

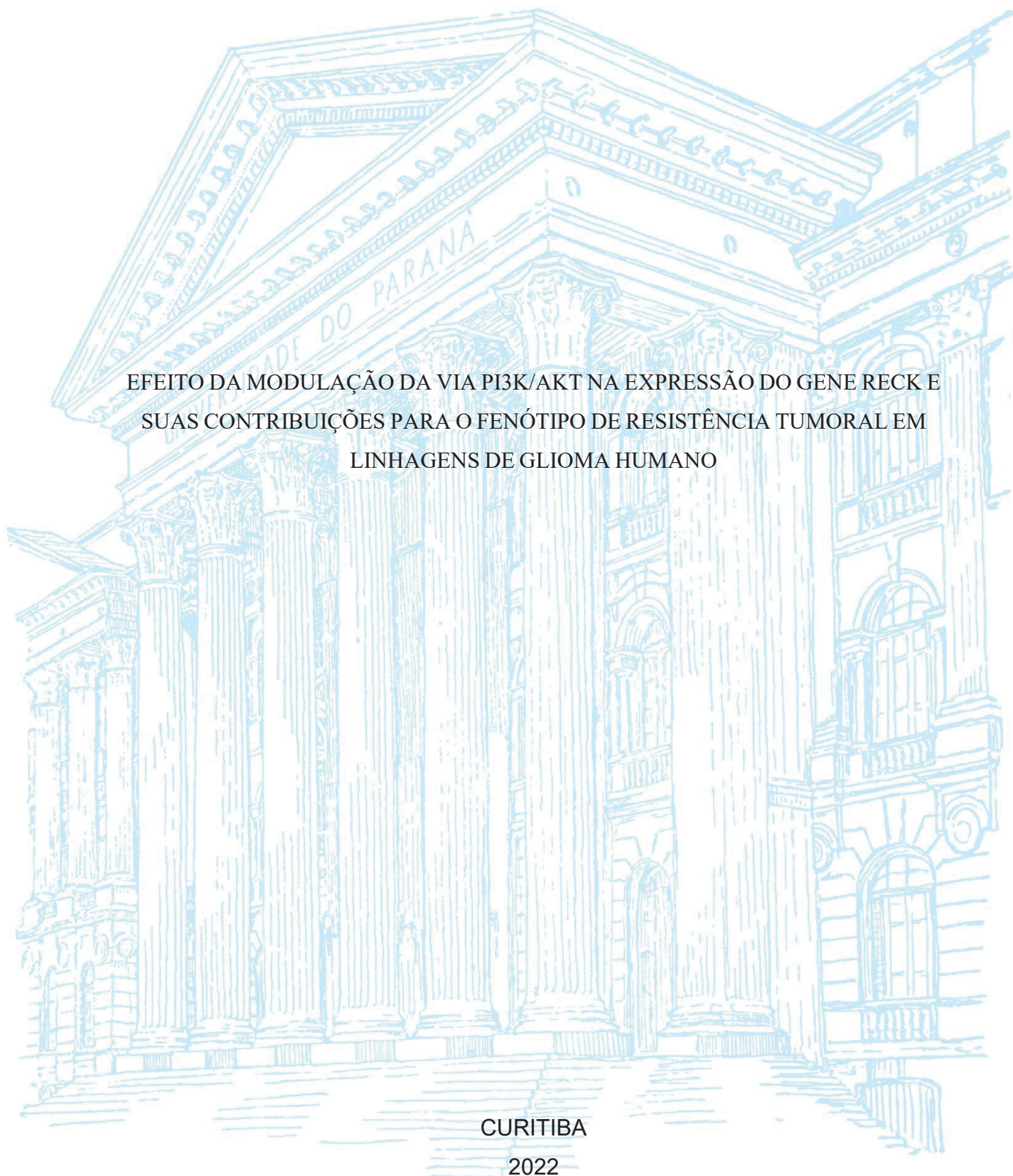
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LISLEY JANOWSKI SPISILA

EFEITO DA MODULAÇÃO DA VIA PI3K/AKT NA EXPRESSÃO DO GENE RECK E
SUAS CONTRIBUIÇÕES PARA O FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA TUMORAL EM
LINHAGENS DE GLIOMA HUMANO

CURITIBA

2022



LISLEY JANOWSKI SPISILA

EFEITO DA MODULAÇÃO DA VIA PI3K/AKT NA EXPRESSÃO DO GENE RECK E
SUAS CONTRIBUIÇÕES PARA O FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA TUMORAL EM
LINHAGENS DE GLIOMA HUMANO

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de mestra em Ciências – Bioquímica.

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

CURITIBA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Spisila, Lisley Janowski, 1995-

Efeito da modulação da via de PI3K/Akt na expressão do gene RECK e suas contribuições para o fenótipo de resistência tumoral em linhagens de glioma humano / Lisley Janowski Spisila. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

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

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

1. Glioblastoma. 2. 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 **LISLEY JANOWSKI SPISILA** intitulada: **Efeito da modulação da via PI3K/Akt na expressão do gene RECK e suas contribuições para o fenótipo de resistência tumoral em linhagens de glioma humano**, sob orientação da Profa. Dra. SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestra 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, 29 de Março de 2022.

Assinatura Eletrônica

20/04/2022 06:03:21.0

SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

18/04/2022 15:46:33.0

MARILIA LOCATELLI CORREA FERREIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

18/04/2022 10:29:42.0

MARIA ELIANE MERLIM ROCHA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 175500

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prrpg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 175500

DEDICATÓRIA

Para Dona Suzana e Seu Floriano: Os lírios mais
lindos que agora habitam o jardim de Deus.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me permitir as conexões dessa vida.

Aos meus pais, Eunice e Marcos e às minhas irmãs, Leidy e Laís pelo apoio e amor incondicional.

À toda a minha família pela grande torcida e afeto.

À minha orientadora, Prof^ª Dr^ª Sheila, por todo o carinho, apoio e confiança.

À Dr^ª Juliana M. Bark por me ensinar grande parte do que sei hoje e por fazer eu me apaixonar pela ciência.

Ao meu melhor amigo deste laboratório e melhor químico de todos, Viktor, por estar presente em cada experimento, por cada discussão científica, cada abraço apertado e cada risada (mesmo quando de desespero).

À Mari por ser a melhor IC do mundo e me permitir ter o privilégio de te coorientar no TCC.

Às professoras, técnicas e colegas do laboratório de oxidações biológicas por todo o suporte.

À banca, Prof^ª Dr^ª Maria Eliane e Prof^ª Dr^ª Marília pelo aceite.

À todos que de alguma maneira contribuíram para a viabilidade deste trabalho.

Aos financiadores de tudo CNPq, CAPES e UFPR.

EPÍGRAFE

“Eu não tenho outro vestido, com exceção do que uso diariamente. Se você vai ser gentil suficiente para me dar outro, faça questão de ele ser prático e escuro para que eu possa colocá-lo e depois ir ao laboratório”.

Marie Skłodowska Curie

RESUMO

Glioblastomas (GBs) são as neoplasias de astrócitos mais agressivas e mais comuns que acometem o sistema nervoso central (SNC). O regime terapêutico atual consiste em quimioterapia, radioterapia e, quando possível, remoção cirúrgica. Porém, a alta agressividade e a resistência das células tumorais frente à ação dos quimioterápicos é bastante evidente, o que resulta em uma expectativa de vida média de 15 meses. A temozolomida (TMZ) é o quimioterápico padrão atualmente utilizado, e o seu uso combinado ao de fármacos adjuvantes têm sido importante foco de pesquisa na área. Nesse aspecto, destacam-se os inibidores das vias bioquímicas de PI3K/Akt e ERK, que estão relacionadas com crescimento, invasão e manutenção tumoral, capazes de potencializar o efeito citotóxico promovido pela TMZ. Diversos são os mecanismos de resistência à TMZ já descritos na literatura, dentre eles, estão as células-tronco de glioma (GSCs). Estas células não são afetadas pelos tratamentos convencionais e são responsáveis pelos altos índices de recorrência da doença. Sabe-se que o cultivo de células em *hanging drops* são capazes de aumentar marcadores desse tipo celular, em especial CD133. Desta maneira, o objetivo deste projeto, foi avaliar se a inibição das vias de PI3K/Akt e ERK combinadas com o tratamento de TMZ são capazes de sensibilizar as células de GB, aumentando os índices de morte já existentes em linhagens sensíveis e sensibilizando as linhagens que se mostram intrinsecamente resistentes à TMZ, tanto em cultivo em monocamada como também em modelos 3D. Nossos resultados mostraram que o uso do inibidor de PI3K (LY294002) e do inibidor de ERK (U0126), ambos na concentração de 10 μ M, isolados ou combinados com TMZ (100 μ M) foram capazes de promover maior citotoxicidade e inibir proliferação celular em comparação com o tratamento único com o quimioterápico. Cálculos de unidades arbitrárias de autofagia e marcação por laranja de acridina sugerem que o tratamento com ambos os inibidores promove um aumento no percentual autofágico das linhagens resistentes à TMZ (U87RTMZ e T98G) quando comparadas com as linhagens sensíveis (U87MG e A172), sugerindo que esta ativação pode representar um mecanismo de resistência tumoral. Adicionalmente, a sugestão de modulação da via autofágica foi corroborada com o aumento da expressão da proteína Bcl-2 frente ao tratamento combinado de U0126+TMZ para a linhagem T98G. De forma muito interessante, a combinação de ambos os inibidores com TMZ diminuiu a formação de esferóides em *hanging drops* e aumentou características fenotípicas relacionadas a morte celular, em ambas as linhagens sensíveis e intrinsecamente resistentes à TMZ. Dados preliminares sugerem que a expressão de RECK e RECKvar3, possivelmente modulando os níveis de MMP2 e 9, podem estar envolvidos na modulação da responsividade aos inibidores. Em conjunto nossos resultados mostram o potencial do uso combinado de TMZ e os inibidores das vias de PI3K e ERK na sensibilização de células de glioblastoma humano à morte celular, sugerindo RECK como um possível alvo molecular a ser explorado nesse contexto.

Palavras-Chave: Glioblastoma. Temozolomida. PI3K/Akt. ERK. RECK.

ABSTRACT

Glioblastomas (GBs) are the most aggressive and most common astrocyte neoplasms affecting the central nervous system (CNS). The current therapeutic regimen consists of chemotherapy, radiation therapy and, when possible, surgical removal. However, the high aggressiveness and resistance of the tumor cells to chemotherapeutic agents is quite evident, resulting in an average life expectancy of 15 months. Temozolomide (TMZ) is the standard chemotherapy currently used, and its use combined with adjuvant drugs has been an important focus of research in the area. In this aspect, we highlight the inhibitors of the biochemical pathways PI3K/Akt and ERK, which are related to tumor growth, invasion and maintenance, capable of potentiating the cytotoxic effect promoted by TMZ. Several are the mechanisms of resistance to TMZ already described in the literature, among them are the glioma stem cells (GSCs). These cells are not affected by conventional treatments and are responsible for the high recurrence rates of the disease. It is known that the culture of cells in *hanging drops* are able to increase markers of this cell type, especially CD133. Thus, the aim of this project was to evaluate whether inhibition of PI3K/Akt and ERK pathways combined with TMZ treatment are able to sensitize GB cells, increasing the death rates already existing in sensitive lines and sensitizing lines that are intrinsically resistant to TMZ, both in monolayer culture and in 3D models. Our results showed that the use of PI3K inhibitor (LY294002) and ERK inhibitor (U0126), both at 10 μ M concentration, alone or combined with TMZ (100 μ M) were able to promote greater cytotoxicity and inhibit cell proliferation compared to treatment with chemotherapy alone. Calculations of arbitrary autophagy units and acridine orange labeling suggest that treatment with both inhibitors promotes an increase in the autophagic percentage of TMZ-resistant strains (U87RTMZ and T98G) when compared to sensitive strains (U87MG and A172), suggesting that this activation may represent a mechanism of tumor resistance. Additionally, the suggestion of modulation of the autophagic pathway was corroborated with increased Bcl-2 protein expression upon combined treatment of U0126+TMZ for the T98G strain. Most interestingly, combinations of both inhibitors with TMZ decreased *hanging drops* spheroid formation increased cell death related phenotypic characteristics in both TMZ sensitive and intrinsically resistant strains. Preliminary data suggest that expression of RECK and RECKvar3, possibly modulating MMP2 and 9 levels, may be involved in modulating responsiveness to inhibitors. Taken together our results show the potential of the combined use of TMZ and the inhibitors of the PI3K and ERK pathways in sensitizing human glioblastoma cells to cell death, suggesting RECK as a possible molecular target to be explored in this context.

Keywords: Glioblastoma. Temozolomide. PI3K/Akt. ERK.RECK.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de resistência à TMZ.	22
Figura 2. Via de sinalização PI3K/Akt e MEK/ERK. Representação esquemática do mecanismo de ação do inibidor LY294002 e U0126.....	25
Figura 3. Mecanismos de modulação do processo autofágico mediado pela sinalização de PI3K/Akt e MEK/ERK.....	28
Figura 4. Estratégia experimental	32
Figura 5. Screening inicial para determinação da concentração a ser utilizada dos inibidores LY294002 e U0126.....	42
Figura 6. Avaliação de citotoxicidade celular pelo método de MTT.....	44
Figura 7. Avaliação do número de células aderidas ao longo do tempo	46
Figura 8. Avaliação da proliferação celular em diferentes linhagens	48
Figura 9. Avaliação da integridade de membrana ao longo do tempo	50
Figura 10. Unidades arbitrárias autofágicas para a linhagem T98G	51
Figura 11. Unidades arbitrárias autofágicas para diferentes linhagens de GB.....	52
Figura 12. Avaliação da presença de organelas vesiculares ácidas em células T98G após tratamento com TMZ isolado ou combinado com os inibidores de PI3K e ERK.....	54
Figura 13. Modulação da expressão de Bcl-2 na linhagem T98G após tratamento com TMZ em combinação com os inibidores de PI3K e ERK.....	55
Figura 14. Avaliação da capacidade de formação de esferoides derivados de células T98G após o tratamento combinado de TMZ e os inibidores de PI3K e ERK.....	57
Figura 15. Tratamento das linhagens A172 e U87MG durante a formação das esferoides	58
Figura 16. Tratamento durante a manutenção no Poly-HEMA.....	59
Figura 17. Expressão de MMP-2 e MMP-9 na linhagem T98G	60
Figura 18. Avaliação da contribuição de RECK e <i>RECKvar3</i> para a responsividade de células de GB aos inibidores das vias de PI3K/Akt e ERK.....	62
Figura 19. Perspectivas obtidas a partir dos resultados apresentados	67

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATGs – Relacionados com autofagia (AuTophagy-related, do inglês)
- BRCA 1 e 2 – Câncer de mama 1 e 2 (breastcancer1 or 2, do inglês)
- ECM – Matriz Extracelular (Extracellular matrix, do inglês)
- EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico (epidermal growth factor receptor, do inglês)
- GB – Glioblastoma
- GPCR – Receptor acoplado a proteína G (G-protein-coupled receptors, do inglês)
- GSC – Células-tronco de glioma (glioma stem cells, do inglês)
- IDH – Isocitratodesidrogenase (isocitrate dehydrogenase, do inglês)
- MGMT – O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase
- MMP – Metaloproteinases de matriz (matrix metalloproteinase, do inglês)
- NF1 - Neurofibromina-1
- PI3K – Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase (Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate3-kinase, do inglês)
- PI3KCA – Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase subunidade catalítica (Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate3-kinase catalytic subunit, do inglês)
- PTEN – Fosfatase e tensina homóloga (phosphatase and tensin homologous, do inglês)
- RECK – Indutor de reversão rica em cisteína com motivos Kazal (reversion-inducing cysteine rich protein with Kazal motifs, do inglês)
- RTK – Receptor de tirosina quinase (Receptor tyrosine kinase, do inglês)
- SNC – Sistema nervoso central
- TIMP – Inibidor de metalopeptidase (Metalloproteinase inhibitor, do inglês)
- TMZ – Temozolomida
- TP53 – Proteína tumoral 53 (tumor protein 53, do inglês)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Câncer	18
2.2. Sistema nervoso central.....	19
2.3. Gliomas	19
2.4. Glioblastomas.....	20
2.5. Tratamento	20
2.6. Potencial uso dos inibidores LY294002 e U0126 na modulação das vias de sinalização de PI3K/Akt e MEK/ERK	23
2.6.1. LY294002	23
2.6.2. U0126.....	24
2.7. O gene RECK: um alvo da via de PI3K/Akt.....	26
2.8. Modelos de cultivo celular 3D – formação de esferoides por <i>hanging drops</i>	26
2.9. Autofagia.....	28
3 JUSTIFICATIVA	30
4 OBJETIVOS	31
4.1. Objetivo geral.....	31
4.2. Objetivos específicos.....	31
4.3. Estratégia de Ação.....	32
5 MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1. Procedimentos em cultivo celular	33
5.1.1. Esterilização e manejo de materiais e células	33
5.2. Soluções e meios de cultura	33
5.2.1. Solução de PBS	33
5.2.2. Solução de tripsina-EDTA	33
5.2.3. Solução estoque de temozolomida	34
5.2.4. Solução estoque de LY294002.....	34
5.2.5. Solução estoque de U0126	34
5.2.6. Meio de cultura.....	34
5.3. Linhagens celulares e condições de cultivo	34
5.3.1. Linhagens celulares.....	34
5.3.2. Estabelecimento da linhagem U87MG resistente à TMZ (U87RTMZ).....	35
5.4. Avaliação da viabilidade celular	36

5.4.1.	Ensaio de MTT.....	36
5.4.2.	Método de Cristal Violeta	36
5.4.3.	Método de vermelho neutro	37
5.5.	Determinação do Índice Autofágico – AAU.....	37
5.6.	Avaliação de organelas vesiculares ácidas por laranja de acridina	39
5.7.	Avaliação da expressão gênica de proteínas	39
5.7.1.	Extração e quantificação de proteínas.....	39
5.7.2.	Imunodeteção de proteínas.....	40
5.8.	Hangingdrops	41
5.8.1.	Formação dos esferoides	41
5.8.2.	Manutenção de esferoides em substrato não aderente.....	41
5.9.	Análise Estatística	41
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6.1.	<i>Screening</i> inicial para determinação de concentração de uso dos inibidores de PI3K (LY294002) e ERK (U0126) em células de GB resistentes à TMZ (linhagem T98G).....	42
6.2.	Avaliação do efeito citotóxico de Temozolomida (TMZ) em combinação com os inibidores das vias de PI3K/Akt e ERK em células de GB humano	44
6.2.1.	Avaliação da porcentagem de células metabolicamente ativas após tratamento com TMZ em combinação com os inibidores	44
6.2.2.	Avaliação da porcentagem de células aderidas após tratamento com TMZ em combinação com os inibidores	46
6.2.3.	Avaliação da proliferação celular em linhagens de GB com diferentes perfis de resistência à TMZ	48
6.2.4.	Avaliação da integridade da membrana após tratamento das células T98G com TMZ em combinação com os inibidores	49
6.3.	Determinação do Índice Autofágico (AAU) em células de GB após tratamento com TMZ em combinação com os inibidores	51
6.3.1.	Determinação do Índice autofágico (AAU) em linhagens de GB com diferentes responsividades à TMZ.....	52
6.4.	Avaliação da presença de organelas vesiculares ácidas em células T98G após tratamento com TMZ em combinação com os inibidores.....	53
6.5.	Avaliação da expressão de proteínas envolvidas na dinâmica dos processos de autofagia e apoptose.....	55

Os resultados obtidos mostram que os níveis da proteína anti-apoptótica, Bcl-2 são aumentadas na linhagem T98G após o tratamento com o quimioterápico TMZ. Porém, de forma interessante, é evidente o aumento expressivo nos níveis de Bcl-2 nas células T98G após os tratamentos combinados de ambos os inibidores com TMZ, em comparação com os tratamentos isolados. Porém, foi visto na literatura que Beclin-1, é capaz de interagir e inibir Bcl-2, aumentando os níveis de apoptose em linhagens de glioma sensíveis à TMZ (HUANG, *et al.*, 2014). Tal perfil observado para a linhagem T98G pode apresentar um aumento dos níveis de Bcl-2 como um indício de fenótipo de indução de autofagia como um mecanismo de resistência tumoral, tendo em vista que dados da literatura

demonstraram que é possível haver a repressão da inibição da autofagia mediada pela interação entre Bcl-2 e Beclin-1, através da fosforilação do domínio BH3 de Beclin-1 mediada por DAPK, fosforilação mediada por JNK da alça não estruturada de Bcl-2, competição com Bad e Bax pela ligação de Bcl-2/Bcl-xL e através da ligação entre DAMP HMGB-1 e Beclin-1 (GORDY, C. <i>et al</i> ; 2012), liberando assim Beclin-1 e Bcl-2 para atuarem em diferentes alvos e gerarem papéis relacionados com a apoptose a autofagia concomitantemente.	56
6.6. Efeito da inibição de PI3K e ERK na capacidade de formação de esferoides em linhagens de glioblastoma humano	56
6.6.1. Efeito da inibição de PI3K e ERK na formação de esferoides na linhagem T98G	56
6.6.2. Avaliação do efeito da inibição de PI3K e ERK, em combinação ou não com TMZ, na manutenção de esferoides em substrato não-aderente.....	58
6.7. Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K e ERK em alterar a expressão de proteínas envolvidas com o processo de invasão celular (MMP-2 e MMP-9).	59
6.8. Avaliação da contribuição de RECK e RECKvar3 para a responsividade de células de GB aos inibidores das vias de PI3K/Akt e ERK	61
7 DISCUSSÃO FINAL	64
8 CONCLUSÕES	66
9 PERSPECTIVAS	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXO	73

1. INTRODUÇÃO

As células da glia são populações celulares residentes do SNC, compostas por uma diversidade de tipos celulares, dentre eles: astrócitos, oligodendrócitos, ependimócitos e microgliócitos (LENT, 2012). Neoplasias que acometam qualquer uma das células da glia são chamadas de maneira geral de gliomas. (BLACKBURN *et al.*, 2009). Dentre os gliomas, os tumores derivados de astrócitos são os mais prevalentes e esses também são chamados de astrocitomas, sendo que o astrocitoma de maior grau de agressividade é chamado de glioblastoma (GB) (LOUIS *et al.*, 2016). Este tipo tumoral acomete principalmente idosos acima de 70 anos apresentando uma taxa de sobrevida média de cerca de 4 meses na ausência de tratamento. Porém, mesmo com o tratamento atual envolvendo quimioterapia, radioterapia e quando possível, remoção cirúrgica, a taxa de sobrevida máxima é de cerca de 15 meses, fazendo com que as opções terapêuticas atuais para GB tenham eficácia reduzida (MAIRET *et al.*, 2021; THAKKAR *et al.*, 2014).

