

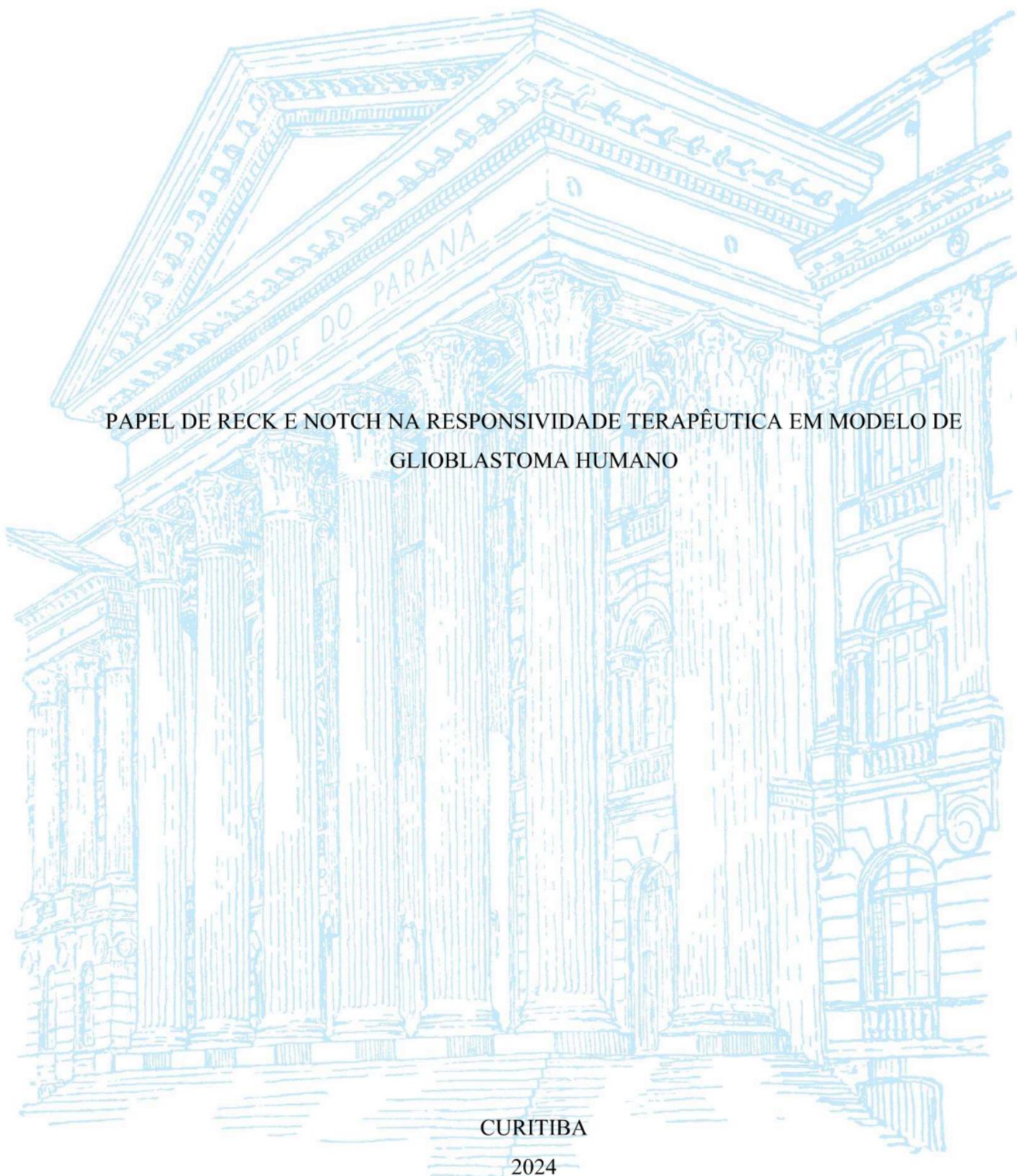
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO VITOR SANTOS DE SOUZA

PAPEL DE RECK E NOTCH NA RESPONSABILIDADE TERAPÊUTICA EM MODELO DE  
GLIOBLASTOMA HUMANO

CURITIBA

2024



JOÃO VITOR SANTOS DE SOUZA

PAPEL DE RECK E NOTCH NA RESPONSIVIDADE TERAPÊUTICA EM MODELO DE  
GLIOBLASTOMA HUMANO

Projeto de pesquisa apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso ao curso de graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer.

CURITIBA

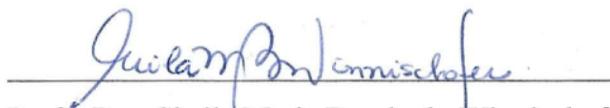
2024

## TERMO DE APROVAÇÃO

JOÃO VITOR SANTOS DE SOUZA

### PAPEL DE RECK E NOTCH NA RESPONSIVIDADE TERAPÊUTICA EM MODELO DE GLIOBLASTOMA HUMANO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.



Profª. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer

Orientadora – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR



Profª. Dra. Adriana Frohlich Mercadante

Departamento de Patologia Básica, UFPR

Curitiba, 04 de julho de 2024.

*Para meu tio João (in memoriam) e para todos aqueles  
que perderam um ente querido para o câncer.  
Que num futuro próximo, com o avanço da Ciência e  
de pesquisas básicas sobre a biologia do câncer  
como esta, não tenhamos tantas vítimas desta doença.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar agradecendo infinitamente meus pais, sem todo amor e suporte de todas as formas imagináveis e inimagináveis de vocês eu não teria conseguido completar esses anos de graduação e este último semestre intenso de estágio e atividades para a realização deste TCC. Agradeço a Deus todos os dias por tê-los como pais, saibam que vos amo infinitamente!

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Sheila M. B. Winnischofer, por todos esses 3 anos de orientação, ensino e suporte, principalmente nesta fase final da realização dos ensaios mais complexos e discussão dos resultados.

À Prof.<sup>a</sup> Adriana Mercadante pelo aceite da banca.

Aos colegas do Laboratório de Oxidações Biológicas, pelas diversas manhãs e tardes que passamos junto no laboratório de cultivo celular, contando células e plaqueando experimentos, pelas conversas, trocas e risadas que fizeram o trabalho mais leve.

Aos meus queridos amigos “Niaqers” por todos esses anos junto que o curso de Biomedicina nos proporcionou, de estudo em conjunto, conversas, rolês, festas e inclusive as disciplinas e trabalhos realizados em conjunto. De uma forma ou outra vocês também me auxiliaram a chegar até aqui e sem vocês com toda e absoluta certeza passar pela graduação não teria sido a mesma coisa! Vocês sabem que eu amo e admiro cada um de vocês!

À minha família por todo carinho desde sempre!

Aos professores, que durante a graduação tanto me ensinaram e instigaram a aprender, me apaixonar pela Ciência e pelos fascínios do corpo humano e das diversas patologias. À seu modo cada um me fez perceber meu amor pela Biomedicina e que fiz a decisão certa em escolher este curso.

Aos meus amados “Netflix”, por todos esses anos de amizade, me acompanhando desde antes da fase de pré-vestibular, por todos os encontros, tardes e noites conversando, às idas ao cinema.

Ao meu queridíssimo Cantateca, por todo suporte musical ao longo desses anos. Cantar ao lado de vocês sempre me deixa mais feliz.

À Deus por literalmente tudo!

Às agências de fomento CNPQ e Fundação Araucária.

