

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANE PAGNO DE SOUZA BUENO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO DE TEMOZOLOMIDA E
SINVASTATINA EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO CULTIVADOS EM
NEUROESFERAS

CURITIBA

2021

MARIANE PAGNO DE SOUZA BUENO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO DE TEMOZOLOMIDA E
SINVASTATINA EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO CULTIVADOS EM
NEUROESFERAS

Projeto de pesquisa apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso I do curso de Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção de aprovação na disciplina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Sheila Maria Brochado Winnischofer

Coorientadora: Lislely Janowski Spisila

CURITIBA

2021

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo meus pais. Por sempre fazerem o possível e o impossível para que eu pudesse seguir meus sonhos. O amor, a paciência e principalmente o apoio de vocês durante toda minha vida me trouxeram aqui hoje. Poderia escrever um TCC inteiro só agradecendo e mostrando de quantas formas vocês me ajudaram. Aos meus irmãos, Aline e Júnior, por me escutarem em momentos de surto, por me abraçarem mesmo estando longe, por me fazerem rir em momentos que o estresse era grande, mas principalmente por acreditarem tanto em mim. Sou extremamente grata por dividir essa vida com vocês! E pra fechar com os agradecimentos à família, não posso deixar de agradecer à minha pequena Ana, que mesmo tão nova já tem os abraços mais carinhosos e com toda sua energia e felicidade são capazes de renovar qualquer um (e também por ser a mais orgulhosa pela “didi” cientista).

Queria agradecer também à minha orientadora Sheila Winnischofer, por todos esses anos de orientação, por todas as horas discutindo ideias para serem estudadas, por todo conhecimento compartilhado e oportunidades que tudo isso gerou.

À minha coorientadora Lisley, que me ensinou muito sobre cultivo, ensaios, biomedicina, mas também como é ser uma grande mulher pesquisadora. Você é meu grande exemplo e foi simplesmente incrível todos esses anos sendo sua IC.

Ao Viktor, que entrou como meu colega de IC mas hoje já está perto do seu título de mestre. Obrigada por toda a paciência e cuidado me ensinando cada etapa dos experimentos que realizamos!

À todo laboratório de oxidações, por todas as conversas, conselhos, ensinamentos e materiais.

Aos meus amigos Lorena, Jhonatan, Alana, Amanda, Bruna, Camila, Julia e Giulia. Cada um sempre ocupou um espacinho meu e em momentos diferentes foram os responsáveis por me ajudar, inspirar e tornar minha vida muito melhor. Obrigada por cada risada, desabafo ou simplesmente por compreenderem minha ausência em diversos momentos. Não vejo a hora de ver cada um e comemorar junto.

E por último, à Júlia, que acompanhou de perto (mesmo quando estava longe) todo meu TCC. Obrigada por todo apoio, cuidado, paciência, carinho e amor nesses últimos anos.

RESUMO

Neoplasias que atingem o Sistema Nervoso Central estão entre as de maior índice de mortalidade, e destes, destacam-se os gliomas, neoplasias que se originam em células da glia. Dentre os gliomas, sobressaem-se os glioblastomas (GB), astrocitomas com um alto grau de malignidade. Avanços importantes têm sido feitos no conhecimento da biologia tumoral e terapias para GB, porém o quimioterápico padrão para tratamento do glioblastoma, a temozolomida, ainda apresenta alta resistência, evidenciando a busca por terapias adjuvantes como uma tentativa de potencializar a resposta ao tratamento. Nesse aspecto de resistência destaca-se a complexidade do microambiente tumoral, e cada vez mais técnicas *in vitro*, como a metodologia de *hanging drops*, têm sido amplamente utilizadas para a formação de neuroesferas celulares, de forma a manter as interações célula-célula em linhagens em cultura. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento de células de glioblastoma humano com temozolomida e sinvastatina, de forma isolada ou em combinação, quando cultivadas em monocamada e em neuroesferas. As células de glioblastoma humano A172 e T98G foram tratadas com 100 μ M de TMZ, 1 μ M de SVA, de forma isolada ou combinada, além das condições controle por 72h. Avaliação da porcentagem de células metabolicamente ativas após os diferentes tratamentos foi realizada em monocamada, através do ensaio de MTT. Análises da capacidade de formação de neuroesferas foram realizadas para a linhagem A172 e os efeitos dos tratamentos com SVA e TMZ foram avaliados através de ensaios fenotípicos. Para a análise estatística foi realizado ANOVA de uma via e Kruskal-Wallis, e valores de p menores que 0,05 considerados estatisticamente significativos. Em modelo de monocamada, verificou-se que a linhagem A172 é responsiva tanto ao tratamento com TMZ quanto com SVA. Já a linhagem T98G manteve seu padrão de não responsividade ao tratamento com TMZ, porém com uma redução na quantidade de células metabolicamente ativas através do tratamento com sinvastatina, e uma redução ainda mais significativa com o tratamento combinado de TMZ com SVA. Em modelo 3D, os ensaios com as neuroesferas mostraram que o tratamento com SVA impossibilitou a formação de esferas para a linhagem A172, e o tratamento combinado provocou este mesmo efeito para a linhagem T98G. O tratamento combinado de SVA e TMZ também foi efetivo para diminuir o tamanho de neuroesferas já estabelecidos de ambas as linhagens. Desta forma concluímos que o tratamento combinado foi eficaz para sensibilizar as células das duas linhagens, enquanto os fármacos de

forma isolada apresentaram diferentes resultados para as duas linhagens e para as duas formas de cultivo.

Palavras-chave: glioblastoma; neuroesferas; temozolomida; sinvastatina.

ABSTRACT

Neoplasms that occur in the Central Nervous System are among those with the highest mortality rate, and of these, gliomas stand out, which are neoplasms that originate in glial cells. Among the gliomas, glioblastomas (GB) attract attention, for they are astrocytomas with a high degree of malignancy. Important advances have been made in the field of tumor biology and therapies for GB, but the standard chemotherapy for the treatment of glioblastoma, a temozolomide, is still highly resistant, evidencing a search for adjuvant therapies as an attempt to enhance the response to treatment. On the matter of the resistance, the complexity of the tumor microenvironment is highlighted, and more and more in vitro techniques, such as the hanging drops methodology, have been widely used for the formation of cell spheroids, in order to maintain cell-cell interactions in lineages in culture. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of treating human glioblastoma cells with temozolomide and simvastatin, alone or in combination, when cultivated in monolayer and in spheroids. A172 and T98G human glioblastoma cells were treated with 100 μ M of TMZ, 1 μ M of SVA, alone or in combination, in addition to the control conditions (cells treated with vehicles, DMSO and ethanol) for 72h. Evaluation of the percentage of metabolically active cells after the different treatments was performed in monolayer, using the MTT assay. Analyzes of the spheroid formation capacity were carried out for the A172 strain and the effects of treatments with SVA and TMZ were obtained through phenotypic assays. For statistical analysis, the one-way ANOVA and Kruskal-Wallis tests were performed, and p values less than 0.05 were considered statistically significant. In the monolayer model, the A172 strain was found to be responsive to both TMZ and SVA treatment. The T98G strain maintained its pattern of non-responsiveness to treatment with TMZ, but with a reduction in the number of metabolically active cells through treatment with simvastatin, and an even more significant reduction with the combined treatment of TMZ with SVA. In a 3D model, the tests with neurospheres showed that the treatment with SVA prevented the formation of spheres for the A172 strain, and the combined treatment caused this same effect for the T98G strain. The combined treatment of SVA and TMZ was also effective in decreasing the size of established spheroids of both strains. Thus, we conclude that the combined treatment was effective in sensitizing cells from both strains, while the drugs alone showed different results for both strains and both forms of culture.

Key-words: glioblastoma; neurospheres; temozolomide; simvastatin;

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.2	CÂNCER.....	11
2.3	SISTEMA NERVOSO CENTRAL	12
2.4	GLIOMAS.....	12
2.5	GLIOBLASTOMA	13
2.6	TRATAMENTO	14
2.6.1	Terapia adjuvante	15
2.7	RECK.....	16
2.8	MICROAMBIENTE TUMORAL E O CULTIVO 3D.....	17
2.8.1	Células-tronco tumorais	17
2.8.2	<i>Hanging drops</i>	18
3	JUSTIFICATIVA	19
4	OBJETIVOS	20
4.2	OBJETIVO GERAL	20
4.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5	METODOLOGIA	21
5.2	CULTIVO CELULAR.....	21
5.2.1	Esterilização e manejo de materiais	21
5.2.2	Soluções e meio de cultura.....	21
5.2.2.1	PBS.....	21
5.2.2.2	Tripsina	21
5.2.2.3	Meio de cultura DMEM alta glucose	22
5.2.3	Condições de cultivo	22
5.3	TRATAMENTO DAS CÉLULAS	22
5.4	FORMAÇÃO DE <i>HANGING DROPS</i> PARA PASSAGEM PARA O POLY-HEMA.....	22
5.5	FORMAÇÃO DE <i>HANGING DROPS</i> COM TRATAMENTO	23
5.6	ATIVIDADE METABÓLICA POR MTT.....	23
5.7	ANÁLISE FENOTÍPICA	23
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6.1	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE NEUROESFERAS POR METODOLOGIA DE <i>HANGING DROPS</i> EM LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA	25

6.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DAS CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO APÓS TRATAMENTO COM TEMOZOLOMIDA E SINVASTATINA.....	26
6.3	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE NEUROESFERAS APÓS TRATAMENTO COM TMZ E SVA	29
6.4	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM TMZ E SVA EM MODELO DE NEUROESFERAS OBTIDOS DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO.....	30
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), câncer é um conjunto de mais de 100 doenças com características comuns de crescimento desordenado das células e potencial de invasão à tecidos e órgãos adjacentes. O INCA ainda estima a incidência de mais de 600 mil novos casos de neoplasia malignas, sendo desses, onze mil referentes a neoplasias do sistema nervoso central (SNC) somente dentro do território brasileiro. Em 2018, tumores primários originados no SNC foram responsáveis por mais de 9.300 mortes no Brasil, estando entre as dez neoplasias com maior índice de mortalidade em ambos os sexos (INCA, 2020).

