

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VIKTOR KALBERMATTER BOELL

EFEITOS DE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDAIIS EM MODELO
DE GLIOBLASTOMA HUMANO: MODULAÇÃO DA AGRESSIVIDADE
TUMORAL E DA EXPRESSÃO DO GENE *RECK*

CURITIBA

2022

VIKTOR KALBERMATTER BOELL

EFEITOS DE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDAIIS EM MODELO
DE GLIOBLASTOMA HUMANO: MODULAÇÃO DA AGRESSIVIDADE
TUMORAL E DA EXPRESSÃO DO GENE *RECK*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito para a obtenção do título de mestre.

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

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Boell, Viktor Kalbermatter

Efeitos de anti-inflamatórios não esteroidais em modelo de glioblastoma humano : modulação da agressividade tumoral e da expressão do gene RECK / Viktor Kalbermatter Boell . – Curitiba, 2021.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica).

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

1. Glioblastoma. 2. Anti-inflamatórios não-esteroidais. 3. Temozolomida. I. Winnischofer, Sheila Maria Brochado, 1976-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **VIKTOR KALBERMATTER BOELL** intitulada: **Efeitos de anti-inflamatórios não-esteroidais em modelo de glioblastoma humano: modulação da agressividade tumoral e da expressão do gene RECK**, sob orientação da Profa. Dra. SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 04 de Agosto de 2022.

Assinatura Eletrônica

09/08/2022 08:40:58.0

SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

08/08/2022 16:58:47.0

GUILHERMINA RODRIGUES NOLETO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

10/08/2022 13:27:41.0

ADRIANA FROHLICH MERCADANTE

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Para Eliete S. Figueiredo, a inesquecível Lili.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Silvia e Emerson, e aos meus irmãos, Annelise e Günther, pelo amor incondicional, por proverem o alicerce firme no qual posso construir meus sonhos;

À toda a minha família, pelo amparo imensurável;

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Sheila Maria Brochado Winnischofer, pelo apoio, pela confiança, por ter compartilhado comigo o seu conhecimento e sua paixão pela ciência;

Às demais professoras e técnicas do Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular, por todo o suporte fornecido;

À Prof.^a Dr.^a Guilhermina Rodrigues Noleto, pelo aceite para compor a banca, pela admirável dedicação ao laboratório e, acima de tudo, pelos inúmeros ensinamentos através de suas palavras e de seu exemplo;

À Prof.^a Dr.^a Adriana Frohlich Mercadante, pelo aceite para compor a banca e pelas contribuições já feitas através da avaliação do projeto e do relatório, pelo entusiasmo incessável e contagiante;

Aos amigos e amigas do Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular, por terem tornado mais agradável esta jornada. Especialmente à Carolina, ao Henrique e à Mariane, pelas risadas e ensinamentos compartilhados;

À mestra Lislely, por encher os meus dias de alegria e estar sempre ao meu lado (incluindo noites, feriados e finais de semana no laboratório), por ter me tornado um cientista melhor, por me inspirar, por ampliar imensamente o que eu entendia por amizade e companheirismo;

Às amigas que o curso de Química me proporcionou, Ana, Bianca, Caroline e Letícia, por podermos sempre dividir as alegrias de nossas conquistas;

À Dr.^a Regiane Stafim da Cunha e, em seu nome, ao Laboratório de Nefrologia Experimental do Departamento de Patologia Básica da UFPR, pelo suporte para a realização dos experimentos de qRT-PCR;

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica da UFPR;

Às agências de fomento e à UFPR.

“A scientist in his laboratory is not a mere technician: he is also a child confronting natural phenomena that impress him as though they were fairy tales.”

Marie Skłodowska-Curie

RESUMO

Glioblastomas (GB), tumores originados de astrócitos com elevado grau de malignidade, são as neoplasias mais comuns que acometem o sistema nervoso central. A baixa taxa de sobrevida pode ser atribuída à natureza altamente difusa e invasiva deste tipo tumoral, bem como a limitações no regime terapêutico. O tratamento quimioterápico padrão é feito com temozolomida (TMZ), porém diversos mecanismos de resistência à ação deste fármaco já são conhecidos. Sabe-se que a presença de células-tronco de glioblastoma (GSCs) no microambiente tumoral confere resistência ao tratamento e que esta subpopulação pode ser experimentalmente enriquecida através de técnicas de cultivo celular tridimensional para a formação de esferoides. A glicoproteína RECK, forma canônica codificada pelo gene supressor de tumor de mesmo nome, apresenta caráter antitumoral por inibir processos de invasão e migração mediados pela ação de MMP-2. Contudo, variantes de *RECK* produzidos por *splicing* alternativo, a exemplo de RECKvar3 e RECKvar5, correlacionam-se a fenótipos opostos ao da proteína canônica. Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) apresentam atividade antitumoral e alguns representantes desta classe foram descritos como capazes de induzir a expressão de RECK, ainda que por mecanismos não totalmente elucidados. Desta maneira, este trabalho destinou-se a avaliar a capacidade de AINEs de modular características de agressividade tumoral e responsividade ao tratamento quimioterápico com TMZ, bem como de modular a expressão do gene *RECK* em linhagens de GB humano. Foram observadas reduções na atividade metabólica e na população de células aderidas mediante o tratamento das linhagens U87MG e T98G com aspirina (AAS) e, de maneira mais sensível, com ibuprofeno (IBU). Interessantemente, a capacidade de formação de esferoides na presença de AAS foi reduzida em ambas as linhagens, enquanto o tratamento com IBU teve efeito somente na linhagem T98G. Ambos os AINEs promoveram redução da capacidade de migração, com o efeito mais pronunciado para a linhagem U87MG. Observou-se, ainda, que o cotratamento de AAS ou IBU com TMZ é capaz de sensibilizar a linhagem T98G, que é intrinsecamente resistente à ação deste quimioterápico. A análise de qRT-PCR revelou que AAS e IBU reprimem a expressão de MMP-2 e induzem a expressão de RECK canônico em ambas as linhagens. Destaca-se o tratamento com IBU por promover aumento da expressão do transcrito canônico de RECK, redução dos transcritos alternativos RECKvar3 e RECKvar5, redução da expressão proteica de MMP-2. A regulação da expressão de RECK e MMP-2 por AAS e IBU pode ser parcialmente explicada pelos menores níveis da forma fosforilada de ERK. Por fim, observou-se uma menor atividade de MMP-2 na linhagem U87MG tratada com ambos os AINEs, evidenciando que esta classe de fármacos pode atuar na regulação da expressão de MMP-2 em diferentes níveis. Em conjunto, os resultados obtidos neste projeto reforçam o potencial de AINEs na terapia antineoplásica e fornecem evidências de novos mecanismos de ação para AAS e IBU no contexto tumoral.

Palavras-chave: Glioblastoma; Anti-inflamatórios não-esteroidais; Temozolomida; RECK; MMP-2.

ABSTRACT

Glioblastomas (GB), tumors originating from astrocytes with a high degree of malignancy, are the most common neoplasms that affect the central nervous system. The low survival rate can be attributed to the highly diffuse and invasive nature of this tumor type, as well as limitations in the therapeutic regimen. The standard chemotherapy treatment is done with temozolomide (TMZ), but several mechanisms of resistance to the action of this drug are already known. It is known that the presence of glioblastoma stem cells (GSCs) in the tumor microenvironment confers resistance to treatment and that this subpopulation can be experimentally enriched through three-dimensional cell culture techniques for the formation of spheroids. The RECK glycoprotein, the canonical form encoded by the tumor suppressor gene of the same name, has an antitumor activity by inhibiting invasion and migration processes mediated by the action of MMP-2. However, variants of *RECK* produced by alternative splicing, such as RECKvar3 and RECKvar5, correlate with phenotypes opposite to that of the canonical protein. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) also have antitumor activity and some representatives of this class have been described as capable of inducing *RECK* expression, although by mechanisms not fully elucidated. Thus, this work aimed to evaluate the ability of NSAIDs to modulate tumor aggressiveness and responsiveness to chemotherapy with TMZ, as well as to modulate *RECK* expression in human GB cell lines. Reductions in metabolic activity and adherent cell population were observed upon treatment of the U87MG and T98G cell lines with aspirin (AAS) and, more sensitively, with ibuprofen (IBU). Interestingly, the ability to form spheroids in the presence of AAS was reduced in both cell lines, while IBU treatment only affected the T98G cells. Both NSAIDs promoted reduced migration capacity, with the most pronounced effect for U87MG. It was also observed that the co-treatment of AAS or IBU with TMZ is capable of sensitizing the T98G cell line, which is intrinsically resistant to the action of this chemotherapeutic agent. qRT-PCR analysis revealed that AAS and IBU repress MMP-2 expression and induce RECK expression in both cell lines. The treatment with IBU stands out for promoting increased expression of the canonical transcript of RECK, reduction of RECKvar3 and RECKvar5 transcripts and reduction of the protein expression of MMP-2. Regulation of RECK and MMP-2 expression by AAS and IBU can be partially explained by lower levels of phosphorylated ERK. Finally, a lower MMP-2 activity was observed in U87MG cells treated with both NSAIDs, evidencing that this class of drugs can act in the regulation of MMP-2 expression at different levels. Taken together, the results obtained in this project reinforce the potential of NSAIDs in anticancer therapy and provide evidence of new mechanisms of action for AAS and IBU in the tumor context.

Keywords: Glioblastoma; Non-steroidal anti-inflammatory drugs; Temozolomide; RECK; MMP-2

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura e mecanismo de ativação da temozolomida (TMZ).....	22
FIGURA 2: Biossíntese e vias de sinalização ativadas por PGE ₂	26
FIGURA 3: Domínios preditos para a proteína RECK canônica.....	29
FIGURA 4: Regulação da atividade de MMPs pela proteína RECK canônica.....	30
FIGURA 5: Representação do <i>splicing</i> alternativo de RECK e domínios proteicos preditos para cada transcrito.....	32
FIGURA 6: Determinação da atividade metabólica após o tratamento da linhagem U87MG com AAS e IBU por 24 e 48 horas.....	47
FIGURA 7: Determinação da atividade metabólica após o tratamento da linhagem T98G com AAS e IBU por 24 e 48 horas.....	48
FIGURA 8: Quantificação de células aderidas após o tratamento da linhagem U87MG com AAS e IBU por 24 e 48 horas.....	50
FIGURA 9: Quantificação de células aderidas após o tratamento da linhagem T98G com AAS e IBU por 24 e 48 horas.....	51
FIGURA 10: Comparação dos resultados obtidos pelas metodologias de MTT e CV para a linhagem U87MG tratada com AAS e IBU por 24 e 48 horas.....	52
FIGURA 11: Comparação dos resultados obtidos pelas metodologias de MTT e CV para a linhagem T98G tratada com AAS e IBU por 24 e 48 horas.....	53
FIGURA 12: Avaliação da capacidade de formação de esferoides derivados da linhagem U87MG na presença de AAS e IBU por 72 horas.....	54
FIGURA 13: Avaliação da capacidade de formação de esferoides derivados da linhagem T98G na presença de AAS e IBU por 72 horas.....	55
FIGURA 14: Quantificação da capacidade de migração de células a partir de esferoides da linhagem U87MG na presença de AAS e IBU por 24 e 48 horas....	57
FIGURA 15: Avaliação de capacidade de migração de células a partir de esferoides da linhagem U87MG na presença de AAS e IBU por 24 e 48 horas....	58
FIGURA 16: Quantificação da capacidade de migração de células a partir de esferoides da linhagem T98G na presença de AAS e IBU por 24 e 48 horas.....	59
FIGURA 17: Avaliação de capacidade de migração de células a partir de esferoides da linhagem T98G na presença de AAS e IBU por 24 e 48 horas.....	60

FIGURA 18: Curva de área relativa de migração a partir de esferoides das linhagens U87MG e T98G na presença de AAS e IBU por 24 e 48 horas.....	61
FIGURA 19: Avaliação da atividade metabólica após o tratamento da linhagem U87MG com diferentes combinações entre AAS, IBU e TMZ por 24 horas.....	62
FIGURA 20: Avaliação da atividade metabólica após o tratamento da linhagem U87MG com diferentes combinações entre AAS, IBU e TMZ por 48 horas.....	63
FIGURA 21: Avaliação da atividade metabólica após o tratamento da linhagem U87MG com diferentes combinações entre AAS, IBU e TMZ por 72 horas.....	64
FIGURA 22: Avaliação da atividade metabólica após o tratamento da linhagem T98G com diferentes combinações entre AAS, IBU e TMZ por 24 horas.....	65
FIGURA 23: Avaliação da atividade metabólica após o tratamento da linhagem T98G com diferentes combinações entre AAS, IBU e TMZ por 48 horas.....	66
FIGURA 24: Avaliação da atividade metabólica após o tratamento da linhagem T98G com diferentes combinações entre AAS, IBU e TMZ por 72 horas.....	67
FIGURA 25: Expressão relativa de mRNA dos transcritos RECK canônico, RECKvar3, RECKvar5 e de MMP-2 para a linhagem U87MG tratada com AAS ou IBU por 24 horas.....	69
FIGURA 26: Expressão relativa de mRNA dos transcritos RECK canônico, RECKvar3, RECKvar5 e de MMP-2 para a linhagem T98G tratada com AAS ou IBU por 24 horas.....	71
FIGURA 27: Razão entre a expressão de mRNA do transcrito RECK canônico e de RECKvar3, RECKvar5 e MMP-2 para a linhagem U87MG tratada com AAS ou IBU por 24 horas.....	73
FIGURA 28: Razão entre a expressão de mRNA do transcrito RECK canônico e de RECKvar3, RECKvar5 e MMP-2 para a linhagem T98G tratada com AAS ou IBU por 24 horas.....	75
FIGURA 29: Imunodeteção de MMP-2, MMP-9, p-ERK e ERK para a linhagem U87MG tratada com AAS e IBU por 24 horas.....	76
FIGURA 30: Imunodeteção de MMP-2, MMP-9, p-ERK e ERK para a linhagem T98G tratada com AAS e IBU por 24 horas.....	77
FIGURA 31: Detecção de MMPs com atividade gelatinolítica em meio condicionado das linhagens U87MG e T98G tratadas com AAS e IBU por 24 horas.....	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Sequência, concentração e eficiência de amplificação dos <i>primers</i> utilizados.....	40
TABELA 2: Propriedades físico-químicas e estruturais determinadas para diferentes AINEs.....	45
TABELA 3: Alinhamento das sequências dos transcritos RECKvar3 e RECKvar5.....	99
TABELA 4: Sítios de ligação de micro-RNAs presentes na região 3' de RECKvar3 e RECKvar5.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAS – aspirina ou ácido acetilsalicílico
- AIC – 5-aminoimidazol-4-carboxamida
- AINEs – anti-inflamatórios não-esteroidais
- BCA – ácido bicinconínico (do inglês, *bicinchoninic acid*)
- BER – reparo por excisão de bases (do inglês, *base excision repair*)
- BHE – barreira hematoencefálica
- BRCA (1/2) – do inglês, *breast cancer gene 1 and 2*
- BSA – albumina sérica bovina (do inglês, *bovine serum albumine*)
- cDNA – DNA complementar
- COX (1/2) – ciclo-oxigenases 1 e 2
- CSCs – células-tronco tumorais (do inglês, *cancer stem cells*)
- C_t – ciclo de equivalência ao valor de *treshold* (do inglês, *cycle threshold*)
- CV – cristal violeta
- DMEM-AG – meio Eagle modificado por Dulbecco com alta glucose (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DNA – ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)
- EGFR – receptor do fator de crescimento epidérmico (do inglês, *epidermal growth factor receptor*)
- EGFRviii – variante 3 do receptor do fator de crescimento epidérmico
- EP(1–4) – receptores de prostaglandina E₂ 1 a 4
- ERK – quinases reguladas por sinais extracelulares (do inglês, *extracellular signal regulated kinases*)
- EtOH – etanol ou álcool etílico
- GB – glioblastoma
- GSCs – células-tronco de glioblastoma (do inglês, *glioblastoma stem cells*)
- H3K27me3 – lisina 27 da histona H3 trimetilada
- IBU – ibuprofeno ou ácido isobutilpropanoicofenólico
- IDH1 – isocitrato desidrogenase 1 (do inglês, *isocitrate dehydrogenase 1*)
- iHDAC – inibidores de histona desacetilases

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

JAK/STAT – quinase Janus/transdutor de sinal e ativador de transcrição (do inglês, *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*)

LOH – perda de heterozigose (do inglês, *loss of heterozygosity*)

MAPK – proteínas quinase ativadas por mitógenos (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*)

MEC – matriz extracelular

MGMT – O-6-metilguanina-DNA metiltransferase

miRNA – micro RNA

MMP – metaloproteinases de matriz (do inglês, *matrix metalloproteinase*)

MMR – reparo de mau pareamento (do inglês, *mismatch repair*)

MTIC – 5-(3-metiltriazenil)-imidazol-4-carboxamida

MT-MMPs – metaloproteinases de matriz de membrana (do inglês, *membrane-type matrix metalloproteinases*)

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

NF1 – neurofibromina 1

Nrf2 – fator nuclear eritroide 2 (do inglês, *nuclear factor erythroid 2*)

NVU – unidade neurovascular (do inglês, *neurovascular unit*)

O⁶MeG – guanina metilada na posição O⁶

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – tampão fosfato salino (do inglês, *phosphate buffer saline*)

PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês, *platelet-derived growth factor*)

p-ERK – proteína ERK fosforilada

PGE₂ – prostaglandina E₂

PGES – prostaglandina E-sintase

PI3K – quinase de 3-fosfatidilinositol (do inglês, *phosphatidylinositol-3 kinase*)

PIK3CA – subunidade catalítica alfa de PI3K (do inglês, *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*)

PP2A – proteína fosfatase 2^a (do inglês, *phosphatase protein 2A*)

PTEN – fosfatase homóloga à tensina (do inglês, *phosphatase and tensin homologue*)

qRT-PCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (do inglês, *real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*)

RECK – do inglês, *reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs*

RECKvar(3–5) – transcritos alternativos de *RECK* 3 a 5

RNA – ácido ribonucleico (do inglês, *ribonucleic acid*)

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (do inglês, *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*)

SFB – soro fetal bovino

SHH – do inglês, *sonic hedgehog*

SNC – sistema nervoso central

TIMP – inibidores teciduais de metaloproteinases (do inglês, *tissue inhibitor of metalloproteinases*)

TMZ – temozolomida

TP53 – proteína tumoral p53 (do inglês, *tumor protein p53*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 CÂNCER.....	18
2.2 SISTEMA NERVOSO CENTRAL	19
2.3 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA.....	19
2.4 GLIOMAS E GLIOBLASTOMA	20
2.4.1 Definição e características epidemiológicas	20
2.4.2 Subtipos e classificação molecular de glioblastomas.....	21
2.4.3 Mecanismos de ação e de resistência à temozolomida	21
2.5 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDAIIS NO CONTEXTO TUMORAL	24
2.6 CICLO-OXIGENASE 2 E PROSTAGLANDINA E ₂ NO CONTEXTO TUMORAL... 25	
2.7 METALOPROTEINASES DE MATRIZ.....	27
2.8 RECK	28
3. JUSTIFICATIVA	33
4. OBJETIVOS	34
4.1 OBJETIVO GERAL	34
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
5. MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1 MODELAGEM MOLECULAR.....	35
5.2 CULTIVO CELULAR.....	35
5.3 TRATAMENTOS.....	36
5.4 VIABILIDADE CELULAR.....	36
5.4.1 Determinação da atividade metabólica por redução do sal de tetrazólio (MTT)	36
5.4.2 Quantificação de células aderidas por coloração com cristal violeta (CV).....	37
5.5 FORMAÇÃO DE ESFEROIDES EM <i>HANGING DROPS</i>	37
5.6 MIGRAÇÃO CELULAR A PARTIR DE ESFEROIDES	38

5.7 EXPRESSÃO GÊNICA POR qRT-PCR.....	38
5.7.1 Extração e quantificação de RNA total.....	38
5.7.2 Síntese de cDNA.....	39
5.7.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)	39
5.8 EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOTTING.....	40
5.8.1 Extração total de proteínas	40
5.8.2 Quantificação de proteínas	41
5.8.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	41
5.8.4 Transferência e imunodeteção de proteínas.....	41
5.9 ZIMOGRAFIA EM GELATINA	42
5.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	43
6. RESULTADOS	44
6.1 SELEÇÃO DOS AINEs PARA O ESTUDO.....	44
6.2 AVALIAÇÃO CELULAR DOS EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM AAS E IBU NAS LINHAGENS U87MG E T98G	46
6.2.1 Avaliação da viabilidade celular por determinação de atividade metabólica.....	46
6.2.2 Avaliação da viabilidade celular por quantificação de células aderidas	49
6.2.3 Avaliação da capacidade de formação de esferoides em <i>hanging drops</i>	53
6.2.4 Avaliação da migração celular a partir de esferoides.....	56
6.2.5 Avaliação da viabilidade celular por determinação de atividade metabólica para a combinação de AINEs com TMZ.....	61
6.3 AVALIAÇÃO MOLECULAR DOS EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM AAS E IBU NAS LINHAGENS U87MG E T98G	68
6.3.1 Análise da expressão de mRNA de RECK, RECKvar3, RECKvar5 e MMP-2.....	68
6.3.2 Análise da expressão proteica de (p)-ERK e MMP-2	76
6.3.3 Análise da secreção e atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9.....	77
7. DISCUSSÃO	80
8. CONCLUSÕES.....	87

9. PERSPECTIVAS	88
REFERÊNCIAS.....	89
APÊNDICES	99

1. INTRODUÇÃO

Responsável por 4,2% das mortes por câncer no Brasil em 2017, os tumores que acometem o sistema nervoso central têm suas porcentagens de incidência e mortalidade aumentadas anualmente (INCA, 2017). No Brasil, a previsão realizada pelo Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) é de 625 mil novos casos para o triênio 2020-2022, dos quais 33,2 mil (5,3%) corresponderiam àqueles que acometem o sistema nervoso central (INCA, 2019). Apesar de serem tumores de incidência relativamente baixa, estes contribuem de forma considerável para os índices de mortalidade no mundo, principalmente ao serem observadas as crianças e os idosos.

Dentre os tumores do sistema nervoso central que derivam de células da glia, destacam-se os astrocitomas pela elevada incidência e baixa taxa de sobrevida associada. Denominadas glioblastomas (GBs) em seu maior grau de agressividade, tais neoplasias são as mais frequentes e correlacionam-se a uma sobrevida média após o diagnóstico de 16 meses, recebendo o tratamento convencional (THAKKAR *et al.*, 2014).

O regime terapêutico atual para GB compreende a remoção cirúrgica, quando possível, seguida de radioterapia e quimioterapia. Nesta última abordagem, realiza-se o tratamento com temozolomida TMZ, um agente alquilante que insere grupamentos metil em unidades de adenina e guanina e exerce efeito terapêutico ao formar adutos que impedem a replicação do material genético, levam à quebra da dupla-fita de DNA e induzem morte por apoptose (ZHANG; STEVENS; BRADSHAW, 2012). No entanto, diversos mecanismos de resistência intrínseca e adquirida à TMZ já são conhecidos, dentre os quais podem ser citados a atividade de MGMT; a ação de complexos enzimáticos envolvidos no reparo do DNA e alterações em diversas vias de sinalização intracelular (ULASOV *et al.*, 2011; TAN *et al.*, 2018; TOMAR; PATIL; SOMASUNDARAM, 2019). Ao nível de microambiente tumoral, é igualmente necessário destacar a presença de células-tronco de glioma junto à população celular heterogênea que compõe o tumor. Tal subpopulação celular é caracterizada pela presença do marcador de membrana CD133 e apresenta elevadas capacidades de reparo do DNA, de autorrenovação e de resistência à morte celular por apoptose – características relacionadas a uma maior agressividade e uma menor responsividade às intervenções quimio- e radioterápicas (GAO *et al.*, 2017; JIAPAER *et al.*, 2018; ZUCCARINI *et al.*, 2018). Em conjunto, tais constatações evidenciam a necessidade da busca por fármacos adjuvantes ao tratamento.

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) recebem destaque nesse sentido por apresentarem atividades anti-angiogênica e anti-metastática, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, as quais relacionam-se, principalmente, à modulação da produção de prostaglandinas e outros mediadores inflamatórios pró-tumorais. A aspirina é o representante desta classe de fármacos mais estudado e sabe-se que esta pode atuar na modulação de diferentes vias de sinalização intracelular; na modulação da expressão de RECK, ainda que por mecanismos não totalmente elucidados; e na sensibilização ao tratamento quimioterápico (LIU *et al.*, 2002; MING *et al.*, 2017; NAVONE *et al.*, 2018). Apesar de figurar em estudos de indução da expressão de RECK e sensibilização a quimioterápicos, propriedades físico-químicas e estruturais da aspirina sugerem uma baixa capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e, portanto, de atuar de forma efetiva no tratamento de glioblastoma.

A glicoproteína RECK, forma canônica codificada pelo gene supressor de tumor *RECK*, pertence à família de inibidores de metaloproteinases de matriz e apresenta caráter antitumoral por inibir processos de invasão, migração e angiogênese em células cancerosas, incluindo gliomas. No entanto, variantes de RECK produzidas por *splicing* alternativo (RECKvar3, RECKvar4 e RECKvar5) correlacionam-se a fenótipos de agressividade e resistência ao tratamento opostos ao da proteína canônica (TROMBETTA-LIMA *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2018; LEE; BOSOMPRA; COLLER, 2019). Tais evidências apontam para o fato de que o balanço entre a expressão das diferentes variantes de RECK desempenha um importante papel na agressividade tumoral e, portanto, os mecanismos de indução de expressão de tal gene devem levar em consideração a extensão com que cada variante é produzida.

Dessa maneira, entende-se que são necessários estudos que investiguem com qual extensão os diferentes transcritos de RECK são expressos mediante o tratamento com AINEs, bem como os efeitos de tal modulação na sensibilização ao tratamento quimioterápico e em outros fenótipos relevantes ao contexto tumoral em linhagens de GB, levando em consideração a escolha de fármacos adequados a este modelo experimental.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER

O câncer compreende um conjunto de neoplasias clinicamente heterogêneas que compartilham entre si o crescimento celular desordenado e o potencial metastático (INCA, 2017). Em nível celular destacam-se algumas características comuns já bem conhecidas, a exemplo de sinalização proliferativa autossustentável, evasão de sinais de parada do crescimento e de morte celular, imortalidade replicativa e elevada plasticidade fenotípica (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN, 2022). Tais características são adquiridas em várias etapas durante a tumorigênese através de vias específicas para cada tipo tumoral e permitem que as células cancerosas proliferem, sobrevivam e se disseminem. Atualmente, entende-se que o desenvolvimento de tais características é possibilitado, principalmente, pela elevada instabilidade genômica, bem como pelo estado inflamatório observado em lesões pré-malignas e no microambiente tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A despeito dos avanços diários feitos na área de pesquisa básica e aplicada ao câncer, os índices de incidência e mortalidade ao redor do mundo demonstram permanecer em ascensão. A Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou um total de 18,1 milhões de casos de câncer e 9,5 milhões de mortes causadas por câncer no ano de 2018 em nível mundial (WHO, 2020). É válido ressaltar, porém, que tais valores velam recortes relacionados com a economia, a produção científica e a adoção de políticas de saúde públicas de determinada localidade: enquanto o continente africano apresentou uma razão de mortalidade por novos casos de câncer igual a 0,66, nas Américas este valor correspondeu a 0,36 (WHO, 2020).

Apesar de o estilo de vida e de fatores ambientais serem relevantes no contexto de desenvolvimento tumoral, o conhecimento mais aprofundado dos efeitos de mutações genética de um indivíduo, bem como de modulações de caráter epigenético, tem se mostrado de vital importância para o entendimento da biologia tumoral. Tais processos podem ser altamente específicos de um indivíduo, ou ainda, compartilhados por alguns tipos tumorais definidos: mutações no gene *TP53* são comuns em tumores humanos, mutações em *BRCA1* e *BRCA2* são observadas principalmente em câncer gástrico, pancreático, de endométrio e de mama, enquanto mutações em *PTEN* e *PIK3CA* são observadas em câncer de pulmão, tireoide e gliomas (MARTINCORENA; CAMPBELL.,

2015). Em glioblastomas, os principais marcadores são o receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*), proteína tumoral 53 (*p53*), isocitrato desidrogenase 1 (*IDH1*), neurofibromina 1 (*NF1*) e fosfatase homóloga à tensina (*PTEN*) (MUIR, *et al.*, 2020).

2.2 SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O sistema nervoso central é formado pela medula espinhal e pelo encéfalo, que engloba o cérebro, o cerebelo e o tronco encefálico. Tais estruturas são compostas majoritariamente por neurônios e pelas células da glia, as quais dividem-se em oligodendrócitos (especializadas na produção de mielina), micróglia (macrófagos residentes do SNC), ependimócitos (células de revestimento) e astrócitos (GIOVANNONI; QUINTANA, 2020).

Os astrócitos são as células mais abundantes e, por muito tempo, foram vistos como um tipo celular cuja função era limitada ao suporte sináptico e à orientação axonal. No entanto, sabe-se hoje que os astrócitos desempenham importantes funções no neurodesenvolvimento e na homeostase do SNC, a exemplo de manutenção da integridade da barreira hematoencefálica, controle do fluxo sanguíneo, regulação da maturação de oligodendrócitos e proteção de neurônios contra danos oxidativos, além de serem fontes de fatores neurotróficos (BLACKBURN *et al.*, 2009; HART; KARIMI-ABDOLREZAEI, 2021).

2.3 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

A barreira hematoencefálica (BHE) corresponde ao componente de comunicação entre a circulação sanguínea e o sistema nervoso central, atuando diretamente na manutenção da homeostase deste. Originalmente, foi conceitualizada como uma estrutura composta por células endoteliais microvasculares, envoltas por uma lâmina basal especializada, com uma notável seletividade em sua absorção. Tal funcionalidade deriva da restrição do transporte paracelular pela presença de proteínas de junção oclusiva, bem como da regulação do transporte transcelular pela ação de transportadores específicos para o influxo de substâncias necessárias ao metabolismo glial e neuronal, além de uma grande quantidade de transportadores ativos de efluxo e de enzimas que atuam diretamente na degradação de diversas classes de substâncias (DANEMAN, PRAT, 2015). Nesse cenário, as substâncias de caráter mais lipofílico podem permear por difusão

passiva através da membrana, sendo essa uma característica fundamental para a atuação de fármacos no SNC (NOVAKOVA *et al.*, 2014).

Atualmente, compreende-se que a formação e o correto funcionamento dessa barreira dependem, ainda, da interação das células endoteliais com micróglia e pericitos, bem como com terminações neuronais e astrocitárias, o que levou à definição do conceito de unidade neurovascular (NVU, do inglês, *neurovascular unit*) (ARVANITIS; FERRARO; JAIN. 2020).

2.4 GLIOMAS E GLIOBLASTOMA

2.4.1 Definição e características epidemiológicas

Advém da última edição da obra “*The Cancer Atlas*” a estimativa do aumento de 2,9 milhões de casos de tumores no sistema nervoso central em 2018 para 4,6 milhões até 2040, representando uma elevação de aproximadamente 60% no cenário mundial (ACS, 2019). No Brasil, a previsão realizada pelo Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) para o triênio 2020-2022 é de 625 mil novos casos, dos quais 33,2 mil (5,3%) corresponderiam àqueles que acometem o SNC (INCA, 2019). Apesar de serem tumores de incidência relativamente baixa, sabe-se que contribuem de forma considerável para os índices de mortalidade no mundo, principalmente ao serem observadas crianças e idosos (INCA, 2017).