A quimiorresistência de células com característica de células-tronco tumorais ocorre, em partes, pelas chamadas de *glioma stem cells*, (GSC), as quais não são acometidas pela citotoxicidade dos tratamentos convencionais e possuem alterações em diversas vias de sinalização, gerando maior proliferação, invasão, propensão metastática e sobrevivência tumoral (STRÖBELE *et al.*, 2015). Dentre os marcadores de GSCs, o CD133 (ou promina-1) é o mais conhecido, envolvido na ativação de diferentes vias bioquímicas, dentre elas JAK/STAT, Wnt/ β catenin, Notch, TGF β , PI3K /AKT, Hedgehog e NF κ B (AGHAJANI *et al.*, 2019).

A ativação constitutiva do receptor de tirosina quinase (RTK) em tumores fosforila PI3K, que por sua vez, ativa PIP3, responsável por atuar como um sítio de ancoragem para Akt e PDK1, levando à ativação de fatores intermediários responsáveis pela transformação celular, aumento da motilidade, sobrevivência, crescimento e síntese de proteínas, resistência a drogas e proliferação celular (LI *et al.*, 2016). Estudos têm demonstrado que a combinação de inibidores de PI3K e ERK como drogas adjuvantes ao quimioterápico temozolomida (TMZ) demonstram efeitos citotóxicos importantes em modelo de glioma (CHAKRAVARTI *et al.*, 2004; SHI *et al.*, 2017; PREVO *et al.*, 2008), evidenciando a importância de se caracterizar alvos moleculares-chaves nesse processo de sensibilização e modulação dos fenótipos de morte e invasão celular.

De fato, a alta capacidade invasiva das células tumorais de GBs à tecidos adjacentes é uma característica marcante nesse tipo de tumor, sendo consequência da elevada degradação de matriz extracelular (ECM), que é essencial para processos como crescimento, migração e diferenciação celular. Dentre as proteínas remodeladoras da ECM podemos citar as metaloproteinases de matriz (MMPs), que podem ser inibidas pela glicoproteína de membrana chamada RECK. A expressão de RECK é baixa ou suprimida em diferentes tipos tumorais, porém quando sua expressão é restaurada, RECK atua inibindo atividades invasivas e metastáticas do tumor por regular negativamente a secreção e atividade, entre outros alvos, de diferentes metaloproteinases de matriz, como MMP-2, MMP-9, MMP-14 (BERGERS *et al.*, 2010; OH *et al.*, 2001; STETLER-STEVENSON, 1999; TAKAHASHI *et al.*, 1998).

Recentemente, Trombetta-Lima e colaboradores descreveram transcritos alternativos para *RECK* que parecem possuir papéis opostos na biologia de GB. Interessantemente, o transcrito alternativo *RECKvar3* relaciona-se diretamente com o prognóstico do paciente. Tumores com uma maior expressão de RECK canônico em relação ao transcrito alternativo *RECKvar3* está correlacionada com uma maior taxa de sobrevida geral dos pacientes. Além disso, linhagens de GB que superexpressam RECK não demonstraram alterações de crescimento celular ou alteração do potencial clonogênico das células, porém, linhagens que superexpressam *RECKvar3* mostraram importante aumento da independência de ancoragem e crescimento celular, o que sugere possível função pró-oncogênica destas células (TROMBETTA-LIMA *et al.*, 2015).

Atualmente, a grande maioria dos estudos em câncer realizados *in vitro* consistem no cultivo de células em modelos 2D, no entanto, a busca por novas formas de cultivo que se assemelhem ao microambiente tumoral para estudos *in vitro* tem sido uma importante ferramenta no desenvolvimento de estudos que envolvam mecanismos de biologia celular (LEDUR *et al.*, 2017). Em se tratando de GB, é importante destacar a presença das GSCs junto à população celular heterogênea que compõe o tumor (ZUCCARINI *et al.*, 2018). Estas células não são tão afetadas por terapias padrão, pois apresentam maior capacidade de reparo do DNA, capacidade de auto renovação, maior resistência à morte por apoptose e maior capacidade invasiva, sendo parcialmente responsáveis pela característica de malignidade e agressividade de GB (GAO *et al.*, 2017; JIAPAER *et al.*, 2018; ZUCCARINI *et al.*, 2018; CHENG *et al.*, 2011). Visando modelos que promovam o estudo das interações célula-célula ou célula-microambiente tumoral e aspectos de arquitetura e funcionamento celular vistos em ambientes *in vivo*, técnicas de padronização para um modelo de estudos em *hanging drops* estão sendo consolidadas (WEISWALD, *et al.*, 2015). Dados da literatura mostram que a

inibição da via PI3K/Akt, pode sensibilizar as GSCs ao processo de morte, reduzindo taxas de proliferação e o potencial invasivo de GB, apresentando-se como um potencial terapêutico para aumentar a eficiência da TMZ também frente a essa subpopulação de células resistentes (IQBAL *et al.*, 2016; ZUCCARINI *et al.*, 2018).

Diante do exposto acima, a utilização de inibidores da via de PI3K/Akt e MEK/ERK mostram-se como potenciais alvos para serem utilizados como adjuvantes terapêuticos com o objetivo de aumentar a citotoxicidade no tratamento por TMZ em células de glioma humano, atuando também frente à subpopulação de células consideradas resistentes. A caracterização de alvos moleculares e dos processos que medeiam a potencialização da citotoxicidade em células de glioblastoma humano com diferentes graus de agressividade e resistência à TMZ, bem como explorar a ação adjuvante desses inibidores em modelo 3D de formação de esferoides são aspectos importantes a serem explorados no contexto de resistência tumoral de glioblastoma, os quais esse trabalho visa contribuir.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Câncer

Segundo definição do Instituto Nacional do Câncer (INCA), câncer é o nome de um vasto conjunto de mais de 100 doenças que compartilham entre si uma alta capacidade celular replicativa e um elevado potencial metastático. No ano de 2020, a totalidade de casos de incidência de câncer primário entre homens e mulheres no Brasil ultrapassou 600 mil casos e destes, cerca de 1/3 tiveram o desfecho de óbito (INCA, 2021).

Em um cenário mundial, segundo a organização mundial da saúde (do inglês, WHO) em 2018, foram notificados mais de 18 milhões de casos de câncer no mundo. Sendo que destes, mais de 8 milhões tiveram desfecho de óbito. As projeções apontam que para 2040, são esperados 29,4 milhões de novos casos (WHO, 2020).

Esses valores são mais pronunciados em países de baixa economia e o aumento latente de casos se justifica, ao menos em partes, devido ao aumento na expectativa de vida da população. Outro aspecto relevante em políticas públicas relacionadas ao tratamento contra câncer é o da produção científica. Países desenvolvidos possuem maior produção científica e isso possui impacto direto na adoção de medidas em saúde pública de combate ao câncer quando comparado a países subdesenvolvidos ou emergentes, como o Brasil (COSTA, 2019). Além disso, sabe-se que estilo de vida e fatores ambientais são fatores relevantes para o contexto de desenvolvimento tumoral. Segundo o Sumário Executivo de Ações e Políticas Preventivas publicado pelo INCA, 30% da totalidade de casos dos principais tipos de câncer pode ser evitados quando adotadas medidas que incluem alimentação, nutrição e atividade física (INCA, 2009).

Além dos fatores supracitados, mutações na carga genética de um indivíduo e modulações de caráter epigenético e não epigenético também são relevantes para o contexto de promoção tumoral. Tais processos podem ser altamente específicos de um indivíduo, ou ainda, comuns para alguns tipos tumorais definidos, como mutações no gene TP53 que é a mutação mais comum presente em tumores humanos, BRCA1 e BRCA2 observados principalmente em câncer gástrico, endométrio, mama e pâncreas e mutações em PTEN e PI3KCA, observados em câncer de mama, tireóide, endométrio, pulmão e gliomas (MARTINCORENA, *et al.*, 2016). Especificamente para o contexto de GBs, os principais oncogenes que se encontram superexpressos são o receptor do fator de crescimento

epidérmico (EGFR), proteína tumoral 53 (p53), isocitrato desidrogenase 1 (IDH1), neurofibromina 1 (NF1) e fosfatase homólogo de tensina (PTEN) (MUIR, *et al.*, 2020).

2.2. Sistema nervoso central

Dentre a totalidade de casos de câncer supracitados (em torno de 600 mil), apresentados pelo INCA para todo o território brasileiro cerca de 10 mil foram casos de câncer relacionados com o sistema nervoso central (SNC). Tal nome é dado para as estruturas neurais presentes no crânio e ao longo da coluna vertebral, possuindo estruturas celulares como neurônios e células gliais. Enquanto que os neurônios são responsáveis pela produção de sinais bioelétricos, as células da glia exercem a função de sustentação e manutenção dos neurônios e defesa do SNC (LENT, 2010; MENESES, 2015). Estas células são divididas em astrócitos, oligodendrócitos, microglíocitos e ependimócitos com funções na regulação de íons, nutrientes e mensageiros químicos próximos a neurônios, formação da bainha de mielina para condução de impulsos nervosos, manutenção tecidual e proteção do SNC na defesa contra agressores (LENT, 2010; MENESES, 2015).

2.3. Gliomas

Gliomas são as neoplasias mais comuns que afetam o SNC. São tumores que afetam astrócitos e oligodendrócitos e a classificação segundo a organização mundial da saúde (WHO, 2020) divide estes em astrocitomas (quando derivados de astrócitos), oligodendrogliomas (quando derivado de oligodendrócitos) e oligoastrocitomas (quando de natureza mista, derivados de astrócitos e oligodendrócitos). Estes três grupos são isoladamente classificados em quatro graus de malignidade, sendo que os que recebem o grau IV de classificação são os mais agressivos dentre os subtipos (WESSELING, *et al.*, 2018).

A classificação histológica, embora bastante criticada por não levar em conta fatores genéticos, ainda é utilizada. Ela classifica os tumores em quatro graus de acordo com aspectos histológicos como celularidade, ativação mitótica e pontos de necrose (OMURO, 2018). São eles:

Grau I: Astrocitoma pilocítico

Grau II: Astrocitoma difuso

Grau III: Astrocitoma anaplásico

Grau IV: Glioblastoma

2.4. Glioblastomas

Os GB correspondem a mais de 45% dos tumores cerebrais, acometendo principalmente crianças (0,15 a cada 100.000 casos) e idosos de 75 a 84 anos (15,03 a cada 100.000 casos) (estudos realizados na população estadunidense). Apesar da baixa incidência, a agressividade deste tipo tumoral é o que justifica a necessidade de estudos na área, pois, somente 5% dos indivíduos diagnosticados sobrevivem por cinco anos. Este número é ainda mais reduzido de acordo com a idade, sendo que somente 2% dos pacientes com mais de 65 anos possuem taxa de sobrevida superior a cinco anos (WIRCHING, 2016). Além disso, afeta 1,7 vezes mais homens do que mulheres (RHUN *et al.*, 2019). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), uma das possíveis classificações para GB é a ausência de mutação nos genes que codificam para isocitrato desidrogenase (IDH) do tipo 1 e 2. Essa classificação é possível, pois 90% dos GBs possuem IDH tipo selvagem, sendo que a presença de mutações no IDH indica que possivelmente trata-se de gliomas de baixo grau e o prognóstico, portanto, é favorável. Além disso, mutações como amplificação de EGFR (receptor de fator de crescimento epidérmico), mutações de ganho de função do cromossomo 7 e perda de função do cromossomo 10 (+7/-10) e mutações no promotor de transcriptase reversa da telomerase (TERT), incorporam padrões moleculares de diagnóstico da doença (RHUN, *et al.*, 2019; WESSELING, *et al.*, 2018).

2.5. Tratamento

A terapêutica atual para GB envolve remoção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, sendo a temozolomida (TMZ) (Temodal®), o principal quimioterápico atualmente utilizado, descoberto ainda na década de 80 e aprovado para uso em câncer de SNC pelo FDA (Foods and Drugs Administration) em 2005. Trata-se de um agente alquilante oral que promove metilações em bases do DNA, principalmente nas regiões O⁶ e N⁷ da guanina e N³ da adenina, formando metil-guaninas e/ou metil-adenina (ME-O6, ME-N7 e ME-N3), promovendo citotoxicidade, levando à parada de replicação do DNA, encaminhando essas células à morte por apoptose (TAYLOR *et al.*, 2015; FUKAI *et al.*, 2014; JIAPER, 2018).

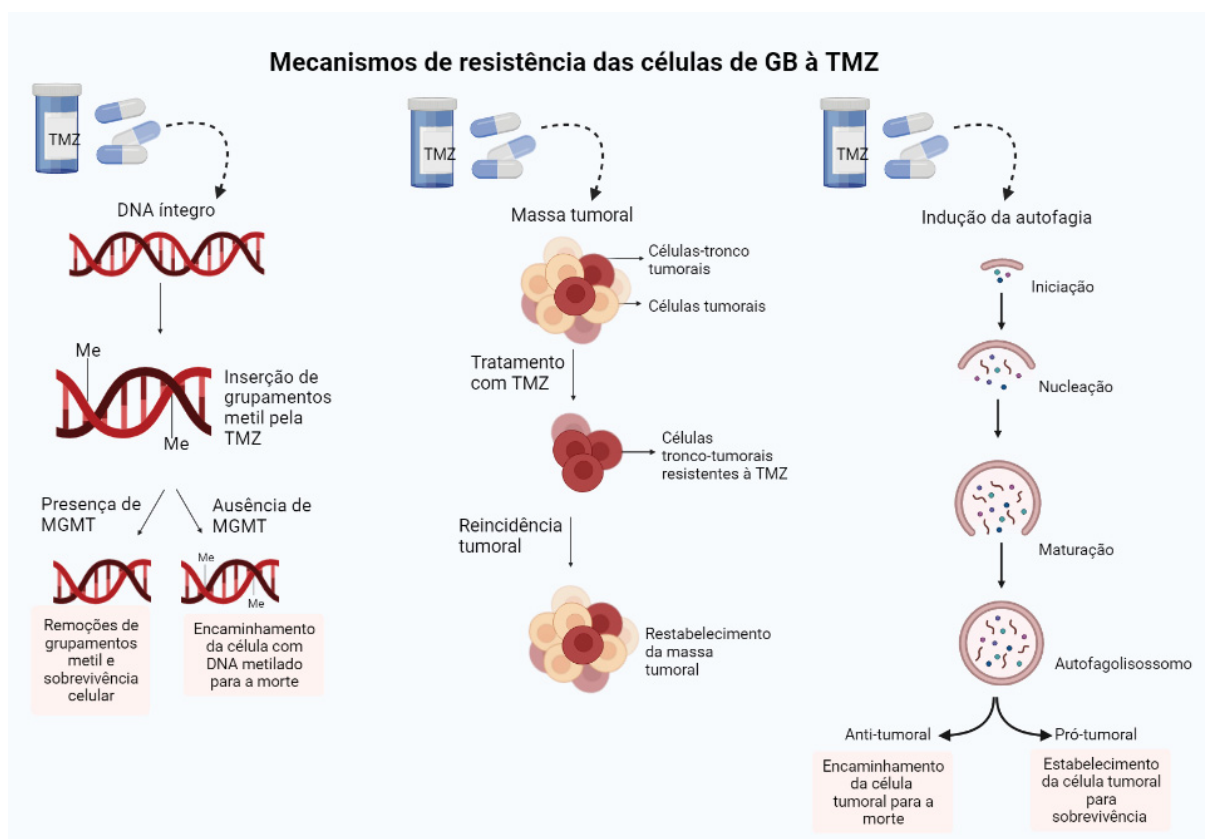
O uso da TMZ como estratégia terapêutica aumenta a expectativa de vida dos pacientes com GB em cerca de 2 anos. Porém, já foram descritos diferentes mecanismos de resistência ao uso deste fármaco. Dentre eles, destacam-se: a presença da maquinaria

enzimática O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT), que remove as metilações citotóxicas geradas pelo uso da TMZ, restabelecendo assim a fita de DNA, que continuará o processo de replicação, promovendo assim o crescimento/ restabelecimento tumoral a longo prazo. Sabe-se que os níveis de metilação de MGMT estão diretamente relacionados com a taxa de sobrevida dos pacientes, nos quais, na presença do promotor de MGMT metilado há um aumento da taxa de sobrevida quando comparado com o mesmo promotor não metilado. Segundo estudo publicado por Heigi e colaboradores em 2005, pacientes com GB tratados com TMZ e radioterapia que possuíam o promotor de MGMT metilado, tiveram uma taxa de sobrevida média de 21,7 meses, quando comparado com 15,3 meses dos pacientes que não possuíam a metilação em questão (HEIGI, 2005). Além disso, estudos demonstram que a atividade de MGMT é aumentada quando há recorrência tumoral quando comparada com sua expressão no tumor primário (WIEWRODT, 2008). Tais informações, fazem da maquinaria MGMT um dos principais alvos na terapia anti-GB (JIAPER, 2018; JACKSON, 2019).

Outro importante mecanismo de resistência à TMZ é a presença de células de GB com características de células-tronco, as chamadas *glioma stem cells* (GSCs). Tais células possuem uma quimiorresistência natural e um estágio de quiescência. Além disso, possuem alta capacidade de restaurar danos no DNA, alta capacidade de resistir a apoptose e alta expressão de transportadores ABC (JIN, *et al*; 2017).

A autofagia, processo de degradação de moléculas e/ou organelas frente a um estímulo estressante, também pode consistir em um mecanismo de resistência frente ao tratamento com TMZ por possuir um papel dual, pois embora possa encaminhar as células de GB aos mecanismos de morte, também pode atuar como mecanismo de resistência por possuir papel protetivo nas células de GB, através da redução dos índices de apoptose e da regulação da atividade de proteínas da família das caspases (HE, *et al*; 2019).

Figura 1. Mecanismos de resistência à TMZ.



FONTE: O autor (2021).

Nota: A presença de células-tronco de gliomas (esquerda) compoem a massa tumoral altamente heterogênea, torna o tratamento por TMZ parcialmente ineficaz. Estas células não são levadas a processos de morte pelas terapias convencionais por entrarem em um processo de quiescência. Após determinado período, essa subpopulação celular retoma o ciclo celular, sendo responsáveis pelas altas taxas de recidiva desse tipo tumoral. Outro mecanismo de resistência visto no GB é a presença da maquinaria MGMT (direita). Essa maquinaria promove a retirada das metilações citotóxica que foram causadas pela TMZ, inviabilizando assim o encaminhamento dessas células tumorais para processos de morte. Ainda, a modulação do processo de autofagia pode gerar o estabelecimento da massa tumoral por atuar diretamente na modulação de vias de sinalização envolvidas na indução apoptótica, como as vias das caspases.

Além dos mecanismos de resistência ao uso da TMZ, outras problemáticas que impedem a eficácia do tratamento atual para GB, são a capacidade altamente proliferativa e invasiva das células de GB, que impedem a destruição do tumor, a alta heterogeneidade intra e inter-tumoral, que faz com que seja mais difícil definir alvos moleculares para atuarem nessas diferentes populações celulares que formam a massa tumoral, o não encapsulamento da massa tumoral em local bem delimitado, a necessidade de características altamente lipofílicas dos fármacos, para que atravessem a barreira hematoencefálica, a natureza tumoral intrínseca

de resistência à apoptose e mecanismos de expulsão de drogas por transportadores de membrana (JIAPER, 2018; STRÖBELE, 2015).

Nesse sentido, surge a necessidade de se identificar novas vias moleculares que estejam envolvidas diretamente no contexto tumoral, com o objetivo de selecionar novos alvos farmacológicos mais específicos e assim melhorar o tratamento e, por conseguinte, a expectativas de vida dos pacientes. Interessantemente, inibidores da via PI3K/Akt e de ERK estão sendo amplamente estudados em ensaios clínicos em pacientes com GB, demonstrando potencial sensibilização das células frente à terapia convencional por TMZ (LI *et al.*, 2016).

2.6. Potencial uso dos inibidores LY294002 e U0126 na modulação das vias de sinalização de PI3K/Akt e MEK/ERK

2.6.1. LY294002

As enzimas fosfoinositídeos 3 quinase (PI3K), ligam-se a cauda intracelular de receptores tirosina quinase (RTKs) que são ativados por RTKs ou GPCRs (receptores acoplados à proteína G), que são responsáveis por fosforilar o fosfolípido de membrana fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). Um segundo mensageiro responsável por atuar como sítio de ancoragem para PDK-1 e AKT. As PI3Ks da classe IA são heterodímeros, ativadas por RTKs que possuem uma subunidade reguladora (p85) e uma subunidade catalítica (p110), frequentemente mutadas e encontram-se hiperativadas em muitos tumores humanos (WALKER, *et al.*, 2000).