Gliomas são neoplasias que surgem nas células da glia, um grupo celular residente do SNC, sendo que neoplasias que acometam qualquer célula glial é chamada de glioma. Dentre os gliomas, o glioblastoma (GB) trata-se da forma mais comum, correspondendo a 57,7% do total de gliomas diagnosticados nos Estados Unidos entre 2013 e 2017, tratando-se da neoplasia mais agressiva de astrócitos (LOUIS e colab., 2016; OSTROM e colab., 2020). Sua característica heterogênea e alta agressividade resulta em uma taxa de sobrevida média superior a cinco anos somente em 6.8% do total de pacientes diagnosticados mesmo mediante administração terapêutica (OSTROM e colab., 2019).

O tratamento para o GB é feito através de cirurgia para retirada do máximo da massa tumoral possível de forma segura ao paciente, além de radioterapia e quimioterapia, sendo a temozolomida (TMZ) a droga padrão de escolha. Apesar da combinação das três terapias resultarem em um aumento da sobrevida média, a alta agressividade do tumor e resistência as terapias atuais estão relacionados com uma alta reincidência e altas taxas de mortalidade dos pacientes (STROBEL e colab., 2019). Nesse sentido, a busca de terapias adjuvantes que possibilitem aumentar a eficácia da TMZ e assim auxiliar na terapêutica do glioblastoma são novos alvos de estudo. Trabalhos recentes têm demonstrado que a família das estatinas, fármacos hipocolesterolêmicos amplamente utilizados na clínica, possui importante potencial como terapêutica adjuvante para potencializar o efeito de diferentes quimioterápicos (DASTGHAIB e colab., 2020). Além disso, o uso da sinvastatina tem sido relacionado com uma maior indução de apoptose e a diminuição nos níveis de invasão e do fluxo autofágico em linhagens de glioblastoma humano, sendo um fármaco promissor para ser utilizado em conjunto com o quimioterápico padrão- TMZ, em pretensão do aumento da eficácia no tratamento de GB (SAMIEI e colab., 2020; SHOJAEI e colab., 2020).

Sabe-se que a expressão de altos níveis do gene *RECK* está relacionado com um melhor prognóstico no GB, e o mesmo mostra-se mais expresso em linhagens celulares com características de menor invasividade (CORRÊA e colab., 2010). A isoforma canônica codificada pelo gene *RECK* tem sido considerada uma proteína supressora tumoral. Mais recentemente, em um estudo descrito por Trombetta-Lima e colaboradores (2015), diferentes variantes produzidas por processo de *splicing* alternativo foram identificados. Um desses transcritos variantes, chamado de *RECKvar3* (ou RECK B), possui propriedades pró-oncogênicas, tendo sua expressão aumentada em linhagens de glioblastoma com características de maior agressividade e resistência celular, sendo portanto um marcador de mau prognóstico (RIBEIRO, 2021; TROMBETTA-LIMA e colab., 2015).

A busca pelo entendimento da natureza tumoral através da avaliação de aspectos de microambiente tumoral, como as interações célula-célula, são alvos de diferentes linhas de pesquisa que trabalham com tumores sólidos. Uma vez que o modelo de cultivo celular em monocamada não é capaz de reproduzir de maneira fiel aspectos da biologia tumoral, cada vez mais tem sido estudado o modelo tridimensional de cultivo celular, pois tanto as células malignas como as células saudáveis estão organizadas em redes 3D, com variação nutricional e em sua sinalização e interações célula-célula e célula-matriz, que podem ser um grande fator na busca à alvos terapêuticos (KELM e colab., 2003; WARE e colab., 2016). Além disso, em cultivos tridimensionais, é possível que seja enriquecida a presença de células-tronco tumorais (*cancer stem cells* - CSCs), que cada vez mais vêm sendo relacionadas a resistência celular à terapêutica e recorrência tumoral do glioblastoma (ISHIGURO e colab., 2017). Uma metodologia muito empregada para cultivo celular 3D é a das *hanging drops*. As *hanging drops* baseiam-se em fatores como gravidade e agregação celular para a formação das esferas, que são plaqueadas em gotas de meio de cultura e deixadas suspensas, e tratando-se de uma técnica de baixo custo e passível de replicabilidade em cultivo 3D (MISUN e colab., 2018).

Sabendo disso, o objetivo deste trabalho é avaliar se o tratamento conjunto com temozolomida e sinvastatina é capaz de alterar aspectos relacionados com o fenótipo de agressividade tumoral em duas linhagens de glioblastoma humano cultivadas em monocamada e em neuroesferas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.2 CÂNCER

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) define o câncer como um conjunto de mais de 100 doenças que compartilham da característica de crescimento desordenado das células, invadindo tecidos e órgãos (INCA, 2020). A alta taxa de divisões dessas células as torna muito agressivas e difíceis de serem controladas, o que possibilita sua disseminação para outras regiões do corpo (INCA, 2020).

Hanahan & Weinberg propuseram seis marcadores para o melhor entendimento da biologia do câncer, visto a grande heterogeneidade das neoplasias, sendo eles a evasão à apoptose, indução da angiogênese, escape de sinais inibitórios da proliferação, ativação de mecanismos de metástase e invasão de tecidos, autossuficiência em sinais proliferativos e potencial replicativo ilimitado (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Posteriormente, estes mesmos autores publicaram um novo trabalho, onde indicaram outros dois marcadores para o câncer: reprogramação do metabolismo energético e evasão da destruição pelo sistema imune, além de sinalizarem a instabilidade genômica e a promoção da inflamação como características das neoplasias que são facilitadoras da aquisição do fenótipo tumoral (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

A World Health Organization (WHO) estimou que no ano de 2018 cerca de 9,6 milhões de mortes foram por conta do câncer (WHO, 2020). Para o ano de 2020, foi estimado pela American Cancer Society que sejam diagnosticados 1.806.950 novos casos de câncer e 606.520 mortes decorridas por conta do mesmo no Estados Unidos (ACS, 2020). Segundo a mesma organização, desses números, 23.890 seriam casos de câncer acometendo o sistema nervoso central (SNC) e 18.020 seriam as mortes derivadas de neoplasias originadas dessa localização (ACS, 2020).

No Brasil, o INCA estimou para o ano de 2020 mais de 600 mil novos casos de neoplasias malignas no país em ambos os sexos, e desses, há uma incidência estimada de cerca de 11 mil casos referentes a neoplasias que acometem o SNC estando entre os 10 mais incidentes. Em 2019, tumores com localização primária no SNC foram responsáveis pelo óbito de 9.712 pessoas, sendo 4,18% de todas as mortes por câncer do país, estando entre as 10 neoplasias com maior índice de mortalidade em ambos os sexos (INCA, 2021).

2.3 SISTEMA NERVOSO CENTRAL

É considerado como sistema nervoso central (SNC) todas as estruturas neurais presentes no crânio e coluna vertebral (LENT, 2010). O SNC tem seu tecido composto de neurônios, células que podem ter longos prolongamentos e com capacidade de produzir sinais bioelétricos de forma integrada à sua sinalização bioquímica, e de células da glia (ou neuroglia), que atuam na sustentação e manutenção dos neurônios, sinalização e defesa do sistema nervoso, além de hoje já se saber do seu importante papel na excitabilidade dos neurônios (LENT, 2010; MENESES, 2015).

A neuroglia, chamada assim pois os primeiros histologistas acreditavam que suas funções se resumiam em agregação e sustentação dos neurônios, desta forma o termo “glia” vem do grego e traria o sentido de “cola neural” para as células da glia (LENT, 2010). As células da glia, apesar de terem tamanhos menores, são aproximadamente metade do volume do tecido nervoso, existindo em média 10 células da glia para cada neurônio (MENESES, 2015). São subdivididas em astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e células ependimárias, e suas funções são as mais diversas dentro do sistema nervoso, podendo participar da regulação de íons, nutrientes e mensageiros químicos próximos à neurônios, formar a bainha de mielina, a qual tem papel fundamental na condução de impulsos nervosos, e principalmente, atuar na proteção do sistema nervoso agindo contra agressores e atuando na manutenção desse tecido (LENT, 2010; MENESES, 2015).

2.4 GLIOMAS

Gliomas são neoplasias que acometem as células da glia. Podendo ser dividido de acordo com o tipo celular atingido em astrocitoma (tumor de astrócitos), oligodendroglioma (tumor de oligodendrócitos), ependimoma (tumor de ependimócitos), oligoastrocitoma (tumor de astrócito e oligodendrócito)(OSTROM e colab., 2019). Segundo a Organização Mundial da Saúde (do inglês, WHO) a nova classificação para os tumores do SNC define a nomenclatura para os diferentes tipos de glioma difuso com base em suas características fenotípicas e genotípicas, considerando as classificações histológicas de astrocitomas e oligodendrogliomas

de grau II e III e glioblastoma (IV grau) e as mutações nos genes que cada um apresenta, incorporando assim padrões moleculares para a classificação da doença (LOUIS e colab., 2016).

