DANIEL ANTUNES MORENO

Estudo da expressão dos genes *DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MGMT* e efeitos da zebularina em glioblastoma

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de doutor em ciências.

Área de concentração Genética. Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone.

RIBEIRÃO PRETO 2012 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, dede que citada a fonte.

Catalogação da Publicação

Preparada pela Biblioteca do Serviço de Biblioteca e Documentação Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Moreno, Daniel Antunes.

Estudo da expressão dos genes das *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *MGMT* e efeitos da zebularina em glioblastoma / Daniel Antunes Moreno; orientador Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone. – Ribeirão Preto, 2012.

108 f.: il.

Tese (Doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética. Área de concentração: Oncologia.

Glioblastoma. 2. Zebularina. 3. DNMTs. 4. Temozolomida.
Radiação.

Nome: Daniel Antunes Moreno

Título: Estudo da expressão dos genes *DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MGMT* e efeitos da zebularina em glioblastoma.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de doutor em ciências.

Aprovado em:

Prof. Dr	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:
Prof. Dr	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:
Prof. Dr	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:
Prof. Dr	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:
Prof. Dr	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:

Banca Examinadora

Dedico Este Trabalho Especialmente

Aos meus pais Roberto e Matilde, ao meu irmão Douglas, às minhas irmãs Adriana e Sílvia, a minha família e a todos os meus amigos.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Luiz Gonzaga Tone pela sabedoria, pela paciência e pela confiança.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Scrideli pela colaboração e pelas sugestões importantes neste trabalho.

À Dra. Rosane de Paula Gomes Queiroz pela colaboração durante a realização deste trabalho.

À Bióloga e técnica do laboratório de biologia molecular Veridiana pela amizade, pela ajuda e colaboração.

À Professora Dra. Andréa Cecchi pela confiança e amizade.

À Dra. Maria Sol Brassesco Annichini pelos conselhos durante a realização deste trabalho.

À Dra. Vanessa Silveira pelo apoio pela amizade e pela ajuda durante o todo curso de doutorado.

Ao Msc Kleiton Silva Borges pela amizade, pelos conselhos e por todo apoio pessoal e profissional. Ao Msc Angel Maurício e à sua esposa Angela pela amizade, pelo companheirismo e colaboração.

Ao Biólogo Gustavo Alencastro Veiga Cruzeiro pela amizade, pelo companheirismo e pela força.

Ao Biólogo Augusto Faria pela amizade e pela ajuda.

A toda equipe de pós graduandos do laboratório: Guilherme, Jaqueline, Régia, Paola, Silvia, Fernanda, Andressa, Priscila, Julia e as estagiárias Pâmela, Mayara, Lara, Gabriela e Lenisa.

Aos membros da equipe de funcionários do laboratório de citogenética Lucimar, Malu, Sônia e Aidê pela ajuda, amizade e pela boa convivência.

Aos Professores Dr. Elvis Valera e Dra. Fabiana Valera.

Ao Prof. Dr. Harley Francisco de Oliveira por toda ajuda nos experimentos realizados neste trabalho

À secretária do Departamento Evelise pela ajuda concedida.

Às funcionárias do Departamento de Genética Susie, Silvia e Aparecida Helena pela paciência, pela disposição em ajudar sempre e por todo apoio durante o curso. Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado concedida.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA) pelo auxílio financeiro.

Ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e à Universidade de São Paulo (HC/FMRP-USP).

"O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes"

RESUMO

Moreno DA. Estudo da expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *MGMT* e efeitos da zebularina em glioblastoma (tese). Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2012. 108f.

Os gliomas são tumores que surgem a partir de células da glia e são considerados os mais comuns do sistema nervoso central. São subdivididos em quatro grupos: astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III) e glioblastoma (grau IV ou GBM). Entre esses, o GBM é o tumor mais agressivo e mais freqüente. Apesar de ser encontrado em qualquer faixa etária, esse tumor é raro em crianças. Atualmente a cirurgia seguida de radioterapia e quimioterapia com temozolomida (TMZ) tem sido utilizado como protocolo de tratamento padrão para a maioria dos pacientes e mesmo assim a sobrevida se mantem extremamente baixa. Além disso, grande parte dos pacientes não respondem ao tratamento com TMZ indicando a necessidade de agentes quimioterápicos alternativos. A zebularina (ZB) é um agente inibidor de DNA metiltransferases (iDNMTs) estável, pouco tóxico, que promove radiosensibilização e tem mostrado efeitos promissores em diversos tipos de neoplasias, entretanto pouco se sabe a respeito dos efeitos da ZB em glioblastoma. Os objetivos deste trabalho foram analisar a expressão dos genes DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MGMT em 5 amostras de substâncias brancas (SB), 6 linhagens de GBM e 33 amostras de gliomas (13 grau I, 2 grau II e 18 grau IV), correlacionar a expressão desses genes com os diferentes graus de gliomas e analisar os efeitos da ZB combinada ou não com TMZ em linhagens de GBM irradiadas e não irradiadas. Para análise da expressão gênica foi realizada a técnica de PCR em tempo Real. Os ensaios de proliferação celular, clonogênico, radiação e apoptose foram realizados em 3 linhagens de GBM (U251, SF188 e T98G) e uma de fibroblastos (MRC5). Também foi realizado o ensaio de proliferação celular em 5 culturas primárias de GBM tratadas com zebularina. Os genes DNMT3A e MGMT mostraram expressão maior nas amostras de SB comparando-se com gliomas e linhagens de GBM. O gene DNMT3B foi mais expresso nas linhagens de GBM comparando-se com as SB. O gene DNMT1 não mostrou diferenças significativas entre as amostras analisadas. Os ensaios de proliferação celular mostraram diminuição na proliferação com doses a partir de 50-100µM de ZB e de 250-500µM de TMZ nas linhagens e a partir de 50µM de ZB para as culturas primárias de GBM. As combinações de ZB com TMZ não mostraram sinergia na grande maioria das doses testadas. A ZB aumenta a apoptose nas 3 linhagens com doses a partir de 100µM. A ZB e TMZ mostraram diminuição na formação de colônias com as doses de 100µM e 10µM nas linhagens U251 e SF188 não irradiadas e irradiadas com 2, 4 e 6 Gy. A linhagem T98G expressa o gene *MGMT*, mostrou resistência a 10 μ M de TMZ e respondeu ao tratamento com 100 μ M de ZB. Também foi observado que 10 μ M de TMZ é mais citotóxico do que 100 μ M de ZB em fibroblastos não irradiados e irradiados (2Gy). Os resultados obtidos neste estudo mostram que a ZB pode representar um alvo terapêutico interessante para o estudo em glioblastoma.

Palavras Chave: Glioblastoma, Zebularina, DNA metil-transferases, Temozolomida, Radiação.

ABSTRACT

Study of *DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MGMT* gene expression and zebuarine effects in glioblastoma (tesis). Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2012.