PI3K é uma enzima da família de lipídeos quinases com diversas funções celulares vitais como proliferação, migração, diferenciação e mobilidade celular. Já é bem descrito o papel de PI3K na progressão de diferentes doenças como osteoporose, epilepsia e câncer (MAZUMDER, *et al.*, 2018). Dentro do contexto tumoral, a utilização de inibidores de PI3K têm se mostrado efetivo quando utilizado como droga adjuvante em conjunto com quimioterápicos para promover morte celular. Em um estudo realizado por Chakravarti e colaboradores mostrou que pacientes com GB e ativação oncogênica da via PI3K/Akt (medido por índices de fosforilação de componentes-chave da via) possuem taxa de sobrevida reduzida se comparada com pacientes sem tal ativação (CHAKRAVARTI *et al.*, 2004). Um segundo estudo realizado por Shi e colaboradores em 2017, mostrou que a combinação de TMZ, radiação ionizante e um inibidor de PI3K (GDC-0941) foram capazes de reduzir

viabilidade, invasão e migração para a linhagem T98G, sabidamente resistente ao tratamento por TMZ (SHI *et al.*, 2017).

Dentre os inibidores da via de PI3K/Akt, o inibidor LY294002 (Figura 2) possui destaque para este trabalho. Trata-se de um composto sintético altamente estável em solução, desenhado baseado no flavonóide quercetina amplamente utilizado na biologia celular. Ainda, parece ser capaz de aumentar a sensibilidade das células de GB frente à citotoxicidade induzida pela TMZ e radiação ionizante. Em um estudo publicado por Prevo e colaboradores em 2008, mostrou que a inibição da via PI3K pelo inibidor LY294002 (10 μ M por 1 h após radiação de 4Gy) foi capaz de sensibilizar células da linhagem U251MG de GB à morte celular por supressão de mecanismos de reparo de dano no DNA quando submetidas à radioterapia (terapia adjuvante), aumentando o efeito apoptótico da terapia de radiação (PREVO *et al.*, 2008). Também foi demonstrado que o inibidor LY294002 (5 μ M por 48h) tratado em conjunto com a TMZ (10 μ M por 48h) foi capaz de aumentar citotoxicidade e inibir invasão celular em linhagem de GB (U87MG) quando comparado com o tratamento isolado de TMZ (CHEN, *et al.*, 2012). Mais recentemente, Zajac e colaboradores demonstraram o papel de aumentar toxicidade e diminuir invasão frente ao inibidor LY294002 (10 μ M) em conjunto com a TMZ (50 μ M) para linhagem T98G, intrinsecamente resistente à TMZ por até 48 h. Demonstraram ainda que há um aumento do fluxo autofágico em detrimento da taxa de apoptose e que isso está correlacionado também com estresse de retículo endoplasmático (ZAJAC, *et al.*, 2021).

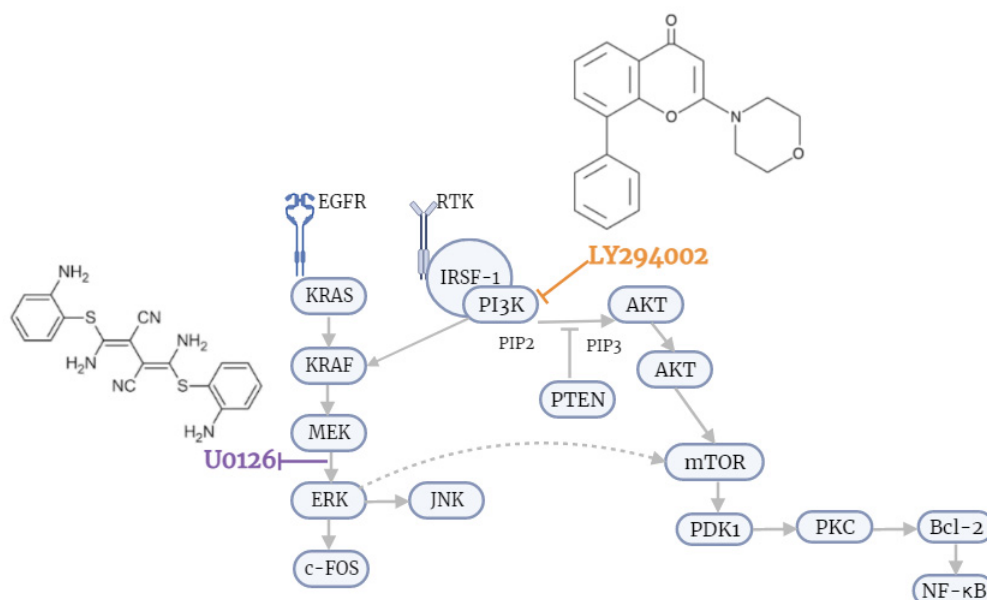
2.6.2. U0126

A proteína quinase 1 ativada por mitógenos (MEK1), também conhecida como MAP2K1, é uma proteína quinase com alvo conhecido a jusante do proto-oncogene serina / treonina quinase Raf-1 e está a montante da quinase regulada por sinal extracelular (ERK). A via de MEK/ERK possui importantes funções na proliferação, sobrevivência, diferenciação e plasticidade neuronal (WANG, *et al.*, 2018).

Uma ampla variedade de inibidores da via de MEK são atualmente investigadas em ensaios pré-clínicos ou clínicos para o tratamento de diferentes doenças, incluindo o câncer. Nesse sentido, o U0126 (1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis (2-aminofeniltio) butadieno) (Figura

2), um potente inibidor não-competitivo e seletivo de MEK 1 e 2, possui importante função sobre ERK/MAPK, alvos a jusante da via de MEK possui efeitos bem caracterizados. Tal inibidor tem demonstrado ser eficiente *in vitro* e *in vivo* para estudar as funções de MEK1/2 (JING, *et al.*, 2018; WANG, *et al.*, 2018). Em um estudo publicado por Lind e colaboradores em 2006, foi demonstrado que o uso de U0126 (10 μ M por 24 h) em linhagem de glioma murino (C6) foi capaz de diminuir invasão e migração das células (LIND, *et al.*, 2006). Outro estudo utilizando da mesma linhagem, mas tratado com U0126 (30 nM por 24h) e TMZ (500 μ M por 24 h) mostrou que o tratamento combinado foi capaz de reduzir parâmetros de proliferação, migração e invasão quando combinado com o tratamento isolado de TMZ (WANG, *et al.*, 2016). Ainda, um estudo utilizando linhagens resistentes à TMZ mostrou que houve mudanças fenotípicas e cariotípicas/ frente ao tratamento com U0126 (10 μ M) isoladamente ou em combinação com TMZ (100 μ M), sem alterar padrões de migração celular (STEPANENKO, *et al.*, 2016).

Figura 2. Via de sinalização PI3K/Akt e MEK/ERK. Representação esquemática do mecanismo de ação do inibidor LY294002 e U0126



FONTE:O autor (2020).

Nota: No esquema acima é demonstrado a via de sinalização PI3K/Akt e MEK/ERK. E o mecanismo de ação dos inibidores LY29002 e U0126, que inibe a fosforilação nas porções p85 e p110q de PI3K e do inibidor U0126 que inibe a fosforilação de MEK1/2.

2.7. O gene RECK: um alvo da via de PI3K/Akt

O gene RECK (proteína rica em cisteína indutora de reversão com motivos de Kazal) é encontrado em todas as células que constituem o corpo humano e fisiologicamente, sua função é controlar o equilíbrio entre construção e destruição da matriz extracelular (ECM). RECK é traduzido em uma glicoproteína de mesmo nome, que possui função de inibir MMPs (metaloproteinases de matriz) que degradam a ECM. Além disso, RECK atua como um indutor de novos vasos, processo conhecido como angiogênese, através de interações com VEGF (fator de crescimento endotelial vascular). Tais características fazem de RECK um importante fator na biologia do câncer. A forma canônica de RECK é encontrada inibida em diferentes tipos tumorais e diferentes oncogenes como Ras e MYC, atuam como inibidores de RECK (ALEXIUS-LINDGREN, 2014; NODA, 2003).

De forma interessante, em um estudo prévio realizado em nosso grupo de pesquisa, foi observado que a inibição da via de PI3K/Akt pelo inibidor LY294002 foi capaz de reduzir os níveis de expressão (RT-qPCR) do transcrito alternativo de RECK (*RECKvar3*) em modelo de melanoma humano (linhagem 1205Lu) se comparada com a expressão de RECK canônico (RECK) (JACOMASSO *et al.*, 2019).

Vale destacar que, em dados descritos previamente pelo grupo, observamos que o tratamento da linhagem que superexpressa *RECKvar3* (U87MG-*RECKvar3*) com TMZ não foi capaz de induzir índices significativos de citotoxicidade celular, enquanto que para outras linhagens, como U87MG parental, U87MG-EGFP (controle com vetor de superexpressão vazio) e U87MG-RECK (que superexpressa da forma canônica do gene RECK), o mesmo tratamento induziu morte entre 20 e 30% (compatível com resultados anteriores do grupo), evidenciando que, além de maior agressividade tumoral, a linhagem U87MG-*RECKvar3* pode estar relacionada com maior resistência frente ao quimioterápico TMZ (SPISILA, 2018).

2.8. Modelos de cultivo celular 3D – formação de esferoides por *hanging drops*

Atualmente o modelo mais utilizado para as análises *in vitro* utiliza de metodologias de cultivo em monocamada. Porém, esta técnica apresenta baixa reprodutibilidade quando comparada a modelos animais, não mimetiza a totalidade de interações observadas um ambiente *in vivo* (ANTONI *et al.*, 2015).

Além das limitações de estudos supracitados, outra importância observada nos estudos que utilizam de metodologias de cultivo em esferoides é a capacidade de estudar populações de células tumorais com características de células-tronco (do inglês, *cancer stem cells* (CSCs)). Sabe-se que as células que compõe a massa tumoral possuem características heterogêneas, exibindo diferentes fenótipos que podem estar relacionados com as células normais a que deram origem. Dessa maneira, nem todas as células presentes no tumor, possuem as mesmas características proliferativas para crescimento e manutenção tumoral. Nesse sentido, as CSCs compreendem um fundamental grupo responsável pela auto-renovação do tumor (LOBO, 2013). Diante disso, dados do nosso laboratório mostraram que o cultivo celular tridimensional utilizando a metodologia de *hanging drops*, seguido por cultivo celular em substrato não aderente (Poly-HEMA) apresenta-se como uma alternativa eficaz para a avaliação de esferoides com enriquecimento da população de CSCs (BARK, *et al.*, 2018).

No tecido cerebral adulto e fetal, as células-tronco normais foram primeiramente isoladas com base na expressão de CD133(+) por Uchida e colaboradores em 2000. Tais células são cultivadas em colônias esferoides não aderentes, chamadas de neuroesferas (UCHIDA *et al.*, 2000). No contexto do câncer, a expressão de CD133(+) é essencial para a formação e manutenção tumoral. Foi observado que somente células CD133(+) são capazes de formar novos tumores. (LOBO *et al.*, 2013).

De maneira interessante, a glicoproteína transmembrana CD133 interage com a subunidade reguladora de PI3K (p85) através de uma fosforilação na treonina 828 no domínio C-terminal e tal interação ativa preferencialmente a via de Akt gerando assim um aumento no índice de proteínas anti-apoptóticas e redução nos índices de proteínas pró-apoptóticas, promovendo então um fenótipo de maior resistência tumoral. Um estudo publicado por Wei e colaboradores em 2013 demonstrou que o *knockdown* de CD133 inibe a atividade de PI3K/Akt, demonstrando importante correlação entre as vias (WEI *et al.*, 2013; JANG *et al.*, 2017; CHEN, *et al.*, 2011).

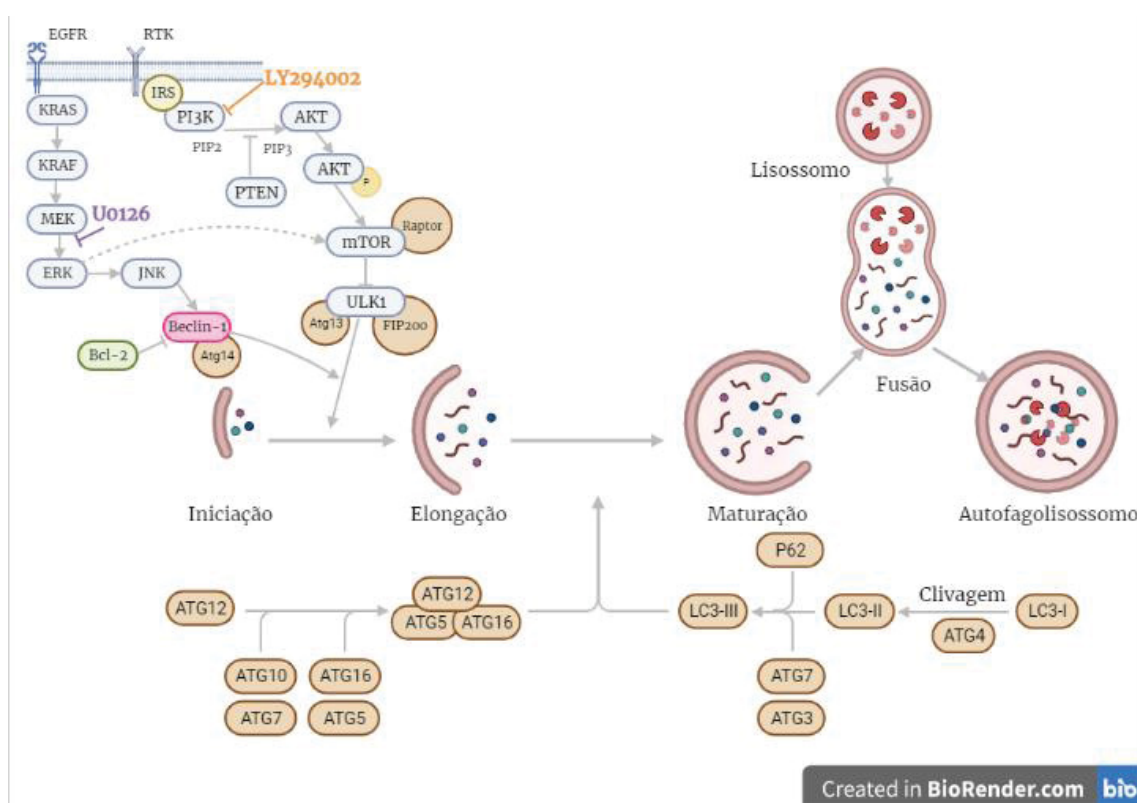
Ainda, uma análise de proteômica de GSCs isoladas de pacientes (subclasse mesenquimal) mostraram uma forte correlação com genes relacionados com a via autofágica (DRAM1 e SQSTM1) associada à via de RAS/MAPK. Interessantemente, a ativação da via

autofágica mostrou-se diretamente correlacionada com um aumento do fenótipo de invasão e migração dos tumores. Após tratamento com o inibidor U0126 (20 μ M), os níveis de autofagia mostraram-se reduzidos (GALAVOTTI, *et al.*, 2012).

2.9. Autofagia

Muitos são os processos celulares envolvidos na promoção e progressão tumoral, dentre eles destaca-se a autofagia, neste caso, a macroautofagia. Trata-se de um processo de degradação de moléculas do citoplasma ao lisossomo, realizada através da fusão de autofagossomos com lisossomos, formando uma organela híbrida de membrana dupla chamada de autolisossomo ou autofagolisossomo. Quando ativada, a macroautofagia leva à clivagem e ao endereçamento do material a outras organelas em forma de geração de energia e aproveitamento de recursos para a célula. Este mecanismo pode ocorrer fisiologicamente, como sinalização para sobrevivência, diferenciação, desenvolvimento, homeostasia e progressão tumoral, sendo regulado por genes da família Atgs (LIU *et al.*, 2016; NIXON *et al.*, 2013; WOLFE *et al.*, 2013). Na Figura 3, pode-se observar a regulação do processo autofágico mediado pela sinalização de PI3K/Akt e ERK/MEK.

Figura 3. Mecanismos de modulação do processo autofágico mediado pela sinalização de PI3K/Akt e MEK/ERK



FONTE: O autor (2022).

Nota: A sinalização bioquímica das vias de PI3K/Akt e MEK/ERK que convergem com a sinalização do processo autofágico são demonstradas em tons de azul. Nela podemos observar os principais fatores de ativação e indução das vias, além de evidenciar os pontos de atuação dos inibidores LY294002 (laranja) e U0126 (roxo). Também é evidenciada a participação da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (verde) em inibir a proteína pró-autofágica Beclin-1 (rosa) (tópico abordado adiante). A sinalização bioquímica dos principais moduladores do processo autofágico é mostrada em tons de marrom, nela, evidenciamos o papel de membros da família Atg, LC3 e de P62 como mecanismos moduladores indispensáveis. Por fim, é possível visualizar a ocorrência das principais etapas da autofagia, como a iniciação, a alongação do fagóforo e a consequente nucleação do material englobado, a maturação do fagóforo que culmina na sua fusão com o lisossomo maduro, gerando por fim uma organela híbrida chamada de autofagolisossomo, que será encaminhada para o processo de degradação.

No câncer, a autofagia cumpre função dual, podendo promover a progressão ou inibição do tumor. Atuando tanto por mecanismos que suprimam a resposta tumoral, como por mecanismos que atuem auxiliando no estabelecimento e desenvolvimento do tumor (LIU *et al.*, 2012). Sabe-se que agentes quimioterápicos, radioterápico e alguns fármacos podem atuar modulando a autofagia (NATSUMEDA *et al.*, 2011). Em um estudo realizado por Fillipp-Chiela e colaboradores em 2015, foi visto que o tratamento com TMZ induz a autofagia e que esse processo parece ter um papel citoprotetor na linhagem U87. Ainda, o tratamento agudo com TMZ (100 μ M por 1 h) induz a inibição sustentada da via Akt-mTOR, resultando em uma indução transiente da autofagia, levando a célula à resistência ao tratamento quimioterápico (FILIPPI-CHIELA *et al.*, 2016). Por outro lado, um trabalho publicado em linhagens de GB (U87MG e U251MG) mostrou que um supressor tumoral e importante regulador da etapa de nucleação da autofagia, Beclin-1, é capaz de interagir e inibir a proteína anti-apoptótica Bcl-2, gerando assim aumento nos níveis de apoptose (HUANG, *et al.*, 2014). Nesse sentido, a modulação do processo autofágico relacionou-se com um fenótipo anti-tumoral. Tais trabalhos, exemplificam a dualidade (anti e pró) tumoral e entender a dinâmica desse processo pode favorecer o entendimento da biologia de GB e o desenvolvimento de futuras terapêuticas.

Diversas são as maneiras de modular o processo autofágico dentro das terapêuticas antitumorais. Dentre elas estão a manipulação da via lisossômica. Em gliomas, já é bem descrito que os compostos actinomicina D, trióxido de arsênio, tamoxifeno, análogos da vitamina D, resveratrol e IFN- γ destacam-se por induzir a autofagia e consequentemente aumentar as taxas de citotoxicidade, elevando as taxas de apoptose, um processo conhecido como morte autofagia-dependente (KAZA, *et al.*, 2012). Sabe-se também, que células de glioma tratadas com o inibidor LY294002 parecem aumentar os índices autofágicos (ZAJAC, 2021), aumentando os níveis de apoptose. De maneira contrária, o tratamento com U0126 parece não alterar esses índices (WANG, *et al.*, 2017).

3 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a alta agressividade tumoral observada em gliomas, a baixa taxa de sobrevida dos pacientes diagnosticados com GB e as altas taxas de reincidência que culminam com o fenótipo resistente das células frente às terapias atuais disponíveis de quimioterapia, radioterapia e remoção cirúrgica, têm-se no cenário atual a busca por terapias adjuvantes que aumentem a eficácia de sensibilização das células tumorais à morte como importante foco de pesquisas atuais.

Além disso, sabe-se que a subpopulação de células com características de células-tronco possui uma resistência intrínseca aos mecanismos de morte celular estabelecidos para células tumorais bem diferenciadas, reduzindo ainda mais o sucesso do tratamento. Nesse contexto, sabe-se que a via de PI3K/Akt e ERK/MEK estão envolvidas em diferentes aspectos tumorais, sendo um deles o aumento do potencial invasivo, que ocorre através da ação de MMPs que promovem o remodelamento da ECM. O gene *RECK*, em sua forma canônica, atua como um inibidor de MMPs e codifica para diferentes transcritos alternativos gerados por processo de *splicing* alternativo. Alguns destes transcritos têm se mostrado como importantes geradores de um fenótipo de maior agressividade tumoral e podem estar relacionados com maior resistência frente ao quimioterápico TMZ. Sendo assim, estudos que visem compreender o papel da inibição das vias de PI3K/Akt, assim como MEK/ERK em células com diferentes sensibilidades à TMZ e expressões diferenciais dos transcritos de *RECK*, torna-se um foco de estudo muito interessante e relevante para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na biologia tumoral, visando a busca por alternativas de tratamento mais efetivas para GB.

4 OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar se a inibição das vias de PI3K/Akt e MEK/ERK é capaz de sensibilizar linhagens de glioma humano com diferentes fenótipos de resistência tumoral quando combinadas com TMZ e uma possível modulação do processo de autofagia, de forma a propiciar o melhor entendimento dos mecanismos celulares relacionados ao aumento no índice de morte celular.

4.2. Objetivos específicos

- Analisar a contribuição da inibição das vias de PI3K/Akt e ERK no processo de sensibilização de morte celular frente ao tratamento com temozolomida em células de glioblastoma humano. Para abordar esse contexto, análises de proliferação, atividade metabólica das células, avaliação de integridade de membrana celular e a expressão de proteínas relacionadas com o processo de morte celular (Bcl-2) foram exploradas, utilizando a linhagem T98G e comparativamente a ela, as linhagens U87MG, A172 e U87RTMZ.