Mutações no gene IDH são muito comuns em gliomas, e tratam-se de modificações no gene da isocitrato desidrogenase, estando inclusa nessa família a IDH1 que atua no citoplasma e peroxissomos, e IDH2 e IDH3, na mitocôndria, catalisando a descarboxilação oxidativa do isocitrato à α -cetoglutarato através da geração de NADPH ou NADH no ciclo de ácido cítrico. Embora essas mutações sejam mais comuns no gene IDH1, que na grande maioria das vezes envolve uma mutação de troca de sentido de arginina para histidina no aminoácido 132, elas também podem ocorrer no IDH2 através de uma mutação similar, sensibilizando as células à espécies reativas de oxigênio (EROs) e danos oxidativos moleculares pela baixa taxa de produção de NADPH (KARSY e colab., 2017).

Além de mutações no gene IDH, gliomas podem apresentar o silenciamento epigenético através da metilação do gene de reparo de DNA, O⁶-Metilguanina-DNA Metiltransferase (MGMT), característica relacionada com uma maior responsividade à tratamentos quimioterápicos com agentes alquilantes (GUSYATINER e HEGI, 2018). O gene MGMT é localizado no cromossomo 10q26 e através do The Cancer Genome Atlas (TCGA) sua metilação pode ser relacionada a um aumento de mutações pontuais nos genes TP53 e PTEN, importantes genes relacionados com processos tumorigênicos, como supressores tumorais (WICK e colab., 2014).

2.5 GLIOBLASTOMA

De acordo com a classificação da WHO, GB corresponde a um astrocitoma de grau IV, sendo altamente heterogêneo e a forma mais comum e agressiva de gliomas. Possui maior acometimento em homens com a média de idade de 64 anos, e por conta de danos que a doença causa, como lesão do tecido nervoso, epilepsia e edema, torna-se extremamente deteriorante para quem tem seu diagnóstico (THAKKAR e colab., 2014; WIRSCHING e colab., 2016). O tratamento é responsável por aumentar a sobrevida dos pacientes, e ocorre através de cirurgia, radioterapia e quimioterapia, sendo a Temozolomida (TMZ) o quimioterápico padrão utilizado (BATASH e colab., 2017).

Em um aspecto mais molecular, o GB possui como marcadores clássicos à amplificação do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) e rearranjo gênico para EGFRvIII, mutações nos genes PTEN, TERT e TP53, além mutações em IDH1/2 e ATRX (BATASH e colab., 2017; THAKKAR e colab., 2014). Apesar dos primeiros estudos indicarem que GB eram neoplasias derivadas exclusivamente de células gliais, estudos atuais sugerem que não apenas essas células estão presentes na patogênese do glioblastoma, mas também células neurais com propriedades de células-tronco (DAVIS, 2016).

2.6 TRATAMENTO

O tratamento para o GB é feito através de cirurgia para retirada do máximo da massa tumoral possível de forma segura ao paciente, radioterapia e quimioterapia. Por conta do grande potencial infiltrativo das células de glioblastoma, a ressecção cirúrgica muitas vezes é impossibilitada e dessa forma, a administração de quimioterápicos visa aumentar a sobrevida dos pacientes (STROBEL e colab., 2019).

O quimioterápico padrão atual para o tratamento do GB é a temozolomida (TMZ), conhecido como Temodal® e Temodar® e sua administração junto com a radioterapia é responsável por aumentar a sobrevida do paciente em 2,5 meses quando comparado com a radioterapia isoladamente. A baixa taxa de sobrevida dos pacientes é justificada pela complexidade e alta heterogeneidade do glioblastoma, que resulta em uma grande resistência ao tratamento com temozolomida. A resistência à TMZ se mostra muito presente em linhagens de glioblastoma como T98G e, LN-18 e U138, enquanto outras linhagens como A172, U87MG e U251 são listadas pela literatura como mais responsivas ao tratamento quimioterápico. Entre os fatores que parecem afetar essa responsividade estão os níveis de expressão da proteína MGMT e proteínas alquilantes de DNA (LEE, 2016). Além disso, cada vez mais é estudado o papel de células com características de células tronco, as CSCs, por conta de sua alta capacidade de diferenciar em outros tipos celulares (PHI e colab., 2018).

A TMZ é um pró-fármaco sendo ativado ao entrar em contato com o pH do sangue e mostra efeitos citostáticos e citotóxicos às células, além disso ela apresenta uma alta capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), chegando ao tecido tumoral em concentrações terapêuticas (STROBEL e colab., 2019). Trata-se de um agente alquilante que insere os grupamentos metil principalmente nas regiões O⁶ e N⁷ da guanina. Sua ação promove a indução

da parada do ciclo celular em G2/M, podendo levar a apoptose (LEE, 2016). Porém, a resposta ao tratamento com TMZ depende do status de metilação na O⁶-metilguanina-DNA Metiltransferase (MGMT), um gene de reparo que remove as metilações de agentes alquilantes (YU e colab., 2020). Dessa forma, quando MGMT encontra-se metilada, sua expressão é silenciada e a ação da TMZ não é reparada, representando um melhor prognóstico devido a uma maior responsividade ao tratamento (CHUA e colab., 2019).

2.6.1 Terapia adjuvante

Por conta da alta resistência apresentada pelas células tumorais ao tratamento quimioterápico convencional, cada vez mais busca-se terapias adjuvantes para melhorar a terapêutica do glioblastoma. As estatinas, que classicamente atuam através da inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) redutase na cascata do mevalonato, são uma das linhas de investigação nessa busca por novas terapias, uma vez que conseguem afetar vias de sinalização da tumorigênese através da redução da síntese de colesterol e da produção de intermediários isoprenóides prenilados, levando à prenilação e geranilação de proteínas. Estudos mostram que as estatinas apresentam propriedades anticâncer, anti-proliferativas e anti-metastáticas, em diversos tipos de câncer, incluindo glioma (DASTGHAIB e colab., 2020).

A Sinvastatina (SVA), um fármaco da classe das estatinas com capacidade de atravessar a BHE, tem seu papel terapêutico contra o glioblastoma cada vez mais desvendado. Shojaei e colaboradores (2020) demonstraram que o tratamento de linhagens de glioblastoma humano (U87MG e U251) com sinvastatina sozinha ou combinada com temozolomida foi responsável por aumentar a indução de apoptose, além de atuar na inibição do fluxo autofágico, promovendo ação citotóxica (SHOJAEI e colab., 2020). Samiei e colaboradores, por sua vez, mostraram o efeito do tratamento dessas mesmas linhagens com SVA e TMZ, porém em cultivo tridimensional, diminuindo a invasividade das células de glioblastoma (SAMIEI e colab., 2020). Dados preliminares do nosso grupo sugerem que o tratamento de células de glioblastoma humano com SVA são capazes de modular a expressão do gene supressor de tumor *RECK* (GOMES, 2018), tornando-se um alvo muito interessante de ser explorado no contexto de resistência tumoral e responsividade terapêutica.

2.7 RECK

O gene Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (*RECK*) codifica uma glicoproteína ancorada à membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI) com diversos motivos semelhantes à inibidores de serina proteases, que atuam no desenvolvimento, morfogênese, remodelamento, migração celular, angiogênese e outros processos do organismo. A proteína canônica de *RECK* é encontrada nos mais diversos tecidos, e além de desempenhar funções essenciais para as células, cada vez mais entende-se seu papel como supressora tumoral em diferentes tipos de câncer. Desta forma, a presença de níveis mais altos de *RECK* canônico nas células está relacionado com um melhor prognóstico (CHEN e TSENG, 2012).

Corrêa e colaboradores (2010) analisaram o papel de *RECK* canônico na invasão tumoral, uma vez que já tinham constatado em estudos anteriores que seu mRNA tinha maior expressão na linhagem de glioblastoma humano A172, que apresenta características de menor invasão, quando comparado com linhagens com características de maior invasividade, como a T98G. Seus dados comprovaram que *RECK* canônico inibe o processo de invasão quando é expresso por meio de vetores na linhagem T98G, provavelmente através de rearranjo dos filamentos de actina do citoesqueleto, corroborando com os dados da literatura ao indicar que níveis mais baixos de *RECK* canônico estão relacionados com um maior potencial de invasão e migração dessas células (CORRÊA e colab., 2010).

O *splicing* alternativo, processo que leva a produção de diferentes transcritos a partir de um mesmo gene, tem papel descrito em diversos processos fisiológicos e patogênicos, como em diferentes tipos tumorais. Trombetta-Lima e colaboradores (2015) identificaram duas variantes ao *RECK* canônico: o *RECK*-I (30kDa) e o *RECK*-B (40kDa). Esses transcritos alternativos apresentam apenas 9 éxons, enquanto o transcrito canônico apresenta 21 éxons, e isso ocorre por conta de uma modificação no nono éxon das variantes, sendo que os oito primeiros são idênticos nas três formas. Estudos mostram que o *RECK*-B, também conhecido como *RECKvar3*, teria função antagonista à sua versão canônica, atuando como um proto-oncogene e estimulando assim a malignidade das linhagens de glioblastoma (JACOMASSO e colab., 2020; RIBEIRO, 2021; TROMBETTA-LIMA e colab., 2015).