Gliomas arise from glial cells and are the most common central nervous system tumors. They are divided in four groups: pilocytic astrocytoma (grade I), difuse astrocytoma (grade II), anaplastic astrocytoma (grade III) and glioblastoma (grade IV or GBM). GBM is the most frequent and aggressive glioma. This type of tumor can occur in any age but it's rare in children. Actually, surgery, radiotherapy and temozolomide (TMZ) adjuvant/concomitant chemotherapy has been the standard treatment protocol but the survival is extremely poor. In addition most patients do not respond to TMZ indicating the need for alternative chemotherapeutic agents. Zebularine (ZB) is a DNA metiltransferase inhibitor (DNMTi) stable, slight toxic that has been showed promise effects in cancer including radiosensitivity but little is known about ZB in glioblastoma. The objectives of this study were analyze DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MGMT gene expression profile in 5 samples of normal brain, 6 GBM cell lines and 33 glioma samples (13 grade I, 2 grade II e 18 grade IV), correlate with different gliomas grades and analyze the effects of ZB isolate and in combination with TMZ in irradiated and non irradiated GBM cell lines. Gene expression assays was made using Real Time PCR. Proliferation, clonogenic, radiation and apoptosis assays were realized in three GBM cell lines (U251, SF88, T98G) and one fibroblast cell line (MRC5). We also made proliferation assays in 5 primary cultures of samples of GMB. MGMT and DNMT3A genes showed higher expression in normal brain compared to gliomas and GBM cell lines. DNMT3B gene showed higher expression in GBM cell lines compared with normal brain and DNMT1 showed no significant differences among samples analyzed. We observed decrease of cell proliferation from 50-100µM of ZB and 250-500µM of TMZ on GBM cell lines and from 50µM of ZB for primary GBM samples. It was not observed synergy in the most combinations doses of ZB and TMZ (Calcusyn software). It was observed that 100µM of ZB and 10µM of TMZ decrease colony formation on U251 and SF188 cell lines non irradiated and irradiated with 2, 4, and 6Gy. T98G that express MGMT, did not respond to TMZ but showed response to ZB. It was also observed that 10µM of TMZ is more cytotoxic than 100µM of ZB in fibroblast cell line non irradiated and irradiated with 2Gy. ZB increase apoptosis from 100µM on the three GBM cell lines. Results obtained in this study can indicate that ZB may be an interestig therapeutic target for future studies in glioblastoma.

Key words: Glioblastoma, Zebularine, DNA metil-transferases, Temozolomide, Radiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organograma dos experimentos realizados para o estudo da expressão dos genes *DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MGMT* e efeitos da zebularina e temozolomida em linhagens de glioblastoma e fibroblastos humanos40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	. Significado	dos valores	s dos índice	es de comb	oinação (Cl) descritos
por Chou	Talahai					

Tabela 6. Soma das porcentagens de células apopóticas (marcadas comanexina V) e células necróticas (Iodeto de propídio) observadas nas linhagensde glioblastoma tratadas com 100, 200 e 300μM de ZB52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- A: Adenina **C:** Citosina cDNA: DNA complementar **CpG:** Citosina seguida de Guanina Ct: Cycle Threshold **DEPC:** Dietilpirocarbonato DM ou IC50: quantidade de droga necessária para diminuir a proliferação celular em 50% **DMSO:** Dimetilsulfito **DMSO:** Dimetilsulfóxido **DNA:** Ácido Desoxirribonucléico **DNMT:** DNA metiltransferase **DNMT:** DNA Metiltransferase dNTP: Desoxiribonucleotídeos Trifosfatos DRI: Indice de redução de dose **DRM:** Doença Residual Mínima **dUTP:** Desoxiuridina Trifosfato **EDTA:** Ácido Etilenodiaminatetracético **FA:** Fração afetada **G**: Guanina **GBM:** Glioblastoma **HDAC:** Histonas desacetilases
- IC: Índice de combinação

MGMT: O6-metilguanina-DNA metiltransferase

PBS: Tampão fosfato salina

PBS: Tampão fosfato-salina

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PI: Iodeto de propídio

RNA: Ácido Ribonucléico

RPM: rotações por minuto

RPM: Rotações por minuto

SNC: Sistema nervoso central

SNC: Sistema Nervoso Central

T: Timina

TMZ: Temozolamida

ZB: Zebularina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Glioblastoma	18
1.2 DNA metiltransferases (DNMTs) e câncer	22
1.3 Inibidores de DNA metiltransferases (iDNMTs)	24
2. OBJETIVOS	29
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	31
3.1 Amostras de gliomas e substâncias brancas	31
3.2 Linhagens e culturas primárias de glioblastoma	31
3.3 Preparação das drogas	32
3.4 Extração do RNA	32
3.5 Síntese de DNA complementar (cDNA)	33
3.6 PCR em tempo real	33
3.7 Tratamento da linhagem T98G com Zebularina para análise expressão dos genes DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e MGMT	da 34
3.8 Ensaios de proliferação celular e combinações de drogas	35
3.9 Ensaios de apoptose	37
3.10 Ensaios clonogênicos e irradiação	37
3.11 Análise estatística dos dados	39
3.12 Organograma experimental	39
4. RESULTADOS	42
4.1 Expressão dos genes <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>DNMT3B e MGMT</i> substâncias brancas, gliomas e linhagens de GBM	em 42

Innagem 1980 tratada com zebularina	4
4.3 Ensaios de proliferação celular nas linhagens de glioblastoma tratadas com ZB, TMZ e combinações de ZB+TMZ46	6
4.4 Ensaios de proliferação celular em culturas primárias de glioblastoma tratadas com zebularina	9
4.5 Ensaios de apoptose nas linhagens de glioblastoma tratadas com zebularina	1
4.6 Ensaios clonogênicos nas linhagens de glioblastoma tratadas com zebularina, temozolomida e irradiadas	3
4.7 Ensaio clonogênico e irradiação na linhagem MRC5 tratada com zebularina e temozolomida	4
5. DISCUSSÃO	7
5. DISCUSSÃO	7 1
5. DISCUSSÃO	7 4 6
5. DISCUSSÃO	7 4 6
5. DISCUSSÃO 5' 6. CONCLUSÕES 7' 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 7' 8. ANEXOS 8' 8.1 ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA 8'	7 4 6 5
5. DISCUSSÃO 5' 6. CONCLUSÕES 74 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 70 8. ANEXOS 80 8.1 ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA 80 8.2 ANEXO 2 – Artigo 81	7 4 6 5 7

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Glioblastoma

Os gliomas são os tumores que surgem a partir de células da glia e são considerados os tumores mais comuns do sistema nervoso central (SNC). De acordo com o tipo de célula que dá origem ao tumor os gliomas são classificados em ependimais, oligodendrogliais, tumores do plexo coróide e astrocíticos (Louis, et al., 2007; Ohgaki; Kleihues, 2007).