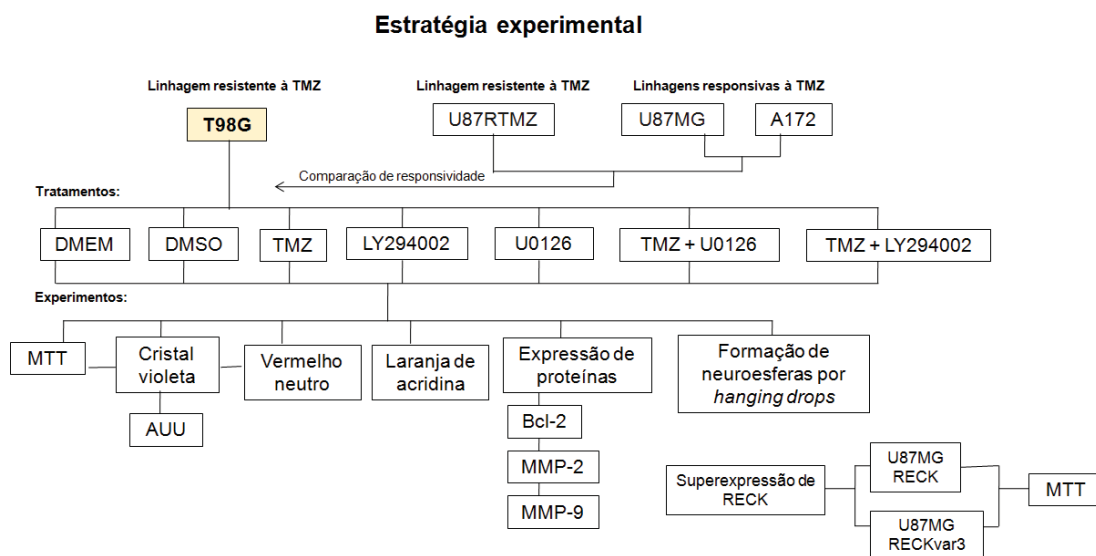
- Avaliar a indicação de modulação do processo autofágico em células de glioblastoma humano após tratamento combinado de TMZ e os inibidores de PI3K e ERK. Nessa etapa, foram determinadas as unidades arbitrárias de autofagia (AUU) e análise de marcação de organelas vesiculares ácidas em linhagens sensíveis e resistentes ao quimioterápico padrão, utilizando as linhagens U87MG, A172, T98G e U87RTMZ.

- Avaliar a contribuição de PI3K e ERK para a formação e manutenção de esferoides derivados de células de glioblastoma humano cultivados em *hanging drops*. Ensaios de cultivo em *hanging drops* e manutenção em substrato não aderente, seguido de análises fenotípicas, foram realizados utilizando as linhagens U87MG, A172 e T98G.

- Avaliar o papel de RECK e MMPs (MMP2 e MMP9) no fenótipo de sensibilização das células de glioblastoma humano ao tratamento quimioterápico. Nessa etapa foram utilizadas as linhagens U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-*RECK*^{var3}.

4.3. Estratégia de Ação

Figura 4. Estratégia experimental



FONTE: O autor (2021).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Procedimentos em cultivo celular

5.1.1. Esterilização e manejo de materiais e células

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

5.2. Soluções e meios de cultura

5.2.1. Solução de PBS

A solução salina fosfato tamponada (PBS) utilizada para lavagem das células em cultura foi preparada como uma solução estoque concentrada cinco vezes (NaCl 680 mmol/L, KCl 13,4 mmol/L, Na₂HPO₄ 40,5 mmol/L), e diluída para uso posterior com pH ajustado para 7,4, sendo esterilizada em autoclave nas condições anteriormente mencionadas e armazenada em temperatura ambiente.

5.2.2. Solução de tripsina-EDTA

Células aderentes foram soltas de seu substrato utilizando-se solução de tripsina-EDTA (NaCl 137 mmol/L, KCl 54 mmol/L, glucose 5 mmol/L, Na₂HPO₄ 0,42 mmol/L, KH₂PO₄ 0,44 mmol/L, NaHCO₃ 2,3 mmol/L, EDTA 0,53 mmol/L e 50mg de tripsina, pH 7,4). Esta solução é esterilizada por filtração em membrana estéril com poro de 0,22 µm (Millipore) sob pressão em aparato Sartorius, em câmara de fluxo laminar e armazenada a -20°C.

5.2.3. Solução estoque de temozolomida

A solução estoque de TMZ (Temodal®) Sigma-Aldrich, encontra-se na concentração de 100mM diluída em DMSO e armazenada a 4°C. Para os experimentos com células, foi utilizada a concentração de 100µM de TMZ, também diluída em DMSO. Como controle foi utilizado: células na presença do meio de cultura e células na presença de DMSO (veículo da droga; volume equivalente ao utilizado no tratamento combinado com os inibidores LY294002 e U0126).

5.2.4. Solução estoque de LY294002

A solução estoque do inibidor LY294002, Cayman Chemical Company, encontra-se na concentração de 10 mM diluída em DMSO e armazenada a -20°C. Para os experimentos com células foi utilizada a concentração de 10 µM de LY294002, diluída em DMSO.

5.2.5. Solução estoque de U0126

A solução estoque do inibidor U0126, Promega Company, encontra-se na concentração de 10 mM diluída em DMSO e armazenada a -20°C. Para os experimentos com células foi utilizada a concentração de 10 µM de U0126, diluída em DMSO.

5.2.6. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) alta glicose (Sigma-Aldrich), esterilizado por meio de filtração em membrana de 0,22µm. O meio DMEM é suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco) e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Gibco).

5.3. Linhagens celulares e condições de cultivo

5.3.1. Linhagens celulares

As linhagens celulares estudadas foram gentilmente cedidas pela Prof^a. Dr^a. Mari Cleide Sogayar do Núcleo de Terapia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP). Estas culturas foram mantidas em incubadora com 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. As subculturas foram realizadas de acordo com a confluência das células, utilizando-se a solução de tripsina-EDTA para desprendê-las do substrato plástico.

A superexpressão do quadro aberto de leitura (*Open reading frame* – ORF) de RECK e do transcrito alternativo *RECKvar3* foi obtido através de clonagem da sequência amplificada desta ORF em um vetor lentiviral de superexpressão, gerando plasmídeos chamados de pLV-RECK e pLV-*RECKvar3*. Como controle foi gerado um vetor sem nenhuma inserção no sítio de restrição. Este plasmídeo foi chamado de pLV-EGFP.

5.3.2. Estabelecimento da linhagem U87MG resistente à TMZ (U87RTMZ)

Para o estabelecimento da linhagem U87MG resistente à TMZ foram utilizadas concentrações crescentes de TMZ na linhagem U87MGparental ao longo de 5semanas, sendo a concentração inicial de 25 µM, posteriormente 50 Mm e, finalmente, 100 µM (STEPANENKO *et al*, 2016). A aquisição de resistência foi confirmada através dos ensaios de MTT e cristal violeta.

Tabela 1. Linhagens celulares

Nomenclatura	Modificações
U87MG	Linhagem parental
T98G	Linhagem parental
A172	Linhagem parental
U87RTMZ	Linhagem farmacologicamente resistente à TMZ
U87MG pLv RECK (U87MG-RECK)	Superexpressão de RECK canônico
U87MG pLv RECKB (U87MG- <i>RECKvar3</i>)	Superexpressão do transcrito de <i>RECKvar3</i>
U87MG pLv EGFP (U87MG-EGFP)	Controle de superexpressão

FONTE: O autor (2021).

5.4. Avaliação da viabilidade celular

5.4.1. Ensaio de MTT

Para determinar o IC₅₀ dos inibidores para as linhagens utilizadas neste trabalho, foi utilizada a metodologia de MTT (descrito anteriormente por REILLY *et al.*, 1998). Para tal, as células foram plaqueadas na densidade de 4×10^3 células/poço) em placas de 96 poços e incubadas durante 24 horas para total adesão das células. Após esse período, as células foram tratadas nas condições DMEM, DMEM + DMSO [0,2%] (concentração equivalente à combinação TMZ 100 μ M + 10 μ M dos inibidores) e os inibidores LY294002 e U0126 (5 μ M, 10 μ M e 50 μ M) durante 72 horas. Depois do tratamento, o meio foi removido e as células foram incubadas com solução de MTT (500 μ g/mL em PBS) por 3 horas a 5% de CO₂ e temperatura de 37°C, sob o abrigo da luz. Após esse período, a solução de MTT foi removida e os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e a absorbância foi determinada em leitor de microplacas (TecanInfinite 200, Tecan Systems, Inc.), a 570nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (considerado como 100% de células viáveis).

Tal ensaio supracitado também foi utilizado, após a seleção da concentração dos inibidores, para avaliar a atividade dos mesmos isoladamente ou em combinação com a TMZ ao longo do tempo (24, 48 e 72h), assim como para avaliar a atividade dos inibidores isoladamente em linhagens que superexpressam o gene RECK, utilizando da mesma metodologia supracitada.

5.4.2. Método de Cristal Violeta

Para a análise da viabilidade celular por esse método foram plaqueadas 4×10^3 células/poço em placas de 96 poços e estas deixadas em incubadora a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ durante 24h para a adesão das células. Após este período, foi realizado o tratamento com DMEM, DMEM + DMSO 0,2%, TMZ 100 μ M, LY294002 10 μ M, U0126 10 μ M, TMZ 100 μ M + LY294002 10 μ M e TMZ 100 μ M + U0126 10 μ M durante 72 horas. Após o tratamento, o meio de cultura com os tratamentos foi retirado, as células lavadas com PBS, e posteriormente fixadas com metanol 100% durante 10 minutos.

Após este tempo, o metanol foi retirado e adicionou-se aos poços a solução de cristal violeta (cristal violeta 0,2% em etanol 2%) durante 3 minutos. O cristal violeta cora ácidos

nucléicos das células aderidas e fixadas (KUENG *et al.*, 1989). O cristal violeta é retirado e são realizadas dez lavagens com PBS para a remoção do excesso de corante. Após estas lavagens, foi realizada a eluição do conteúdo aderido às placas com uma solução de citrato de sódio (citrato de sódio 0,05mol/L em etanol 50%) durante 10 minutos sob agitação. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (TecanInfinite 200, Tecan Systems, Inc.), a 550nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (considerado como 100% de células viáveis).

5.4.3. Método de vermelho neutro

As células foram plaqueadas 4×10^3 células/poço em placas de 96 poços e estas deixadas em incubadora a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ durante 24h para a adesão das células. Após este período, foi realizado o tratamento com TMZ 100 µM, LY294002 10 µM, U01265 10 µM, TMZ 100 µM + LY294002 10 µM e TMZ 100 µM + U0126 10 µM durante 72 horas. Em seguida, as células foram incubadas em solução de vermelho neutro (500µg/mL em PBS) por 2 horas sob abrigo de luz, em estufa de 37°C com 5% de CO₂, seguindo protocolo descrito por (REPETTO, *et al.*, 2008). Após o tempo de tratamento as células foram lavadas com PBS e foram adicionados 100µL de solução de extração (Etanol/ Ácido acético, 50%/1%). Após esse período, a leitura da absorbância foi realizada a 550nm em leitor de microplacas (TecanInfinite 200, Tecan Systems, Inc.). Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (considerado como 100% de células viáveis).

5.5. Determinação do Índice Autofágico – AAU

O cálculo das unidades autofágicas arbitrárias (AAU), foi realizado segundo Martin *et al.* (2013), a partir da fórmula:

$$AAU = 2Xa / (Xb + Xc)$$

Onde:

Xa = níveis de sobrevivência celular pelo método de vermelho neutro

Xb = níveis de sobrevivência celular pelo método de MTT

X_c = níveis de sobrevivência celular pelo método de cristal violeta

5.6. Avaliação de organelas vesiculares ácidas por laranja de acridina

As células de todas as linhagens foram plaqueadas em placas p96 na densidade de 4×10^3 células/poço. Após 24 horas para que ocorresse a adesão celular, as células foram tratadas com TMZ 100 μM , LY294002 10 μM , U01265 10 μM , TMZ 100 μM + LY294002 10 μM e TMZ 100 μM + U0126 10 μM durante 72 horas. Conforme protocolo proposto por (Thomé T. M., 2013), o meio foi retirado e os poços foram lavados com PBS. Foram então adicionados 100 μL de solução de laranja de acridina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS) por poço e aguardado 15 minutos, para seguinte observação em microscópio de luz invertida defluorescência (ZeissAxiovert).

5.7. Avaliação da expressão gênica de proteínas

5.7.1. Extração e quantificação de proteínas

As células foram plaqueadas em placas de 100mm, na concentração de 1×10^6 células/placa e incubadas por 24 horas em estufa, a 37°C com 5% de CO_2 para que fossem aderidas na placa. Após esse período, as células foram tratadas com TMZ 100 μM , LY294002 10 μM , U01265 10 μM , TMZ 100 μM + LY294002 10 μM e TMZ 100 μM + U0126 10 μM durante 72 horas. Em seguida, coletou-se o meio de cultura e as células foram lavadas com PBS resfriado. Após a lavagem, as células foram desaderidas com solução de EDTA 2 mM. O conteúdo total foi centrifugado a 6000g por 3 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, adicionou-se tampão RIPA+ (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, desoxicolato de sódio 1%, Triton X-100 1%, SDS 0,1%, 1mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM β -glicerofosfato, 2,5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) com 1% de PMSF e colocado imediatamente a 4°C por 45 minutos, com vórtex rigoroso a cada 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 15000g, por 10 minutos a 4°C . Após, foi coletado o sobrenadante e congelado imediatamente a -80°C .

A quantificação de proteínas das amostras foi realizada utilizando a metodologia de Bradford (BRADFORD *et al.*, 1976). Para isso, foi realizada uma curva padrão com concentrações crescentes de BSA 2mg/mL (0 uL, 1uL, 2uL, 3uL, 4uL e 5 uL por poço) e volume constante do reativo de Bradford (0,1 mg/mL de Comassie Brilliant Blue G-250, 0,05% de Etanol 95% e 0,1% de Ácido Fosfórico 85%) 195 uL por poço de uma placa p96. As amostras foram diluídas em RIPA+ (1:10) e 5uL desta diluição foram adicionados em

duplicada na mesma placa, junto com 195uL do reativo de Bradford. A leitura da absorbância foi realizada a 595nm em leitor de microplacas (TecanInfinite 200, Tecan Systems, Inc.). Em seguida, uma função de primeiro grau ($y=[ax+b]$) foi gerada, na qual x equivale a concentração de proteínas e y equivale a absorbância encontrada e o valor encontrado foi multiplicado pelo fator de diluição do RIPA+, 10.

5.7.2. Imunodeteção de proteínas

Foram utilizadas alíquotas de 50 µg de proteína, 6 µL de tampão de amostra 5 X (Tris-HCl (pH 6,8) 150 mM, SDS 6%, glicerol 30%, β-mercaptoetanol 15% e azul de bromofenol 0,3%) e para completar um volume final de 30 µL por amostra, foi utilizado tampão RIPA+ (composição subscrita no item 5.7.1) para eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS PAGE nas concentrações de 12%-15% utilizando em média voltagem de 120V por 2 horas. Como padrão de peso molecular, foi utilizado 3 µL do Spectra Multicolor High Range ProteinLadder (ThermoScientific). Após este processo, as proteínas do gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de PVDF com transferência semi-seca, utilizando 20V e 300mA por 1 hora. Para proteínas maiores que 80kDa foram utilizados 100 ug de proteínas e 6uL do tampão redutor 5x subdescrito no item 5.7.1. Para a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS PAGE nas concentrações de 8%-10% utilizando em média voltagem de 120V por 2 horas. Como padrão de peso molecular, foi utilizado 3 µL do Spectra Multicolor High Range ProteinLadder (ThermoScientific). Após este processo, as proteínas do gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de PVDF com transferência úmida utilizado voltagem média de 70V e 350mA por 2,5 horas. A coloração de Ponceau foi utilizada para visualizar a transferência para a membrana e o corante azul de bromofenol foi utilizado para a coloração do gel. A detecção das proteínas foi realizada a partir da incubação por 4 h dos anticorpos primários anti-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology), anti-MMP-2 (Cell Signaling Technology), anti-MMP-9 (Cell Signaling Technology) e anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology), a temperatura ambiente, ou overnight a 4°C e por 2 h dos anticorpos secundários anti-mouse e anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology) diluídos conforme instruções do fabricante. Para a revelação, a membrana foi incubada com o substrato quimioluminescente Super Signal® West Atto Ultimate Sensitivity Substrate – ThermoScientific) durante 1 min, em temperatura ambiente utilizando a fotodocumentador GE Healthcare Launches High Performance Amersham® Imager 600 series.

5.8. Hangingdrops

5.8.1. Formação dos esferoides

Conforme já padronizado em nosso laboratório por (BARK, *et al.*, 2017). As células foram plaqueadas em tampas de placas p100, na densidade de 1×10^3 células em um volume de 25 μL por gota de meio de cultura DMEM, enriquecido com 10% de SBF com os tratamentos DMEM, DMEM + DMSO 0,2%, TMZ 100 μM , LY294002 10 μM , U0126 10 μM , TMZ 100 μM + LY294002 10 μM e TMZ 100 μM + U0126 10 μM . Após um período de 72 h, foram feitas análises comparativas da morfologia dos esferoides através da utilização do microscópio de luz invertida Carl Zeiss, do modelo Axiovert 40 acoplado à câmera Zeiss Axio Cam MR. O software usado para análise da imagem foi o Axiovision.

5.8.2. Manutenção de esferoides em substrato não aderente

Conforme já padronizado em nosso laboratório por (BARK, *et al.*, 2017). Após o período de formação de esferoides apenas em meio DMEM, as células foram transferidas para um microtubo estéril até que houvesse a decantação completa dos esferoides. Havendo a decantação, as células tiveram seu meio removido e foram ressuspensas em novo meio de cultura e transferidas para novas placas p100 recobertas com poly-HEMA 1.2% para evitar adesão, permanecendo neste ambiente por 5 dias, sendo que no segundo dia as células foram tratadas com DMEM, DMEM + DMSO 0,2%, TMZ 100 μM , LY294002 10 μM , U0126 10 μM , TMZ 100 μM + LY294002 10 μM e TMZ 100 μM + U0126 10 μM para que totalizasse 72h de tratamento. Em seguida, foram feitas análises fenotípicas das esferas.

5.9. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPadPrism6.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). Para a comparação entre os valores experimentais obtidos entre o controle e as condições de tratamento, foi realizado o teste ANOVA com teste de Tukey. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

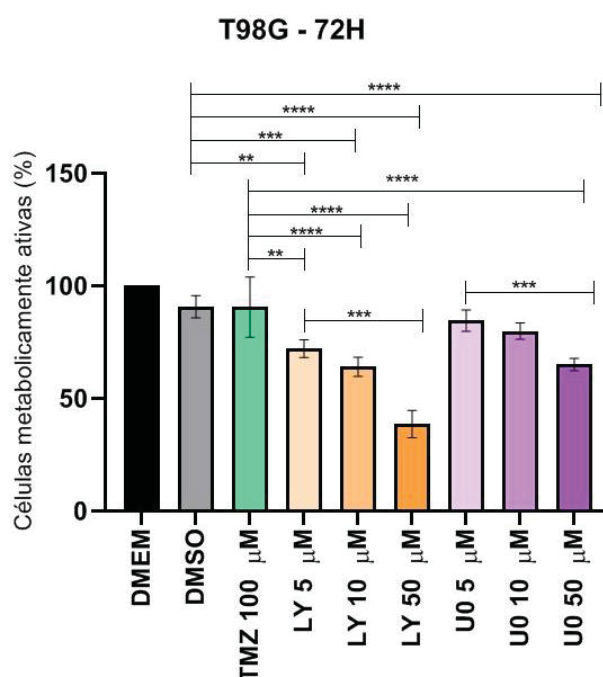
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. *Screening* inicial para determinação de concentração de uso dos inibidores de PI3K (LY294002) e ERK (U0126) em células de GB resistentes à TMZ (linhagem T98G)

Para determinara concentração de uso apropriada dos inibidores de PI3K (LY294002) e ERK (U0126) foi realizado um ensaio de dosagem de atividade metabólica celular, pelo método de MTT. Tal ensaio, utiliza da colorimetria gerada por uma redução do sal de MTT(brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) em cristais de formazan insolúveis, que possuem coloração roxa, quando na presença de desidrogenases celulares, principalmente mitocondriais. Para essa análise foi utilizada a linhagemde glioblastoma humano caracterizada como resistente ao quimioterápico padrão TMZ - linhagem T98G, tratada por 72h com os inibidores LY294002 e U0126nas concentrações de 5 μ M, 10 μ M e 50 μ M e TMZ na concentração de 100 μ M. Como condições controle foram utilizadas as células mantidas apenas em meio DMEM e células tratadas apenas com o veículo dos fármacos, DMSO 0,2% (quantidade equivalente ao utilizado na maior concentração do tratamento com os inibidores).

Os resultados estão representados na Figura 5.

Figura 5.Screening inicial para determinação da concentração a ser utilizada dos inibidores LY294002 e U0126



FONTE: O autor (2022).

NOTA: Células da linhagem T98G (4×10^3 cél/p96) foram tratadas com LY294002 (5 μ M, 10 μ M e 50 μ M), U0126 (5 μ M, 10 μ M e 50 μ M) e TMZ (100 μ M) por 72h. Atividade metabólica foi avaliada por ensaio de MTT. Como controle experimental foi utilizado meio DMEM e veículo DMEM + DMSO 0,2%. Os gráficos representam dados de quatro experimentos independentes realizados em triplicata (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p > 0,0001$).

Observamos que não houve alteração na atividade metabólica das células T98G após tratamento apenas com o quimioterápico TMZ, comprovando as características clássicas dessa linhagem resistente. Em relação ao tratamento com os inibidores, verificou-se que ambos os inibidores promoveram diminuição da porcentagem de células metabolicamente ativas, porém, de maneira geral o inibidor LY294002 mostrou-se mais citotóxico em comparação com o inibidor U0126. Observou-se que na maior concentração utilizada (50 μ M) o tratamento com LY294002 promoveu uma redução na porcentagem de células T98G metabolicamente ativas de 38,64% em comparação com 62,55% de redução promovida pelo tratamento das células T98G com o inibidor U0126 na mesma concentração. Vale ressaltar que essa maior citotoxicidade promovida pelo LY294002 em comparação com U0126 também foi observado quando diferentes linhagens de GB foram avaliadas (A172, U87MG, U87MG-RTMZ – dados não mostrados).