## RESUMO

Dentre as neoplasias que acometem o Sistema Nervoso Central, o glioblastoma IDH-selvagem (GBM) é o tumor cerebral primário mais incidente em adultos, com alto grau de malignidade, agressividade e extensa heterogeneidade. O regime terapêutico atual consiste em quimioterapia com temozolomida (TMZ), radioterapia e, se possível, remoção cirúrgica. Porém, a grande resistência das células tumorais frente à ação do quimioterápico é bastante evidente, o que resulta em uma expectativa de vida média dos pacientes de 15 meses. Diante disso, a ação de fármacos adjuvantes têm sido importante foco de pesquisa na área. Nesse aspecto, destaca-se a sinvastatina (SVA), uma droga conhecida por sua ação antilipêmica, que tem sido explorada no nosso grupo como moduladora do crescimento e invasão tumoral, capaz de potencializar o efeito citotóxico promovido pela TMZ. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o envolvimento do gene *RECK* e a via de sinalização de Notch na responsividade promovida pelos tratamentos de TMZ e SVA em células da linhagem U87MG de glioblastoma humano. Para tanto, foram utilizadas células de glioblastoma humano da linhagem U87MG com superexpressão da forma canônica de RECK, seu variante de *splicing* RECKvar3 e o vetor controle contendo EGFP, tratadas com 100µM de TMZ e 1µM de SVA de forma isolada e/ou combinada, além das condições controle (veículos DMSO e EtOH) por 72h. Foram realizados ensaios de avaliação da atividade metabólica por redução de tetrazólio (MTT) e análise da expressão gênica por RT-qPCR, tendo por alvos moleculares os transcritos de *NOTCH1* e *HES1*. Os resultados indicam que os tratamentos com os diferentes agentes promoveram redução da viabilidade nas células U87MG e, de forma interessante, a superexpressão de RECKvar3 reduziu a sensibilidade da linhagem U87MG após tratamento com TMZ, corroborando com demais ensaios realizados recentemente em nosso laboratório que sugerem uma ação pró-tumoral dessa variante. Adicionalmente, ambos os fármacos promoveram aumento dos níveis relativos de mRNA de *NOTCH1* e *HES1* na linhagem controle (U87MG-EGFP). A superexpressão de RECK suprimiu os níveis de mRNA dos dois alvos, ao passo que RECKvar3 elevou os níveis relativos de mRNA de *NOTCH1* e *HES1* somente na condição tratada com TMZ. Deste modo, estes dados em conjunto sugerem que o balanço entre RECK/RECKvar3 está envolvido na responsividade e resistência à TMZ, bem como modula os níveis de mRNA de genes da via de NOTCH.

Palavras-chave: glioblastoma; sinvastatina; temozolomida; RECK; NOTCH.

## ABSTRACT

Considering all neoplasms that affect the Central Nervous System, glioblastoma IDH-wildtype (GBM) is the most frequent primary brain tumor in adults, with high rates of malignancy, aggressiveness and extensive heterogeneity. The current therapy is based on chemotherapy with temozolomide (TMZ), radiotherapy and when it is possible, surgical resection. In this way, the use of adjuvant drugs has been an important research object. Simvastatin (SVA), a drug well-known for its anti-hyperlipidemia action, has been researched in our group as growth and invasion modulator, being able to improve the cytotoxicity promoted by TMZ. Here, this work aimed to investigate the involvement of RECK gene and the Notch signaling pathway in the responsiveness mediated by the treatment of TMZ and SVA in U87MG human glioblastoma cell line. Therefore, it had been used human glioblastoma cells of U87MG line overexpressing the canonical form of RECK, the splicing variant RECKvar3 and the control empty vector EGFP, treated with 100 $\mu$ M of TMZ and 1 $\mu$ M of SVA in isolated and/or combined manner, besides the control conditions (vehicles DMSO and EtOH) for 72h. The cellular metabolic activity was investigated through tetrazolium reduction (MTT) and gene expression analysis by RT-qPCR, with *NOTCH1* and *HES1* transcripts as molecular targets. Our results showed that both treatments lead to reduction in U87MG cell viability, and interesting, the RECKvar3 overexpression reduced the sensitivity of the U87MG cells to TMZ, which confirms recent results of our group, suggesting a pro-tumoral action of this splicing variant. In addition, the treatments increased the relative mRNA levels of both *NOTCH1* and *HES1* in the control cell line (U87MG-EGFP). Canonical RECK overexpression suppressed the relative mRNA levels of *NOTCH1* and *HES1*, and RECKvar3 increased the relative mRNA levels of these targets in the TMZ treated condition. As a conclusion, these data suggest that the balance between RECK/RECKvar3 ratio is involved in TMZ responsiveness and resistance, beyond modulating the mRNA levels of Notch pathway genes.

Key words: glioblastoma; simvastatin; temozolomide; RECK; Notch.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	10
2.1. CÂNCER .....	10
2.2. NEOPLASIAS DE SISTEMA NERVOSO CENTRAL .....	11
2.3. GLIOBLASTOMA .....	11
2.4. TRATAMENTO E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À TEMOZOLOMIDA .....	13
2.5. ESTATINAS E TERAPIA ADJUVANTE.....	14
2.6. RECK.....	15
2.7. NOTCH.....	16
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	19
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	20
4.1. OBJETIVO GERAL .....	20
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>5. METODOLOGIA</b> .....	21
5.1. CULTIVO DAS LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA .....	21
5.2. CONDIÇÕES DE TRATAMENTO E PLAQUEAMENTO DAS CÉLULAS .....	21
5.3. ENSAIO DE ATIVIDADE METABÓLICA POR REDUÇÃO DE TETRAZÓLIO (MTT).....	22
5.4. EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR.....	22
5.4.1. Coleta da suspensão de células .....	22
5.4.2. Extração, isolamento e quantificação do RNA total .....	22
5.4.3. Síntese de cDNA.....	23
5.4.4. <i>Real-time quantitative PCR</i> (qPCR) .....	23
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	24
6.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DAS CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO APÓS TRATAMENTO COM TMZ E SVA.....	24
6.2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE mRNA de <i>NOTCH1</i> E <i>HES1</i> NAS LINHAGENS U87MG TRATADAS COM TMZ E SVA.....	25
6.3. RECK/RECK <sup>var3</sup> , VIA DE NOTCH E RESISTÊNCIA À TMZ .....	27
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	29
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	30

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer pode ser caracterizado como conjunto de mais de 100 doenças distintas que possuem como expoente comum o crescimento descontrolado e desordenado de células com potencial invasivo à tecidos e órgãos diferentes ao de origem. Trata-se de uma das doenças mais incidentes em todo globo e com maior taxa de mortalidade, em torno de 10 milhões em 2020 (INCA, 2020; WHO, 2022). Dentre as neoplasias que acometem o Sistema Nervoso Central, destacam-se os gliomas, grupo heterogêneo de tumores originados das células da glia, a saber: astrócitos, oligodendrócitos e endotélio. Apesar de não serem o tipo de tumor com maior incidência em relação às demais neoplasias, os gliomas representam aproximadamente 80% de todos os casos de tumores primários cerebrais em adultos. O de maior destaque pela frequência e mortalidade é o glioblastoma IDH-selvagem (GBM), tumor de origem astrocitária e grau histológico 4, o qual apresenta alta taxa de heterogeneidade e malignidade devido seu crescimento difuso e potencial metastático. Tais características se expressam na baixíssima taxa de sobrevida dos pacientes diagnosticados, a qual é menor que 18 meses (Ostrom e colab., 2015; Louis e colab., 2021; Wu e colab., 2020).

O tratamento do GBM segue os protocolos dos demais tumores: ressecção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia, onde o fármaco padrão utilizado é o agente alquilante temozolomida (TMZ), conhecido pelos nomes comerciais Temodar® e Temodal®. Este agente é uma pró-droga a qual é hidrolisada em contato com o pH sanguíneo e sua forma ativa atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) atingindo os sítios de ação. O efeito citotóxico decorre da indução de apoptose das células cancerosas, através das quebras da dupla-fita de DNA originada pela metilação das bases púricas (Strobel e colab., 2019; Lee e colab., 2016). No entanto, grande parte da parcela de pacientes que são responsivos à quimioterapia torna-se resistente, o que, somado à grande dificuldade de remoção cirúrgica, faz do GBM uma neoplasia essencialmente sem tratamento eficaz (Wu e colab., 2020).

Assim, a busca por terapias alternativas que possam potencializar a ação da TMZ torna-se alvo de diversos estudos, onde a abordagem de reposicionamento de drogas se mostra ainda mais interessante. Recentes trabalhos vêm demonstrando que fármacos da classe das estatinas, as quais são amplamente empregados na clínica para o tratamento de dislipidemias, apresentam propriedades pleiotrópicas, sendo uma delas a atividade antineoplásica (Dastghaib e colab., 2020). Diferentes estatinas vão apresentar efeitos distintos de acordo com as células alvo. A sinvastatina (SVA), por exemplo, apresenta efeitos significativos na inibição do crescimento e indução de apoptose em diferentes tipos e linhagens de tumores (Ahmadi e colab., 2020). Em

específico para o GBM, a SVA tem sido relacionada com aumento da indução de apoptose e do fluxo autofágico, bem como diminuição da invasão celular em diferentes linhagens. Estes achados apontam a SVA como potencial fármaco para ser administrado em conjunto com o quimioterápico padrão (TMZ), em pretensão do aumento da eficácia do tratamento do glioblastoma (Samiei e colab., 2020; Shojaei e colab., 2020).