Gliomas astrocíticos originam-se a partir de astrócitos e são classificados conforme as características morfológicas e de proliferação celular observadas no tecido. Segundo a Organização Mundial de Saúde, são subdivididos em quatro grupos: astrocitoma pilocítico (glioma grau I), astrocitoma difuso (glioma grau II), astrocitoma anaplásico (glioma grau III) e glioblastoma (glioma grau IV ou glioblastoma multiforme - GBM). O glioma grau I é considerado benigno e geralmente curável com ressecção cirúrgica completa. Gliomas grau II e III são invasivos, podem progredir para lesões mais graves e apresentam prognóstico pior em relação aos glioma grau I (Holland, 2000; Louis et al., 2007; Ohgaki; Kleihues, 2007).

O glioma grau IV ou GBM é considerado o tumor mais agressivo e mais frequente do SNC representando cerca de 65% dos casos. Quando o GBM é diagnosticado primariamente ou surge *de novo*, é chamado de glioblastoma primário. Nos casos em que surge em decorrência da transformação de um tumor de baixo grau ou anaplásico, é chamando de glioblastoma secundário. Essa divisão não tem repercussão prática em relação ao tratamento e nem apresenta uma diferença histológica marcante. O Glioblastoma primário é o tipo mais prevalente e ocorre em mais de 80% dos casos (Bai; Staedtkea; Riggins, 2011; Brandes et al., 2008; Holland, 2000; Louis et al., 2007; Ohgaki; Kleihues, 2007). Apesar de ser encontrado em qualquer faixa etária, esse tumor manifestase principalmente em homens com mais de 40 anos sendo pouco frequente em crianças. O GBM geralmente é encontrado nos hemisférios cerebrais e devido ao seu crescimento rápido os sintomas mais freqüentes como dores de cabeça, convulsões, perda de memória e alterações de comportamento são em grande parte, decorrentes do aumento da pressão intracraniana (Brandes et al., 2008).

Determinadas característica do glioblastoma como ausência de delimitação anatômica, heterogeneidade celular e complexidade genética dificultam a intervenção terapêutica. (Grant et al., 2004; Kleihues; Ohgaki, 2000; Louis et al., 2007; Ohgaki; Kleihues, 2007; Stark et al., 2005).

Macroscopicamente o GBM apresenta regiões de necrose e hemorragia, microscopicamente apresenta regiões com necrose pseudopaliçadas, proliferação microvascular, núcleos e células pleomórficas (Holland, 2000; Ohgaki; Kleihues, 2007).

Genéticamente o GBM apresenta várias alterações em fatores importantes envolvidos no controle do ciclo celular como mutações no *P53*, no *PTEN*, perda de *RB*, perda do *INK4a-ARF*, amplificação de *CDK4*, mutações de ponto no receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) e o fator de crescimento derivado das plaquetas (*PDGFR*) que ativam vias de sinais de transdução. Além de toda essas alterações genéticas citadas é importante ressaltar que o glioblastoma também apresenta heterogeneidade genética intratumoral, ou seja, clones diferentes presentes dentro de uma mesma população celular (Holland, 2000; Ohgaki; Kleihues, 2007). Alguns estudos indicam que determinadas mutações nos genes *IDH1* e *IDH2* presentes em gliomas grau II e grau III e glioblastomas secundários, podem indicar a transformação de gliomas de baixo grau para alto grau e tambem podem auxiliar na distinção entre glioma grau I e glioma grau II além dos critérios histopatológicos (Yan et al., 2009).

O tratamento cirúrgico para este tipo de tumor é dificultado devido a sua topografia difusa e localização variável. O GBM apresenta ramificações distantes da área central do tumor devido ao comportamento invasivo das células neoplásicas. Em alguns casos extremos pode apresentar um tipo de comportamento conhecido como *gliomatosis cerebri* em que o tumor apresenta uma região central mínima ou ausente e o cérebro inteiro é difundido e infiltrado por células neoplásicas. Desta forma, mesmo com cirurgias recorrentes os pacientes normalmente vêm a óbito quando o tumor atinge regiões vitais do cérebro (Holland, 2000).

O tratamento padrão para o GBM manteve-se estável por muitos anos e consiste essencialmente na ressecão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia normalmente utilizada para inibir a replicação ou provocar danos no DNA (Chang et al., 2007; Holland, 2000).

Atualmente a cirurgia seguida de radioterapia e quimioterapia concomitante e adjuvante com temozolomida (TMZ) têm sido utilizado como protocolo de tratamento padrão para a maioria dos pacientes e mesmo assim a sobrevida média se mantém muito baixa (de 12 a 15 meses) (Minniti et al., 2009; Stupp et al., 2005) e a sobrevida em 5 anos é de apenas 10% (Bai; Staedtkea; Riggins, 2011).

A radioterapia pós ressecssão têm mostrado aumento na sobrevida dos pacientes com doses de 5000-6000cGy, entretanto doses acima de 6000cGy resultam em aumento da toxicidade sem maiores benefícios em relação a sobrevida (Chang et al., 2007).

Todas essas dificuldades relativas a terapia para pacientes portadores de GBM indicam a necessidade de novas estratégias de tratamento como combinações de drogas e terapias direcionadas de acordo com as características moleculares e perfil genômico dos pacientes (Yan; Zhang; Jiang, 2011).

Um bom exemplo de como uma característica molecular do paciente pode influenciar o tratamento do GBM é o estado de metilação do *O6-methylguanine–DNA methyltransferase (MGMT)*. Sabe-se que o silenciamento epigenético resultante da metilação da região promtora do gene *MGMT* esta

associado a sobrevida maior de pacientes portadores de GBM tratados com TMZ (Regi et al., 2005).

O gene *MGMT* está localizado no cromossomo 10q26 e codifica uma proteína de reparo no DNA que remove grupos alquil da posição O6 da guanina, que é um sítio importante de alquilação do DNA. Quando a região promotora do *MGMT* encontra-se metilada esse gene é silenciado e as células neoplásicas sofrem os efeitos provocados pela TMZ. Por outro lado, pacientes com altos níveis de expressão do *MGMT* são resistentes ao tratamento com TMZ (Regi et al., 2005).

Aproximadamente metade dos pacientes portadores de GBM apresentam a região promotora do *MGMT* desmetilada e expressam esse fator. Neste grupo de pacietes não há diferenças significativas entre os grupos tratados com TMZ e radioterapia e pacientes submetidos somente a radioterapia (Everhard et al., 2009 ; Kitange et al., 2009; Regi et al., 2005).

Esses dados mostram a necessidade de terapias alternativas para o grupo de pacientes que tem expressão aumentada do *MGMT* e que consequentemente não respondem ao tratamento com TMZ. Nesses casos a utilização de uma droga alternativa que sensibilize as células de glioblastoma para a radioterapia por um mecanismo diferente da alquilação do DNA pode ser uma estratégia interessante.

Nos últimos anos vários estudos tem mostrado que drogas epigenéticas como inibidores de DNMTs promovem radiosensibilização (De Schutter; Nuytz, 2009; Meador et al., 2010) e outros efeitos promissores na terapia contra o câncer (Cang et al., 2010; Cortez; Jones, 2008; Kelly; De Carvalho; Jones, 2010; Yoo; Jones, 2006).