2.8 MICROAMBIENTE TUMORAL E O CULTIVO 3D

Sabe-se que o modelo de cultivo celular em monocamada não é a forma ideal de entender o microambiente tumoral por este não ser fiel à sua biologia e características físico-químicas (WARE e colab., 2016). Tanto as células malignas quanto as saudáveis são organizadas em redes tridimensionais, com variações nutricionais e de sinalização, e com interações célula-célula e célula-matriz, por conta da presença de outras células e da matriz extracelular (ISHIGURO e colab., 2017; KELM e colab., 2003). Por conta disso, cada vez mais tem sido estudado o modelo tridimensional de cultivo celular, por entender-se que essas propriedades do cultivo 3D podem ser um grande fator na busca à alvos terapêuticos e ter um melhor entendimento dos processos de resistência celular (KELM e colab., 2003; WARE e colab., 2016).

2.8.1 Células-tronco tumorais

Sabe-se que microambiente do tumoral é composto por grande heterogeneidade celular. Dentre as células que permeiam esse microambiente, destacam-se células tumorais com características de células-tronco, conhecidas como cancer stem cells (CSCs), que cada vez mais mostram-se importantes para o processo tumorigênico. As CSCs são células que tornam-se quiescentes tornando-se mais resistentes às terapias padrão, além disso apresentam capacidade de autorrenovação, com importância na sustentação da tumorigênese de forma continuada (ATASHZAR e colab., 2020; NAJAFI e colab., 2019). A dificuldade acerca da presença das CSCs no microambiente tumoral é por conta de sua autorregeneração e alta capacidade de se diferenciar em diferentes tipos celulares, facilitando desta forma, a formação, progressão, invasão, metástase e resistência à quimioterapia pelo tumor (ATASHZAR e colab., 2020).

Em resposta à quimioterapia, mesmo que haja a morte de grande parte da massa tumoral, as CSCs são capazes de se diferenciar em tipos celulares heterogêneos, resultando em resistência e a reincidência do tumor, dificultando dessa forma, a terapêutica dos pacientes (PHI e colab., 2018).

Nesse sentido, algumas formas de cultivo celular, como em cultivos tridimensionais, onde métodos para agregação célula-célula são empregados, é possível que seja constatada a

presença de marcadores clássicos de CSCs, e em cultivos com depleção de soro, essa população pode ser enriquecida, sendo um bom modelo para estudo da interferência dessas células na responsividade aos tratamentos (ISHIGURO e colab., 2017).

Para a identificação de CSCs é analisada a expressão de marcadores de superfície específicas dessas populações (NAJAFI e colab., 2019). Em glioblastoma o principal marcador encontrado é o CD133, onde populações de CSCs CD133⁺ contribuem para a resistência ao tratamento com Temozolomida (PHI e colab., 2018). Além de CD133, Nestina e A2B5 são descritos na literatura como marcadores para glioblastoma (NAJAFI e colab., 2019).

2.8.2 *Hanging drops*

O sistema de cultivo tridimensional através de *hanging drops* baseia-se em propriedades como gravidade, tensão superficial, capilaridade e agregação celular, para levar à formação de esferoides através de um plaqueamento de gotas, onde as mesmas são deixadas suspensas em uma placa de petri (MISUN e colab., 2018). Por tratar-se de uma técnica de baixo custo, que não dispense de grande tecnologia, e de alta replicabilidade, a técnica a partir de *hanging drops* tem sido uma boa candidata para estudo mais aprofundado da interação célula-célula (JENSEN e TENG, 2020; MISUN e colab., 2018).

Além disso, essa metodologia pode ser utilizada para estudar as CSCs, uma vez que nos esferoides é perceptível a expressão de marcadores de stemness, sendo as CSCs, responsáveis pela secreção fatores de angiogênese, de citocinas e quimiocinas que atuam na proliferação, viabilidade e migração das células tumorais (RYU e colab., 2019).

3 JUSTIFICATIVA

Glioblastoma é uma doença relacionada com uma alta mortalidade, recorrência e baixa qualidade de vida de seus pacientes, grande parte disso devido sua alta complexidade e pouco entendimento dos mecanismos de resistência que apresenta. O tratamento padrão, mesmo com avanços nos estudos, ainda não é capaz de mudar a realidade onde menos de 10% dos pacientes diagnosticados sobrevivem por mais de 5 anos. Por conta disso são necessários mais estudos buscando entender os mecanismos envolvidos na resistência do glioblastoma à temozolomida, além de buscar outras terapias adjuvantes que sejam capazes de melhorar a responsividade ao tratamento e diminuir a progressão da doença.

O cultivo 3D é responsável por uma maior fidelidade ao microambiente tumoral uma vez que as células se organizam dessa maneira em nosso organismo, sendo uma maneira mais viável de estudar a responsividade aos tratamentos, uma vez que nos permite uma maior semelhança ao efeito que esses fármacos causam ao entrarem em contato com as células tumorais no organismo. Outro ponto importante que precisa ser melhor estudado é a contribuição de genes que apresentam sua expressão modificada nas células tumorais, como o gene supressor tumoral *RECK* e principalmente sua variante proto-oncogênica *RECKvar3*, na resposta aos quimioterápicos, buscando entender a sua relação com a resistência e a agressividade tumoral.

Até onde foi constatado, não há na literatura dados que comparem a formação de neuroesferas entre linhagens de glioblastoma com diferentes padrões de agressividade, como a A172 (linhagem menos proliferativa e mais responsiva à TMZ) e T98G (linhagem mais proliferativa e que apresenta maior resistência à TMZ), constituindo um objetivo do presente trabalho. Ainda, os efeitos citotóxicos do tratamento de células de glioblastoma humano com sinvastatina e temozolomida, administrado de forma isolada ou em combinação, também será explorado no presente trabalho, tanto em modelo de cultivo em monocamada (2D) como em modelo de neuroesferas (3D).

4 OBJETIVOS

4.2 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é avaliar se o tratamento conjunto com temozolomida e sinvastatina é capaz de alterar aspectos relacionados com o fenótipo de agressividade tumoral em duas linhagens de glioblastoma humano cultivadas em monocamada e em neuroesferas.

4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade de formação de neuroesferas da linhagem de glioblastoma humano A172 em cultivo de *hanging drops*.
- Avaliar efeitos do tratamento combinado de temozolomida e sinvastatina tanto na capacidade de formação como na manutenção de neuroesferas das linhagens A172 e T98G.
- Avaliar como o tratamento combinado de temozolomida e sinvastatina afeta a atividade metabólica das linhagens de glioblastoma humano A172 e T98G.

5 METODOLOGIA

5.2 CULTIVO CELULAR

5.2.1 Esterilização e manejo de materiais

Todos os materiais e vidrarias que foram utilizados para os procedimentos de cultivo celular (frascos para soluções e meio de cultura, equipamento para filtração de soluções, tampas, ponteiros plásticos para pipetas e pipetas de vidro) passaram por esterilização em autoclave a 120°C, durante 45 minutos e sob pressão de 1 atm. Após a esterilização, o material foi seco em estufa a 50°C. O manejo das culturas de células foi realizado em condições de esterilidade, no interior de capela de fluxo laminar.

5.2.2 Soluções e meio de cultura

5.2.2.1 PBS

A solução salina-fosfato tamponada (PBS) foi preparada como uma solução estoque concentrada cinco vezes, sendo que esta solução estoque é constituída por 680 mmol/L de NaCl, 13,4 mmol/L de KCl e 40,5 mmol/L de Na₂HPO₄. Esta também teve seu pH ajustado para 7,4, sendo esterilizada em autoclave da marca Fanem a 120°C, durante 45 minutos, sob pressão de 1 atm e armazenada em temperatura ambiente ou a 4°C.

5.2.2.2 Tripsina

A solução de tripsina-EDTA utilizada para soltar as células cultivadas de forma aderente nas garrafas constitui-se de 137 mmol/L de NaCl, 5,4 mmol/L de KCl, 5 mmol/L de glucose, 0,42 mmol/L de Na₂HPO₄, 0,44 mmol/L de KH₂PO₄, 2,3 mmol/L de NaHCO₃, 0,53 mmol/L de EDTA e 50 mg/L de tripsina, e teve seu pH ajustado para 7,4. O indicador de pH utilizado foi o vermelho de fenol 15 mg/L. Esta solução foi esterilizada por filtração em membrana estéril com poro de 0,22 µm (Millipore) sob pressão em aparelho Sartorius, em câmara de fluxo laminar vertical (VECO) e armazenada a -20°C.

5.2.2.3 Meio de cultura DMEM alta glucose

O meio de cultura DMEM alta glucose (Sigma) foi reconstituído em água ultra-pura e teve seu pH ajustado em 7,4. O ajuste do pH do meio foi realizado pela adição de NaHCO₃ estéril (autoclavado). O meio foi esterilizado por filtração em membrana de aceto-nitrato de celulose com poro de 0,22 µm sob pressão em aparelho Sartorius, em câmara de fluxo laminar vertical (VECO). Para os experimentos, o meio DMEM alta glucose foi suplementado com 10% de soro fetal bovino estéril (SFB; Gibco) e 100µg/mL do antibiótico estreptomicina e 100 U/mL de penicilina.