Tumores derivados de células da glia são coletivamente chamados de gliomas e correspondem a cerca de 75% de todos os tumores do SNC (THAKKAR *et al.*, 2014). Ao acometerem os astrócitos, denominam-se astrocitomas e podem ser classificados em uma escala crescente de grau de malignidade, através de critérios histológicos, em astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III) e o glioblastoma (grau IV) (CUNLIFFE *et al.*, 2010). Os tumores de grau IV são os mais frequentes e caracterizam-se pelo elevado potencial proliferativo e invasivo, bem como pela alta heterogeneidade intratumoral (RAJESH *et al.*, 2017).

Pacientes diagnosticados com GB são, em sua maioria, crianças de até 14 anos e idosos acima de 70 anos, com razão de masculinidade de aproximadamente 1,3 e apresentam uma taxa de sobrevida média de apenas 17 semanas (sem tratamento) a 16 meses (após tratamento convencional) (INCA, 2017; THAKKAR *et al.*, 2014).

2.4.2 Subtipos e classificação molecular de glioblastomas

Os glioblastomas podem ser classificados como primários, quando não há evidência de lesão maligna precursora (desenvolvimento *de novo*), ou secundários, quando são originados a partir de um astrocitoma de baixo grau de malignidade. Para além das diferenças clínicas e epidemiológicas, são atualmente conhecidas distinções genéticas e no perfil de expressão entre tais classes. Glioblastomas primários comumente apresentam amplificação do receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*), mutações em *PTEN* e maiores níveis de expressão de MMP-9; glioblastomas secundários possuem maiores níveis de mutação em *p53* e expressão de PDGF, perda de *TIMP-3*, metilação do promotor de *MGMT* e ambas as classes apresentam perda de heterozigose no cromossomo 10 (LOH 10q) (OHGAKI; KLEIHUES, 2007).

Outro importante trabalho para o entendimento desse modelo foi publicado por Verhaak e colaboradores, no qual foram definidos quatro subtipos de glioblastoma, através de uma classificação molecular baseada em dados de genômica e transcriptômica, com diferentes sensibilidades à terapia e prognósticos associados (VERHAAK *et al.*, 2010). O subtipo clássico assemelha-se ao glioblastoma primário: apresenta baixos níveis de mutação em *p53*, *EGFR* encontra-se amplificado, além de expressar um mutante constitutivamente ativo desse receptor (*EGFRviii*), correlacionando-se ao pior prognóstico. O subtipo mesenquimal, também de prognóstico ruim, possui deleção de *PTEN*, mutações em *NF1* e maior expressão de genes relacionados à inflamação e necrose. O subtipo pró-neural apresenta mutações em *IDH1* e características de glioblastoma secundário (expressão de PDGF e altos níveis de mutação em *p53*) e possui um melhor prognóstico, enquanto o subtipo neural expressa marcadores neuronais e possui uma baixa correlação com a sobrevida de pacientes.

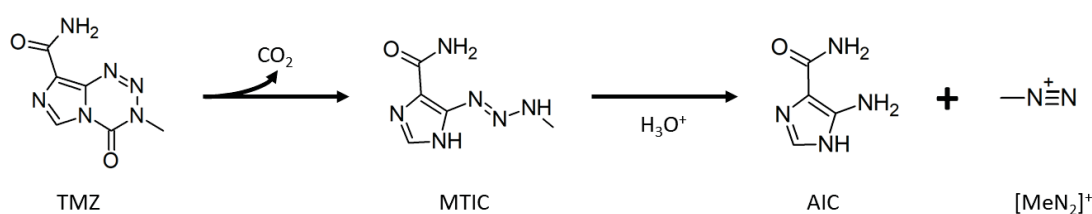
2.4.3 Mecanismos de ação e de resistência à temozolomida

O regime terapêutico padrão para a maioria dos tipos tumorais inclui a ressecção cirúrgica, quando possível, seguida de radioterapia e quimioterapia adjuvantes. No entanto, devido à natureza altamente invasiva e difusa dos glioblastomas, a remoção cirúrgica apresenta inúmeras limitações e costuma ter a finalidade de reduzir os sintomas e aumentar a eficácia terapêutica, através de um diagnóstico mais preciso (AHMADLOO *et al.*, 2013). A radioterapia, por não apresentar potencial curativo isoladamente, é

empregada apenas em combinação ao tratamento quimioterápico. E a quimioterapia, por sua vez, é limitada aos poucos fármacos capazes de atravessar a barreira hematoencefálica.

Nesse cenário, o tratamento atual para GB consiste em administração de temozolomida (TMZ), um pró-fármaco que, em condições fisiológicas, é hidrolisado em duas etapas ao cátion metildiazônio – espécie passível de ataque por centros nucleofílicos presentes no DNA (FIGURA 1). A TMZ caracteriza-se, portanto, como um agente alquilante, inserindo grupamentos metil majoritariamente nas posições N⁷ e O⁶ da guanina e N³ da adenina.

FIGURA 1: Estrutura e mecanismo de ativação da temozolomida (TMZ)



Fonte: O autor.

Nota: Após a sua absorção, observa-se a descarboxilação espontânea da temozolomida (TMZ), levando à formação do intermediário 5-(3-metiltriazenil)-imidazol-4-carboxamida (MTIC). O grupo triazeno, lábil em condições fisiológicas, é rapidamente hidrolisado, formando 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) e o cátion altamente reativo metildiazônio ([MeN₂]⁺).

Apesar de serem as mais abundantes, as *N*-metilações (inserções em N⁷-MeG e N³-MeA), que juntas respondem por 79% das metilações em ácidos nucleicos, são rapidamente corrigidas pelo reparo por excisão de bases (BER, do inglês, *base excision repair*) (ZHANG; STEVENS; BRADSHAW, 2012). De maneira contraintuitiva, a atividade antitumoral da TMZ é decorrente da formação da lesão menos abundante O⁶-metilguanina (O⁶MeG) e requer a maquinaria de reparo de mau-pareamento (MMR, do inglês, *mismatch repair*) ativa. A explicação para isso é dada pelo fato de a guanina O⁶-metilada ser erroneamente pareada com a timina na fita recém-sintetizada durante a replicação, ativando a via de MMR que prontamente faz a excisão da timina. No momento da ressíntese do trecho de DNA a ser corrigido, uma nova timina é incorporada na mesma posição e, dessa maneira, ciclos fúteis de excisão e reinserção são desencadeados e levam ao colapso da forquilha de replicação e a quebras de duplas fitas no DNA, culminando na parada do ciclo celular em G2/M e indução de apoptose (LEE, 2016; STROBEL *et al.*, 2019).

Diversos mecanismos de resistência intrínseca e adquirida à ação desse fármaco, no entanto, já são conhecidos. Dentre eles, destaca-se a expressão da enzima O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT), a qual remove os grupamentos metil inseridos pela temozolomida, reparando, assim, a lesão O⁶MeG. Uma maior expressão de MGMT estará relacionada a uma baixa responsividade ao tratamento com agentes alquilantes e, em virtude disso, o nível de metilação do promotor de *MGMT* caracteriza-se como um importante marcador para o prognóstico de pacientes com GB. Tal correlação foi evidenciada pelo trabalho de Hegi e colaboradores, o qual revelou uma sobrevida média de 21,7 meses em pacientes com silenciamento de MGMT, via metilação do promotor, comparada a uma sobrevida de 15,3 meses em pacientes com expressão de MGMT após o tratamento combinado de TMZ e radioterapia (HEGI *et al.*, 2005).

Os mecanismos de resistência à TMZ são, no entanto, bem mais complexos e podem envolver ainda alterações em diversas vias de sinalização intracelular, tais como SHH, JAK/STAT, PI3K/Akt, Wnt/ β -catenina, e Notch (CARBALLO *et al.*, 2020; KOHSAKA *et al.*, 2012; ULASOV *et al.*, 2011; TAN *et al.*, 2018; TOMAR; PATIL; SOMASUNDARAM, 2019); bem como modificações epigenéticas, a exemplo de alterações no perfil de acetilação de histonas, e a expressão de RNAs regulatórios (CHEN; CHEN; ZHAO, 2020; KIM *et al.*, 2019; SHI *et al.*, 2012; STATBERG *et al.*, 2017). Por fim, ao nível de microambiente tumoral, é igualmente necessário destacar a presença de células-tronco de glioma (GSCs, do inglês, *glioma stem cells*) junto à população celular heterogênea que compõe o tumor. Tal subpopulação celular é caracterizada pela presença de alguns marcadores de membrana, como CD44, CD133, SOX-2, Oct4 e nestina, e apresenta elevada expressão de transportadores de efluxo de drogas, alta capacidade de reparo do DNA e de resistência à morte celular, assim como de autorrenovação e de quiescência – características relacionadas a uma maior agressividade, menor responsividade às intervenções quimio- e radioterápicas e maior reincidência tumoral (BAO *et al.*, 2006; BLEAU *et al.*, 2009; CHEN, J. *et al.*, 2012; ORZAN *et al.*, 2017).

Em conjunto, tais constatações evidenciam a necessidade da busca por fármacos adjuvantes ao tratamento capazes de, em alguma extensão, evadir ou antagonizar tais mecanismos de resistência, e cujas características físico-químicas sejam adequadas à atuação no SNC.

2.5 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDAIIS NO CONTEXTO TUMORAL

A elevada expressão em diversos tipos tumorais de COX-2, alvo farmacológico dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), conferiu especial atenção a esta classe de fármacos, cujas atividades de supressão da proliferação celular, indução à apoptose e repressão da angiogênese já foram demonstradas tanto *in vitro* como *in vivo* (HUNG, 2008; LEIDGENS *et al.*, 2015).

Certamente, um dos anti-inflamatórios não-esteroidais mais conhecidos é a aspirina, ou ácido acetilsalicílico (AAS), cuja atividade antitumoral é alvo de investigação há muitos anos e serve de modelo para a classe (ZHANG *et al.*, 2019). Na linhagem de glioma humano H4, por exemplo, observou-se que o tratamento com aspirina promoveu maiores níveis de estresse de retículo endoplasmático e de Noxa, ativando a via intrínseca da apoptose (CHANG *et al.*, 2020a). Ainda, estudos feitos com células endoteliais de culturas primárias de glioma e com linhagens de GB revelaram o potencial de sensibilização da aspirina ao tratamento com diferentes agentes quimioterápicos, como temozolomida, bevacizumabe e sunitinibe através de modulações de vias como SHH/GLI1, MAPK/ERK e PI3K/Akt (MING *et al.*, 2017; NAVONE *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, um número crescente de publicações tem evidenciado a atividade antitumoral de outros AINEs. Em linhagens de GB, a indometacina demonstrou capacidade de aumentar os níveis de estresse de retículo endoplasmático e induzir apoptose via ceramida/PP2A/Akt (CHANG *et al.*, 2018; CHANG *et al.*, 2020b). O diclofenaco, por sua vez, mostrou-se capaz de inibir os processos de proliferação e migração *in vitro*, usando linhagens de GB e culturas primárias de GSCs, e alterar parâmetros metabólicos, indicados por mudanças no consumo de oxigênio e pelos níveis de lactato extracelular (LEIDGENS *et al.*, 2015; GERTHOFER *et al.*, 2018). Por fim, o tratamento com ibuprofeno ocasionou redução em parâmetros indicativos de proliferação e migração *in vitro*, bem como a capacidade de induzir a morte celular por ferroptose através da inibição de Nrf2 (LEIDGENS *et al.*, 2015; GAO *et al.*, 2020).

Apesar de alguns mecanismos independentes de COX serem descritos, defende-se que a atividade antitumoral de AINEs esteja relacionada principalmente à inibição de COX-2 e, portanto, da produção de prostaglandinas e outros mediadores inflamatórios pró-tumorais (GURPINAR; GRIZZLE; PIAZZA, 2013).

2.6 CICLO-OXIGENASE 2 E PROSTAGLANDINA E₂ NO CONTEXTO TUMORAL

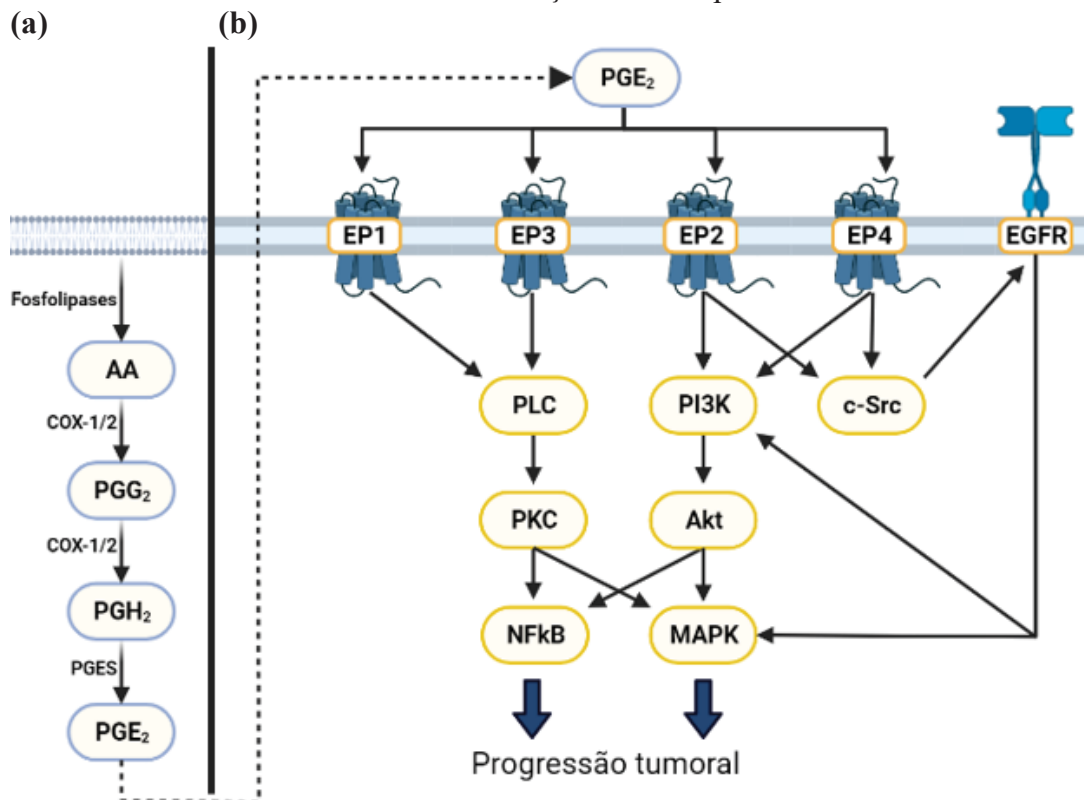
Ciclo-oxigenases (COX-1/-2) são proteínas homodiméricas integrais de membrana, localizadas principalmente na região luminal do retículo endoplasmático e no envelope nuclear e, em humanos, são codificados pelos genes *Ptgs1/2*. Sabe-se hoje que a COX-2, geralmente entendida como uma isoforma induzível por citocinas, possui expressão constitutiva no SNC (PATRIGNANI *et al.*, 2005; KIRKBY *et al.*, 2016). Estas enzimas bifuncionais catalisam duas reações sequenciais coordenadas em sítios ativos espacialmente distintos. Inicialmente, através da atividade de ciclo-oxigenase, catalisam a dupla dioxigenação do ácido araquidônico para formação de prostaglandina G₂ (PGG₂), seguida da redução do grupamento hidroperóxido para a formação de prostaglandina H₂ (PGH₂) (BLOBAUM; MARNETT, 2007).

Em diversos tipos de câncer, observa-se ainda a sua superexpressão ao ser feita a comparação com tecidos saudáveis adjacentes. Em biópsias de GB, observou-se um aumento da expressão de COX-2 ao partir das bordas em direção a regiões mais centrais de tumores sólidos, indicando que a hipóxia pode ser um importante fator para a sua regulação (SMINIA *et al.*, 2005). Ainda em modelos de GB humano, maiores níveis de expressão de COX-2 são explicados, principalmente, pela ativação de EGFR e consequente sinalização através da via p38/PKC- δ /Sp1/*Ptgs2*, bem como pela redução dos níveis de reguladores negativos de sua expressão, a exemplo de miR-137 (CHEN, L. *et al.*, 2012; XU; SHU, 2007; XU *et al.*, 2009).

O produto da reação catalisada por COX-2, a PGH₂, é um intermediário de vida curta e serve como substrato para a síntese de diferentes eicosanoides, a qual ocorre de maneira tecido-específica, tanto em processos fisiológicos como patológicos (MENTER e DUBOIS, 2012). Em um contexto inflamatório e em tecidos tumorais, a elevada expressão de COX-2 e da prostaglandina E sintase microssomal (mPGES-1) contribuem para a observação de elevados níveis de prostaglandina E₂ (PGE₂). Uma vez sintetizados, estes prostanoides são exportados para o espaço extracelular pela ação de proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas (MRPs, do inglês, *multidrug resistance proteins*). Em se tratando da PGE₂, sabe-se que tal molécula atua por sinalização autócrina e parácrina através de sua ligação a qualquer um de seus quatro receptores acoplados à proteína G (EP1-4). Sabe-se, ainda, que a ligação de PGE₂ à EP1, EP2 ou EP4 é capaz de transativar o receptor EGFR e, conseqüentemente, atuar através de vias como

MAPK/ERK e PI3K/Akt/NF- κ B, sabidamente envolvidas com processos de proliferação celular (CHATTERJEE *et al.*, 2018; OLIVER; OLIVIER; VALLETTE, 2016).

FIGURA 2: Biossíntese e vias de sinalização ativadas por PGE₂



Fonte: O autor. Adaptado de Jiang *et al.*, 2017.

Nota: (a) A biossíntese de prostaglandina E₂ (PGE₂) necessita da liberação de ácido araquidônico (AA) esterificado na forma de fosfolípidos, mediante a ação de fosfolipases. As isoformas 1 e 2 de ciclooxigenases (COX-1/2) catalisam a conversão de AA à prostaglandina G₂ (PGG₂) e, sequencialmente, à prostaglandina H₂ (PGH₂). Esta última serve de substrato para diferentes prostaglandinas E-sintases (PGES), finalizando a síntese de PGE₂, a qual é liberada para o espaço extracelular. (b) PGE₂ é reconhecida por diferentes receptores de membrana (EP1–4) acoplados à proteína G. A ligação a esses receptores promove a ativação de diversas vias de sinalização intracelulares, a exemplo de PLC/PKC, PI3K/Akt/NF- κ B e MAPK, as quais são interconectadas. Mediante a sinalização via c-Src por EP1 (não mostrado), EP2 e EP4, pode ocorrer ainda a transativação de alvos da sinalização de EGFR.

Interessantemente, PGE₂ parece estar relacionada com a sobrevivência celular *in vitro* e a reincidência de tumores *in vivo* após serem submetidos à radioterapia, através de um mecanismo intitulado “*phoenix rising*” (HUANG *et al.*, 2011). Tal constatação sugeriu a relação de PGE₂ com células-tronco tumorais (CSCs, do inglês, *cancer stem cells*), a qual foi observada em modelos de câncer de mama e colorretal, nos quais observou-se a coexpressão de COX-2 e marcadores de CSCs como CD44, CD133, SOX-2 e Oct3/4 (SINGH *et al.*, 2011; MAJUMDER *et al.*, 2014; WANG, D. *et al.*, 2015).

Uma característica marcante de CSCs é a habilidade de formar colônias na forma de esferoides em condições de cultura com meio definido, ideais para a proliferação de células indiferenciadas. Em concordância, constatou-se que células que superexpressam COX-2 possuem maiores níveis de Oct4, bem como maiores capacidade de formação de esferoides e clonogenicidade do que aquelas com baixa expressão dessa enzima, empregando modelos de câncer de nasofaringe e de mama (SINGH *et al.*, 2011; LIAO *et al.*, 2015).

Em modelo de glioma humano, observou-se que CSCs possuem uma maior expressão de COX-2, a qual correlaciona-se com a radiorresistência. A inibição de COX-2, por sua vez, promoveu a sensibilização ao tratamento e suprimiu a expressão de genes relacionados à angiogênese e a células-tronco (MA *et al.*, 2011). Utilizando linhagens de GB, constatou-se que o cultivo celular da linhagem de glioblastoma U87MG em meio definido foi responsável pelo aumento na expressão de COX-2 em células CD133⁺ (ANNABI *et al.*, 2009). Ademais, o tratamento com um inibidor seletivo de COX-2, denominado NS-398, em linhagens de GB reduziu a capacidade de formação de neuroesferas (PALUMBO *et al.*, 2020).

Por fim, a prostaglandina E₂ promove a migração e invasão de células tumorais (ITO *et al.*, 2004; BUCHANAN *et al.*, 2006). Dentre os principais mecanismos que fundamentam essa observação, está a capacidade de PGE₂ de modular a expressão e atividade de metaloproteinases de matriz em diversos modelos celulares (PAVLOVIC *et al.*, 2005; ITATSU *et al.*, 2009; HSU *et al.*, 2011; YEN *et al.*, 2011).

2.7 METALOPROTEINASES DE MATRIZ

As metaloproteinases de matriz (MMPs, do inglês, *matrix metalloproteinases*) constituem uma família de 23 proteases dependentes de zinco que, mediante processos de secreção e ativação, atuam no remodelamento da matriz extracelular (MEC) pela degradação de seus principais componentes: colágeno, gelatina, proteoglicanos, fibronectina, laminina, entre outros (DANNEMAN, PRAT, 2015; ROSENBERG, 2015). Apesar de alguns membros desta classe possuírem uma certa especificidade quanto ao substrato, os espectros de ação destas proteases podem ser sobreponíveis. As MMPs podem ser solúveis ou possuir domínios transmembrana (MT-MMPs, do inglês, *membrane-type matrix metalloproteinases*) e geralmente são produzidas e secretadas na

forma de zimogênio, cuja clivagem é responsável pela conversão à forma ativa dessas proteases (NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006).

Tais enzimas encontram-se envolvidas em diversos processos fisiológicos, como angiogênese, embriogênese, e cicatrização, assim como em condições patológicas, sendo as doenças cardiovasculares, distúrbios fibróticos e câncer os exemplos mais comuns (CUI; HU; KHALIL, 2017). Nesse último caso, sabe-se que MMPs são intensamente secretadas por células cancerosas e estromais adjacentes, contribuindo não somente para o processo metastático, mas também favorecendo a proliferação e progressão tumoral, ao disponibilizar fatores de crescimento anteriormente envolvidos pela MEC (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010). Existe, portanto, a necessidade de regular finamente a expressão e a atividade das MMPs. Tal regulação ocorre principalmente nos níveis transcricional e pós-traducional, sendo válido ainda ressaltar o envolvimento de inibidores endógenos como α -macroglobulina, os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP, do inglês, *tissue inhibitor of metalloproteinases*) e a proteína RECK (CLARK, 2008; GONZALEZ-AVILA, 2019).

2.8 RECK

Dentre os inibidores fisiológicos das MMPs e reconhecido biomarcador na clínica, encontra-se o gene *RECK* (do inglês, *REversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs*), inicialmente descrito por Takahashi e colaboradores como um supressor de tumor em função de sua capacidade de reverter o fenótipo tumoral desenvolvido pelo oncogene *v-Ki-Ras* (TAKAHASHI *et al.*, 1998). Seu produto de tradução, uma glicoproteína extracelular de mesmo nome, é ancorada por glicosilfosfatidilinositol (GPI) em sua extremidade carboxiterminal em microdomínios específicos da membrana plasmática, sendo esta localização essencial para que desempenhe suas funções (MIKI *et al.*, 2007).

Atualmente, somente a região contendo os domínios ricos em cisteína (CC) de RECK foi cristalizada e teve a estrutura resolvida, de forma que tais informações para a proteína inteira ainda se encontram indisponíveis (CHANG *et al.*, 2020). São, no entanto, preditos domínios semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF) e a inibidores de serina-protease (SPI), ainda que tal atividade nunca tenha sido observada (TROMBETTA-LIMA *et al.*, 2015) (FIGURA 3). Recentemente, o programa de inteligência artificial AlphaFold® realizou uma predição da estrutura de RECK, cujo

modelo apresentou confiança superior a 70% ao longo de praticamente toda a cadeia polipeptídica, com exceção das extremidades C- e N-terminais (JUMPER *et al.*, 2021; VARADI *et al.*, 2022; Identificador: AF-O95980-F1). Entende-se que a elucidação estrutural completa de RECK possibilitará novos entendimentos acerca de seus mecanismos de ação.

FIGURA 3: Domínios preditos para a proteína RECK canônica

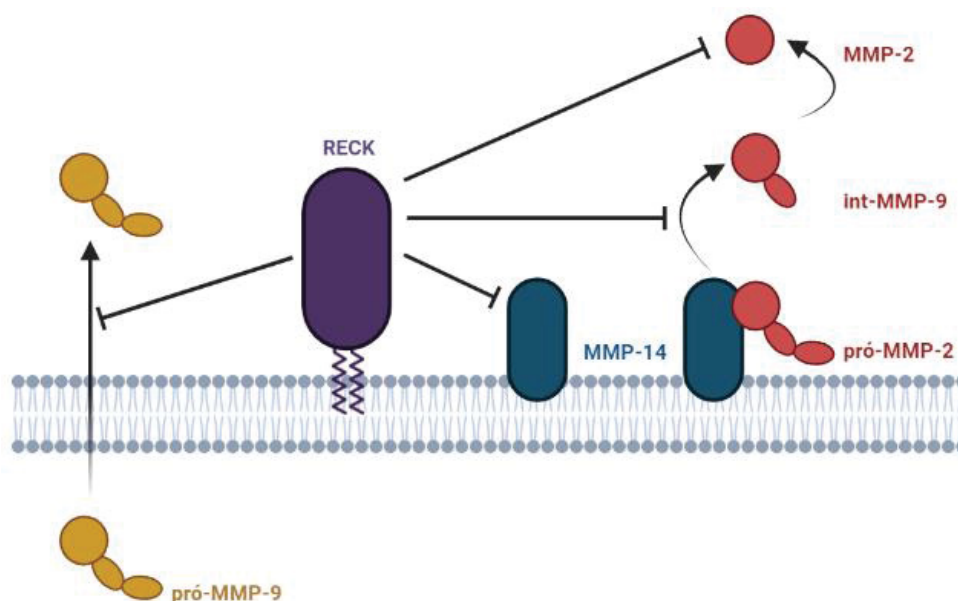


Fonte: O autor. Adaptado de Takahashi *et al.*, 1998.

Nota: Através da sequência da proteína RECK canônica, que apresenta 971 aminoácidos, são preditos domínios ricos em cisteína (CC), domínio do tipo fator de crescimento epidérmico (EGF), domínio tipo inibidor de serina-protease (SPI), bem como a sequência peptídica para ancoramento por glicosilfosfatidilinositol (GPI) na porção C-terminal e a ocorrência de uma região altamente hidrofóbica na porção N-terminal.

Sabe-se, no entanto, que RECK antagoniza a ação da MMP-9 ao inibir a secreção de sua pró-forma, além de impedir o processamento proteolítico da pró-MMP-2, inibir a atividade catalítica da MMP-14 (ou MT1-MMP) e promover seu sequestro para o interior da célula (FIGURA 4) (TAKAHASHI *et al.*, 1998; OH *et al.*, 2001). Desempenha, ainda, um importante papel na especificidade da sinalização de Wnt/ β -catenina, essencial para a homeostase da barreira hematoencefálica e para a angiogênese no SNC (CHO; SMALLWOOD, NATHANS, 2017; CHO *et al.*, 2019; VALLON *et al.*, 2018).

FIGURA 4: Regulação da atividade de MMPs pela proteína RECK canônica



Fonte: O autor. Adaptado de Oh *et al.*, 2001.

Nota: Dentre os mecanismos de inibição de MMPs por RECK, são representados a inibição da secreção de pró-MMP-9, inibição da atividade de MMP-2 e MMP-14, bem como da ativação proteolítica de MMP-2.

Quando comparado a tecidos saudáveis, *RECK* apresenta uma menor expressão em tecidos tumorais e correlaciona-se negativamente com a agressividade em diversos tipos de neoplasias, como gliomas, hepatocarcinomas, além de cânceres de pulmão, intestino, próstata e estômago (GABRIELY *et al.*, 2008; TAKENAKA *et al.*, 2004). O mecanismo de redução da expressão de *RECK* é multifatorial, tumor-específico e parece envolver uma fina regulação da ligação de Sp1 em diferentes sítios ao longo deste gene. Sasahara e colaboradores observaram dois sítios de ligação a Sp1 no “promotor mínimo” de *RECK* (ou seja, a região mínima necessária para promover a sua expressão), denominados Sp1(A), localizado entre -15 e -26, e Sp1(B), localizado entre +25 e +36 (SASAHARA; TAKAHASHI; NODA, 1999). Sabe-se que o oncogene *Ras* reduz a expressão de *RECK* em fibroblastos murinos e que esta repressão envolve a modificação da ligação ao sítio Sp1(B), ainda que o mecanismo exato por detrás dessa observação não seja conhecido (SASAHARA *et al.*, 2002). Ademais, observou-se que a ligação de Sp1 ao sítio localizado entre -71 e -82 da região promotora de *RECK* é favorecida após sua fosforilação em Thr⁴⁵³ e Thr⁷³⁹, mediada por ERK, em modelo de glioblastoma murino (HSU; CHANG; HUNG, 2006). Reforça a complexidade dessa regulação a constatação de que a ativação de ERK promove também a fosforilação em Ser²¹ da histona metiltransferase EZH2, o aumento de H3K27me3 na região promotora de *RECK* e, conseqüentemente, a redução de sua

expressão (NING; MA, 2018). São conhecidos ainda outros mecanismos de regulação epigenética, seja por metilação do promotor ou por desacetilação de histonas, bem como mecanismos pós-transcricionais, a exemplo da atuação do micro-RNA 21 (CHANG *et al.*, 2006; HAN *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2010). A compreensão de tais mecanismos de regulação tem possibilitado a proposição de novas estratégias terapêuticas baseadas na indução ou restabelecimento da expressão de *RECK* em modelos tumorais.

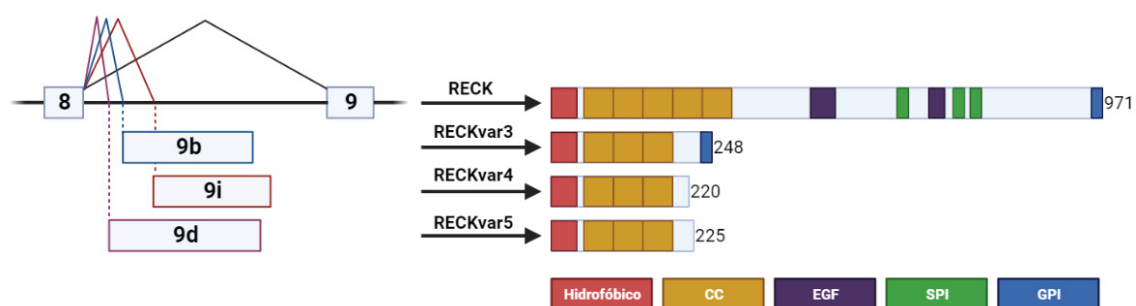
Duas são as classes de fármacos descritas como capazes de promover a expressão de *RECK*: inibidores de histona deacetilase (iHDAC) e anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs). Apesar da influência mais evidente dos iHDAC na expressão gênica, por modular o balanço entre cromatinas acessíveis à maquinaria de transcrição, o mecanismo de ação dos AINEs encontra-se apenas parcialmente elucidado (CHEN; TSENG, 2012).

