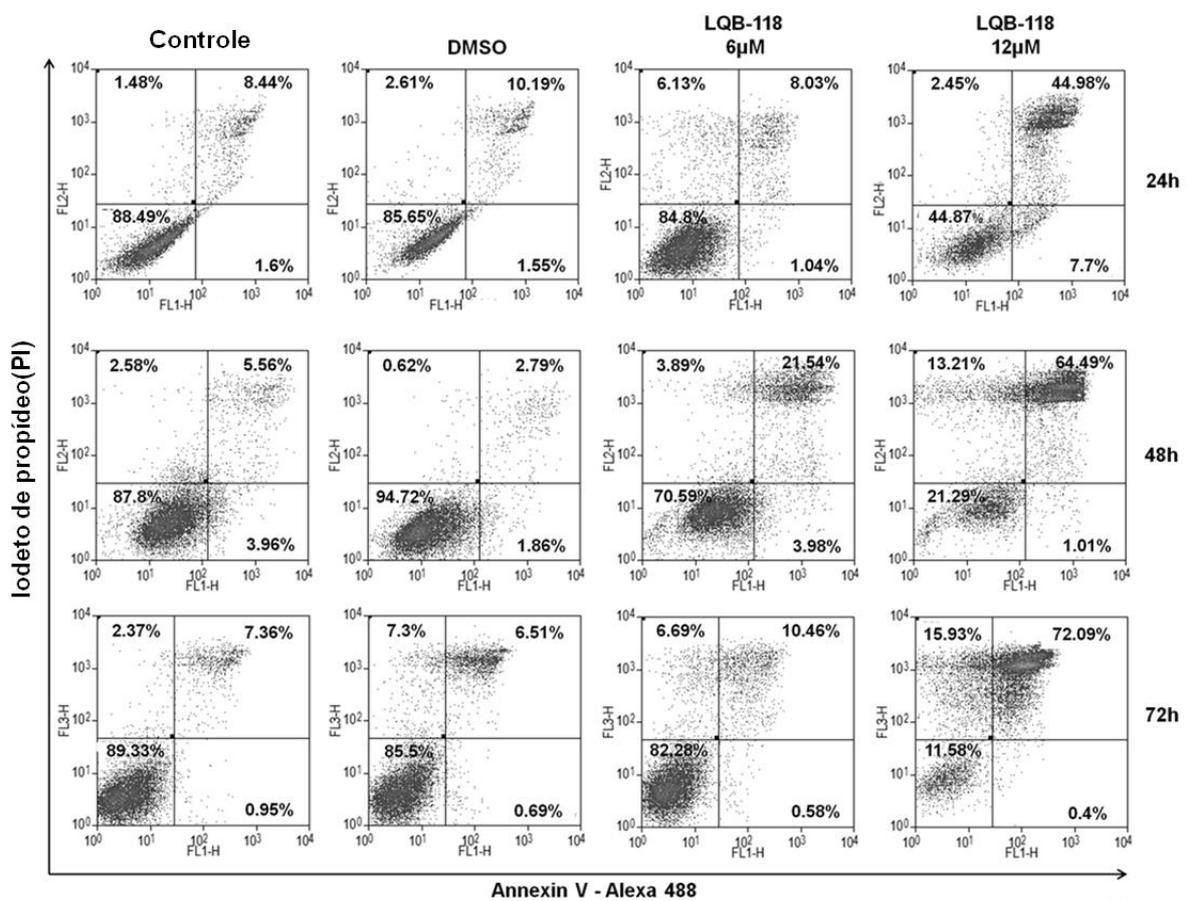


**Figura 6.9. Apoptose avaliada pela expressão de pró-caspase 7 por *Western blotting*.** A linhagem U251-MG foi tratada com 50,0 e 100,0  $\mu\text{M}$  de TMZ, 6,0 e 12,0  $\mu\text{M}$  de LQB-118 durante 24 e 48 horas para avaliação da expressão de pró-caspase-7. Expressão de HSC-70 (70kDa) foi utilizada como controle endógeno. Figura representativa de dois experimentos independentes. TMZ = temozolomida;

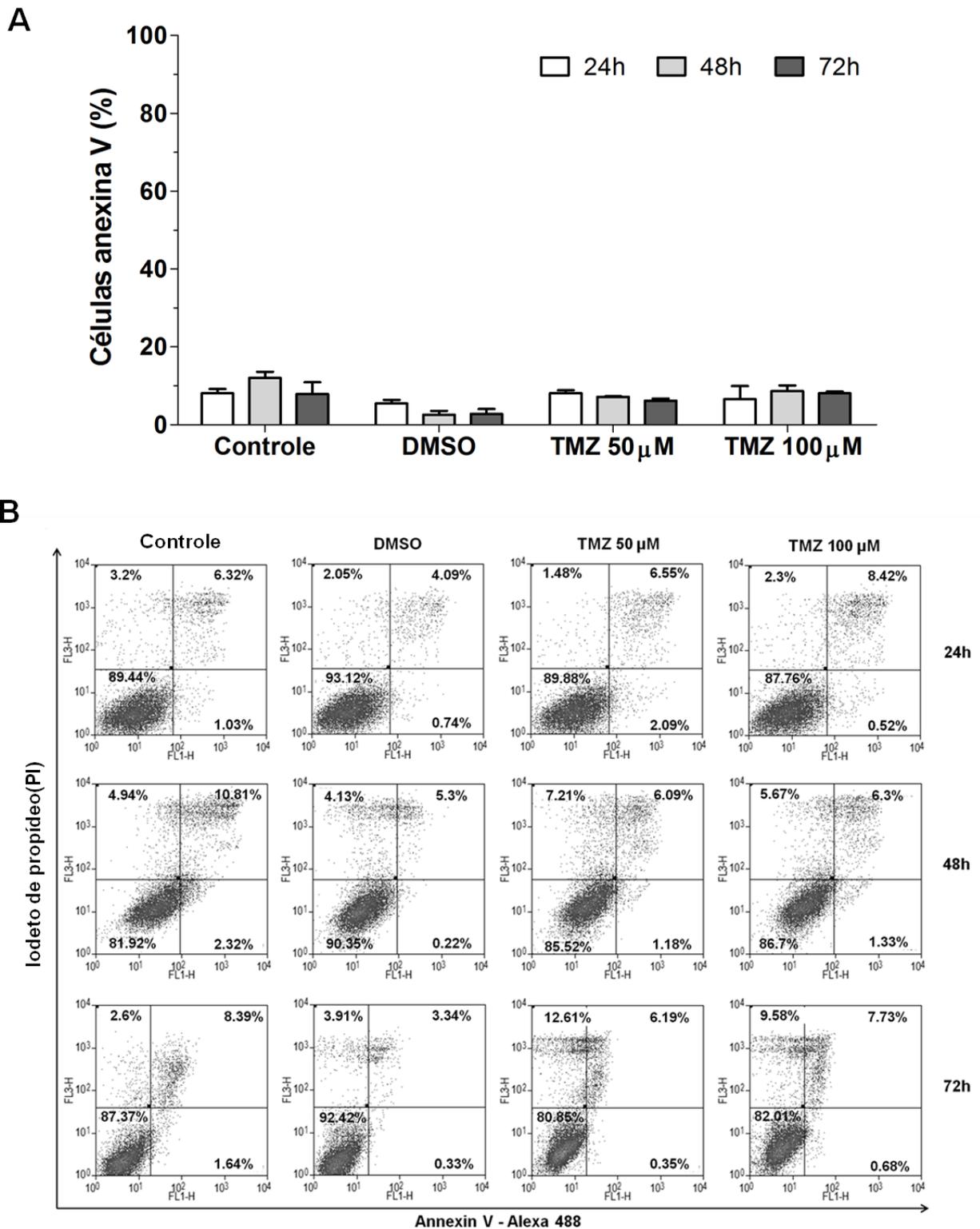
**A**



**B**



**Figura 6.10. Indução de apoptose avaliada por marcação da anexina V/PI.** A linhagem U251-MG foi tratada com (A, B) 6,0 e 12,0  $\mu$ M de LQB-118 durante 24, 48 e 72 horas para avaliação da marcação com anexina V/PI por citometria de fluxo. (A) Gráfico com média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão (células anexina V positivas = anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> e anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). (B) Histogramas representativos. \*\* p < 0,01



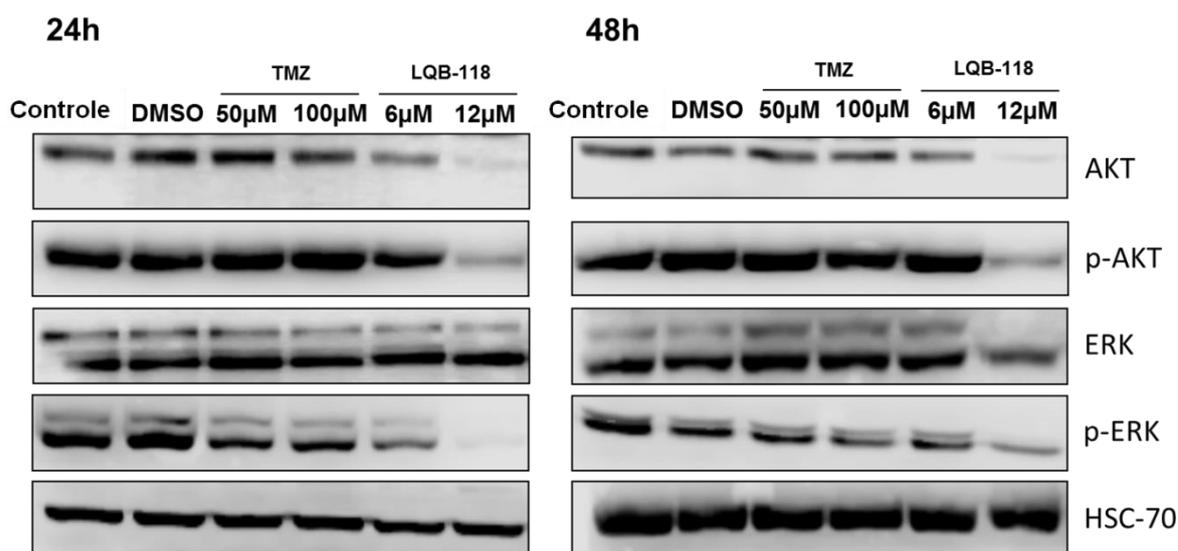
**Figura 6.11. Indução de apoptose avaliada por marcação da anexina V/PI.** A linhagem U251-MG foi tratada com (A, B) 50,0 e 100,0 µM de TMZ por 24, 48 e 72 horas para avaliação da marcação com anexina V/PI por citometria de fluxo. (A) Gráfico com média de três experimentos independentes ± desvio padrão (células anexina V positivas = anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> e anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). (B) Histogramas representativos. TMZ = temozolomida; P.I = iodeto de propídeo.

## 6.2) Estudo do mecanismo de ação do novo composto sintético LQB-118

A fim de investigar o mecanismo de ação do composto LQB-118, foram avaliadas as vias de sinalização relacionadas à sobrevivência celular na linhagem U251-MG.

### 6.2.1) LQB-118 reduz a fosforilação de ERK1/2 e de Akt

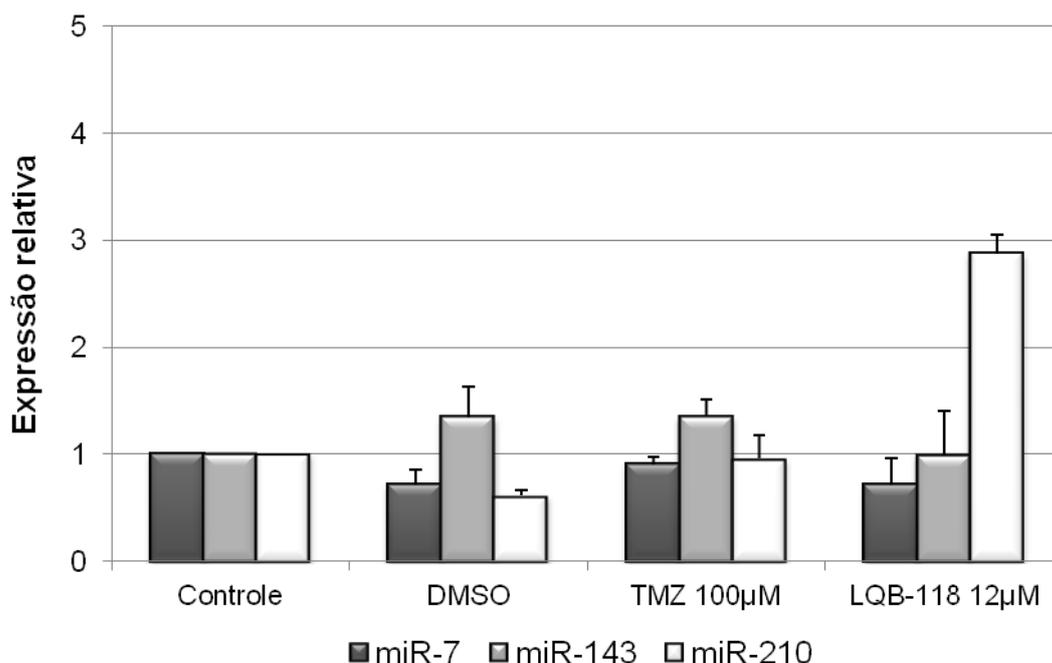
TMZ 50,0 e 100,0  $\mu\text{M}$ , e LQB-118 6,0  $\mu\text{M}$  reduziram discretamente a fosforilação de ERK1/2 em 24h e 48h de incubação, enquanto 12,0 $\mu\text{M}$  de LQB-118 reduziu acentuadamente a expressão e fosforilação de ERK1/2 e Akt (Figura 6.12). Esses dados sugerem a participação das vias de proliferação celular no efeito antitumoral do composto LQB-118.



**Figura 6.12. Expressão de ERK1/2 e Akt avaliada por Western blotting.** A linhagem U251-MG foi tratada com 50,0 e 100,0  $\mu\text{M}$  de TMZ e 6,0 e 12,0  $\mu\text{M}$  de LQB-118 por 24 e 48 horas para análise da expressão de Akt, pAkt, ERK1/2 e pERK1/2. Expressão de HSC-70 (70kDa) foi utilizada como controle endógeno. Figura representativa de três experimentos independentes. TMZ = temozolomida; pAKT, pERK = forma fosforilada.

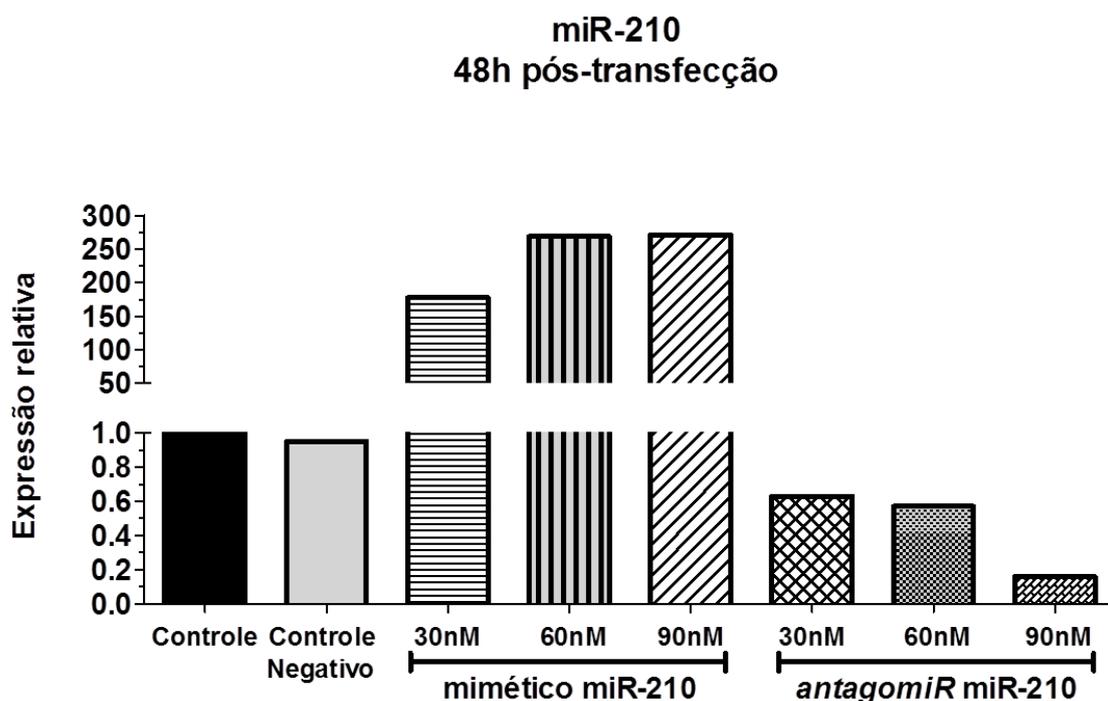
### 6.2.2) LQB-118 aumenta a expressão do miR-210

Para melhor compreensão sobre a regulação das vias de sobrevivência celular e o mecanismo de ação do LQB-118 selecionamos os miRNAs, miR-7 e miR-143, que regulam negativamente as vias de PI3K/Akt e ERK, e o miR-210 que regula diversos processos celulares como proliferação celular e apoptose. A TMZ não alterou a expressão de nenhum dos miRNAs avaliados, miR-7, miR-143 e miR-210. Entretanto, o LQB-118 alterou apenas o miR-210, aumentando em três vezes sua expressão, sugerindo participação desse miRNA na resposta ao composto (Figura 6.13).



**Figura 6.13. Expressão de miRNAs avaliada por PCR em tempo real.** A linhagem U251-MG foi incubada com 100,0 µM de TMZ e 12,0 µM de LQB-118 por 24 horas para análise da expressão dos microRNAs, miR-7, miR-143 e miR-210. A expressão microRNAs foi normalizada pelo controle endógeno, RNU6B e expressão do miR-143. Média de dois experimentos independentes ± desvio padrão. TMZ = temozolomida;

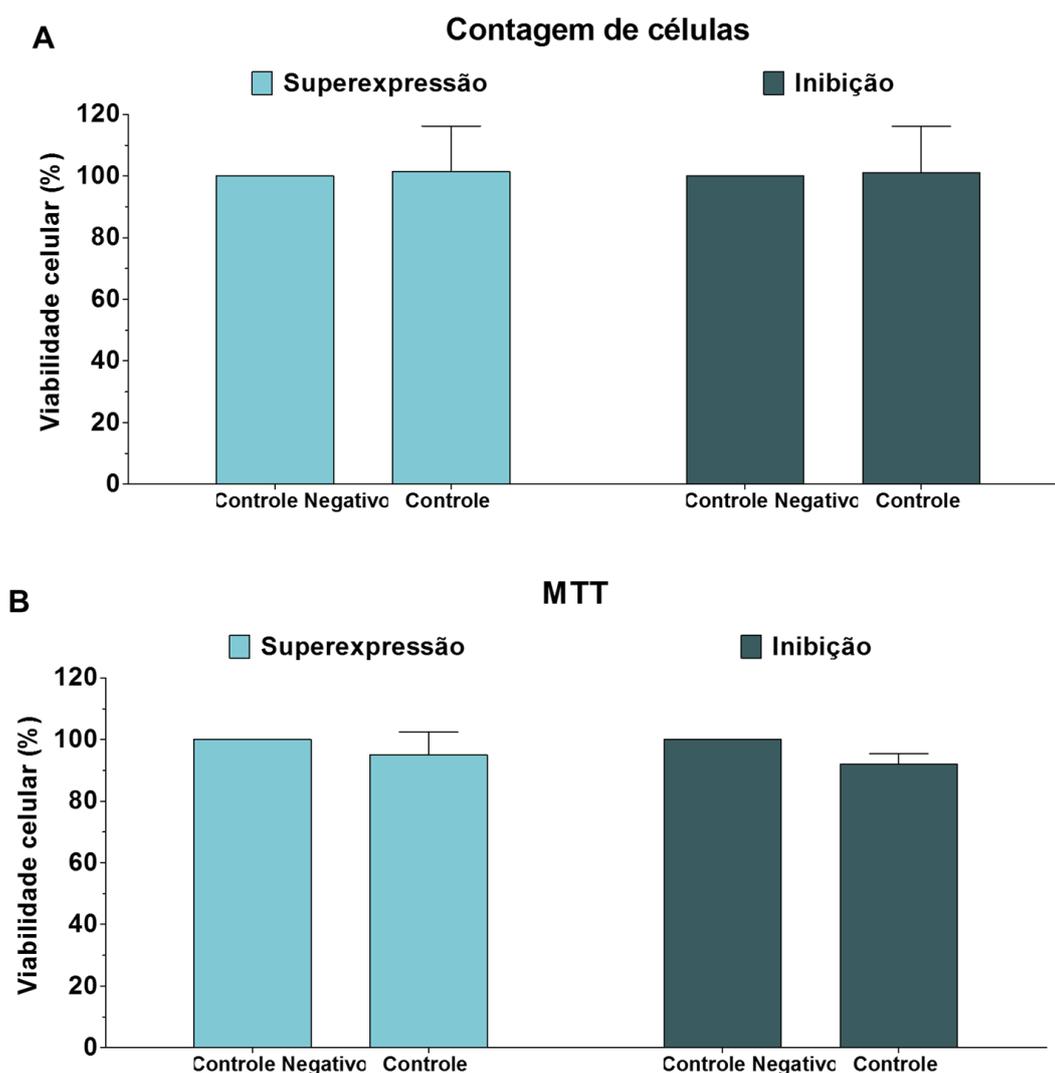
A fim de avaliar se o aumento da expressão de miR-210 observado após o tratamento com LQB-118 é necessário para o mecanismo de ação do composto, sua expressão foi modulada utilizando miméticos, para a superexpressão, e antagomiRs, para inibição, ambos disponíveis comercialmente. Primeiramente, foram testadas as concentrações de 30, 60 e 90 nM para a padronização da melhor concentração a ser utilizada para superexpressão e inibição do miR-210. As concentrações de 60 e 90nM do mimético aumentaram a expressão do miR-210 em 270 vezes, enquanto a concentração de 90 nM do antagomiR apresentou maior redução da expressão do miR-210, em 6,2 vezes (Figura 6.14). Para dar continuidade a avaliação, as concentrações de 60 nM e 90 nM de mimético e antagomiR, respectivamente, foram selecionadas.