5.2.3 Condições de cultivo

As células das linhagens de glioblastoma humano, A172 e T98G, foram cedidas pelo Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL/NETCEM) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP). As células foram cultivadas em DMEM com 10% SBF, sendo manuseadas em fluxo laminar vertical (VECO) e mantidas a 37°C e 5% de CO₂ até obterem confluência aproximada de 80%. A subcultura foi realizada de acordo com a confluência das células, sendo utilizada a solução salina-fosfato tamponada (PBS 1X) para lavagem, e em seguida a solução de tripsina-EDTA para o desprendimento das mesmas.

5.3 TRATAMENTO DAS CÉLULAS

As células foram submetidas à tratamento com 100µM de TMZ (Sigma) e 1µM de SVA (Merck Sharpe and Dohme) por 72h, concentrações padronizadas em nosso laboratório. Os grupos controle foram tratados com DMSO e etanol, respectivos veículos da TMZ e SVA.

5.4 FORMAÇÃO DE *HANGING DROPS* PARA PASSAGEM PARA O POLY-HEMA

Conforme já padronizado em nosso laboratório pela Ms. Juliana Müller Bark (BARK e colab., 2017), as células foram plaqueadas com auxílio de um pipetador multicanal em placas p100, na densidade de 1x10³ células em um volume de 25 µL por gota de meio de cultura

DMEM, enriquecido com 10% de SBF. Após um período de 72 h, tempo de formação das neuroesferas, foram transferidas para um microtubo estéril até que haja sua decantação completa. Havendo a decantação, as células tiveram seu meio removido e foram ressuspensas em meio DMEM e transferidas para placas de 6 poços recobertos com poly-HEMA 1.2% para evitar sua adesão, permanecendo neste ambiente por 5 dias.

5.5 FORMAÇÃO DE *HANGING DROPS* COM TRATAMENTO

Para a formação de neuroesferas com o tratamento, o mesmo protocolo de plaqueamento foi utilizado, porém junto com o meio de cultura DMEM enriquecido com 10% de SBF foi adicionado os tratamentos nas condições descritas anteriormente. Após um período de 72 h, tempo de formação das neuroesferas, as placas foram analisadas em microscópio de luz invertida.

5.6 ATIVIDADE METABÓLICA POR MTT

As células foram plaqueadas na densidade de 4×10^3 células por poço em uma placa de 96 poços. Após 24 h para a adesão, as mesmas foram tratadas de acordo com o descrito no tópico 5.3. Ao atingir 72 h com o tratamento todo o sobrenadante foi retirado para incubação por 3 h com a solução de MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5- diphenyltetrazolium bromide), preparado com 6 mg do reagente MTT em 12 mL de PBS. Após, a solução foi retirada e adicionado 200 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo), deixando a placa por 15 min em agitador de placas para homogeneização da solução. A absorbância foi lida com auxílio de um leitor de placas em 570 nm.

5.7 ANÁLISE FENOTÍPICA

Foram feitas análises comparativas do tamanho e outros aspectos da morfologia das neuroesferas através da utilização do microscópio de luz invertida Carl Zeiss, do modelo

Axiovert 40 e as fotos tiradas com a câmera ZeissAxioCam MR. O software usado para análise da imagem será o Axiovision.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas serão realizadas no software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA). Para a comparação entre mais de duas condições independentes, será realizado o teste de One-way ANOVA com teste Tukey para dados paramétricos e Kruskal-Wallis para dados não-paramétricos. Valores de p menores que 0,05 serão considerados estatisticamente significativos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE NEUROESFERAS POR METODOLOGIA DE *HANGING DROPS* EM LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA

A partir do plaqueamento em *hanging drops*, a capacidade de formação de neuroesferas da linhagem A172 (linhagem menos agressiva e mais responsiva à TMZ) foi analisada em comparação com as neuroesferas geradas pela linhagem T98G (linhagem mais agressiva, não-responsiva à TMZ, já amplamente descrita na literatura como capaz de formar neuroesferas em modelos 3D). A média de tamanho das neuroesferas formadas de cada linhagem estão representados na Figura 1. Percebe-se um aumento do tamanho das neuroesferas ao longo dos tempos avaliados, para ambas as linhagens. A média de tamanho das neuroesferas formadas a partir da linhagem A172 mostrou ser menor em todos os tempos avaliados quando comparado com as neuroesferas formadas a partir da linhagem T98G. Vale destacar que a média de tamanho das neuroesferas formadas a partir das células A172 após 72h é equivalente às neuroesferas formadas pelas células T98G em apenas 24h de cultivo (em torno de 130,5 μ m). Em estudos utilizando cultura em monocamada foi percebido um padrão de crescimento diferenciado entre as duas linhagens, onde a T98G apresenta um crescimento mais rápido possivelmente indicando uma maior agressividade (CORRÊA e colab., 2006). Este padrão se manteve na formação das *hanging drops*, onde em mesmas condições, a linhagem A172 mostrou uma tendência à formação de neuroesferas estruturalmente menores. Mais análises necessitam ser realizadas para entender melhor as razões dessas diferenças de crescimento e proliferação.

As diferenças de fenótipos entre essas duas linhagens não se restringem à índices de proliferação, Yoshino e colaboradores (2010) analisaram a responsividade celular de linhagens de glioblastoma ao tratamento com temozolomida, e seus dados mostram que a IC₅₀ (inibição de 50% do crescimento) da linhagem A172 exposta a TMZ aconteceu em concentrações menores de 100 μ M do quimioterápico, enquanto a linhagem T98G, nas mesmas condições, alcançou seu IC₅₀ apenas em concentrações maiores que 350 μ M. Esses dados indicam que a linhagem T98G apresenta uma maior resistência a esse tratamento, enquanto a linhagem A172 mostra-se mais sensível (YOSHINO e colab., 2009).

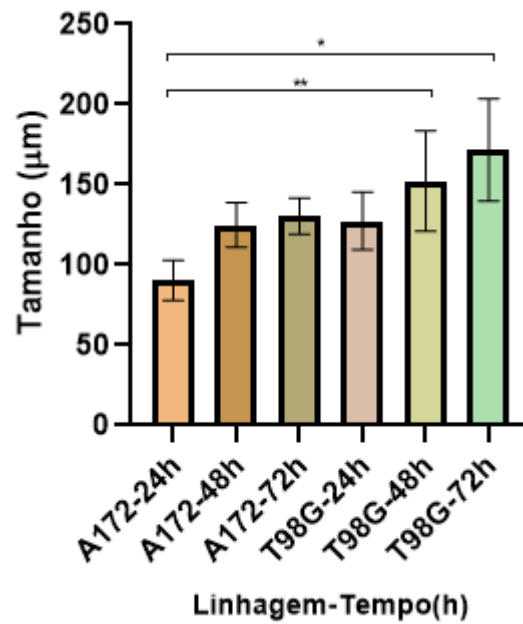


Figura 1: Capacidade de formação de neuroesferas de diferentes linhagens de glioblastoma humano. Células A172 e T98G foram plaqueadas em sistema hanging drop por 24, 48 e 72h. O tamanho das neuroesferas foi avaliado em microscópio de luz invertida Carl Zeiss, do modelo Axiovert 40. Estes resultados representam a média de três experimentos realizados em triplicatas. *Valores significativos com $p < 0.0001$; **Valores significativos com $p = 0.0011$.

6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DAS CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO APÓS TRATAMENTO COM TEMOZOLOMIDA E SINVASTATINA

Com o objetivo de avaliar os efeitos do tratamento com TMZ, SVA e TMZ+SVA na regulação metabólica das duas linhagens foi realizado um ensaio de MTT, o qual tem como princípio analisar a atividade das oxidoredutases dependentes de NADH na conversão do MTT (de coloração amarela) para o formazan (coloração roxa). Tanto a linhagem A172 quanto a linhagem T98G foram plaqueadas sob as mesmas condições e tratamentos.

A Figura 2 mostra os resultados obtidos para a linhagem T98G. Ao analisar as porcentagens de células metabolicamente ativas obtidas após os diferentes tratamentos, é possível perceber que essa linhagem mostrou não ser responsiva ao tratamento com TMZ isolada, não diminuindo de forma significativa a quantidade de células metabolicamente ativas quando comparado ao

controle (DMSO+EtOH). Apesar disso, o tratamento com SVA promoveu uma redução significativa na porcentagem de células T98G metabolicamente ativas, com uma queda ainda mais expressiva quando utilizada em conjunto com a TMZ. Esses resultados evidenciam uma maior responsividade da linhagem T98G ao tratamento combinado TMZ+SVA, que normalmente é caracterizada por um perfil mais agressivo e de menor responsividade terapêutica.