Interessantemente, os AINEs parecem ser capazes de modular a expressão de *RECK* e de MMPs, independentemente de sua seletividade por COX-2. Pioneiros na área, Pan e colaboradores demonstraram que o tratamento da linhagem de câncer de pulmão A549 com indometacina (pouco seletivo) e NS-398 (COX-2 seletivo) foi capaz de inibir a expressão de MMP-2 ao nível transcricional via ERK/Sp1 (PAN; CHUANG; HUNG, 2001; PAN; HUNG, 2002). Ao ser realizado o tratamento com aspirina em linhagens de câncer de pulmão e colangiocarcinoma, observou-se a indução da expressão de *RECK* no nível de mRNA e proteína, inibição da atividade das MMP-2 e -9 e diminuição da fosforilação dos intermediários da via Akt/ERK/c-Jun, culminando em uma redução na capacidade invasiva (LIU *et al.*, 2002; NANWAT *et al.*, 2010). Apesar de também ter sido observado um aumento na expressão de *RECK* após o tratamento com NS-398 na linhagem CL-1, observou-se que nem a superexpressão de COX-2 ou o tratamento com PGE₂ exógena foi capaz de modular a expressão de *RECK* nesta linhagem (LIU *et al.*, 2002). Estes resultados indicam que o envolvimento de COX-2/PGE₂ na regulação de *RECK* permanece elusivo.

No entanto, tais estudos são anteriores à descrição feita por Trombetta-Lima e colaboradores de variantes de *RECK* obtidas por *splicing* alternativo na região do nono éxon (*RECKvar3*, *RECKvar4* e *RECKvar5*), as quais demonstraram estar relacionadas a fenótipos tumorais opostos ao da forma canônica. A superexpressão do transcrito *RECKvar3* em linhagens de GB resultou em um considerável aumento no crescimento independente de ancoragem e proliferação celular; a variante *RECKvar5*, por sua vez, está relacionada a maiores potenciais de migração e invasão em modelo de fibroblastos (TROMBETTA-LIMA *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2018; LEE; BOSOMPRA; COLLIER,

2019). Em pacientes com glioblastoma ou melanoma, observou-se que uma maior quantidade do transcrito canônico está correlacionada a um melhor prognóstico, enquanto a predominância de *RECKvar3* associa-se a uma menor taxa de sobrevivência (TROMBETTA-LIMA *et al.*, 2015; JACOMASSO *et al.*, 2020). Tais evidências sugerem que o balanço entre a expressão das diferentes variantes de *RECK* desempenha um importante papel na agressividade tumoral e, portanto, os mecanismos de indução de expressão de tal gene devem levar em consideração a extensão com que cada transcrito é produzido.

FIGURA 5: Representação do *splicing* alternativo de *RECK* e domínios proteicos preditos para cada transcrito



Fonte: O autor. Adaptado de Trombetta-Lima *et al.*, 2015.

Nota: O transcrito canônico de *RECK* compartilha os oito primeiros éxons com os transcritos *RECKvar3*, *RECKvar4* e *RECKvar5*. O *splicing* alternativo ocorre na região entre o oitavo e o nono éxon do transcrito canônico. Dentre os transcritos alternativos, apenas *RECKvar3* apresenta a sequência para ancoramento por GPI.

3. JUSTIFICATIVA

A baixa taxa de sobrevida dos pacientes diagnosticados com glioblastoma (GB) pode ser explicada pela natureza altamente infiltrativa e difusa dos tumores, a qual é amplamente influenciada pela ação de metaloproteinases de matriz (MMPs) no microambiente tumoral e redução da expressão de *RECK*. Somado a isto, encontram-se a limitação do regime terapêutico atual e a identificação de diversos mecanismos de resistência ao quimioterápico temozolomida (TMZ).

Nesse contexto, os anti-inflamatórios não-esteroidais despontam como potenciais candidatos adjuvantes ao tratamento por inibirem processos relevantes à progressão tumoral, através de diferentes mecanismos moleculares, bem como por sua capacidade recentemente descoberta de sensibilizar linhagens resistentes ao tratamento quimioterápico. Ainda, alguns membros desta classe farmacológica são descritos como capazes de reprimir a expressão de MMPs e induzir a expressão de *RECK*. No entanto, tais trabalhos são anteriores à descrição de variantes obtidas por *splicing* alternativo, correlacionadas a fenótipos tumorais opostos ao da proteína canônica, e utilizam fármacos cujas propriedades físico-químicas e estruturais são pouco favoráveis à passagem pela barreira hematoencefálica e não abrangem o modelo de glioblastoma.

Dessa maneira, são necessários estudos que investiguem o potencial de AINEs como possibilidade terapêutica para GB através da modulação dos diferentes transcritos de *RECK*, bem como da modulação de parâmetros relacionados à agressividade tumoral e à responsividade ao tratamento quimioterápico com TMZ, levando em consideração a escolha de fármacos adequados a este modelo experimental.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de anti-inflamatórios não-esteroidais de modular parâmetros de agressividade tumoral e responsividade ao tratamento quimioterápico com temozolomida, assim como modular a expressão do gene *RECK* em linhagens de glioblastoma humano.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar anti-inflamatórios não-esteroidais candidatos ao estudo através da predição de capacidade de passagem pela barreira hematoencefálica por modelagem molecular;
- Caracterizar o efeito dos anti-inflamatórios não-esteroidais selecionados nas linhagens de GB humano U87MG e T98G em aspectos relevantes ao contexto tumoral. Para tanto, serão avaliados parâmetros como viabilidade celular (pelo ensaio de redução de MTT e coloração com cristal violeta), capacidade de formação de esferoides (pela metodologia de *hanging drops*) e migração (migração a partir de esferoides);
- Investigar o potencial dos anti-inflamatórios não-esteroidais selecionados em modular a responsividade ao tratamento quimioterápico com temozolomida, através da avaliação de atividade metabólica (pelo ensaio de redução de MTT) em modelo de GB humano (U87MG e T98G);
- Avaliar a capacidade dos anti-inflamatórios não-esteroidais selecionados de modular a expressão dos transcritos de *RECK* e de MMP-2, por qRT-PCR em modelo de GB humano (U87MG e T98G);
- Avaliar a capacidade dos anti-inflamatórios não-esteroidais selecionados de modular a expressão de (p)-ERK e MMP-por Western blotting em modelo de GB humano (U87MG e T98G);
- Explorar o possível mecanismo de regulação dos anti-inflamatórios não-esteroidais sobre a atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 em modelo de GB humano (U87MG e T98G).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MODELAGEM MOLECULAR

O cálculo de propriedades físico-químicas relevantes para a comparação entre os AINEs candidatos ao estudo foi feito utilizando o software *HyperChem*® (v.7.1), disponível no Laboratório de Informática do Botânico (Setor de Ciências da Saúde – Campus Jardim Botânico – UFPR). Após construídos, os modelos tiveram sua geometria espacial otimizada pela metodologia de mecânica molecular, empregando o campo de força MM+. A padronização foi feita mediante a obtenção da primeira estrutura com gradiente RMS inferior a $0,1 \text{ kcal } \text{Å}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Para a obtenção das superfícies de potencial eletrostático, utilizou-se o método semiempírico, com campo de força AM1. Para redução de custo computacional, foram desconsiderados os efeitos de ionização em pH fisiológico e, portanto, os AINEs foram estudados em sua forma neutra. Após calculada a energia de *single point* (SPE), procedeu-se com o mapeamento tridimensional em isosuperfícies, utilizando malha fina e renderização Jorgensen-Salem. A densidade total de carga foi de $0,01 \text{ C m}^{-2}$, salvo em situações nas quais uma densidade maior é necessária para que não houvesse a sobreposição da superfície de átomos espacialmente próximos.

Em seguida, foram calculadas as seguintes propriedades físico-químicas e parâmetros estruturais: massa molar (MM, em g mol^{-1}), momento de dipolo (μ , em D), área superficial (A_S , em Å^2), área superficial polar (A_{SP} , em Å^2), porcentagem de área superficial polar ($\%A_{SP}$, em %) polarizabilidade (α , em Å^3), ligações rotacionáveis (LR, adimensional), sítios doadores de ligação de hidrogênio (DLH, adimensional), sítios aceptores de ligação de hidrogênio (ALH, adimensional), constante de dissociação (pKa, adimensional) e coeficiente de partição (log P, adimensional).

5.2 CULTIVO CELULAR

As linhagens celulares de GB humano T98G e U87MG foram gentilmente cedidas pela Prof.^a Dr.^a Mari C. Sogayar, do Núcleo de Terapia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (NUCEL-FMUSP). A linhagem T98G é intrinsecamente resistente à TMZ pela expressão de MGMT, apresenta mutações em p53 e é não-tumorigênica, enquanto a linhagem U87MG apresenta diminuição dos níveis de

MGMT através da metilação de seu promotor, apresenta p53 selvagem e é tumorigênica em camundongos nude (RAMÃO *et al.*, 2012; PALUMBO *et al.*, 2020).

O cultivo foi realizado em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) com alto teor de glicose (Cultilab®, D0620), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco®, #12657-029), penicilina G a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL (Gibco®, #15140-122). As células foram mantidas a 37°C em incubadora com 5% de CO₂.

5.3 TRATAMENTOS

As soluções-estoque de aspirina (AAS; Sigma®, A5376) e ibuprofeno (IBU; Sigma®, I4483) foram preparadas em etanol absoluto (EtOH; Biotec®) nas concentrações de 400 mM e 200 mM, respectivamente. A solução-estoque de temozolomida (TMZ; Sigma®, T2577) foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO; Neon®) na concentração de 100 mM e mantida ao abrigo da luz. Todas as soluções foram mantidas em alíquotas a -20°C.

5.4 VIABILIDADE CELULAR

5.4.1 Determinação da atividade metabólica por redução do sal de tetrazólio (MTT)

A avaliação do efeito dos tratamentos sobre a atividade metabólica foi realizada com base na metodologia descrita por Mosmann (MOSMANN, 1983). Para tal, as células foram plaqueadas na concentração de $4,0 \times 10^3$ células/poço em placa de 96 poços. Após o período de 24 h destinado à adesão, substituiu-se o sobrenadante por meio de cultura contendo os tratamentos correspondentes às condições experimentais, e as placas retornaram à incubadora de CO₂ pelo período indicado de cada tratamento. Decorrido o tempo de tratamento, o sobrenadante foi substituído por solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio; Sigma®, M2128) dissolvido a 0,5 mg/mL em tampão fosfato salino (PBS) e mantidas na incubadora de CO₂ ao abrigo da luz por 3 horas. Por fim, o sobrenadante foi removido e a formazana produzida foi solubilizada em DMSO (Neon®). Observada a total dissolução, procedeu-se com a determinação da absorbância em leitor de microplacas (TECAN Infinite M200®) a 570 nm. Três experimentos independentes foram realizados em quadruplicata experimental.

Os resultados foram expressos como porcentagem de células metabolicamente ativas em relação ao controle com o veículo.

5.4.2 Quantificação de células aderidas por coloração com cristal violeta (CV)

A determinação da porcentagem de células aderidas após os tratamentos foi realizada com base no ensaio de coloração com cristal violeta (KUENG *et al.*, 1989). Para tal, as células foram plaqueadas na concentração de $4,0 \times 10^3$ células/poço em placa de 96 poços. Após o período de 24 h destinado à adesão, substituiu-se o sobrenadante por meio de cultura contendo os tratamentos correspondentes às condições experimentais, e as placas retornaram à incubadora de CO₂ pelo período indicado de cada tratamento. Decorrido o tempo de tratamento, o sobrenadante foi removido, os poços foram lavados com PBS e as células foram fixadas com metanol (Biotec®) por 10 minutos. Em seguida, realizou-se a incubação das mesmas com solução de cristal violeta dissolvido a 0,2% (m/V) em etanol 2% (V/V) por 3 minutos. Descartada a solução de cristal violeta, os poços foram extensivamente lavados com PBS para remoção do corante não incorporado pelas células e, por fim, foi realizada a eluição com solução de citrato de sódio (Merck®, #6436) a 50 mM em etanol 50% (V/V). Observada a total dissolução, procedeu-se com a determinação da absorbância em leitor de microplacas a 545 nm. Três experimentos independentes foram realizados em quadruplicata experimental. Os resultados foram expressos como porcentagem de células aderidas em relação ao controle com o veículo.

5.5 FORMAÇÃO DE ESFEROIDES EM *HANGING DROPS*

A capacidade dos tratamentos de alterarem a formação de esferoides foi realizada através da metodologia de cultivo celular em *hanging drops*, padronizada em nosso laboratório (BARK, 2017). Para tal, gotas de 25 µL contendo 1×10^3 células, na ausência ou presença dos tratamentos correspondentes às condições experimentais, foram adicionadas à parte interna de tampas de placas de 100 mm, as quais foram invertidas a fim de manter as gotas suspensas no interior da placa de cultura e mantidas em incubadora de CO₂. Dessa maneira, a formação de uma estrutura tridimensional é favorecida pela ação da gravidade e da tensão superficial, permitindo que sejam estabelecidas interações célula-célula que melhor mimetizam o microambiente tumoral. Após o período de 72 h destinado à formação de esferoides, foram realizadas avaliações fenotípicas por

comparação da morfologia dos esferoides em um microscópio de luz invertida (Carl Zeiss® Axiovert 40) acoplado à câmera Zeiss Axio Cam MR®. Três experimentos independentes foram realizados em quintuplicata experimental. O software usado para análise das imagens foi o ImageJ®.

5.6 MIGRAÇÃO CELULAR A PARTIR DE ESFEROIDES

A avaliação da capacidade de migração celular a partir de esferoides em substrato aderente na presença dos tratamentos foi adaptada do trabalho de Leidgens e colaboradores, utilizando a metodologia de *hanging drops* para a formação dos esferoides (LEIDGENS *et al.*, 2015; BARK, 2017). Para tal, gotas de 25 μ L contendo 1×10^3 células suspensas em meio de cultura foram plaqueadas usando a técnica de cultivo em *hanging drops*. Após o período de 72 horas padronizado para a formação, os esferoides foram individualmente transferidos para poços de placas de 96 poços, na ausência ou presença dos tratamentos correspondentes às condições experimentais, com a ressalva de ser utilizado o meio de cultura sem SFB, a fim de evitar a influência dos resultados por efeitos de proliferação. Os poços foram registrados nos períodos de 0, 24 e 48 horas em um microscópio de luz invertida (Carl Zeiss® Axiovert 40) acoplado à câmera Zeiss Axio Cam MR®. A área coberta pelas células no substrato aderente é proporcional à migração. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata experimental. O software usado para análise das imagens foi o ImageJ®. Os resultados foram expressos como porcentagem de migração em relação ao controle com o veículo.

5.7 EXPRESSÃO GÊNICA POR qRT-PCR

5.7.1 Extração e quantificação de RNA total

Para o plaqueamento destinado à extração de RNA, foram adicionadas $1,0 \times 10^6$ células em placas de 100 mm. Após o período de 24 h destinado à adesão, substitui-se o sobrenadante por meio de cultura contendo os tratamentos correspondentes às condições experimentais, e as placas retornaram à incubadora de CO₂ pelo período de 24 horas do tratamento. Decorrido o tempo de tratamento, o sobrenadante foi recolhido para tubos de 15 mL, as placas foram lavadas com PBS, as células foram desaderidas, incubando-as a 37°C por 5 minutos em solução de tripsina, e transferidas para o tubo correspondente.

Após uma etapa de centrifugação (3000x g; 4°C; 5 minutos), o sobrenadante foi descartado, o pellet celular foi ressuspendido em PBS e transferido para microtubos de 1,5 mL. Após a obtenção do pellet celular, a extração de RNA total foi realizada através do kit Illustra™ RNA Spin Mini RNA Isolation (GE Healthcare®, 25-0500-71), seguindo as instruções do fabricante. A quantificação do RNA isolado foi feita por determinação de absorvância, utilizando o Nanodrop 2000 (Thermo-Fisher®). Para cada linhagem, foram realizados dois experimentos independentes para a extração de RNA. As amostras foram armazenadas a -80°C.

5.7.2 Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA, foi utilizado o kit ImProm II Reverse Transcriptase (Promega®, A3800), seguindo as instruções do fabricante, utilizando o termociclador PCR Agilent® (Thermo-Fisher®). O cDNA sintetizado foi diluído em 30 vezes em água ultrapura autoclavada e armazenado a -80°C.

5.7.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)

A qRT-PCR será realizada em termociclador Step One Plus (Life Technologies®), utilizando o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega®, A6001), seguindo as instruções do fabricante. Para os alvos de interesse, foram utilizados *primers* já disponíveis no laboratório, cujas eficiências de amplificação foram previamente determinadas. Informações relevantes sobre os *primers* encontram-se listadas na TABELA 1. As amostras foram analisadas em duplicata experimental para cada alvo.

Após o término da reação, os valores de *cycle threshold* (Ct) de cada quantificação foram tabelados. A normalização dos dados foi feita através da ferramenta GeNorm 3.4, levando em conta a eficiência de amplificação de cada par de *primers* e utilizando a expressão dos genes *GAPDH*, *HPRT* e *HMBS* como controle endógeno (PFAFFL, 2001; VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Os resultados foram expressos como razão da expressão de cada amostra em relação ao controle com o veículo.

TABELA 1: Sequência, concentração e eficiência de amplificação dos *primers* utilizados

Alvo	Sequência (5'-3')	Concentração	Eficiência
<i>RECK</i>	F: TGGAAAGCAATAGCTTGTTCACT R: CTTTCAGCTGTGTGGTCTTCAG	150 nm	1,942
<i>RECKvar3</i>	F: TATTGCGCCTCTATTAGTCCACAA R: CAGCTTCATCAGGAGGCCTATC	600 nm	2,093
<i>RECKvar5</i>	F: AATGAGGAACCCAACGGATATGT R: TCAGGCTCTCTTCTCATTGTTATGACT	600 nm	1,903
<i>MMP-2</i>	F: AGCTCCCGGAAAAGATTGATG R: CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT	600 nm	2,061
<i>GAPDH</i>	F: ACCCACTCCTCCACCTTTGA R: CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT	600 nm	2,037
<i>HPRT</i>	F: GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA R: TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT	150 nm	1,917
<i>HMBS</i>	F: TGGACCTGGTTGTTCACTCCTT R: CAACAGCATCATGAGGGTTTTC	150 nm	2,000

Fonte: O autor.

5.8 EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOTTING

5.8.1 Extração total de proteínas

Para o plaqueamento destinado à extração de proteínas, foram adicionadas $1,0 \times 10^6$ células em placas de 100 mm. Após o período de 24 h destinado à adesão, substitui-se o sobrenadante por meio de cultura contendo os tratamentos correspondentes às condições experimentais, e as placas retornaram à incubadora de CO₂ pelo período de 24 horas do tratamento. Decorrido o tempo de tratamento, o sobrenadante foi recolhido para tubos de 15 mL, as placas foram lavadas com PBS, as células foram desaderidas, utilizando solução de EDTA (Sigma®, E6758) a 2,0 mM em PBS, e transferidas para o tubo correspondente. Após uma etapa de centrifugação (3000x g; 4°C; 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuscitado em PBS. Uma nova centrifugação foi realizada (5000x g; 4°C; 1 minuto) e o sobrenadante foi novamente descartado. A lise celular foi feita utilizando o tampão do ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) que consiste em uma solução aquosa de NaCl a 150 mM (Biotec®), deoxicolato de sódio a 1% (m/V) (Sigma®, D6750), SDS a 0,1% (GE®, 17-1313-01), triton X-100 a 1% (Sigma®, T8787) e Tris a 25 mM (Sigma®). A inibição da atividade de proteases e fosfatases foi feita pela adição de Na₃VO₄ a 1,0 mM, Na₄P₂O₇ a 1,0 mM, NaF a 1,0 mM, PMSF (Sigma®, P7626) a 10 µM e EDTA a 2,0 mM. Os lisados foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e mantidos no gelo por 15 minutos. Por

fim, uma última etapa de centrifugação (16000x g; 4°C; 20 minutos) foi realizada e os sobrenadantes foram transferidos para microtubos novos e armazenados a – 80°C. Apenas um experimento independente foi realizado para cada linhagem.

5.8.2 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas das amostras foi realizada utilizando a metodologia de Bradford (BRADFORD, 1976). Para isso, foi construída uma curva-padrão com concentrações crescentes de albumina do soro bovino (BSA; Sigma®, A7906) e volume constante do reagente de Bradford (solução aquosa de Coomassie Brilliant Blue G-250 a 0,01% (m/V), etanol a 4,75% e ácido fosfórico a 8,5%) em placas de 96 poços. As amostras foram diluídas em RIPA (1:10). A determinação da absorbância foi realizada a 595 nm em leitor de microplacas. Os valores de absorbância puderam então ser relacionados às concentrações conhecidas da curva-padrão, através de uma equação de primeiro grau, levando-se em consideração o fator de diluição.

5.8.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Para a separação eletroforética das proteínas, as amostras tiveram volumes correspondentes a 50 µg de proteínas misturados com tampão de amostra redutor (concentrações finais de 50 mM Tris pH = 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 5% β-mercaptoetanol; 0,1% azul de bromofenol), foram fervidas por 10 minutos e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). Empregaram-se as concentrações de poliacrilamida iguais a 5% (m/V) no gel de empilhamento e 10% (m/V) no gel de separação, bem como o tampão de corrida Tris-glicina (Tris-HCl pH = 8,3 a 25 mM; glicina a 192 mM e SDS a 0,1% (m/V)) (LAEMMLI, 1970). Em todas as corridas, foi utilizado o marcador PageRuler™ (Thermo-Fischer®, #26616) como padrão de peso molecular. As amostras foram submetidas a diferenças de potencial de 50 V por 30 minutos e, em seguida, 110 V por 2 horas.

5.8.4 Transferência e imunodeteção de proteínas

Após a separação, as proteínas foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF; GE®, #10600023) utilizando tampão de transferência contendo

Tris a 25 mM, glicina a 192 mM e metanol a 20% (V/V) (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). A transferência foi conduzida por 90 minutos em cuba de transferência úmida com uma corrente de 120 mA. A transferência das proteínas do gel para a membrana de PVDF foi confirmada pela coloração do gel após a transferência com solução aquosa de Coomassie R-250 a 0,1% (m/V), metanol a 20% (V/V) e ácido acético a 10% (V/V), bem como através da coloração da membrana, com o corante solúvel de Ponceau.

Confirmada a transferência, a membrana foi lavada com TBST (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% (V/V) em água ultrapura) até a total remoção do Ponceau e incubada *overnight* em solução de BSA a 3% (m/V) em TBST a 4°C para bloqueio dos sítios de ligação inespecífica. Em seguida, a membrana bloqueada foi incubada com as soluções dos anticorpos primários de interesse à temperatura ambiente por 4 horas. Os anticorpos utilizados foram: Mouse anti-GAPDH 1:4000 (Santa Cruz®, sc32233), Rabbit anti-p42/44^{MAPK} (ERK1/2) 1:1000 (Cell Signalling®, 137F5), Rabbit anti-p-p42/44^{MAPK} (p-ERK1/2) 1:1000 (Cell Signalling®, 187G2), Rabbit anti-MMP-2 1:1000 (antígeno reconhecido é comum às formas pró-MMP-2 e MMP-2 ativa) (Sigma®, M6302). Ao término da incubação, a membrana passou por três lavagens de 10 minutos com TBST para remoção dos anticorpos não-ligados ou com ligações inespecíficas mais fracas. A membrana com os anticorpos primários ligados foi incubada por 1 hora, à temperatura ambiente, com soluções dos respectivos anticorpos secundários conjugados com peroxidase. Por fim, a membrana foi lavada outras três vezes com TBST.

Para a revelação, a membrana foi incubada com o substrato quimioluminescente Super Signal® West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate; Thermo-Fischer®, #34580) por diferentes tempos, a fim de obter uma detecção de sinal suficiente sem que houvesse saturação, utilizando a fotodocumentador Amersham® Imager 600 series (GE Healthcare®).

5.9 ZIMOGRÁFIA EM GELATINA

A detecção e quantificação de MMPs com atividade de gelatinase secretadas para o meio extracelular foi performada através do ensaio de zimografia em gelatina (KATO; YAMASHITA; ISHIKAWA, 2002). Para tal, 5×10^5 células foram plaqueadas em placas de 60 mm. Após o período de 24 horas destinado à adesão, o sobrenadante foi removido e as placas foram lavadas três vezes com meio de cultura sem SFB. Seguidamente,

adicionou-se meio de cultura sem SFB contendo os tratamentos correspondentes às condições experimentais, e as placas retornaram à incubadora de CO₂ por 24 horas. Decorrido o tempo de tratamento, o sobrenadante foi recolhido para microtubos de 1,5 mL e foram realizadas duas centrifugações (400x g; 4°C; 5 minutos) para remoção de precipitados e debris celulares. A quantificação de proteínas do sobrenadante foi feita através do kit BCA (Thermo-Fischer®, #23227), seguindo as instruções do fabricante.

Em seguida, as amostras tiveram volumes correspondentes a 25 µg de proteínas misturados com tampão de amostra não-redutor (concentrações finais de 50 mM Tris pH = 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 0,1% azul de bromofenol) e aplicados em um gel de SDS-PAGE contendo 10% de acrilamida co-polimerizada com 1 mg/mL de gelatina (BioRad®). A eletroforese foi conduzida com o mesmo tampão de corrida anteriormente descrito e utilizando o marcador PageRuler™ (Thermo-Fischer®, #26616) como padrão de peso molecular. As amostras foram submetidas a diferenças de potencial de 30 V por 30 minutos e, em seguida, 100 V por 2 horas, a 4°C. Ao término da eletroforese, cada gel foi lavado duas vezes com solução de Triton X-100 a 2,5% (V/V) em água ultrapura e incubado por 16 horas a 37°C na presença do tampão de reação (50 mM Tris pH = 8,0; 10 mM CaCl₂; 1,0 µM ZnSO₄). Após o período de incubação, o gel foi corado com 0,5% Coomassie R-250 em uma mistura de água, metanol e ácido acético nas proporções de 6:3:1, respectivamente. Por fim, o gel foi digitalizado em fotodocumentador Amersham® Imager 600 series (GE Healthcare®). Apenas um experimento independente foi realizado para cada linhagem. As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ®, com o qual foram feitas três quantificações para cada gel. Os resultados foram expressos como porcentagem da área da banda da MMP em relação ao controle com o veículo.

5.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas no software Prism 8.0.1.244 (GraphPad Software®). Para avaliar a normalidade dos dados obtidos em cada experimento, foram empregados critérios numéricos (proximidade entre média e mediana, coeficiente de variação < 30%), gráficos (QQ-plot) e o teste de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$). A comparação entre amostras e controles foi realizada através da análise de variância paramétrica de uma via (One-Way ANOVA) e do teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos e representados em cada gráfico conforme indicado nas legendas de cada figura.

6. RESULTADOS

6.1 SELEÇÃO DOS AINEs PARA O ESTUDO

A seleção de AINEs de relevância para os objetivos deste projeto foi feita, em um primeiro momento, a partir de um levantamento bibliográfico. Foram escolhidas, inicialmente, a aspirina e a indometacina, por serem descritas como capazes de modular a expressão de RECK e/ou MMPs em modelos tumorais, bem como o inibidor seletivo de COX-2 NS-398 (PAN *et al.*, 2001; PAN *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2002; NANWAT *et al.*, 2010). Somaram-se à lista os fármacos celecoxibe, ibuprofeno, diclofenaco, meloxicam, piroxicam e tenoxicam, os quais tiveram sua capacidade de passagem pela BHE estudada *in vitro* com diferentes modelos celulares e condições experimentais (NOVAKOVA *et al.*, 2014). O trabalho de Novakova e colaboradores não identificou nenhum desses fármacos como incapaz de atravessar a BHE, ainda que tenha sido observado o efluxo dos mesmos. Por fim, foram escolhidos os fármacos cetoprofeno, naproxeno e nimesulida a fim de melhor abranger subclasses estruturais desta família de fármacos na análise.

Após a construção dos modelos e otimização da estrutura tridimensional por minimização de energia, foram construídas as superfícies de potencial eletrostático e determinadas características estruturais e parâmetros físico-químicos dos compostos candidatos ao estudo. Em posse de tais resultados, foram obtidos critérios e faixas de valores descritos para fármacos de atuação no SNC (PAJOUHESH; LENZ, 2005; HITCHCOCK; PENNINGTON, 2006). Apesar de alguns estudos indicarem que compostos com massa molar (MM) inferior a 500 g mol^{-1} sejam capazes de atravessar a BHE, observa-se que fármacos comercialmente disponíveis que atuam no SNC apresentam $MM \leq 310 \text{ g mol}^{-1}$. A área superficial polar (A_{SP}) deve, idealmente, ser inferior a 60 \AA^2 , não devendo ultrapassar o limite de 90 \AA^2 , e deve corresponder a não mais do que 16-20% da área superficial total. Ainda em termos de polaridade, são preditores de uma boa capacidade de passagem pela BHE um total de sítios aceptores de ligação de hidrogênio (ALH) menor ou igual a 5 e um número de sítios doadores de ligação de hidrogênio (DLH) menor ou igual a 1, não podendo ser superior a 3. O valor calculado do coeficiente de partição ($c_{log P}$) é indicativo da lipofilicidade da molécula e deve estar entre 2 e 4. Observa-se, ainda, que fármacos de atuação no SNC apresentam como verdadeira a relação $c_{log P} - ALH \geq 0$. Ao considerarmos que espécies carregadas

são incapazes de atravessar a bicamada lipídica por difusão passiva, entende-se que um caráter ácido ou básico forte é desfavorável à passagem pela BHE e, dessa maneira, valores de pKa entre 4,0 e 10,0 são preferíveis (PAJOUHESH; LENZ, 2005; HITCHCOCK; PENNINGTON, 2006).

São apresentados na TABELA 2 os valores das propriedades físico-químicas e estruturais calculados conforme descrito e que se mostraram úteis para a distinção entre os compostos elegíveis a este projeto.

TABELA 2: Propriedades físico-químicas e estruturais determinadas para diferentes AINEs

AINEs	MM	A _{SP}	% A _{SP}	pK _a	clog P	DLH	clogP – ALH
Aspirina	180,1	63,6	20,6	3,50	1,24	1	-0,76
Cetoprofeno	251,3	54,4	13,6	4,45	3,46	1	0,46
Ibuprofeno	205,3	37,7	8,83	5,25	3,83	1	1,83
Naproxeno	230,3	46,5	11,9	4,15	2,99	1	-0,01
Diclofenaco	296,1	49,3	12,3	4,15	3,97	2	0,97
Meloxicam	351,4	136	31,6	4,44	3,00	2	-4,00
Piroxicam	331,3	108	29,6	6,30	3,10	2	-2,90
Tenoxicam	351,4	136	33,6	5,30	3,00	2	-4,00
Nimesulida	308,3	110	27,3	6,50	2,67	1	-3,33
NS-398	314,4	110	24,1	6,45	2,58	1	-3,42
Celecoxib	381,4	86,4	17,4	11,1	3,91	1	-3,09
Indometacina	357,8	68,5	13,8	4,50	3,17	1	-1,83

Fonte: O autor.

Nota: Valores considerados preferíveis, aceitáveis e fora da faixa estipulada foram representados em verde, amarelo e vermelho, respectivamente.

Legenda: MM = massa molecular (em g mol⁻¹); A_{SP} = área superficial polar (Å²); % A_{SP} = porcentagem de área superficial polar (%); pK_a = cologaritmo da constante de acidez; clogP = logaritmo do coeficiente de partição calculado; DLH = número de sítios doadores de ligações de hidrogênio; ALH = número de sítios aceptores de ligações de hidrogênio).

É válido ressaltar que tais valores representam médias e o fato de um ou mais parâmetros avaliados encontrarem-se fora da faixa descrita não significa que o fármaco seja incapaz de atravessar a BHE. Outros parâmetros como o coeficiente de distribuição (log D), tempo de meia-vida, fração ionizada e eficiência como substrato de transportadores de efluxo, entre outros, também poderiam ser considerados. Apesar disso, observa-se que os AINEs derivados de ácidos arilalcanoicos (ibuprofeno, cetoprofeno,

naproxeno) e o diclofenaco apresentaram os melhores conjuntos de valores para os parâmetros avaliados.

Nesse cenário, optou-se por realizar este projeto utilizando a aspirina (AAS), considerando sua capacidade de induzir a expressão de RECK e atividade antitumoral já descritas, bem como o ibuprofeno (IBU), considerando sua atividade antitumoral já descrita e características físico-químicas mais adequadas ao modelo de GB.