**Figura 6.14. Padronização da superexpressão e inibição do miR-210 por QT-PCR.** Células da linhagem U251-MG foram transfectadas com 30, 60 e 90 nM de mimético de miR-210 ou inibidor (antagomiR) de miR-210 para análise da expressão do miR-210 48 horas após a transfecção. A expressão do miRNA foi normalizada pelo controle endógeno, RNU6B.

### 6.2.3) A modulação da expressão do miR-210 não altera a sensibilidade ao tratamento com LQB-118

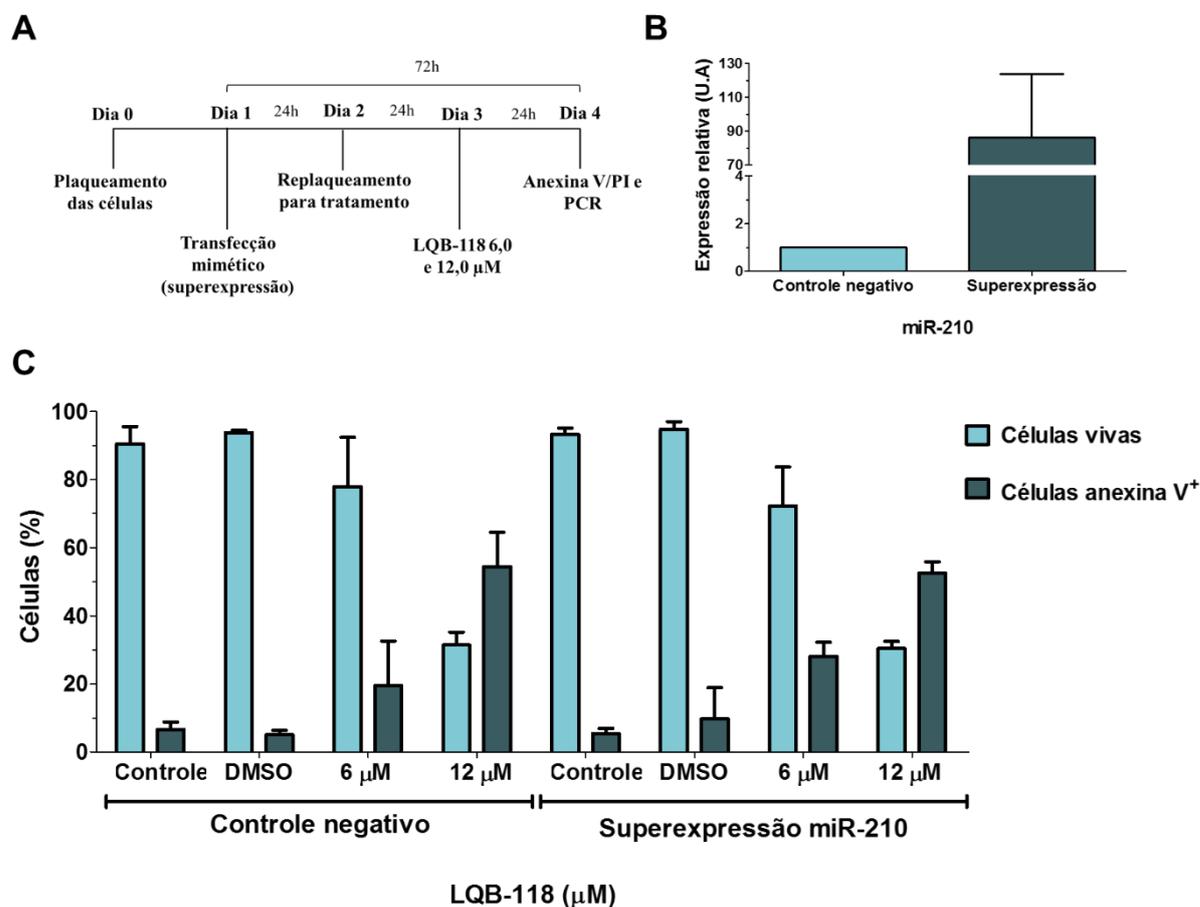
Primeiramente, foi avaliado se a superexpressão e a inibição do miR-210 alteravam a viabilidade das células da linhagem U251-MG por contagem de células em câmara de Neubauer e pelo ensaio de MTT. Os resultados demonstram que a modulação da expressão desse miRNA por si não altera a viabilidade celular pelos ensaios empregados nesse estudo (Figura 6.15). Em seguida, a expressão do miR-210 foi avaliada por qRT-PCR a fim de confirmar que a superexpressão ou inibição do miR-210 alterou a expressão do miR-210 conforme esperado (Figuras 6.16B e 6.17B). Os resultados demonstram que 72 horas após a transfecção com o mimético, o aumento da expressão do miR-210 foi de, aproximadamente, 80 vezes (Figura 6.16B). A transfecção com o antagomiR promoveu uma redução da expressão do miR-210 de, aproximadamente, 20 vezes (Figura 6.17B). Uma vez confirmada a modulação do miR-210, a indução de morte celular por anexina V/PI foi avaliada após tratamento com o composto LQB-118 (Figuras 6.16 e 6.17).



**Figura 6.15. Viabilidade celular avaliada pelos ensaios de MTT e contagem de células na linhagem U251-MG.** Porcentagem de células viáveis após superexpressão e inibição do miR-210. (A) Contagem de células 24 horas após transfecção com mimético ou antagomiR para o miR-210. (B) Ensaio de MTT 72 horas após transfecção com mimético ou antagomiR para o miR-210. Média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.

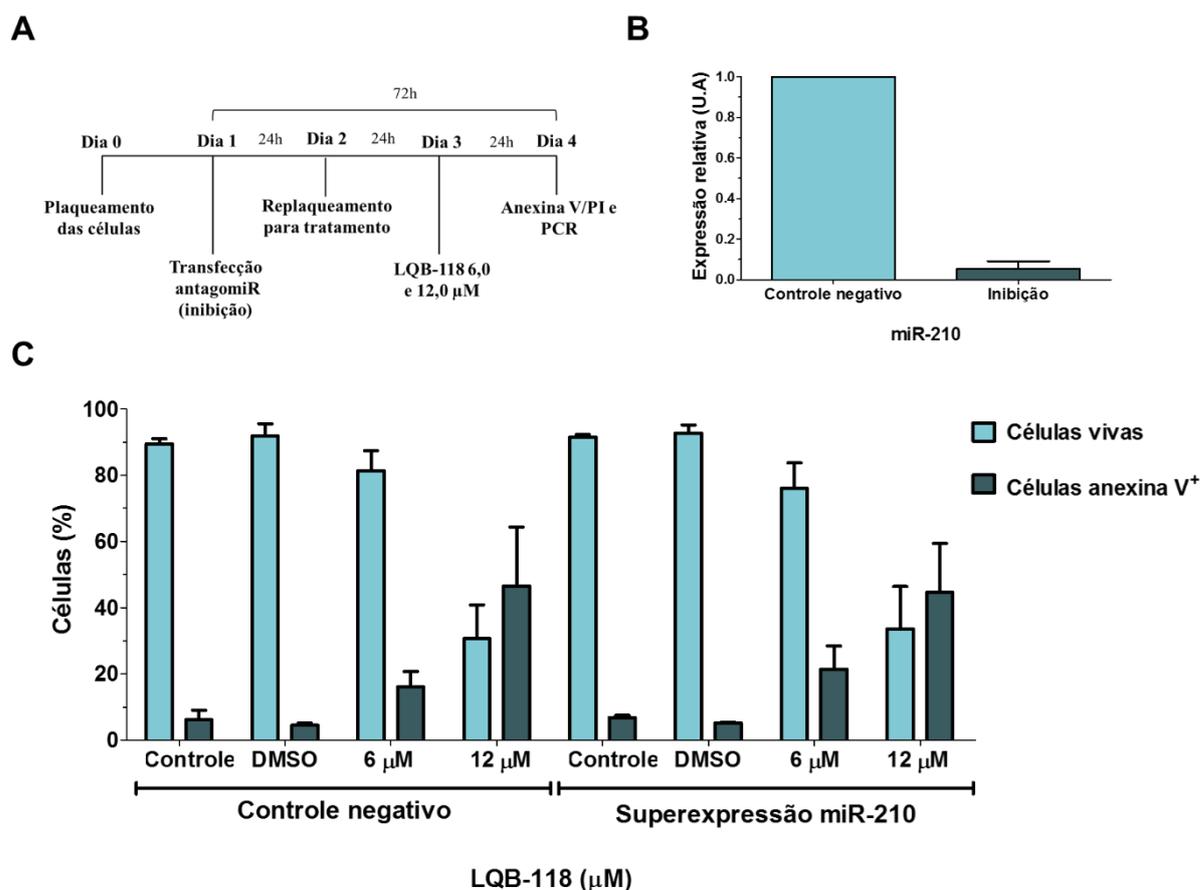
Os dados obtidos demonstraram que tanto a superexpressão quanto a inibição do miR-210 promoveram um pequeno aumento, não estatisticamente significativo, na marcação por anexina V de 8,5% e 5%, respectivamente, após tratamento com 6 $\mu$ M de LQB-118 (Figuras 6.16C e 6.17C). Nenhuma alteração foi observada após o tratamento com 12 $\mu$ M do composto (Figuras 6.16C e 6.17C). Esses dados sugerem que apesar do aumento da expressão do miR-210 observado com o tratamento com LQB-118, esse miRNA não é necessário para o efeito citotóxico do composto.

## U251-MG Superexpressão miR-210



**Figura 6.16.** Expressão do miR-210 e da marcação por anexina V/PI após superexpressão do miR-210 na linhagem U251-MG. Células da linhagem U251-MG foram transfectadas com 60 nM de mimético de miR-210 e tratadas com 6,0 e 12,0 µM de LQB-118 por 24 horas. (A) Desenho experimental. (B) Gráfico da expressão relativa do miR-210, 72h após transfecção. A expressão do miRNA foi normalizada pela expressão de RNU6B. (C) Gráfico da marcação por anexina V (células anexina V positivas = anexina V<sup>+</sup>/PI e anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). Todos os gráficos foram feitos com a média de três experimentos independentes ± desvio padrão.

## U251-MG Inibição miR-210



**Figura 6.17. Expressão do miR-210 e marcação por anexina V/PI após inibição do miR-210 na linhagem U251-MG.** Células da linhagem U251-MG foram transfectadas com 90 nM de inibidor de miR-210 (antagomiR) e tratadas com 6,0 e 12,0  $\mu$ M de LQB-118 por 24 horas. (A) Desenho experimental. (B) Gráfico da expressão relativa do miR-210, 72h após transfecção. A expressão do miRNA foi normalizada pela expressão de RNU6B. (C) Gráfico da marcação por anexina V (células anexina V positivas = anexina V<sup>+</sup>/PI e anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). Todos os gráficos foram feitos com a média de dois experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.

### 6.3) Estudo do perfil de radiorresistência das linhagens de GB e do papel do miR-210

A radioterapia é uma etapa importante do tratamento dos pacientes com GB, entretanto a radiorresistência é uma barreira para a eficiência do tratamento. Portanto, compreender os mecanismos de radiorresistência é relevante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Durante o desenvolvimento do trabalho da minha dissertação de mestrado, a linhagem U251-MG foi exposta a diversas doses de radiação ionizante para avaliação de morte celular, sendo observada a indução de fragmentação do DNA em 20% das células após exposição às doses de 8 e 16Gy após 24h de incubação. As mesmas doses acarretaram cerca de 50% das células com DNA fragmentado após 72 horas. Durante o desenvolvimento do

trabalho da dissertação de mestrado do aluno Gustavo Henrique Cardoso Guimarães, o perfil de sensibilidade à radiação ionizante das linhagens T98G e A172 também foi avaliado e seus resultados demonstraram que linhagem A172 é resistente às doses estudadas (4, 8, 16 e 24Gy) em todos os tempos (24, 48 e 72h). Enquanto a linhagem T98G, apresentou, aproximadamente, 30% das células com fragmentação do DNA 72h após exposição à 16 e 24Gy. Em conjunto esses dados sugeriram que as linhagens possuem diferentes perfis de radiorresistência. A linhagem U251-MG apresenta um perfil mais sensível seguida pela linhagem T98G e, a linhagem A172 apresenta um perfil mais resistente.

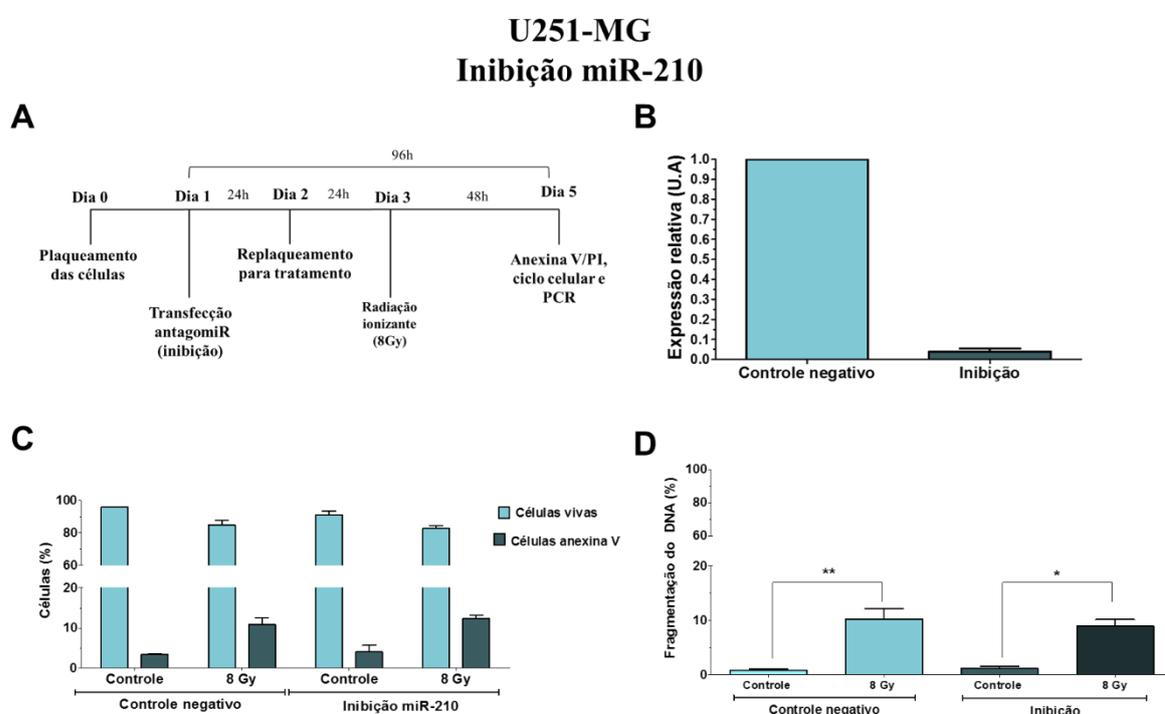
Sabendo-se que as linhagens apresentam diferentes perfis de radiorresistência e diversos estudos têm associado à superexpressão do miR-210 com a radiorresistência em câncer de pulmão, cólon e hepatoma (GROSSO *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2015), selecionamos as linhagens com o perfil mais sensível (U251-MG) e mais resistente (A172) para avaliar o papel do miR-210.

### **6.3.1) Modulação dos níveis de expressão do miR-210 não altera o perfil de radiorresistência.**

Após 96h da transfecção com o inibidor, a expressão do miR-210 foi 25 vezes reduzida na linhagem U251-MG (Figura 6.18B). Entretanto, a inibição do miR-210 não alterou o perfil de radiorresistência da linhagem. A dose de 8Gy foi capaz de induzir aproximadamente 10% de marcação com anexina V e 20% de fragmentação do DNA, independente da inibição do miR-210 (Figura 6.18C e D). Visto que essa linhagem é mais sensível a radiação ionizante em comparação com as linhagens A172 e T98G, o miR-210 também foi superexpresso a fim de avaliar se a superexpressão seria capaz de tornar a linhagem mais resistente (Figura 6.19). Contudo, a superexpressão do miR-210 também não alterou o perfil de radiorresistência da linhagem U251-MG, sugerindo que esse miRNA não está envolvido na resposta ao dano no DNA. Para corroborar esses dados, a inibição do miR-210 também foi induzida na linhagem A172 (Figura 6.20).

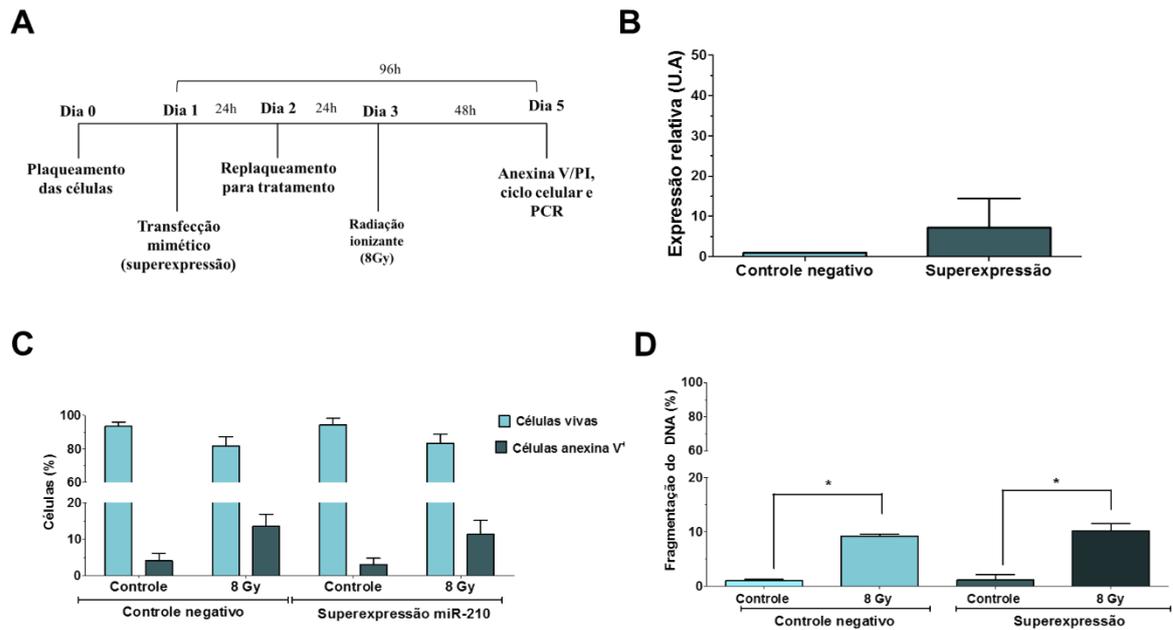
A inibição do miR-210 reduziu sua expressão em 5 vezes e não promoveu alteração na viabilidade celular na linhagem A172, assim como foi observado para a linhagem U251-MG (Figura 6.20B e C). Apesar do tratamento com a radiação ionizante não promover fragmentação do DNA, conforme descrito acima, a dose de 8Gy promoveu redução significativa da viabilidade celular após 48h de tratamento (54%). Além disso, o tratamento com 8Gy nas células com miR-210 inibido, reduziu de forma significativa a viabilidade celular em relação às células sem inibição, apresentando 30,87% *versus* 45,94% de células viáveis após o tratamento (Figura 6.20D). Dado que a radiação ionizante promove danos no

DNA, o perfil do ciclo celular foi avaliado. A dose de 8Gy promoveu aumento das células em G2/M, o que também foi observado mediante inibição do miR-210 (Figura 6.20F e G). Além do ciclo celular, foram avaliadas a fragmentação do DNA e a marcação por anexina induzidas pela radiação ionizante. Os resultados mostraram que não houve indução de fragmentação do DNA, tampouco marcação por anexina V na linhagem A172, corroborando seu perfil radorresistente (Figura 6.20E e H). Do mesmo modo, a inibição do miR-210 também não alterou a sensibilidade à radiação ionizante (Figura 6.20E e H). Esses dados corroboram os resultados observados na linhagem U251-MG, entretanto o miR-210 parece ter um papel importante na proliferação celular, acarretando, quando inibido, a redução da viabilidade celular mediante o tratamento com radiação ionizante.