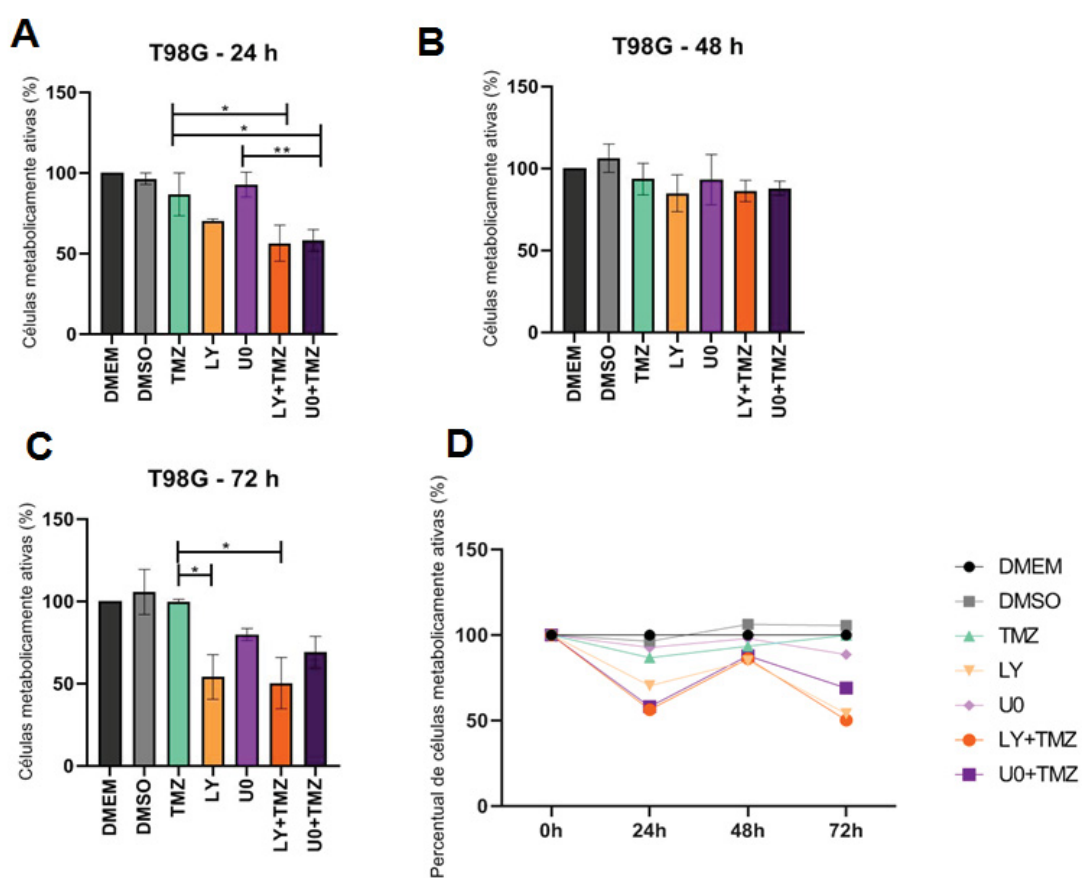
Para o inibidor LY294002, a concentração de 10 μ M foi selecionada para as análises posteriores com base na redução significativa da porcentagem de células metabolicamente ativas tanto em comparação com o controle DMSO, quanto em relação a condição que as células T98G foram tratadas apenas com TMZ (Figura 5). Tais resultados corroboram com dados encontrados na literatura para as linhagens U87MG e LN18 (FRIEDMAN *et al.*, 2013). Ainda mais interessante, dados publicados com a linhagem T98G mostraram que concentrações de 10 μ M do inibidor LY294002 foram capazes de reduzir significativamente índices de células viáveis (ZAJAC *et al.*, 2021). Já para o inibidor U0126, as menores concentrações utilizadas não promoveram alteração na atividade metabólica das células T98G, porém, dados da literatura mostram que o tratamento da linhagem T98G com 10 μ M de U0126 foram capazes de reduzir significativamente índices proliferativos (STEPANENKO, *et al.*, 2016) – o que foi corroborado no presente estudo, em ensaios posteriores de proliferação das células T98G (Figura 6). Além disso, dados publicados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que a concentração de 10 μ M de U0126 gera importante efeito citotóxico para modelo de melanoma metastático (JACOMASSO *et al.*, 2020). Nesse sentido, foram adotadas para os ensaios posteriores as concentrações de tratamento de 10 μ M para ambos os inibidores LY294002 e U0126.

6.2. Avaliação do efeito citotóxico de Temozolomida (TMZ) em combinação com os inibidores das vias de PI3K/Akt e ERK em células de GB humano

6.2.1. Avaliação da porcentagem de células metabolicamente ativas após tratamento com TMZ em combinação com os inibidores

Com o intuito de avaliar parâmetros de citotoxicidade celular frente ao uso dos inibidores, células da linhagem T98G foram tratadas com os inibidores isoladamente ou em combinação com a TMZ ao longo de 24h, 48h e 72h e a atividade metabólica das células foi avaliada pelo método de MTT. Os resultados estão indicados na Figura 6.

Figura 6. Avaliação de citotoxicidade celular pelo método de MTT



FONTE: O autor (2022).

NOTA: Gráficos de citotoxicidade celular da linhagem T98G (4×10^3 cél/p96) realizados pelo ensaio de MTT após o tratamento com LY294002 (10 μ M) e U0126 (10 μ M) isolados ou combinados com TMZ (100 μ M)

por 24h, 48h e 72h. Como controle experimental foi utilizado DMEM e DMEM + DMSO (0,2%). Os gráficos representam dados de três experimentos independentes realizados em triplicata (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Os resultados mostram que não há diferença estatística entre os controles experimentais utilizados (DMEM e DMSO) e a condição das células T98G tratadas apenas com TMZ, reforçando a ideia de que se trata de uma linhagem intrinsecamente resistente à TMZ. No entanto, foi possível observar uma alteração na atividade metabólica das células T98G após tratamento com os inibidores LY294002 e U0126 ou ainda em combinação destes inibidores com TMZ.

Observa-se que após 24 h, apenas as condições de tratamento com os inibidores combinados LY+TMZ (69,61%) e U0+TMZ (66,97%) apresentaram redução significativa de células metabolicamente ativas quando comparado com as células tratadas apenas com TMZ (não significativo). Ainda, houve redução significativa da atividade metabólica das células T98G entre a condição de células tratadas apenas com o inibidor U0126 (92,86%) em comparação com o tratamento combinado deste com a TMZ (U0+TMZ) (66,97%) (Figura 6 – A). Em 48 h, nenhum dos tratamentos demonstrou diferença estatística (Figura 6 – B). Já em 72 h, o tratamento das células T98G com o inibidor LY294002 (LY) isolado (67%) e sua combinação com a TMZ (LY+TMZ) (61,25%) demonstraram redução significativa de células metabolicamente ativas, quando comparado com o tratamento isolado de TMZ (90,58%) (Figura 6 – C). Ainda, quando observamos as porcentagens de células metabolicamente ativas encontrados ao longo do tempo, observamos uma tendência de redução nesse percentual para todos os tratamentos comparados com a TMZ, exceto para o tratamento com o inibidor U0126 (condição U0) tratado isoladamente (Figura 6 – D).

Dados da literatura, que utilizaram o tratamento de um inibidor de PI3K (GDC0941-50 μ M por 48h) mostrou redução nos níveis de atividade metabólica na linhagem T98G (SHI, *et al.*, 2017). Apresentando assim, um perfil de aumento de citotoxicidade semelhante ao que observamos para outro inibidor da mesma via, o LY294002. Para o inibidor U0126, não foram encontrados dados que correlacionassem a redução de níveis de atividade metabólica.

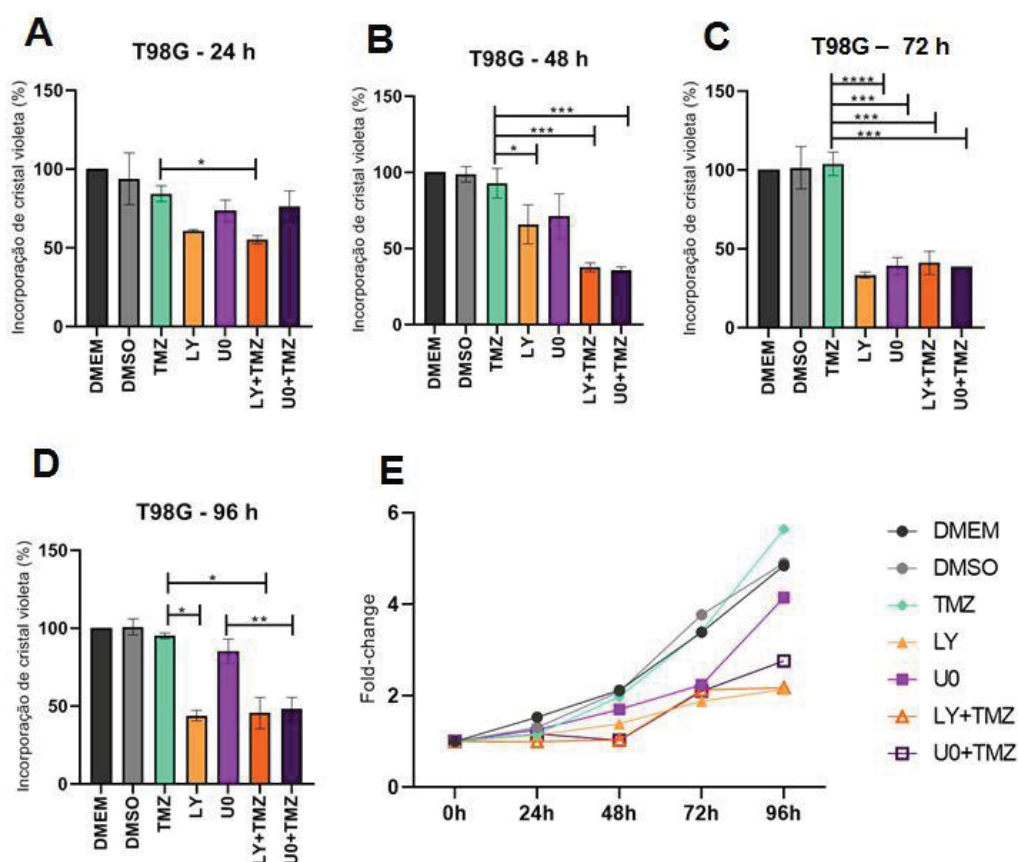
De modo interessante, Jang e colaboradores observaram que o tratamento com LY294002 e U0126 na concentração de 10 μ M geraram uma redução considerável nos níveis de proliferação e aumento na fração apoptótica em células de câncer de mama da linhagem MDA-MB-468 (JANG *et al.*, 2010). Ensaios preliminares de ciclo celular também mostraram aumento no percentual de marcação na fração sub G1, indicativo de morte celular, frente ao tratamento com os inibidores LY294002 e U0126 isolados, e mais evidente após combinação com a TMZ, quando comparados ao tratamento isolado de TMZ (dados não mostrados). Esse

resultado corrobora com os índices de fração apoptótica encontrados em trabalhos da literatura que também utilizaram da inibição de PI3K (GDC0941) (SHI, 2017).

6.2.2. Avaliação da porcentagem de células aderidas após tratamento com TMZ em combinação com os inibidores

Para a avaliação da porcentagem de células T98G aderidas ao longo do tempo (24h, 48h, 72h e 96h) foi utilizada a metodologia de coloração por cristal violeta. O princípio do método avalia que células não viáveis se desprendem da placa com o progresso da morte celular, permanecendo aderidas somente as células viáveis. Estas células, por sua vez, são incubadas com o corante cristal violeta que possui a capacidade de se ligar a proteínas e DNA. Desta forma, o corante retido nas células é eluído e a mensuração da coloração final é medida em termos de absorbância. Os resultados obtidos estão representados na Figura 7.

Figura 7. Avaliação do número de células aderidas ao longo do tempo



FONTE: O autor (2022).

NOTA: Gráficos de número de células aderidas da linhagem T98G (4×10^3 cél/p96) realizados pelo ensaio de cristal violeta após o tratamento com LY294002 (10 μ M) e U0126 (10 μ M) isolados ou combinados com TMZ (100 μ M) ao longo de 24h, 48h, 72h e 96h. Como controle experimental foi utilizado DMEM e DMEM + DMSO 0,2%. Os gráficos representam dados de três experimentos independentes realizados em triplicata.

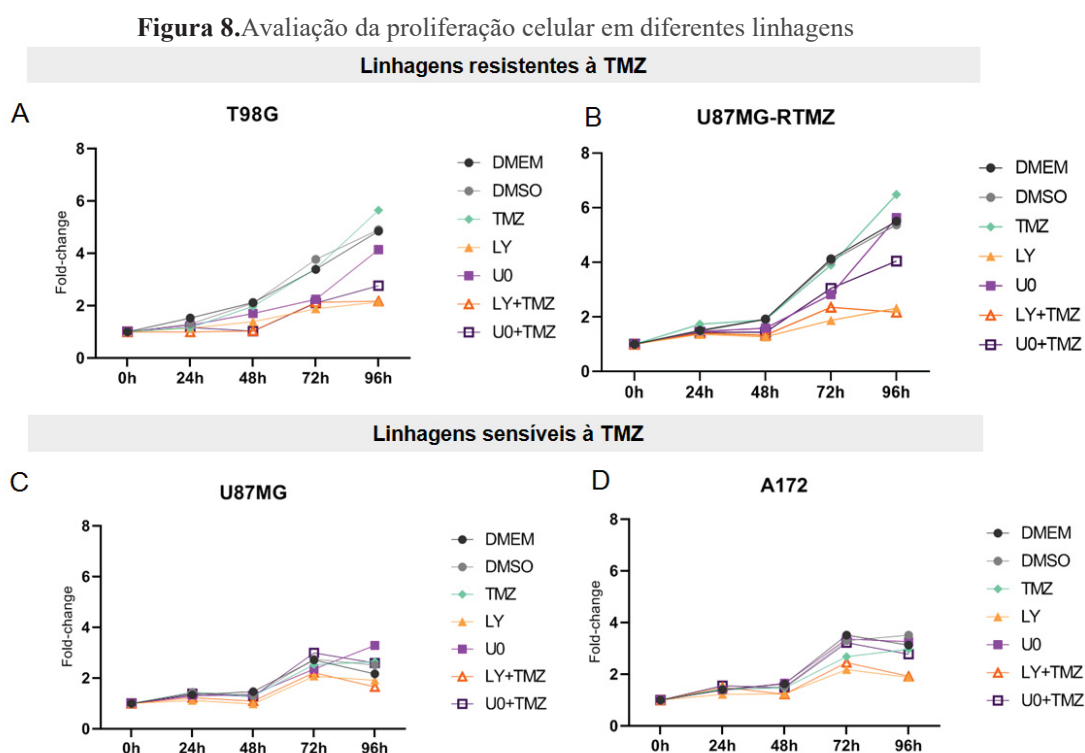
Novamente percebe-se que o tratamento das células T98G somente com TMZ não promove nenhuma alteração significativa em relação às condições controles (DMEM e DMSO). Os resultados mostram que após 24 h, somente o tratamento combinado de LY+TMZ (66,85%) apresentou diferença estatística no número de células T98G aderidas quando comparada ao tratamento isolado de TMZ (77,33%) (Figura 7 – A). Após 48 h, os tratamentos das células T98G nas condições LY (65,86%), LY+TMZ (50,02%) e U0+TMZ (49,34%), mas não a condição U0 (81,80%), apresentaram reduções significativas na porcentagem de células aderidas em comparação com a condição de células tratadas com TMZ (Figura 7 – B). Porém, no tempo de 72 h, todas as condições de tratamentos realizados com os inibidores isolados e combinados com TMZ (LY (49,02%), U0 (57,66%), LY+TMZ (56,34%) e U0+TMZ (54,78%)) apresentaram diferenças significativas de redução no número de células aderidas quando comparados com a TMZ (Figura 7 – C). Já em 96 h de tratamento, a significância estatística foi observada somente quando células T98G foram tratadas com o inibidor LY294002 isolado (44,18%) ou combinado com TMZ (44,85%) (LY e LY+TMZ). Neste mesmo tempo de análise, a combinação do U0126 com TMZ (56,82%) se mostrou mais efetivo em comparação com o tratamento isolado de U0126 (85,58%) em reduzir índices de proliferação celular (Figura 7 – D).

Não foram encontrados trabalhos na literatura que relacionassem o número de células aderidas frente à administração dos inibidores isolados ou em conjunto com a TMZ através de mensuração pela técnica de cristal violeta. Porém, recentemente foi demonstrado que o tratamento de células da linhagem MDA-MB-231 com 40 μ M dos inibidores LY294002 e U0126 foi capaz de reduzir significativamente o número de células aderidas quando comparadas com o controle (COLÍN-VAL *et al.*, 2021).

Juntos, estes resultados reforçam o perfil de resistência da linhagem T98G frente ao tratamento com a TMZ e reforçam também a escolha do tempo de 72 h como sendo o mais adequado para observar modulações frente à inibição das vias em questão para a realização de experimentos posteriores.

6.2.3. Avaliação da proliferação celular em linhagens de GB com diferentes perfis de resistência à TMZ

Com o objetivo de comparar o perfil de proliferação celular de linhagens de GB com diferentes graus de responsividade à TMZ, foi realizado um ensaio de coloração pela técnica de cristal violeta ao longo do tempo, para linhagens resistentes à TMZ (T98G e U87RTMZ) e sensíveis à TMZ (U87MG e A172). Os resultados obtidos estão representados na Figura 8.



FONTE: O autor (2022).

NOTA: Gráficos de proliferação celular utilizando as linhagens U87MG, A172, T98G e U87RTMZ (4×10^3 cél/p96) realizado pelo ensaio de cristal violeta após o tratamento com LY294002 (10 μ M) e U0126 (10 μ M) isolados ou combinados com TMZ (100 μ M) por 24h, 48h, 72h e 96h. Como controle experimental foi utilizado DMEM e DMEM + DMSO 0,2%. Os gráficos representam dados de três experimentos independentes realizados em triplicata.

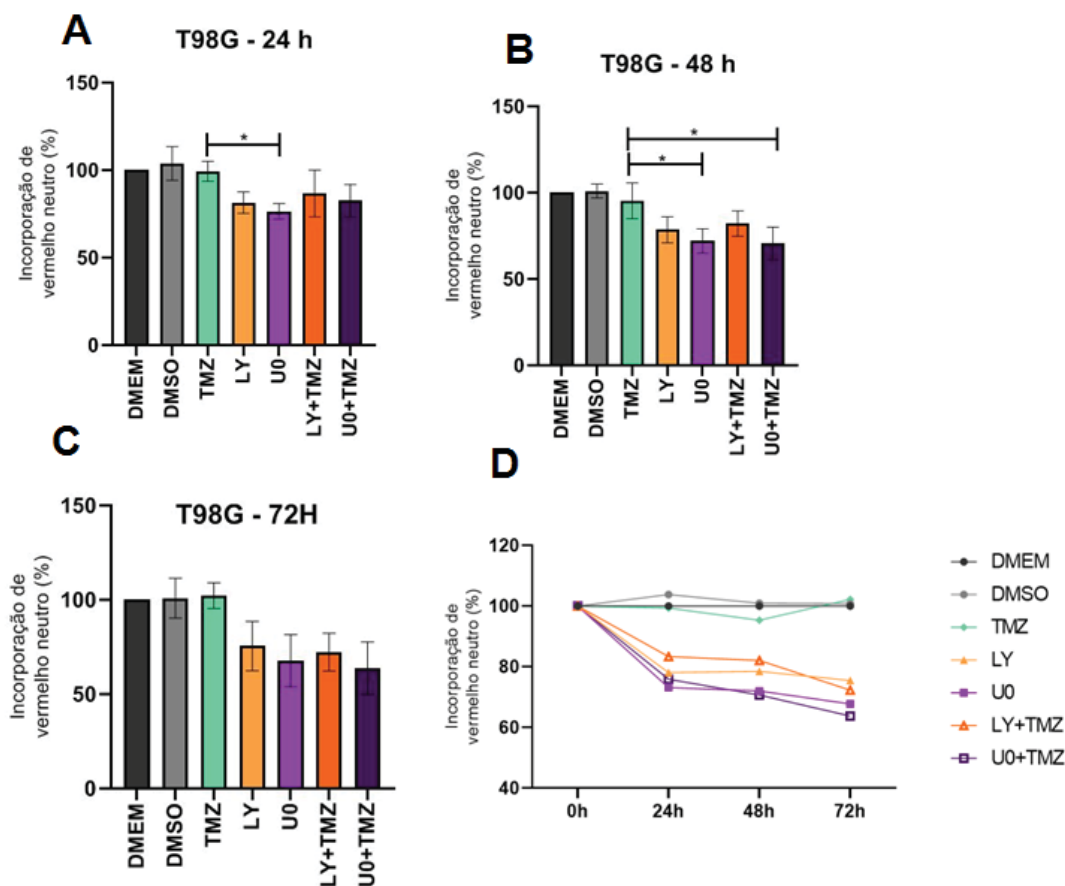
Foi possível observar que as células sensíveis à TMZ demonstraram um perfil de resposta semelhantes entre si (Figura 8 C e D), e o mesmo ocorreu para as linhagens resistentes (Figura 8 A e B). Para todas as linhagens testadas, não houve diferença entre o tratamento isolado do inibidor LY e o tratamento combinado com TMZ (LY+TMZ) (tons de laranjado). Já para as linhagens resistentes, o tratamento combinado de U0126 com TMZ (U0+TMZ) apresentou redução significativa na proliferação celular, quando comparado com o inibidor U0126 isolado (observado principalmente em 96 h). Essa diferença não foi

observada nas linhagens sensíveis. Esse resultado reforça a hipótese de que a combinação de administração do inibidor U0126 com a temozolomida pode ser capaz de aumentar a efetividade na citotoxicidade do quimioterápico, tanto para as linhagens mais sensíveis, como também superando o efeito de resistência da droga nas linhagens consideradas resistentes (Figura 8 – A e B).