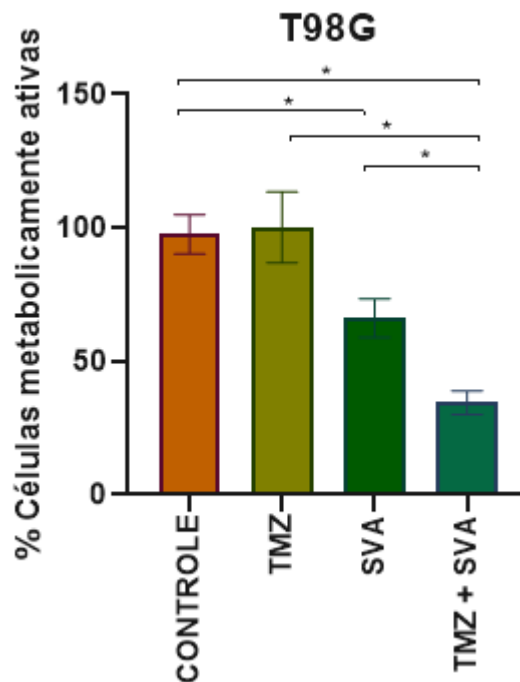


Figura 2: Ensaio de MTT para a linhagem de GB humano T98G. Células foram plaqueadas em monocamada (4×10^3 células por poço) e tratadas com $100\mu\text{M}$ de TMZ e $1\mu\text{M}$ de SVA por 72h. Os grupos controle foram tratados com DMSO e etanol, respectivos veículos da TMZ e SVA. Esse resultado representa 4 experimentos realizados em triplicatas biológicas. Houve uma redução de células metabolicamente ativas apenas com o tratamento com SVA, com redução de 31,4%, e TMZ+SVA, com redução de 63%. *Valores significativos com $p < 0.0001$.

A avaliação da modulação da atividade metabólica mediada pelos tratamentos de TMZ e SVA também foram avaliados para a linhagem A172. Os resultados estão expressos na Figura 3. Podemos perceber primeiramente que diferentemente da linhagem T98G, a A172 é responsiva ao tratamento com TMZ, diminuindo a porcentagem de células metabolicamente ativas em relação ao controle, seguindo dessa forma um padrão já encontrado anteriormente em

nosso laboratório, onde essa linhagem mostra responsividade ao tratamento quimioterápico padrão, sendo considerada de menor agressividade e resistência. O tratamento da linhagem A172 com SVA mostrou ser mais eficaz quando comparado com o tratamento isolado com TMZ, indicando desta forma ser uma boa opção de tratamento alternativo, uma vez que é capaz de aumentar a resposta do tratamento padrão. Porém, diferente da linhagem T98G, o tratamento das linhagens com SVA isolada ou combinada com TMZ não mostraram diferenças significativas.

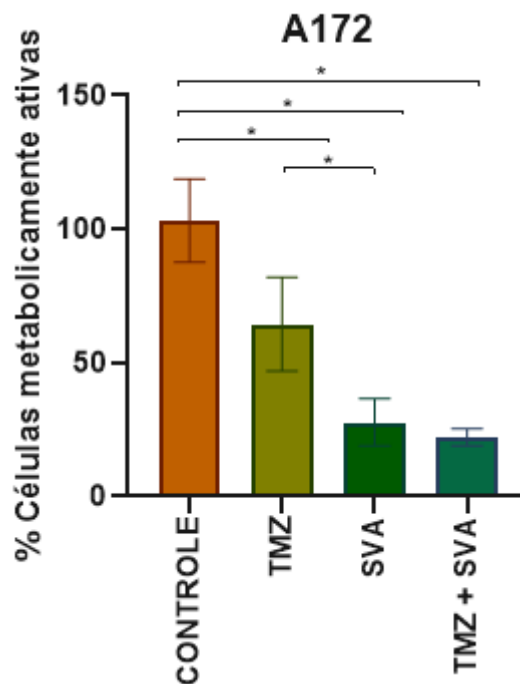


Figura 3: Ensaio de MTT para a linhagem de GB humano A172. Células foram plaqueadas em monocamada (4×10^3 células por poço) e tratadas com $100\mu\text{M}$ de TMZ e $1\mu\text{M}$ de SVA por 72h. Os grupos controle foram tratados com DMSO e etanol, respectivos veículos da TMZ e SVA. Esse resultado representa 4 experimentos realizados em triplicatas biológicas. Houve uma redução de células metabolicamente ativas de 38,7% para o tratamento com TMZ, 75,5 % para o tratamento com SVA e 81% para o tratamento TMZ+SVA. *Valores significativos com $p < 0.0001$.

O tratamento com a sinvastatina isolada foi efetivo para a linhagem A172, enquanto para a T98G, linhagem com características mais agressivas e não responsiva ao tratamento padrão com temozolomida, a sinvastatina conseguiu sensibilizar ao tratamento com temozolomida, quando estas utilizadas em combinação.

Esses dados corroboram com os estudos feitos com outras linhagens de glioblastoma, mostrando que o tratamento combinado é capaz de afetar a agressividade, resistência e migração do glioblastoma humano (SHOJAEI e colab., 2020).

6.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE NEUROESFERAS APÓS TRATAMENTO COM TMZ E SVA

Considerando os resultados anteriores que mostram que tanto a linhagem A172 como a T98G são capazes de formar neuroesferas em modelo *in vitro* por metodologia de *hanging drops* e que o tratamento combinado de SVA e TMZ promoveu uma diminuição significativa da atividade metabólica em ambas as linhagens, tornou-se interessante avaliar a responsividade dessas linhagens aos diferentes tratamentos considerando o modelo de cultivo em neuroesferas. Através do cultivo em *hanging drops* foi analisado primeiramente a capacidade das duas linhagens formarem esferas quando submetidas ao tratamento com TMZ, SVA e TMZ+SVA. Nesse primeiro ensaio, o tratamento foi realizado na etapa que as células são submetidas aos efeitos da gravidade e agregação celular em gota, com o intuito de analisar se a presença dos compostos seria capaz de afetar a etapa de formação das neuroesferas.

A Figura 4 retrata os resultados obtidos por essa metodologia. Com ela podemos perceber uma maior dificuldade dessa agregação celular com os tratamentos, mesmo sendo submetidas apenas à metodologia de *hanging drops*, qual força a formação de neuroesferas por conta de princípios como tensão superficial e gravidade. Para ambas as linhagens, as neuroesferas formaram-se sem dificuldades nas condições controle e tratadas apenas com os veículos (DMSO e etanol).

Observou-se que o tratamento com TMZ promoveu uma maior dispersão das células, perdendo de maneira sutil o seu formato compacto e arredondado para a linhagem A172, não surgindo esse efeito de forma evidente para a linhagem T98G, linhagem resistente a este fármaco. De forma interessante, tanto o tratamento isolado com SVA como sua combinação com TMZ impediu ambas as linhagens celulares de se agregarem em neuroesferas.

Sabe-se que em modelos 3D o enriquecimento e manutenção de subpopulações de células tronco tumorais é uma característica importante relacionada com o fenótipo de resistência tumoral (ATASHZAR e colab., 2020; KELM e colab., 2003; WARE e colab., 2016). Assim,

avaliar a presença de subpopulações de células tronco tumorais sob essas condições de tratamento com TMZ e SVA torna-se interessante uma vez que seria uma maneira de analisar a capacidade ou não de formar neuroesferas com o maior ou menor presença dessas subpopulações, e desta forma, correlacionar com um possível efeito do tratamento combinado.

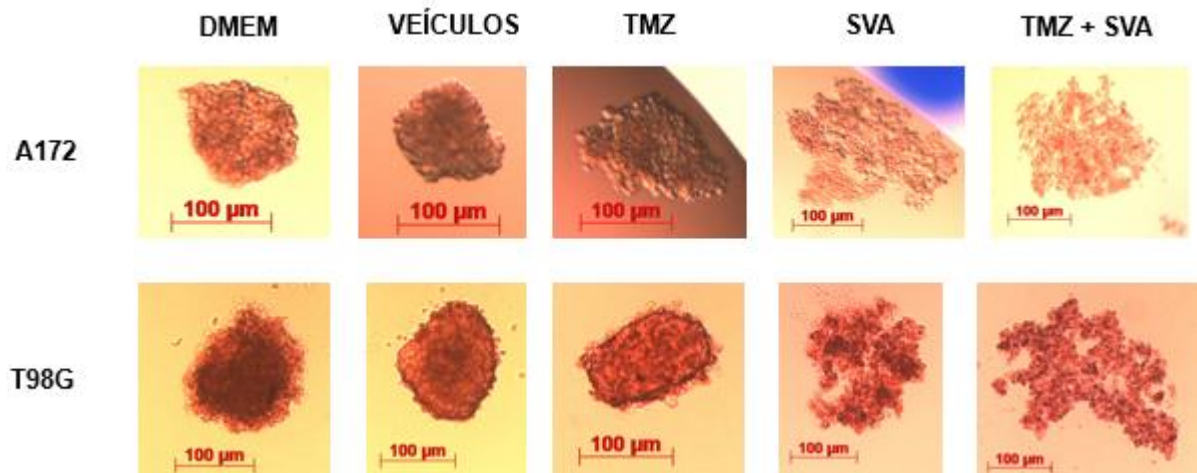


Figura 4: Formação de neuroesferas através de células de GB humano das linhagens A172 e T98G submetidas à diferentes tratamentos. As células foram plaqueadas na densidade de 1000 células por gota em *hanging drops* e tratadas com 100µM de TMZ e 1µM de SVA por 72h. Os grupos controle foram tratados com DMSO e etanol, respectivos veículos da TMZ e SVA. Esse resultado é representativo de cinco experimentos, realizados em triplicatas biológicas para a linhagem A172 e duplicatas biológicas para a T98G. A avaliação foi realizada em microscópio de luz invertida Carl Zeiss, do modelo Axiovert 40.

6.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM TMZ E SVA SOBRE A MANUTENÇÃO DE MODELO DE NEUROESFERAS OBTIDOS DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO

Após constatar que o tratamento com SVA e sua combinação com TMZ afetam a capacidade de formação das neuroesferas de células de glioblastoma humano, foi analisado se os mesmos seriam capazes de alterar a manutenção dessas neuroesferas já estabelecidas.