Dados preliminares de nosso grupo sugerem que o tratamento combinado da SVA aumenta a ação citotóxica da TMZ, induz as células à apoptose de acordo com o aumento dos níveis de NF-kB, caspase 3 e ainda é capaz de modular a expressão do gene supressor de tumor *RECK* (Gomes, 2018; Gomes et al., trabalho submetido). Entretanto, Trombetta-Lima e colaboradores descreveram o processo de *splicing* alternativo do gene *RECK*, onde seus transcritos variantes (*RECKvar3*, *RECKvar4*, *RECKvar5*) apresentam papéis antagônicos. Enquanto a forma canônica tem ação supressora tumoral, sua forma alternativa, *RECKvar3*, apresenta ação pró-tumoral. Tais achados apontam que o balanço entre a expressão das diferentes variantes de *RECK* desempenham papéis distintos na agressividade tumoral (Trombetta-Lima e colab., 2015).

Desse modo, a investigação da maneira pela qual o tratamento adjuvante de SVA modula a expressão tanto dos diferentes transcritos de *RECK*, bem como de genes envolvidos na sensibilização, agressividade e apoptose tornam-se possíveis devido à potencial descoberta de alvos moleculares envolvidos na biologia do GBM, bem como seu emprego em novas abordagens terapêutica.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. CÂNCER

Câncer é um termo comum usado para designar mais de 100 patologias que podem acometer qualquer parte do corpo humano e tem por sinônimos os termos: tumores malignos e neoplasias. Uma definição para câncer é o processo de transformação das células normais de qualquer tecido caracterizado por um distúrbio genético provocado por mutações no DNA, amplificações gênicas e alterações em vias de transdução de sinal intracelular (Kumar, Abbas, Aster, 2018). Essas células ao adquirirem propriedades diferentes das fisiológicas, passam a se proliferar de maneira desordenada e fora de controle, atingindo tecidos adjacentes ao de origem ou ainda outros órgãos (INCA, 2020; WHO, 2022). Este último caso é o que se conhece por metástase e é a principal causa de morte por câncer, sendo ainda a doença que lidera o número de mortes no mundo, cerca de 10 milhões em 2020 (Ferlay e colab., 2020; WHO, 2022).

Desde a Antiguidade o câncer intriga o ser humano e tem sido um dos principais objetos de estudo das ciências biológicas e biomédicas. No entanto, foi com o avanço das técnicas de biologia molecular que diversos mecanismos ligados às neoplasias foram elucidados. Grande parte do conhecimento atual referente à biologia do câncer se deu a partir dos trabalhos de Hanahan e Weinberg. Em seu primeiro trabalho publicado nos anos 2000, os autores propuseram uma série de “marcas do câncer”, ou seja, um conjunto de atributos presentes nas células que se tornaram malignas, as quais são: potencial replicativo ilimitado; evasão da apoptose; autossuficiência em sinais proliferativos; evasão dos sinais supressores de crescimento; indução de angiogênese; ativação de mecanismos de invasão aos tecidos e metástase (Hanahan e Weinberg, 2000).

Com os avanços das pesquisas em oncologia, os mesmos autores publicaram uma atualização de seu trabalho em 2011. A desregulação do metabolismo energético celular foi apontada como uma nova “marca” e os autores ainda indicaram que a instabilidade genômica das células seria um facilitador para a transformação maligna celular. Além disso, outros dois achados relacionados ao sistema imunológico trouxeram à luz uma nova forma para a compreensão da complexidade do câncer, são eles: o escape das células cancerosas de serem destruídas pelo sistema imunológico; a capacidade das células cancerosas de promover inflamação (Hanahan e Weinberg, 2011). No mesmo ano, Schreiber e colab. a partir de importantes descobertas no contexto do microambiente tumoral, apresentaram o conceito de imunoeedição, o qual aborda sobre como o sistema imunológico pode apresentar papéis

ambíguos ao interagir com os tumores, podendo atuar tanto na supressão quanto para progressão da tumorigênese (Schreiber e colab., 2011).

Mais recentemente, a plasticidade fenotípica, a reprogramação epigenética não mutacional e os microbiomas polimórficos foram incluídos como características adicionais no contexto tumoral. Além disso, células senescentes, de origens variadas, podem ser adicionadas à lista de tipos de células funcionalmente importantes no microambiente tumoral (Hanahan, 2022).

## 2.2. NEOPLASIAS DE SISTEMA NERVOSO CENTRAL

As neoplasias que acometem o Sistema Nervoso Central (SNC) possuem íntima relação com o seu tipo celular de origem. Remetendo à histofisiologia do SNC, neurônios e células da glia são os dois tipos celulares constituintes do tecido neural.

A maioria dos tumores de SNC são os advindos das células da glia e são chamados genericamente de gliomas. Segundo a mais recente diretriz para classificação e nomenclatura dos tumores de SNC, a qual considera características histopatológicas e os padrões moleculares, os gliomas são divididos em diversos subtipos, sendo o de maior relevância os gliomas difusos de adultos. O maior representante deste grupo é glioblastoma IDH-selvagem (GBM), tumor cerebral primário mais incidente em adultos (Louis e colab., 2021).

## 2.3. GLIOBLASTOMA

O GBM é caracterizado por sua grande heterogeneidade, agressividade e resistência, além de possuir um descontrole na proliferação celular, infiltração local e crescimento difuso, extensa instabilidade genômica, tendência à necrose e angiogênese. Em termos moleculares, é caracterizado pela desregulação de várias vias de sinalização chave, as quais envolvem sobrevivência celular, crescimento, proliferação e apoptose (Decordova e colab., 2020; Louis e colab., 2016; Wen e colab., 2020).

A incidência global ajustada por idade do GBM nos Estados Unidos é de 3,22 a cada 100 mil pessoas, e apontou que a idade mais avançada ao diagnóstico e o sexo masculino são fatores relacionados. Os fatores de risco conhecidos para o glioblastoma representam apenas uma pequena proporção de casos. Em múltiplos estudos independentes, fatores protetores e de risco foram validados, sendo eles respectivamente, o histórico de doenças atópicas (incluindo alergias, asma, eczema e febre do feno) e a exposição à radiação ionizante na cabeça e no pescoço (Wen e colab., 2020).

Estudos de associação entre o genoma e fatores de risco validaram 25 polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) associados ao risco de desenvolver gliomas, sendo 11 deles específicos para glioblastomas. Mesmo que esses achados ainda não possuam estudos para validar a sua significância biológica, as abordagens empregadas que analisam todo o genoma identificaram alguns *loci* contendo genes críticos para gliomas, como: transcriptase reversa da telomerase (*TERT*), *RTEL1*, receptor de fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) e inibidor de quinase dependente de ciclina 2B (*CDKN2B*) (Wen e colab., 2020).

A maioria dos glioblastomas são detectados após as primeiras manifestações sintomatológicas, principalmente devido à grande expansão da massa tumoral que causa a destruição de certas estruturas cerebrais. Alguns sintomas clínicos incluem: dor de cabeça, náuseas, tontura, confusão mental, dificuldades na fala, mudança na personalidade, além de quadros convulsivos, déficits neurológicos focalizados e dos sinais provenientes do aumento da pressão intracraniana. A ressonância magnética de alto contraste é o principal exame utilizado na detecção do glioblastoma, na qual todas as características macroscópicas comumente encontradas no tumor são visíveis nesse exame (Decordova e colab., 2020; Wen e colab., 2020).

Através de técnicas de transcriptoma, mais especificamente *single-cell RNA sequencing* (scRNA-Seq), Neftel e colab. (2019) descreveram três subtipos moleculares para o glioblastoma. O primeiro deles, o subtipo clássico, é marcado pela amplificação do gene do receptor de fator de crescimento epidérmico (*EGFR*); o segundo subtipo, pró-neural, é marcado por mutações e amplificação no gene do fator de crescimento derivado de plaquetas alfa (*PDFRG $\alpha$* ) e no gene da proteína isocitrato-desidrogenase 1 (*IDH-1*); enquanto que o terceiro subtipo, mesenquimal e mais agressivo, é marcado pela mutação no gene neurofibromatose tipo 1 (*NF1*). De modo curioso, os autores também descrevem que as células cancerosas presente dentro da massa tumoral do GBM coexistem em 4 subpopulações celulares, de acordo com seu perfil transcricional e marcadores específicos, sendo eles: astrócito-like (*AC-like*), progenitor neural-like (*NPC-like*), progenitor de oligodendrócito-like (*OPC-like*), mesenquimal-like (*MES-like*). Dessa forma, cada subtipo de GBM possui diferentes frequências dessas subpopulações celulares e como isto varia de tumor para tumor e de paciente para paciente, o grau de heterogeneidade representa um dos maiores e principais desafios relacionados ao GBM, afetando a abordagem clínica empregada, bem como a responsividade à terapêutica.