6.2.4. Avaliação da integridade da membrana após tratamento das células T98G com TMZ em combinação com os inibidores

Com o intuito de avaliar se o tratamento das células T98G com os inibidores das vias de PI3K/Akt e ERK utilizados de forma isolados ou combinados com a TMZ foram capazes de alterar a integridade de membrana celular, foi realizado o ensaio de coloração por vermelho neutro. Este ensaio avalia a capacidade das células vivas de incorporar o corante vermelho neutro, que penetra nas células por difusão não iônica mediante um pH fisiológico. Quando o corante penetra em uma célula que possui suas membranas íntegras (condição viável), ele se acumula nos lisossomos, onde há um gradiente de prótons que garante um pH mais ácido e o corante fica retido nesse ambiente pelo ganho de cargas. Para a avaliação deste parâmetro, células T98G foram tratadas com os inibidores de forma isolada ou em combinação com TMZ pelos tempos de 24 h, 48 h e 72 h. Os resultados estão indicados na Figura 9.

Figura 9. Avaliação da integridade de membrana ao longo do tempo



FONTE: O autor (2022).

NOTA: Gráficos de integridade de membrana da linhagem T98G (4×10^3 cél/p96) realizado pelo ensaio de vermelho neutro após o tratamento com LY294002 (10 μ M) e U0126 (10 μ M) isolados ou combinados com TMZ (100 μ M) por 24h, 48h e 72h. Como controle experimental foi utilizado DMEM e DMEM + DMSO 0,2%. Os gráficos representam dados de três experimentos independentes realizados em triplicata (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Observou-se que o tratamento das células T98G com TMZ não promoveu alteração na incorporação do corante vermelho neutro em comparação com as condições controle onde as células foram mantidas apenas em meio DMEM ou tratadas com o veículo DMSO, mostrando mais uma vez o perfil de resistência dessa linhagem frente ao quimioterápico padrão. Após 24 h, observa-se que apenas nas condições em que foram realizados os tratamentos combinados LY+TMZ (83,35%) e U0+TMZ (71,39%) apresentaram reduções significativas na capacidade de incorporação do corante vermelho neutro quando comparadas ao tratamento isolado com TMZ (99,39%). Em 48 h, houve redução significativa na incorporação do corante quando as células foram tratadas com U0126 isolado (72%) ou com o tratamento combinado U0+TMZ (70,67%) quando comparados com a TMZ isolada (95,36%) (Figura 8 – B). Já para o tempo de 72 h, não houve diferenças estatísticas (Figura 9 – C).

Ainda, quando avaliado o perfil de incorporação do corante ao longo do tempo, observamos uma tendência de redução desta capacidade de incorporação para os tratamentos U0, LY, LY+TMZ e U0126+TMZ, mas não para os controles (DMEM e DMSO) e nem para a TMZ isolada. O que sugere que os tratamentos isolados e combinados com TMZ são capazes de interferir na permeabilidade de membranas, um importante aspecto de viabilidade celular.

6.3. Determinação do Índice Autofágico (AAU) em células de GB após tratamento com TMZ em combinação com os inibidores

A partir dos resultados de vermelho neutro expostos acima que mostraram diferenças significativas na captação do corante vermelho neutro pelas membranas lisossomais e através de dados da literatura que mostram que o tratamento com os inibidores LY294002(ZAJAC *et al.*, 2021) e U0126 (SIVAPRASAD *et al.*, 2008) são capazes de modular o processo autofágico em diferentes modelos tumorais, buscou-se avaliar o índice autofágico da linhagem T98G ao longo do tempo. O índice autofágico (AAU) trata-se de uma variável numérica que correlaciona diferentes métodos de viabilidade e citotoxicidade celular (cristal violeta, MTT e vermelho neutro) e pode estar relacionada com a ocorrência de morte celular autofágica (MARTINS *et al.*, 2013). Os resultados obtidos estão indicados na Figura 10.

Figura 10. Unidades arbitrárias autofágicas para a linhagem T98G

Média aritmética utilizada para cálculos de AAU

T98G		DMEM	DMSO	TMZ	LY	U0	LY+TMZ	U0+TMZ
CV	24H	100	86,90	77,33	76,59	84,02	66,85	76,49
	48H	100	98,81	93,18	65,86	81,80	50,02	49,34
	72H	100	101,43	94,09	49,02	57,66	56,34	54,78
VN	24H	100	103,86	99,40	78,10	73,16	85,35	71,40
	48H	100	100,99	95,36	78,51	72,01	82,13	70,68
	72H	100	100,82	102,25	75,52	67,75	72,29	63,75
MTT	24H	100	96,50	86,82	82,05	92,86	69,61	66,97
	48H	100	106,30	93,59	84,90	106,42	73,34	75,04
	72H	100	95,24	90,58	67,00	88,71	61,25	65,42
AAU	24H	1,0	1,13	1,21	0,98	0,83	1,22	1
	48H	1,0	0,98	1,02	1,04	0,77	1,33	1,14
	72H	1,0	1,03	1,11	1,3	0,93	1,23	1,06

FONTE: O autor (2022).

Nota: Tabela representativa das células T98G mostrando as médias aritméticas dos valores experimentais obtidos pelos ensaios cristal violeta (CV), MTT e vermelho neutro (VN) e o cálculo de AAU. As células foram tratadas com DMEM, DMSO (veículo), TMZ (100 uM), LY294002 (10 uM), U0126 (10 uM), LY

(10 uM)+TMZ (100 uM) e U0 (10 uM)+TMZ (100 uM) por 72 horas. Esse índice aponta uma sugestão da quantificação dos índices autofágicos nas células.

Já se sabe, por dados na literatura, que o tratamento com TMZ é capaz de ativar o processo de autofagia em células de glioma, incluindo linhagens resistentes, fazendo com que a autofagia tenha um papel pró-tumoral citoprotetor (KANZAWA, *et al.*, 2004). A maioria dos trabalhos que fazem mensurações de índices autofágicos utilizam os tempos de análise de 24 h e 48 h. Nesse sentido, nossos dados corroboram com a literatura, mostrando que em todos os tempos analisados, observamos que há um perfil de aumento autofágico para o tratamento isolado com TMZ. O tratamento com LY isolado parece não modular os índices autofágicos até 48h. Mas, de maneira interessante, a combinação dos inibidores com TMZ (LY+TMZ e U0+TMZ) parecem aumentar o índice autofágico em 24h e 48h, mas observamos uma queda desse índice em 72h. De maneira diferente, o tratamento isolado de U0 parece diminuir os índices autofágicos ao longo do tempo analisado.

6.3.1. Determinação do Índice autofágico (AAU) em linhagens de GB com diferentes responsabilidades à TMZ

A partir dos resultados obtidos na Figura 9, buscou-se avaliar se há diferenças entre o perfil do índice AUA em linhagens de GB com diferentes responsabilidades à TMZ pelo período de 24 h, 48 h e 72 h. Os resultados obtidos estão indicados na Figura 11.

Figura 11. Unidades arbitrárias autofágicas para diferentes linhagens de GB

Perfil de AAU observada em outras linhagens de GB								
U87RTMZ		DMEM	DMSO	TMZ	LY	U0	LY+TMZ	U0+TMZ
AAU	24H	1,00	1,04	0,96	1,01	0,93	0,95	0,87
	48H	1,00	1,01	1,03	1,19	1,03	1,37	1,15
	72H	1,00	1,10	1,12	1,29	1,08	1,15	1,35
U87MG		DMEM	DMSO	TMZ	LY	U0	LY+TMZ	U0+TMZ
AAU	24H	1,00	1,03	1,10	1,03	0,89	1,03	0,87
	48H	1,00	1,24	1,37	1,21	1,05	1,18	1,06
	72H	1,00	1,09	1,22	0,67	1,07	0,66	0,75
A172		DMEM	DMSO	TMZ	LY	U0	LY+TMZ	U0+TMZ
AAU	24H	1,00	1,12	1,17	1,06	0,98	1,08	1,00
	48H	1,00	1,08	1,11	1,03	0,96	1,14	1,10
	72H	1,00	1,09	1,20	0,97	0,92	0,69	0,73

FONTE: O autor (2022).

Nota: Tabela representativa das células U87RTMZ, U87MG e A172 mostrando o cálculo de AAU ao longo de 24 h, 48 h, e 72 h. As células foram tratadas com DMEM, DMSO (veículo), TMZ (100 μ M), LY294002 (10 μ M), U0126 (10 μ M), LY (10 μ M)+TMZ (100 μ M) e U0126(10 μ M)+TMZ (100 μ M).

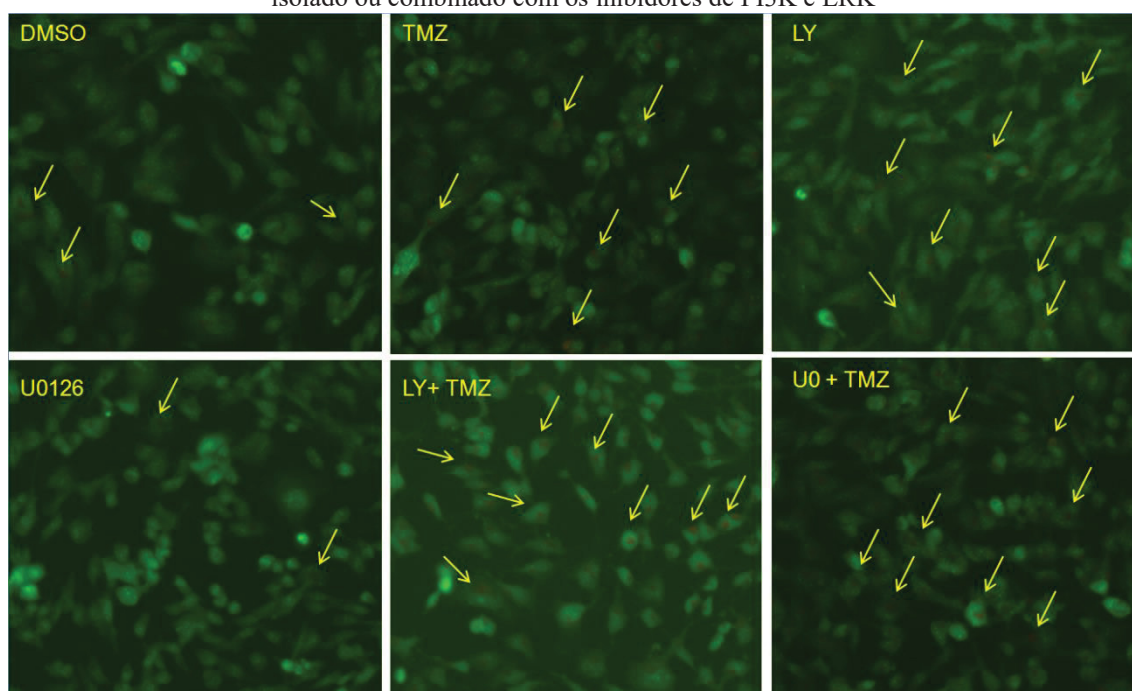
Interessantemente, a linhagem U87RTMZ, estabelecida em nosso laboratório através de tratamentos em concentração crescente de TMZ ao longo de 5 semanas para não responder ao quimioterápico na concentração de 100 μ M, mostrou um perfil de AAU bastante semelhante ao observado para a linhagem T98G. Porém, quando estes dados são comparados com os de linhagens sensíveis à TMZ (U87MG e A172), há um perfil de modulação diferente. A linhagem U87MG mostrou aumento do AAU para todas as condições em 48 h. Porém, em 72 h houve uma significativa redução dos índices autofágicos para o tratamento com LY, LY+TMZ e U0+TMZ, mas não para o U0. De maneira semelhante, a linhagem A172, demonstrou aumento nos índices autofágicos em todos os tratamentos, exceto para U0 em 48 h. Porém, em 72 h esse aumento é completamente superado e há redução dos índices autofágicos para os inibidores isolados e combinados. Além da redução nos índices de AAU, as linhagens A172 e U87MG também apresentaram redução no percentual de incorporação de vermelho neutro em 72 h, principalmente frente ao tratamento de LY e LY+TMZ (Figura A1). Diferentemente dos resultados encontrados para as linhagens resistentes, estes resultados sugerem que há um aumento na capacidade de permeabilização das membranas celulares frente ao tratamento com os inibidores. Através do cálculo de AAU, reforça-se a ideia de que membranas lisossomais podem estar fortemente envolvidas neste processo. Mostrando assim que linhagens com diferentes graus de responsividade à TMZ possuem diferenças também na modulação da resposta autofágica frente ao tratamento com os inibidores LY e U0 isolados e combinados com a TMZ. .

6.4. Avaliação da presença de organelas vesiculares ácidas em células T98G após tratamento com TMZ em combinação com os inibidores

O mapeamento de organelas híbridas formadas durante o processo autofágico pode ser um importante marcador para estudos iniciais desta via. Um exemplo deste tipo de mapeamento é através de marcação com laranja de acridina. Por se tratar de um corante fluorogênico acidotrópico, o laranja de acridina consegue acessar e ficar retido em ambientes de baixo pH. Durante o processo autofágico, a formação de autofagossomos maduros e autofagolisossomos propicia um ambiente celular ácido para estas organelas, o que permite a quantificação do corante através de pontos de tonalidade laranja nessas regiões, em

detrimento de pontos de tonalidade verde em regiões celulares onde não há a deposição do corante. Com o objetivo de avaliar se o tratamento das células de glioblastoma humano T98G com os inibidores de PI3K e ERK utilizados de forma isolada e combinada com TMZ são capazes de alterar a presença de vesículas ácidas, sugestivas de modulação do balanço autofágico, foi realizado um ensaio para avaliação da presença de organelas vesiculares ácidas determinada pela incubação com o corante laranja de acridina. Os resultados estão indicados na Figura 12.

Figura 12. Avaliação da presença de organelas vesiculares ácidas em células T98G após tratamento com TMZ isolado ou combinado com os inibidores de PI3K e ERK



FONTE: O autor (2022).

Nota: Células T98G (4×10^3 cél/p96) foram tratadas com TMZ ($100 \mu\text{M}$) de forma isolada ou combinada com os inibidores LY294002 (LY - $10 \mu\text{M}$) e U0126 (U0 - $10 \mu\text{M}$) por 72h. A condição controle foi mantida veículo DMSO (na maior concentração utilizada 0.2%). A marcação com o corante laranja de acridina (2 mg/mL) foi avaliada. As setas indicam os principais pontos de presença de organelas ácidas (pontos em laranja). Dados representam um experimento independente realizado em quintuplicata.

Resultados iniciais utilizando a linhagem T98G tratada por 72 h demonstraram que os tratamentos com TMZ, LY, LY+TMZ e U0+TMZ foram capazes de aumentar a presença de organelas vesiculares ácidas, como o caso de organelas lisossomais (destacadas pelas setas na Figura 10). O tratamento das células T98G somente com inibidor U0126 não foi capaz de aumentar a presença dessas organelas nas condições experimentais utilizadas. Tais resultados precisam ser repetidos com o intuito de se obter uma quantificação estatística, porém, corroboram com os resultados anteriores de AUU (Figura 9), reforçando a nossa hipótese de

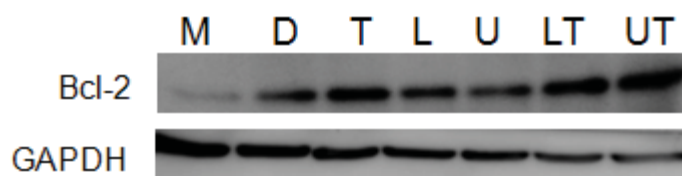
que para as linhagens resistentes à TMZ, em especial a T98G, os tratamentos com TMZ, LY e com as combinações (LY+TMZ e U0+TMZ) parecem aumentar o processo autofágico, talvez como um mecanismo de resistência a morte.

Já é descrito na literatura que o inibidor LY294002 e o inibidor Sorafenib de múltiplas quinases (tanto intracelulares RAF, BRAF, como de superfície KIT, VEGFR) são capazes de induzir aumento da vesiculação ácida nas mesmas concentrações de uso deste trabalho na linhagem T98G (ZAJAC, *et al.*, 2021). Ainda, neste mesmo trabalho, observou-se que a presença de um importante marcador pró-autofágico, essencial para a etapa de nucleação da autofagia, Beclin-1, encontrou-se aumentado frente ao tratamento com LY, que reforça a nossa hipótese de indução autofágica nessas condições.

6.5. Avaliação da expressão de proteínas envolvidas na dinâmica dos processos de autofagia e apoptose

Para avaliar se o tratamento das células T98G com TMZ em combinação com os inibidores de PI3K e ERK afetam a dinâmica dos processos de autofagia e morte celular por apoptose, foi avaliado a modulação da expressão da proteína Bcl-2, classicamente envolvida no processo de apoptose. Vale destacar, porém que Bcl-2 é também descrita como capaz de interagir com Beclin-1 e modular a via autofágica (HUANG *et al*, 2014). Os resultados estão indicados na Figura 13.

Figura 13. Modulação da expressão de Bcl-2 na linhagem T98G após tratamento com TMZ em combinação com os inibidores de PI3K e ERK



FONTE: O autor (2022).

Nota: Células T98G (2×10^6 cél) foram tratadas nas condições DMEM, DMSO 0,2% (veículo), TMZ (100 μ M), LY294002 (10 μ M), U0126 (10 μ M), LY(10 μ M)+TMZ (100 μ M) e U0126(10 μ M)+TMZ (100 μ M) em 72h. O extrato proteico total foi obtido e submetido a SDS-PAGE. As membranas foram hibridizadas com anticorpo anti-Bcl-2 (1:1000) e anti-GAPDH (1:4000), seguido da incubação com o anticorpo secundário anti-mouse (1:1000). M (DMEM), D (DMSO), T (TMZ), L (LY294002), U (U0126), LY (LY + TMZ) e UT (U0+TMZ). A imagem é representativa de 2 experimentos independentes.

Os resultados obtidos mostram que os níveis da proteína anti-apoptótica, Bcl-2 são aumentadas na linhagem T98G após o tratamento com o quimioterápico TMZ. Porém, de forma interessante, é evidente o aumento expressivo nos níveis de Bcl-2 nas células T98G após os tratamentos combinados de ambos os inibidores com TMZ, em comparação com os tratamentos isolados. Porém, foi visto na literatura que Beclin-1, é capaz de interagir e inibir Bcl-2, aumentando os níveis de apoptose em linhagens de glioma sensíveis à TMZ (HUANG, *et al.*, 2014). Tal perfil observado para a linhagem T98G pode apresentar um aumento dos níveis de Bcl-2 como um indicio de fenótipo de indução de autofagia como um mecanismo de resistência tumoral, tendo em vista que dados da literatura demonstraram que é possível haver a repressão da inibição da autofagia mediada pela interação entre Bcl-2 e Beclin-1, através da fosforilação do domínio BH3 de Beclin-1 mediada por DAPK, fosforilação mediada por JNK da alça não estruturada de Bcl-2, competição com Bad e Bax pela ligação de Bcl-2/Bcl-xL e através da ligação entre DAMP HMGB-1 e Beclin-1 (GORDY, C. *et al.*; 2012), liberando assim Beclin-1 e Bcl-2 para atuarem em diferentes alvos e gerarem papéis relacionados com a apoptose a autofagia concomitantemente.

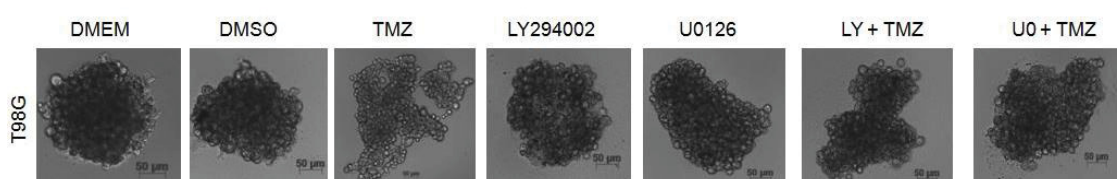
6.6. Efeito da inibição de PI3K e ERK na capacidade de formação de esferoides em linhagens de glioblastoma humano

6.6.1. Efeito da inibição de PI3K e ERK na formação de esferoides na linhagem T98G

Além de promover uma forma de cultivo que traz a possibilidade de avaliação entre a interação célula-célula e célula microambiente tumoral, metodologias de cultivo em 3D são importantes marcadores de um processo de resistência tumoral observado em gliomas, o enriquecimento da população de GSCs. Dados do nosso laboratório em processo de publicação (BARK, *et al.*, artigo em processo de submissão) demonstraram que esse modelo de cultivo aumenta a expressão de importantes marcadores de células-tronco, como CD133 (Figura 2-A). Dados publicados mostram que células CD133+ são mais resistentes à TMZ, possuem maior expressão (mRNA) de marcadores relacionados com diferenciação pró-neural e expressam níveis mais altos de genes relacionados com resistência em GB, como MGMT em linhagens de glioma primárias (Liu *et al.*, 2006). Com base nisso, buscou-se avaliar se o cultivo das células T98G em modelo de esferóide 3D iria propiciar alteração na responsividade frente ao tratamento com os inibidores de PI3K e ERK isolados e combinados

com TMZ. Inicialmente a capacidade de alterar a formação dos esferoides de células T98G cultivadas pela técnica de *hanging drops* foi avaliada. Para isso, a linhagem T98G foi cultivada por 72h, na densidade de 1×10^3 células por gota, mantendo o meio de cultura com os tratamentos correspondente aos inibidores de PI3K e ERK isolados ou combinados com TMZ. Os resultados obtidos para a capacidade de formação de esferóides nas diferentes condições experimentais estão representados na Figura 14.