1.2 DNA metiltransferases (DNMTs) e câncer

Sabe-se que além de mecanismos genéticos, o processo de carcinogênese depende também de alterações em mecanismos epigenéticos responsáveis pela manutenção do perfil de expressão gênica nos diversos tipos celulares. Mecanismos epigenéticos são essenciais para processos de diferenciação e memória celular e podem ser influenciados por mudanças no microambiente celular (Ducasse; Brown, 2006; Esteller, 2006; Gallinari et al., 2007).

O termo epigenética refere-se a mecanismos herdáveis e potencialmente reversíveis que provocam alterações na expressão gênica sem que ocorram modificações na seqüência do DNA (Galm; Herman; Baylin, 2006; Lu et al., 2006; Weinhold, 2006). De modo geral, os principais mecanismos epigenéticos são representados basicamente pela metilação do DNA e pelas modificações das proteínas histonas (Bernstein; Meissner; Lander, 2007; Ducasse; Brown, 2006; Lu et al., 2006; Ropero; Esteller, 2007).

A metilação do DNA consiste na adição do radical metil (CH³) no carbono 5 do anel pirimídico da base citosina (C) seguida da base guanina (G) em pontos conhecidos como dinucleotídeos CpG (Bernstein; Meissner; Lander, 2007; Kurkjian; Kummar; Murgo, 2008). Esse processo é catalisado por um grupo de enzimas denominadas DNA metilases ou DNA metiltransferases (DNMTs) e está associado a compactação da cromatina e silenciamento gênico (Jones; Baylin, 2002; Kurkjian; Kummar; Murgo, 2008). As principais enzimas envolvidas neste processo são: DNMT1, DNMT3A e DNMT3B. A DNMT1 é a responsável pela manutenção do padrão de metilação durante a replicação do DNA. A DNMT3A e a DNMT3B atuam nas metilações novas, adicionando grupos metil em regiões não metiladas do DNA (Kurkjian; Kummar; Murgo, 2008).

A DNMT1 é considerada uma metiltransferase de manutenção porque se localiza próxima a *loci* de replicação e apresenta uma afinidade maior (de 7 a 21 vezes) por substratos hemimetilados comparando-se com substratos não metilados (Jeltsch et al., 2006), entretanto alguns estudos indicam que a DNMT1 também pode atuar estabelecendo metilações novas no DNA (Jair et al., 2006).

A DNMT3A e DNMT3B são essenciais para o desenvolvimento embrionário e apresentam afinidades a substratos não metilados formando novos padrões específicos de metilação em uma fita de DNA sem a necessidade de qualquer modelo (Tang et al., 2009)

A metilação do DNA resulta no recrutamento de proteínas que restringem o acesso da maquinaria envolvida na transcrição gênica impedindo a realização desse processo (Ducasse; Brown, 2006; Feinberg; Tycko, 2004). Sabe-se que mutações e expressão alterada das DNMTs podem alterar o padrão normal de metilação do DNA (Robertson, 2001; Fanelli et al., 2008).

Por um lado, a expressão reduzida de DNMTs pode resultar em hipometilação global que está associada com instabilidade genética que é uma característica comum de células neoplásicas (Kurkjian; Kummar; Murgo, 2008). Por outro lado a expressão aumentada das DNMTs no câncer pode cooperar para o silenciamento epigenético de genes supressores tumorais (Rhee et al., 2002).

Estima-se que mais de 80% dos dinucleotídeos CpG encontram-se metilados no genoma dos mamíferos entretanto, determinadas regiões ricas em dinucleotídeos CpG conhecidas como "ilhas CpG", na maioria das vezes não estão metiladas. Essas regiões geralmente apresentam mais de 500 pares de base com a maioria dos nucleotídeos contendo as bases nitrogenadas C e G. As ilhas CpG estão localizadas próximas à regiões promotoras de aproximadamente metade dos genes no genoma e quando são metiladas, a transcrição é impedida (Galm; Herman; Baylin, 2006; Jones; Baylin, 2002).

Uma característica comum das neoplasias é a hipometilação global do DNA, principalmente de regiões intergênicas provocando instabilidade genômica, e a hipermetilação da região promotora de genes específicos (Yoo; Jones, 2006; Kelly; De Carvalho; Jones, 2010).

Muitos genes supressores de tumor como o *P53*, *PTEN*, *P14*^{ARF}, *RASSF1A*, *P16*, *P73 e PRB* encontram-se metilados em gliomas. Essa metilação resulta em silenciamento gênico e descontrole de várias vias de sinalização (Rajendran et al., 2011).

Em muitos casos o silenciamento epigenético de genes de reparo do DNA pode predispor a eventos mutacionais durante a progressão do câncer. O gene de reparo *MLH1* encontra se frequentemente hipermetilado em tumores que apresentam instabilidade de regiões microssatélite (Herman; Baylin, 2003).

O gene de reparo *MGMT* também é silenciado por hipermetilação em tumores como o de cólon, pulmão, entre outros (Esteller et al., 2001; Esteller et al., 2009). O estudo da metilação pode ser muito útil para o diagnóstico precoce e para definição do tratamento de vários tipos de tumores. O perfil de metilação permite distinguir entre tipos e subtipos de tumores e pode auxiliar na escolha do agente quimioterápico para o tratamento. A metilação do gene de reparo *MGMT*, por exemplo, aumenta a sensibilidade dos gliomas ao tratamento com agentes alquilantes (Kelly; De Carvalho; Jones, 2010; Esteller et al., 2000).

1.3 Inibidores de DNA metiltransferases (iDNMTs)

O silenciamento de determinados genes provocados pela metilação anormal de suas regiões promotoras é uma característica observada com frequência em diversos tipos de neoplasias. Esse silenciamento aberrante pode contribuir de forma significativa para o desenvolvimento e progressão de neoplasias, principalmente quando envolve genes supressores de tumor, genes de reparo do DNA, apoptose, invasão, metástase e outros genes envolvidos no controle do ciclo celular (Brown et al., 2009; Yoo; Cheng; Jones, 2004).

Recentemente também tem sido descritas diversas alterações epigenéticas associadas a patologia molecular do GBM como alterações no padrão de

metilação do DNA e de modificações de histonas (Nagarajan; Costello, 2009a; Nagarajan; Costello, 2009b; Natsume et al., 2010).

A hipometilação global ocorre com freqüência muito alta (~80%) em GBMs primários e quanto maior o grau de hipometilação maior a capacidade de proliferação do tumor. Os níveis de metilação observadas em GBM variam de 50% a níveis próximos ao encontrado em cérebros normais refletindo a desmetilação de aproximadamente 10 milhões de sítios CpG por célula tumoral (Cadieux et al., 2006).Acredita-se que muitas vezes essa hipometilação pode ser provocada por expressão diminuída das DNMTs (Nagarajan; Costello, 2009a).

GBMs com altos graus de hipometilação também apresentam hipometilação (de 22 a 50% do cérebro normal) do gene *STAT2* (satélite 2 repetitivo em tandem) e de outros fatores associados a sequências repetitivas predispondo á quebras cromossômicas e alterações no número de cópias (Nagarajan, Costello, 2009a).