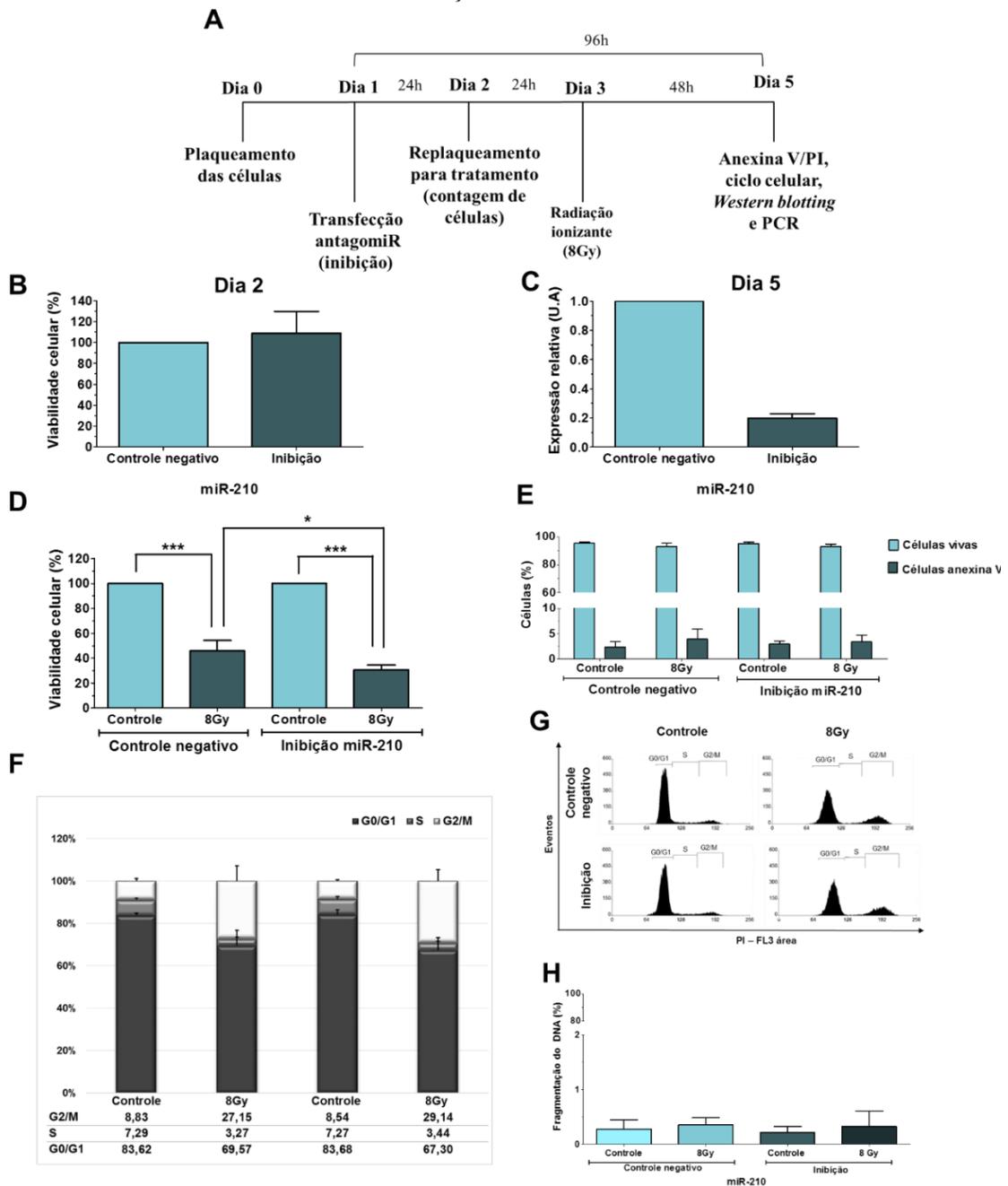
**Figura 6.18. Expressão do miR-210, marcação por anexina V/PI e fragmentação do DNA após inibição do miR-210 na linhagem U251-MG.** Células da linhagem U251-MG foram transfectadas com 90 nM de inibidor de miR-210 (antagomiR) e expostas à 8Gy de radiação ionizante, posteriormente incubadas por 48h. (A) Desenho experimental. (B) Expressão relativa do miR-210, 96h após transfecção. A expressão do miRNA foi normalizada pela expressão de RNU6B. Após exposição à radiação ionizante (8Gy) foram avaliadas a (C) marcação por anexina V (células anexina V positivas = anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> e anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) e fragmentação do DNA (D). Todos os gráficos foram feitos com média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

## U251-MG Superexpressão miR-210



**Figura 6.19. Expressão do miR-210, marcação por anexina V/PI e fragmentação do DNA após superexpressão do miR-210 na linhagem U251-MG.** Células da linhagem U251-MG foram transfectadas com 60 nM de mimético de miR-210 (superexpressão) e expostas à 8Gy de radiação ionizante, posteriormente incubadas por 48h. (A) Desenho experimental. (B) Expressão relativa do miR-210, 96h após transfecção. A expressão do miRNA foi normalizada pela expressão de RNU6B. Após exposição à radiação ionizante (8Gy) foram avaliadas a (C) marcação por anexina V (células anexina V positivas = anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> e anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) e fragmentação do DNA (F). Todos os gráficos foram feitos com média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. \*  $p < 0,05$

A172  
Inibição miR-210

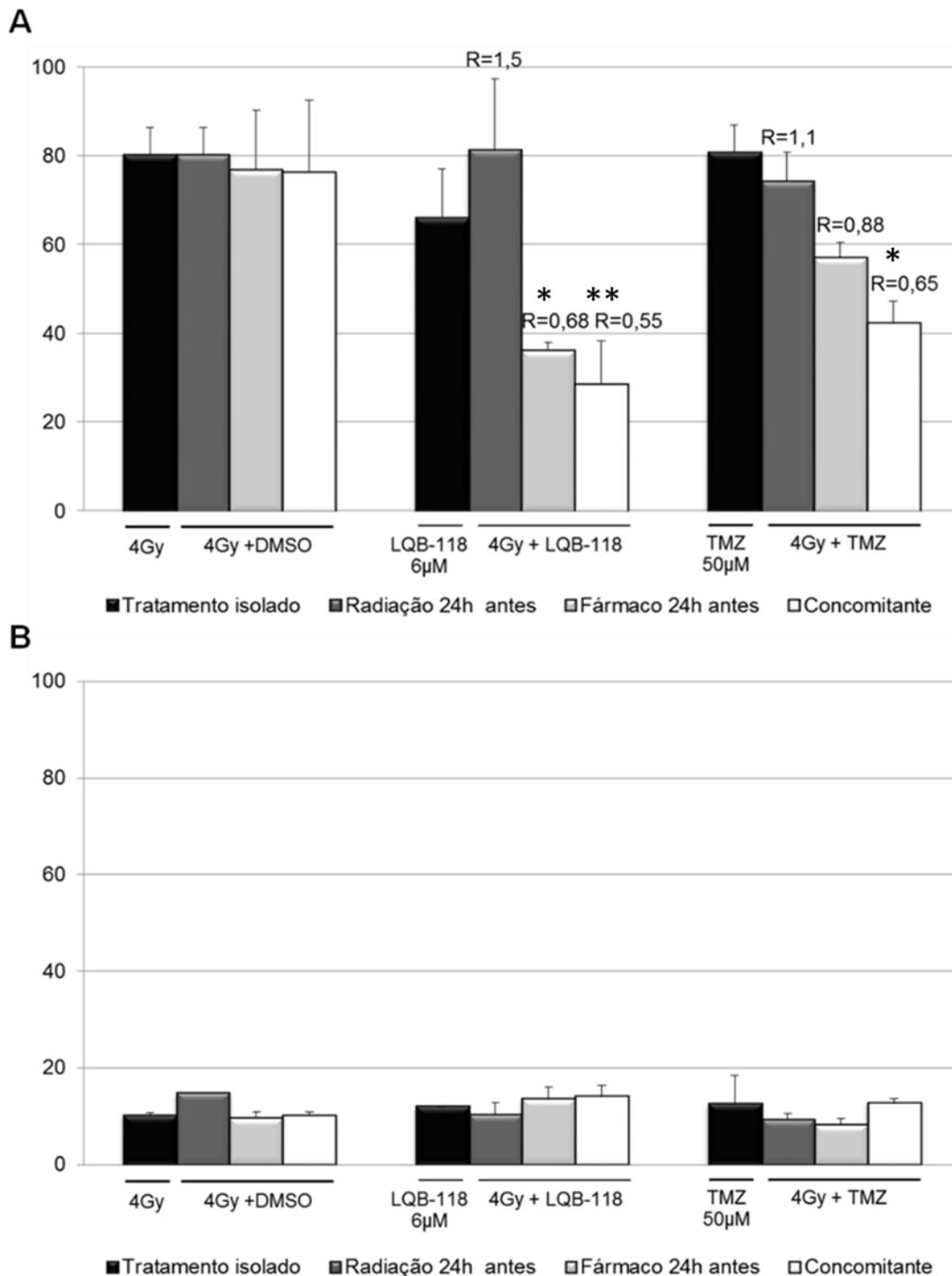


**Figura 6.20. Expressão do miR-210, marcação por anexina V/PI, ciclo celular e contagem de células após inibição do miR-210 na linhagem A172.** Células da linhagem A172 foram transfectadas com 90 nM de inibidor de miR-210 (antagomiR) e expostas a 8Gy de radiação ionizante, posteriormente incubadas por 48h. (A) Desenho experimental. (B) Contagem de células 24h após transfecção com antagomiR. (C) Expressão relativa do miR-210, 96h após transfecção. A expressão do miRNA foi normalizada pela expressão de RNU6B. (D-F) Após exposição à radiação ionizante (8Gy) foram avaliadas a (D) contagem de células viáveis, (E) marcação por anexina V (células anexina V positivas = anexina V<sup>+</sup>/PI e anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) e (F) distribuição das células nas fases do ciclo celular. (G) Histograma representativo do ciclo celular. (H) Fragmentação do DNA após o tratamento. Todos os gráficos foram feitos com a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.

\*  $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$

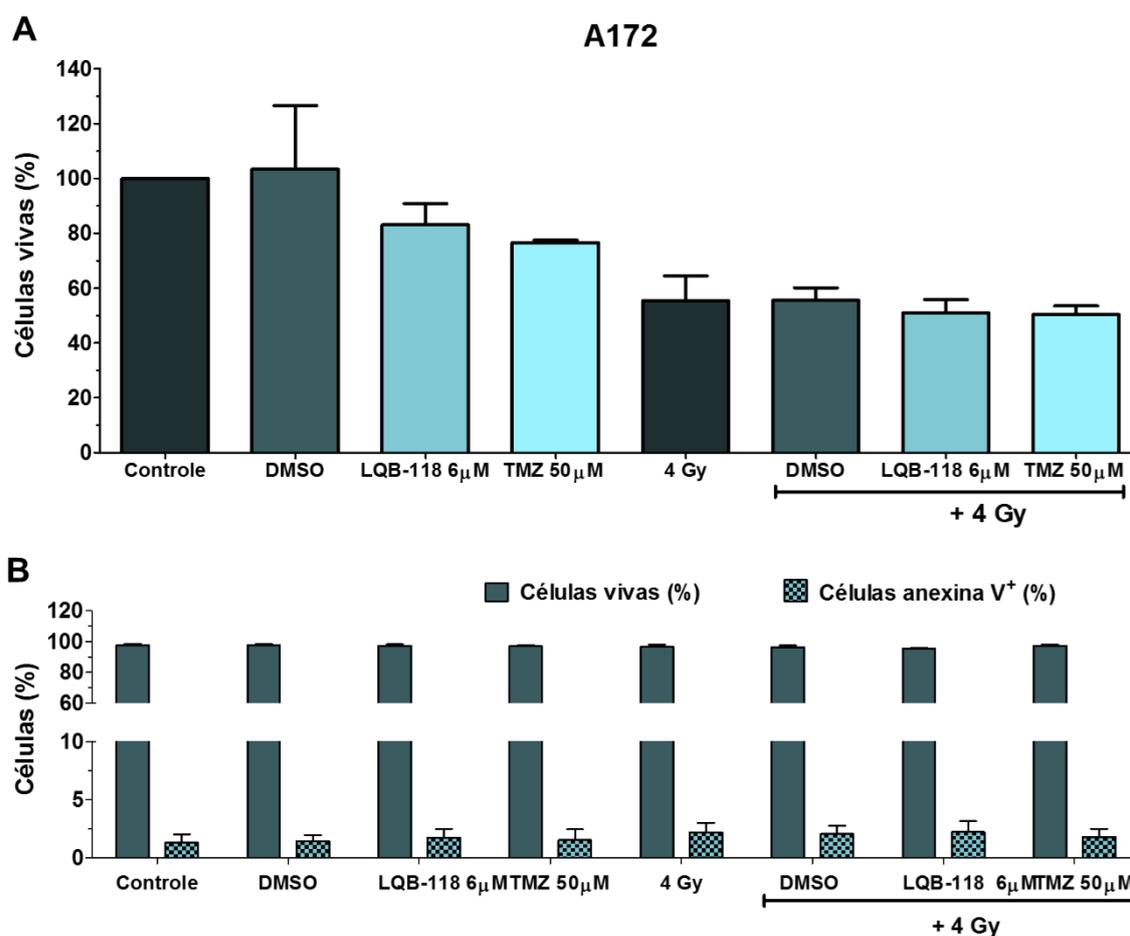
#### **6.4) LQB-118 e TMZ possuem efeito sinérgico quando associados à radiação ionizante na linhagem U251-MG**

O tratamento do GB baseia-se em cirurgia seguida por radioterapia associada à quimioterapia. Entretanto, a maioria dos pacientes apresenta quimio- e radiorresistência e, atualmente, nem todos os pacientes se beneficiam da quimioterapia. Com isso, o efeito da associação de LQB-118 com a radiação ionizante foi avaliado, primeiramente, pelo ensaio de exclusão por azul tripan na linhagem U251-MG (Figura 6.21A). LQB-118 6,0 $\mu$ M ou TMZ 50,0  $\mu$ M associados com 4Gy de radiação ionizante concomitantemente apresentaram efeito sinérgico ( $R = 0,55$  e  $R = 0,65$ , respectivamente). No entanto, LQB-118 teve um efeito sinérgico ( $R = 0,68$ ) e TMZ um efeito aditivo ( $R = 0,88$ ), quando adicionados 24 horas antes da radiação ionizante (4Gy). Não foi observado efeito sinérgico, nem aditivo quando a radiação ionizante foi adicionada antes dos fármacos, LQB-118 e TMZ, com  $R = 1,5$  e  $R = 1,1$ , respectivamente (Figura 6.21A). Por outro lado, nenhuma das combinações induziu a apoptose quando avaliada por marcação com anexina V/PI (Figura 6.21B). Esses resultados demonstram que tanto a TMZ quanto o LQB-118 apresentam ação sinérgica com a radiação ionizante na inibição da proliferação celular, principalmente quando adicionados concomitantemente. Diante disso, avaliamos se o tratamento concomitante do LQB-118 ou TMZ com a radiação ionizante também apresentaria efeito potencializado sobre a viabilidade celular nas linhagens celulares A172 e T98G (Figuras 6.22 e 6.23).

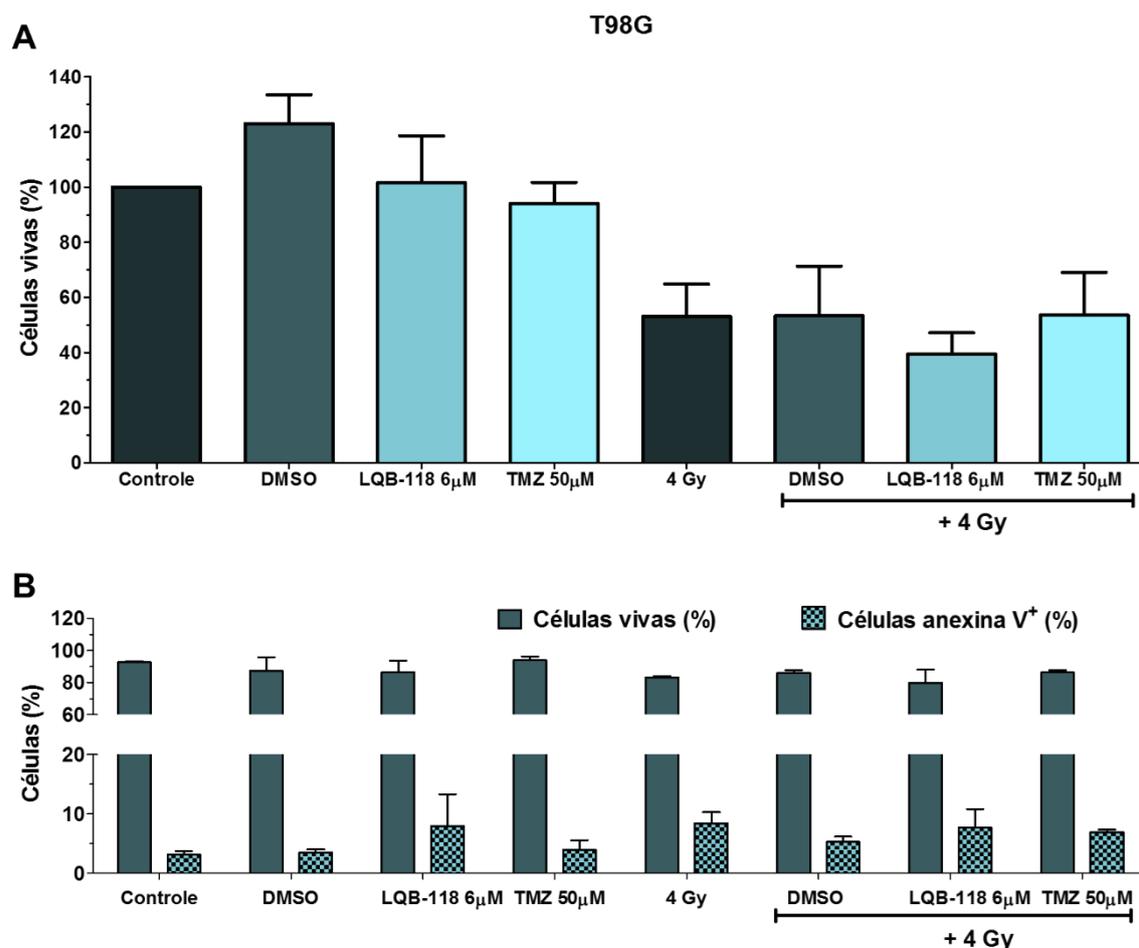


**Figura 6.21. Associação de LQB-118 ou temozolamida (TMZ) com radiação ionizante na linhagem U251-MG.** Células da linhagem U251-MG foram incubadas com TMZ 50,0 µM ou LQB-118 6,0 µM associado com 4Gy de radiação ionizante. (A) Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de exclusão por azul de tripan. (B) Morte celular avaliada pelo ensaio de anexina V / PI por citometria de fluxo. Média de três experimentos independentes ± desvio padrão. R representa o índice de interação, onde  $R < 0,8$  representa efeito sinérgico,  $0,8 < R < 1,2$  representa efeito aditivo e  $R > 1,2$  efeito antagônico ou sem efeito combinado. \*  $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$

Os resultados demonstram que a combinação de LQB-118 com a radiação ionizante não apresentou efeito aditivo, nem efeito sinérgico em ambas as linhagens. O tratamento com 4Gy reduziu a viabilidade celular em 50% em ambas as linhagens, essa redução também foi observada no tratamento concomitante (Figura 6.22A e 6.23A). O mesmo foi observado para a combinação com TMZ em ambas as linhagens (Figura 6.22A e 6.23A). Após a avaliação da marcação por anexina V, as linhagens A172 e T98G apresentaram resultado semelhante à linhagem U251-MG, sem marcação significativa de anexina V em nenhuma das condições avaliadas (Figura 6.22B e 6.23B).