Figura 14. Avaliação da capacidade de formação de esferoides derivados de células T98G após o tratamento combinado de TMZ e os inibidores de PI3K e ERK



FONTE: O autor (2021).

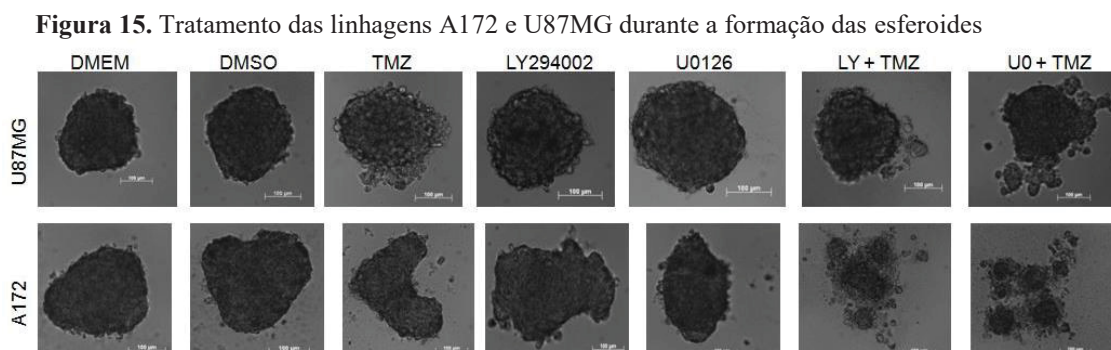
Nota: Células T98G (1×10^3 cél) foram mantidas em *hanging drop* por 72h nas seguintes condições: células mantidas em meio DMEM, DMSO (veículo), TMZ (100 μ M), LY294002 (10 μ M), U0126 (10 μ M), LY (10 μ M)+TMZ (100 μ M) e U0 (10 μ M)+TMZ (100 μ M). Após o período de incubação os esferoides formados foram fotografados usando o equipamento AxioVision - Zeiss (aumento 20X). Imagens são representativas de 3 experimentos realizados em quintuplicatas.

Foi observado que a linhagem T98G apresentou a capacidade de formar esferoides de maneira homogênea nas condições controle DMEM e DMSO. O tratamento das células T98G com TMZ alterou a capacidade de formação dos esferóides em *hanging drop*, sendo observado dispersão dos agregados e menor compactação celular. Os tratamentos com LY294002 e U0126 não alteraram de forma significativa a formação dos esferoides derivadas de células T98G, no entanto, observa-se que os tratamentos com a combinação dos inibidores e TMZ diminuíram a capacidade de agregação celular, e os esferoides obtidos se mostraram com morfologia menos regular e com células mais dispersas (Figura 14).

É interessante ressaltar que as células T98G que se mostraram altamente resistentes ao tratamento com TMZ nas condições de cultivo em monocamada, tiveram uma resposta bastante diferenciada em relação aos controles DMEM e DMSO em relação a capacidade de formação dos esferoides mostrando a importância de se avaliar efeitos citotóxicos e aspectos de responsividade celular em modelos 3D..

Com o objetivo de avaliar se células que são responsivas à TMZ também são capazes de formar esferoides mediante os tratamentos com os inibidores de PI3K e ERK de

forma isolada e combinada de TMZ, foi realizado o ensaio de formação de esferoides para as linhagens U87MG e A172 (Figura 15).



FONTE: O autor (2021).

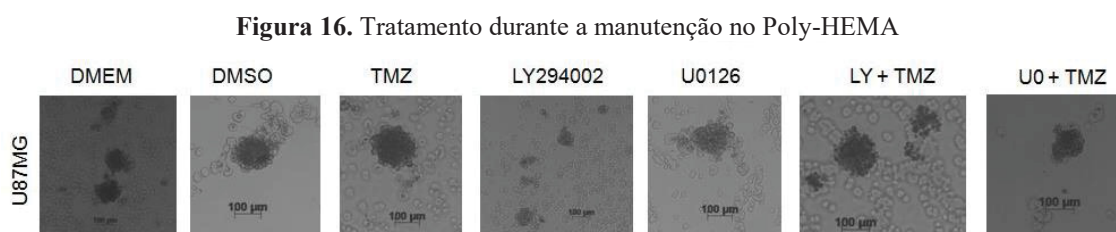
Nota: Células A172 e U87MG (1×10^3 cél) foram mantidas em *hanging drop* por 72h nas seguintes condições: células mantidas em meio DMEM, DMSO (veículo), TMZ (100 uM), LY294002 (10 uM), U0126 (10 uM), LY (10 uM)+TMZ (100 uM) e U0 (10 uM)+TMZ (100 uM). Após o período de incubação os esferoides formados foram fotografados usando o equipamento AxioVision - Zeiss (aumento 20X). Imagens são representativas de 3 experimentos realizados em quintuplicatas.

Foi observado que as linhagens A172 e U87MG foram capazes de formar esferoides de maneira homogênea nas condições DMEM e DMSO. Os tratamentos com TMZ, LY e U0 de maneira isolada, formaram esferoides, mas estes apresentavam um grau de descompactação celular. No entanto, foi observado que o tratamento combinado de TMZ com os inibidores LY e U0 alterou de maneira significativa a capacidade de formação dos esferoides, diminuindo a adesão celular, gerando agregados disformes e células com elevada presença de debris celulares (Figura 15).

6.6.2. Avaliação do efeito da inibição de PI3K e ERK, em combinação ou não com TMZ, na manutenção de esferoides em substrato não-aderente

Dados prévios do nosso grupo mostraram que a metodologia de formação de esferoides em *hanging drop*, seguido da manutenção destes esferoides em substrato não aderente de Poly-HEMA 1.2%, enriquecem ainda mais a população de GSCs CD133+ (Figura 2A). Assim, buscou-se avaliar a capacidade dos tratamentos com os inibidores de PI3K e ERK combinados ou não com o quimioterápico TMZ de alterar a manutenção e crescimento dos esferoides ao longo do cultivo 3D. Para isso, células U87MG foram plaqueadas em *hanging drops* somente em meio de cultura por 72h para a formação adequada de esferoides regulares e com compactação celular adequada. Na sequência, os esferoides foram

transferidos para placas recobertas por poly-HEMA por 5 dias, sendo que nos últimos 3 dias foram adicionadas as diferentes condições de tratamentos com os inibidores de PI3K e ERK isolados ou combinados com TMZ. Os resultados estão representados na Figura 16.



FONTE: O autor (2021).

Nota: Células U87MG (1×10^3 células) foram mantidas em *hanging drop* por 72h nas seguintes condições: células mantidas em meio por 72h, transportadas para substrato não aderente por 5 dias. No terceiro dia de cultivo não aderente, as células foram tratadas com DMEM, DMSO (veículo), TMZ (100 μ M), LY294002 (10 μ M), U0126 (10 μ M), LY (10 μ M)+TMZ (100 μ M) e UO (10 μ M)+TMZ (100 μ M) e TMZ (100 μ M). Após o período de incubação os esferoides formados foram fotografados usando o equipamento AxioVision - Zeiss (aumento 20X). Imagens são representativas de 1 experimento realizado em triplicatas.

Observou-se que os controles DMEM e DMSO mostraram-se capazes de manter os esferoides agregados, o tratamento com TMZ também gerou esferoides uniformes. Em relação as condições em que os tratamentos com os inibidores de PI3K e ERK foram utilizados, observa-se elevado grau de desagregação e descompactação dos esferoides.

Juntos, os resultados obtidos nas Figuras 14, 15 e 16, sugerem que os tratamentos combinados de LY e U0126 com TMZ são capazes de alterar a capacidade de formação de esferoides regulares, alterando a agregação celular e possivelmente induzindo mecanismos de morte, em um contexto celular onde sabidamente há a presença de células CD133+. Esta hipótese está pautada em dados da literatura que mostram que a via de CD133 relaciona-se diretamente com a ativação da via de PI3K *upstream* e isso contribui para o potencial de auto-renovação e tumorigênese em células de cultura primária de glioma humano (WEI, *et al.*, 2013).

6.7. Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K e ERK em alterar a expressão de proteínas envolvidas com o processo de invasão celular (MMP-2 e MMP-9).

Sabe-se que a capacidade de remodelamento deECM, que está relacionada com a modulação da atividade de MMPs e seus inibidores (TIMPs e RECK), correlaciona-se diretamente com a capacidade de metástase de diferentes tumores (TAKAHASHI, *et al.*,

1998). Ainda, sabe-se que tumores da glia são altamente suscetíveis ao desenvolvimento de micrometástases (SATTIRAJU *et al.*, 2018) o que se torna um alvo importante para o entendimento da biologia de GB e desenvolvimento de novas terapêuticas.

Dados publicados mostraram que as vias de PI3K e ERK estão envolvidas com proliferação, migração e mobilidade celular (MAZUMDER *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018). Além disso, em modelos tumorais, a superativação de PI3K/Akt relaciona-se com a redução na taxa de sobrevivência dos pacientes (CHAKRAVARTI *et al.*, 2004). Com base no exposto acima e de acordo com nossos dados prévios que mostram que o tratamento com os inibidores afetam parâmetros de citotoxicidade, permeabilidade de membrana e número de células aderidas, é relevante analisar fatores que estejam relacionados com invasão e metástase. Com base nisso, buscamos avaliar a modulação da expressão de proteínas que estão diretamente relacionadas com o remodelamento de matriz extracelular (MMP-2 e MMP-9).

Com base no exposto acima, células T98G foram tratadas com as diferentes condições experimentais contendo somente os inibidores de PI3K e ERK isolados ou combinados com TMZ e a modulação da expressão de MMP-2 e MMP-9 foi avaliada. Os resultados estão indicados na Figura 17.

Figura 17. Expressão de MMP-2 e MMP-9 na linhagem T98G



FONTE: O autor (2022).

Nota: Células T98G (2×10^6 cél) foram tratadas nas condições DMEM, DMSO (veículo), TMZ (100 μ M), LY294002 (10 μ M), U0126 (10 μ M), LY (10 μ M)+TMZ (100 μ M) e U0126(10 μ M)+TMZ (100 μ M) em 72h. O extrato proteico total foi obtido e submetido a SDS-PAGE. As membranas foram hibridizadas com anticorpo anti-Bcl-2 (1:1000) e anti-GAPDH (1:4000), seguido da incubação com o anticorpo secundário anti-rabbit (1:1000). M (DMEM), D (DMSO), T (TMZ), L (LY294002), U (U0126), LY (LY + TMZ) e UT (U0+TMZ) A imagem é representativa de 2 experimentos independentes.

Foi observado que o tratamento com TMZ de forma isolada promoveu um aumento na expressão de MMP-9, porém esse aumento foi revertido quando a TMZ foi combinado ao inibidor LY294002. De forma interessante, a modulação da expressão de MMP9 se mostrou distinta para o tratamento combinado de U0+TMZ, onde os níveis de MMP-9 se mantiveram elevados.

Em relação à MMP-2, os tratamentos isolados com TMZ, LY294002 e U0126 não parecem modular os níveis dessa proteína em relação as condições controle DMEM e DMSO, porém de forma muito interessante, o tratamento combinado de U0126 e TMZ diminui de forma muito intensa a expressão de MMP-2.

Dados da literatura mostram que o tratamento isolado com LY294002 (20 uM) em células de glioma murino (C6) já promoveram reduções significativas na expressão de MMP-2, mas não de MMP-9 (TIAN, *et al.* 2012). Não foram encontrados estudos que demonstrem a expressão de MMPs frente ao tratamento com U0126 em gliomas, porém, em estudo publicado com células de câncer de colo de útero (HeLa), tratadas com U0126 (10 uM), mostrou-se redução significativa na expressão proteica das MMP-2 e MMP-9 (YE, *et al.*, 2017). Nossos dados sugerem que o tratamento combinado desses inibidores com TMZ pode contribuir também para modular o fenótipo invasivo das células de glioblastoma humano.

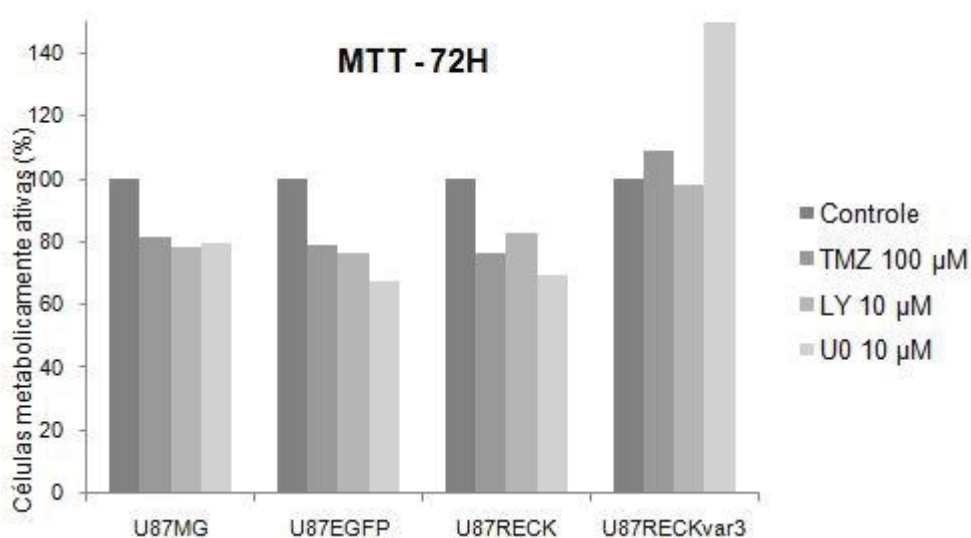
6.8. Avaliação da contribuição de RECK e RECKvar3 para a responsividade de células de GB aos inibidores das vias de PI3K/Akt e ERK

O gene *RECK* é descrito como um supressor tumoral, classicamente associado com a inibição da expressão e atividade de MMPs, especificamente MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP (CÔRREA *et al.*, 2010). Sabe-se que pacientes que possuem alta expressão de RECK possuem melhor prognóstico quando comparados com pacientes que possuem baixa expressão do mesmo (TROMBETTA-LIMA *et al.*, 2015).

Mais recentemente, Trombetta-Lima e colaboradores descreveram que o gene *RECK* é suscetível a passar pelo processo de *splicing alternativo*, gerando diferentes transcritos alternativos. Pouco se sabe sobre a real função desses transcritos de *RECK* na biologia de GBs, porém, foi demonstrado que um destes transcritos, denominado de *RECKvar3* possui papéis antagônicos aos de RECK. Enquanto o transcrito canônico atua suprimindo fatores envolvidos com remodelamento de matriz extracelular e metástase, a variante alternativa parece ter um papel pró-tumoral. Observou-se que pacientes com glioblastoma com maior expressão da variante RECKvar3 possuem uma taxa de sobrevida menor do que aqueles pacientes com maior expressão de RECK canônico (TROMBETTA-LIMA, *et al.*, 2015). Não existem estudos que avaliem o papel de RECK e seus variantes frente à responsividade aos inibidores das vias de PI3K e ERK isolados ou a combinação deles com TMZ. Com base nisso, utilizando células de glioma U87MG com superexpressão de diferentes transcritos de

RECK (U87MG-RECK e U87MG-RECKvar3) em comparação com células U87MG controles (U87MG parental e U87MG-EGFP – que contém o vetor EGFP vazio), a contribuição de RECK e RECKvar3 na responsividade celular frente aos inibidores das vias de PI3K e ERK foi avaliada através de ensaios de citotoxicidade celular avaliados pelo método de MTT. Os resultados estão indicados na Figura 18.

Figura 18. Avaliação da contribuição de RECK e *RECKvar3* para a responsividade de células de GB aos inibidores das vias de PI3K/Akt e ERK



FONTE: O autor (2022).

Nota: Células U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECKvar3 (4×10^3 cél/p96) tratadas com DMEM, TMZ (100 µM), LY294002 (10 µM) e U0126 (10 µM) por 72 horas. A atividade metabólica das células foi avaliada por MTT. Este resultado representa uma replicata biológica em triplicata.

Nossos dados demonstram que as células controle U87MG-EGFP mantêm o mesmo perfil de responsividade aos diferentes tratamentos quando comparado com as células parentais U87MG, mantendo uma sensibilidade similar aos tratamentos com TMZ, LY294002 e U0126. A superexpressão de RECK canônico (U87RECK) não parece alterar a responsividade aos diferentes tratamentos, mantendo o perfil de células metabolicamente ativas após 72h quando comparado com as células U87MG e U87MG-EGFP. De forma muito interessante, a linhagem que superexpressa o transcrito alternativo de RECK (U87RECKvar3) apresenta um perfil de responsividade distinto quando comparado as outras linhagens avaliadas. Os resultados mostrados indicam um perfil de resistência da linhagem que superexpressa *RECKvar3* frente aos três tratamentos testados: TMZ, LY e U0. Esses dados representam apenas uma replicata biológica e precisam ser repetidos para possuir

significância estatística, porém, é interessante que corroboram com dados prévios que mostraram que a linhagem U87RECKvar3, além de mais agressiva, apresenta uma tendência a resistência tumoral (SPISILA, 2018).

7 DISCUSSÃO FINAL

Com base no exposto acima, os dados do presente estudo mostraram que os tratamentos combinados foram capazes de aumentar significativamente índices de citotoxicidade, reduzir proliferação e integridade de membrana. A exemplo disso, as reduções observadas no número de células aderidas, de 56,34% para LY + TMZ e 54,78 % para U0 + TMZ em 72 h. Os tratamentos utilizando inibidores das vias de PI3K/Akt e MEK/ERK também foram capazes de modular o processo autofágico em linhagens de glioblastoma humano com diferentes graus de agressividade e resistência à TMZ. Dados publicados demonstraram que o tratamento por TMZ e LY294002 (tratados isoladamente) são capazes de aumentar os índices autofágicos em células de glioma (KANZAWA *et al.*, 2004; ZAJAC, A. *et al.*, 2021). De modo contrário, o tratamento com U0126 é capaz de inibir o processo autofágico nessas células (WU *et al.*, 2015). Não há, porém, a presença de estudos que abordem a modulação destas vias frente aos tratamentos combinados de LY294002 e U0126 com a TMZ nas concentrações e tempos de tratamento utilizadas neste trabalho. Nossos resultados demonstraram indicativos de modulação positiva da via de autofagia após os tratamentos das células T98G com os inibidores das vias de PI3K e ERK combinados com TMZ no tempo de 72 h. Corroborando com dados da literatura, a autofágica ocorre para o tratamento isolado com o inibidor LY294002 com TMZ. Curiosamente, nossos dados mostram que o tratamento com o inibidor U0126 isolado mantém índices de unidades arbitrárias autofágicas negativos e, surpreendentemente, após o tratamento combinado de U0126 com TMZ, estes índices tornam-se positivos. Estes resultados são corroborados pela marcação por laranja de acridina, reforçando a sugestão de que o processo autofágico está sendo modulado nas condições de tratamento avaliadas. Com base nesses achados, no item 9 são apresentadas perspectivas futuras para responder a hipótese gerada.

Ainda, encontramos um aumento significativo na expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 para o tratamento combinado dos inibidores com a TMZ. Dados da literatura demonstram que Bcl-2 relaciona-se com o fenótipo de invasão e migração em células de glioma através da modulação de MMP-2 (WICK *et al.*, 1998). Além disso, sabe-se que Bcl-2 é capaz de interagir com uma importante proteína da regulação autofágica, Beclin-1 aumentando os níveis de apoptose (HUANG *et al.*, 2014). De forma interessante, nossos resultados prévios de análise de ciclo celular (dados não mostrados) mostraram que há um aumento da porcentagem de células em sub G1, indicativo de morte celular, quando as células T98G foram tratadas com os inibidores, em especial com a combinação de U0126 e TMZ,

quando comparadas com o tratamento isolado de TMZ. Esses dados reforçam o potencial uso do tratamento combinado dos inibidores com TMZ em modelo de GB e indicam uma perspectiva muito interessante de estudo de interação dessas proteínas e intercorrelação entre os processos de autofagia e apoptose.

Com base nesses achados, sugere-se que os tratamentos tiveram nas células duas importantes rotas bioquímicas. A primeira, baseada nos ensaios colorimétricos de aumento de citotoxicidade, aumento de permeabilidade de membrana e redução na capacidade de adesão celular, seria o encaminhamento dessas células para as vias de morte celular. A segunda, baseada nos cálculos de AUU, laranja de acridina e aumento na expressão de Bcl-2, seria a utilização da ativação da via autofágica como um mecanismo dual. Hora contribuindo para o fenótipo anti-tumoral, aumentando os índices de morte e hora atuando como fenótipo pró-tumoral, aumentando índices de resistência tumoral.

Além disso, nossos resultados também demonstraram que os tratamentos combinados diminuíram a expressão de MMP-2 (em especial na combinação de U0126 e TMZ), mostrando assim que o tratamento com os inibidores combinados também pode contribuir com a modulação do fenótipo de invasão tumoral observado em gliomas.

8 CONCLUSÕES

Através da análise dos dados obtidos nesse trabalho é possível concluir que:

Os tratamentos dos inibidores LY294002 e U0126 isolados e combinados com TMZ se mostraram citotóxicos para células de glioblastoma humano intrinsicamente resistentes à TMZ (T98G). O tratamento combinado dos inibidores com TMZ também se mostrou efetivo para linhagens de GB sensíveis à TMZ, evidenciando o potencial uso desses inibidores para potencializar o efeito do quimioterápico padrão.