Outra alteração epigenética frequente em GBM é a hipermetilação lócus específica de ilhas CpG localizadas em regiões promotoras de genes que desempenham diversas funções relacionadas ao desenvolvimento e progressão tumoral incluindo fatores associados a regulação do ciclo celular (*CDKN2/p16*, *RB*, *PTEN*, *TP53* and *p14*^{*ARF*}) proliferação (*PDGF-B*), reparo do DNA (*MGMT*), apoptose, angiogênese, invasão (*PCDH-gamma-A11*) e sensibilidade a drogas e radioterapia (*SOCS1*) (Nagarajan, Costello, 2009a).

O P16 é um fator que atua no controle do ciclo celular inativando CDKs (quinases dependentes de ciclinas). Estima-se que aproximadamete 74% dos GBMs apresentam níveis reduzidos da proteína P16 e que desses, 76,5% apresentam região promotora do gene *P16* hipermetilada (Burgess; Jenkin; Zhang, 2008).

Outro gene que apresenta região promotora frequentemente metilada em GBM (43%) é o *TSC1/ASC* que está envolvido no controle da apoptose, ativação do NF-kB e maturação de citocinas. O gene da proteína epitelial de membrana 3

(*EMP3*) também encontra-se frequentemnte alterado em GBM. A metilação do *EMP3* parece ser um evento precoce em astrocitomas, sendo observada em 80% dos astrocitomas difuso, anaplásicos e GBMs secundários, e apenas em 17% dos GBMs primários. Consequentemente a metilação do *EMP3* pode ser utilizado como marcador para a distinção entre glioblastoma primário e secundário (Burgess; Jenkin; Zhang, 2008).

Diferente das alterações genéticas observadas no câncer, alterações epigenéticas como hipermetilação do DNA podem ser revertidas pela ação de fármacos que inibem esse processo. Os agentes desmetilantes agem através da inibição das DNMTs, sendo que em neoplasia hematológicas essas drogas têm sido utilizadas com sucesso (Esteller, 2005; Yoo; Jones, 2006; Kelly; De Carvalho; Jones, 2010).

Nos últimos anos têm sido desenvolvidos diversos agentes inibidores da metilação do DNA como o Decitabina (5-Aza-2-desoxicitidina) e Azacitidina (5-azacitidina) que já estão sendo utilizados em triagens clínicas e terapia de leucemias agudas e síndrome mielodisplásica (SMD) (Yoo; Cheng; Jones, 2004; Cang et al., 2010).

Estudos internacionais randomizados de fase III mostraram que a Azacitidina mostrou eficiência no tratamento aumentando a sobrevida de pacientes portadores de SMD (Fenaux et al, 2009). Sabe-se também que essa droga tem mostrado bons resultados combinada com inibidores de histona desacetilases (iHDACs) em SDM e leucemia mielóide crônica (Cang et al., 2010).

Além de SMD e leucemias agudas, a Decitabina tem sido testada em triagens clinicas de fase I isoladamente ou em combinação com iHDACs em pacientes portadores tumores toráxicos (pulmão, esôfago e plêura), tumores sólidos e melanoma renal (Cang et al., 2010). Embora mostrem resultados promissores em diversos tipos de neoplasias essas drogas são consideradas agentes relativamente instáveis e tóxicos (Yoo, Cheng, Jones, 2004).

A zebularina (ZB) é um agente inibidor da metilação do DNA e que apresenta propriedades interessantes para um agente terapêutico. É considerado um agente desmetilante muito efetivo e promissor, podendo vir a ser administrado oralmente devido à suas propriedades farmacêuticas que incluem grande estabilidade química em solução aquosa e baixa citotoxicidade observadas durante experimentos *in vitro* (Cheng et al., 2003; Cheng et al., 2004; Cang et al., 2010).

Essa droga é um análogo de citidina que se incorpora nas fitas de DNA recém-sintetizadas, captura as DNMTs formando ligações covalentes inibindo o mecanismo de metilação (Zhou et al., 2002). Durante esse processo a ZB é fosforilada e incorporada no DNA e esse processo é mediado por uridino citosino quinases (UCKs) (Ben-Kasus et al., 2005).

Sabe-se que a ZB inibe a proliferação celular, atrasa o ciclo em G2/M e induz apoptose *in vitro* mostrando ser um potencial agente terapêutico contra o câncer, isoladamente ou em combinação com outras drogas epigenéticas como a Decitabina e iHDACs (Scott et al., 2007). Sabe-se também que células neoplásicas apresentam uma capacidade maior de incorporar a ZB comparando-se com células normais, mostrando também ser um agente seletivo (Cheng et al., 2004).

Outros estudos tem mostrado que a ZB promove radiosensibilização em linhagens celulares de glioblastoma indicando que essa droga apresente também potencial para a quimioterapia adjuvante a radioterapia (Dote et al., 2005; Meador et al., 2010).

Com o aumento do conhecimento sobre a importância das alterações epigenéticas e sobre o papel das DNMTs no desenvolvimento do câncer, o interesse nos iDNMTs vem aumentando. Vários estudos relatam a habilidade dessas drogas contra neoplasias, mas pouco se sabe a respeito dos efeitos dessas drogas em GBM (Ducasse; Brouw, 2006; Kurkjian; Kummar; Murgo, 2010; Yoo; Jones, 2006).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Analisar a expressão dos genes *DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MGMT* em amostras de gliomas, correlacionar a expressão desses genes com os diferentes graus de gliomas, analisar os efeitos da zebularina combinada ou não com temozolomida em linhagens celulares irradiadas e não irradiadas de glioblastoma e fibroblastos.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Amostras de gliomas e substâncias brancas

Neste estudo foram utilizadas 33 amostras consecutivas e microdissecadas de gliomas. Dessas amostras, 13 foram provenientes de pacientes portadores de glioma grau I, 2 de glioma grau II e 18 de GBM. Também foram analisadas 5 amostras de substância branca extraídas de cirurgias de epilepsia. Todas as amostras utilizadas neste estudo foram coletadas no centro cirúrgico do Hostpital da Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC/FMRP USP) aprovadas para o estudo pelo comitê de ética em pesquisa de acordo com o Processo HCRP n 8607/2009 (oficio n 4111/2009 CEP/MGV).

3.2 Linhagens e culturas primárias de glioblastoma

Foram inclusas também neste estudo 6 linhagens de GBM e uma linhagem de fibroblastos humanos (MRC5). As T98G, U251, U343, U87 e MRC5 foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC, VA, EUA), as linhagens LN319 e SF188 (glioblastoma pediátrico) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Frank Furnari (Ludwig Institute for Cancer Research, La Jolla, CA, EUA) e Dr Michael S. Bobola (Department of Neurological Surgery, University of Washington, Seattle, WA), respectivamente.

As culturas primárias derivadas de biópsias de pacientes portadores de GBM foram mantidas por poucas passagens nas condições padronizadas para cultura de células no laboratório de Pediatria do HC/FMRP/USP (Brassesco et al., 2009).