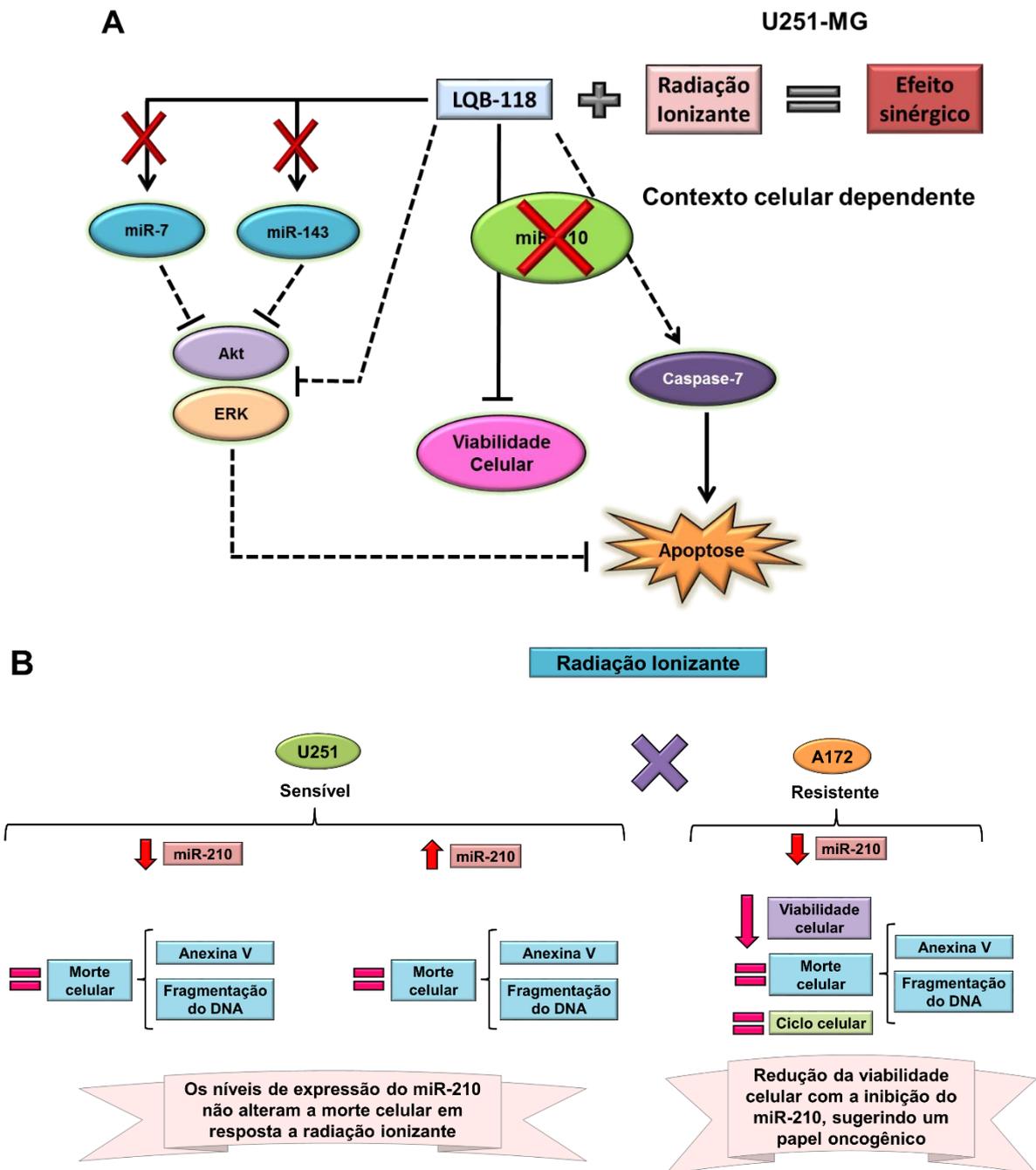
**Figura 6.22. Associação de LQB-118 ou temozolamida (TMZ) com radiação ionizante na linhagem A172.** Células da linhagem A172 foram incubadas com TMZ 50,0  $\mu$ M ou LQB-118 6,0  $\mu$ M associado com 4Gy de radiação ionizante. (A) Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de exclusão por azul de tripan. (B) Morte celular avaliada pelo ensaio de anexina V / PI por citometria de fluxo. Média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 6.23. Associação de LQB-118 ou temozolamida (TMZ) com radiação ionizante na linhagem T98G.** Células da linhagem T98G foram incubadas com TMZ 50,0  $\mu$ M ou LQB-118 6,0  $\mu$ M associado com 4Gy de radiação ionizante. (A) Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de exclusão por azul de tripan. (B) Morte celular avaliada pelo ensaio de anexina V / PI por citometria de fluxo. Média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.

O fato do efeito aditivo ter sido observado apenas na linhagem U251-MG reforça a importância da identificação de biomarcadores, para que seja possível determinar quais grupos de pacientes irão se beneficiar de um tratamento específico. Esses dados sugerem que a combinação de baixas concentrações do composto LQB-118 juntamente com doses menores de radiação ionizante pode representar uma nova abordagem terapêutica para reduzir a toxicidade e aumentar a resposta ao tratamento em alguns grupos de pacientes com GB.

A fim de resumir os dados obtidos a partir do estudo *in vitro*, foram desenhados dois esquemas representados na figura 6.24.



**Figura 6.24** Esquemas representativos dos principais resultados obtidos na parte do estudo desenvolvida *in vitro*. (A) Esquema mostrando que o composto LQB-118 apresenta efeito antitumoral mediado pela inibição de vias de sobrevivência celular e indução de morte celular. Além disso, o LQB-118 apresenta efeito sinérgico sobre a viabilidade celular quando combinado com a radiação ionizante na linhagem U251-MG. (B) As linhagens U251-MG e A172 apresentam perfis diferentes de sensibilidade a radiação ionizante. Entretanto, apenas na linhagem mais resistente, A172, a inibição do miR-210 apresentou efeito sobre a viabilidade celular, sugerindo um papel oncogênico desse miRNA e participação na maior radorresistência da linhagem.

### **6.5) Avaliação da expressão do miR-210 em amostras de sangue periférico de pacientes**

Conforme citado anteriormente, o diagnóstico inicial da doença é baseado apenas em exames de imagem, principalmente ressonância magnética (RM). Os pacientes realizam os exames de imagem devido a alterações clínicas inespecíficas tal como a cefaléia (WELLER 2011). Após a confirmação de uma neoplasia cerebral, a classificação só é possível por análise histopatológica do tumor (ROSSEAU *et al.*, 2008). De acordo, essencialmente, com os exames de imagem, 43 amostras de sangue periférico foram obtidas de pacientes matriculados no Serviço de Neurocirurgia do INCA com suspeita de astrocitoma. Após análise histopatológica, apenas 18 amostras foram confirmadas como astrocitomas. Dentre elas, dois astrocitomas pilocíticos (OMS grau I), sendo que a confirmação em um dos casos não foi possível devido ao escasso material obtido na biópsia. Três casos eram astrocitomas difusos (grau II), cinco eram astrocitomas anaplásicos (OMS grau III), oito eram GBs (OMS grau IV), dentre eles, um gliossarcoma e um GB com focos de componente de oligodendroglioma. Dos 18 casos de astrocitomas classificados de acordo com a análise histopatológica e de imagem, o caso de gliossarcoma foi excluído, totalizando 17 casos incluídos. Das 25 amostras restantes, foram diagnosticados três casos de metástase, três de oligoastrocitoma, quatro de meningioma, dez de oligodendroglioma, uma de hemangioma, uma de neurocitoma, uma de pineoblastoma, duas amostras com diagnóstico inconclusivo, sendo uma de glioma de alto grau residual (OMS grau III ou grau IV). Na tabela 6.1 estão descritas as características demográficas e clínicas de todos os pacientes incluídos no estudo.

Dos 17 casos estudados, sete amostras foram obtidas na ocasião do diagnóstico, duas amostras foram coletadas na segunda intervenção cirúrgica sem tratamento prévio, quatro após tratamento com protocolo de radioterapia fracionada associada à TMZ, seguida por TMZ adjuvante, duas após tratamento apenas com radioterapia e duas após tratamento quimioterápico apenas (Tabela 6.2). Desses casos, seis pacientes evoluíram para o óbito, sendo que dois deles em menos de dois meses após o diagnóstico da doença sem realizar nenhum tratamento (uma paciente de 79 anos de idade apresentando astrocitoma anaplásico e um paciente de 66 anos de idade apresentando GB). Dos pacientes que evoluíram ao óbito, dois possuíam astrocitoma anaplásico (grau III) e quatro, GB (grau IV) (Tabela 6.2). Esses dados reforçam a alta agressividade da doença e a necessidade de novas alternativas de tratamento e de fatores que possam indicar quais pacientes podem se beneficiar de uma determinada terapia.

Tabela 6.1. Características dos 17 pacientes do Serviço de Neurocirurgia do INCA (Janeiro/2014 - Outubro/2015)

Paciente	Diagnóstico	Idade (anos)	Gênero	Localização do tumor	Óbito	Momento da coleta
P2	Astrocitoma anaplásico (OMS grau III)	79	Feminino	Parieto-temporal direita	Sim	DIAGNÓSTICO
P3	Glioblastoma (OMS grau IV)	48	Feminino	Temporo-parietal direita	Não	DIAGNÓSTICO
P4	Possível astrocitoma pilocítico (OMS grau I)	43	Masculino	Tronco cerebral, assoalho do IV ventrículo e pedúnculo cerebelar à direita	Não	DIAGNÓSTICO
P7	Glioblastoma (OMS grau IV)	60	Masculino	Frontal esquerda	Sim	Após cirurgia, RT + TMZ
P10	Astrocitoma anaplásico (OMS grau III)	29	Feminino	Fronto-parietal direita	Não	Segunda intervenção cirúrgica sem tratamento prévio
P14	Glioblastoma (OMS grau IV)	45	Masculino	Temporo-parietal direita	Sim	Após cirurgia, RT + TMZ
P21	Astrocitoma difuso (OMS grau II)	53	Masculino	Lobo frontal e predominantemente parietal esquerda	Não	DIAGNÓSTICO
P26	Glioblastoma (OMS grau IV)	63	Feminino	Temporal esquerda	Não	Após cirurgia, RT + TMZ
P28	Astrocitoma difuso (OMS grau II)	39	Feminino	Parietal direita	Não	Segunda intervenção cirúrgica sem tratamento prévio
P29	Glioblastoma (OMS grau IV)	53	Masculino	Fronto-parietal esquerda	Não	Após cirurgia, RT + TMZ
P30	Glioblastoma (OMS grau IV)	66	Masculino	Frontal, temporal e parietal esquerda	Sim	DIAGNÓSTICO
P31	Astrocitoma anaplásico (OMS grau III)	38	Feminino	Frontal esquerda	Não	Após cirurgia e QT
P32	Astrocitoma difuso (OMS grau II)	49	Feminino	Frontal esquerda	Não	DIAGNÓSTICO
P34	Astrocitoma pilocítico (OMS grau I)	38	Masculino	Tumor orbitário, intracranial	Não	DIAGNÓSTICO
P36	Astrocitoma anaplásico (OMS grau III)	32	Masculino	Frontotemporal esquerda	Sim	Após cirurgia e RT
P38	Glioblastoma com componente oligo	51	Masculino	Temporal direita	Não	Após cirurgia e QT com TMZ
P45	Astrocitoma anaplásico (OMS grau III)	70	Masculino	Temporal esquerda	Sim	Após cirurgia e RT

QT = quimioterapia/ RT = radioterapia / TMZ = temozolamida

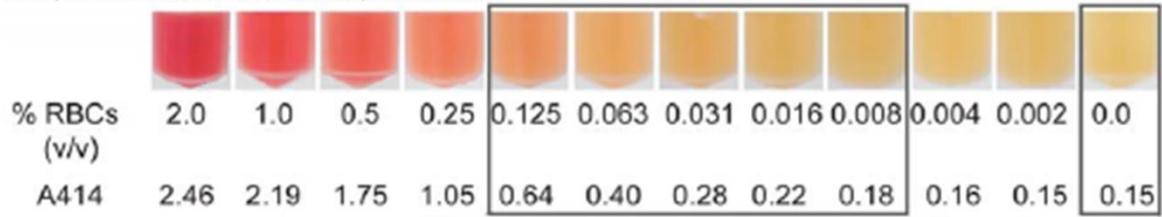
Tabela 6.2. Características gerais de 17 pacientes com astrocitoma do Serviço de Neurocirurgia do INCA, incluídos no estudo.

Características	Astrocitoma pilocítico (grau I)	Astrocitoma difuso (grau II)	Astrocitoma anaplásico (grau III)	Glioblastoma (grau IV)	TOTAL
<b>Gênero</b>					
Feminino	—	2	3	2	7
Masculino	2	1	2	5	10
<b>Idade (anos)</b>					
Variação	38-43	39-53	29-79	45-66	29-79
Mediana	40,5	49	38	53	49
<b>Tratamento</b>					
Ao diagnóstico	2	2	1	2	7
Cirurgia	—	1	1	—	2
Cirurgia + RT	—	—	2	—	2
Cirurgia + QT	—	—	1	1	2
Cirurgia + RT + QT	—	—	—	4	4
<b>Óbito</b>					
	—	—	2	4	6

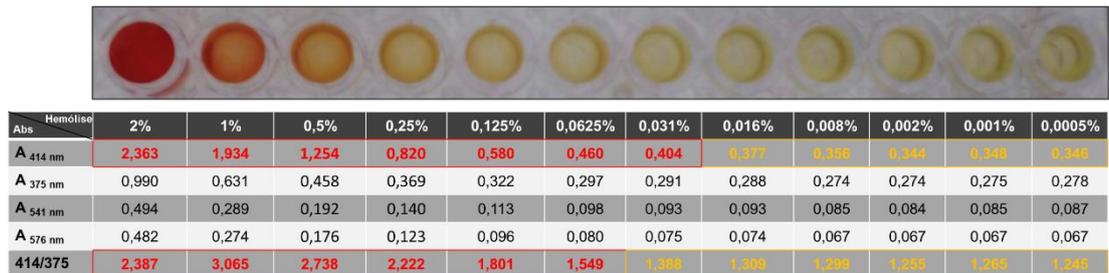
QT = quimioterapia/ RT = radioterapia / TMZ = temozolamida

Para a investigação da expressão do miR-210 nas amostras de sangue periférico, a presença de hemólise nas 17 amostras de pacientes incluídos no estudo foi avaliada. Primeiramente, foi realizada uma curva padrão baseada no estudo desenvolvido por Kirschner e colaboradores em 2011, conforme mostrado na Figura 6.24, onde foi estabelecido um ponto de corte para este estudo de  $A_{414nm} < 0,4$  associado com a razão  $A_{414}/A_{375} < 1,4$  (Figura 6.25). Dentre as amostras obtidas nesse estudo, as amostras denominadas P4 e P36 foram consideradas com hemólise e excluídas do estudo (Figura 6.26). Além disso, as amostras dos doadores também passaram pela mesma análise e todas foram consideradas próprias para dar continuidade ao estudo (Figura 6.27).

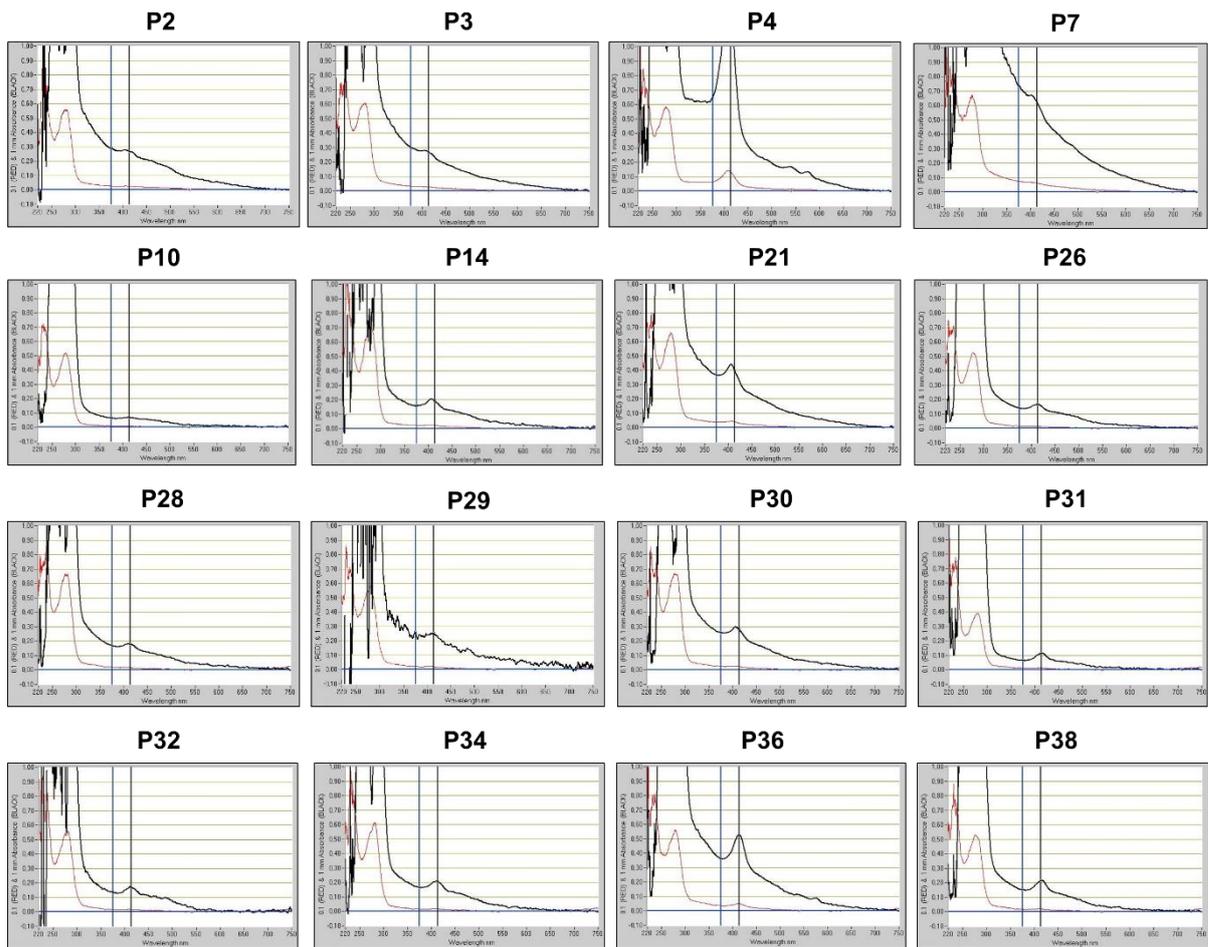
**A** Curva padrão do estudo de Kirschner *et al.*, *plosOne*, 2011



**B**

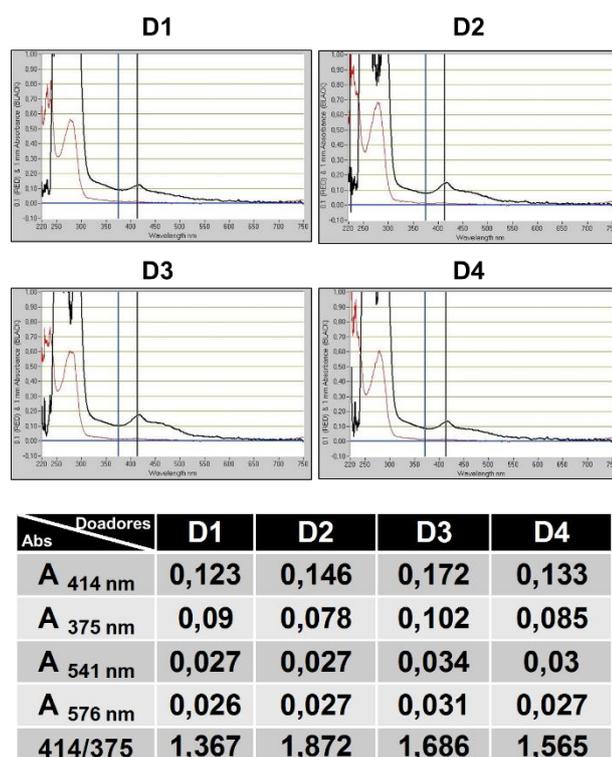


**Figura 6.25. Curva padrão de hemólise.** Hemácias foram lisadas e diluídas de forma seriada para avaliação da absorbância nos comprimentos de onda de 414, 541, 576 e 375nm por espectrofotometria utilizando NanoDrop na configuração UV-Vis. Tabela descrevendo os valores obtidos e a foto representativa da curva padrão desenvolvida neste trabalho (B) em comparação à curva padrão desenvolvida no estudo de Kirschner *et al.*, *PlosOne*, 2011 (A). Os valores correspondentes à hemólise foram destacados em vermelho na tabela e, em amarelo, os valores das amostras consideradas não influenciadas por hemólise.