## 2.4. TRATAMENTO E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À TEMOZOLOMIDA

O tratamento padrão adotado na clínica para o glioblastoma é a ressecção cirúrgica, a qual visa a retirada do máximo de tecido tumoral. Como muitas vezes não é possível realizar a retirada de toda massa tumoral sem causar danos na atividade cerebral, devido ao padrão infiltrativo do tumor, a radioterapia e quimioterapia também são empregados (WEN e colab., 2020; STROBEL e colab., 2019).

O quimioterápico padrão utilizado é a temozolomida (TMZ), conhecido pelos nomes comerciais Temodar® e Temodal®. Este pró-fármaco é um agente alquilante de DNA, que se ativa através de hidrólise pelo contato com o pH sanguíneo, atravessando facilmente a barreira hematoencefálica (BHE). Sua ação citotóxica decorre através da inserção de grupos metil na posição O<sup>6</sup> e N<sup>7</sup> da guanina. Apesar das N-metilações serem corrigidas pelo reparo de excisão de bases durante a replicação, as O<sup>6</sup>-metilguaninas formadas se ligam de forma errônea com os resíduos de timina, ativando assim o mecanismo de reparo de mau-pareamento o qual promove a excisão da timina. No entanto, como a forma ativa da TMZ continua em concentrações suficientes para formar O<sup>6</sup>-metilguaninas, os ciclos fúteis de excisão e reinserção levam à instabilidade da forquilha de replicação e à quebras de dupla fita do DNA, o que culmina na parada do ciclo celular em G2/M e a consequente indução de morte celular por apoptose (Lee, 2016; Strobel e colab., 2019). Ademais, também foi descrito na literatura que a TMZ quando administrada junto com a radioterapia possui propriedades sensibilizantes à radiação, ou seja, aumentam as quebras da fita dupla de DNA induzidas pela radiação, levando ao aumento da morte celular (Wu e colab., 2021).

Apesar das abordagens descritas acima serem utilizadas no regime terapêutico atual, o prognóstico e taxa de sobrevida dos pacientes se mantém extremamente baixos, algo em torno de 18 meses e 10%. Além disso, grande parte dos pacientes deixam de responder à terapia com TMZ, o que aliado com a dificuldade de ressecção cirúrgica do tumor leva o glioblastoma a ser considerado uma doença essencialmente sem tratamento eficaz (Loius e colab., 2016; Strobel e colab., 2020; Wu e colab., 2020).

Alguns mecanismos de resistência associados à TMZ já são bem conhecidos. O mais estabelecido dentre eles é a expressão da enzima O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT), a qual retira os grupamentos metil dos resíduos de O<sup>6</sup>-metilguanina, possuindo assim ação antagônica à da TMZ. Dessa forma, maiores níveis de expressão de MGMT estão relacionados com a baixa responsividade de agentes alquilantes, como a TMZ. Portanto, o nível

de metilação do promotor de *MGMT* é considerado um marcador de prognóstico para pacientes com GBM. Hegi e colab. descreverem que a taxa de sobrevida média de pacientes com o silenciamento de *MGMT* via metilação do promotor foi de 21,7 meses, ao passo que pacientes com elevada expressão da enzima possuem sobrevida em torno de 15,3 meses (Hegi e colab., 2005). No entanto diversos estudos têm associado o perfil de resistência a demais vias de sinalização intracelular, como SHH, JAK/STAT, PI3K/Akt, Wnt/ $\beta$ -catenina, e Notch, o que aumenta mais ainda o grau de complexidade do GBM (Carballo e colab., 2020; Kohsaka e colab., 2012; Ulasov e colab., 2011; Tan e colab., 2018; Tomar; Patil; Somasundaram, 2019).

## 2.5. ESTATINAS E TERAPIA ADJUVANTE

Devido os pacientes de GBM apresentarem alta taxa de resistência à TMZ, busca-se terapias adjuvantes capazes de potencializar a resposta à terapêutica do glioblastoma. Dessa forma, as estatinas, uma classe de fármacos que agem como inibidores competitivos da enzima hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, a qual converte HMG-CoA em mevalonato na via de biossíntese do colesterol, foram descritas por possuírem efeitos pleiotrópicos. Tanto o colesterol quanto o mevalonato, são essenciais para diversos processos, sendo o mevalonato precursor de produtos que regulam o ciclo celular, como o geranylpirofosfato (GPP) e farnesilpirofosfato (FPP). Estes intermediários, GPP e FPP, são essenciais para a modificação pós-traducional de diferentes proteínas, como as proteínas GTPases (Rho, Rac e Ras), as quais regulam a transdução de sinal de diferentes receptores de membrana requeridos para a transcrição de genes envolvidos na proliferação celular, diferenciação e apoptose (Thurnher, Nussbaumer, Gruenbacher, 2012; Baenke e colab., 2013; Pisanti e colab., 2014).

No contexto tumoral, as estatinas são relatadas pela sua capacidade de bloquear a isoprenilação de oncoproteínas que regulam a proliferação, migração, invasão e ciclo celular (Pisanti e colab., 2014). Dados de estudos pré-clínicos sugerem que as estatinas possuem interessantes efeitos de inibição do crescimento tumoral e indução da apoptose em alguns tipos de câncer, como o de próstata, mama, melanoma e em especial, o glioblastoma (Ahmadi e colab., 2020).

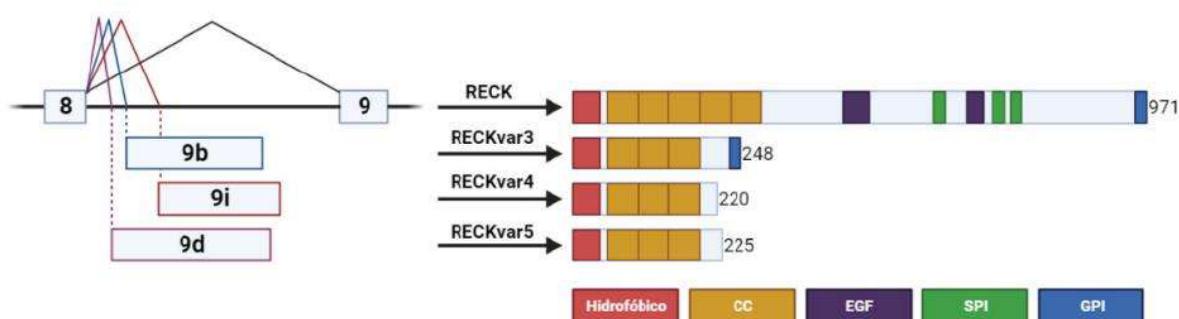
Dentre as estatinas, a sinvastatina (SVA) apresentou efeitos antitumorais e, por ser lipofílica e atravessar em concentrações significativas a BHE, tem seu papel terapêutico cada vez mais sendo estudado no contexto do glioblastoma. Shojaei e colab. (2020) evidenciaram

que linhagens de glioblastoma humano (U87MG e U251) tratadas unicamente com sinvastatina ou em combinação com temozolomida tiveram um aumento das taxas de apoptose induzidas por TMZ, além de inibir o fluxo autofágico. Ademais, dados preliminares do nosso grupo sugerem que o tratamento de células de glioblastoma com SVA é capaz de modular a expressão do gene supressor de tumor *RECK* (Gomes, 2018), aumentando ainda mais a relevância da sinvastatina de ser estudada como alvo terapêutico.

## 2.6. RECK

O gene *Reverse-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK)*, inicialmente descrito por Takahashi e colaboradores como gene supressor tumoral, codifica uma glicoproteína de mesmo nome que se encontra ancorada à membrana plasmática por glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Takahashi e colab., 1997). A proteína RECK atua como uma das inibidoras fisiológicas das metaloproteinases de matriz (MMPs) e ainda desempenha papéis relacionados ao desenvolvimento, morfogênese, remodelamento, migração celular, angiogênese e outros processos do organismo. Também é relatado que maiores níveis de expressão de RECK estão relacionados com menor taxa de migração e invasão das células cancerosas de GBM, conferindo a ela um status de biomarcador de bom prognóstico (Chen e Tseng, 2012; Corrêa e colab., 2010).