A morfologia das neuroesferas quanto características como compactação celular, formato e linearidade para as duas linhagens nas duas condições de tratamento foram analisadas e estão representadas na Figura 5.

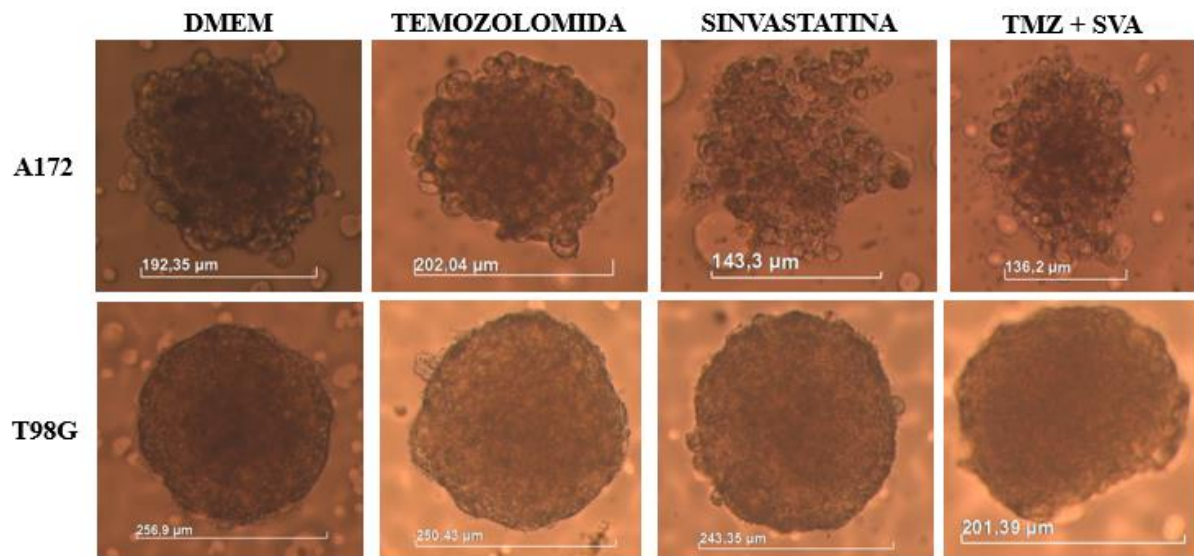


Figura 5: Efeitos do tratamento com TMZ e SVA sobre a manutenção de neuroesferas obtidos das linhagens A172 e T98G. As neuroesferas, formadas a partir de um plaqueamento de 1000 células por gota através metodologia em *hanging drops*, foram mantidas em meio não-aderente e tratadas com 100 μM de TMZ e 1 μM de SVA por 72h. Os grupos controle foram tratados com DMSO e etanol, respectivos veículos da TMZ e SVA. Características da morfologia das neuroesferas foram analisadas no microscópio Carl Zeiss, do modelo Axiovert 40. Esse resultado representa 5 experimentos em uma replicata.

Dados sobre tamanho das neuroesferas para as diferentes condições de tratamento e linhagens estão plotados nas Figuras 6 e 7.

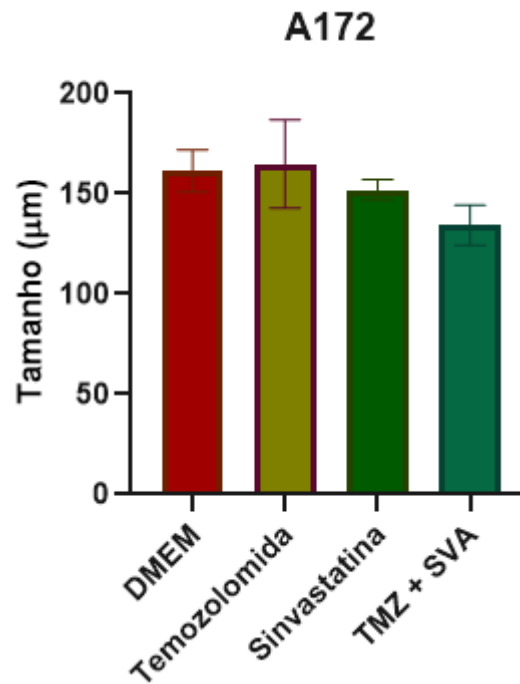


Figura 6: Efeitos do tratamento com TMZ e SVA sobre o tamanho de neuroesferas obtidas da linhagem A172. As neuroesferas, formadas a partir de um plaqueamento de 1000 células por gota através metodologia em *hanging drops*, foram mantidas em meio não-aderente e tratadas com 100μM de TMZ e 1μM de SVA por 72h. Os grupos controle foram tratados com DMSO e etanol, respectivos veículos da TMZ e SVA. O tamanho das neuroesferas foi avaliado em microscópio de luz invertida Carl Zeiss, do modelo Axiovert 40 e mensurados com auxílio do software *Axionvision*. Resultados são representativos de uma replicata biológica (N=4).

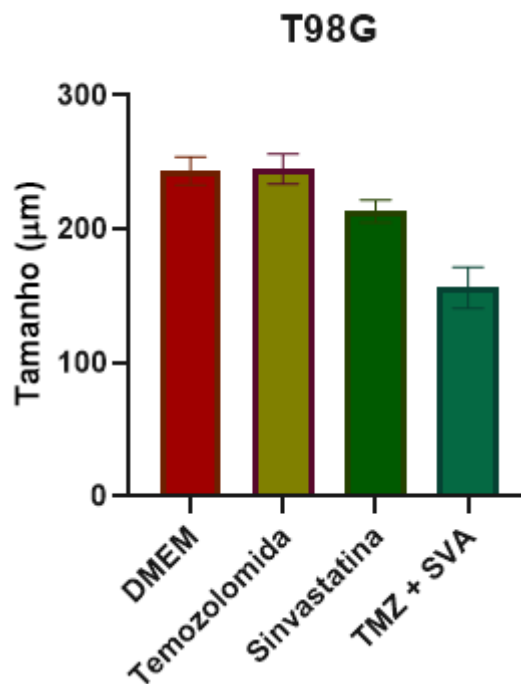


Figura 7: Efeitos do tratamento com TMZ e SVA sobre o tamanho de neuroesferas obtidas da linhagem T98G. As neuroesferas, formadas a partir de um plaqueamento de 1000 células por gota através metodologia em *hanging drops*, foram mantidas em meio não-aderente e tratadas tratadas com 100µM de TMZ e 1µM de SVA por 72h. Os grupos controle foram tratados com DMSO e etanol, respectivos veículos da TMZ e SVA. O tamanho das neuroesferas foi avaliado em microscópio de luz invertida Carl Zeiss, do modelo Axiovert 40 e mensurados com auxílio do software *Axionvision*. Resultados são representativos de uma replicata biológica (N=4).

A linhagem T98G mostrou ser mais propícia a formação de esferoides em modelo de cultura tridimensional (Figura 5). Suas neuroesferas se formaram de maneira mais linear, com um tamanho maior e bordas regulares, apesar de terem sido plaqueadas sob as mesmas condições que a linhagem A172. Quando apenas DMEM foi administrado nos poços foi possível perceber um aumento de cerca de 25% do tamanho das neuroesferas para a linhagem T98G quando comparado com a A172, dado que está de acordo com o perfil encontrado também durante a formação em gota das neuresferas, ou seja, a linhagem T98G mantém a capacidade de proliferação e crescimento de neuroesferas mesmo em condições não aderentes, em acordo com o padrão de maior agressividade desta linhagem (Figuras 6 e 7).

Apesar do MTT indicar uma diminuição de células metabolicamente ativas e outros ensaios em nosso grupo indicando que a linhagem A172 responde significativamente ao tratamento com TMZ (Figuras 2 e 3), percebemos que quando esse tratamento é aplicado às neuroesferas, não parece diminuir seu tamanho quando comparado ao grupo que não recebeu os fármacos (Figuras 6 e 7). Isso pode acontecer devido ao maior enriquecimento de células-tronco tumorais em neuroesferas quando comparado às células em configuração 2D, resultando em um fenótipo de maior resistência tumoral (ISHIGURO e colab., 2017).

Juntos, esses dados reforçam alguns dados já obtidos no laboratório sobre a responsividade aumentada quando administrada a combinação dos dois fármacos, sinvastatina e temozolomida, para a linhagem A172 e principalmente para a linhagem T98G, e também para o ensaio em monocamada realizado neste trabalho. As diferenças em sinalização e contato célula-célula são aspectos que podem ser melhor abordados com cultivo tridimensional, além do enriquecimento de células-tronco tumorais brevemente discutidos anteriormente, por isso torna-se importante utilizar desta metodologia para entender melhor a eficácia dos tratamentos no organismo.