6.2 AVALIAÇÃO CELULAR DOS EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM AAS E IBU NAS LINHAGENS U87MG E T98G

6.2.1 Avaliação da viabilidade celular por determinação de atividade metabólica

Inicialmente, buscou-se avaliar se o tratamento das células de glioblastoma humano U87MG e T98G com AAS e IBU era capaz de alterar a atividade metabólica das células, a fim de definir as melhores condições para os ensaios posteriores. Para isso, foram analisadas quatro concentrações de cada fármaco (AAS 0,25 mM, 0,50 mM, 1,00 mM e 2,00 mM; IBU 0,125 mM, 0,25 mM, 0,50 mM e 1,00 mM) nos períodos de 24 e 48 horas através do ensaio de redução de MTT. Por se valer, principalmente, da atividade da succinato desidrogenase – componente do ciclo do ácido cítrico e da cadeia respiratória – para esta redução, este ensaio fornece indícios do estado metabólico geral da célula.

Para a linhagem U87MG, o tratamento com AAS por 24 horas demonstrou uma redução significativa da atividade metabólica somente nas concentrações superiores a 0,50 mM (FIGURA 6a). Não houve diferença significativa entre os tratamentos AAS 0,50 mM e AAS 1,0 mM em 24 horas, os quais apresentaram atividade metabólica em relação ao controle de 88,8% e 84,8%, respectivamente. Ainda em 24 horas, para a condição de AAS 2,00 mM, foi obtido o valor de 71,2% em relação ao controle.

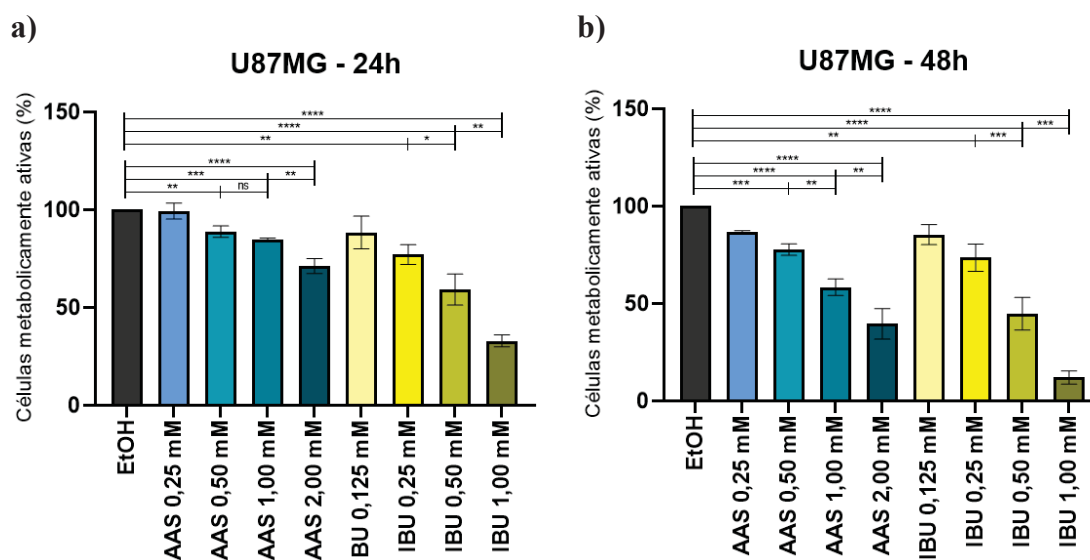
Em 48 horas, o tratamento da linhagem U87MG com AAS 0,25 mM demonstrou redução significativa para 86,5% do valor observado para o controle (FIGURA 6b). Nesse período de tratamento, observam-se diferenças entre as condições AAS 0,50 mM e AAS 1,0 mM, cujas porcentagens de atividade metabólica foram de 77,8% e 58,4%, respectivamente. Já o tratamento com AAS 2,00 mM por 48 horas foi responsável pela redução a 39,6% da atividade metabólica.

Para a linhagem U87MG, o tratamento por 24 horas com IBU 0,125 mM promoveu uma redução da atividade metabólica, porém esta diferença não se mostrou

estatisticamente significativa (FIGURA 6a). Para as condições de IBU 0,25 mM, 0,50 mM e 1,00 mM foram obtidas porcentagens de atividade metabólica iguais a 77,1%, 59,3% e 33,0%, respectivamente.

Ao ser realizado o tratamento por 48 horas na linhagem U87MG, novamente, a redução observada para IBU 0,125 mM não se mostrou estatisticamente significativa (FIGURA 6b). Curiosamente, o tratamento com IBU 0,25 mM demonstrou uma redução equivalente a 73,5% em relação ao controle, valor muito semelhante ao observado no tratamento por 24 horas. Já no tratamento com IBU 0,50 mM, o valor observado correspondeu a 44,8%. Vale destacar o impressionante valor de 12,1% obtido para o tratamento com IBU 1,00 mM por 48 horas. De maneira geral, nota-se uma maior sensibilidade da linhagem U87MG ao tratamento com ibuprofeno, quando comparado com a aspirina.

FIGURA 6: Determinação da atividade metabólica após o tratamento da linhagem U87MG com AAS e IBU por 24 e 48 horas



Fonte: O autor.

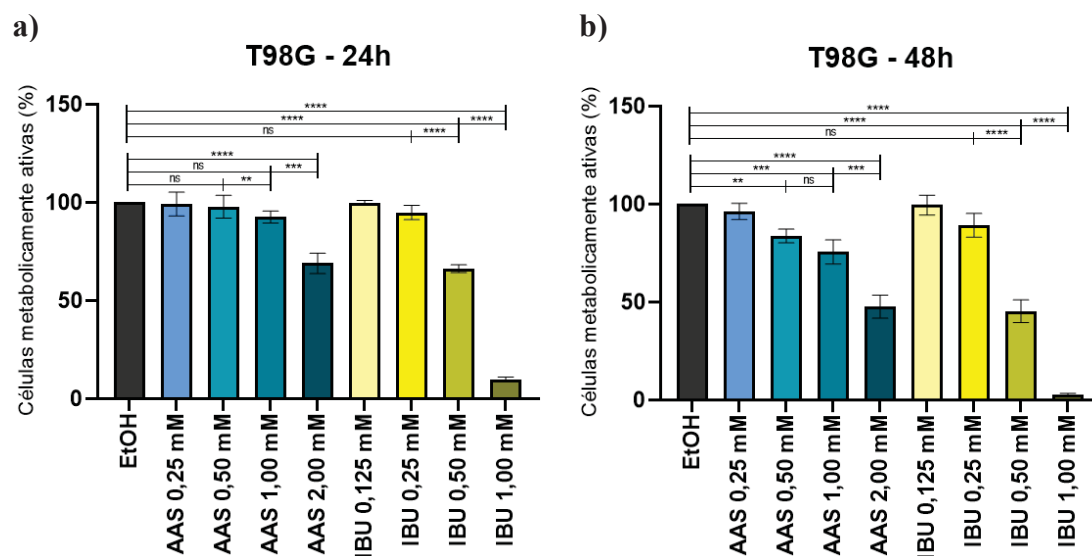
Nota: Gráficos de porcentagem de atividade metabólica obtidos pelo ensaio de redução de MTT para a linhagem U87MG tratada com AAS (0,25 mM; 0,50 mM; 1,00 mM; 2,00 mM) ou IBU (0,125 mM; 0,25 mM; 0,50 mM; 1,00 mM) por (a) 24 e (b) 48 horas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão em relação ao valor observado para o controle com veículo (EtOH 0,5% V/V) para três experimentos independentes realizados em quadruplicata (ns: não significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$).

Para a linhagem T98G, o tratamento por 24 horas com AAS demonstrou ter efeito estatisticamente significativo somente com a maior concentração testada (2,00 mM), na qual houve uma redução para 69,0% do valor observado para o controle (FIGURA 7a).

Após 48 horas de tratamento desta mesma linhagem com AAS, observou-se redução para 83,8% mediante o tratamento com AAS 0,50 mM, para 75,6% com AAS 1,00 mM e para 47,7% para AAS 2,00 mM (FIGURA 7b).

Ao ser realizado o tratamento da linhagem T98G com IBU por 24 horas, foi observada redução significativa somente para as maiores concentrações testadas, sendo elas IBU 0,50 mM (66,4%) e 1,00 mM (9,96%) (FIGURA 7a). O mesmo comportamento foi observado após o tratamento da linhagem T98G com IBU por 48 horas, sendo obtidas as porcentagens de 45,4% para IBU 0,50 mM e 2,7% para IBU 1,00 mM (FIGURA 7b). De maneira geral, existe uma maior sensibilidade da linhagem T98G ao tratamento com ibuprofeno, quando comparado com a aspirina, apesar de tais comparações poderem ser feitas somente nas concentrações 0,50 mM e 1,00 mM de ambos os fármacos.

FIGURA 7: Determinação da atividade metabólica após o tratamento da linhagem T98G com AAS e IBU por 24 e 48 horas



Fonte: O autor.

Nota: Gráficos de porcentagem de atividade metabólica obtidos pelo ensaio de redução de MTT para a linhagem T98G tratada com AAS (0,25 mM; 0,50 mM; 1,00 mM; 2,00 mM) ou IBU (0,125 mM; 0,25 mM; 0,50 mM; 1,00 mM) por (a) 24 e (b) 48 horas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão em relação ao valor observado para o controle com veículo (EtOH 0,5% V/V) para três experimentos independentes realizados em quadruplicata (ns: não significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$).

Ao ser feito um comparativo entre as linhagens, as células U87MG são mais responsivas ao tratamento com AAS em ambos os períodos analisados. A condição de AAS 0,25 mM não se mostrou promissora, visto que promoveu redução significativa da atividade metabólica apenas para a linhagem U87MG em 48 horas. De maneira

semelhante, a menor concentração de IBU (0,125 mM) não apresentou efeito em nenhuma das linhagens em ambos os períodos analisados, enquanto a linhagem U87MG foi mais sensível ao tratamento com IBU 0,25 mM. Apesar do efeito muito pronunciado do tratamento com IBU 1,00 mM (especialmente na linhagem T98G), a condição de IBU 0,50 mM teve efeitos semelhantes em ambas as linhagens.

6.2.2 Avaliação da viabilidade celular por quantificação de células aderidas

Ainda com o intuito de caracterizar os efeitos do tratamento com AAS e IBU nas linhagens U87MG e T98G, foi realizado o ensaio de coloração com cristal violeta. Para isso, foram analisadas quatro concentrações de cada fármaco (AAS 0,25 mM, 0,50 mM, 1,00 mM e 2,00 mM; IBU 0,125 mM, 0,25 mM, 0,50 mM e 1,00 mM) nos períodos de 24 e 48 horas. Por ser capaz de permear a membrana de células fixadas com metanol, esse ensaio permite quantificar a população de células que permaneceram aderidas após os tratamentos.

Para a linhagem U87MG, o tratamento com AAS por 24 horas demonstrou uma redução significativa da população de células aderidas somente nas concentrações superiores a 0,50 mM (FIGURA 8a). Não houve diferença significativa entre os tratamentos AAS 0,50 mM e AAS 1,0 mM em 24 horas, os quais apresentaram os valores de 85,4% e 84,4%, respectivamente. Ainda em 24 horas, para a condição de AAS 2,00 mM, foi obtido o valor de 67,7% em relação ao controle.

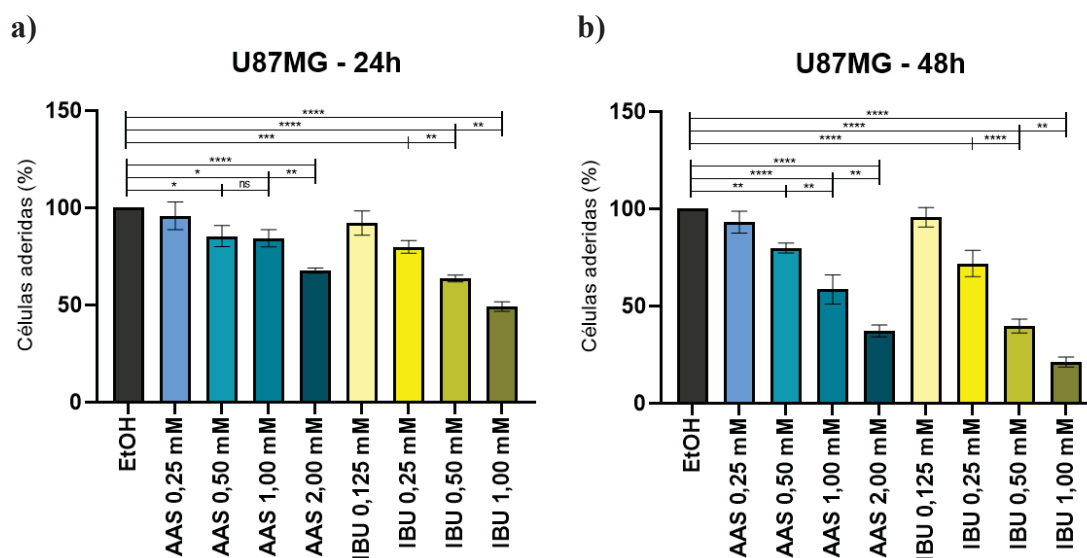
Em 48 horas, o tratamento da linhagem U87MG com AAS 0,25 mM novamente não demonstrou uma alteração significativa (FIGURA 8b). Nesse mesmo período, as condições AAS 0,50 mM e AAS 1,0 mM apresentaram reduções para 79,8% e 58,5%, respectivamente. Já o tratamento com AAS 2,00 mM por 48 horas foi responsável pela redução a 37,3% da população de células aderidas.

O tratamento da linhagem U87MG por 24 horas com a menor concentração de IBU (0,125 mM) não causou uma redução significativa (FIGURA 8a). Para as condições de IBU 0,25 mM, 0,50 mM e 1,00 mM foram observados valores correspondentes a 79,9%, 63,7% e 49,3% em relação ao controle, respectivamente.

Ao ser realizado o tratamento por 48 horas na linhagem U87MG, novamente não houve efeito significativo na condição de IBU 0,125 mM (FIGURA 8b). O tratamento com IBU 0,25 mM demonstrou uma redução equivalente a 71,9% em relação ao controle, valor muito semelhante ao observado no tratamento por 24 horas. Já no tratamento com

IBU 0,50 mM, o valor observado correspondeu a 39,8%, enquanto para IBU 1,00 mM houve diminuição para 21,2%. De maneira geral, há uma maior sensibilidade da linhagem U87MG ao tratamento com ibuprofeno, quando comparado com a aspirina.

FIGURA 8: Quantificação de células aderidas após o tratamento da linhagem U87MG com AAS e IBU por 24 e 48 horas



Fonte: O autor.

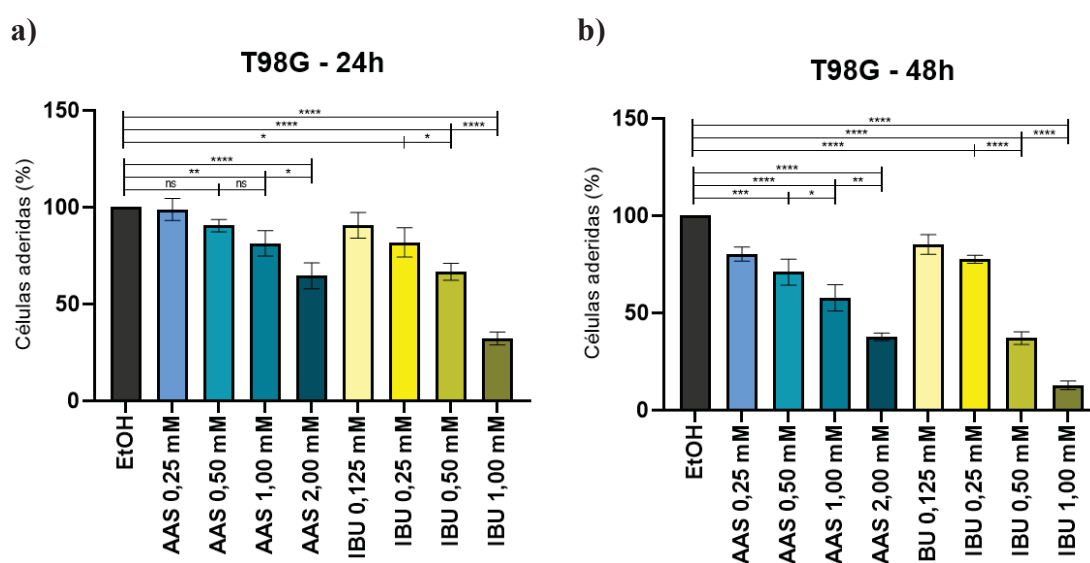
Nota: Gráficos de porcentagem de células aderidas obtidos pelo ensaio de coloração com cristal violeta para a linhagem U87MG tratada com AAS (0,25 mM; 0,50 mM; 1,00 mM; 2,00 mM) ou IBU (0,125 mM; 0,25 mM; 0,50 mM; 1,00 mM) por (a) 24 e (b) 48 horas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão em relação ao valor observado para o controle com veículo (EtOH 0,5% V/V) para três experimentos independentes realizados em quadruplicata (ns: não significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$).

Para a linhagem T98G, o tratamento por 24 horas com AAS demonstrou ter efeito estatisticamente significativo somente nas concentrações de AAS 1,00 mM (81,4%) e 2,00 mM (64,6%) (FIGURA 9a). O tratamento desta mesma linhagem com AAS por 48 horas, no entanto, demonstrou uma redução significativa da população de células aderidas em todas as concentrações testadas: AAS 0,25 mM (80,5%), 0,50 mM (71,0%), 1,00 mM (57,8%) e 2,00 mM (37,7%) (FIGURA 9b).

Ao ser realizado o tratamento da linhagem T98G com IBU por 24 horas, somente a menor condição não demonstrou um efeito significativo (FIGURA 9a). O tratamento com IBU 0,25 mM promoveu uma redução para 81,9% da população de células aderidas, enquanto IBU 0,50 mM e 1,00 mM promoveram diminuições para 66,7% e 32,3%, respectivamente.

Já após 48 horas do tratamento da linhagem T98G com IBU, observou-se uma redução para 85,2% na condição IBU 0,125 mM (FIGURA 9b). O tratamento com IBU 0,25 mM apresentou uma diminuição para 77,6% daquele observado para o controle, sendo este valor muito próximo daquele observado no tratamento por 24 horas. Por fim, foram obtidas as porcentagens de 37,0% para IBU 0,50 mM e 12,8% para IBU 1,00 mM. De maneira geral, nota-se uma maior sensibilidade da linhagem T98G ao tratamento com ibuprofeno, quando comparado com a aspirina.

FIGURA 9: Quantificação de células aderidas após o tratamento da linhagem T98G com AAS e IBU por 24 e 48 horas



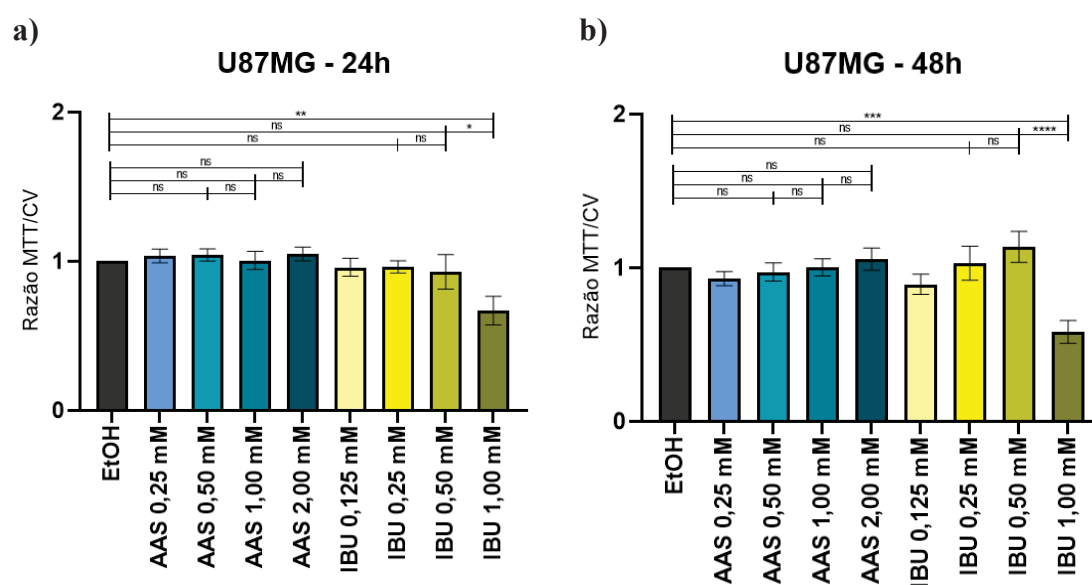
Fonte: O autor.

Nota: Gráficos de porcentagem de células aderidas obtidos pelo ensaio de coloração com cristal violeta para a linhagem T98G tratada com AAS (0,25 mM; 0,50 mM; 1,00 mM; 2,00 mM) ou IBU (0,125 mM; 0,25 mM; 0,50 mM; 1,00 mM) por (a) 24 e (b) 48 horas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão em relação ao valor observado para o controle com veículo (EtOH 0,5% V/V) para três experimentos independentes realizados em quadruplicata (ns: não significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$).

Visto que o perfil obtido para cada linhagem em determinado período de tratamento foi muito semelhante para ambas as metodologias distintas de avaliação de viabilidade celular, buscou-se uma maneira alternativa de apresentar esses dados, de forma a evidenciar possíveis diferenças. Optou-se, dessa maneira, por realizar uma razão do resultado obtido no ensaio de MTT pelo resultado obtido no ensaio de cristal violeta. Nessas condições, valores de razão diferentes de 1,0 indicariam preponderância do resultado obtido por uma ou outra metodologia. Pode-se ainda entender este resultado como uma normalização da atividade metabólica pela quantidade de células.

Para a linhagem U87MG, observa-se que houve diferença significativa entre os resultados obtidos pelas metodologias distintas somente na condição de IBU 1,00 mM, cujos valores de razão MTT/CV em 24 e 48 horas foram de 0,67 e 0,58, respectivamente (FIGURAS 10a e 10b). Esses valores demonstram que a população de células que permaneceu aderida após o tratamento possui uma menor atividade metabólica, o que poderia ser uma sugestão de ocorrência de processos de morte celular, embora experimentos adicionais para confirmar essa hipótese necessitem ser realizados.

FIGURA 10: Comparação dos resultados obtidos pelas metodologias de MTT e CV para a linhagem U87MG tratada com AAS e IBU por 24 e 48 horas



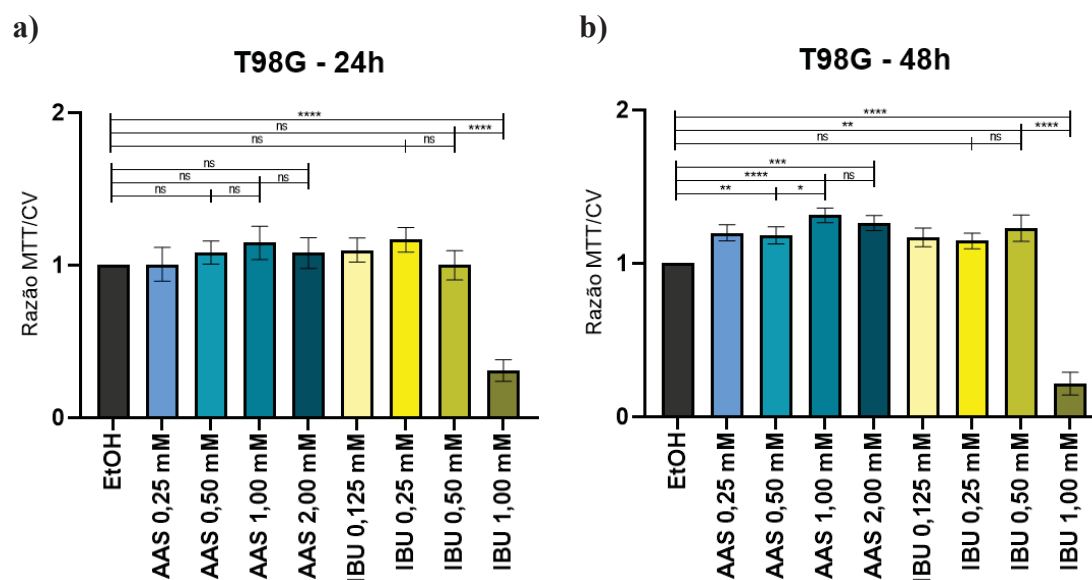
Fonte: O autor.

Nota: Gráficos de razão MTT/CV obtidos através do quociente entre os resultados obtidos pelas diferentes metodologias de avaliação de viabilidade celular para a linhagem U87MG tratada com AAS (0,25 mM; 0,50 mM; 1,00 mM; 2,00 mM) ou IBU (0,125 mM; 0,25 mM; 0,50 mM; 1,00 mM) por (a) 24 e (b) 48 horas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão em relação ao valor observado para o controle com veículo (EtOH 0,5% V/V) para três experimentos independentes realizados em quadruplicata (ns: não significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$).

Para linhagem T98G, observa-se um aumento nos valores de razão MTT/CV para todas as concentrações de AAS em 48 horas, bem como para o tratamento com IBU 0,50 mM neste mesmo período (FIGURA 11b). Esses resultados demonstram que a população de células aderidas ao substrato após o tratamento possui uma atividade metabólica mais elevada, o que poderia ser uma resposta compensatória ao tratamento com o objetivo de promover a sobrevivência, necessitando essa hipótese ser investigada futuramente. Tal

qual para a linhagem U87MG, são observados baixos valores de razão MTT/CV para os tratamentos com IBU 1,00 mM em 24 e 48 horas.

FIGURA 11: Comparação dos resultados obtidos pelas metodologias de MTT e CV para a linhagem T98G tratada com AAS e IBU por 24 e 48 horas



Fonte: O autor.

Nota: Gráficos de razão MTT/CV obtidos através do quociente entre os resultados obtidos pelas diferentes metodologias de avaliação de viabilidade celular para a linhagem T98G tratada com AAS (0,25 mM; 0,50 mM; 1,00 mM; 2,00 mM) ou IBU (0,125 mM; 0,25 mM; 0,50 mM; 1,00 mM) por (a) 24 e (b) 48 horas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão em relação ao valor observado para o controle com veículo (EtOH 0,5% V/V) para três experimentos independentes realizados em quadruplicata (ns: não significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$).

Em posse dos dados previamente apresentados, optou-se por adotar nos demais experimentos as condições de AAS 0,50 mM, AAS 1,00 mM, IBU 0,25 mM e IBU 0,50 mM. Foram excluídas, dessa maneira, a menor concentração de cada fármaco, cujo efeito em 24 horas parece ser desprezível, bem com a maior concentração, a qual poderia inviabilizar a realização de experimentos posteriores pela marcante redução em parâmetros de viabilidade celular em 24 e 48 horas.

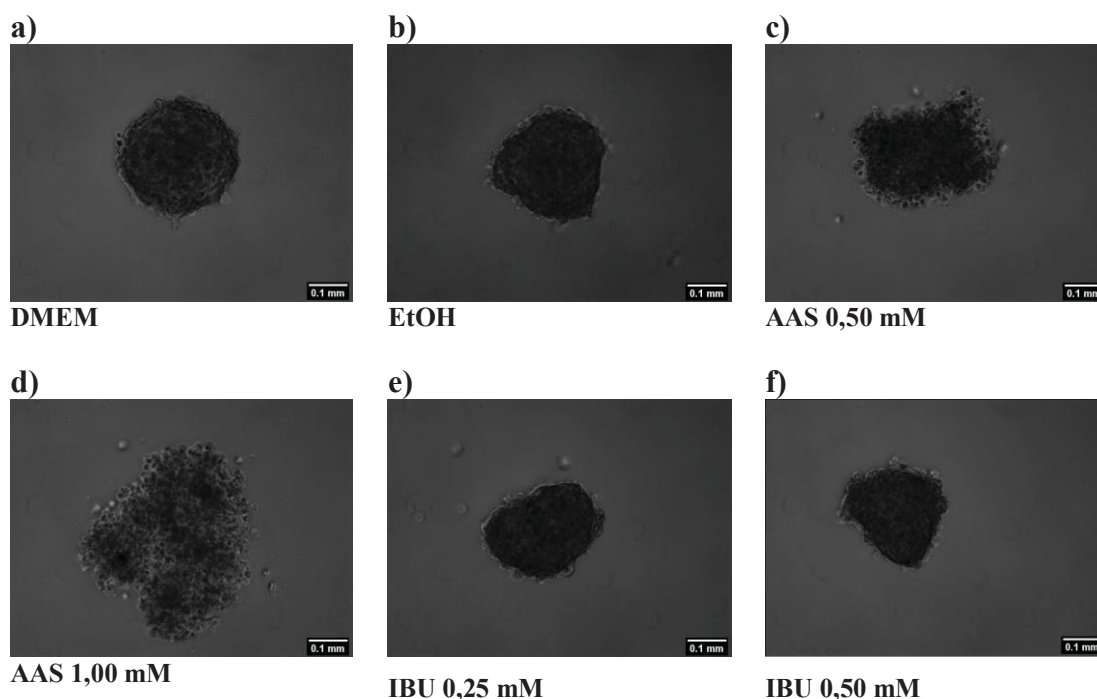
6.2.3 Avaliação da capacidade de formação de esferoides em *hanging drops*

Considerando que a formação de esferoides é uma característica marcante da subpopulação de células tumorais com características de células-tronco, buscou-se avaliar a capacidade dos AINEs selecionados de afetarem a capacidade das linhagens T98G e

U87MG de formarem esferoides através do cultivo celular em *hanging drops* (LIAO *et al.*, 2014; BARK, 2017).

Para a linhagem U87MG, foram observados esferoides regulares e com bordas definidas nas condições controle (FIGURAS 12a e 12b). Já na presença de AAS 0,50 mM, observou-se a formação de esferoides com bordas irregulares e com menor compactação (FIGURA 12c) quando comparados àqueles observados nas condições controles. Essa menor compactação ficou ainda mais evidenciada na condição de tratamento com AAS 1,00 mM, sendo igualmente notada uma grande quantidade de debris celulares (FIGURA 12d).

FIGURA 12: Avaliação da capacidade de formação de esferoides derivados da linhagem U87MG na presença de AAS e IBU por 72 horas



Fonte: O autor.

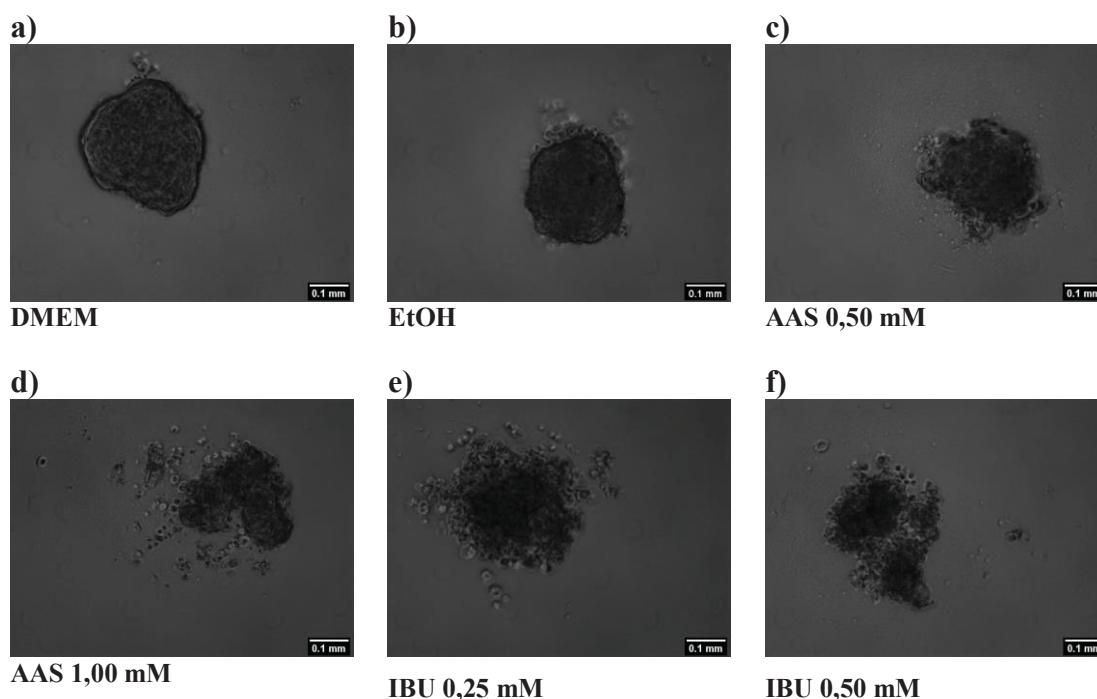
Nota: Imagens representativas de esferoides formados pelo cultivo de 1×10^3 células da linhagem U87MG em *hanging drops* por 72 horas na presença de (a) DMEM-AG 10% SFB, (b) EtOH 0,25% V/V, (c) AAS 0,50 mM, (d) AAS 1,00 mM, (e) IBU 0,25 mM e (f) IBU 0,50 mM, oriundas de três experimentos independentes realizados em quintuplicata. As imagens foram obtidas em microscópio AxioVision – Zeiss (aumento 10X).