Mais recentemente, Trombetta-Lima e colaboradores descreveram o processo de *splicing* alternativo do gene *RECK*, o qual produz diferentes transcritos a partir de uma mesma sequência gênica. Foram identificadas outras variantes para além da forma canônica de RECK: RECKvar3, RECKvar4 e RECKvar5. Estes transcritos alternativos apresentam 9 éxons, enquanto que a forma canônica apresenta 21 éxons. Tais diferenças encontram-se devido a uma modificação no nono éxon nas formas variantes, visto que os 8 éxons anteriores são comuns para as três variantes (FIGURA 1) (Trombetta-Lima e colab., 2015).

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS TRANSCRITOS DE *RECK*

Fonte: Boel, 2022

Nota: O gene *RECK* pode dar origem a diferentes transcritos, distintos do transcrito canônico de 21 éxons. As isoformas alternativas (*RECKvar3* e *RECKvar5*) possuem 9 éxons, as quais compartilham os 8 primeiros éxons e o nono éxon de cada um destes transcritos é distinto dos demais. À direita, representação da predição dos domínios proteicos e massa de cada uma das isoformas. O tamanho dos éxons está fora de escala.

De maneira interessante, as variantes *RECKvar3* e *RECKvar5* apresentam papel antagonista à forma canônica de *RECK*, podendo atuar como oncogene. A superexpressão de *RECKvar5* em linhagens de GBM resultou em aumento da proliferação celular (Lee e colab., 2018). Ademais, a análise de pacientes com glioblastoma e melanoma apontou que maiores quantidades do transcrito canônico de *RECK* correlaciona-se com um melhor prognóstico dos pacientes, ao passo que a predominância de *RECKvar3* está ligada a uma menor taxa de sobrevida (Trombetta-Lima e colab., 2015; Jacomasso e colab., 2020). Tais achados apontam que o balanço entre a expressão das diferentes variantes de *RECK* desempenham papéis distintos na agressividade tumoral.

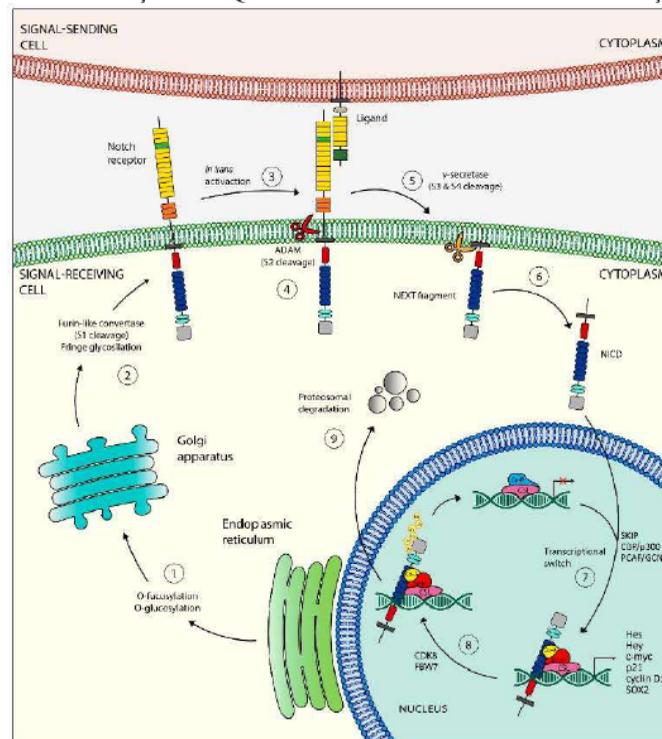
## 2.7. NOTCH

A sinalização de Notch é descrita como uma via evolutivamente conservada que possui um papel crítico numa série de processos celulares e de desenvolvimento, como proliferação celular, apoptose, manutenção da potência de células tronco, determinação celular e homeostase tecidual. Notch opera funcionalmente como uma proteína receptora da superfície da membrana citoplasmática. Em mamíferos, existem quatro proteínas homólogas, Notch1, Notch2, Notch3 e Notch4 (codificadas por genes de mesmo homônimo), as quais se ligam em duas grandes famílias de ligantes: *Delta-like* (*Dll1-3* e *-4*) e *Jagged* (*Jagged1* e *-2*). A ativação da sinalização

de Notch via ligantes pode ocorrer de duas formas distintas: cis, quando a sinalização é parácrina e trans, quando a sinalização é autócrina (Banzoni e Bentivegna, 2019).

Após interação com seus ligantes, Notch passa por uma série de clivagens enzimáticas até a liberação de seu domínio intracelular, chamado NICD (*Notch intracellular domain*). A porção NICD é translocada até o núcleo celular, onde interage com os fatores da família CSL de ligação ao DNA, os quais agem como fatores de transcrição de diversos genes, como: Hes, Hey, duas grandes famílias de repressores transcricionais envolvidos com a determinação fenotípica, além de outros alvos como NF- $\kappa$ B, c-Myc, p21/Waf1, ciclina D1 e -3, SOX2, HER2, PAX5, SLUG entre outros (FIGURA 2) (Banzoni e Bentivegna, 2019).

FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE NOTCH



Fonte: Banzoni e Bentivegna, 2019.

Nota: Logo após a síntese no retículo endoplasmático (1), a cadeia polipeptídica precursora de Notch é direcionada para o aparelho de Golgi, onde é clivada por uma convertase do tipo furina (clivagem S1) (2) e translocada para a membrana celular. A interação com um de seus ligantes (3) induz a uma segunda clivagem (S2) por uma proteína ADAM, resultando num fragmento truncado (NEXT), o qual ainda é processado em dois sítios (S3 e S4) por proteínas do complexo  $\gamma$ -secretase (5), gerando o domínio intracelular de Notch (NICD), a forma ativa do receptor. A porção NICD pode então ser translocada para o núcleo e exercer suas funções transcricionais (7). Por fim, a ubiquitinação de NICD (8) leva para sua degradação via proteossomo.

Desregulações da via de Notch são descritas em diversas patologias, inclusive no câncer. No glioblastoma, *Notch1* é descrito como sendo um dos diversos oncogenes com elevada expressão, e seus efetores estão relacionados com inibição da apoptose e ativação de proliferação e sobrevivência (Hai e colab., 2018; Banzoni e Bentivegna, 2019). Ainda, como os

efetores da via de Notch são cruciais para a manutenção de células progenitoras neurais no contexto fisiológico, tem sido relatado a influência da sinalização de Notch nas chamadas *glioma stem cells* (GSCs), as quais são hipotetizadas por manter o fenótipo de resistência e agressividade do GBM (Muraguchi e colab., 2007; Banzoni e Bentivegna, 2019).

### 3. JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços nos estudos de imunoterapias e estudos clínicos em relação ao GBM, esta neoplasia segue essencialmente sem tratamento eficaz. O que aliado à sua grande prevalência dentre as neoplasias de SNC em adultos, o GBM torna-se a maior causa de morte por tumores cerebrais primários.

Diversas são as abordagens para melhorar a terapêutica do GBM. O reposicionamento de drogas tem sido um interessante objeto de estudo no campo das ciências biológicas e da saúde, principalmente pelo baixo custo e pela facilidade em se utilizar fármacos bem estabelecidos. Desta forma o emprego das estatinas e por consequência a sinvastatina, vem sendo descritas na literatura pela sua atividade antineoplásica, o que a torna candidata como fármaco adjuvante.