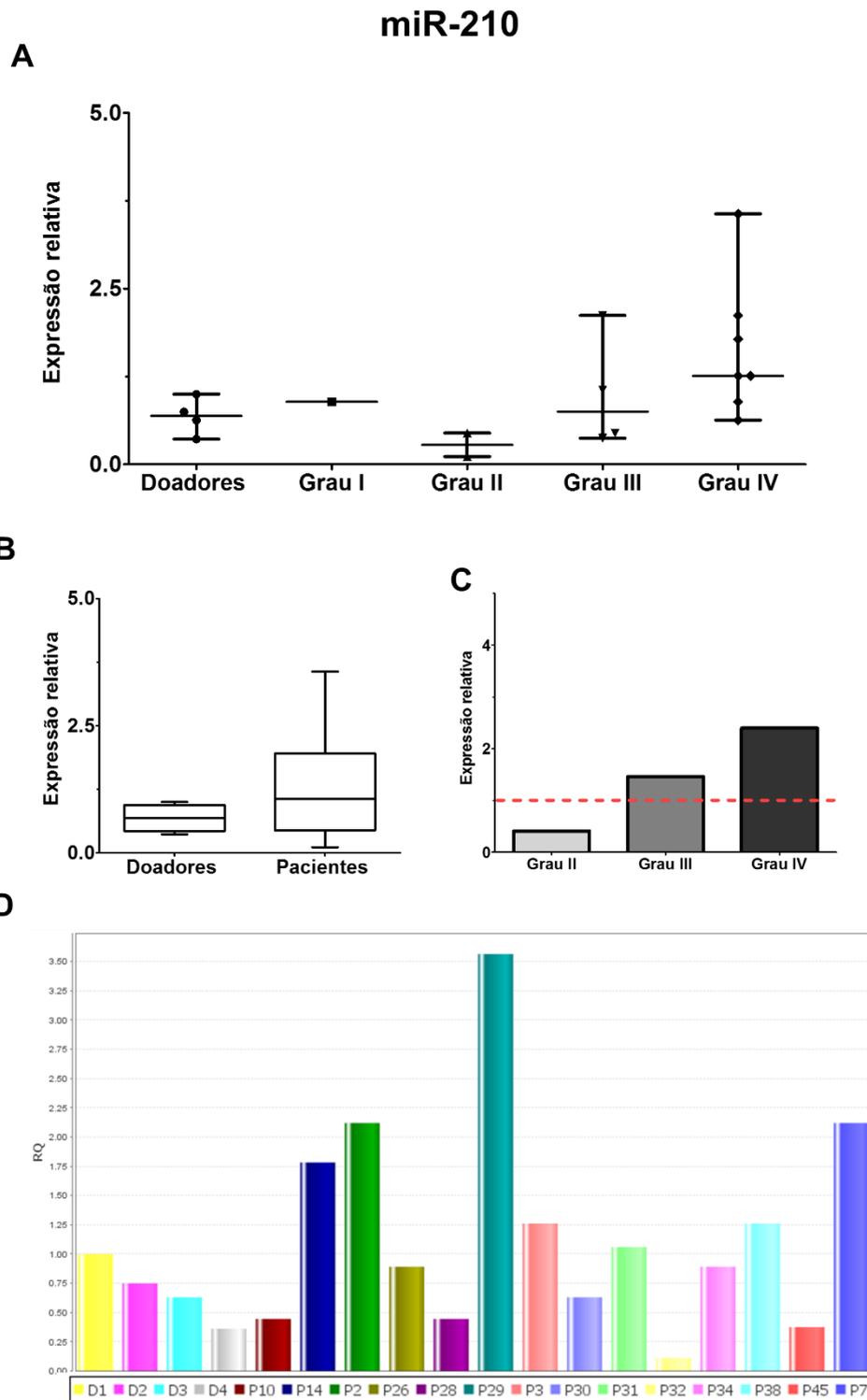
Pacientes	P2	P3	P4	P7	P10	P14	P21	P26	P28	P29	P30	P31	P32	P34	P36	P38	P45
A 414 nm	0,288	0,207	1,264	0,622	0,067	0,096	0,399	0,168	0,176	0,232	0,260	0,114	0,169	0,205	0,523	0,210	0,165
A 375 nm	0,288	0,301	0,653	0,735	0,064	0,159	0,367	0,141	0,168	0,259	0,258	0,065	0,137	0,165	0,362	0,150	0,062
A 541 nm	0,088	0,084	0,167	0,194	0,017	0,051	0,099	0,041	0,046	0,086	0,069	0,018	0,033	0,042	0,111	0,040	0,053
A 576 nm	0,064	0,064	0,132	0,138	0,011	0,034	0,071	0,030	0,041	0,072	0,054	0,018	0,032	0,032	0,090	0,034	0,052
414/375	0,824	0,807	1,936	0,946	1,007	1,156	1,397	1,177	1,060	0,873	1,066	1,754	1,226	1,332	1,445	1,433	1,694

**Figura 6.26. Hemólise nas amostras de plasma de pacientes com glioma.** A absorvância das amostras nos comprimentos de onda de 414, 541, 576 e 375nm foi avaliada por espectrofotometria utilizando NanoDrop na configuração UV-Vis. Os gráficos são referentes as leituras de cada amostra no espectrofotômetro. Os valores de absorvância foram colocados na tabela contendo todos os pacientes. Os valores correspondentes à hemólise foram destacados em vermelho na tabela e, em amarelo, os valores das amostras consideradas não influenciadas por hemólise.

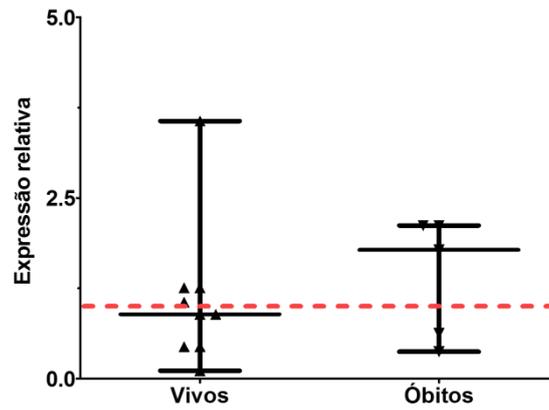


**Figura 6.27. Hemólise nas amostras de plasma dos doadores.** A absorvância das amostras nos comprimentos de onda de 414, 541, 576 e 375nm foi avaliada por espectrofotometria utilizando NanoDrop na configuração UV-Vis. Os gráficos são referentes as leituras de cada amostra no espectrofotômetro. Os valores de absorvância foram colocados na tabela contendo todos os pacientes.

Após análise de todos os critérios de elegibilidade, 15 amostras de plasma foram elegíveis e processadas para detecção da expressão do miR-210. Das amostras estudadas, apenas na amostra P21 (grau II) não foi possível detectar a expressão do miR-210. Dentre as 14 amostras finais, uma amostra pertencia ao grau I, duas amostras de grau II, quatro amostras ao grau III e sete amostras ao grau IV. Foram selecionadas 4 amostras de doadores saudáveis como controles da expressão do miR-210. Apesar do pequeno número amostral foi possível observar que as amostras de grau IV apresentavam maiores níveis de expressão do miR-210 em relação as amostras provenientes de pacientes com menores graus de malignidade da doença. As amostras de grau II com os níveis menores de expressão do miR-210, inclusive em relação aos doadores (Figura 6.28A). Quando as amostras dos astrocitomas malignos (graus II, III e IV) foram agrupadas, estas apresentaram níveis 2,4 vezes mais elevados de expressão do miR-210 em relação aos doadores (Figura 6.28B e C). A figura 6.28C mostra a expressão de cada amostra individualmente em relação aos níveis de expressão do doador. Além disso, foi possível observar que os pacientes que evoluíram para o óbito apresentavam uma maior expressão do miR-210 em comparação ao grupo de pacientes vivos (Figura 6.29).



**Figura 6.28. Expressão do miR-210 nas amostras de plasma provenientes de pacientes com astrocitoma.** A expressão do miR-210 foi detectada por QT-PCR nas amostras de plasma provenientes de pacientes com diferentes graus de astrocitoma. (A) Expressão do miR-210 entre os diferentes graus de malignidade dos astrocitomas. (B, C) Expressão do miR-210 nas amostras provenientes dos graus II, III e IV em relação aos doadores (indivíduos saudáveis). (D) Expressão do miR-210 em cada amostra individualmente em relação aos níveis de expressão do doador. A linha pontilhada vermelha representa a normalização em relação aos doadores. A expressão do miR-210 foi normalizada pela expressão de miR-16 e cel miR-39.



**Figura 6.29. Expressão do miR-210 nas amostras de plasma separadas entre pacientes vivos e os óbitos.** A expressão do miR-210 foi detectada por QT-PCR e a expressão do miR-210 comparada entre pacientes vivos e os óbitos. A linha pontilhada representa a normalização em relação aos doadores. A expressão do miR-210 foi normalizada pela expressão de miR-16 e cel-miR-39.

## VII) DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novos protocolos de tratamento capazes de sobrepujar a resistência à quimioterapia e a radioterapia em pacientes com GB, visando aumentar a qualidade de vida e sobrevida global desses pacientes é foco de diversos estudos pré-clínicos e clínicos. A introdução da TMZ promoveu aumento da sobrevida global dos pacientes em 2,5 meses, atingindo 14,5 meses de sobrevida global (STUPP et al., 2005). No entanto, a resistência a TMZ é um problema clínico e sua superioridade em relação às nitrosuréis tem sido questionada (WELLER et al, 2003; LINZ 2008;. WOLFF et al, 2008;. VINJAMURI et al, 2009). Um estudo desenvolvido por Lwin e colaboradores (2013) mostrou que apenas 44% dos pacientes conseguiram completar o tratamento (radioterapia e TMZ) devido à progressão da doença, septicemia, e mielossupressão profunda. Apenas 9% dos pacientes sobreviveram mais de dois anos. Esses dados demonstram que a minoria dos pacientes consegue completar o tratamento devido à toxicidade e que apesar do aumento da sobrevida, praticamente todos os pacientes evoluem para o óbito. Esse estudo demonstra a necessidade de desenvolvimento de fármacos, com baixa toxicidade, que potencializem o efeito da radioterapia.

Na busca por novos compostos para o tratamento, o presente estudo testou quatro novas substâncias sintéticas com potencial atividade antitumoral em uma linhagem celular de GB e o composto LQB-118 teve o efeito superior na inibição da viabilidade celular. O LQB-118 inibiu a viabilidade celular e induziu elevados índices de morte celular por apoptose em três linhagens celulares de GB humano, com perfis moleculares distintos. Além disso, LQB-118 apresentou efeito superior a TMZ, assinalando para o grande potencial antitumoral desse composto. A inibição de proliferação e a indução de morte celular foram mediadas pela inibição da expressão de Akt e ERK1/2. As vias de PI3K / Akt e MAPK estão constantemente ativadas no GB e envolvidas na resistência à TMZ e a radioterapia (JIANG et al, 2007; BLEAU et al, 2009; HAN et al, 2014.). Estudos demonstraram que a inibição dessas vias de sinalização sensibiliza linhagens celulares e células-tronco de GB ao tratamento com radiação ionizante e ao TMZ (JIANG et al, 2007; SATO et al, 2011; CHEN et al, 2012). Além disso, as três linhagens estudadas apresentam ativação dessas vias devido a mutações em PTEN e/ou ativação de EGFR, demonstrando a importância dessa inibição para o tratamento do GB e apontando a regulação das vias de sobrevivência celular como parte importante do mecanismo de ação do LQB-118. Assim como observado nesse estudo com modelo de GB, já foi mostrado que o composto LQB-118 induz apoptose em linhagens celulares de leucemia com o fenótipo MDR (MAIA *et al.*, 2011; DE SOUZA REIS *et al.*, 2013) e em células de câncer de próstata resistentes a terapia com androgênio (MARTINO *et al.*, 2014), demonstrando o seu potencial para sobrepujar mecanismos de resistência em diferentes tipos tumorais. O LQB-

118 induziu parada do ciclo celular em G2/M e inibiu ciclina D1 em modelo celular de câncer de próstata. Entretanto, no modelo de GB, apenas a linhagem T98G apresentou aumento das células em G2/M com a concentração de 9 $\mu$ M de LQB-118. Estudos do nosso grupo com linhagens celulares de LMA e LMC não apresentaram alteração do perfil de ciclo celular mediante tratamento com LQB-118 (DE SÁ BACELAR *et al.*, 2013; NESTAL *et al.*, 2014), sugerindo que esse efeito é tipo celular dependente.

Devido à importância dessas vias de sinalização no GB, onde aproximadamente 60% dos casos possuem umas das vias alteradas (Parsons *et al.*, 2008; TCGA 2008), a regulação dessas vias pelos miRNAs, miR-7 e miR-143 foi avaliada. Entretanto, não houve alteração nos níveis de expressão dessas moléculas, demonstrando que não estão envolvidos nessa regulação. Visto que não apenas a fosforilação, mas também os níveis proteicos de Akt e ERK foram reduzidos, algumas hipóteses foram levantadas para explicar essa regulação. Primeiramente, pode estar havendo uma regulação da expressão gênica, levando a redução da transcrição dessas proteínas. LQB-118 pode estar induzindo a expressão de miRNAs que regulam diretamente o mRNA codificante dessas proteínas, como os membros da família do miR-29 (WEI *et al.*, 2013; GONG *et al.*, 2014). Outra hipótese envolve vias de degradação celular, visto que essas proteínas são muito reguladas pós-traducionalmente, LQB-118 pode estar induzindo ubiquitinação, sumoilação ou lavando a degradação dessas proteínas indiretamente, culminando com a redução da expressão proteica. Por fim, FOXM1 é um fator de transcrição que ativa a via de ERK, esta por sua vez, induz a expressão de FOXM1, formado uma alça de regulação positiva (WANG *et al.*, 2010). No estudo desenvolvido pelo nosso grupo com linhagem de LMA, o LQB-118 reduziu a expressão de FOXM1, surgindo a hipótese de que FOXM1 regula as vias de sobrevivência celular em resposta ao LQB-118 (NESTAL *et al.*, 2014).

Além da inibição de ERK e Akt, o LQB-118 aumentou a expressão de miR-210. Conforme apresentado na introdução, o miR-210 é o principal miRNA regulado por hipoxia, portanto, encontra-se superexpresso na maioria dos tumores sólidos (GREITHER *et al.*, 2010; DEVLIN *et al.*, 2011; OZATA *et al.*, 2011; PUISSÉGUR *et al.*, 2011; LAGES *et al.*, 2011). Entretanto, não se sabe se a superexpressão é causa ou consequência da progressão tumoral. Como alguns fatores sugerem a importância do miR-210 no mecanismo de ação do LQB-118, sua participação no mecanismo de ação do composto foi avaliada de forma mais aprofundada. Primeiramente, o miR-210 tem como alvo diversas enzimas mitocondriais a inibição dessas proteínas pelo miR-210 pode levar a produção de ROS (CHAN *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2010; FAVARO *et al.*, 2010). O composto LQB-118 induz produção de ROS por reações do

grupamento paraquinona na mitocôndria e a enzima mitocondrial NAD(P)H quinoneoxidoreductase 1 (NQO1) contribui para a sua atividade (NETTO et al., 2010; DE SÁ BACELAR et al., 2013). O ensaio utilizado para avaliação da viabilidade celular baseia-se na atividade de uma enzima mitocondrial, e demonstrou que o LQB-118 reduz intensamente a viabilidade celular. Além disso, Piusségur e colegas (2011) demonstraram que, apesar da superexpressão de miR-210 em estágios tardios de câncer de pulmão, ele promoveu ativação de caspases 3/7 e redução da viabilidade celular usando um ensaio semelhante ao MTT em resposta a um composto natural. Esses dados apontam para a participação do miR-210 na sensibilidade do GB ao composto LQB-118. Entretanto, ao modularmos a expressão do miR-210 na linhagem U251-MG não observamos mudança na sensibilidade da linhagem. Nem a superexpressão, nem a inibição do miR-210 alteraram de maneira significativa a morte celular avaliada pelo ensaio de anexinaV/PI, sugerindo que o aumento observado na expressão desse miRNA não é determinante para a atividade do composto. A modulação por si da expressão do miR-210, independente do tratamento, não alterou a viabilidade celular, nem promoveu morte celular, indicando a necessidade de combinar a modulação da expressão de miRNA com outros tratamentos citotóxicos.

Além de induzir morte celular isoladamente, o LQB-118 quando associado à radiação ionizante proporcionou uma maior redução da viabilidade celular, mas não da morte celular por apoptose na linhagem U251-MG. Menores concentrações do composto apresentam ação sinérgica com a radiação ionizante, principalmente quando adicionados concomitantemente. A TMZ também apresentou efeito sinérgico quando adicionada concomitantemente com a radiação, e aditivo quando adicionada primeiro. Não houve redução da viabilidade quando a radiação foi realizada primeiro tanto em associação com o composto LQB-118 quanto com a TMZ, demonstrando que a ordem de administração do tratamento é importante. Esses dados estão de acordo com o protocolo de tratamento atual, onde a radioterapia e a quimioterapia com TMZ são realizadas no mesmo período seguidas por uma quimioterapia de consolidação (STUPP et al., 2005; OMURO E DEANGELIS 2013). Entretanto, esse fenômeno não foi observado para as linhagens T98G e A172. Apesar da linhagem A172 apresentar maior resistência à radiação ionizante ao avaliarmos fragmentação do DNA e marcação por anexina V, esta linhagem é mais sensível quando a viabilidade celular é avaliada por exclusão por azul de tripan. Ao avaliarmos a viabilidade celular para o ensaio de combinação, a dose de 4Gy não reduziu a viabilidade celular na linhagem U251-MG, mas o fez nas linhagens A172 e T98G. Esses dados sugerem que apesar da dose de 4Gy não induzir morte celular, esta dose reduz a proliferação celular de maneira efetiva na linhagem A172, considerada mais sensível do que as outras, inicialmente. Estudo desenvolvido por Mirzayans e cols. (2005) demonstrou

que linhagens com *TP53* selvagem, incluindo a A172, quando expostas à radiação gama, apresentam inibição de proliferação celular e indução acelerada de senescência. Diante disso, a radiação ionizante pode estar induzindo senescência e não apoptose na linhagem A172. Como a dose de 4Gy já induziu inibição da viabilidade celular nas linhagens A172 e T98G, talvez seja importante testar doses menores, sem efeito sobre a proliferação celular, para observar um efeito aditivo ou sinérgico. Apesar de não observarmos apoptose em nenhuma das linhagens estudadas, outros tipos de morte celular como autofagia e catástrofe mitótica podem estar sendo induzidos pelo tratamento combinado. A combinação pode estar induzindo senescência, a qual induz parada irreversível do ciclo celular, também considerada um mecanismo supressor tumoral. Lee e cols (2011) demonstraram que radiação ionizante induziu senescência em linhagens celulares de GB com mutação em PTEN e, induziu apoptose em linhagens com PTEN selvagem. Os autores sugeriram um papel compensatório entre senescência e apoptose, tornando a indução de senescência um mecanismo alternativo para células resistentes a apoptose. Além disso, inibição da proliferação possui um papel central na redução da massa tumoral quando terapias combinadas são empregadas para o tratamento do câncer. Em conjunto os nossos dados demonstram o potencial do composto LQB-118 como uma alternativa promissora para o tratamento dos gliomas, visto que além do seu potencial antitumoral em linhagens com fenótipo de resistência a drogas, esse composto não induziu toxicidade para células saudáveis da medula óssea de camundongos (NESTAL *et al.*, 2014).

A radioterapia aumenta a sobrevida em torno de três meses (WOLFF *et al.*, 2008). Os relatos da literatura são bastante controversos quanto ao melhor regime quimioterápico a ser adotado e muitos pacientes não se beneficiam do tratamento (SATHORNSUMETEE *et al.*, 2007). Diante da ausência de opções terapêuticas eficazes para os pacientes com gliomas de alto grau, o principal tratamento pós-cirúrgico continua sendo a radioterapia. Compreender os mecanismos de radiorresistência pode auxiliar o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes. Nesse contexto, diversos estudos têm mostrado papel do miR-210 na radiorresistência no câncer (YANG *et al.*, 2013; GROSSO *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2015). Crosby e cols (2009) demonstraram que o miR-210 favorece a instabilidade genômica e regula proteínas da maquinaria de reparo de dano no DNA, como RAD52. Além disso, o miR-210 atua de forma independente de p53 e do ciclo celular, mas levaria a um reparo mais eficiente pela maquinaria de reparo de quebras de dupla fita (GROSSO *et al.*, 2013). Para compreender seu papel no contexto do GB, a expressão desse miRNA foi inibida e aumentada na linhagem U251-MG. Ao modularmos a expressão do miR-210, não houve alteração da morte celular mediada pela radiação ionizante. Entretanto, a inibição do miR-210

na linhagem A172 promoveu uma redução da viabilidade celular, aumentando a sensibilidade da linhagem ao tratamento com 4Gy. Apesar de não induzir morte celular, esse dado corrobora os dados da literatura que demonstram o papel do miR-210 na radiorresistência, além do seu papel dependente do contexto celular.