Porém, os tratamentos com IBU 0,25 mM e 0,50 mM tiveram pouco sucesso em alterar a capacidade de formação de esferoides, os quais apresentaram bordas regulares e compactação celular semelhantes às condições controle (FIGURAS 12e e 12f). Ressalta-se que não houve diferença no número de esferoides formados entre os diferentes

tratamentos, sendo distintas de cada condição apenas as diferenças morfológicas já citadas. Ao considerar os efeitos danosos apresentados por essas condições nos ensaios de MTT e CV, realizados em monocamada, este resultado evidencia a necessidade de serem avaliados efeitos citotóxicos também em modelos 3D.

Para a linhagem T98G, foram também observados esferoides regulares e com bordas definidas para as condições de DMEM e EtOH (FIGURAS 13a e 13b). Após o tratamento das células T98G com AAS 0,50 mM, para a linhagem T98G, já são observados esferoides com bordas irregulares e uma grande quantidade de debris celulares (FIGURA 13c).

FIGURA 13: Avaliação da capacidade de formação de esferoides derivados da linhagem T98G na presença de AAS e IBU por 72 horas



Fonte: O autor.

Nota: Imagens representativas de esferoides formados pelo cultivo de 1×10^3 células da linhagem T98G em *hanging drops* por 72 horas na presença (a) DMEM-AG 10% SFB, (b) EtOH 0,25% V/V, (c) AAS 0,50 mM, (d) AAS 1,00 mM, (e) IBU 0,25 mM e (f) IBU 0,50 mM, oriundas de três experimentos independentes realizados em quintuplicata. As imagens foram obtidas em microscópio AxioVision – Zeiss (aumento 10X).

Tais características ficaram ainda mais evidentes na condição de tratamento AAS 1,00 mM, na qual observam-se muitas células soltas (FIGURA 13d). Similarmente, os tratamentos com IBU 0,25 mM e IBU 0,50 mM também afetaram a capacidade de formação de esferoides nesta linhagem, o que é indicado pela presença de muitas células

soltas e menor compactação celular (FIGURAS 13e e 13f). Não foi observada diferença no número de esferoides formados a partir da linhagem T98G para nenhum dos tratamentos realizados.

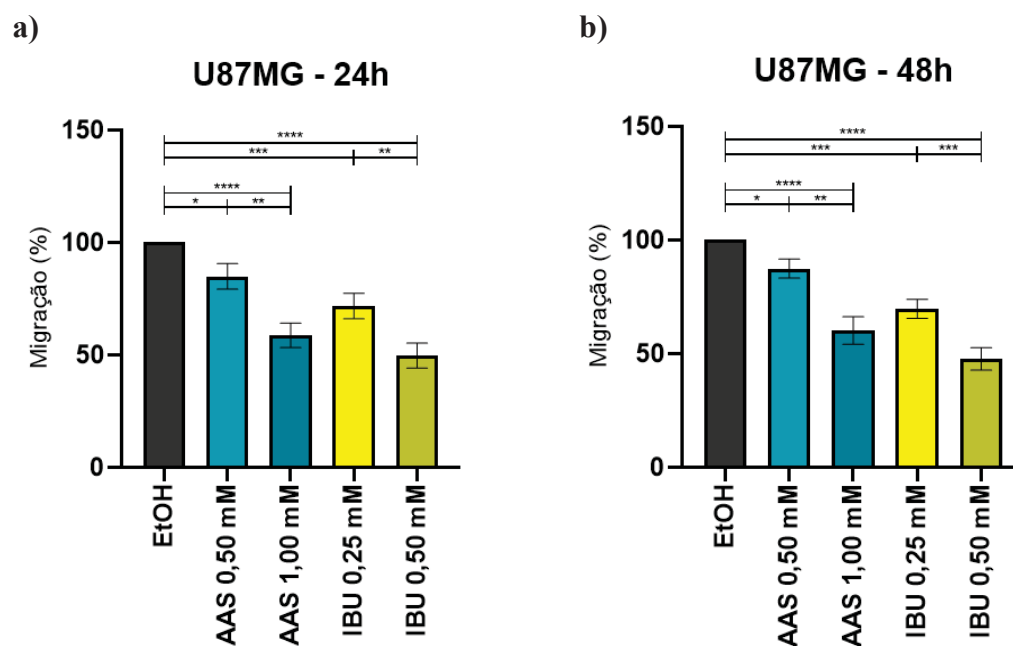
Uma melhor caracterização dos efeitos citotóxicos destes tratamentos utilizando a metodologia de cultivo em *hanging drops* ainda é necessária. Ademais, tais resultados abrem margem para investigações acerca do mecanismo por detrás de tal observação, o qual pode estar relacionado, por exemplo, à inibição de vias de biossíntese de moléculas de adesão e junção célula-célula ou com a indução de processos de morte celular.

6.2.4 Avaliação da migração celular a partir de esferoides

Foram, em seguida, gerados esferoides das linhagens U87MG e T98G pela metodologia de *hanging drops*. O esferoide presente em cada gota foi transferido, individualmente, para um substrato aderente, na ausência ou presença dos tratamentos. Através da medida da área após a difusão radial das células do esferoide na placa, pode-se inferir a capacidade de migração das células em cada condição.

O efeito dos tratamentos com AAS e IBU sobre o fenótipo de migração das células em esferoides formados a partir da linhagem U87MG não é tempo-dependente, visto que um perfil de migração muito semelhante foi obtido nos períodos de 24 e 48 horas (FIGURAS 14a e 14b). Valores sucessivamente menores são observados ao considerar o tratamento com AAS 0,50 mM (85%), IBU 0,25 mM (70%), AAS 1,00 mM (60%) e IBU 0,50 mM (50%) nos dois períodos de tratamento analisados. Nota-se, ainda, que a maior parte das células permanecem compactadas, formando esferoides com bordas regulares, em todas as condições experimentais mesmo depois de 48 horas na presença do substrato aderente (FIGURAS 15a-1). Ainda que seja discreta a capacidade de migração nas condições controle desta linhagem, é evidente que os tratamentos exerceram efeito inibitório sobre o perfil migratório.

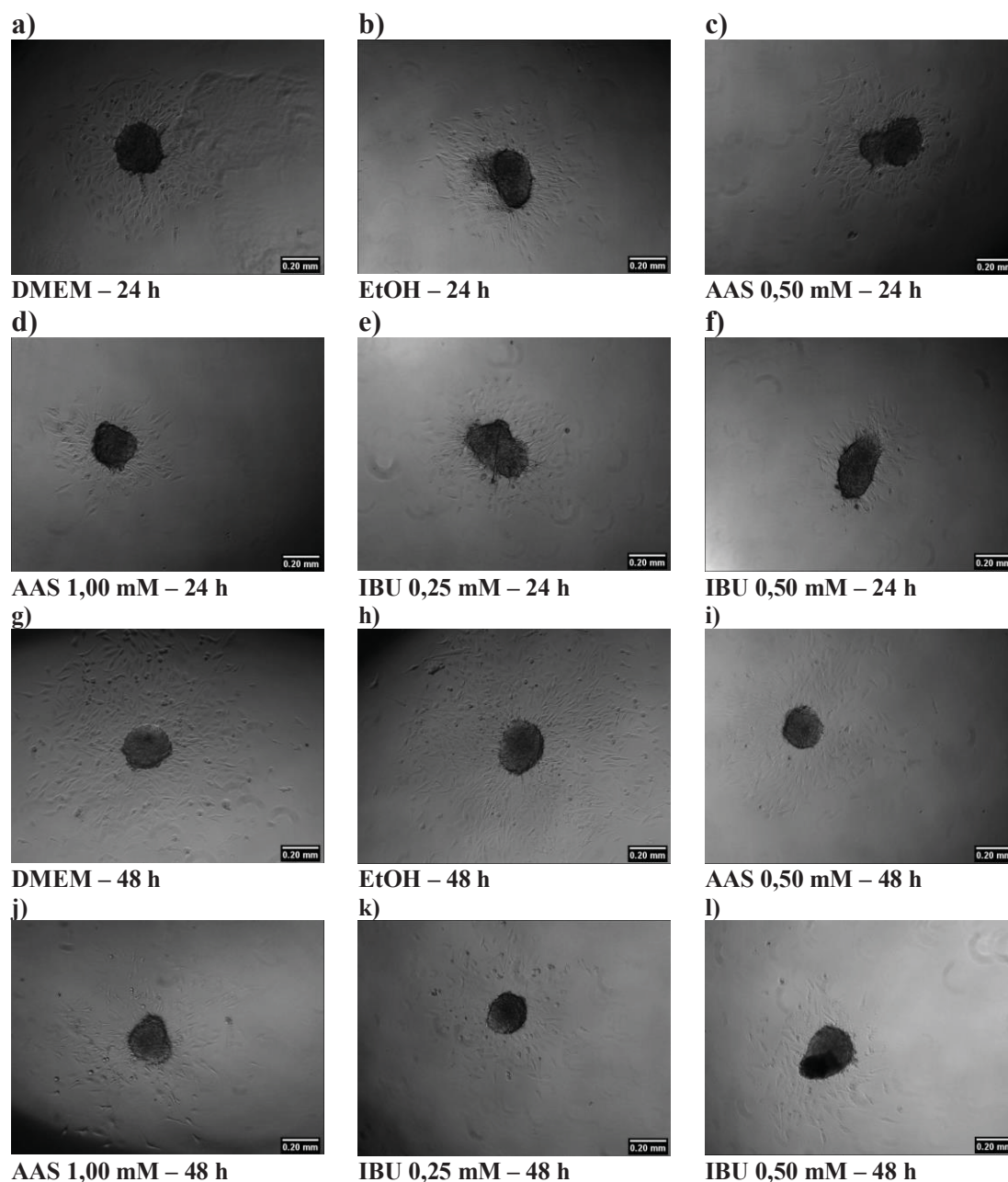
FIGURA 14: Quantificação da capacidade de migração de células a partir de esferoides da linhagem U87MG na presença de AAS e IBU por 24 e 48 horas



Fonte: O autor.

Nota: Gráficos de porcentagem de migração a partir de esferoides da linhagem U87MG na presença de AAS (0,50 mM e 1,00 mM), IBU (0,25 mM e 0,50 mM) em DMEM-AG sem SFB por (a) 24 e (b) 48 horas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão em relação ao valor observado para o controle com veículo (EtOH 0,25% V/V) para três experimentos independentes realizados em triplicata (ns: não significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$).

FIGURA 15: Avaliação de capacidade de migração de células a partir de esferoides da linhagem U87MG na presença de AAS e IBU por 24 e 48 horas



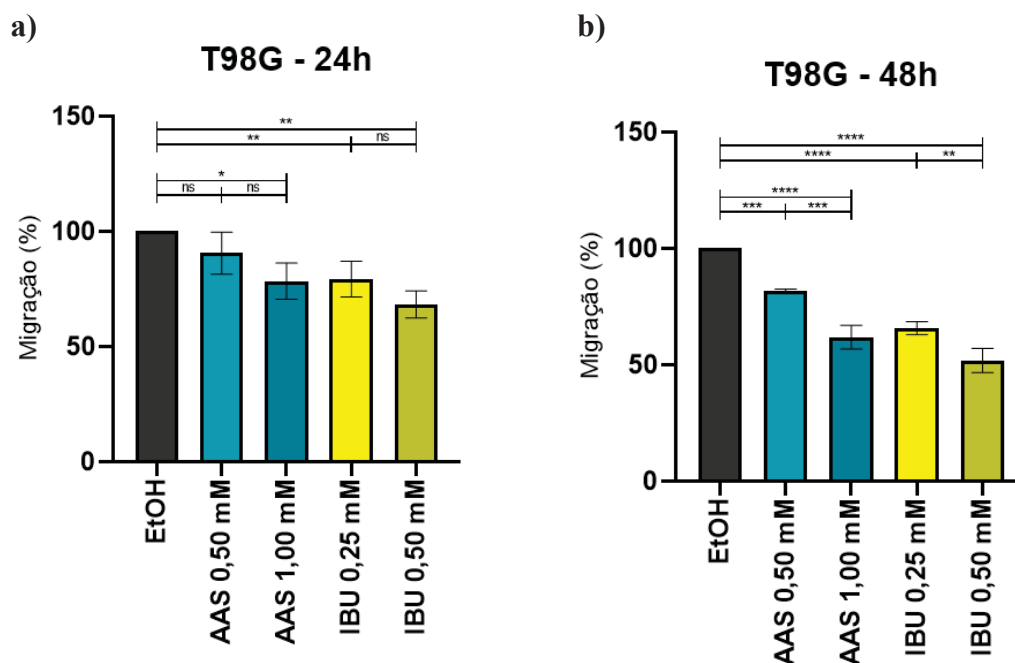
Fonte: O autor.

Nota: Imagens representativas de migração a partir de esferoides formados pela linhagem U87MG na presença DMEM-AG sem SFB, EtOH 0,25% V/V, AAS 0,50 mM, AAS 1,00 mM, IBU 0,25 mM e IBU 0,50 mM por 24 (a-f) e 48 horas (g-l), oriundas de três experimentos independentes realizados em triplicata. As imagens foram obtidas em microscópio AxioVision – Zeiss (aumento 5X).

Para a linhagem T98G, houve redução estatisticamente significativa da capacidade de migração em relação ao controle em 24 horas para as condições AAS 1,00 mM (78,4%), IBU 0,25 mM (79,3%) e IBU 0,50 mM (68,3%) (FIGURA 16a). Decorridas 48 horas do tratamento, observa-se redução da capacidade de migração em todas as

condições testadas (FIGURA 16b). Para os tratamentos com AAS 0,50 mM e 1,00 mM foram obtidos valores correspondentes a 81,6% e 61,8%, respectivamente. Já para os tratamentos com IBU 0,25 mM e 0,50 mM, os valores observados foram de 65,7% e 51,8%. Através das micrografias, observa-se uma maior migração das células de esferoides da linhagem T98G em comparação à linhagem U87MG, evidenciada pela menor densidade celular aparente no corpo do esferoide já em 24 horas, bem como pela completa ausência de contorno dos esferoides em 48 horas de tratamento nas condições controle, por exemplo (FIGURAS 17a-17l).

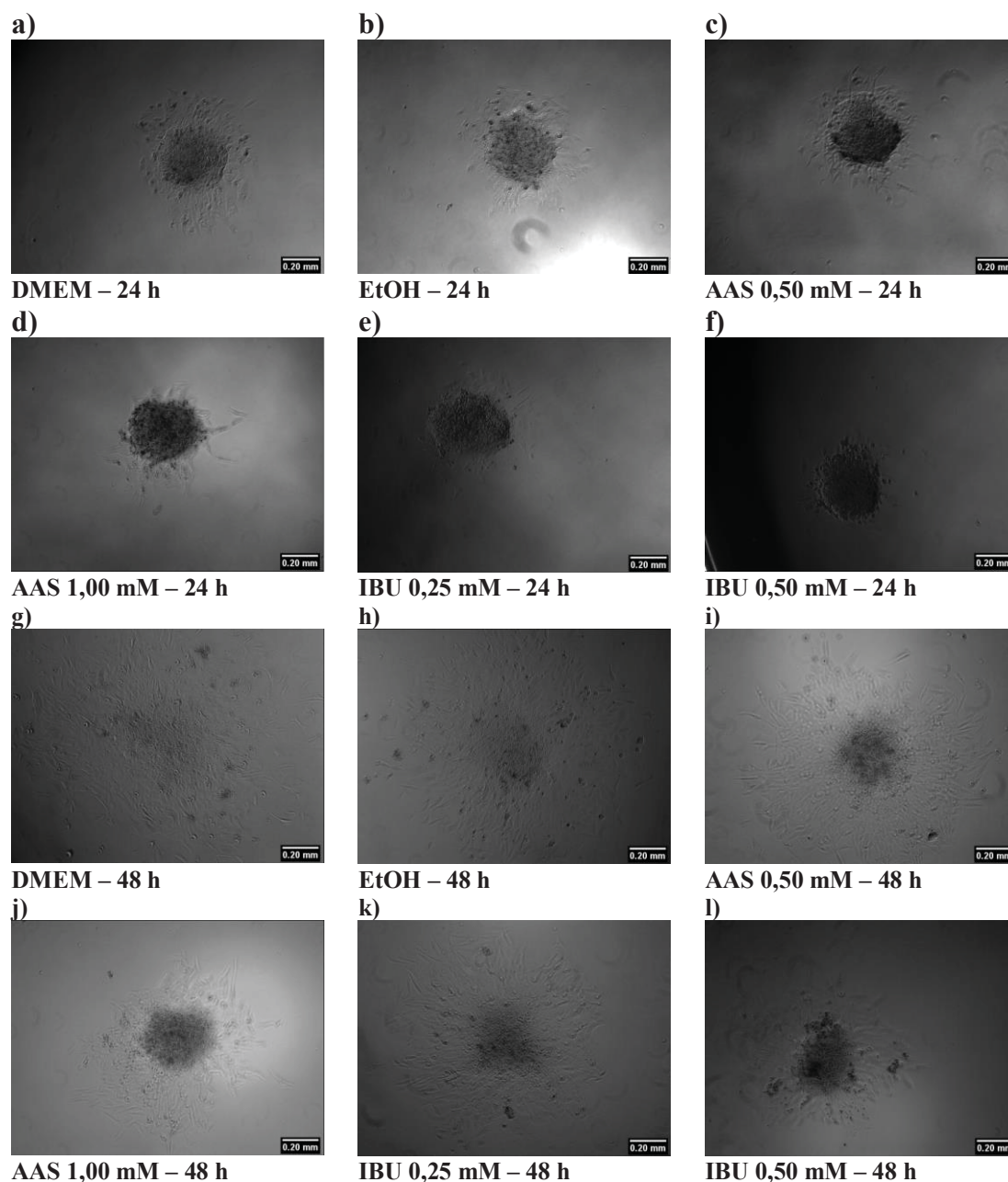
FIGURA 16: Quantificação da capacidade de migração de células a partir de esferoides da linhagem T98G na presença de AAS e IBU por 24 e 48 horas



Fonte: O autor.

Nota: Gráficos de porcentagem de migração a partir de esferoides da linhagem T98G na presença de AAS (0,50 mM e 1,00 mM), IBU (0,25 mM e 0,50 mM) em DMEM-AG sem SFB por (a) 24 e (b) 48 horas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão em relação ao valor observado para o controle com veículo (EtOH 0,25% V/V) para três experimentos independentes realizados em triplicata (ns: não significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$).

FIGURA 17: Avaliação de capacidade de migração de células a partir de esferoides da linhagem T98G na presença de AAS e IBU por 24 e 48 horas



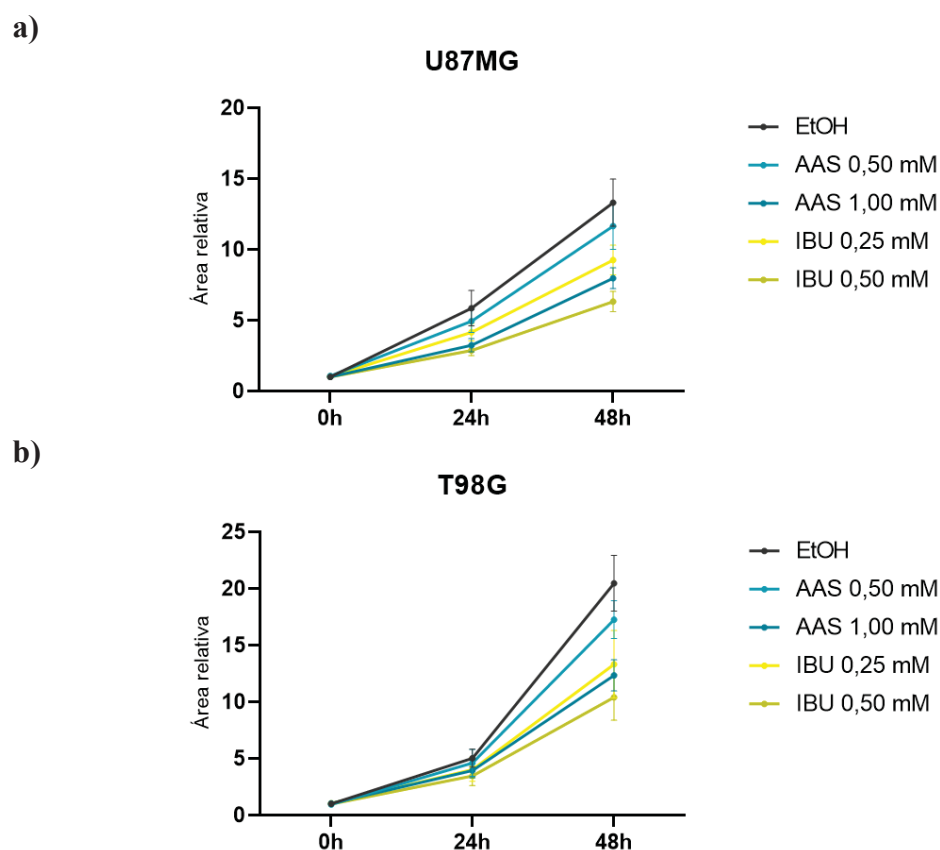
Fonte: O autor.

Nota: Imagens representativas de migração a partir de esferoides formados pela linhagem T98G na presença DMEM-AG sem SFB, EtOH 0,25% V/V, AAS 0,50 mM, AAS 1,00 mM, IBU 0,25 mM e IBU 0,50 mM por 24 (a-f) e 48 horas (g-l), oriundas de três experimentos independentes realizados em triplicata. As imagens foram obtidas em microscópio AxioVision – Zeiss (aumento 5X).

O efeito mais expressivo da inibição da migração pelo tratamento com AAS e IBU foi observado para a linhagem U87MG. Tal afirmação baseia-se não apenas no aspecto menos difuso observado nas micrografias desta linhagem ao longo de todo o experimento (FIGURAS 15a-15l) quando comparadas àquelas obtidas para a linhagem T98G

(FIGURAS 17a-17l), mas também no recobrimento de áreas menores após a migração das células em esferoides da linhagem U87MG, como se observa nas FIGURAS 18a e 18b. Ressalta-se que estes valores de área foram normalizados pelas dimensões dos esferoides de cada linhagem no início do experimento (0 h), as quais foram ligeiramente menores para a linhagem T98G (dados não mostrados).

FIGURA 18: Curva de área relativa de migração a partir de esferoides das linhagens U87MG e T98G na presença de AAS e IBU por 24 e 48 horas



Fonte: O autor.

Nota: Curva de área observada após a migração de células a partir de esferoides das linhagens (a) U87MG e (b) T98G na presença de AAS (0,50 mM e 1,00 mM), IBU (0,25 mM e 0,50 mM) ou EtOH 0,25% V/V em DMEM-AG sem SFB por 24 e 48 horas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão em relação às dimensões iniciais dos esferoides de cada linhagem, oriundos três experimentos independentes realizados em triplicata.

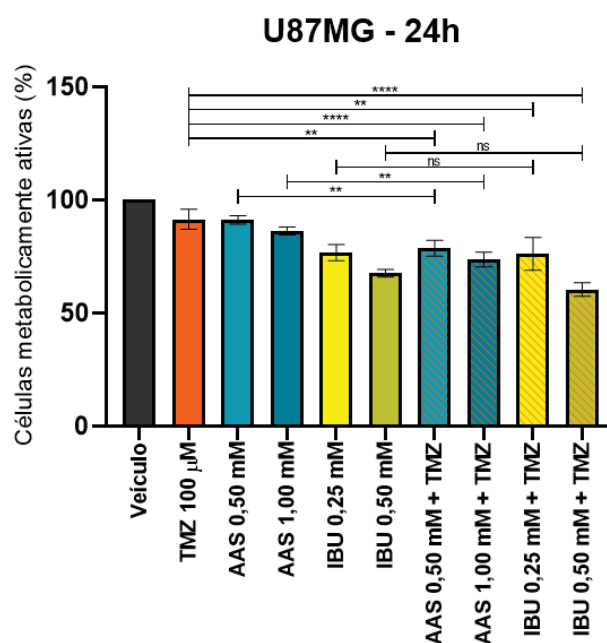
6.2.5 Avaliação da viabilidade celular por determinação de atividade metabólica para a combinação de AINEs com TMZ

Buscou-se avaliar o efeito da combinação de AAS ou IBU com TMZ na atividade metabólica das linhagens T98G e U87MG, considerando relatos recentes do tratamento

com AAS sensibilizar linhagens de glioblastoma humano e células endoteliais de glioma frente ao tratamento com diferentes quimioterápicos (temozolomida, bevacizumabe, sunitinibe) (MING *et al.*, 2017; NAVONE *et al.*, 2018). Além dos períodos já avaliados, foi incluído nesta análise o período de 72 horas, no qual a resposta de tais linhagens frente ao tratamento com TMZ 100 μM já é bem conhecida em nosso laboratório.

Para a linhagem U87MG, o tratamento por 24 horas com TMZ 100 μM promoveu uma redução da atividade metabólica para 91,5% (FIGURA 19). Ao ser considerado o tratamento com aspirina, observou-se diferença estatística entre as condições AAS 0,50 mM isolada (91,2%) e combinada com TMZ (78,7%), bem como AAS 1,00 mM isolada (86,3%) e combinada com TMZ (73,7%).

FIGURA 19: Determinação da atividade metabólica após o tratamento da linhagem U87MG com diferentes combinações entre AAS, IBU e TMZ por 24 horas



Fonte: O autor.

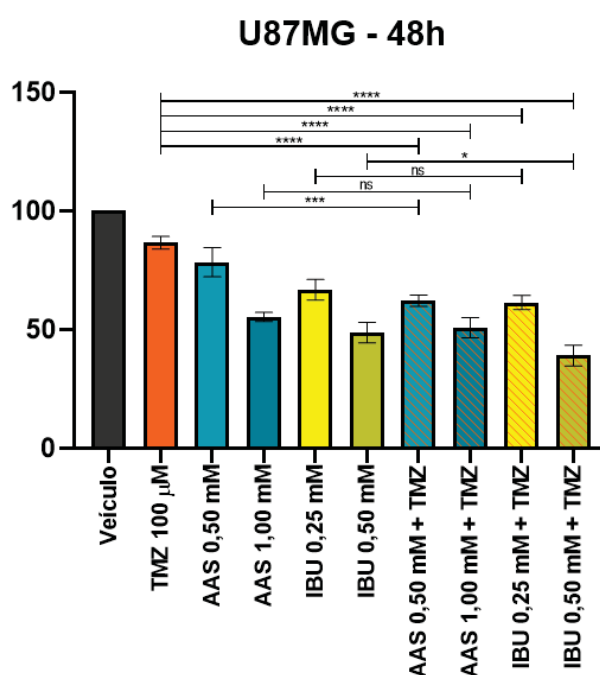
Nota: Gráfico de porcentagem de atividade metabólica obtido pelo ensaio de redução de MTT para a linhagem U87MG tratada com AAS (0,50 mM e 1,00 mM) ou IBU (0,25 mM e 0,50 mM) isoladamente ou em combinação com TMZ 100 μM por 24 horas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão em relação ao valor observado para os controles com veículo (EtOH 0,25% V/V para AAS e IBU isolados; DMSO 0,1% V/V para TMZ isolada; EtOH 0,25% V/V + DMSO 0,1% V/V para as combinações entre AAS ou IBU e TMZ), oriundos de três experimentos independentes realizados em quadruplicata (ns: não significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$).

Não foi observada, no entanto, diferença estatisticamente significativa entre as condições IBU 0,25 mM e IBU 0,50 mM isoladas e suas respectivas combinações com a TMZ. Apesar de haver uma redução significativa de todos os tratamentos combinados em

relação à condição de TMZ isolada, para a linhagem U87MG houve um efeito de sensibilização à ação do quimioterápico apenas nas combinações com a aspirina.

Ainda considerando a linhagem U87MG, observou-se uma redução para 86,6% mediante o tratamento com TMZ 100 μ M por 48 horas (FIGURA 20). O tratamento combinado de AAS 0,50 mM + TMZ (62,1%) novamente mostrou-se mais efetivo do que o respectivo tratamento isolado (78,4%). Interessantemente, não há diferença significativa entre o cotratamento de AAS 1,00 mM + TMZ (50,8%) e a condição de AAS 1,00 mM (55,3%), bem como entre a menor concentração de IBU avaliada (IBU 0,25 mM: 66,8%) e sua respectiva combinação (IBU 0,25 mM + TMZ: 61,4%). Já para a maior concentração de IBU avaliada, observou-se uma redução ligeiramente maior para a condição combinada com TMZ (IBU 0,50 mM + TMZ: 39,0%) frente à condição isolada (IBU 0,50 mM: 48,8%).

FIGURA 20: Determinação da atividade metabólica após o tratamento da linhagem U87MG com diferentes combinações entre AAS, IBU e TMZ por 48 horas

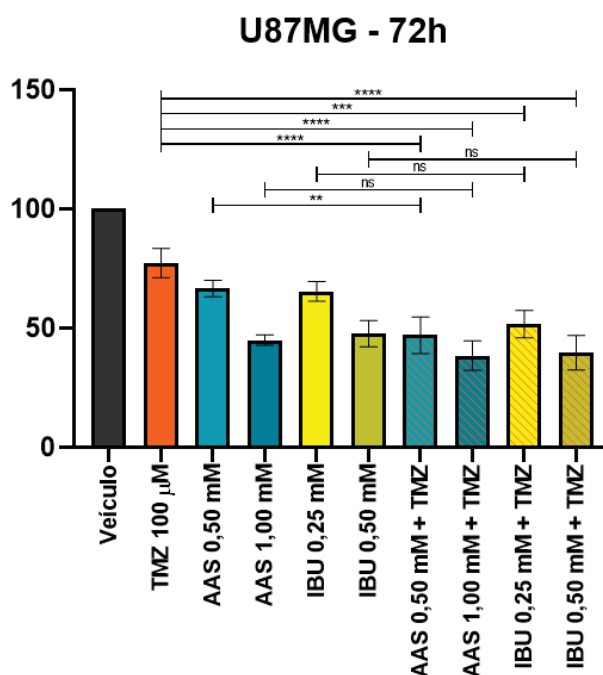


Fonte: O autor.