Dados preliminares do nosso grupo e de demais trabalhos vêm demonstrando os efeitos da sinvastatina em modelos de GBM, em especial na modulação das vias de sinalização intracelulares consequentes da indução de apoptose. Gomes e colab. (2024) relatou a diminuição nos níveis de NF-kB nas células de GBM após tratamento combinado de TMZ e SVA. Dessa forma, abre-se luz e justifica-se a investigação das vias afetadas e moduladas a montante desse alvo molecular.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o envolvimento do gene *RECK* e da via de sinalização de *NOTCH1* na responsividade promovida pelos tratamentos de TMZ e SVA em células da linhagem U87MG de glioblastoma humano.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os efeitos do tratamento combinado de TMZ e SVA na viabilidade celular de diferentes linhagens de GBM com superexpressão ou não do gene *RECK* (U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK<sub>var3</sub>);
- Avaliar a capacidade do tratamento combinado TMZ e SVA de modular a expressão dos genes de interesse *NOTCH1* e *HES1*.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. CULTIVO DAS LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA

As linhagens de glioblastoma humano utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mari C. Sogayar, do Núcleo de Terapia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (NUCEL-FMUSP). U87MG (ATCC® HTB–14™) é uma linhagem celular estabelecida através da amostra do tumor de GBM de um paciente homem caucasiano de 44 anos. Tem por características as altas taxas de proliferação e invasão, além de ser tumorigênica em camundongos *nude*. Trombetta-Lima e colab. (2015), através de vetor transfecção lentiviral p156RRLsinPPCCMVIns3IRESPRC, supressaram os transcritos de *RECK* e *RECKvar3* em células U87MG, obtendo dessa forma 3 sublinhagens, descritas na tabela a seguir.

TABELA 1 – LINHAGENS U87MG MODIFICADAS

<b>Linhagem</b>	
U87MG-EGFP	Vetor vazio
U87MG-RECK	Vetor com a sequência codificante de RECK canônico
U87MG-RECK <sub>var3</sub>	Vetor com a sequência codificante de RECK <sub>var3</sub>

Fonte: O autor.

As células foram cultivadas em meio de DMEM com 10% de soro bovino fetal, 10µg/mL de estreptomicina e 100U/mL de penicilina, a 37°C em atmosfera úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As mesmas foram subcultivadas ao atingirem 80% de confluência, utilizando tripsina 0,1% em PBSA contendo 1mM de EDTA. Os estoques celulares foram mantidos em meio de cultivo contendo 10% de DMSO a –80°C.

### 5.2. CONDIÇÕES DE TRATAMENTO E PLAQUEAMENTO DAS CÉLULAS

Após contagem em câmara de Neubauer as células suspensas em meio DMEM foram plaqueadas em placas P96, na densidade de  $5,0 \times 10^3$  células/poço em 100µL de suspensão e em placas P100mm, na densidade de  $1,0 \times 10^6$  células por placa em 10mL de suspensão. Decorrido 24h para adesão das células, o meio foi retirado e as mesmas foram submetidas ao tratamento individual ou combinado com 100µM de Temozolomida (Sigma®) e 1µM de

Sinvastatina (Merck®) por 72h. Os grupos controles serão tratados com DMSO e etanol, respectivos veículos da TMZ e SVA.

### 5.3. ENSAIO DE ATIVIDADE METABÓLICA POR REDUÇÃO DE TETRAZÓLIO (MTT)

Findado as 72h de tratamento conforme descrito na seção anterior, as células plaqueadas em placas P96 tiveram seu sobrenadante retirado para a adição de 200µL da solução de MTT (3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio), a qual foi preparada a 0,5mg/mL em PBS. As placas foram incubadas ao abrigo da luz em estufa a 36°C por 3h. Posteriormente a solução de MTT foi retirada e adicionou-se 200µL de solução DMSO (dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo). As placas foram mantidas em agitador mecânico por 30 min para homogeneização da solução. A absorbância foi lida em 570 nm com auxílio de um leitor de placas (TECAN Infinite M200®), cujo branco foi a solução DMSO. Três experimentos individuais foram realizados em quadruplicata experimental. Os resultados foram expressos como porcentagem das células metabolicamente ativas em relação aos veículos (controle).

### 5.4. EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR

#### 5.4.1. Coleta da suspensão de células

Para os ensaios moleculares cujas células foram plaqueadas em placas P100mm, a suspensão de células foi obtida conforme descrito a seguir. O sobrenadante foi desprezado, as placas foram lavadas com PBS e as células desaderidas com solução de tripsina. A suspensão de células de cada condição foi colocada em tubos *falcon* e centrifugados a 3000g por 3 min. O sobrenadante foi vertido, o *pellet* ressuspensionado em PBS gelado e transferido para microtubos *ependorf*. Novamente as amostras foram centrifugadas, a 4000g 1 min, o sobrenadante vertido e os microtubos *ependorf* armazenados em freezer -80° C.

#### 5.4.2. Extração, isolamento e quantificação do RNA total

A extração do RNA total foi realizada com o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega®), seguindo as instruções do fabricante. Ao final do processo de purificação, cada amostra foi eluída em 20 µL de água *nuclease-free*. A determinação da pureza e quantificação do RNA foi realizada no equipamento Nanodrop 1000®.

### 5.4.3. Síntese de cDNA

Para os posteriores ensaios de qPCR, 1 µg do RNA total de cada amostra foi utilizado para a reação de síntese de DNA complementar (cDNA), a partir do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems™) seguindo instruções do fabricante. O cDNA sintetizado foi diluído em 30 vezes em água ultrapura autoclavada e armazenado a -80° C.

### 5.4.4. *Real-time quantitative PCR* (qPCR)

A RT-qPCR foi realizada em termociclador Step One Plus (Life Technologies®), utilizando o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega®, A6001), seguindo as instruções do fabricante. Para os alvos de interesse, foram utilizados primers já disponíveis no laboratório, cujas eficiências de amplificação foram previamente determinadas. As amostras foram analisadas em duplicata experimental para cada alvo.

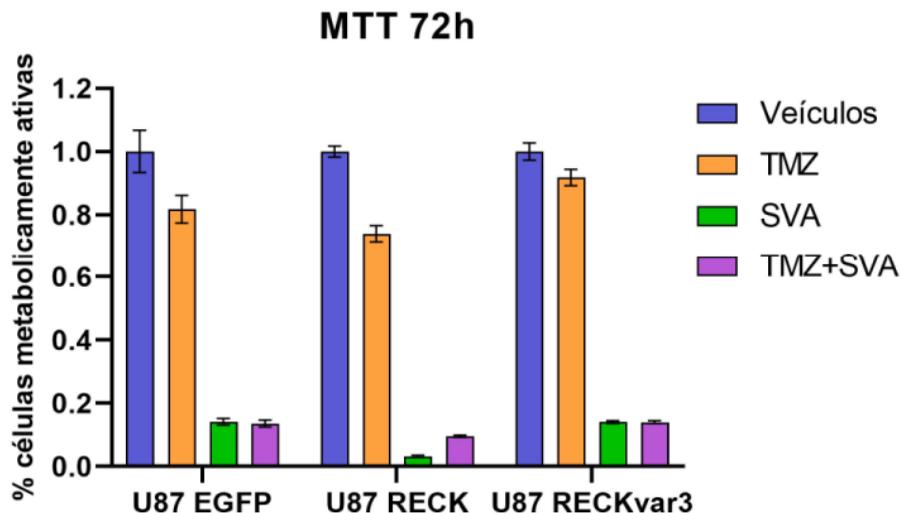
Após o término da reação, os valores de *cycle threshold* (Ct) de cada quantificação foram tabelados. A normalização dos dados foi feita levando em conta a eficiência de amplificação de cada par de primers e utilizando a expressão do gene GAPDH controle endógeno. Os resultados foram expressos como razão da expressão de cada amostra em relação ao controle com o veículo.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DAS CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO APÓS TRATAMENTO COM TMZ E SVA

Inicialmente, com o intuito de caracterizar os efeitos da TMZ, SVA e a combinação de ambas as drogas na regulação metabólica das linhagens U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECKvar3 foi realizado um ensaio de MTT. Este ensaio colorimétrico tem por princípio verificar as atividades das oxidoredutases dependentes de NADH na conversão da molécula de MTT, de coloração amarela, para o cristal de formazan, de coloração roxa. Em outras palavras, o ensaio possibilita avaliar as células que estão metabolicamente ativas, pois somente essas serão capazes de realizar tal conversão. As três linhagens foram plaqueadas e tratadas sob as mesmas condições (FIGURA 3).

FIGURA 3 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA APÓS O TRATAMENTO DAS LINHAGENS U87MG-EGFP, U87MG-RECK E U87MG-RECKvar3 COM TMZ E SVA POR 72h



Fonte: O autor (2024).

Nota: Gráfico de porcentagem relativa de atividade metabólica obtido pelo ensaio de redução de MTT para as linhagens U87MG EGFP, U87MG RECK e U87MG RECKvar3 tratadas com TMZ 100  $\mu$ M, SVA 1  $\mu$ M e a combinação dos fármacos por 72 horas. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão em relação ao valor observado para os controles com veículo (EtOH e DMSO) proveniente de três experimentos independentes realizados em quadruplicata.