Para a realização dos ensaios funcionais, 5 culturas primárias, 3 linhagens de GBM (U251, SF188 e T98G) e uma linhagem de fibroblastos (MRC5) foram mantidas em meio HAM F10 (Gibco BRL, Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100g/mL penicilina e 100 μ g/mL estreptomicina (Sigma® Chemical Co., St. Louis, MO, USA), em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C.

3.3 Preparação das drogas

A Zebularina (Tocris Bioscience, USA) e a temozolomida (Sigma-Aldrich, USA) foram diluídas em DMSO e estocadas a -20°C. Foram feitas soluções estoques de 100mM de Zebulariana e de 200mM de temozolomida.

As drogas foram adicionadas em meio de cultura HAM e homogeneizadas antes de serem aplicadas nas culturas. Neste estudo foi utilizada quantidade máxima de DMSO de 0,8% nos experimentos. Todos os controles foram normalizados adicionando-se a mesma quantidade de DMSO utilizada nas culturas tratadas.

3.4 Extração do RNA

Os procedimentos para extração do RNA foram realizados de acordo com o protocolo do laboratório de Pediatria do HC/FMRP-USP. Para 50-100mg de tecido foi acrescentado 1000µl de *TRIZOL Reagent*®, esse material foi homogeneizado e deixado à temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente foram acrescentados 200µL de clorofórmio, o material foi agitado lentamente por 15 segundos e centrifugado a 13.200 RMP por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa superior foi coletada e transferida para novos tubos devidamente identificados. O RNA foi precipitado com 500µL de álcool isopropílico 100% mantido à –20°C por pelo menos 12 horas.

Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 13.200 RPM por 20 minutos a 4°C desprezando-se em seguida o sobrenadante. Acrescentou-se 1.000µL de etanol 75% seguido novamente de centrifugação refrigerada a 4°C por 5 minutos a 13.200 RPM. Desprezou-se a fase superior e o *pellet* foi dissolvido em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) por pelo menos 15 minutos. Em seguida, foi aliquotado, identificado e armazenado a -80° C.

3.5 Síntese de DNA complementar (cDNA)

O RNA extraído das amostras foi quantificado em um espectrofotômetro (NanoDrop 2000 – Thermo Scientific) e a síntese do cDNA foi realizada com a utilização do Kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit - Applied Biosystems*® a partir de 1µg de RNA.

Para cada reação de transcrição reversa com volume final de 25µl, foram utilizados 2,5µL de *buffer*, 1µL de dNTP, 2,5µL de *Random Primers*, 1,25µL de *multiscribe*, 0,63µL de *RNAse OUT* e 17,12µL de solução contendo 1µg de RNA diluído em água tratada com DEPC. Os reagentes e o RNA foram submetidos ao termociclador onde foram realizados os ciclos de PCR a 25°C por 10 minutos e 37°C por 120 minutos e finalmente as amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C.

3.6 PCR em tempo real

A análise da expressão relativa dos genes *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *MGMT* foi realizada utilizando-se a técnica de PCR em tempo real (método *TaqMan*) no aparelho 7500 *Real-Time PCR System*® (*Applied Biosystems*) disponível no Laboratório de Pediatria do HC/FMRP-USP. Os genes de referência utilizados neste estudo foram o *TBP* (TATA box binding protein) e o *HPRT* (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase) que são indicados por apresentam baixa variabilidade de expressão em glioblastoma (Valente et al, 2009). A linhagem U343 foi utilizada como calibrador das reações para a análise da expressão gênica das *DNMTs* e a linhagem T98G para analise da expressão do *MGMT*.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata, sendo desconsiderados os experimentos que apresentaram desvio padrão maior do que 0,5 mesmo após repetição. Em todas as placas foram realizados controles negativos das reações para todos os genes estudados e foram desconsideradas as reações que apresentaram qualquer sinal de amplificação para esses controles. As sondas TaqMan utilizadas foram: *DNMT1* (Hs00154749_m1), *DNMT3A* (Hs01027166_m1), *DNMT3B* (Hs00171876_m1), *MGMT* (Hs01037698_m1), *TBP* (4310891E) *e HPRT* (4326321E) - *Applied Biosystems*®.

Todos os procedimentos relativos à análise de expressão gênica foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, excetuando o volume final de cada reação que foi otimizado em 12 μ L. Para cada reação foram utilizados 6,0 μ L de TaqMan PCR Master Mix, 0,6 μ L de sonda TaqMan e 5,4 μ L de cDNA (diluído 1:50) por poço em placas de polipropileno para 96 reações (*ultraAmp 96-well Semi-Skirt PCR plates, Sorenson BioScience*, EUA) cobertas com adesivos ópticos (*Adhesive PCR film, ABgene*). Esses procedimentos descritos foram realizados com as amostras imersas em gelo e com pouca exposição à luz.

Os valores da expressão relativa dos genes foram calculados pelo método 2^{-DDCT} (Livak; Schmittgen, 2001) e a análise estatística dos dados foi realizada com o programa SPSS17.0 utilizando-se o teste de Mann-Whitney.

3.7 Tratamento da linhagem T98G com Zebularina para análise da expressão dos genes DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e MGMT

Esse ensaio teve como objetivo avaliar se o tratamento com ZB provoca alterações na expressão dos gene das *DNMTs e MGMT*. A linhagem de GBM T98G foi escolhida por ser a única a expressar o *MGMT*.

Para a realização desse ensaio foram adicionadas 150.000 células da linhagem T98G em 3ml meio HAM em cada poço em placas de 6 poços. O meio foi retirado 24 horas depois adicionado 3ml de meio contendo 100, 200 e 300µM de ZB. As culturas foram mantidas por 72horas. Posteriormente foi feita a extração do RNA, síntese de cDNA para análise da expressão gênica.

3.8 Ensaios de proliferação celular e combinações de drogas

Os ensaios de proliferação celular foram realizados em triplicata em pelo menos três tempos diferentes nas linhagens U251, SF188 e T98G tratadas por 72 horas com ZB, TMZ e combinações de ZB com TMZ utilizando-se o kit XTT (Sigma Aldrich, USA). Após a contagem das células na câmara de Neubauer, foram adicionadas 3000 células em 100µl de meio HAM em cada poço em placas de 96 poços. Inicialmente foram realizados ensaios preliminares para a determinação das doses e tempo de exposição das drogas. Após a determinação desses parâmetros, as células foram tratadas com 50, 100, 200, 400µM de ZB e 250, 500, 1000, 2000µM de TMZ diluídas em DMSO. As células foram tratadas 24hs após o plaqueamento e a leitura das placas 72hs após o tratamento.

As culturas primárias foram submetidas ao tratamento com ZB (50, 100, 200, 400 e 800µM) 24hs após o plaqueamento e mantidas por 72hs. Inicialmente foram selecionadas 10 culturas primárias, entretanto 5 destas não apresentaram crescimento apropriado e foram excluídas do estudo. Alem disso, os experimentos com as culturas primárias foram realizados em triplicata em apenas um momento devido a dificuldades de crescimento das culturas e obtenção de células.