Nota: Gráfico de porcentagem de atividade metabólica obtido pelo ensaio de redução de MTT para a linhagem U87MG tratada com AAS (0,50 mM e 1,00 mM) ou IBU (0,25 mM e 0,50 mM) isoladamente ou em combinação com TMZ 100 μ M por 48 horas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão em relação ao valor observado para os controles com veículo (EtOH 0,25% V/V para AAS e IBU isolados; DMSO 0,1% V/V para TMZ isolada; EtOH 0,25% V/V + DMSO 0,1% V/V para as combinações entre AAS ou IBU e TMZ), oriundos de três experimentos independentes realizados em quadruplicata (ns: não significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$).

Finalmente, no período de tratamento de 72 horas, a linhagem U87MG apresentou uma atividade metabólica de 77,3% em relação ao controle após o tratamento com TMZ 100 μ M (FIGURA 21). Ao ser realizada a comparação entre os tratamentos isolados e combinados com TMZ, somente a condição de AAS 0,50 mM (66,6%) apresentou diferença estatística com sua respectiva condição combinada (AAS 0,50 mM + TMZ: 47,0%). As condições AAS 1,00 mM + TMZ (38,5%), IBU 0,25 mM + TMZ (51,6%) e IBU 0,50 mM + TMZ (39,7%), apesar de apresentarem valores muito próximos de suas condições isoladas correspondentes, ainda são significativamente menores do que o tratamento isolado com TMZ.

FIGURA 21: Determinação da atividade metabólica após o tratamento da linhagem U87MG com diferentes combinações entre AAS, IBU e TMZ por 72 horas



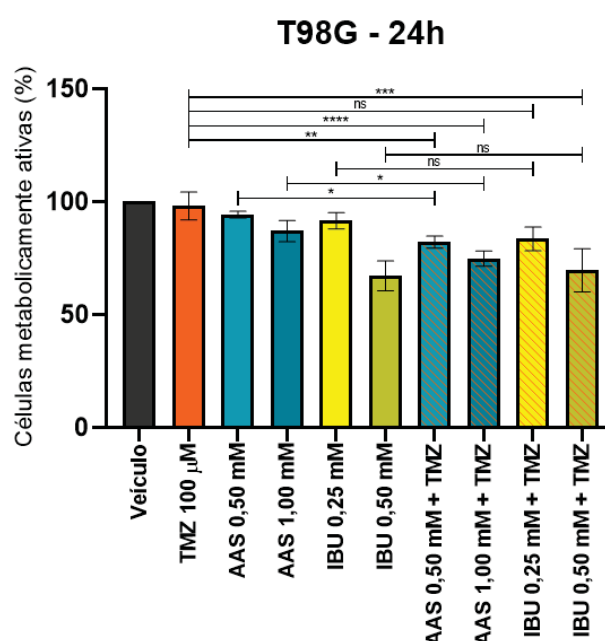
Fonte: O autor.

Nota: Gráfico de porcentagem de atividade metabólica obtido pelo ensaio de redução de MTT para a linhagem U87MG tratada com AAS (0,50 mM e 1,00 mM) ou IBU (0,25 mM e 0,50 mM) isoladamente ou em combinação com TMZ 100 μ M por 72 horas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão em relação ao valor observado para os controles com veículo (EtOH 0,25% V/V para AAS e IBU isolados; DMSO 0,1% V/V para TMZ isolada; EtOH 0,25% V/V + DMSO 0,1% V/V para as combinações entre AAS ou IBU e TMZ), oriundos de três experimentos independentes realizados em quadruplicata (ns: não significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$).

O cotratamento de TMZ com AAS por 24 horas na linhagem T98G, sabidamente resistente à ação deste quimioterápico, demonstrou resultados interessantes: a combinação de AAS 0,50 mM + TMZ apresentou uma redução para 82,1%, enquanto foi obtido o valor de 74,8% para a condição AAS 1,00 mM + TMZ, ambos os valores

significativamente diferentes de suas respectivas condições isoladas (84,3% e 87,0%, respectivamente) (FIGURA 22). O mesmo não ocorreu, no entanto, para as condições que envolvem ibuprofeno. Não houve diferença estatística entre a combinação IBU 0,25 mM + TMZ e seus respectivos tratamentos isolados. Já para a condição IBU 0,50 mM + TMZ, a redução para 69,6% parece ser devida à ação do ibuprofeno isoladamente, tendo em vista o valor muito próximo observado para o tratamento somente com IBU 0,50 mM (67,2%).

FIGURA 22: Determinação da atividade metabólica após o tratamento da linhagem T98G com diferentes combinações entre AAS, IBU e TMZ por 24 horas



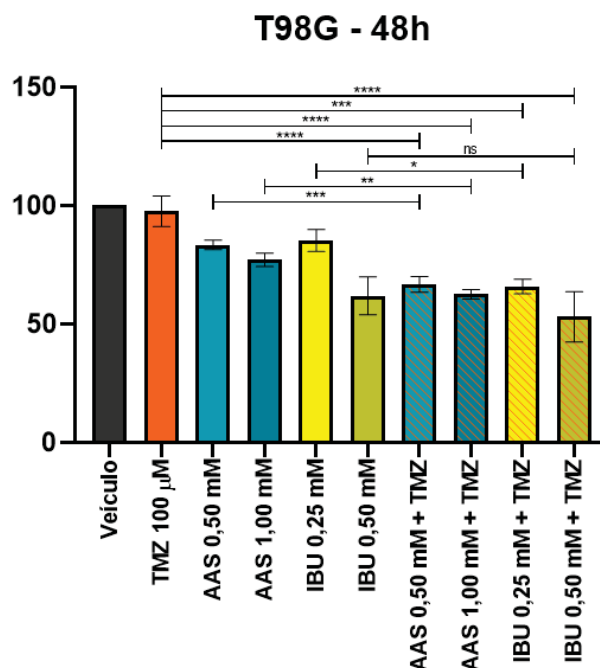
Fonte: O autor.

Nota: Gráfico de porcentagem de atividade metabólica obtido pelo ensaio de redução de MTT para a linhagem T98G tratada com AAS (0,50 mM e 1,00 mM) ou IBU (0,25 mM e 0,50 mM) isoladamente ou em combinação com TMZ 100 µM por 24 horas. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão em relação ao valor observado para os controles com veículo (EtOH 0,25% V/V para AAS e IBU isolados; DMSO 0,1% V/V para TMZ isolada; EtOH 0,25% V/V + DMSO 0,1% V/V para as combinações entre AAS ou IBU e TMZ), oriundos de três experimentos independentes realizados em quadruplicata (ns: não significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$).

No período de tratamento de 48 horas, a linhagem T98G voltou a apresentar resultados interessantes mediante o tratamento combinado de AAS com TMZ. A condição AAS 0,50 mM + TMZ forneceu uma redução da atividade metabólica para 66,7%, a qual é muito próxima da redução para 62,5% observada para a condição AAS 1,00 mM + TMZ, sendo ambas significativamente diferentes de suas respectivas condições isoladas (83,4% e 77,1%, respectivamente) (FIGURA 23). Já para o tratamento com ibuprofeno, nota-se um efeito de sensibilização somente do cotratamento de IBU

0,25 mM + TMZ (65,8%), ao ser comparado com o tratamento isolado correspondente (85,2%). O mesmo não ocorre para a condição IBU 0,50 mM combinada com TMZ (53,0%) e isolada (61,9%).

FIGURA 23: Determinação da atividade metabólica após o tratamento da linhagem T98G com diferentes combinações entre AAS, IBU e TMZ por 48 horas

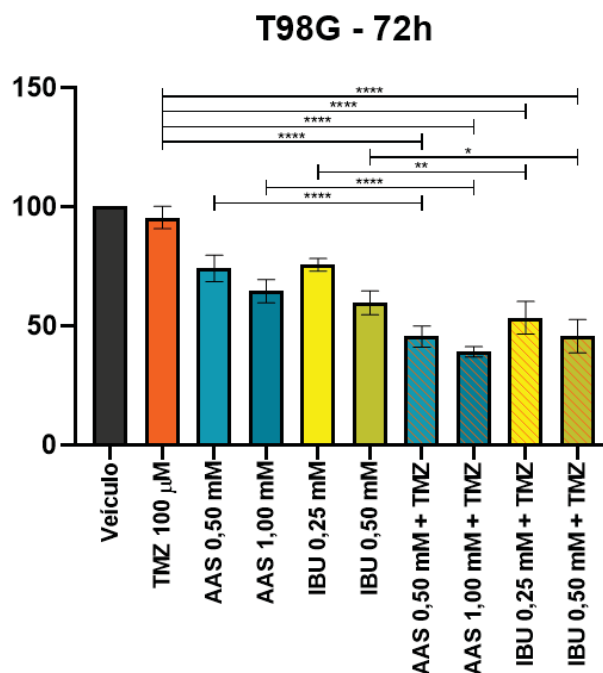


Fonte: O autor.

Nota: Gráfico de porcentagem de atividade metabólica obtido pelo ensaio de redução de MTT para a linhagem T98G tratada com AAS (0,50 mM e 1,00 mM) ou IBU (0,25 mM e 0,50 mM) isoladamente ou em combinação com TMZ 100 µM por 48 horas. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão em relação ao valor observado para os controles com veículo (EtOH 0,25% V/V para AAS e IBU isolados; DMSO 0,1% V/V para TMZ isolada; EtOH 0,25% V/V + DMSO 0,1% V/V para as combinações entre AAS ou IBU e TMZ), oriundos de três experimentos independentes realizados em quadruplicata (ns: não significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$).

Por fim, decorridas 72 horas de tratamento da linhagem T98G, o cotratamento de AAS com TMZ mostrou-se igualmente promissor. Apesar de novamente muito próximos entre si, os resultados obtidos para as condições AAS 0,50 mM + TMZ (45,5%) e AAS 1,00 mM + TMZ (39,1%) diferem largamente dos resultados das condições isoladas correspondentes (74,1% e 64,5%, respectivamente) (FIGURA 24). Ademais, o tratamento combinado de IBU 0,25 mM + TMZ (53,4%) demonstrou uma maior capacidade de redução da atividade metabólica do que o tratamento isolado com IBU 0,25 mM (75,6%), assim como o tratamento combinado e isolado de IBU 0,50 mM (45,7% e 59,7%, respectivamente).

FIGURA 24: Determinação da atividade metabólica após o tratamento da linhagem T98G com diferentes combinações entre AAS, IBU e TMZ por 72 horas



Fonte: O autor.

Nota: Gráfico de porcentagem de atividade metabólica obtido pelo ensaio de redução de MTT para a linhagem T98G tratada com AAS (0,50 mM e 1,00 mM) ou IBU (0,25 mM e 0,50 mM) isoladamente ou em combinação com TMZ 100 µM por 72 horas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão em relação ao valor observado para os controles com veículo (EtOH 0,25% V/V para AAS e IBU isolados; DMSO 0,1% V/V para TMZ isolada; EtOH 0,25% V/V + DMSO 0,1% V/V para as combinações entre AAS ou IBU e TMZ), oriundos de três experimentos independentes realizados em quadruplicata (ns: não significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$).

Ao longo de todo o experimento, o tratamento da linhagem T98G com TMZ 100 µM não apresentou diferença estatística em relação ao veículo, confirmando sua característica de resistência intrínseca a este fármaco (FIGURAS 22, 23 e 24). De maneira geral, a aspirina demonstrou capacidade de sensibilizar a linhagem T98G à TMZ nas diferentes concentrações e períodos avaliados, enquanto a modulação da responsividade mediada pelo ibuprofeno foi observada somente após 48 horas de tratamento. Para a linhagem U87MG, por sua vez, pouca ou nenhuma modulação foi observada para os tratamentos combinados de IBU e TMZ em comparação com o tratamento do anti-inflamatório isolado. Já para o cotratamento desta linhagem com aspirina, observou-se modulação somente na menor concentração avaliada (AAS 0,50 mM).

6.3 AVALIAÇÃO MOLECULAR DOS EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM AAS E IBU NAS LINHAGENS U87MG E T98G

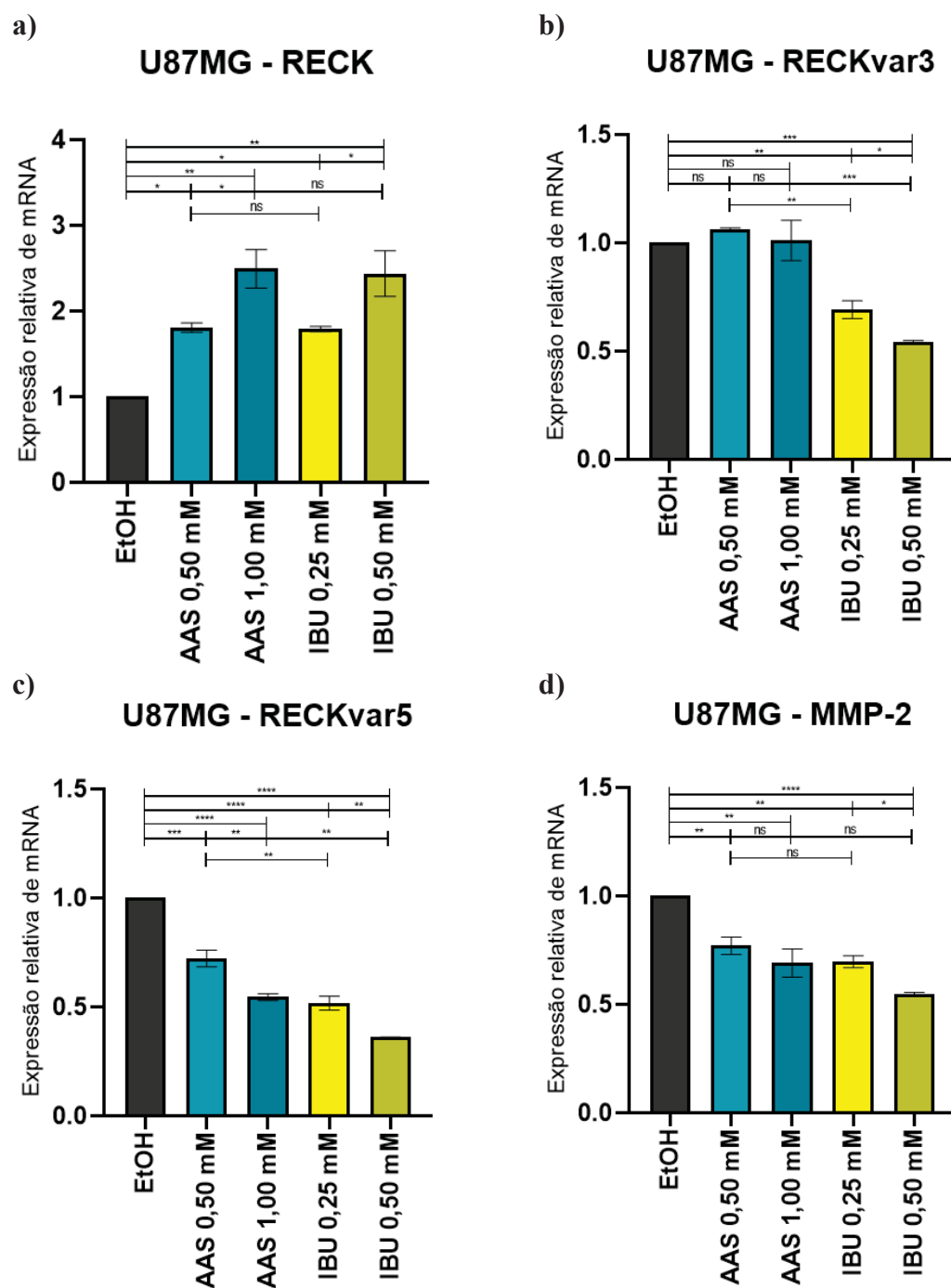
6.3.1 Análise da expressão de mRNA de RECK, RECKvar3, RECKvar5 e MMP-2

A possibilidade dos tratamentos com AAS e IBU modularem a expressão dos diferentes transcritos de RECK, bem como da MMP-2, em linhagens de glioblastoma humano foi investigada no presente trabalho, considerando a atividade regulatória em nível transcricional da aspirina e outros AINEs já descrita para estes alvos em outros modelos tumorais (PAN *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2002; NANWAT *et al.*, 2010).

Para a linhagem U87MG, observou-se que o tratamento com AAS por 24 horas promoveu um aumento da expressão do transcrito canônico RECK (AAS 0,50 mM: 180%; AAS 1,00 mM: 249%) sem modular, no entanto, a expressão do transcrito alternativo RECKvar3 (FIGURAS 25a e 25b). Já para o transcrito alternativo RECKvar5, observou-se uma redução nos níveis de mRNA equivalente a 72,3% e 54,5% mediante o tratamento com AAS 0,50 mM e 1,00 mM, respectivamente (FIGURA 25c). Houve, ainda, supressão da transcrição de MMP-2, cujos níveis de mRNA em relação ao controle foram de 77,0% para AAS 0,50 mM e 69,1% para AAS 1,00 mM (FIGURA 25d).

O tratamento da linhagem U87MG com ibuprofeno resulta igualmente em aumento da expressão do transcrito canônico RECK (IBU 0,25 mM: 179%; IBU 0,50 mM: 244%) (FIGURA 25a). Por sua vez, o tratamento com IBU 0,25 mM suprime a expressão de ambos os transcritos alternativos RECKvar3 (69,2%) e RECKvar5 (51,8%), bem como a expressão de MMP-2 (69,6%) (FIGURAS 25b-25d). De maneira semelhante, observa-se a diminuição dos níveis de mRNA de RECKvar3 (54,2%), RECKvar5 (36,2%) e MMP-2 (54,9%) após o tratamento com IBU 0,50 mM (FIGURAS 25b-25d).

FIGURA 25: Expressão relativa de mRNA dos transcritos RECK canônico, RECKvar3, RECKvar5 e de MMP-2 para a linhagem U87MG tratada com AAS ou IBU por 24 horas



Fonte: O autor.

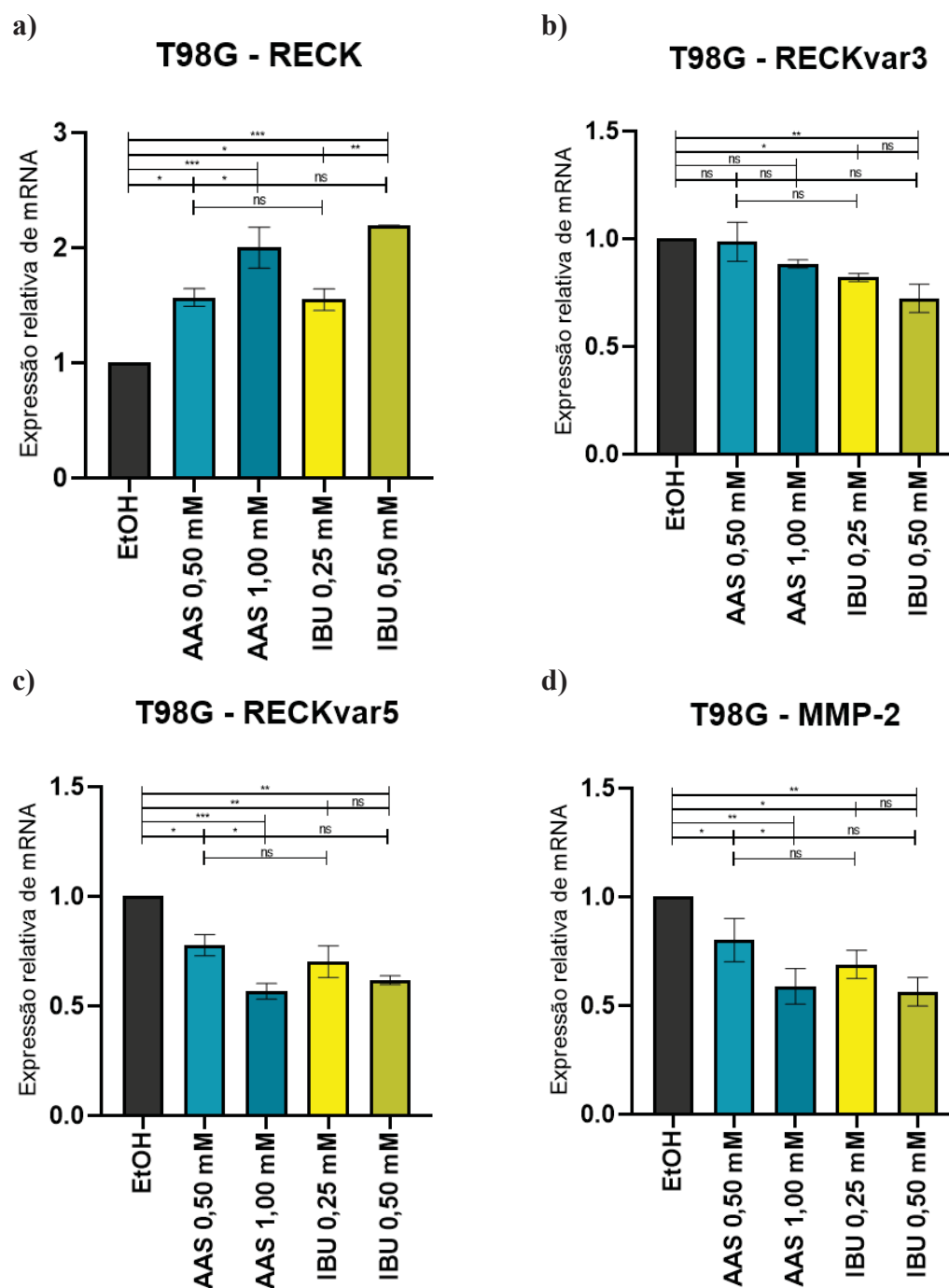
Nota: Gráfico de porcentagem de expressão de mRNA de (a) RECK, (b) RECKvar3, (c) RECKvar5 e (d) MMP-2 obtido por qRT-PCR para a linhagem U87MG tratada com AAS (0,50 mM e 1,00 mM) ou IBU (0,25 mM e 0,50 mM) por 24 horas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão em relação ao valor observado para o controle com veículo (EtOH 0,25% V/V), oriundos de dois experimentos independentes realizados em duplicata (ns: não significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$).

Para a linhagem T98G, um perfil muito semelhante foi observado. O aumento da concentração de AAS 0,50 mM para AAS 1,00 mM resulta em um aumento de 157% para 200% na expressão do transcrito canônico RECK (FIGURA 26a). Não ocorreu modulação significativa da expressão de RECKvar3 após o tratamento com AAS em nenhuma das concentrações avaliadas (FIGURA 26b). Ainda, o tratamento com AAS 0,50 mM promoveu supressão da expressão de RECKvar5 (77,3%) e MMP-2 (80,2%), assim como observado para a condição AAS 1,00 mM, cujas reduções na expressão de RECKvar5 e MMP-2 são de 56,8% e 58,9%, respectivamente (FIGURAS 26c e 26d).

Após o tratamento da linhagem T98G com ibuprofeno, observou-se novamente uma indução da expressão do transcrito canônico RECK para 155% (IBU 0,25 mM) e 219% (IBU 0,50 mM) em relação ao controle (FIGURAS 26a e 26b). Na menor concentração de IBU avaliada, são observados menores níveis de mRNA de RECKvar3 (82,0%), RECKvar5 (70,2%) e MMP-2 (68,9%) (FIGURAS 26b-26d). Similarmente, a condição de IBU 0,50 mM resulta em repressão da expressão dos transcritos alternativos RECKvar3 e RECKvar5 (72,4% e 61,8%, respectivamente), bem como de MMP-2 (56,4%) (FIGURAS 26b-26d).

De maneira geral, ambos os AINEs foram capazes de modular a expressão do gene *RECK* nas linhagens U87MG e T98G. Em termos de indução do transcrito canônico RECK, observou-se uma equivalência dos efeitos da menor concentração de cada fármaco entre si (AAS 0,50 mM e IBU 0,25 mM), bem como da maior concentração (AAS 1,00 mM e IBU 0,50 mM) (FIGURAS 25a e 26a). No entanto, especial destaque é conferido ao tratamento com ibuprofeno, o qual promoveu, simultaneamente, aumento da expressão do transcrito canônico e redução da expressão dos transcritos alternativos (FIGURAS 25a-25c e 26a-26c).

FIGURA 26: Expressão relativa de mRNA dos transcritos RECK canônico, RECKvar3, RECKvar5 e de MMP-2 para a linhagem T98G tratada com AAS ou IBU por 24 horas



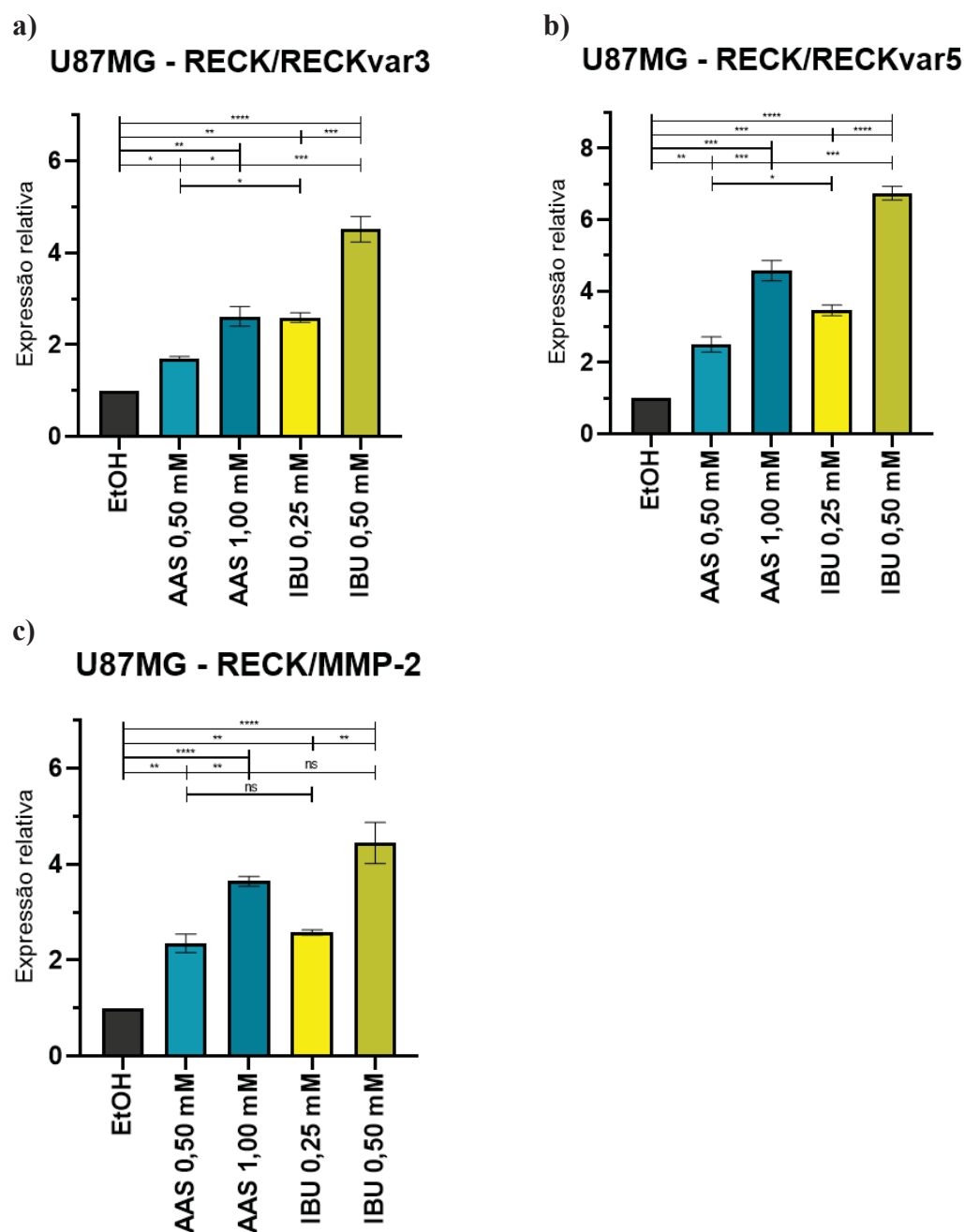
Fonte: O autor.

Nota: Gráfico de porcentagem de expressão de mRNA de (a) RECK, (b) RECKvar3, (c) RECKvar5 e (d) MMP-2 obtido por qRT-PCR para a linhagem T98G tratada com AAS (0,50 mM e 1,00 mM) ou IBU (0,25 mM e 0,50 mM) por 24 horas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão em relação ao valor observado para o controle com veículo (EtOH 0,25% V/V), oriundos de dois experimentos independentes realizados em duplicata (ns: não significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$).

Considerando a descrição do envolvimento de MMP-2, RECKvar3 e RECKvar5 com fenótipos pró-tumorais, por favorecerem processos como migração e invasão, entende-se que um efeito antitumoral mais pronunciado será observado em tratamentos que promovam a redução da expressão de tais alvos, bem como o aumento da expressão de RECK. Tais informações podem ser melhor representadas no formato de razões para compreender o balanço entre tais marcadores associados a fenótipos opostos.

Nesse sentido, observou-se que, apesar de apresentarem níveis de indução de RECK muito semelhantes na linhagem U87MG, as razões RECK/RECKvar3 e RECK/RECKvar5 entre as condições AAS 0,50 mM (1,70 e 2,50, respectivamente) e IBU 0,25 mM (2,58 e 3,46, respectivamente) são significativamente distintas (FIGURAS 27a e 27b). O mesmo foi observado ao serem comparadas as condições AAS 1,00 mM (RECK/RECKvar3 = 2,61; RECK/RECKvar5 = 4,57) e IBU 0,50 mM (RECK/RECKvar3 = 4,51; RECK/RECKvar5 = 6,74) (FIGURAS 27a e 27b). A equivalência entre a modulação positiva de RECK e negativa de MMP-2 entre os tratamentos AAS 0,50 mM e IBU 0,25 mM foi refletida nas suas razões RECK/MMP-2 (2,35 e 2,57, respectivamente), assim como entre os tratamentos AAS 1,00 mM e IBU 0,50 mM (3,64 e 4,44, respectivamente) (FIGURA 27c). De maneira geral, uma maior modulação do balanço entre os transcritos RECK/RECKvar5 foi observada em todas as condições para a linhagem U87MG.

FIGURA 27: Razão entre a expressão de mRNA do transcrito RECK canônico e de RECKvar3, RECKvar5 e MMP-2 para a linhagem U87MG tratada com AAS ou IBU por 24 horas



Fonte: O autor.