Analisando a atividade metabólica das células inicialmente após tratamento com TMZ, observa-se que a linhagem U87MG-EGFP, com vetor de superexpressão vazio, e, portanto, semelhante à linhagem parental não submetida a nenhuma transfecção viral, apresenta o perfil

de responsividade característico à TMZ, com percentagem relativa de células metabolicamente ativas em torno de 80%. Ainda, ao superexpressar RECK, nota-se breve redução na percentagem, com viabilidade relativa próxima aos 75%. No entanto, com a superexpressão de RECKvar3 um perfil de responsividade diferente é observado, com as células apresentando viabilidade relativa de 98%. Tal fenômeno sugere que o transcrito variante de RECK possa estar de algum modo influenciando as células da linhagem U87MG a apresentar um perfil de resistência à TMZ. Tal dado corrobora o que foi observado recentemente em nosso laboratório, pela mestrandia Ana Gabriela Jungles Almeida, e aponta que o balanço entre a expressão de RECK/RECKvar3 desempenha um papel entre a responsividade e a resistência à TMZ, aumentando a possibilidade de investigação dos mecanismos adjacentes à tal fenômeno.

Por outro lado, um perfil distinto foi observado nas condições experimentais de tratamento com SVA e TMZ. Previamente, Gomes 2018 (dados não publicados) realizou experimentos semelhantes ao deste trabalho, mas utilizando somente a linhagem U87MG parental e numa maior densidade celular e observou um perfil de citotoxicidade distinto, no qual a SVA na concentração de 1 uM reduziu a viabilidade das células em torno de 30%, ao passo que a combinação dos fármacos promoveu ainda mais a redução da viabilidade, em torno de 50%. No presente trabalho, os 3 experimentos de MTT realizados apontaram um grau de citotoxicidade e sensibilização das células à SVA e à combinação muito maior do que inicialmente obtido, onde as células nestas condições experimentais apresentaram drástica redução na viabilidade das células, igual ou superior a 70% para as 3 linhagens analisadas. Portanto, futuramente, mais ensaios serão realizados aumentando a quantidade de células por cm<sup>2</sup> da área de crescimento, a fim de avaliar se os perfis de responsividade se mantêm, sendo dependentes de densidade celular.

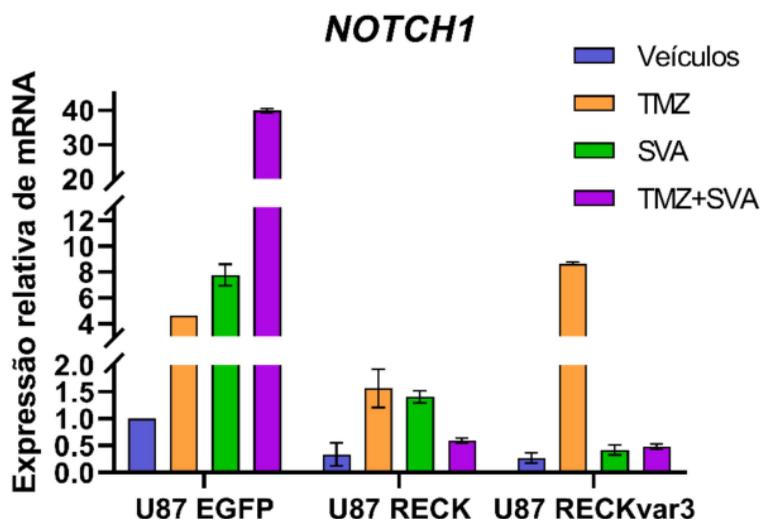
## 6.2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE mRNA de *NOTCH1* E *HES1* NAS LINHAGENS U87MG TRATADAS COM TMZ E SVA

A fim de caracterizar os efeitos dos tratamentos de TMZ, SVA e a combinação das drogas no perfil transcricional dos genes *NOTCH1* e *HES1*, ensaios de análise da expressão gênica por RT-qPCR foram realizados (FIGURAS 4 E 5).

De maneira interessante, para a linhagem U87MG-EGFP, a ação dos fármacos promoveu um aumento na expressão dos transcritos de *NOTCH1*, com aumento relativo de 5 e 8 vezes para as condições tratadas por TMZ e SVA, respectivamente. Já na condição de tratamento combinado, esse aumento foi ainda mais intenso, algo em torno de 40 vezes em

relação à condição controle. De outro modo, observou-se que a superexpressão de RECK (na linhagem U87MG-RECK) promoveu certa supressão do aumento do nível do transcrito de *NOTCH1* induzido pelas diferentes condições de tratamento, pois todas as condições experimentais tiveram redução na expressão relativa de mRNA de *NOTCH1* em relação à linhagem controle (U87MG-EGFP). Vale ressaltar que a condição de tratamento combinado de TMZ e SVA promoveu a diminuição dos níveis de *NOTCH1* de maneira mais brusca, mantendo os níveis de *NOTCH1* próximos aos níveis da condição controle onde as células foram mantidas somente com o veículo das drogas. Por fim, na linhagem com superexpressão do variante alternativo RECKvar3 o nível de expressão relativa do mRNA de *NOTCH1* se manteve elevado após o tratamento com TMZ, atingindo 10 vezes em relação as condições de tratamento somente com os veículos e aos tratamentos com SVA e combinação dos fármacos.

FIGURA 4 – EXPRESSÃO RELATIVA DE mRNA DOS TRANSCRITOS DE *NOTCH1* PARA AS LINHAGENS U87MG-EGFP, U87MG-RECK E U87MG-RECKvar3 TRATADAS COM TMZ E SVA POR 72h



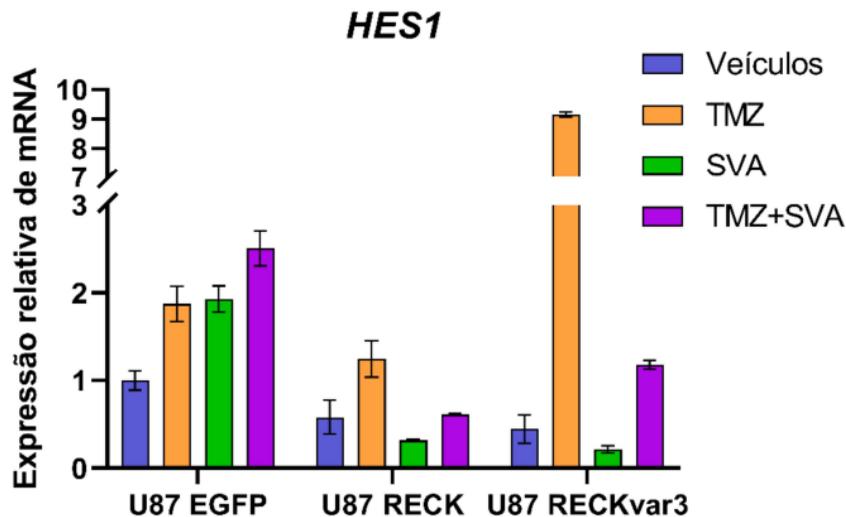
Fonte: O autor (2024).

Nota: Gráfico de porcentagem de expressão de mRNA *NOTCH1* obtido por RT-qPCR para as linhagens U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECKvar3 tratadas com TMZ e SVA por 72h. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão em relação ao valor observado para o controle com os veículos (U87MG-EGFP), decorrentes de um experimento independente realizado em duplicata.

Obedecendo o padrão de sinalização como um dos primeiros alvos a jusante de *NOTCH1*, o nível de expressão relativa do transcrito de *HES1* seguiram o perfil apresentado acima. Para a linhagem U87MG-EGFP, observou-se novamente um aumento do nível de

expressão de *HES1* após os tratamentos com TMZ, SVA e os fármacos combinados, atingindo respectivamente 2, 2 e 2,5 vezes. Do mesmo modo, a superexpressão de RECK canônico promoveu supressão do aumento da expressão do transcrito de *HES1* após os diferentes tratamentos, com os níveis variando em torno de 0,5 a 1,5 vezes a expressão relativa. Por último, na linhagem U87MG-RECKvar3, de maneira repetida o nível de expressão de mRNA de *HES1* na condição tratada com TMZ se sobressaiu em relação as demais, em torno de 10 vezes, ao passo que as outras condições experimentais variaram entre 0,5 e 1,5 vezes.