Os dados obtidos nos experimentos de proliferação celular nas linhagens de glioblastoma tratadas com ZB, TMZ e combinações de ZB+TMZ foram analisados utilizando-se o programa Calcusyn® desenvolvido para a análise de combinações de drogas e que fornece seguintes dados para a análise dos resultados (Chou, 2008)..

O DM (dose média) ou IC50 que refere-se a concentração da droga necessária para diminuir a proliferação celular em 50%. Quando as doses experimentais não atingem 50% da proliferação, o programa simula o valor de DM baseado na curva dose efeito ou dose e fração afetada (FA). Esse dado nos permite realizar comparações entre os efeitos de determinadas drogas em
diferentes tipos de células ou de várias drogas em um determinado tipo celular. O DRI (índice de redução de dose) indica a proporção da redução da dose de uma determinada droga em uma combinação sinérgica que proporciona o mesmo efeito comparando-se com a dose da droga isolada (Chou, 2008).

O índice de combinação (CI) indica o tipo de efeito resultante de uma combinação de drogas. Se as duas drogas apresentam efeitos isoladamente, em combinação elas podem produzir efeito aditivo, sinérgico ou antagônico. Se o CI for < que 1 o efeito é sinérgico, se CI=1 aditivo ou se CI>1 o efeito é antagônico. Sinergismo representa um efeito maior do que aditivo e antagonismo e um efeito menor do que aditivo (CHOU, 2008).

Para a melhor interpretação dos valores de CI obtidos nos experimentos de combinação baseado no método descrito por Chou Talahai, a Tabela 1 descreve de forma graduada o significado prático dos valores de CI (Chou, 2006).

Variação do Índice de Combinação	Descrição
<0.1	Sinergismo muito forte
0.1–0.3	Sinergismo forte
0.3–0.7	Sinergismo
0.7–0.85	Sinergismo moderado
0.85-0.90	Sinergismo fraco
0.90-1.10	Próximo a efeito aditivo
1.10-1.20	Antagonismo fraco
1.20-1.45	Antagonismo moderado
1.45-3.3	Antagonismo
3.3–10	Forte antagonismo
>10	Antagonismo muito forte

Tabela1. Significado dos valores dos índices de combinação (CI) descritos por Chou Talahai.

Adaptado (Chou, 2006).

As doses de ZB e TMZ escolhidas para os experimentos de combinação foram baseadas nas recomendações descritas por Chou (2008) e de modo que não ultrapassassem a concentração máxima de DMSO adotada para esse trabalho (0,08%).

3.9 Ensaios de apoptose

O ensaio de apoptose foi realizado em triplicata em dois tempos diferentes através da marcação de células apoptóticas com Anexina V - Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Biosciences Pharmigen, USA) e células necróticas com iodeto de propídio. Anexina V é uma molécula que apresenta alta afinidade pela fosfatidilserina, se ligando a esta especificamente. A fosfatidilserina é um fosfolipídio presente na face interna da membrana das células. Sua externalização ocorre durante o processo de apoptose e serve como um sinal para as células serem removidas. A marcação positiva com iodeto de propídio indica que as células perderam a integridade da membrana. Após o tratamento, 1x10⁵ células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1000 rpm por 5 min a 4°C, lavadas com PBS gelado e depois ressuspendidas em 300uL de tampão de ligação 1X (BD Biosciences Pharmigen, USA). As células foram então coradas com 5µL de anexina e 50µL de uma solução de iodeto de propídio (PI) e incubadas protegidas da luz em temperatura ambiente. As células foram analisadas com um citômetro de fluxo BD FACSCaliburTM (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

3.10 Ensaios clonogênicos e irradiação

Os ensaios clonogênicos nas linhagens de GBM (U251, SF188 e T98G) e de fibroblastos (MRC5) tratadas com zebularina, temozolomida e submetidas à

irradiação (2, 4 e 6Gy) foram realizados em triplicata em pelo menos dois tempos diferentes.

Inicialmente foram realizados ensaios clonogênicos nas 3 linhagens de glioblastoma não irradiadas com doses de 100 a 300µM de ZB e 5 a 500µM de TMZ para a determinação das doses que seriam utilizadas nos experimentos com radiação. As doses de 100µM e 10µM de ZB e TMZ respectivamente foram escolhidas para os experimentos com radiação por serem as menores doses que mostraram diferenças significativas em relação ao controle em experimentos sem radiação, exceto para a linhagem T98G que foi mais resistente ao tratamento com TMZ.

Para o a realização desses experimentos foram utilizadas placas de 12 poços onde foram adicionados 1ml de meio HAM contendo 300 células por poço. Após 24h foram realizados os tratamentos com ZB (100 μ M), TMZ (10 μ M) e as culturas foram incubadas por 48hs em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. Ao término deste período, as células foram irradiadas com raios- γ provenientes da fonte de ⁶⁰Co, a uma taxa de dose de 3,20 Gy/min., usando-se o equipamento Gammatron S-80 (Siemens Medical Systems Inc., South Iselin, USA), do Setor de Radioterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Harley Francisco de Oliveira.

No experimento de irradiação as placas de cultura foram depositadas sobre uma placa de acrílico de 4mm, em campo com tamanho compatível com o número de placas a serem irradiadas. Os feixes de raios-γ foram emitidos por baixo das placas e direcionados para a placa de acrílico. O tempo de emissão foi calculado de acordo com a dose a ser utilizada, sendo sempre considerado o decaimento do radioisótopo. Posteriormente à irradiação, o material foi imediatamente transportado para o laboratório, o meio de cultura removido, as células lavadas com PBS e adicionado meio de cultivo sem drogas. As culturas foram incubadas em estufa a 37°C por 7 dias para posterior contagem das colônias. Para a visualização das colônias o meio de cultura foi retirado, as células lavadas com PBS, fixadas com metanol por 15 minutos, e coradas com Giemsa. As colônias foram contadas com microscópio estereoscópico (40x), sendo consideradas somente aquelas que apresentaram pelo menos 50 células.

3.11 Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados foi realizada com auxílio do programa SPSS 17.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) considerando os resultados significativos para todos os ensaios para valores de p<0.05.

Para os ensaios funcionais de proliferação celular, ensaio clonogênico e apoptose, foi utilizado o teste Anova One Way e pós-teste de Bonferroni. Para a análise da comparação da expressão gênica nas diferentes amostras estudadas foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

3.12 Organograma experimental

Os experimentos realizados neste estudo foram feitos em duas etapas. Na primeira etapa foram realizados os experimentos de expressão dos genes das *DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MGMT* e nas amostras de pacientes portadores de gliomas, substâncias brancas e linhagens de GBM não tratadas e tratadas com ZB.

Na segunda etapa foram realizados os ensaios funcionais nas linhagens de GBM, nas culturas primárias de GBM e na linhagem de fibroblastos MRC5.