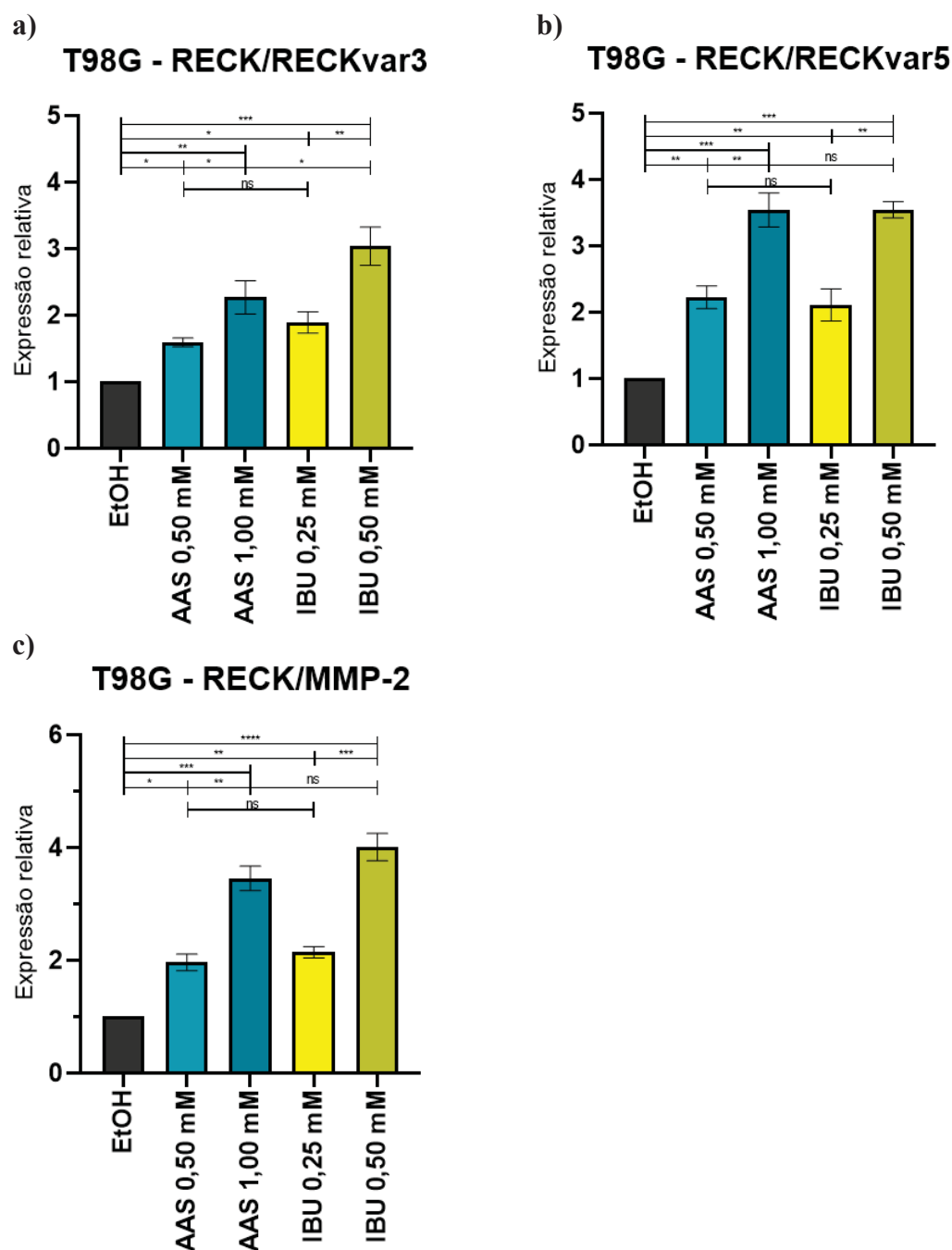
Nota: Gráficos de razão da expressão de mRNA de (a) RECK/RECKvar3, (b) RECK/RECKvar5 e (c) RECK/MMP-2 obtidos por qRT-PCR para a linhagem U87MG tratada com AAS (0,50 mM e 1,00 mM) ou IBU (0,25 mM e 0,50 mM) por 24 horas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão em relação ao valor observado para o controle com veículo (EtOH 0,25% V/V), oriundos de dois experimentos independentes realizados em duplicata (ns: não significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$).

Ao ser analisada a linhagem T98G, observou-se um aumento na razão RECK/RECKvar3 com o aumento da concentração entre AAS 0,50 mM (1,59) e AAS 1,00 mM (2,27) (FIGURA 28a). Não existe, no entanto, diferença significativa entre tais valores e aquele observado para a condição IBU 0,25 mM (1,89). A maior modulação do balanço entre RECK e RECKvar3 é obtida pelo tratamento com IBU 0,50 mM (3,04).

Para o tratamento da linhagem T98G com aspirina, observou-se um aumento concentração-dependente das razões RECK/RECKvar5 (AAS 0,50 mM: 2,22; AAS 1,00 mM: 3,54) e RECK/MMP-2 (AAS 0,50 mM: 1,96; AAS 1,00 mM: 3,45) (FIGURAS 28b e 28c). Resultados muito semelhantes foram obtidos para os tratamentos com ibuprofeno, tanto para o balanço entre os transcritos RECK/RECKvar5 (IBU 0,25 mM: 2,11; IBU 0,50 mM: 3,54) como para o balanço entre RECK e MMP-2 (IBU 0,25 mM: 2,14; IBU 0,50 mM: 4,01) (FIGURAS 28b e 28c). De maneira geral, torna-se possível distinguir os efeitos de AAS 1,00 mM e IBU 0,50 mM somente para o balanço entre RECK/RECKvar3.

Por fim, é possível observar uma maior responsividade da modulação da expressão dos transcritos de *RECK* mediante o tratamento com ibuprofeno para ambas as linhagens. Em outras palavras, o efeito causado nas razões RECK/RECKvar3 e RECK/RECKvar5 pelo tratamento com ibuprofeno em determinada concentração mostrou-se igual ou superior àquele proporcionado pelo tratamento com o dobro da concentração de aspirina.

FIGURA 28: Razão entre a expressão de mRNA do transcrito RECK canônico e de RECKvar3, RECKvar5 e MMP-2 para a linhagem T98G tratada com AAS ou IBU por 24 horas



Fonte: O autor.

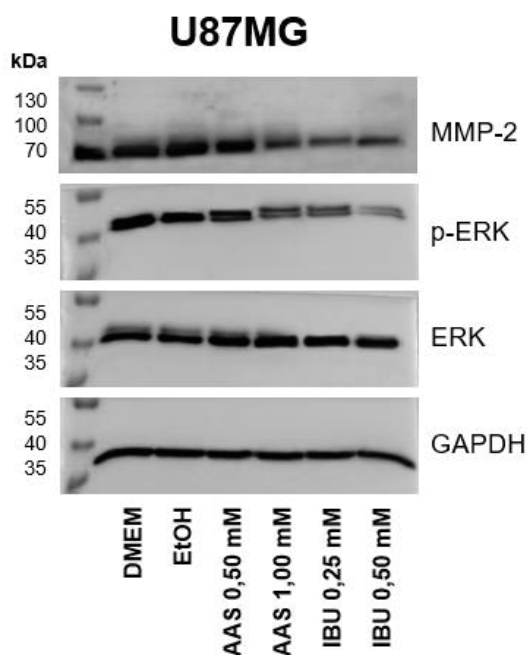
Nota: Gráficos de razão da expressão de mRNA de (a) RECK/RECKvar3, (b) RECK/RECKvar5 e (c) RECK/MMP-2 obtidos por qRT-PCR para a linhagem T98G tratada com AAS (0,50 mM e 1,00 mM) ou IBU (0,25 mM e 0,50 mM) por 24 horas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão em relação ao valor observado para o controle com veículo (EtOH 0,25% V/V), oriundos de dois experimentos independentes realizados em duplicata (ns: não significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$).

6.3.2 Análise da expressão proteica de (p)-ERK e MMP-2

Buscou-se, em seguida, avaliar o efeito da modulação de MMP-2 e MMP-9 em nível proteico mediante o tratamento das linhagens U87MG e T98G com AAS e IBU, bem como o envolvimento de ERK em tal modulação, conforme já descrito em outros modelos tumorais (LIU *et al.*, 2002; NANWAT *et al.*, 2010).

Para a linhagem U87MG, observou-se uma redução da expressão de MMP-2 após o tratamento por 24 horas com AAS 1,00 mM, acompanhada da redução da marcação referente à forma fosforilada de ERK (p-ERK) (FIGURA 29). Ainda, os tratamentos com IBU 0,25 mM e IBU 0,50 mM proporcionaram, igualmente, uma repressão acentuada da expressão de MMP-2 e de p-ERK.

FIGURA 29: Imunodeteção de MMP-2, p-ERK e ERK para a linhagem U87MG tratada com AAS e IBU por 24 horas



Fonte: O autor.

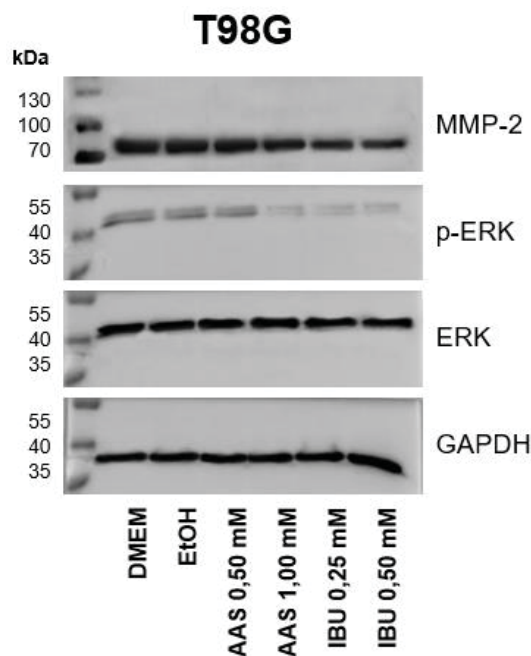
Nota: 50 µg de proteínas do extrato proteico total de células da linhagem U87MG tratadas com AAS (0,50 mM e 1,00 mM), IBU (0,25 mM e 0,50 mM) ou o controle com veículo (EtOH 0,25% V/V) por 24 horas foi submetido a SDS-PAGE e transferência úmida para membrana de PVDF. As membranas foram hibridizadas com os anticorpos primários anti-MMP-2 (1:1000), anti-p-ERK (1:1000), anti-ERK (1:1000), anti-GAPDH (1:4000), seguida de incubação com anticorpo secundário anti-Mouse (1:5000) para detecção de GAPDH e anti-Rabbit (1:10000) para os demais alvos. A imagem é representativa de um único experimento independente.

Quanto à linhagem T98G, novamente, parece haver redução da expressão de MMP-2 somente para a maior concentração de AAS analisada (AAS 1,00 mM) após 24

horas de tratamento, sendo esta redução acompanhada de menores níveis de p-ERK (FIGURA 30). Os tratamentos com IBU 0,25 mM e IBU 0,50 mM resultaram em redução dos níveis de MMP-2 e p-ERK, apesar de não ser perceptível um efeito concentração-dependente.

Para ambas as linhagens, a condição de AAS 0,50 mM parece desempenhar pouco ou nenhum efeito no tocante à modulação de MMP-2 ou à inibição da fosforilação de ERK. Ademais, não houve modulação dos níveis proteicos de ERK com nenhum tratamento.

FIGURA 30: Imunodeteccção de MMP-2, p-ERK e ERK para a linhagem T98G tratada com AAS e IBU por 24 horas



Fonte: O autor.

Nota: 50 µg de proteínas do extrato proteico total de células da linhagem T98G tratadas com AAS (0,50 mM e 1,00 mM), IBU (0,25 mM e 0,50 mM) ou o controle com veículo (EtOH 0,25% V/V) por 24 horas foi submetido a SDS-PAGE e transferência úmida para membrana de PVDF. As membranas foram hibridizadas com os anticorpos primários anti-MMP-2 (1:1000), anti-p-ERK (1:1000), anti-ERK (1:1000), anti-GAPDH (1:4000), seguida de incubação com anticorpo secundário anti-Mouse (1:5000) para detecção de GAPDH e anti-Rabbit (1:10000) para os demais alvos. A imagem é representativa de um único experimento independente.

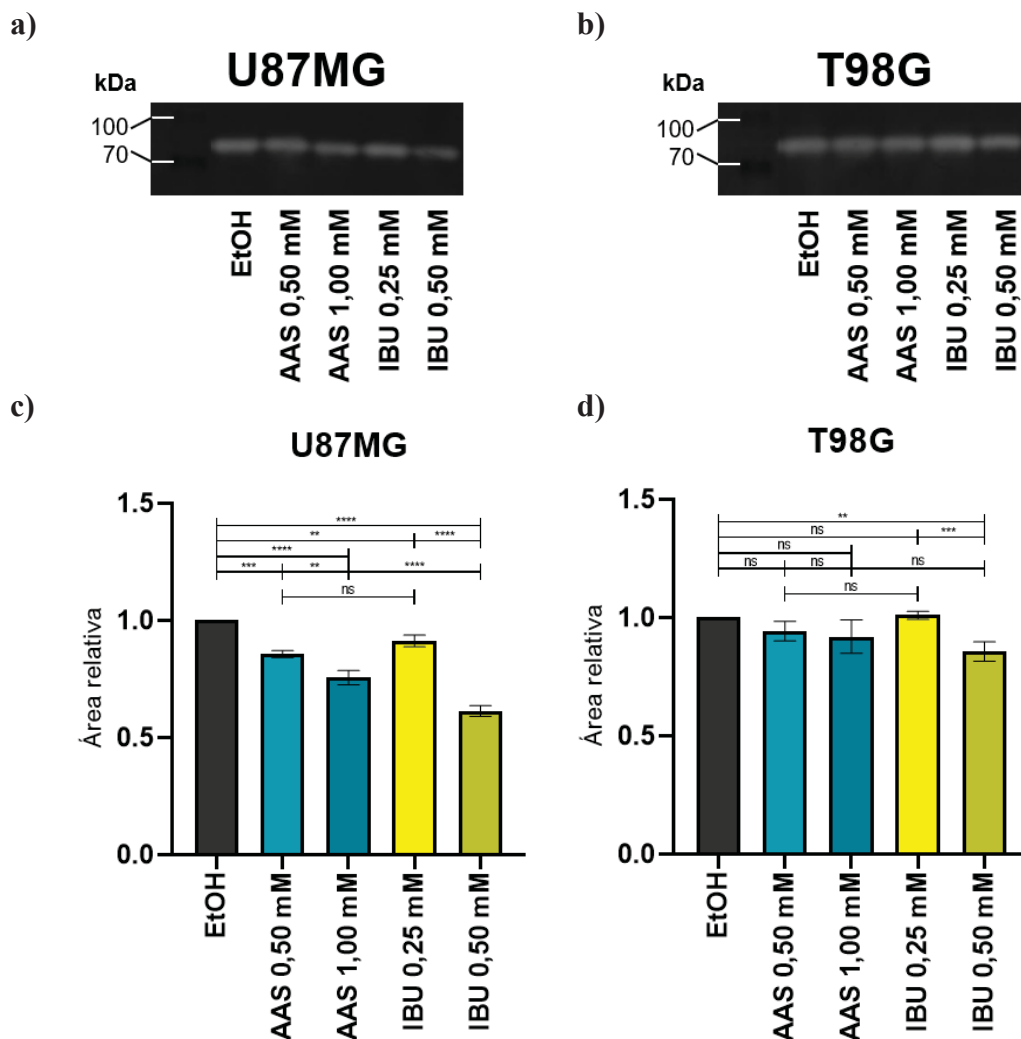
6.3.3 Análise da secreção e atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9

Por fim, com o intuito de quantificar MMPs com atividade gelatinolítica secretadas para o meio extracelular, foi realizado o ensaio de zimografia em gelatina do

meio condicionado das linhagens U87MG e T98G após 24 horas de tratamento com AAS ou IBU.

Para a linhagem U87MG, o tratamento com AAS 0,50 mM por 24 horas resultou em uma redução para 85,6% da área da banda referente à MMP-2 para o controle, sendo este efeito intensificado pelo tratamento com AAS 1,00 mM (75,6%) (FIGURAS 31a e 31c). De maneira semelhante, o tratamento com IBU 0,25 mM promoveu uma redução para 91,3% do valor observado para o controle. Ao ser aumentada a concentração para IBU 0,50 mM, observa-se o marcante resultado de 61,3%. No entanto, apenas a condição IBU 0,50 mM promove redução significativa dos níveis de MMP-2 no meio condicionado da linhagem T98G após o tratamento por 24 horas (FIGURAS 31b e 31d). Não foi detectada atividade proteolítica na região correspondente à MMP-9 (90 kDa). Ademais, não foi possível resolver as formas pró-MMP-2 e MMP-2 ativa (68 e 72 kDa, respectivamente).

FIGURA 31: Detecção de atividade gelatinolítica de MMP-2 em meio condicionado das linhagens U87MG e T98G tratadas com AAS e IBU por 24 horas



Fonte: O autor.

Nota: 25 µg de proteínas do sobrenadante de células das linhagens U87MG e T98G após o tratamento com AAS (0,50 mM e 1,00 mM), IBU (0,25 mM e 0,50 mM) ou o controle com veículo (EtOH 0,25% V/V) em DMEM contendo 0,1% BSA foi submetido à eletroforese em gel de poliácridamida copolimerizada com gelatina. Após o período destinado à renaturação e desenvolvimento da reação de proteólise das MMPs, os géis referentes às linhagens (a) U87MG e (b) T98G foram corados com Coomassie Blue 0,5% m/V e fotodocumentados. Três densitometrias para cada banda foram realizadas com o *software* ImageJ. Os resultados são apresentados para a linhagem (c) U87MG e (d) T98G como média ± desvio padrão em relação à área observada para o controle com veículo (EtOH 0,25% V/V), oriundos de um único experimento independente (ns: não significativo; *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001; ****: p < 0,0001).

7. DISCUSSÃO

Dentre a grande família dos AINEs, foram selecionados a aspirina (AAS) e o ibuprofeno (IBU) para o desenvolvimento deste trabalho. Enquanto AAS corresponde a um bom protótipo de estudo, ao serem considerados os artigos que evidenciam a atividade antitumoral de AINEs e sua capacidade de modular a expressão de RECK e/ou MMPs, o IBU foi selecionado através de análises de modelagem molecular, as quais revelaram um conjunto de características estruturais e físico-químicas deste fármaco mais adequado para a atuação no SNC.

Buscou-se, inicialmente, investigar o efeito do tratamento das linhagens U87MG e T98G com diferentes concentrações de AAS e IBU sobre a viabilidade celular. Embora o conceito de viabilidade celular seja amplo e não seja diretamente acessível, são bem aceitas as metodologias de redução de MTT e coloração com cristal violeta para vislumbrá-lo. Enquanto a primeira considera como viáveis as células capazes de reduzir o composto MTT e, portanto, encontram-se metabolicamente ativas, o ensaio com cristal violeta se baseia na capacidade de adesão para inferir a viabilidade.

Os dados do presente trabalho mostraram que os tratamentos com AAS e IBU por 24 e 48 horas são capazes de reduzir os índices de atividade metabólica e adesão celular das linhagens U87MG e T98G. De maneira geral, nos dois períodos de tratamento analisados, uma maior sensibilidade aos tratamentos com ibuprofeno foi observada. Tal afirmação é baseada não apenas nos resultados expressivos obtidos para as maiores concentrações de IBU (0,50 mM e 1,00 mM), mas também na constatação de que, comumente, o efeito de uma dada concentração de ibuprofeno era muito semelhante ou maior do que aquele observado para o tratamento com dobro da concentração de aspirina.

Para a grande maioria das condições analisadas, foram obtidos resultados muito semelhantes para ambos os ensaios. No entanto, após o tratamento da linhagem T98G por 48 horas com as diferentes concentrações de AAS, são obtidos valores pelo ensaio de MTT maiores do que aqueles observados para as respectivas condições pelo ensaio de cristal violeta, sugerindo que as células que permaneceram aderidas após o tratamento encontram-se metabolicamente mais ativas. O mecanismo por detrás disso ou a consequência biológica desta observação ainda não são conhecidos, mas pode-se sugerir que se trata de uma resposta compensatória para promover a sobrevivência celular nessas condições. Por sua vez, o tratamento de ambas as linhagens por 48 horas com IBU 1,00 mM resultou em valores de atividade metabólica inferiores às respectivas porcentagens

de células aderidas, o que pode ser indicativo de morte celular efetivamente. No entanto, com os resultados disponíveis ainda não é possível distinguir claramente entre a ocorrência de processos de morte celular, alteração na progressão ou bloqueio do ciclo celular ou alterações na capacidade de adesão, sendo necessários experimentos adicionais para isto. Permanece também como necessidade de investigação se tais efeitos seriam ou não dependentes da inibição do alvo farmacológico mais bem caracterizado dos AINEs: a isoforma COX-2. Vale destacar, no entanto, que tais fármacos possuem mecanismos de inibição distintos: enquanto a aspirina atua de maneira irreversível pela acetilação de Ser⁵³⁰ das ciclo-oxigenases, a inibição mediada pelo ibuprofeno é de natureza reversível e competitiva com o substrato (BLOBAUM; MARNETT, 2007).

Encontram-se na literatura diversas evidências que relacionam a via de COX-2/PGE₂ com marcadores de CSCs (LIAO *et al.*, 2015; WANG, D. *et al.*, 2015). Apesar da maior agressividade e resistência a intervenções quimioterápicas características desta subpopulação tumoral, é conhecida a capacidade destas células de formarem colônias denominadas esferoides. Uma das maneiras de acessar a capacidade de formação de esferoides é através do cultivo celular em *hanging drops*, tendo esta metodologia já sido padronizada em nosso laboratório (BARK, 2017). Nesse sentido, investigou-se a possibilidade dos AINEs selecionados afetarem a capacidade de formação de neuroesferas.

Observou-se que não houve alteração da morfologia ou do número de esferoides formados pela linhagem U87MG quando tratada com IBU por 72 horas. Ao recapitularmos os efeitos observados pelo tratamento desta linhagem em cultivo 2D por 48 horas com ibuprofeno, no entanto, torna-se evidente a possibilidade de serem obtidas respostas diferentes ao serem comparados experimentos realizados em monocamada ou em cultivo tridimensional, ainda que para uma mesma linhagem celular. Por outro lado, quando cultivada na presença de AAS 0,50 mM, os esferoides derivados da linhagem U87MG apresentam alterações morfológicas, a exemplo de bordas irregulares e menor compactação celular, sendo este efeito ainda mais evidente na condição AAS 1,00 mM. Por sua vez, a linhagem T98G mostrou ter sua capacidade de formação de esferoides prejudicada pelo tratamento com ambos os AINEs, em todas as concentrações analisadas. Um resultado semelhante é encontrado na literatura: ao serem tratadas com NS-398, um inibidor seletivo de COX-2, houve uma redução expressiva na capacidade de formação de neuroesferas derivadas das linhagens U87MG e T98G cultivadas em meio definido (PALUMBO *et al.*, 2020). Este resultado serve como indício de que a alteração na

formação de esferoides pela metodologia de *hanging drops* observada neste trabalho para as linhagens U87MG e T98G mediante o tratamento com AAS e IBU pode estar relacionada com a inibição de COX-2, ainda que a eventualidade deste resultado ser dependente de outros processos celulares ainda não possa ser descartada. A partir dos resultados obtidos, surgem como possibilidades de investigação futura avaliar se o tratamento com AINEs efetivamente reduz a subpopulação de CSCs, se a produção de PGE₂ é inibida, bem como se ocorrem processos de morte celular mediante o tratamento de esferoides das linhagens U87MG e T98G com AAS e IBU.

Objetivou-se, em seguida, avaliar se o tratamento com AINEs poderia inibir a migração de células a partir de esferoides das linhagens U87MG e T98G quando na presença de um substrato aderente. Para a linhagem T98G, o tratamento com AAS 0,50 mM foi capaz de inibir a proliferação somente em 48 horas, período no qual ocorre ainda a intensificação do efeito inibitório observado para os demais tratamentos em 24 horas. Por sua vez, nota-se que o efeito inibitório na migração de células U87MG promovido por AAS e IBU não é tempo-dependente, mas, sim, concentração-dependente. O efeito mais expressivo de inibição da migração na linhagem U87MG torna-se evidente ao serem observadas a menor variação na área relativa à condição inicial, bem como o aspecto menos difuso dos esferoides após 48 horas. Estes resultados encontram-se em concordância com o efeito de inibição de migração relatado para a aspirina e para o ibuprofeno utilizando culturas primárias de glioblastoma humano como modelo (NAVONE *et al.*, 2018; LEIDGENS *et al.*, 2015). Considerando, ainda, que o tratamento das linhagens U87MG e T98G com NS-398 (inibidor seletivo de COX-2) proporciona redução da capacidade de migração, é razoável sugerir que os resultados observados neste trabalho utilizando AAS e IBU nestas mesmas linhagens estejam, ao menos parcialmente, relacionados com a inibição de COX-2 (PALUMBO *et al.*, 2020). Pretende-se, futuramente, avaliar o efeito de inibição da migração em monocamada, a fim de serem estabelecidas correlações mais diretas com os resultados obtidos nos demais experimentos.

A fim de averiguar o potencial de AAS e IBU como fármacos adjuvantes ao tratamento quimioterápico de GB, foi avaliado o efeito de suas combinações com TMZ, quimioterápico que compõe o regime terapêutico padrão deste tipo tumoral, empregando as linhagens U87MG e T98G como modelos. Para a linhagem U87MG, a condição AAS 0,50 mM foi a única que apresentou um efeito de sensibilização à ação do quimioterápico em todos os períodos de tratamento analisados. Curiosamente, para a linhagem T98G, o

tratamento com AAS em ambas as concentrações apresentou um potencial de sensibilização à ação da TMZ ao longo de todo o experimento, enquanto uma pequena modulação da responsividade ao quimioterápico mediada pelo ibuprofeno passa a ser observada somente após 48 horas de tratamento. Ming e colaboradores, no entanto, relatam que o cotratamento da linhagem U87MG por 72 horas com AAS 1,00 mM e TMZ 100 μ M é significativamente diferente do tratamento isolado com AAS na mesma concentração, bem como a ausência de um efeito de sensibilização desta combinação para a linhagem T98G (MING *et al.*, 2017). Apesar de inicialmente contraditórios, é necessário ressaltar que tais resultados foram obtidos através de uma metodologia distinta (CCK-8). Ademais, caracteriza-se como perspectiva futura investigar se há indução de morte celular mediante o cotratamento de AAS ou IBU com TMZ nestas linhagens a fim de fazer uma melhor ponderação acerca da modulação da responsividade ao tratamento quimioterápico.

Sabe-se que o gene *RECK*, descrito como um supressor tumoral em virtude de sua atuação como inibidor fisiológico da expressão e atividade de MMPs, correlaciona-se negativamente com a agressividade em diversos tipos de neoplasias (JACOMASSO *et al.*, 2020; TAKENAKA *et al.*, 2004). Relatos na literatura revelam que AINEs podem modular a expressão de *RECK*, contudo, pouco se conhece acerca da regulação da expressão de transcritos formados por *splicing* alternativo deste gene, a exemplo de *RECKvar3* e *RECKvar5*, cujas expressões desenvolvem fenótipos opostos àquele observado para o transcrito canônico (LIU *et al.*, 2002; TROMBETTA-LIMA *et al.*, 2015).

Procedeu-se, em sequência, com a análise da expressão dos diferentes transcritos do gene *RECK* e de MMP-2 após o tratamento com AAS e IBU por 24 horas nas linhagens U87MG e T98G. Em termos de indução do transcrito canônico *RECK*, observa-se uma equivalência dos efeitos da menor concentração de cada fármaco entre si (AAS 0,50 mM e IBU 0,25 mM), bem como da maior concentração (AAS 1,00 mM e IBU 0,50 mM) para ambas as linhagens. Constata-se, ainda, a redução da expressão de MMP-2 mediada pelos tratamentos com AAS e IBU para as linhagens U87MG e T98G. Destaca-se, no entanto, o tratamento com ibuprofeno por promover, simultaneamente, o aumento da expressão do transcrito canônico e a redução da expressão de ambos os transcritos alternativos nas duas linhagens.

É intrigante o fato do tratamento com AAS em ambas as linhagens promover o silenciamento de *RECKvar5* sem alterar, no entanto, a expressão de *RECKvar3*. Um

possível mecanismo que poderia estar por detrás disso seria o silenciamento mediado por micro-RNAs (miRNA), os quais sabidamente atuam reduzindo a estabilidade do mRNA maduro ou impedindo a sua tradução. Através do alinhamento das sequências destes transcritos, observa-se que o transcrito RECKvar3 possui uma região 3' distinta (638-765) de RECKvar5 (638-750) (TABELA 3 em APÊNDICES). A busca por miRNA complementares a estas regiões pela ferramenta miRBase retornou dois miRNA para RECKvar3 (hsa-miR-219b-3p e hsa-miR-5192) e um RECKvar5 (hsa-miR-190a-5p), apresentados na TABELA 4 (APÊNDICES) (KOZOMARA; BIRGAOANU; GRIFFITHS-JONES, 2018). Relatos na literatura dão suporte ao papel de supressores tumorais de miR-219, cuja superexpressão reduz a capacidade de migração em modelo celular de câncer de estômago, bem como de miR-190, por inibir processos de invasão e migração em linhagens de hepatocarcinoma (LEI *et al.*, 2013; WANG, X. *et al.*, 2015). Apesar de não dispormos de evidências experimentais do envolvimento destes microRNAs na regulação dos transcritos alternativos do gene *RECK*, a detecção de sítios de ligação a miRNA nas regiões 3' e o fenótipo de inibição de migração observado em outros modelos experimentais sugerem a ocorrência de um mecanismo de regulação desta natureza.

Ainda, ao serem avaliadas as razões entre as expressões dos diferentes transcritos de *RECK*, percebe-se que maiores razões RECK/RECKvar3 e RECK/RECKvar5 são obtidas pelo tratamento da linhagem U87MG com IBU. Já a linhagem T98G, além de apresentar valores das razões menores do que aqueles obtidos para U87MG, responde de maneira muito semelhante às maiores concentrações e às menores concentrações de cada fármaco – com exceção da razão RECK/RECKvar3, que é maior para IBU 0,50 mM quando comparada à condição AAS 1,00 mM.

Sabe-se, que a proteína RECK canônica forma dímeros ancorados em balsas lipídicas na membrana plasmática, sendo tais características fundamentais para sua atividade de inibição de MMPs (OMURA *et al.*, 2008). Utilizando fibroblastos como modelo, Lee e colaboradores observaram o silenciamento de RECKvar5 com shRNA relaciona-se com uma menor capacidade de migração e invasão *in vitro* (LEE *et al.*, 2018; LEE; BOSOMPRA; COLLIER, 2019). Através de ensaios de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC), os autores demonstraram que RECKvar5 liga-se à proteína RECK canônica, sendo este um possível mecanismo que explicaria os fenótipos opostos observados para RECK e RECKvar5 (LEE *et al.*, 2018). Esta relação é verdadeira para os resultados obtidos neste trabalho, os quais demonstraram uma menor capacidade

de migração da linhagem U87MG, bem como uma maior razão RECK/RECKvar5 frente à linhagem T98G, promovidas pelo tratamento com AAS ou IBU.

Buscou-se, em seguida, acessar a modulação de MMP-2 mediante o tratamento com AAS e IBU nas linhagens U87MG e T98G, bem como caracterizar o envolvimento de ERK nesta modulação. Sabe-se que a fosforilação do fator de transcrição Sp1 mediada por ERK regula a expressão de RECK e de MMP-2 de maneira recíproca: enquanto a ligação de Sp1 à região regulatória de *RECK* atenua a sua transcrição, MMP-2 tem sua expressão promovida por este mesmo mecanismo (SASAHARA *et al.*, 2002; PAN *et al.*, 2002). Interessantemente, alguns AINEs são capazes de modular a expressão de RECK e de MMPs, sendo observada uma concomitante redução da fosforilação de ERK em diferentes modelos tumorais (LIU *et al.*, 2002; NANWAT *et al.*, 2010). Dentre os mecanismos por detrás desta observação, estariam o bloqueio da interação entre Ras/c-Raf, que se encontram à montante de ERK na via de MAPK, bem como a ativação de fosfatases que atuam sobre esta mesma via (PAN *et al.*, 2008). Apesar da relação de prostaglandina E₂, seus receptores e a via de MAPK, o envolvimento da via de COX-2/PGE₂ nesta regulação ainda não é totalmente compreendido: enquanto a adição de PGE₂ exógena reverte a inibição de MMP-2 promovida pela inibição de COX-2, não foi observado efeito na regulação de RECK em modelos de câncer de pulmão (LIU *et al.*, 2002; PAN *et al.*, 2001).

Para a linhagem U87MG, há uma redução da expressão de MMP-2 após o tratamento por 24 horas com AAS já na concentração de 0,50 mM, sendo seguro afirmar, no entanto, que ocorre repressão de MMP-2 nesta linhagem mediante o tratamento com AAS 1,00 mM. De fato, esta regulação relaciona-se com redução dos níveis de p-ERK, em concordância com outros modelos descritos na literatura. Efeitos ainda mais pronunciados foram observados para o tratamento com IBU. Estes resultados são interessantes pois, apesar da regulação ao nível transcricional ter sido muito semelhante para os diferentes tratamentos da linhagem U87MG, existe claramente um maior potencial de redução dos níveis proteicos de MMP-2 promovido pelo ibuprofeno.