Diversos estudos têm demonstrado que diferentes tipos tumorais apresentam assinaturas específicas de miRNAs, que podem auxiliar na identificação, classificação e prognóstico dos pacientes. O diagnóstico dos gliomas ainda é baseado apenas nos exames de imagem e na classificação histopatológica, que depende do fragmento tumoral obtido durante o procedimento cirúrgico ou por biópsia, além de ser uma técnica observador-dependente. Com isso, a obtenção de um fragmento que não seja representativo do tumor pode levar a um diagnóstico equivocado. Recentemente, diversos estudos têm mostrado o potencial dos miRNAs como marcadores não-invasivos, sendo detectáveis no sangue periférico de pacientes com diversos tipos de câncer (CHENG et al, 2011; CHO *et al.*, 2011; STARK *et al.*, 2015; CHAKRABORTY *et al.*, 2016). A detecção de miR-210 circulante foi demonstrada como relevante para o diagnóstico e monitoramento de recidiva em câncer de bexiga, renal e de pulmão (LI et al., 2013; IWAMOTO et al., 2014; Yang et al., 2015). Existem apenas dois estudos em gliomas que avaliaram a expressão de miR-210 circulante. Siegal e cols (2016) observaram que a diferença de expressão entre os pacientes e os doadores não foi significativa. Entretanto, Lai e cols (2015) demonstraram que o miR-210 está sete vezes mais expresso em GB do que em doadores, utilizando uma coorte maior de pacientes. Além disso, a expressão elevada de miR-210 se correlacionou positivamente com maior grau de malignidade e pior prognóstico dos pacientes. Vale ressaltar que o primeiro estudo foi realizado com pacientes da Austrália e de Israel, enquanto o segundo estudo foi desenvolvido na China, demonstrando a importância dos estudos em populações e etnias diferentes. No presente estudo, o miR-210 estava 2,4 vezes mais expresso em amostras de GB em relação aos doadores. Além disso, amostras de pacientes que foram ao óbito também apresentaram expressão mais elevada desse miRNA. Apesar de não ser possível a realização de análises estatísticas devido ao pequeno número de pacientes incluídos no estudo, esses dados apontam para um possível envolvimento do miR-210 com a sobrevida, além de ter expressão diferencial entre os graus de malignidade dos astrocitomas, podendo auxiliar a classificação e diagnóstico desse tipo de câncer.

## VIII) CONCLUSÕES

- O composto LQB-118 possui efeito citotóxico em linhagens celulares de GB com diferentes perfis moleculares, apresentando efeito antitumoral superior ao observado pela TMZ.
- O composto LQB-118 inibe a expressão de Akt e ERK, enquanto a TMZ inibe de forma discreta a fosforilação dessas proteínas, demonstrando uma regulação da expressão gênica pelo composto.
- O aumento da expressão do miR-210 observado após o tratamento com LQB-118 não foi determinante para a atividade antitumoral do composto.
- A expressão do miR-210 não está relacionada com a resistência a apoptose induzida por radiação ionizante, mas sua inibição reduz a proliferação celular da linhagem celular A172.
- A expressão diferencial do miR-210 entre os graus de malignidade dos astrocitomas, e nas amostras de pacientes que evoluíram ao óbito, sugere que este miRNA pode auxiliar na classificação, diagnóstico e prognóstico desse tipo de câncer.

### Conclusão geral

Nossos resultados mostram de forma consistente que o composto LQB-118 é um potencial agente antitumoral em GB. O miR-210, apesar de não estar diretamente relacionado a regulação de morte celular, parece ser um fator relevante para as estratégias de diagnóstico, classificação e prognóstico dos astrocitomas.

## IX) PERSPECTIVAS

- Aumentar o número de pacientes para que o trabalho tenha poder estatístico para análise do miR-210 como fator prognóstico e marcador de diagnóstico.
- Analisar amostras tumorais incluídas em parafina, a fim de avaliar se os níveis de expressão do miR-210 detectados na amostra tumoral se correlacionam com o detectado no sangue periférico.
- Combinar o tratamento de LQB-118 com a TMZ, visando o estudo de uma possível abordagem utilizando quimioterapia combinada.

## X) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL R. et al. **Hypoxic signature of microRNAs in glioblastoma: insights from small RNA deep sequencing.** BMC Genomics. 2014.17;15:686.

AKAO, Y. et al. **Role of anti-oncomirs miR-143 and -145 in human colorectal tumors.** Cancer Gene Ther. 2010.17(6):398-408.

AKSAMITIENE E, KIYATKIN A, KHOLODENKO B. N. **Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance.** Biochem Soc Trans. 2012. 40(1):139-46.

BABAE N., et al. **Systemic miRNA-7 delivery inhibits tumor angiogenesis and growth in murine xenograft glioblastoma.** Oncotarget. 2014. 5(16):6687-700.

BARBANO R, *et al.* **A miRNA signature for defining aggressive phenotype and prognosis in gliomas.** PLoS One. 2014. 9(10):e108950.

BOBOLA MS, *et al.* **Minimally cytotoxic doses of temozolomide produce radiosensitization in human glioblastoma cells regardless of MGMT expression.** Mol Cancer Ther. 2010. 9(5):1208-18.

BRADA M, *et al.* **Temozolomide versus procarbazine, lomustine, and vincristine in recurrent high-grade glioma.** J Clin Oncol. 2010. 28(30):4601-8.

BUARQUE CD, SALUSTIANO EJ, FRAGA KC, ALVES BR, COSTA PR. **11a-N-Tosyl-5-deoxy-pterocarpan (LQB-223), a promising prototype for targeting MDR leukemia cell lines.** Eur J Med Chem. 2014. 78:190-7.

BUARQUE CD., DOMINGOS JLO., NETTO CD., COSTA PRR. **Palladium-Catalyzed Oxyarylation, Azaarylation and  $\alpha$ -Arylation Reactions in the Synthesis of Bioactive Isoflavonoid Analogues.** Current Organic Synthesis, 2015, 12, 772-794

BUARQUE, C. D., et al. **Pterocarpanquinones, aza-pterocarpanquinone and derivatives: synthesis, antineoplastic activity on human malignant cell lines and antileishmanial activity on *Leishmaniaamazonensis*.** BioorgMedChem, 19(22): 6885-91, 2011.

CALDAS C, BRENTON J. D. **Sizing up miRNAs as cancer genes.** Nat Med. 2005. 11(7):712-4.

CALIN G. A. *et al.* **Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2002. 26;99(24):15524-9.

CAMPS C. *et al.* **hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer.** Clin Cancer Res. 2008. 14(5):1340-8.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, BRAT DJ, VERHAAK RG, ALDAPE KD, *et al.* **Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas.** N Engl J Med. 2015. 372(26):2481-98.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. **Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways.** Nature. 2008. 455(7216):1061-8.

CROSBY ME, KULSHRESHTHA R, IVAN M, GLAZER PM. **MicroRNA regulation of DNA repair gene expression in hypoxic stress.** Cancer Res. 2009. 69(3):1221-9.

CECCARELLI M, *et al.* **Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma.** Cell. 2016. 164(3):550-63.

CHAKRABORTY C, DAS S. **Profiling cell-free and circulating miRNA: a clinical diagnostic tool for different cancers.** Tumour Biol. 2016 Jan 29.

CHAKRAVARTI A. *et al.* **The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas.** J Clin Oncol. 2004. 22:1926 – 1933.

CHAN S.Y *et al.* **MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2.** Cell Metab. 2009. 10(4):273-84.

CHAUTARD E. *et al.* **Akt signaling pathway: a target for radiosensitizing human malignant glioma.** Neuro Oncol. 2010. 12(5):434-43.

CHEN W.Y. *et al.* **Induction, modulation and potential targets of miR-210 in pancreatic cancer cells.** Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2012. 11(3):319-24.

CHEN X, GUO J, XI RX, *et al.* **MiR-210 expression reverses radioresistance of stem-like cells of oesophageal squamous cell carcinoma.** World J Clin Oncol. 2014. 5(5):1068-77.

CHEN Z, LI Y, ZHANG H, HUANG P, LUTHRA R. **Hypoxia-regulated microRNA-210 modulates mitochondrial function and decreases ISCU and COX10 expression.** Oncogene. 2010. 29(30):4362-8.

CHEN, H.C. *et al.* **MicroRNA deregulation and pathway alterations in nasopharyngeal carcinoma.** Br.J.Cancer. 2009. 100:1002–1011.

CHENG AM. *et al.* **Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis.** Nucleic Acids Res. 2005. 33(4):1290-7.

CHENG H, *et al.* **Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis.** PLoS One. 2011. 6(3):e17745.

CHINOT OL, WICK W, MASON W, *et al.* **Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma.** N Engl J Med. 2014. 370(8):709-22.

CHIO C. C. LIN JW, CHENG HA, *et al.* **MicroRNA-210 targets antiapoptotic Bcl-2 expression and mediates hypoxia-induced apoptosis of neuroblastoma cells.** Arch Toxicol. 2013. 87(3):459-68.

**CHO WCS. Circulating microRNAs as minimally invasive biomarkers for cancer theragnosis and prognosis.** Front Genet. 201. 2:7.

**CHOU YT. *et al.* EGFR promotes lung tumorigenesis by activating miR-7 through a Ras/ERK/Myc pathway that targets the Ets2 transcriptional repressor ERF.** Cancer Res. 2010. 70(21):8822-31.

**CONG Z. *et al.* ERK and PI3K signaling cascades induce Nrf2 activation and regulate cell viability partly through Nrf2 in human glioblastoma cells** ONCOLOGY REPORTS 2013. 30: 715-722.

**CORTOPASSI WA, *et al.* Theoretical and Experimental Studies of New Modified Isoflavonoids as Potential Inhibitors of Topoisomerase I from Plasmodium falciparum.** PLoS One. 2014. 9(3):e91191.

**COSTA L, *et al.* Pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in Leishmania (Viannia) braziliensis and controls lesions in infected hamsters.** PLoS One. 2014. 9(10):e109672.

**COSTA, P. R. R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novassubstâncias bioativas: Candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária.** Rev. Virtual Quim., 2009,.1 (1), 58-66.

**DA SILVA A.J., *et al.* Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of new (+/-) 1,4-naphthoquinones structurally related to lapachol.** Bioorg Med Chem. 2002. 10(8):2731-8.

**DALMAY T. MicroRNAs and cancer.** J Intern Med. 2008. 263(4):366-75.

**DE FARIA FC, LEAL ME, BERNARDO PS, COSTA PR, MAIA RC. NFκB pathway and microRNA-9 and -21 are involved in sensitivity to the pterocarpanquinone LQB-118 in different CML cell lines.** Anticancer Agents Med Chem. 2015;15(3):345-52.

DE LUCA A *et al.* **The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches.** *Expert Opin Ther Targets.* 2012. 16 Suppl 2:S17-27.

DE SÁ BACELAR T, DA SILVA AJ, COSTA PR, RUMJANEK VM. **The pterocarpanquinone LQB 118 induces apoptosis in tumor cells through the intrinsic pathway and the endoplasmic reticulum stress pathway.** *Anticancer Drugs.* 2013. 24(1):73-83.

DE SOUZA PS, FACCION RS, BERNARDO PS, MAIA RC. **Membrane microparticles: shedding new light into cancer cell communication.** *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015. Aug 19.

DE SOUZA REIS F. R., *et al.* **The therapeutical potential of a novel pterocarpanquinone LQB-118 to target inhibitor of apoptosis proteins in acute myeloid leukemia cells.** *Anticancer Agents Med Chem.* 2013. 13(2):341-51.

DESJARDINS A, REARDON DA, VREDENBURGH JJ. **Current available therapies and future directions in the treatment of malignant gliomas.** *Biologics.* 2009. 3:15-25.

DEVLIN C, GRECO S, MARTELLI F, IVAN M. **miR-210: More than a silent player in hypoxia.** *IUBMB Life.* 2011. 63(2):94-100.

DRAAISMA K, *et al.* **PI3 kinase mutations and mutational load as poor prognostic markers in diffuse glioma patients.** *Acta Neuropathol Commun.* 2015. 3(1):88.

DRAKAKI A, ILIOPOULOS D. **MicroRNA Gene Networks in Oncogenesis.** *Curr Genomics.* 2009. 10(1):35-41.

DRESEMANN G. **Temozolomide in malignant glioma.** *OncoTargets Ther.* 2010. 3:139-46.

ECKEL-PASSOW JE, *et al.* **Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors.** *N Engl J Med.* 2015. 372(26):2499-508.

EILERTSEN M, *et al.* **Positive prognostic impact of miR-210 in non-small cell lung cancer.** Lung Cancer. 2014. 83(2):272-8.

ESTELLER M, *et al.* **Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents.** N Engl J Med. 2000. 343(19):1350-4.

ESTELLER M, HERMAN JG. **Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer.** Oncogene. 2004. 23(1):1-8.

EVERHARD S, *et al.* **MGMT methylation: a marker of response to temozolomide in low-grade gliomas.** Ann Neurol. 2006. 60(6):740-3.

EYLER C. E. *et al.* **Brain cancer stem cells display preferential sensitivity to Akt inhibition.** Stem Cells. 2008. 26:3027 – 3036.

FAN Q. W, WEISS W. A. **Targeting the RTK-PI3K-mTOR axis in malignant glioma: overcoming resistance.** Curr Top Microbiol Immunol. 2010. 347:279-96.

FARAZI T. A *et al.* **miRNAs in human cancer.** J Pathol. 2011. 223(2):102-15.

FAROOQI AA, *et al.* **Is miR-34a a Well Equipped swordsman to Conquer Temple of Molecular Oncology?** Chem Biol Drug Des. 2016. 87(3):321-34.

FASANARO P. *et al.* **MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3.** J Biol Chem. 2008. 283(23):15878-83.

FAVARO E. *et al.* **MicroRNA-210 regulates mitochondrial free radical response to hypoxia and krebs cycle in cancer cells by targeting iron sulfur cluster protein ISCU.** PLoS One. 2010. 26;5(4):e10345.

FEDORKO M, *et al.* **Combination of MiR-378 and MiR-210 Serum Levels Enables Sensitive Detection of Renal Cell Carcinoma.** Int J Mol Sci. 2015. 16(10):23382-9.

FEI BY, WANG XY, FANG XD. **MicroRNA-143 replenishment re-sensitizes colorectal cancer cells harboring mutant, but not wild-type, KRAS to paclitaxel treatment.** *Tumour Biol.* 2015 Nov 18.

FISCHEL J.L, FORMENTO P, MILANO G. **Epidermal growth factor receptor double targeting by a tyrosine kinase inhibitor (Iressa) and a monoclonal antibody (Cetuximab). Impact on cell growth and molecular factors.** *Br J Cancer.* 2005. 28;92(6):1063-8.

FLORES O, KENNEDY EM, SKALSKY RL, CULLEN BR. **Differential RISC association of endogenous human microRNAs predicts their inhibitory potential.** *Nucleic Acids Res.* 2014. 42(7):4629-39

FOEKENS J. A. *et al.* **Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008. 105(35):13021-6.

FORTUNATO O, *et al.* **Assessment of circulating microRNAs in plasma of lung cancer patients.** *Molecules.* 2014. 19(3):3038-54.

FRIEDMAN HS, KERBY T, CALVERT H. **Temozolomide and treatment of malignant glioma.** *Clin Cancer Res.* 2000. 6(7):2585-97.

FURNARI FB. *et al.* **Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment.** *Genes Dev.* 2007. 1;21(21):2683-710.

GAUR A. *et al.* **Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines.** *Cancer Res.* 2007. 67(6):2456-68.

GEE H. E. *et al.* **hsa-mir-210 is a marker of tumor hypoxia and a prognostic factor in head and neck cancer.** *Cancer.* 2010. 116(9):2148-58.

GERSTNER ER, *et al.* **MGMT methylation is a prognostic biomarker in elderly patients with newly diagnosed glioblastoma.** *Neurology.* 2009. 73(18):1509-10.

GIANNAKAKIS A. *et al.* **miR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer.** *Cancer Biol Ther.* 2008. 7(2):255-64.

GILAD S, *et al.* **Serum microRNAs are promising novel biomarkers.** *PLoS One* 2008. 3(9):e3148

GILBERT MR, *et al.* **Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial.** *J Clin Oncol.* 2013 Nov 10;31(32):4085-91.

GLASS J, *et al.* **Fractionated stereotactic radiotherapy with cis-platinum radiosensitization in the treatment of recurrent, progressive, or persistent malignant astrocytoma.** *Am J Clin Oncol.* 1997. 20(3):226-9.

GONG JN, YU J, LIN HS *et al.* **The role, mechanism and potentially therapeutic application of microRNA-29 family in acute myeloid leukemia.** *Cell Death Differ.* 2014 Jan;21(1):100-12.

GREGORY RI, SHIEKHATTAR R. **MicroRNA biogenesis and cancer.** *Cancer Res.* 2005. 65(9):3509-12.

GREITHER T. *et al.* **Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival.** *Int J Cancer.* 2010. 126(1):73-80.

GROSSO S, DOYEN J, PARKS SK, *et al.* **MiR-210 promotes a hypoxic phenotype and increases radioresistance in human lung cancer cell lines.** *Cell Death Dis.* 2013. 4:e544.

GUO Y, *et al.* **Characterization of the mammalian miRNA turnover landscape.** *Nucleic Acids Res.* 2015. 43(4):2326-41.

HABERLER C, WÖHRER A. **Clinical Neuropathology practice news 2-2014: ATRX, a new candidate biomarker in gliomas.** *Clin Neuropathol.* 2014. 33(2):108-11.

HAMAMA S, *et al.* **MiR-210: A potential therapeutic target against radiation-induced enteropathy.** *Radiother Oncol.* 2014. 111(2):219-21.

HE J. *et al.* **miR-210 disturbs mitotic progression through regulating a group of mitosis-related genes.** *Nucleic Acids Res.* 2013. 41(1):498-508.

HE W, *et al.* **Chemotherapeutic effect of tamoxifen on temozolomide-resistant gliomas.** *Anticancer Drugs.* 2015. 26(3):293-300.

HEGI M. E. *et al.* **MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma.** *N Engl J Med.* 2005. 352 (10): 997-1003.

HERMANSEN S. K, KRISTENSEN B. W. **MicroRNA biomarkers in glioblastoma.** *J Neurooncol.* 2013. 114(1):13-23.

HONG CF, *et al.* **MicroRNA-7 Compromises p53 Protein-dependent Apoptosis by Controlling the Expression of the Chromatin Remodeling Factor SMARCD1.** *J Biol Chem.* 2016. 291(4):1877-89.

HUANG X, ZUO J. **Emerging roles of miR-210 and other non-coding RNAs in the hypoxic response.** *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2014. 46(3):220-32.

HUANG X. *et al.* **Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation.** *Mol Cell.* 2009. 35(6):856-67.

HUANG Z. **Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer.** *Int J Cancer.* 2010. 127(1):118-26.

HUYNH FC, JONES FE. **MicroRNA-7 inhibits multiple oncogenic pathways to suppress HER2 $\Delta$ 16 mediated breast tumorigenesis and reverse trastuzumab resistance.** *PLoS One.* 2014. 9(12):e114419.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.** INCA, 2015. 122p. ISBN 978-85-7318-283-5.

IORIO M. V., CROCE C.M. **MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review.** EMBO Mol Med. 2012. 4(3):143-59.

IWAMOTO H, *et al.* **Serum miR-210 as a potential biomarker of early clear cell renal cell carcinoma.** Int J Oncol. 2014 Jan;44(1):53-8.

IWASAKI S, *et al.* **Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes.** Mol Cell. 2010. 39(2):292-9.

JACOBS LA, *et al.* **Meta-analysis using a novel database, miRStress, reveals miRNAs that are frequently associated with the radiation and hypoxia stress-responses.** PLoS One. 2013. 8(11):e80844.

JANSEN M, YIP S, LOUIS DN. **Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers.** Lancet Neurol. 2010. 9(7):717-26.

JANSSON M.D, LUND A.H. **MicroRNA and cancer.** Mol Oncol. 2012. 6(6):590-610.

JIANG Z, *et al.* **Phosphatase and tensin homologue deficiency in glioblastoma confers resistance to radiation and temozolomide that is reversed by the protease inhibitor nelfinavir.** Cancer Res. 2007. 67(9):4467-73.

JUNG EJ, *et al.* **Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients.** Cancer. 2012. 118(10):2603-14.

KATAKOWSKI M, *et al.* **Functional microRNA is transferred between glioma cells.** Cancer Res. 2010. 70(21):8259-63.

KEFAS B. *et al.* **microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma.** Cancer Res. 2008. 68(10):3566-72.

KELLY TJ. *et al.* **A hypoxia-induced positive feedback loop promotes hypoxia-inducible factor 1alpha stability through miR-210 suppression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like.** Mol Cell Biol. 2011. 31(13):2696-706.