FIGURA 5 – EXPRESSÃO RELATIVA DE mRNA DOS TRANSCRITOS DE *HES1* PARA AS LINHAGENS U87MG-EGFP, U87MG-RECK E U87MG-RECKvar3 COM TMZ E SVA POR 72h



Fonte: O autor (2024)

Nota: Gráfico de porcentagem de expressão de mRNA *HES1* obtido por RT-qPCR para as linhagens U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECKvar3 tratadas com TMZ e SVA por 72h. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão em relação ao valor observado para o controle com os veículos (U87MG-EGFP), decorrentes de um experimento independente realizado em duplicata.

### 6.3. RECK/RECKvar3, VIA DE NOTCH E RESISTÊNCIA À TMZ

Tomando de início o perfil do conjunto de dados obtidos através dos ensaios moleculares de RT-qPCR, vê-se inicialmente que a superexpressão de ambos os transcritos de RECK canônico e variante 3 afetam de algum modo o perfil de expressão de *NOTCH1* e *HES1*. Ao buscar fundamentação para esse achado na literatura, encontramos o trabalho de Muraguchi e colab. (2007). Neste trabalho, os autores descrevem o papel de RECK como um dos principais moduladores *upstream* da via de Notch, via interação com ADAM10. Apesar dos dados serem

apresentados num contexto do papel fisiológico de RECK e da via de sinalização de Notch para o neurodesenvolvimento e manutenção da população progenitora neural, os autores reforçam a ideia de sugestão de RECK como moduladora da via de Notch através da inibição de ADAM10. Tais dados corroboram principalmente com os dados da expressão dos mRNA de *NOTCH1* e *HES1* após superexpressão de RECK. Com o aumento da proteína na superfície celular, a repressão da proteína ADAM10 acontece em maior extensão, o que inibe por conseguinte os alvos *downstream* da via de Notch.

Em relação aos dados apresentados sobre a resistência das células da linhagem U87MG à TMZ após superexpressão de RECKvar3, Alifate e colab., (2020) apresentam um conjunto de dados que se correlacionam indiretamente com os achados do nosso trabalho. Os autores viram que linhagens celulares (incluindo a U87MG) que adquiriram resistência à TMZ possuem *downregulation* de PLK2, uma quinase que é reguladora da via de Notch. Ainda, os autores viram que com a supressão de PLK2 via shRNA uma série de alvos *downstream* de Notch (HES1, c-MYC, p21, ciclina D3) tem sua expressão elevada a nível de mRNA e a nível proteico Notch1, Notch2 e HES1 se elevam.

Por fim, os dados obtidos reforçam o que o nosso grupo vem descrevendo – o papel distinto e oposto da ação de RECKvar3 em relação a forma canônica de RECK. Ainda, este trabalho mostra uma inédita ação de RECKvar3, sugerindo que essa variante de *splicing* está relacionada com promoção de resistência tumoral. Até o presente momento, pelo que sabemos, a ação de RECK no fenótipo de resistência ao tratamento nunca tinha sido descrito anteriormente.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os dados obtidos neste trabalho abrem diversas possibilidades de investigação no futuro. Nossos resultados sugerem um papel importante da razão RECK/RECKvar3 como modulador da via de Notch. Os resultados descritos contextualizam essa regulação no nível transcricional, mas os efeitos a nível proteico estão dentre algumas possibilidades de experimentos futuros, de forma a completar e ampliar a caracterização de RECK como um modulador da via de Notch em modelo tumorigênico de glioblastoma humano.

Outra perspectiva do estudo diz respeito a ampliação e melhor caracterização dos efeitos da SVA como adjuvante ao quimioterápico TMZ. Nossos resultados de viabilidade celular sugerem um importante efeito citotóxico dependente de densidade celular. Pode-se expandir essas análises avaliando os efeitos da combinação dos fármacos em uma curva de crescimento celular, ou ampliando para modelos de cultura 3D onde não apenas o número de células, mas também a interação célula-célula e célula-matriz pode ser avaliada, criando um ambiente *in vitro* com maior complexidade de interações, se aproximando mais do modelo encontrado *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

AHMADI et al. Pleiotropic effects of statins: A focus on cancer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, Volume 1866, Issue 12, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165968>.

ALAFATE, W., XU, D., WU, W. et al. Loss of PLK2 induces acquired resistance to temozolomide in GBM via activation of notch signaling. *J Exp Clin Cancer Res* 39, 239 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01750-4>

BAZZONI, R.; BENTIVEGNA, A. Role of Notch Signaling Pathway in Glioblastoma Pathogenesis. *Cancers* 2019, 11, 292. <https://doi.org/10.3390/cancers11030292>

BAENKE, F. et al. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Disease Models & Mechanisms*, v. 6, n. 6, p. 1353–1363, 2013.

BEHNAN, J.; FINOCCHIARO, G.; HANNA, G. The landscape of the mesenchymal signature in brain tumours. *Brain*, v. 142, n. 4, p. 847–866, 2019. Disponível em: <https://academic.oup.com/brain/article/142/4/847/5420896>.

BOELL, V. K. Efeitos de anti-inflamatórios não-esteroidais em modelo de glioblastoma humano: modulação da agressividade tumoral e da expressão do gene RECK. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2022.

CHEN, Yun e TSENG, Sheng Hong. The potential of RECK inducers as antitumor agents for glioma. *Anticancer Research*, v. 32, n. 7, p. 2991–2998, 2012.

CHUA, Jason e NAFZIGER, Elizabeth e LEUNG, Denise. Evidence-Based Practice: Temozolomide Beyond Glioblastoma. *Current Oncology Reports*, v. 21, n. 4, 2019.

CORRÊA, Tatiana C.Silveira e colab. RECK-mediated inhibition of glioma migration and invasion. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 110, n. 1, p. 52–61, 2010.

DECORDOVA, S.; SHASTRI, A.; TSOLAKI, A. G.; et al. Molecular Heterogeneity and Immunosuppressive Microenvironment in Glioblastoma. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7379131/>.

FERLAY J, ERVIK M, LAM F, COLOMBET M, MERY L, PIÑEROS M, et al. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2020

GOMES, R. P. Mecanismos De Ação Citotóxicos Mediados Pela Combinação De Temozolomida E Sinvastatina Em Células De Glioma Humano. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná , 2018

HAI, L., ZHANG, C., LI, T. et al. Notch1 is a prognostic factor that is distinctly activated in the classical and proneural subtype of glioblastoma and that promotes glioma cell survival via the NF- $\kappa$ B(p65) pathway. *Cell Death Dis* 9, 158 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0119-z>

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* (2022) 12 (1): 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

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

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

INCA. O que é câncer? Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 16/04/2024.

KUMAR, V. et al. Robbins patologia básica. 10ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

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

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

LOUIS, D.N., PERRY, A., REIFENBERGER, G. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 131, 803–820 (2016). Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>>.

MURAGUCHI, T., TAKEGAMI, Y., OHTSUKA, T. et al. RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity. *Nat Neurosci* 10, 838–845 (2007). <https://doi.org/10.1038/nn1922>

NEFTEL, C.; LAFFY, J.; FILBIN, M. G.; et al. An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell*, 2019. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.024>>

PISANTI, S. et al. Novel prospects of statins as therapeutic agents in cancer. *Pharmacological Research*, v. 88, p. 84–98, 2014.

SCHREIBER R.D., OLD L.J., SMYTH M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331 (2011), pp. 1565-1570

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

STROBEL, H; BAISCH, T; FITZEL, R; et al. Temozolomide and Other Alkylating Agents in Glioblastoma Therapy. *Biomedicines*. 2019; 7(3):69. Disponível em: < <https://doi.org/10.3390/biomedicines7030069>>.

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

THURNHER, M.; NUSSBAUMER, O.; GRUENBACHER, G. Novel aspects of mevalonate pathway inhibitors as antitumor agents. *Clinical Cancer Research*, v. 18, n. 13, p. 3524–3531, 2012.

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

WEN P. Y.; WELLER ; LEE ; et al. Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. *Neuro-oncology* vol. 22, 2020: 1073-1113. Disponível em: <doi:10.1093/neuonc/noaa106>

WHO, 2020. Cancer. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>> Acesso em: 16/04/2024.

WU et al. Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance, *Pharmacological Research*, Volume 171, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105780>.

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