Para a linhagem T98G, novamente, a repressão da expressão de MMP-2 causada pelo tratamento por 24 horas com AAS foi mais evidente na concentração de 1,00 mM, na qual observou-se também uma marcante redução dos níveis de ERK fosforilado. Para os tratamentos com IBU, nos quais se observa uma maior repressão da expressão de MMP-2, não há um efeito concentração-dependente da modulação de tal modulação, bem como da redução de p-ERK. Apesar da regulação transcricional de MMP-2 para esta

linhagem ser muito semelhante para as condições AAS 1,00 mM, IBU 0,25 mM e IBU 0,50 mM, a expressão proteica desta MMP é mais sensível ao tratamento com ibuprofeno. Contudo, existe a necessidade de avaliar a reprodutibilidade dos resultados obtidos para ambas as linhagens, considerando que estes refletem a realização de um único experimento independente. Ainda, seria muito interessante avaliar a modulação da expressão da proteína RECK canônica para estas condições.

Finalmente, foram acessados os níveis de secreção e atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 no meio condicionado das linhagens U87MG e T98G após o tratamento por 24 horas com AAS e IBU. Para a linhagem U87MG, reduções concentração-dependente dos níveis de atividade de MMP-2 no sobrenadante foram observadas para os tratamentos com AAS e com IBU, correlacionando-se com o efeito observado no ensaio de migração. Este resultado torna-se ainda mais interessante ao serem resgatadas as observações de que não houve um efeito concentração-dependente do tratamento desta linhagem com AAS na modulação transcricional de MMP-2 ou do tratamento com IBU na expressão proteica desta MMP, evidenciando a coexistência de mecanismos de regulação da expressão gênica em diferentes níveis. Já para linhagem T98G, houve redução significativa da atividade gelatinolítica de MMP-2 apenas mediante o tratamento com IBU 0,50 mM por 24 horas, a despeito da modulação de mRNA e proteína de MMP-2 observada para as demais condições. Não foi detectada atividade proteolítica na região correspondente à MMP-9 (90 kDa). Ademais, não foi possível resolver as formas pró-MMP-2 e MMP-2 ativa (68 e 72 kDa, respectivamente), reforçando a necessidade de repetir este experimento a fim de refinar o resultado. Por fim, destaca-se que um melhor entendimento desta regulação nas linhagens U87MG e T98G tratadas com AAS e IBU será possibilitado pela avaliação da modulação da expressão proteica de RECK e MT1-MMP, visto que tais proteínas encontram-se diretamente relacionadas com a ativação proteolítica de MMP-2.

8. CONCLUSÕES

Empregando as linhagens de GB humano U87MG e T98G, foram observados diferentes mecanismos pelos quais os tratamentos com AAS e IBU podem desempenhar uma atividade antitumoral. Destacam-se, nesse sentido, a redução na viabilidade celular observada pelos menores índices de atividade metabólica e redução da população de células aderidas mediante o tratamento destas linhagens com AAS e IBU, sendo observada uma maior sensibilidade para o tratamento com IBU. A capacidade de formação de esferoides de ambas as linhagens foi prejudicada na presença de AAS, enquanto o tratamento com IBU teve efeito somente na linhagem T98G. Um efeito marcante de inibição da migração foi obtido para células em esferoides da linhagem U87MG tratadas com AAS e IBU, ainda que este efeito não seja tempo-dependente como foi observado empregando esferoides derivados da linhagem T98G. De maneira muito interessante, foi observado que o tratamento da linhagem T98G com AAS é capaz de sensibilizar esta linhagem intrinsecamente resistente à ação da TMZ em todos os períodos analisados, enquanto o cotratamento com IBU demonstra aumento da responsividade à TMZ a partir de 48 horas, principalmente. Para a linhagem U87MG, no entanto, somente o cotratamento de AAS 0,50 mM + TMZ demonstrou um aumento significativo na resposta em relação a seus respectivos tratamentos isolados ao longo de todo o experimento.

Do ponto de vista molecular, observou-se que o tratamento das linhagens U87MG e T98G com AAS e IBU é capaz de reduzir os níveis de mRNA de MMP-2 e induzir a expressão do gene supressor tumoral *RECK*. Especial destaque é conferido ao tratamento com IBU por ter promovido, simultaneamente, o aumento da expressão do transcrito canônico de *RECK* e a redução da expressão de ambos os transcritos alternativos nas duas linhagens. A análise de expressão gênica no nível proteico revelou um maior potencial do tratamento com IBU em reduzir a expressão de MMP-2, bem como um possível envolvimento de ERK como intermediário na regulação de *RECK* e *MMP-2*. Ademais, a redução observada no ensaio de zimografia em gelatina para a linhagem U87MG revela a possibilidade de AAS e IBU atuarem ainda em outros níveis de regulação de MMP-2, como na secreção ou ativação desta metaloproteinase. Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho reforçam o potencial de AINEs na terapia antineoplásica e fornecem evidências de novos mecanismos de ação para esta classe de fármacos no contexto tumoral.

9. PERSPECTIVAS

Com o desenvolvimento deste trabalho, surgem novas possibilidades de estudo e novas abordagens experimentais que valem a pena ser destacadas: análises de morte celular por citometria de fluxo para as linhagens U87MG e T98G tratadas com diferentes concentrações de AAS e IBU, tanto isolada como combinadamente com TMZ, tornam-se muito interessantes para caracterizar o potencial de modulação à responsividade quimioterápica destes fármacos. A análise de ciclo celular, também por citometria de fluxo, poderia demonstrar o efeito de inibição da proliferação do tratamento destas linhagens com AAS e IBU, reforçando o seu potencial terapêutico. Permanecem como perspectivas futuras a quantificação de PGE₂ no sobrenadante de células U87MG e T98G tratadas com AAS e IBU a fim de acessar o envolvimento deste prostanoide na regulação da expressão de *RECK* e *MMP-2*, bem como a avaliação da expressão da proteína RECK e da regulação transcricional, traducional e da atividade de *MMP-9*. Por fim, a avaliação do perfil de migração em monocamada das linhagens U87MG e T98G tratadas com AAS e IBU, bem como a capacidade invasiva nessas condições, encontram-se em concordância com o objetivo de fornecer evidências fenotípicas para a regulação destes alvos.

REFERÊNCIAS

- ACS (American Cancer Society). The Cancer Atlas. 3rd ed. Atlanta (GA), 2019.
- AHMADLOO, N. *et al.* Treatment outcome and prognostic factors of adult glioblastoma multiforme. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, v. 25, n. 1, p. 21-30, 2013.
- ANNABI, B. *et al.* A MT1-MMP/NF- κ B signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133(+) U87 glioblastoma cells. **Journal of Neuroinflammation**, v. 6, n. 8, 2009.
- ARVANITIS, C. D.; FERRARO, G. B.; JAIN, R. K. The blood–brain barrier and blood–tumour barrier in brain tumours and metastases. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 1, p. 26-41, 2020.
- BAO, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. **Nature**, v. 444, n. 7120, p. 756-760, 2006.
- BARK, J. M. **Tratamento combinado de temozolomida e sinvastatina tem ação citotóxica e altera a formação de neuroesferas em linhagens de glioblastoma humano.** Orientadora: Sheila M. B. Winnischofer. 2017. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Curitiba, 2017.
- BAUMANN, F. *et al.* Lactate promotes glioma migration by TGF- β 2–dependent regulation of matrix metalloproteinase-2. **Neuro-Oncology**, v. 11, n. 4, p. 368-380, 2009.
- BLACKBURN, D. *et al.* Astrocyte function and role in motor neuron disease: A future therapeutic target? **Glia**, v. 57, n. 12, p. 1251–1264, 2009.
- BLEAU, AM. *Et al.* PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 3, p. 226-235, 2009.
- BLOBAUM, A. L.; MARNETT, L. J. Structural and Functional Basis of Cyclooxygenase Inhibition. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 1425-1441, 2007.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BUCHANAN, F. G. *et al.* Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 5, p. 1492-1496, 2006.
- CARBALLO, G. B. *et al.* Cyclopamine sensitizes glioblastoma cells to temozolomide treatment through Sonic hedgehog pathway. **Life Sciences**, v. 257, 118027, 2020.

CHANG, CY. *et al.* Indomethacin induced glioma apoptosis involving ceramide signals. **Experimental Cell Research**, v. 365, n. 1, p. 66-77, 2018.

CHANG, CY. *et al.* Aspirin Induced Glioma Apoptosis through Noxa Upregulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, ID 4129, 2020a.

CHANG, CY. *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress Contributes to Indomethacin-Induced Glioma Apoptosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, ID 557, 2020b.

CHANG, H. C.; CHO, C. Y.; HUNG, W. C. Silencing of the metastasis suppressor RECK by RAS oncogene is mediated by DNA methyltransferase 3b-induced promoter methylation. **Cancer Research**, v. 66, n. 17, p. 8413-8420, 2006.

CHANG, TH. *et al.* Structure of the RECK CC domain, an evolutionary anomaly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 26, p. 15104-15111, 2020.

CHATTERJEE, K. *et al.* Triumph and tumult of matrix metalloproteinases and their crosstalk with eicosanoids in cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 37, n. 2, p. 279-288, 2018.

CHEN, G.; CHEN, Z.; ZHAO, H. MicroRNA-155-3p promotes glioma progression and temozolomide resistance by targeting Six1. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 9, p. 5363-5374, 2020.

CHEN, J. *et al.* A restricted cell population propagates glioblastoma growth following chemotherapy. **Nature**, v. 488, n. 7412, p. 522-526, 2012.

CHEN, L. *et al.* miR-137 is frequently down-regulated in glioblastoma and is a negative regulator of Cox-2. **European Journal of Cancer**, v. 48, n. 16, p. 3104-3111, 2012.

CHEN, T.; TSENG, S-H. The Potential of RECK Inducers as Antitumor Agents for Glioma. **Anticancer Research**, v. 32, n. 7, p. 2991-2998, 2012.

CHO, C.; SMALLWOOD, P. M.; NATHANS, J. Reck and Gpr124 Are Essential Receptor Cofactors for Wnt7a/Wnt7b-Specific Signaling in Mammalian CNS Angiogenesis and Blood-Brain Barrier Regulation. **Neuron**, v. 95, n. 5, p. 1056-1073, 2017.

CHO, C. *et al.* Molecular determinants in Frizzled, Reck, and Wnt7a for ligand-specific signaling in neurovascular development. **eLife**, v. 8, e47300, 2019.

CLARK, I. M. *et al.* The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 40, n. 6, p. 1362-1378, 2008.

CUI, N.; HU, M.; KHALIL, R. A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 147, p. 1-73, 2017.

CUNLIFFE, C. H. *et al.* State-of-the-art pathology: new WHO classification, implications and new developments. **Neuroimaging Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 259-271, 2010.

DANEMAN, R.; PRAT, A. The Blood-Brain Barrier. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 1, p. 1-23, 2015.

DE LA CRUZ-LÓPEZ, K. G. *et al.* Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. **Frontiers in Oncology**, v. 9, ID 1143, 2019.

GABRIELY, G. *et al.* MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 17, p. 5369-5380, 2008.

GAO, L. *et al.* Wnt/ β -catenin signaling pathway inhibits the proliferation and apoptosis of U87 glioma cells via different mechanisms. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. 1–19, 2017.

GAO, X. *et al.* Ibuprofen induces ferroptosis of glioblastoma cells via downregulation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling pathway. **Anticancer Drugs**, v. 31, n. 1, p. 27-34, 2020.

GERTHOFER, V. *et al.* Combined Modulation of Tumor Metabolism by Metformin and Diclofenac in Glioma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, ID 2586, 2018.

GIOVANNONI, F.; QUINTANA, F. J. The Role of Astrocytes in CNS Inflammation. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 9, p. 805-819, 2020.

GONZALEZ-AVILA, G. *et al.* Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 137, p. 57-83, 2019.

GURPINAR, E.; GRIZZLE, W. E.; PIAZZA, G. A. COX independent mechanisms of cancer chemoprevention by anti-inflammatory drugs. **Frontiers in Oncology**, v. 3, n. 181, 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HART, C. G.; KARIMI-ABDOLREZAEE, S. Recent insights on astrocyte mechanisms in CNS homeostasis, pathology, and repair. **Journal of Neuroscience Research**, v. 99, n. 10, p. 2427-2462, 2021.

HAN, L. *et al.* MicroRNA-21 Expression is regulated by β -catenin/STAT3 Pathway and Promotes Glioma Cell Invasion by Direct Targeting RECK. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 18, n. 7, p. 573-583, 2012.

HEGI, M. E. *et al.* MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 10, p. 997-1003, 2005.

HITCHCOCK, S. A.; PENNINGTON, L. D. Structure-Brain Exposure Relationships. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 26, p. 7550-7583, 2006.

HSU, HH. *Et al.* JNK suppression is essential for 17 β -Estradiol inhibits prostaglandin E2-Induced uPA and MMP-9 expressions and cell migration in human LoVo colon cancer cells. **Journal of Biomedical Sciences**, v. 18, n. 1, ID 61, 2011.

HSU, M. C.; CHANG, H. C.; HUNG, W. C. HER-2/neu represses the metastasis suppressor RECK via ERK and Sp transcription factors to promote cell invasion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 8, p. 4718-4725, 2006.

HUANG, Q. *et al.* Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. **Nature Medicine**, v. 17, n. 7, p. 860-866, 2011.

HUNG, WC. Anti-metastatic Action of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs. **The Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 24, n. 8, p. 392-397, 2008.

INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes de Silva). Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro, 2017.

INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes de Silva). Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro, 2019.

ITATSU, K. *et al.* Cyclooxygenase-2 is involved in the up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in cholangiocarcinoma induced by tumor necrosis factor-alpha. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 3, p. 829-841, 2009.

ITO, H. *et al.* Prostaglandin E2 enhances pancreatic cancer invasiveness through an Ets-1-dependent induction of matrix metalloproteinase-2. **Cancer Research**, v. 64, n. 20, p. 7439-7446, 2004.

JACOMASSO, T. *et al.* 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**, v. 30, n. 3, p. 223-234, 2020.

JIANG, J. *et al.* Prostaglandin E2 Signaling: Alternative Target for Glioblastoma? **Trends in Cancer**, v. 3, n. 2, p. 75-78, 2017.

JIAPAER, S. *et al.* Potential strategies overcoming the temozolomide resistance for glioblastoma. **Neurologia Medico-Chirurgica**, v. 58, n. 10, p. 405-421, 2018.

JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583-589, 2021.

KATO, Y.; YAMASHITA, T.; ISHIKAWA, M. Relationship between expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 and invasion ability of cervical cancer cells. **Oncology Reports**, v. 9, n. 3, p. 565-569, 2002.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52-67, 2010.

KIM, G. W. *et al.* Temozolomide-resistant Glioblastoma Depends on HDAC6 Activity Through Regulation of DNA Mismatch Repair. **Anticancer Research**, v. 39, n. 12, p. 6731-6741, 2019.

KIRKBY, N. S. *et al.* Systematic study of constitutive cyclooxygenase-2 expression: Role of NF- κ B and NFAT transcriptional pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 2, p. 434-439, 2016.

KOHSAKA, S. *et al.* STAT3 Inhibition Overcomes Temozolomide Resistance in Glioblastoma by Downregulating MGMT Expression. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 11, n. 6, p. 1289-1299, 2012.

KOZOMARA, A.; BIRGAOANU, M.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: from microRNA sequences to function. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 1, p. 155-162, 2018.

KUENG, W. *et al.* Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Analytical Biochemistry**, v. 182, n. 1, p. 16-19, 1989.

LEE, H. N. *et al.* RECK isoforms having opposing effects on cell migration. **Molecular Biology of the Cell**, v. 29, n. 15, p. 1825-1838, 2018.

LEE, H. N.; BOSOMPRA, O. A.; COLLER, H.A. RECK isoforms differentially regulate fibroblast migration by modulating tubulin post-translational modification. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 510, n. 2, p. 211-218, 2019.

LEE, K. J.; LEE, K. Y.; LEE, Y. M. Downregulation of a tumor suppressor RECK by hypoxia through recruitment of HDAC1 and HIF-1 α to reverse HRE site in the promoter. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1803, n. 5, p. 608-616, 2010.

LEE, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Genes and Diseases**, v. 3, n. 3, p. 198-210, 2016.

LEI, H. *et al.* MicroRNA-219-2-3p functions as a tumor suppressor in gastric cancer and is regulated by DNA methylation. **PLoS One**, v. 8, n. 4, e60369, 2013.

LEIDGENS, V. *et al.* Ibuprofen and Diclofenac Restrict Migration and Proliferation of Human Glioma Cells by Distinct Molecular Mechanisms. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. 1-23, 2015.

LIAO, K. *et al.* Parthenolide Inhibits Cancer Stem-Like Side Population of Nasopharyngeal Carcinoma Cells via Suppression of the NF- κ B/COX-2 Pathway. **Theranostics**, v. 5, n. 3, p. 302-321, 2015.

LIU, LT. *et al.* Induction of RECK by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in lung cancer cells. **Oncogene**, v. 21, p. 8347-8350, 2002.

MA, HI. *Et al.* Celecoxib and radioresistant glioblastoma-derived CD133+ cells: improvement in radiotherapeutic effects. **Journal of Neurosurgery**, v. 144, n. 3, p. 651-662, 2011.

MAJUMDER, M. *et al.* Prostaglandin E2 receptor EP4 as the common target on cancer cells and macrophages to abolish angiogenesis, lymphangiogenesis, metastasis, and stem-like cell functions. **Cancer Science**, v. 105, n. 9, p. 1142-1151, 2014.

MARTINCORENA, I.; CAMPBELL, P. J. Somatic mutation in cancer and normal cells. **Science**, v. 349, n. 6255, 1493-1489, 2015.

MENTER, D. G.; DUBOIS, R. N. Prostaglandins in Cancer Cell Adhesion, Migration, and Invasion. **International Journal of Cell Biology**, v. 2012, ID 7243419, 2012.

MUIR, M. *et al.* Glioblastoma multiforme: novel therapeutic targets. **Expert opinion on Therapeutic Targets**, v. 24, n. 7, p. 605-614, 2020.

MIKI, T. *et al.* The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 16, p. 12341-52, 2007.

MING, J. *et al.* Aspirin inhibits the SHH/GLI1 signaling pathway and sensitizes malignant glioma cells to temozolomide therapy. **AGING**, v. 9, n. 4, p. 1233-1247, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferate and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, v. 69, n. 3, p. 562-573, 2006.

NANWAT, N. *et al.* Downregulation of reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) is associated with enhanced expression of matrix metalloproteinases and cholangiocarcinoma metastases. **Journal of Gastroenterology**, v. 46, n. 5, p. 664-675, 2010.

NAVONE, S. E. *et al.* Aspirin Affects Tumor Angiogenesis and Sensitizes Human Glioblastoma Endothelial Cells to Temozolomide, Bevacizumab, and Sunitinib, Impairing Vascular Endothelial Growth Factor-Related Signaling. **World Neurosurgery**, v. 120, p. 380-391, 2018.

- NING, S.; MA, X. Dephosphorylation-induced EZH2 activation mediated RECK downregulation by ERK1/2 signaling. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 10, p. 19010-19018, 2018.
- NOVAKOVA, I. *et al.* Transport Rankings of Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs across Blood-Brain Barrier In Vitro Models. **PLoS One**, v. 9, n. 1, e86806, 2014.
- OH, J. *et al.* The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. **Cell**, v. 107, n. 6, p. 789–800, 2001.
- OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. **The American Journal of Pathology**, v. 10, n. 5, p. 1445-1453, 2007.
- OLIVER, L.; OLIVIER, C.; VALLETTE, F. M. Prostaglandin E2 plays a major role in glioma resistance and progression. **Translational Cancer Research**, v. 5, S. 6, S1073-1077, 2016.
- ORZAN, F. *et al.* Genetic Evolution of Glioblastoma Stem-Like Cells from Primary to Recurrent Tumor. **Stem Cells**, v. 35, n. 11, p. 2218-2228, 2017.
- PAJOUHESH, H.; LENZ, G. R. Medicinal Chemical Properties of Successful Central Nervous System Drugs. **Neurotherapeutics**, v. 2, n. 4, p. 541-553, 2005.
- PALUMBO, P. *et al.* Biological effects of selective COX-2 inhibitor NS398 on human glioblastoma cell lines. **Cancer Cell International**, v. 20, n. 167, 2020.
- PAN, MR.; CHUANG, LY.; HUNG, WC. Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 expression via repression of transcription in lung cancer cells. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 508, n. 3, p. 365-368, 2001.
- PAN, MR.; HUNG, WC. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Inhibit Matrix Metalloproteinase-2 via Suppression of the ERK/Sp1-mediated Transcription. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 36, p. 32775-32780, 2002.
- PAN, MR.; CHANG, HC; HUNG, WC. Non-steroidal anti-inflammatory drugs suppress the ERK pathway via block of Ras/c-Raf interaction and activation of MAP kinase phosphatases. **Cell Signalling**, v. 20, n. 6, p. 1134-1141, 2008.
- PATRIGNANI, P. *et al.* New insights into COX-2 biology and inhibition. **Brain Research Reviews**, v. 48, n. 2, p. 352-359, 2005.
- PAVLOVIC, S. *et al.* Targeting prostaglandin E2 receptors as an alternative strategy to block cyclooxygenase-2-dependent extracellular matrix-induced matrix metalloproteinase-9 expression by macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 6, p. 3321-3328, 2006.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, e45, 2001.

RAJESH, Y. *et al.* Insights into molecular therapy of glioma: current challenges and next generation blueprint. **Acta Pharmacologia Sinica**, v. 38, n. 5, p. 591-613, 2017.

RAMÃO, A. *et al.* Changes in the expression of proteins associated with aerobic glycolysis and cell migration are involved in tumorigenic ability of two glioma cell lines. **Proteome Science**, v. 10, n. 1, ID 53, 2012.

REUSS, A. M. *et al.* The Acidic Brain—Glycolytic Switch in the Microenvironment of Malignant Glioma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, ID 5518, 2021.

ROSENBERG, G. A. Metalloproteinases and neurodegenerative diseases: pathophysiological and therapeutic perspectives. **Metalloproteinases in Medicine**, v. 2, p. 39-50, 2015.

SASAHARA, R. M. *et al.* Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene. **Cancer Detection and Prevention**, v. 26, n. 6, p. 435-443, 2002.

SASAHARA, R. M.; TAKAHASHI, C.; NODA, M. Involvement of the Sp1 site in ras-mediated downregulation of the RECK metastasis suppressor gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 264, n. 3, p. 668-675, 1999.

SHI, L. *et al.* MicroRNA-125b-2 confers human glioblastoma stem cells resistance to temozolomide through the mitochondrial pathway of apoptosis. **International Journal of Oncology**, v. 40, n. 1, p. 119-129, 2012.

SINGH, B. *et al.* Role of COX-2 in tumorspheres derived from a breast cancer cell line. **Journal of Surgical Research**, v. 168, n. 1, p. 39-49, 2011.

SMINIA, P. *et al.* Expression of cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor in primary and recurrent glioblastoma multiforme. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 131, n. 10, p. 653-661, 2005.

STATBERG, M. *et al.* Inhibition of histone deacetylases sensitizes glioblastoma cells to lomustine. **Cellular Oncology**, v. 40, n. 1, p. 21-32, 2017.

STROBEL, H. *et al.* Temozolomide and Other Alkylating Agents in Glioblastoma Therapy. **Biomedicines**, v. 7, n. 3, 2019.

TAKAHASHI, C. *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 22, p. 13221–13226, 1998.

TAKENAKA, K. *et al.* Expression of a novel matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer. **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 10, p. 1617-1623, 2004.

TAN, Z. *et al.* TRIM14 promotes chemoresistance in gliomas by activating Wnt/beta-catenin signaling via stabilizing Dvl2. **Oncogene**, v. 37, n. 40, p. 5403-5414, 2018.

THAKKAR, J. P. *et al.* Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 23, n. 10, p. 1985-1996, 2014.

TOMAR, V. S.; PATIL, V.; SOMASUNDARAM, K. Temozolomide induces activation of Wnt/ β -catenin signaling in glioma cells via PI3K/Akt pathway: implications in glioma therapy. **Cell Biology and Toxicology**, 2019.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TROMBETTA-LIMA, M. *et al.* Isolation and characterization of novel RECK tumor suppressor gene splice variants. **Oncotarget**, v. 6, n. 32, p. 33120-33133, 2015.

ULASOV, I.V. *et al.* Inhibition of Sonic hedgehog and Notch pathways enhances sensitivity of CD133(+) glioma stem cells to temozolomide therapy. **Molecular Medicine**, v. 17, n.1, p. 103-112, 2011.

VALLON, M. *et al.* A RECK-WNT7 Receptor-Ligand Interaction Enables Isoform-Specific Regulation of Wnt Bioavailability. **Cell Reports**, v. 25, n. 2, p. 339-349, 2018.

VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, ID RESEARCH0034, 2002.

VARADI, M. *et al.* AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. 1, p. 439-444, 2022.

VERHAAK, R. G. W. *et al.* Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 98-110, 2010.

WANG, D. *et al.* Prostaglandin E2 Promotes Colorectal Cancer Stem Cell Expansion and Metastasis in Mice. **Gastroenterology**, v. 149, n. 7, p. 1884-1895, 2015.

WANG, X. *et al.* miR-190a inhibits epithelial-mesenchymal transition of hepatoma cells via targeting the long non-coding RNA treRNA. **FEBS Letters**, v. 589, n. 24, p. 4079-4087, 2015.

WHO (World Health Organization). WHO report on cancer: Setting priorities, investing wisely and providing for all. Geneva: World Health Organization; 2020.

XU, K.; SHU, HK. G. EGFR Activation Results in Enhanced Cyclooxygenase-2 Expression through p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Activation of the Sp1/Sp3 Transcription Factors in Human Gliomas. **Cancer Research**, v. 67, n. 13, p. 6121-9, 2007.

XU, K. *et al.* Epidermal growth factor-dependent cyclooxygenase-2 induction in gliomas requires protein kinase C- δ . **Oncogene**, v. 28, n. 11, p. 1410-1420, 2009.

YEN, JH. *Et al.* Prostaglandin E2 induces matrix metalloproteinase 9 expression in dendritic cells through two independent signaling pathways leading to activator protein 1 (AP-1) activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 45, p. 38913-38923, 2011.

ZHANG, J.; STEVENS, M. F. G.; BRADSHAW, T. D. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. **Current Molecular Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 102-114, 2012.

ZHANG, X. *et al.* Beyond a chemopreventive reagent, aspirin is a master regulator of the hallmarks of cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 125, n. 6, p. 1387-1403, 2019.

ZUCCARINI, M. *et al.* The role of wnt signal in glioblastoma development and progression: A possible new pharmacological target for the therapy of this tumor. **Genes**, v. 9, n. 2, p. 1–21, 2018.

APÊNDICES

TABELA 3: Alinhamento das seqüências dos transcritos RECKvar3 e RECKvar5

RECKvar3	ATGGCGACCGTCCGGCCCTCTCTGCGAGGTGCGCTGCTCCTTCTGCTGGCCGTGGCGGGG	60
RECKvar5	ATGGCGACCGTCCGGCCCTCTCTGCGAGGTGCGCTGCTCCTTCTGCTGGCCGTGGCGGGG *****	60
RECKvar3	GTCGCGGAGGTGGCAGGGGGCCCTGGCTCCGGGCAGTGCGGGTGCATTGTGTGTAATCAT	120
RECKvar5	GTCGCGGAGGTGGCAGGGGGCCCTGGCTCCGGGCAGTGCGGGTGCATTGTGTGTAATCAT *****	120
RECKvar3	TCAAAGGATAACCAAATGTGCCGTGATGTATGTGAACAGATTTTCTCCTCAAAAAGTGAA	180
RECKvar5	TCAAAGGATAACCAAATGTGCCGTGATGTATGTGAACAGATTTTCTCCTCAAAAAGTGAA *****	180
RECKvar3	TCCCGACTAAAACATCTGTTGCAGCGAGCCCCAGATTATGCCCAGAGACAATGGTTGAA	240
RECKvar5	TCCCGACTAAAACATCTGTTGCAGCGAGCCCCAGATTATGCCCAGAGACAATGGTTGAA *****	240
RECKvar3	ATTTGGAATTGTATGAATTCATCTTTGCCAGGTGTGTTAAGAAGTCTGATGGCTGGGTT	300
RECKvar5	ATTTGGAATTGTATGAATTCATCTTTGCCAGGTGTGTTAAGAAGTCTGATGGCTGGGTT *****	300
RECKvar3	GGCTTAGGCTGCTGTGAACTGGCTATTGCCTTGGAGTGTGACAGGCATGCAAGCAGGCA	360
RECKvar5	GGCTTAGGCTGCTGTGAACTGGCTATTGCCTTGGAGTGTGACAGGCATGCAAGCAGGCA *****	360
RECKvar3	TCTTCAAAGAATGATATTTCCAAAGTTTGCAGAAAAGAATATGAGAATGCTCTTTTCAGT	420
RECKvar5	TCTTCAAAGAATGATATTTCCAAAGTTTGCAGAAAAGAATATGAGAATGCTCTTTTCAGT *****	420
RECKvar3	TGCATTAGCAGAAATGAAATGGGCTCGGTTTGTGTCAGTTATGCAGGTCATCACACAAAC	480
RECKvar5	TGCATTAGCAGAAATGAAATGGGCTCGGTTTGTGTCAGTTATGCAGGTCATCACACAAAC *****	480
RECKvar3	TGCCGAGAATACTGTCAAGCCATTTTTCGAACAGACTCTTCTCCTGGTCCATCTCAGATA	540
RECKvar5	TGCCGAGAATACTGTCAAGCCATTTTTCGAACAGACTCTTCTCCTGGTCCATCTCAGATA *****	540
RECKvar3	AAAGCAGTGAAAATTATTGCGCCTCTATTAGTCCACAATTAATACATTGTGTGAACAAT	600
RECKvar5	AAAGCAGTGAAAATTATTGCGCCTCTATTAGTCCACAATTAATACATTGTGTGAACAAT *****	600
RECKvar3	TATACTCAATCTTATCCAATGAGGAACCCAACGGATAGGCCTCCTGATGAAGCTGCACCT	660
RECKvar5	TATACTCAATCTTATCCAATGAGGAACCCAACGGATAGT TTTGAATTTT TGCCAATGAG ***** * * * *	660
RECKvar3	GAAATGGCTCTTCAGAGTCTCCGCTTTGTACATCCTGGAATCCATTTCTTCACCTAGAG	720
RECKvar5	CAATTATTACTTTTGTAAATAAAAAGTCATAACAATGAGAAGA -----GAGC * * * * * * * * * *	707
RECKvar3	GTGACCAGATTTATAAAAACTGACTGATTGACCAAACGACCAA	765
RECKvar5	CTGATATCTTTTAAAAATTAGGGCCTCCTGATGAAGCTGCACC -- *** * * * * * * * *	750

Fonte: O autor.

Nota: alinhamento entre as seqüências de RECKvar3 e RECKvar5 pela ferramenta ClustalOmega. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Em negrito, são destacadas as regiões 3' distintas para cada transcrito alternativo.

TABELA 4: Sítios de ligação de micro-RNAs presentes na região 3' de RECKvar3 e RECKvar5

Alvo	miRNA	Sequência	Região de ligação no alvo	Score
RECKvar3	hsa-miR-219b-3p	AGAUGUCCAGCCACAAUUCUCG	106-120	66
RECKvar3	hsa-miR-5192	AGGAGAGUGGAUCCAGGUGGU	53-74	65
RECKvar5	hsa-miR-190a-5p	UGAUAUGUUUGAUUAUUAGGU	72-92	69

Fonte: O autor.

Nota: a tabela mostra micro-RNAs identificados pela ferramenta miRBase que apresentam complementariedade à região 3' dos transcritos RECKvar3 e RECKvar5.

Disponível em: <https://www.mirbase.org/>.