Por se tratar de apenas uma replicata biológica, mais ensaios tridimensionais precisam ser feitos para primeiramente confirmar os dados obtidos em Poly-HEMA, mas também para auxiliar na compreensão das razões a diminuição de tamanho das neuroesferas, se estas acontecem por dissociação das células do aglomerado ou sua morte por exemplo, se esse efeito efetivamente sensibiliza as células ao tratamento, além de buscar de outras diferenças para o cultivo em monocamada, como o possível enriquecimento de populações de células-tronco tumorais, que podem estar por trás do perfil de menor resposta a TMZ pelas neuroesferas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi estabelecido de forma eficiente um modelo de cultivo tridimensional para estudo dessas duas linhagens de glioblastoma humano, principalmente para a linhagem A172, linhagem menos agressiva e que não apresentava uma padronização para esse método na literatura ainda. Tal feito permitirá ao grupo maiores estudos relacionados com a resistência e agressividade tumoral futuramente. Sua comparação com os dados da literatura obtidos em modelos já estabelecidos em células mais agressivas (U87MG e T98G) será de grande importância para o entendimento da biologia tumoral de GB, evidenciando a importância do microambiente tumoral.

Os ensaios de atividade metabólica mostraram também que o uso combinado de sinvastatina e temozolomida modifica a porcentagem de células metabolicamente ativas, corroborando com ensaios anteriores do laboratório. Além disso, mostra-se um estudo promissor para o uso de drogas adjuvantes no tratamento do câncer, como forma de aumentar a responsividade ao tratamento, e neste caso mais especificamente, o tratamento de glioblastoma, uma doença com um mal prognóstico, relacionada com alta resistência ao tratamento padrão.

Um ponto importante mostrado com os experimentos em cultivo tridimensional foi a eficácia do fármaco sinvastatina em impedir a formação das neuroesferas, efeito não encontrado com a administração isolada de temozolomida, terapia padrão para o glioblastoma. E também os efeitos do tratamento combinado para as duas linhagens, mostrando o importante papel da sinvastatina sensibilizando o tratamento com temozolomida.

Diante dos resultados apresentados, torna-se muito interessante futuramente explorar os possíveis mecanismos pelos quais o fármaco SVA pode estar mediando os efeitos em combinação com o quimioterápico padrão TMZ. Assim, uma perspectiva interessante do trabalho seria avaliar a modulação de subpopulações de células-tronco tumorais em modelos de neuroesferas, assim como explorar ensaios de proliferação e morte celular.

REFERÊNCIAS

- ACS. **Cancer Statistics Cancer.** Disponível em: <
https://cancerstatisticscenter.cancer.org/?_ga=2.145011568.579133017.1606483875-1563519187.1605914640#!/>. Acesso em: 23 nov. 2020.
- ATASHZAR, Mohammad Reza e colab. **Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications.** *Journal of Cellular Physiology*, v. 235, n. 2, p. 790–803, 2020.
- BARK, Juliana M. e TROMBETTA-LIMA, Marina e WINNISCHOFER, Sheila M.B. **Tratamento Combinado de Temozolomida e Sinvastatina tem Ação Citotóxica e Altera a Formação de Neuroesferas em Linhagem de Glioblastoma Humano.** 2017. 1–81 f. 2017.
- BATASH, Ron e colab. **Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review.** *Current Medicinal Chemistry*, v. 24, n. 27, p. 3002–3009, 2017.
- CHEN, Yun e TSENG, Sheng Hong. **The potential of RECK inducers as antitumor agents for glioma.** *Anticancer Research*, v. 32, n. 7, p. 2991–2998, 2012.
- CHUA, Jason e NAFZIGER, Elizabeth e LEUNG, Denise. **Evidence-Based Practice: Temozolomide Beyond Glioblastoma.** *Current Oncology Reports*, v. 21, n. 4, 2019.
- CORRÊA, Tatiana C.Silveira e colab. **Downregulation of the RECK-tumor and metastasis suppressor gene in glioma invasiveness.** *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 99, n. 1, p. 156–167, 2006.
- CORRÊA, Tatiana C.Silveira e colab. **RECK-mediated inhibition of glioma migration and invasion.** *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 110, n. 1, p. 52–61, 2010.
- DASTGHAIB, Sanaz e colab. **Simvastatin Induces Unfolded Protein Response and Enhances Temozolomide-Induced Cell Death in Glioblastoma Cells.** *Cells*, v. 9, n. 11, 2020.
- DAVIS, Mary Elizabeth. **Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment.** *Clinical Journal of Oncology Nursing*, v. 20, n. 5, p. 33–44, 2016.
- GOMES, Rafaela Pino. **Mecanismos De Ação Citotóxicos Mediados Pela Combinação De Temozolomida E Sinvastatina Em Células De Glioma Humano.** . [S.l: s.n.]. , 2018
- GUSYATINER, Olga e HEGI, Monika E. **Glioma epigenetics: From subclassification to**

novel treatment options. *Seminars in Cancer Biology*, v. 51, n. October, p. 50–58, 2018.

HANAHAN, Douglas e WEINBERG, Robert A. **Hallmarks of Cancer : The Next Generation.** *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>>.

HANAHAN, Douglas e WEINBERG, Robert A. **The Hallmarks of Cancer.** *Cell*, v. 100, p. 57–70, 2000.

INCA. **Estatísticas do Câncer.** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 10 dez. 2021.

ISHIGURO, Tatsuya e colab. **Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications.** *Cancer Science*, v. 108, n. 3, p. 283–289, 2017.

JACOMASSO, Thiago e colab. **The alternatively spliced RECK transcript variant 3 is a predictor of poor survival for melanoma patients being upregulated in aggressive cell lines and modulating MMP gene expression in vitro.** *Melanoma Research*, p. 223–234, 2020.

JENSEN, Caleb e TENG, Yong. **Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture?** *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 7, n. March, p. 1–15, 2020.

KARSY, Michael e colab. **New Molecular Considerations for Glioma: IDH, ATRX, BRAF, TERT, H3 K27M.** *Current Neurology and Neuroscience Reports*, v. 17, n. 2, 2017.

KELM, Jens M e colab. **Method for Generation of Homogeneous Multicellular Tumor Spheroids Applicable to a Wide Variety of Cell Types.** *Biotechnology And Bioengineering*, v. 83, p. 173–180, 2003.

LEE, Sang Y. **Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme.** *Genes and Diseases*, v. 3, n. 3, p. 198–210, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2016.04.007>>.

LENT, Roberto. **Cem Bihões de Neurônios.** [S.l: s.n.], 2010. v. 2.

LOUIS, David N e colab. **The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System : a summary.** *Acta Neuropathologica*, v. 131, n. 6, p. 803–820, 2016.

MENESES, Murilo S. **Neuroanatomia Aplicada.** [S.l: s.n.], 2015.

MISUN, Patrick M e colab. **Fabrication and Operation of Microfluidic Hanging-Drop Networks**. [S.l: s.n.], 2018. v. 1771.

NAJAFI, Masoud e FARHOOD, Bagher e MORTEZAEI, Keywan. **Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy**. *Journal of Cellular Physiology*, v. 234, n. 6, p. 8381–8395, 2019.

OSTROM, Quinn T. e colab. **CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016**. *Neuro-Oncology*, v. 21, p. V1–V100, 2019.

OSTROM, Quinn T. e colab. **CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013-2017**. *Neuro-Oncology*, v. 22, n. Supplement_1, p. IV1–IV96, 2020.

PHI, Lan Thi Hanh e colab. **Cancer stem cells (CSCs) in drug resistance and their therapeutic implications in cancer treatment**. *Stem Cells International*, v. 2018, 2018.

RIBEIRO, Carolina Simões Pires. **Papel De Reck E Reck-Var3 Na Modulação Dos Fenótipos De Agressividade E Resistência Tumoral Mediado Por Vesículas Extracelulares**. 2021. 2021.

RYU, Na Eun e LEE, Soo Hong e PARK, Hansoo. **Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells**. *Cells*, v. 8, n. 12, p. 1–13, 2019.

SAMIEI, Ehsan e colab. **Investigating programmed cell death and tumor invasion in a three-dimensional (3d) microfluidic model of glioblastoma**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 9, 2020.

SHOJAEI, Shahla e colab. **Simvastatin increases temozolomide-induced cell death by targeting the fusion of autophagosomes and lysosomes**. *FEBS Journal*, v. 287, n. 5, p. 1005–1034, 2020.

STROBEL, Hannah e colab. **Temozolomide and Other Alkylating Agents in Glioblastoma Therapy**. *Biomedicines*, v. 7, n. 3, p. 69, 2019.

THAKKAR, Jigisha P e DOLECEK, Therese A e HORBINSKI, Craig. **Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma**. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2014.

TROMBETTA-LIMA, Marina e colab. **Isolation and characterization of novel RECK tumor suppressor gene splice variants**. *Oncotarget*, v. 6, n. 32, 2015.

WARE, Matthew J e colab. **Generation of homogenous 3D pancreatic cancer cell spheroids using an improved hanging drop technique**. 2016. 1–36 f. 2016.

WICK, Wolfgang e colab. **MGMT testing - The challenges for biomarker-based glioma treatment**. *Nature Reviews Neurology*, v. 10, n. 7, p. 372–385, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2014.100>>.

WIRSCHING, Hans Georg e GALANIS, Evanthia e WELLER, Michael. **Glioblastoma**. *Handbook of Clinical Neurology*, v. 134, p. 381–397, 2016.

YOSHINO, Atsuo e colab. **Accumulation of aberrant CpG hypermethylation by Helicobacter pylori infection promotes development**. *International Journal of Oncology*, v. 35, p. 547–557, 2009.

YU, Wei e colab. **O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT): Challenges and New Opportunities in Glioma Chemotherapy**. *Frontiers in Oncology*, v. 9, n. January, p. 1–11, 2020.