KENT OA, MCCALL MN, CORNISH TC, HALUSHKA MK. **Lessons from miR-143/145: the importance of cell-type localization of miRNAs.** Nucleic Acids Res. 2014. 42(12):7528-38.

KENT, OA. *et al.* **A resource for analysis of microRNA expression and function in pancreatic ductal adenocarcinoma cells.** Cancer Biol. Ther. 2009. 8:2013–2024

KILLELA PJ, *et al.* **TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2013. 110(15):6021-6.

KIM TM, *et al.* **A developmental taxonomy of glioblastoma defined and maintained by MicroRNAs.** Cancer Res. 2011. 71(9):3387-99.

KIM YH., *et al.* **Molecular classification of low-grade diffuse gliomas.** Am J Pathol 2010. 177:2708 – 14

KIRSCHNER MB, *et al.* **The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers.** Front Genet. 2013. 4:94.

KIRSCHNER MB, *et al.* **Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma.** PLoS One. 2011;6(9):e24145.

KOO S, *et al.* **Serial selection for invasiveness increases expression of miR-143/miR-145 in glioblastoma cell lines.** BMC Cancer. 2012. 12:143.

KOSAKA N. **Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells.** J Biol Chem. 2010. 285(23):17442-52.

KOSHKIN PA, CHISTIYAKOV DA, CHEKHONIN VP. **Role of microRNAs in mechanisms of glioblastoma resistance to radio- and chemotherapy.** Biochemistry (Mosc). 2013. 78(4):325-34.

KROL J, LOEDIGE I, FILIPOWICZ W. **The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay.** Nat Rev Genet. 2010. 11(9):597-610.

KULSHRESHTHA R. *et al.* **A microRNA signature of hypoxia.** Mol Cell Biol. 2007.

KUMAR MS., *et al.* **Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis.** Nat Genet. 2007. 39(5):673-7.

LAGES E., *et al.* **MicroRNA and target protein patterns reveal physiopathological features of glioma subtypes.** PLoS One. 2011. 6(5):e20600.

LAI N, *et al.* **Differential expression of microRNA-210 in gliomas of variable cell origin and correlation between increased expression levels and disease progression in astrocytic tumours.** Folia Neuropathol. 2014;52(1):79-85. (a)

LAI NS, *et al.* **MicroRNA-210 overexpression predicts poorer prognosis in glioma patients.** J Clin Neurosci. 2014. 21(5):755-60. (b)

LAI NS, *et al.* **Serum microRNA-210 as a potential noninvasive biomarker for the diagnosis and prognosis of glioma.** Br J Cancer. 2015. 112(7):1241-6.

LEE D, *et al.* **MicroRNA-210 and Endoplasmic Reticulum Chaperones in the Regulation of Chemoresistance in Glioblastoma.** J Cancer. 2015. 6(3):227-32.

LEE HK. *et al.* **MicroRNA-145 is downregulated in glial tumors and regulates glioma cell migration by targeting connective tissue growth factor.** PLoS One. 2013. 8(2):e54652.

LEE J, *et al.* **Combined inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling with temozolomide enhances cytotoxicity against human glioblastoma cells via downregulation of Neuropilin-1.** J Neurooncol. 2016 Mar 7.

LEE J.J, *et al.* **PTEN status switches cell fate between premature senescence and apoptosis in glioma exposed to ionizing radiation.** Cell Death Differ. 18(4) (2011) 666-77.

LEE K. M, CHOI E. J, KIM I. A. **microRNA-7 increases radiosensitivity of human cancer cells with activated EGFR-associated signaling.** Radiother Oncol. 2011.101(1):171-6.

- LEE R. C, FEINBAUM R. L, AMBROS V. **The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.** Cell. 1993. 75(5):843-54.
- LI HF, KIM JS, WALDMAN T. **Radiation-induced Akt activation modulates radioresistance in human glioblastoma cells.** Radiat Oncol. 2009. 4:43.
- LI R, *et al.* **Identification of intrinsic subtype-specific prognostic microRNAs in primary glioblastoma.** J Exp Clin Cancer Res. 2014. 33:9.
- LI Y., *et al.* **Comprehensive analysis of the functional microRNA-mRNA regulatory network identifies miRNA signatures associated with glioma malignant progression.** Nucleic Acids Res. 2013. 41(22):e203. (a)
- LI Y, *et al.* **Genome-wide analysis of human microRNA stability.** Biomed Res Int. 2013:368975. 2013 (c).
- Li ZH, *et al.* **Prognostic significance of serum microRNA-210 levels in nonsmall-cell lung cancer.** J Int Med Res. 2013 Oct;41(5):1437-44. (b)
- LIN N, *et al.* **Prevalence and clinicopathologic characteristics of the molecular subtypes in malignant glioma: a multi-institutional analysis of 941 cases.** PLoS One. 2014. 9(4):e94871.
- LINZ, U. **Chemotherapy for glioblastoma: is costly better?** Cancer. 2008.113(10):2617-22.
- LIU H, *et al.* **miR-7 modulates chemoresistance of small cell lung cancer by repressing MRP1/ABCC1.** Int J Exp Pathol. 2015. 96(4):240-7.
- LIU, X. **Poly(amido amine) is an ideal carrier of miR-7 for enhancing gene silencing effects on the EGFR pathway in U251 glioma cells.** Oncol Rep. 2013. 29(4):1387-94.
- LIU, XY., *et al.* **Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations.** Acta Neuropathol 2012. 124:615 – 25.

LWIN Z. **Glioblastoma management in the temozolomide era: have we improved outcome?** J Neurooncol. 2013. 115(2):303-10.

LO H. W. **Targeting Ras-RAF-ERK and its interactive pathways as a novel therapy for malignant gliomas.** 2010. 10(8): 840–848.

LOTTERMAN CD, KENT OA, MENDELL JT. **Functional integration of microRNAs into oncogenic and tumor suppressor pathways.** Cell Cycle. 2008. 7(16):2493-9.

LOUIS DN. *et al.* **World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System.** 4<sup>a</sup> edição (vol 1) IARC/WHO Geneva. 2007.

LOUIS DN, *et al.* **International Society of Neuropathology-Haarlem Consensus Guidelines for Nervous System Tumor Classification and Grading.** Brain Pathol. 2014. 24(5):429-35.

LOW SY, *et al.* **MicroRNA as potential modulators in chemoresistant high-grade gliomas.** J Clin Neurosci. 2014. 21(3):395-400.

LOWRY, OH, *et al.* **Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.** Journal of Biological Chemistry. 1951. v. 193, p. 265-275.

LU ZJ, *et al.* **The effect of miR-7 on behavior and global protein expression in glioma cell lines.** Electrophoresis. 2011. 32(24):3612-20.

LUI WO, *et al.* **Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer.** Cancer Res. 2007. 67, 6031–6043.

MA R, *et al.* **Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application.** J Exp Clin Cancer Res. 2012. 31(1):38.

MAGEE P, SHI L, GAROFALO M. **Role of microRNAs in chemoresistance.** Ann Transl Med. 2015. 3(21):332.

MAIA, RC. *et al.* **LQB-118, a pterocarpanquinone structurally related to lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone]: a novel class of agent with high apoptotic effect in chronic myeloid leukemia cells.** Invest New Drugs. 2011. v. 29, n. 6, p. 1143-55.

MALZKORN B. *et al.* **Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas.** Brain Pathol. 2010. 20(3):539-50.

MARTINEZ R, SCHACKERT G, YAYA-TUR R. **Frequent hypermethylation of the DNA repair gene MGMT in long-term survivors of glioblastoma multiforme.** J Neurooncol. 2007. 83(1):91-3.

MARTINO T. *et al.* **The pterocarpanquinone LQB-118 inhibits tumor cell proliferation by downregulation of c-Myc and cyclins D1 and B1 mRNA and upregulation of p21 cell cycle inhibitor expression.** Bioorg Med Chem. 2014. 22(12):3115-22.

MELO SA, ESTELLER M. **Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire.** FEBS Lett. 2011. 585(13):2087-99.

MENDOZA M. C, ER E. E, BLENIS J. **The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation.** Trends Biochem Sci. 2011. 36(6):320-8.

MEZA-SOSA K. F, *et al.* **MiR-7 Promotes Epithelial Cell Transformation by Targeting the Tumor Suppressor KLF4.** PLoS One. 2014. 9(9):e103987.

MIN Y. H. *et al.* **Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia.** Leukemia. 2003. 17: 995–997.

MIRZAYANS R, SCOTT A, CAMERON M, MURRAY D. **Induction of accelerated senescence by gamma radiation in human solid tumor-derived cell lines expressing wild-type TP53.** Radiat Res. 2005. 163(1):53-62.

MITCHELL PS *et al.*, **Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection.** Proc Natl Acad Sci USA. 2008.105(30):10513-8.

MIZOGUCHI M, *et al.* **Clinical implications of microRNAs in human glioblastoma.** Front Oncol. 2013. 3:19.

MOK Y, *et al.* **MiR-210 is induced by Oct-2, regulates B cells, and inhibits autoantibody production.** J Immunol. 2013 Sep 15;191(6):3037-48.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** J Immunol Methods. 1983. v. 65, n. 1-2, p. 55-63.

MUTHARASAN RK, *et al.* **microRNA-210 is upregulated in hypoxic cardiomyocytes through Akt- and p53-dependent pathways and exerts cytoprotective effects.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011 Oct;301(4):H1519-30.

NAJMAN H, GADELHA, M I P. **Temozolamida.** Revista Brasileira de Cancerologia. 2002. 48(3): 439-445.

NAKADA C., *et al.* **Overexpression of miR-210, a downstream target of HIF1 $\alpha$ , causes centrosome amplification in renal carcinoma cells.** J Pathol. 2011. 224(2):280-8.

NAM, SY. *et al.* **Akt/PKB activation in gastric carcinomas correlates with clinicopathologic variables and prognosis.** APMIS. 2003. 111: 1105–1113.

NAQVI, A. R. *et al.* **The fascinating world of RNA interference.** Int J Biol Sci. 2009. 5(2):97-117.

NESTAL DE MORAES G. *et al.* **The pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells of distinct molecular subtypes and targets FoxO3a and FoxM1 transcription factors.** Int J Oncol. 2014. 45(5):1949-58.

NETTO CD., *et al.* **(+/-)-3,4-Dihydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan and derivatives: cytotoxic effect on human leukemia cell lines.** Eur J Med Chem 2009; 44:920 – 5.

NETTO, C.D. *et al.* **New pterocarpanquinones: synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF-alpha modulation in human PBMC cells.** Bioorg Med Chem. 2010. v. 18, n. 4, p. 1610-6.

NIYAZI, M. *et al.* **Therapeutic options for recurrent malignant glioma.** *Radiother Oncol.* 2011. 98(1):1-14.

NORMANNO N, *et al.* **The MEK/MAPK pathway is involved in the resistance of breast cancer cells to the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib.** *J Cell Physiol.*2006.207:420-7

ODJÉLÉ A, CHAREST D, MORIN P. JR. **miRNAs as important drivers of glioblastomas: a no-brainer?** *Cancer Biomark.* 2012;11(6):245-52.

OHGAKI H, KLEIHUES P. **Epidemiology and etiology of gliomas.** *Acta Neuropathol.* 2005. 109(1):93-108. (a)

OHGAKI H, KLEIHUES P. **Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma.** *Am J Pathol.* 170(5): 1445-53. 2007.

OHGAKI H, KLEIHUES P. **Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas.** *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005. 64(6):479-89. (b)

OHGAKI H, KLEIHUES P. **The definition of primary and secondary glioblastoma.** *Clin Cancer Res.* 2013. 19(4):764-72.

OHGAKI H. *et al.* **Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study.** *Cancer Res.* 2004. 64(19):6892-9.

OKAMURA K, CHUNG W. J, LAI E. C. **The long and short of inverted repeat genes in animals: microRNAs, mirtrons and hairpin RNAs.** *Cell Cycle.* 2008. 7(18):2840-5.

OMURO A, DeANGELIS L. M. **Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review.** *JAMA.* 2013. 310(17):1842-50.

ONO S, *et al.* **A direct plasma assay of circulating microRNA-210 of hypoxia can identify early systemic metastasis recurrence in melanoma patients.** *Oncotarget.* 2015. 6(9):7053-64.

OSTROM QT, *et al.* **CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012.** Neuro Oncol. 2015. 17 Suppl 4:iv1-iv62.

OSUGI, J. *et al.* **Prognostic Impact of Hypoxia-Inducible miRNA-210 in Patients with Lung Adenocarcinoma.** J Oncol. 2015;2015:316745.

ÖZATA, DM. *et al.* **The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma.** Endocr Relat Cancer. 2011. 18(6):643-55.

PARSONS, DW *et al.* **An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme.** Science. 2008. 321:1807– 12.

PAZ MF, *et al.* **CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas.** Clin Cancer Res. 2004. 10(15):4933-8.

PEGG AE. **Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents.** Cancer Res. 1990 Oct 1;50(19):6119-29.

POGRIBNY I. P., *et al.* **Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin.** Int J Cancer. 2010. 127(8):1785-94.

PRENSNER JR, CHINNAIYAN AM. **Metabolism unhinged: IDH mutations in cancer.** Nat Med. 2011. 17(3):291-3.

PRITCHARD CC, *et al.* **Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies.** Cancer Prev Res (Phila). 2012. 5(3):492-7.

PIUSSÉGUR M.P. *et al.* **miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity.** *Cell Death Differ.* 2011. 18(3):465-78.

QIN Q, FURONG W, BAOSHENG L. **Multiple functions of hypoxia-regulated miR-210 in cancer.** *J Exp Clin Cancer Res.* 2014. 33:50.

QUERO L, *et al.* **miR-210 as a marker of chronic hypoxia, but not a therapeutic target in prostate cancer.** *Radiother Oncol.* 2011. 101(1):203-8.

RANDO OJ. **Chromatin structure in the genomics era.** *Trends Genet,* v. 23, n.2, p.67-73, 2006.

RAO SA, SANTOSH V, SOMASUNDARAM K. **Genome-wide expression profiling identifies deregulated miRNAs in malignant astrocytoma.** *Mod Pathol.* 2010. 23(10):1404-17.

REDDY SD, *et al.* **MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions.** *Cancer Res.* 2008. 68(20):8195-200.

RIBEIRO GA, *et al.* **LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*.** *J Antimicrob Chemother.* 2013. 68(4):789-99

RIVERA AL, *et al.* **MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma.** *Neuro Oncol.* 2010. 12(2):116-21.

ROTH P, *et al.* **A specific miRNA signature in the peripheral blood of glioblastoma patients.** *J Neurochem.* 2011. 118(3):449-57.

ROTHÉ F. *et al.* **Global microRNA expression profiling identifies MiR-210 associated with tumor proliferation, invasion and poor clinical outcome in breast cancer.** *PLoS One.* 2011. 6(6):e20980.

ROUSSEAU A, MOKHTARI K, DUYCKAERTS C. **The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system - what has changed?** *Curr Opin Neurol*. 2008. 21(6):720-7.

SALUSTIANO, E. J. *et al.* **Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, alpha-lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells.** *Invest New Drugs*. 2010. v. 28, n. 2, p. 139-44.

SANAI N, BERGER MS. **Glioma extent of resection and its impact on patient outcome.** *Neurosurgery*. 2008. 62(4):753-64; discussion 264-6.

SATHORNSUMETEE S. *et al.* **Molecularly targeted therapy for malignant glioma.** *Cancer*. 2007. 110:13-24.

SATO A, *et al.* **MEK-ERK signaling dictates DNA-repair gene MGMT expression and temozolomide resistance of stem-like glioblastoma cells via the MDM2-p53 axis.** *Stem Cells*. 2011. 29(12):1942-51.

SCHMIDT F, *et al.* **PCV chemotherapy for recurrent glioblastoma.** *Neurology*. 2006. 66(4):587-9.

SCHMITZ KJ. *et al.* **Prognostic relevance of activated Akt kinase in node-negative breast cancer.** *Mod Pathol*. 2004. 17: 15–21.

SERRA V, *et al.* **PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer.** *Oncogene* 2011. 30:2547-57

SHEN J *et al.* **Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer.** *Lab Invest*. 2011. 91(4):579-87.

SHINGU T, *et al.* **Suppression of RAF/MEK or PI3K synergizes cytotoxicity of receptor tyrosine kinase inhibitors in glioma tumor-initiating cells.** *J Transl Med*. 2016. 14(1):46.

SHRADER M. *et al.* **Gefitinib reverses TRAIL resistance in human bladder cancer cell lines via inhibition of AKT-mediated X-linked inhibitor of apoptosis protein expression.** Cancer Res. 2007. 67(4):1430-5.

SIEGAL T, *et al.* **Dynamics of circulating hypoxia-mediated miRNAs and tumor response in patients with high-grade glioma treated with bevacizumab.** J Neurosurg. 2016. 22:1-8.

SKOG J, *et al.* **Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers.** Nat Cell Biol. 2008. 10(12):1470-6.

SRINIVASAN S, PATRIC I.R, SOMASUNDARAM K. **A ten-microRNA expression signature predicts survival in glioblastoma.** PLoS One. 2011. 6(3):e17438

STARK MS, *et al.* **The Prognostic and Predictive Value of Melanoma-related MicroRNAs Using Tissue and Serum: A MicroRNA Expression Analysis.** EBioMedicine. 2015. 2(7):671-80

STUPP R *et al.* **Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial.** Lancet Oncol. 2009. 10(5):459-66.

STUPP R, *et al.* **Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial.** JAMA. 2015. 314(23):2535-43.

STUPP R. *et al.* **Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma.** N Engl J Med. 2005. 352(10):987-96.

SUN Y, *et al.* **Hypoxia-induced autophagy reduces radiosensitivity by the HIF-1 $\alpha$ /miR-210/Bcl-2 pathway in colon cancer cells.** Int J Oncol. 2015. 46(2):750-6.

SUTO T, *et al.* **MicroRNA-7 expression in colorectal cancer is associated with poor prognosis and regulates cetuximab sensitivity via EGFR regulation.** Carcinogenesis. 2015. 36(3):338-45.

SUZUKI Y. *et al.* **Higher pAkt expression predicts a significant worse prognosis in glioblastomas.** J Radiat Res (Tokyo). 2010. 51(3):343-8.

SZCZYRBA, J., *et al.* **The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing.** Mol.Cancer Res. 2010. 8:529–538

TAKAGI,T. *et al.* **Decreased expression of microRNA-143 and -145 in human gastric cancers.** Oncology. 2009. 77, 12–21

TANG X, *et al.* **Overexpression of miR-210 is Associated with Poor Prognosis of Acute Myeloid Leukemia.** Med Sci Monit. 2015. 21:3427-33.

TEZCAN G, *et al.* **microRNA expression pattern modulates temozolomide response in GBM tumors with cancer stem cells.** Cell Mol Neurobiol. 2014. 34(5):679-92.

TIBERIO P, *et al.* **Challenges in using circulating miRNAs as cancer biomarkers.** Biomed Res Int. 2015. 2015:731479.

TOLCHER AW, *et al.* **Marked inactivation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity with protracted temozolomide schedules.** Br J Cancer. 2003. 88(7):1004-11.

TSUCHIYA S. *et al.* **MicroRNA-210 regulates cancer cell proliferation through targeting fibroblast growth factor receptor-like 1 (FGFRL1).** J Biol Chem. 2011. 286(1):420-8.

TURCAN S, *et al.* **IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype.** Nature 2012. 483:479 – 83.

UEDA S, *et al.* **Induction of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by dexamethasone in glioblastomas.** J Neurosurg. 2004. 101(4):659-63.

USHIJIMA T. **Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells.** Nat Rev Cancer, 2005. v.5, p.223-31.

VALADI H., *et al.* **Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.** Nat Cell Biol. 2007. 9(6):654-9.

VAN DER SPEK L, *et al.* **3D conformal radiotherapy and cisplatin for recurrent malignant glioma.** Can J Neurol Sci. 2008. 35(1):57-64.

VAN MEIR EG, *et al.* **Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma.** CA Cancer J Clin. 2010. 60(3):166-93.

VEERLA S. *et al.* **MiRNA expression in urothelial carcinomas: important roles of miR-10a, miR-222, miR-125b, miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis, and frequent homozygous losses of miR-31.** Int J Cancer. 2009. 124(9):2236-42.

VERHAAK RG, *et al.* **Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1.** Cancer Cell. 2010. 17(1):98-110.

VINJAMURI M. *et al.* **Comparative analysis of temozolomide (TMZ) versus 1,3-bis (2-chloroethyl)-1 nitrosourea (BCNU) in newly diagnosed glioblastoma multiforme (GBM) patients.** J Neurooncol. 2009. 91(2):221-5.

VISONE R, CROCE C.M. **miRNAs and cancer.** Am J Pathol. 2009.174(4):1131-8.