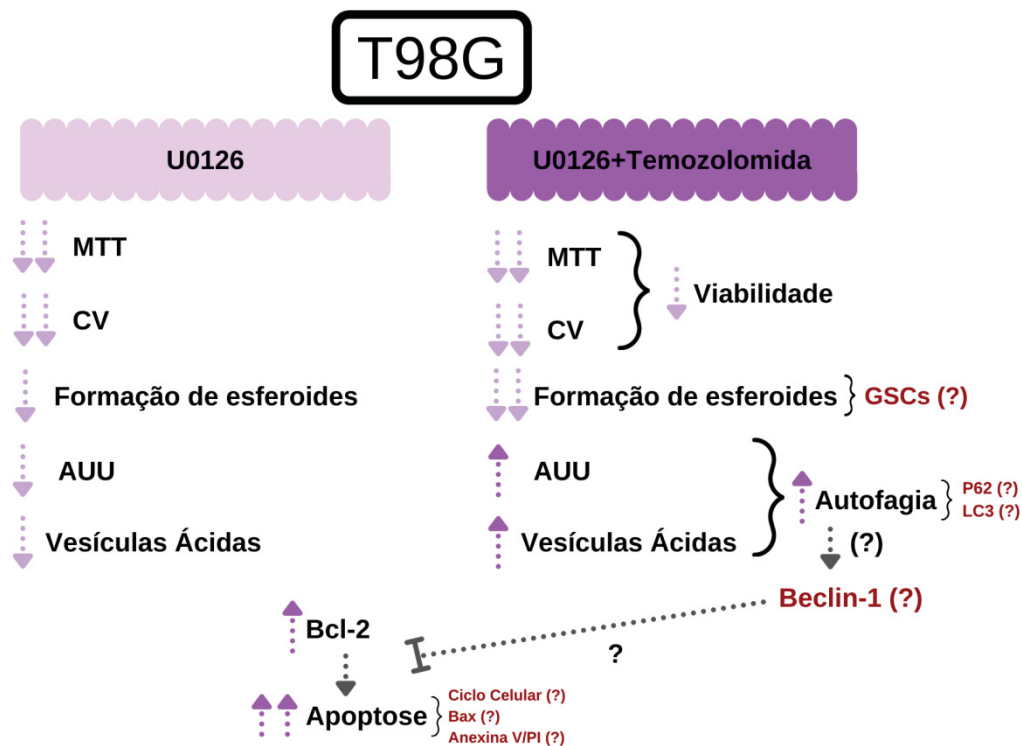
Os cálculos de unidades arbitrárias de autofagia mostraram que a linhagem T98G apresentou aumento do índice principalmente em 72 h para todos os tratamentos, exceto U0126 isolado e estes resultados foram confirmados através de resultados preliminares de marcação por laranja de acridina. Além disso, outra linhagem resistente U87RTMZ apresentou esta mesma tendência, enquanto linhagens sensíveis à TMZ apresentaram efeitos contrários, sugerindo efeitos modulatórios da autofagia relacionados com possíveis parâmetros de resistência tumoral. Ainda, os tratamentos combinados com TMZ demonstraram aumento na expressão do marcador anti-apoptótico (Bcl-2) na linhagem T98G, reforçando nossa hipótese de que os tratamentos utilizados podem ser capazes de modular processos que envolvam a ativação de Beclin-1, através de mecanismos que promovam a inibição da repressão, dentre eles destaca-se a autofagia.

Todas as linhagens foram capazes de formar esferoides pela técnica de *hanging drops*. O tratamento combinado dos inibidores com TMZ promoveu a desagregação dos esferoides formados, com aspecto de células em processo de morte celular, sugerindo uma sensibilização das células CD133+ à morte pelos tratamentos isolados ou combinados com TMZ.

A linhagem que superexpressa a variante 3 de RECK (U87RECKvar3) se mostrou resistente aos tratamentos com TMZ, LY294002 e U0126, sugerindo que além de agressividade, a variante de RECK pode estar relacionada com um fenótipo de resistência tumoral.

9 PERSPECTIVAS

Figura 19. Perspectivas obtidas a partir dos resultados apresentados



FONTE: O autor (2021).

Nota: Os resultados obtidos possibilitaram a geração de uma hipótese que pode ser respondida com os ensaios mostrados na figura acima. As setas apontadas para baixo mostram taxas de redução para os ensaios já realizados e setas apontadas para cima, evidenciam aumento das taxas dos experimentos realizados. Como perspectivas futuras, buscamos realizar os ensaios mostrados em vermelho seguidos de (?) para responder as questões sugestivas levantadas nessa dissertação.

REFERÊNCIAS

- ALEXIUS-LINDGREN, M. *et al.* The RECK Gene and Biological Malignancy- Its Significance in Angiogenesis and Inhibition of Matrix Metalloproteinases. **Anticancer research**, v. 34, p. 3867-3874, 2014.
- AGHAJANI, M. *et al.* New emerging roles of CD133 in câncer stem cell: Signaling pathway and miRNA regulation. **Jounalofcellularphysiology**, p. 1-20, 2019.
- ANTONI, D. *et al.* Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 5517–5527, 2015.
- BARK, J. M. Tratamento combinado de temozolomida e sinvastatina tem ação citotóxica e altera a formação de neuroesferas em linhagens de glioblastoma humano. Dissertação (Mestrado em ciências: Bioquímica)- Universidade Federal do Paraná. Paraná, p.81. 2017.
- BERGERS, G. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. **Nat Cel Biol**, v. 2, n. 10, p. 737–744, 2010.
- 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.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Bichem**, v. 7, 1976.
- CHAKRAVARTI, A. *et al.* The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 10, p. 1926–1933, 2004.
- CHEN, L. *et al.* LY294002 enhances cytotoxicity of temozolomide in glioma by down-regulation of the PI3K/Akt pathway. **Molecular medicine reports**, v. 5, p. 575-579, 2012.
- COLÍN-VAL, Z. *et al.* DHEA inhibits proliferation, migration and alters mesenchymal-epithelial transition proteins through the PI3K/Akt pathway in MDA-MB-231 cells. **Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 208, 2021.
- CÔRREA, T. C. S. *et al.* Inibição mediada por RECK da migração e invasão de glioma. **Journal Cell Biochemistry**, v. 110, p. 52-61, 2010.
- COSTA, P. B. Papel do nível socioeconômico na sobrevida de pacientes com câncer de pulmão no município de São Paulo. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, p. 100. 2019.
- FILIPPI-CHIELA, E. C. *et al.* Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. **Autophagy**, v. 8627, n. October, p. 1099–1113, 2016.
- FRIEDMAN, M. D. *et al.* Targeting cancer stem cells in glioblastoma multiforme using mTOR inhibitors and the differentiating agent all-*trans* retinoic acid. **Oncology reports**, v. 30, p. 1645-1650, 2013.
- FUKAI, J. *et al.* Enhanced Anti-Tumor Effect of Zoledronic Acid Combined with Temozolomide against Human Malignant Glioma Cell Expressing O 6 -Methylguanine DNA Methyltransferase. v. 9, n. 8, p. 1–13, 2014.

- GALAVOTTI, S. *et al.* The autophagy-associated factors DRAM1 and p62 regulate cell migration and invasion in glioblastoma stem cells. **Oncogene**, v. 32, p. 699-712, 2012.
- 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.
- HE, Y. *et al.* Targeting off-target effects: endoplasmic reticulum stress and autophagy as effective strategies to enhance temozolomide treatment. **Onco Targets Ther**, v.12, p. 1857-1865, 2019.
- HEIGI, M. E. *et al.* MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 997-1003, 2005.
- HUANG, X. *et al.* Beclin 1, an autophagy-related gene, augments apoptosis in U87 glioblastoma cells. **Oncology Reports**, v. 31, p. 1761-1767, 2014.
- INCA. Políticas e ações para prevenção do câncer no brasil: Alimentação, nutrição e atividade física, 2009.
- INCA ESTIMATIVA, Incidência de Câncer no Brasil, 2016.
- IQBAL, A. *et al.* Targeting of glioblastoma cell lines and glioma stem cells by combined PIM kinase and PI3K-p110a inhibition. **Oncotarget**, v. 7, n. 22, p. 33192–33201, 2016.
- JACKSON, C. B. *et al.* Temozolomide sensitizes MGMT-deficient tumor cells to ATR inhibitors. **Cancer research**, v. 79, n. 17, p. 4331-4338, 2019.
- 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**, p. 1, 2019.
- JANG, K. *et al.* PTEN sensitizes MDA-MB-468 cells to inhibition of MEK/Erk signaling for the blockade of cell proliferation. **Oncology reports**, v. 24, p. 787-793, 2010.
- JIAPAER, S. *et al.* Potential strategies overcoming the temozolomide resistance for glioblastoma. **Neurologia Medico-Chirurgica**, v. 58, n. 10, p. 405–421, 2018.
- KANZAWA, T. *et al.* Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. **Cell Death Diff.**, v. 11, p. 448-457, 2004.
- KAZA, N. *et al.* Autophagy in Brain Tumors: A New Target for Therapeutic Intervention. **Brain pathology**, v. 22, p. 89-98, 2012.
- KUENG W. *et al.* Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Anal Biochem.**, v. 182, 1989.
- LEDUR, P. F. *et al.* Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries? **Oncotarget**, v. 8, n. 40, p. 69185–69197, 2017.
- LENT, R. Cem bilhões de neurônios? Conceitos fundamentais da neurociência. 3. ed. **Editora Atheneu**, 2012.
- LI, X. *et al.* PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 22, p. 33440–33450, 2016.
- LIND, C. R. P. *et al.* The mitogen-activated/extracellular signal-regulated kinase 1/2 inhibitor u0126 induces glial fibrillary acidic protein expression and reduces the proliferation and migration of C6 glioma cells. **Neuroscience**, v. 141, p. 1925-1933, 2006.
- LIU, G. *et al.* Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cell in glioblastoma. **Molecular cancer**, v. 5, n.67, 2006.

- LOBO, N. A. *et al.* The biology of cancer stem cells. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 23, 2007.
- LOUIS, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, 2016.
- MAIR, J. M. *et al.* A basic review on systemic treatment options in WHO grade-II-III gliomas. **Tumor review**, v. 92, 2021.
- MARTINCORENA, I. *et al.* Somatic mutation in cancer and normal cells. **Mutation and human disease**, v. 349, 2015.
- MARTINS, W. K. *et al.* Triagem rápida de potenciais agentes indutores autofágicos usando linhas celulares de mamíferos. **Biotechnology journal**, v. 8, 2013.
- MAZUMDER, A. G. *et al.* Anticonvulsant action of a selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor LY294002 in pentylenetetrazole-mediated convulsions in zebrafish. **Epilepsy research**, n. 157, 2019.
- MENESES, M. Neuroanatomia Aplicada. Editora Guanabara Koogan - 3^a Ed., 2015.
- MUIR, M. *et al.* Glioblastoma multiforme: novel therapeutic targets. **Expert opinion on Therapeutic Targets**, 2020.
- NATSUMEDA, M. *et al.* Induction of autophagy in temozolomide treated malignant gliomas. **Neuropathology**, v. 31, n. 5, p. 486–493, 2011.
- NIXON, R. A. *et al.* Autophagy and neuronal cell death in neurological disorders **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 14, 2013.
- NODA, M. *et al.* RECK: A novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. **Cancer and metastasis reviews**, v. 22, p. 167-175, 2003.
- 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.
- PREVO, R. *et al.* Class I PI3 kinase inhibition by the pyridinyfuranopyrimidine inhibitor PI-103 enhances tumor radiosensitivity. **Cancer Research**, v. 68, n. 14, p. 5915–5923, 2008.
- REPETTO G. *et al.* Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. **Nat Protoc.**, v. 3, p: 1125-1131, 2008.
- RHUN, E. L. *et al.* Molecular targeted therapy of glioblastoma. **Cancer Treat Rev.**, v. 80, 2019.
- SATTIRAJU, A. *et al.* Alpha particle enhanced Blood Brain/Tumor Barrier permeabilization in glioblastomas using integrin alpha-v beta-3 targeted liposomes. **Molecular Cancer Therapy**, v. 16 , p. 2191-2200, 2017.
- SHI, F. *et al.* The PI3K inhibitor GDC-0941 enhances radiosensitization and reduces chemoresistance to temozolomide in GBM cell lines. **Neuroscience**, v. 346, p. 298–308, 2017.
- SIVAPRASAD, U. *et al.* Inhibition of ERK attenuates autophagy and potentiates tumor necrosis factor- α -induced cell death in MCF-7 cells. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 12, n. 4, p. 1265-1271, 2008.
- SPISILA, L. J. **Avaliação do papel do gene RECK no processo autofágico em linhagens de glioma humano.** Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Biomedicina)-

Universidade Federal do Paraná. Paraná, p.40. 2018.

STEPANENKO, A. A. *et al.* Temozolomide promotes genomic and phenotypic changes in glioblastoma cells. **Cancer cell international**, v. 16, n. 36, 2016.

STEPANENKO, A. A. *et al.* mTOR inhibitor temsirolimus and MEK1/2 inhibitor U0126 promote chromosomal instability and cell type-dependent phenotype changes of glioblastoma cells. **Gene**, v. 41096, 2016.

STETLER-STEVENSON, W. G. *et al.* Matrix metalloproteinases in angiogenesis : a moving target for therapeutic intervention. v. 103, n. 9, p. 1237–1241, 1999.

STRÖBELE, S. *et al.* A potential role for the inhibition of PI3K signaling in Glioblastoma therapy. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, 29 jun. 2015.

TAKAHASHI, CHIAKI. *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. v. 95, n. October, p. 13221–13226, 1998.

TAYLOR, J. W. *et al.* Treatment considerations for MGMT-unmethylated glioblastoma. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 15, n. 1, p. 507, 2015.

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.

THOMÉ, M. P. Nova abordagem para análise de autofagia com o marcador Laranja de acridina. TCC (Monografia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

TIAN, Q. *et al.* LY294002 induces differentiation and inhibits invasion of glioblastoma cells by targeting gsk-3 β and mmp. **EXCLI journal**, v. 11, p. 68-77, 2012.

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

UCHIDA, N. *et al.* Direct isolation of human central nervous system stem cells. **PNAS**, v. 97, n. 26, p. 14720-14725, 2000.

WALKER, E. H. *et al.* Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by Wortmannin, LY294002, Quercetin, Myricetin, and Staurosporine. **Molecular Cell**, v. 6, p. 909-919, 2000.

WANG, Y. *et al.* Temozolomide inhibits cellular growth and motility via targeting ERK signaling in glioma C6 cells. **Molecular medicine reports**, v. 14, p. 5732-5738, 2016.

WANG, H. Role of KCNB1 in the prognosis of gliomas and autophagy modulation. **Scientific reports**, 4, n. 14, 2017.

WANG, J. *et al.* Potent block of potassium channels by MEK inhibitor U0126 in primary cultures and brain slices. **Scientific reports**, v. 8, 2018.

WEI, Y. *et al.* Activation of PI3K/Akt pathway by CD133-p85 interaction promotes tumorigenic capacity of glioma stem cell. **PNAS**, v. 110, n. 17, p. 6829-6834, 2013.

WESSELING, P. WHO 2016 Classification of gliomas. **Neuropathol App Neurobiol.**, v. 44, p. 139-150, 2018.

WICK, W. *et al.* BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. **Federation of european biochemical societies (FEBS) Letters**, v. 440, p. 419-424, 1998.

WIEWRODT, D. *et al.* MGMT in primary and recurrent human glioblastomas after radiation and chemotherapy and comparison with p53 status and clinical outcome. **Inter. J. Cancer**, v. 122, p. 1391-1399, 2008.

WIRSHING, H. Glioblastoma. **Handn Clin Neurol**, v. 134, p. 381-397, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Who report on cancer: Setting priorities, investing wisely and providing for all, 2020.

WOLFE, D. M. *et al.* Autophagy failure in Alzheimer ' s disease and the role of defective lysosomal acidification. v. 37, n. December 2012, p. 1949–1961, 2013.

WU, H. *et al.* Is the autophagy a friend or foe in the silver nanoparticles associated radiotherapy for glioma ? **Biomaterials**, v. 62, p. 47 - 67, 2015.

YE, H. *et al.* The restraining effect of baicalein and U0126 on human cervical cancer cell line HeLa. **Molecular medicine reports**, v. 16, p. 957-963, 2017.

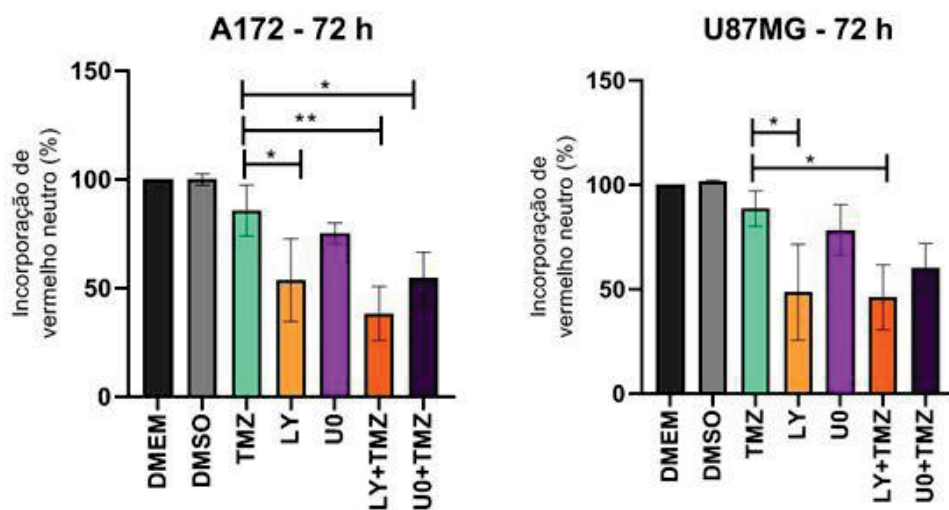
ZAJAC, A. *et al.* LY294002 and soferanib as inhibitors of intracellular survival pathways in the elimination of human glioma cells by programmed cell death. **Cell and tissue research**, v. 386, p. 17-18, 2021.

ZAJAC, A. *et al.* Involvement od PI3K pathway in glioma cell resistance to Temozolomide Treatment. **International journal od molecular sciences**, v. 22, n. 5155, 2021.

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.

ANEXO

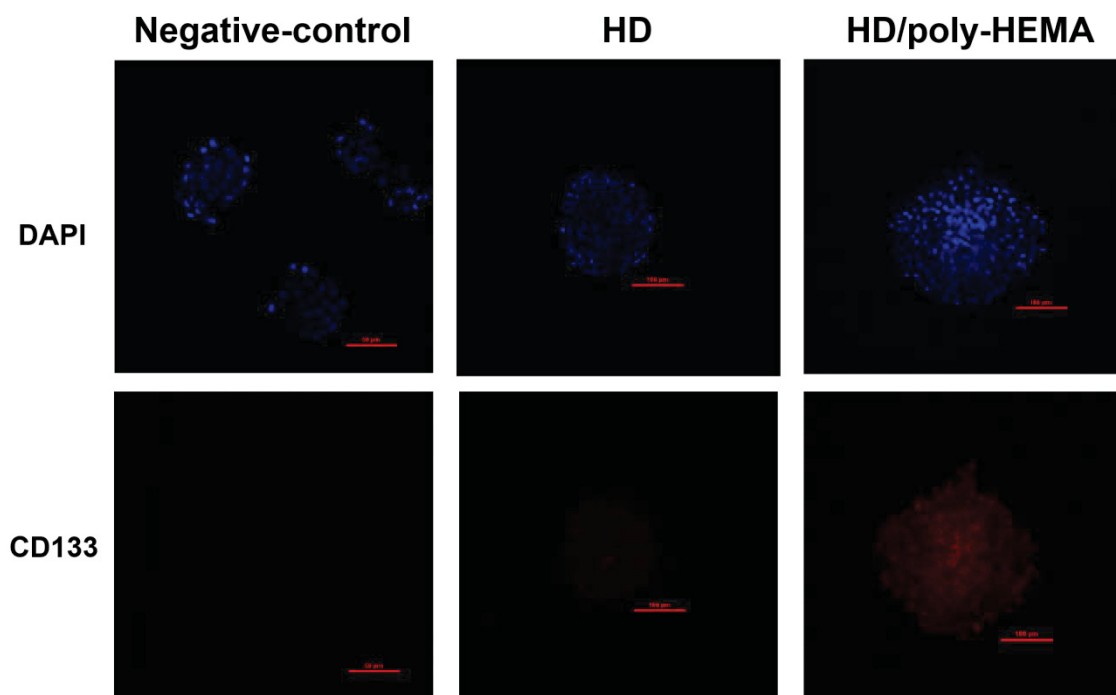
Figura A1. Avaliação da integridade de membrana das linhagens sensíveis à TMZ



FONTE: O autor (2022).

NOTA: Gráficos de integridade de membrana das linhagens A172 e U87MG realizado pelo ensaio de vermelho neutro após o tratamento com LY294002 (10 μ M) e U0126 (10 μ M) isolados ou combinados com TMZ (100 μ M) por 72h. Como controle experimental foi utilizado DMEM e DMSO (0,2%). Os gráficos representam dados de três experimentos independentes realizados em triplicata (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).

Figura A2. Expressão do marcador de células-tronco CD133 em esferoides derivados da linhagem celular de glioblastoma U87MG



FONTE: BARK, J. M., 2018. Dados em processo de submissão.

Nota: Análise por microscopia confocal de esferóides U87MG (1.000 células/gota) incubados em gota suspensa por 72h (condição HD) e esferóides incubados em gota suspensa por 72h seguido de 120h de cultivo em poli-HEMA (condição HD/poli-HEMA). Os esferóides gerados foram marcados com anticorpo anti-CD133 (1:10) e os núcleos foram corados com DAPI (1:1.000). Os esferóides de controle negativo não foram incubados com o anticorpo CD133, mas foram marcados com DAPI 1:1.000. Análise de microscopia confocal de fluorescência usando canais de fluorescência vermelho e azul, respectivamente. Microscópio Confocal Nikon – 20X.