WANG B, *et al.* **MicroRNA-7 directly targets insulin-like growth factor 1 receptor to inhibit cellular growth and glucose metabolism in gliomas.** Diagn Pathol. 2014. 14;9:211.

WANG H, BIAN S, YANG CS. **Green tea polyphenol EGCG suppresses lung cancer cell growth through upregulating miR-210 expression caused by stabilizing HIF-1 $\alpha$ .** Carcinogenesis. 2011. 32 (12):1881–1889

WANG L. **MiR-143 acts as a tumor suppressor by targeting N-RAS and enhances temozolomide-induced apoptosis in glioma.** Oncotarget. 2014. 30;5(14):5416-27.

WANG W, *et al.* **Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by plasmid-based microRNA-7 inhibits human malignant gliomas growth and metastasis *in vivo*.** Neoplasma. 2013. 60(3):274-83.

WANG, X., *et al.* **Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth.** PLoS One. 2008. 3:e2557.

WANG Z, AHMAD A, LI Y, *et al.* **Forkhead box M1 transcription factor: a novel target for cancer therapy.** Cancer Treat Rev. 2010. 36:151-156.

WATANABE K, *et al.* **Over expression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas.** Brain Pathol. 1996. 6:217 –24.

WEBSTER RJ. *et al.* **Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7.** J Biol Chem. 2009. 284(9):5731-41.

WEI W, HE HB, ZHANG WY, *et al.* **miR-29 targets Akt3 to reduce proliferation and facilitate differentiation of myoblasts in skeletal muscle development.** Cell Death Dis. 2013. 4:e668.

WEIDHAAS JB. *et al.* **MicroRNAs as Potential Agents to Alter Resistance to Cytotoxic Anticancer Therapy.** Cancer Res. 2007. 67(23):11111–6

WELLER M, *et al.* **Molecular neuro-oncology in clinical practice: a new horizon.** Lancet Oncol. 2013. 14(9):e370-9.

WELLER M, *et al.*, **EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma.** European Association for Neuro-Oncology (EANO) Task Force on Malignant Glioma. Lancet Oncol. 2014 Aug;15(9):e395-403.

WELLER M. *et al.* **Neuro-Oncology Working Group 01 trial of nimustine plus teniposide versus nimustine plus cytarabine chemotherapy in addition to involved-field radiotherapy in the first-line treatment of malignant glioma.** J Clin Oncol. 2003. 21(17):3276-84.

WELLER M. **Novel diagnostic and therapeutic approaches to malignant glioma.** Swiss Med Wkly. 2011. 141:w13210.

WEN PY, REARDON DA. **Neuro-oncology in 2015: Progress in glioma diagnosis, classification and treatment.** Nat Rev Neurol. 2016. 12(2):69-70.

WESTPHAL M, *et al.* **A randomised, open label phase III trial with nimotuzumab, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in the treatment of newly diagnosed adult glioblastoma.** Eur J Cancer. 2015. 51(4):522-32.

WIESTLER B, *et al.* **ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis.** Acta Neuropathol. 2013. 126:443–451

WINTER J, *et al.* **Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation.** Nat Cell Biol. 2009. 11(3):228-34.

WOLFF J.E. *et al.* **Nitrosourea efficacy in high-grade glioma: a survival gain analysis summarizing 504 cohorts with 24193 patients.** J Neurooncol. 2008. 88(1):57-63.

WONG M. L., KAYE A. H, HOVENS C. M. **Targeting malignant glioma survival signalling to improve clinical outcomes.** J Clin Neurosci. 2007. 14(4):301-8.

WU, D. G. *et al.* **MicroRNA-7 regulates glioblastoma cell invasion via targeting focal adhesion kinase expression.** Chin Med J (Engl). 2011. 124(17):2616-21.

WUCHTY S, *et al.* **Prediction of Associations between microRNAs and Gene Expression in Glioma Biology.** PLoS One. 2011. 6(2):e14681.

XIONG S. *et al.* **MicroRNA-7 inhibits the growth of human non-small cell lung cancer A549 cells through targeting BCL-2.** Int J Biol Sci. 2011. 7(6):805-14.

YAMAMOTO S. *et al.* **Prognostic significance of activated Akt expression in pancreatic ductal adenocarcinoma.** Clin Cancer Res. 2004. 10: 2846–2850.

YAN W, LI R, LIU Y, *et al.* **MicroRNA expression patterns in the malignant progression of gliomas and a 5-microRNA signature for prognosis.** Oncotarget. 2014. 5(24):12908-15.

YANG JS, *et al.* **Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA\* species.** RNA. 2011. 17(2):312-26.

YANG W, WEI J, SUN T, LIU F. **Effects of knockdown of miR-210 in combination with ionizing radiation on human hepatoma xenograft in nude mice.** Radiat Oncol. 2013. 8:102.

YANG W. *et al.* **Downregulation of miR-210 expression inhibits proliferation, induces apoptosis and enhances radiosensitivity in hypoxic human hepatoma cells *in vitro*.** Exp Cell Res. 2012. 318(8):944-54.

YANG W, *et al.* **Knockdown of miR-210 decreases hypoxic glioma stem cells stemness and radioresistance.** Exp Cell Res. 2014. 326(1):22-35.

YANG Y, QU A, LIU J. **Serum miR-210 Contributes to Tumor Detection, Stage Prediction and Dynamic Surveillance in Patients with Bladder Cancer.** PLoS One. 2015. 10(8):e0135168.

YU J, *et al.* **Methylation profiles of thirty four promoter-CpG islands and concordant methylation behaviours of sixteen genes that may contribute to carcinogenesis of astrocytoma.** BMC Cancer. 2004. 14:4-65.

YUAN Y, *et al.* **TERT mutation in glioma: Frequency, prognosis and risk.** J Clin Neurosci. 2016. 26:57-62.

ZHANG B, PAN X, COBB G. P, ANDERSON T. A. **microRNAs as oncogenes and tumor suppressors.** Dev Biol. 2007. 302(1):1-12.

ZHANG Z. *et al.* **MicroRNA miR-210 modulates cellular response to hypoxia through the MYC antagonist MNT.** Cell Cycle. 2009. 8(17):2756-68.

ZHAO S, *et al.* **miR-143 inhibits glycolysis and depletes stemness of glioblastoma stem-like cells.** Cancer Lett. 2013. 333(2):253-60.

ZHOU X, *et al.* **MicroRNA-7 inhibits tumor metastasis and reverses epithelial-mesenchymal transition through AKT/ERK1/2 inactivation by targeting EGFR in epithelial ovarian cancer.** PLoS One. 2014. 9(5):e96718.

ZHOU X. *et al.* **Role of the AKT pathway in microRNA expression of human U251 glioblastoma cells.** Int J Oncol. 2010. 36(3):665-72.

ZHUANG M, *et al.* **Involvement of miR-143 in cisplatin resistance of gastric cancer cells via targeting IGF1R and BCL2.** Tumour Biol. 2015. 36(4):2737-45.

## XI) ANEXOS

### 11.1) Carta de aprovação do projeto de pesquisa pelo CEP do INCA



Rio de Janeiro, 15 de janeiro de 2014.

A(o): Dra. Raquel Ciuvalschi Maia  
Pesquisador(a) Principal

**Registro CEP nº 115/13** (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)

**CAAE:** 20951513.7.0000.5274

**Título do Estudo:** Expressão dos microRNAs em gliomas: papel na classificação, na atividade da doença e na resposta in vitro a radioterapia e a novos compostos sintéticos com atividade antitumoral

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer **aprovou** o estudo intitulado: **Expressão dos microRNAs em gliomas: papel na classificação, na atividade da doença e na resposta in vitro a radioterapia e a novos compostos sintéticos com atividade antitumoral**, em 22 de Outubro de 2013.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Dr. Carlos Henrique D. Silva', is written over a faint circular stamp.

Dr. Carlos Henrique D. Silva  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP-INCA

## 11.2) TCLE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### **Projeto: Expressão dos microRNAs em gliomas: papel na classificação, na atividade da doença e na resposta *in vitro* a radioterapia e a novos compostos sintéticos com atividade antitumoral**

Nome do voluntário:.....

Você está sendo convidado (a) a participar de um estudo sobre moléculas responsáveis pela resposta ao tratamento em tumores cerebrais (gliomas).

#### **OBJETIVO DO ESTUDO**

Esse estudo visa analisar a presença de moléculas denominadas microRNAs em tumores cerebrais (GLIOMAS). Os microRNAs estão presentes de forma abundante em todas as células humanas e estão envolvidos com o funcionamento normal das células humanas. Entretanto, a sua desregulação tem sido associada com as doenças neoplásicas (câncer).

Os resultados do estudo laboratorial junto com as informações clínicas poderão contribuir para esclarecer se os microRNAs presentes no tumor e no sangue periférico estão relacionados com a falha ao tratamento (quimioterapia e radioterapia) dos pacientes.

Se você concordar em participar deste estudo será utilizada uma pequena parte do material do tumor que foi retirado na cirurgia (emblocado em parafina) armazenado na Divisão de Anatomia Patológica do INCA. Além disso, será necessário coletar uma pequena parte do seu sangue periférico (aproximadamente 5 ml) antes e após a cirurgia. O seu prontuário será revisto por um médico visando à obtenção de informações clínicas.

#### **RISCOS**

Não haverá nenhum tipo de risco caso você queira participar do estudo.

O seu tratamento será exatamente o mesmo caso você participe ou não deste estudo.

#### **BENEFÍCIOS**

Caso você participe do estudo, não haverá qualquer benefício direto. O único benefício da sua participação, neste estudo, é possibilitar que maiores conhecimentos dos mecanismos envolvidos com a resistência ao tratamento dos tumores cerebrais possam auxiliar, no futuro, a escolha de um tratamento melhor.

## **CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS**

Seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA e a equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação científica, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

## **CUSTOS**

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento pela sua participação no estudo.

## **BASES DA PARTICIPAÇÃO**

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação no estudo a equipe assistente deve ser comunicada e o estudo será imediatamente interrompido.

## **GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS**

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazerem perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a Dra. Raquel Maia no telefone 3207-1808. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo clínico também pode contar com um terceiro contato imparcial, o Comitê de Ética em Pesquisa do INCA (Rua do Resende, 128 - sala 203 - Centro - Rio de Janeiro – RJ - CEP 20231-092 - [cep@inca.gov.br](mailto:cep@inca.gov.br) - 21 3207-4550 e 21 3207-4556).

## DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que poderei ser submetido a exames de imagem, ou biópsias adicionais necessárias ao meu tratamento, mas estas não estarão relacionadas com o presente estudo.

Entendo que não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

(Assinatura do Paciente)

dia mês ano

\_\_\_\_\_

(Nome do Paciente – letra de forma )

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

(Assinatura de Testemunha, se necessário)

dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento)

dia mês ano

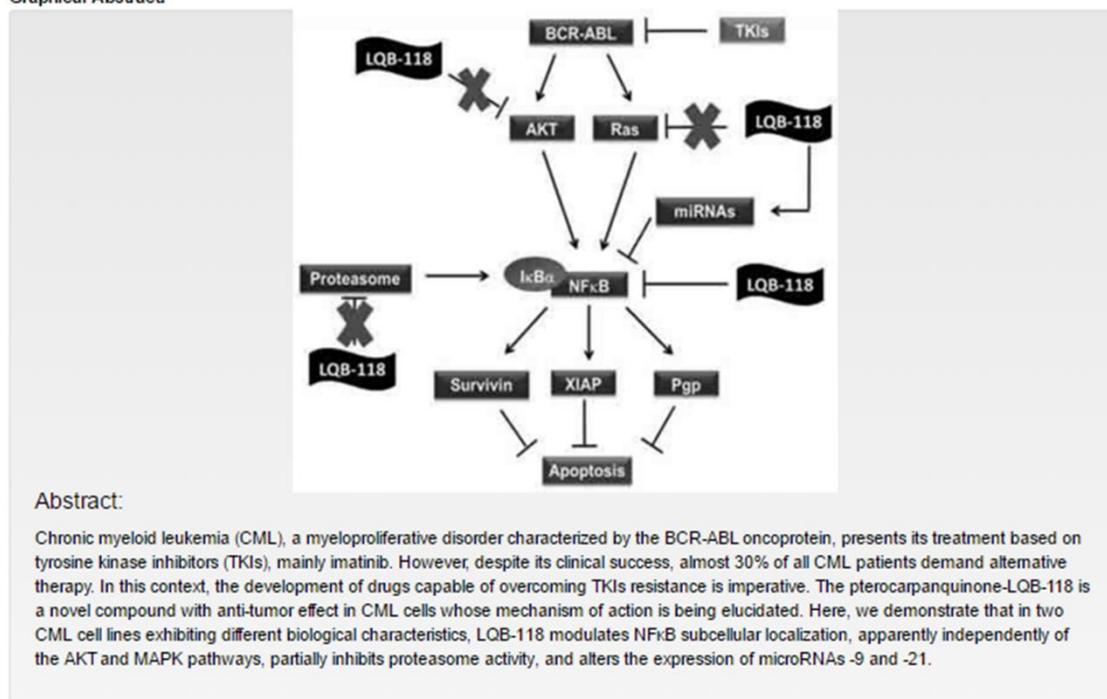
### 11.3) Artigos publicados

#### NFκB Pathway and microRNA-9 and -21 are Involved in Sensitivity to the Pterocarpanquinone LQB-118 in Different CML Cell Lines

Author(s): Femanda Costas C. de Faria, Maria Eduarda Bento Leal, Paula Sabbo Bemardo, Paulo R.R. Costa and Raquel C. Maia

Affiliation: Laboratorio de Hemato- Oncologia Celular e Molecular, Programa de Hemato-Oncologia Molecular, Praca da Cruz Vermelha, 23, 6º andar. Instituto Nacional de Cancer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil, CEP: 20230-130.

#### Graphical Abstract



#### Abstract:

Chronic myeloid leukemia (CML), a myeloproliferative disorder characterized by the BCR-ABL oncoprotein, presents its treatment based on tyrosine kinase inhibitors (TKIs), mainly imatinib. However, despite its clinical success, almost 30% of all CML patients demand alternative therapy. In this context, the development of drugs capable of overcoming TKIs resistance is imperative. The pterocarpanquinone-LQB-118 is a novel compound with anti-tumor effect in CML cells whose mechanism of action is being elucidated. Here, we demonstrate that in two CML cell lines exhibiting different biological characteristics, LQB-118 modulates NFκB subcellular localization, apparently independently of the AKT and MAPK pathways, partially inhibits proteasome activity, and alters the expression of microRNAs -9 and -21.

Keywords: Cancer, chronic myeloid leukemia, microRNA, multidrug resistance phenotype, NFκB, pterocarpanquinone-LQB-118.

Anticancer Agents Med Chem. 2015;15(3):345-52.

## Membrane microparticles: shedding new light into cancer cell communication

Paloma Silva de Souza<sup>1</sup> · Roberta Soares Faccion<sup>1</sup> · Paula Sabbo Bernardo<sup>2</sup> · Raquel Ciuvalschi Maia<sup>1</sup>

Received: 12 June 2015 / Accepted: 5 August 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

### Abstract

**Background** Microparticles (MPs) or ectosomes are small enclosed fragments (from 0.2 to 2 µm in diameter) released from the cellular plasma membrane. Several oncogenic molecules have been identified inside MPs, including soluble proteins XIAP, survivin, metalloproteinases, CX3CL1, PYK2 and other microRNA-related proteins; membrane proteins EGFR, HER-2, integrins and efflux pumps; and messenger RNAs and microRNAs miR-21, miR-27a, let-7, miR-451, among others. Studies have shown that MPs transfer their cargo to neoplastic or non-malignant cells and thus contribute to activation of oncogenic pathways, resulting in cell survival, drug resistance and cancer dissemination.

**Discussion and Conclusion** This review summarizes recent findings on MP biogenesis and the role of the MPs cargo in cancer and discusses some of the RNAs and proteins involved. In addition, the discussion covers evidence of (1) how and which signaling pathways can be activated by MPs in recipient cells; (2) recipient cell-type selectivity in incorporation of proteins and RNAs transported by MPs; and (3) how upon stimulation, stromal cells release MPs, promoting resistance to chemotherapeutics and invasiveness in cancer cells.

**Keywords** Microparticles · Multidrug resistance · Cancer · Intercellular communication · MicroRNAs · Akt and ERK signaling pathways

### Introduction

A comprehensive classification of the different types of shed vesicles is a main concern in the intercellular communication research field. However, the complexity of this task begins with confusing nomenclature, which includes oncosomes, microvesicles (MVs), microparticles (MPs), endosomes, exosomes and ectosomes. Usually, microvesicle is considered to be the collective term for both MPs and exosomes. MPs may be called ectosomes or, as recently proposed, oncosomes, in the case of cancer-derived MPs. The diameter of MPs may range between 0.2 and 2 µm (Piccin et al. 2007; Simak et al. 2004), and exosomes are usually approximately 50–100 nm in diameter. The methodologies available to distinguish MPs from exosomes by size may result in overlapping pools of the different microvesicles. Biochemically, MPs are derived from the plasma membrane and thus usually display membrane biomarkers such as PS or lipid raft proteins, whereas exosomes are derived from intracellular endosomes and present distinct biomarkers. In this review, we focus on studies that specifically isolate MPs to describe their role in cancer communication and their content.

Paloma Silva de Souza, Roberta Soares Faccion and Paula Sabbo Bernardo have contributed equally to this work.

✉ Raquel Ciuvalschi Maia  
rcmaia@inca.gov.br

<sup>1</sup> Laborat rio de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Programa de Hemato-Oncologia Molecular, Brazilian National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Oncologia, INCA, Rio de Janeiro, Brazil

Published online: 19 August 2015

 Springer

### 11.4) Artigos submetidos à publicação

LEMONS, LGT, NESTAL, GM, DELBUE, D, VASCONCELOS, FC, BERNARDO, PS, LAM EW-F, BUARQUE, CD, COSTA, PR., MAIA RC. **11a-N-Tosyl-5-deoxy-pterocarpan, LQB-223, a novel compound with potent antineoplastic activity towards drug-resistant breast cancer cells.** Artigo submetido para publicação na revista Tumor Biology.

## 11.5) Artigos em preparo para submissão

### **Pterocarpanquinone LQB-118 induces cell death and has a cell line dependent synergic effect with ionizing radiation in glioblastoma**

**Paula S. Bernardo<sup>1,2</sup>, Gustavo Henrique C. Guimarães<sup>1,2</sup>, Fernanda Costas C. de Faria<sup>1,2</sup>, Giselle P. de Faria Lopes<sup>3</sup>, Chaquip Daher Netto<sup>4</sup>, Paulo R. R. Costa<sup>5</sup>, Raquel C. Maia<sup>1</sup>**

1-Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Programa de Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro (RJ), Brazil.

2-Programa de Pós-Graduação em Oncologia, INCA, RJ, Brazil.

3- Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

4- Laboratório de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, RJ, Brazil

5-Laboratório de Química Bio-orgânica, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais (IPPN), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), RJ, Brazil.

**Correspondence to:** Raquel C. Maia MD, PhD. Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Programa de Hemato-Oncologia Molecular, Praça da Cruz Vermelha, 23, 6º andar. Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil.

CEP: 20230-130. Telephone number: + 55 21 3207 1198.

E-mail: [rcmaia@inca.gov.br](mailto:rcmaia@inca.gov.br)

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by grants from Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ).

## **Abstract**

Glioblastoma (GB) is the most common astrocytoma and a lethal human malignancy, with a median survival of 12 months. The development of new therapies is imperative for this disease. Therefore, the aim of our study was to evaluate the antitumoral activity of the new synthetic compound, pterocarpanquinone LQB-118, in GB cell lines, and the relationship between microRNAs and survival pathways underlying the mechanism of action. LQB-118, reduced cell viability with an effect superior than the first line chemotherapy, TMZ, evaluated by MTT. The compound also inhibited cell proliferation by clonogenic assay, induced cell death assessed by trypan blue exclusion and promoted apoptosis demonstrated by reduction of pro-caspase-7 levels and annexin V labeling. While LQB-118 reduced ERK1/2 and AKT expression and phosphorylation, and increased the expression of miR-210, TMZ only slightly reduced ERK1/2 phosphorylation and did not significantly induce cell death. As microRNAs are regulators of gene expression and miR-210 has a controversial role in literature, understanding its role in LQB-118 mechanism of action is relevant. Nevertheless, inhibition or overexpression of miR-210 did not induce changes in the susceptibility of U251-MG cells to LQB-118. Furthermore, the association of LQB-118 with ionizing radiation reduced cellular viability synergistically in U251-MG cells. Finally, LQB-118 negatively regulated cell survival pathways, as well as showed an enhanced effect when associated with ionizing radiation. Our results suggest that the compound LQB-118, alone or in combination with radiation, is a promising agent for GBM treatment.

**Keywords:** Glioblastoma, pterocarpanquinone LQB-118, new antitumoral compounds, temozolomide, microRNAs, ionizing radiation.