O organograma representado pela figura 1 mostra o esquema de como foram realizados os experimentos deste trabalho. Os resultados deste trabalho serão apresentados de acordo com os itens 4.1 a 4.7 descritos no organograma da figura 1.



Figura 1. Organograma dos experimentos realizados para o estudo da expressão dos genes das *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *MGMT* e dos efeitos da Zebularina (ZB) e Temozolomida (TMZ) em glioblastoma e fibroblastos humanos. Os itens representados pelos números 4.1 a 4.7 serão apresentados nos resultados deste estudo.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B e MGMT* em substâncias brancas, gliomas e linhagens de GBM

Os dados mostrados na Tabela 2 representam a estatística descritiva (média, mediana, mínimo, máximo e erro padrão) gerada pelo programa SPSS 17.0 dos valores da expressão relativa dos genes *DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e MGMT* obtidos pelos experimentos de PCR em tempo real. Foram inclusas nesta análise 5 amostras de substância branca, 18 de GBM, 13 de glioma grau I, 2 de glioma grau II e 6 linhagens de GBM.

Tabela - 2 Estatística descritiva da análise da expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B e MGMT* em substâncias brancas, gliomas e linhagens celulares de glioblastoma.

		Substâncias bra	ncas (n=5)	Glioma gra	Glioma grau I (n=13) Glioma grau II (n=2) Glioblastoma (n=18			a (n=18)	Linhagens de GBM (n=6)		
		Estatística	EP	Estatística	EP	Estatística	EP	Estatística	EP	Estatística	EP
DNMT1	Média	0.583	0.083	0.748	0.221	0.319	0.091	0.650	0.137	0.778	0.122
	Mediana	0.505		0.445		0.319		0.467		0.857	
	Mínimo	0.489		0.294		0.227		0.085		0.358	
	Máximo	0.833		2.786		0.410		2.502		1.195	
DNMT3A	Média	6.266	1.603	3.695	0.556	4.315	0.144	3.165	0.436	0.866	0.157
	Mediana	5.480		3.550		4.315		2.773		1.000	
	Mínimo	3.696		1.473		4.170		0.633		0.129	
	Máximo	10.407		7.177		4.459		7.285		1.407	
DNMT3B	Média	0.766	0.387	1.938	0.503	0.869	0.367	1.733	0.360	3.426	1.176
	Mediana	0.620		1.836		0.869		1.463		1.690	
	Mínimo	0.000		0.188		0.502		0.184		0.824	
	Máximo	1.825		6.133		1.236		5.124		8.275	
MGMT	Média	3.527	0.882	2.804	0.743	1.013	0.908	0.741	0.117	0.143	0.143
	Mediana	3.206		1.621		1.013		0.728		0.000	
	Mínimo	1.797		0.173		0.105		0.079		0.000	
	Máximo	5.898		7.697		1.920		1.822		1.000	

EP: Erro Padrão

A Figura 2 apresenta os gráficos A, B, C e D que indicam as medianas e desvios padrões dos valores da expressão relativa dos genes *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B e MGMT* respectivamente, nas amostras de substância branca, glioma grau I, grau II, GBM e linhagens celulares de GBM.



Figura 2. Mediana dos valores de expressão dos genes DNMT1(A), DNMT3A (B), DNMT3B(C) e MGMT (D) nas amostras de substância branca, gliomas grau I, II, IV e linhagens de glioblastoma. *Diferença significativa (p<0,05) em relação às substâncias brancas.

O gene *DNMT1* não mostrou nenhuma diferença significativa entre as amostras analisadas (p<0.05) (Figura2A). O gene *DNMT3A* mostrou expressão maior nas amostras de substância branca comparando-se com as amostras de glioma grau I (p=0.028), GBM (p=0,009) e linhagens analisadas (p=0,003). Também foi observada expressão relativa maior do gene *DNMT3A* nas amostras de glioma grau I (p=0,001), II (p=0,040) e IV (p=0,001) comparando-se com as linhagens de GBM (Figura2B). O gene *DNMT3B* foi mais expressa nas linhagens de GBM comparando-se com as substâncias brancas analisadas (p=0,042) (Figura2C).

A expressão do gene *MGMT* foi significativamente maior nas substâncias brancas comparando-se com linhagens (p=0,002) e amostras de GBM(p=0,001); maior em grau I comparando-se com linhagens (p=0,001) e amostras de GBM (p=0,001); maior nas amostras de glioma grau II do que nas linhagens (p=0,037) e maior em GBM comparando-se com as linhagens (p=0,002). A tabela 3 mostra os valores de significância estatística resultantes das comparações realizadas utilizando-se o teste de Mann-Whitney (SPSS17.0).

Tabela - 3. Valores da significância estatística relativa à comparação da expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *MGMT* em amostras de substância branca, gliomas grau I, II, IV e linhagens de glioblastoma (teste de Mann-Whitney).

Amostras	DNMT1	DNMT3A	DNMT31	MGMT
SB x Grau I	0,792	*0,028	0,092	0,14
SB x Grau II	0,182	0,505	0,699	0,121
SB x Grau IV	0,894	*0,009	0,205	*0,001
SB x Linhagens	0,116	*0,003	*0,042	*0,002
Grau I x Grau II	0,234	0,396	0,361	0,361
Grau I x Grau IV	0,968	0,522	0,672	*0,001
Grau I x Linhagens	0,143	*0,001	0,398	*0,001
Grau II x Grau IV	0,208	0,313	0,614	0,801
Grau II x Linhagens	0,079	*0,040	0,242	*0,037
Grau IV x Linhagens	0,25	*0,001	0,204	*0,002

SB=Substâncias Brancas (n=5), Grau I=Gliomas Grau I (n=13), Grau II=Gliomas Grau II (n=2), Grau IV=Glioblastoma (n=18), Linhagens=Linhagens de Glioblastoma (n=6)

4.2 Expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *MGMT* na linhagem T98G tratada com zebularina

Quando foi analisada a expressão dos genes estudados na linhagem T98G tratada com diferentes concentrações de ZB, observou-se que a droga provocou algumas alterações na expressão dos genes estudados. Neste ensaio a linhagem T98G foi tratada com 100, 200 e 300µM de ZB por 72hs, posteriormente foi

feita a extração do RNA, síntese do cDNA e análise da expressão dos genes *DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e MGMT* por PCR em tempo real. A figura 3 e a tabela 4 mostram os resultados obtidos nesta análise.



Figura 3. Expressão dos genes *DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e MGM*T na linhagem de glioblastoma T98G tratada por 72hs com 100, 200 e 300µM de Zebularina.

Como pode ser observado na figura 3 e tabela 4 os tratamentos com 100, 200 e 300 μ M de ZB aumentaram da expressão relativa dos genes *DNMT1*(1.51-1.62) *e DNMT3B* (1.85-3.11) e diminuição da expressão do gene *DNMT3A* (0.54-0.68) e *MGMT* (0.11-0.33).

Tabela – 4. Expressão relativa dos genes *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B e MGMT* na linhagem de glioblastoma T98G tratada com 100, 200 e 300μ M de Zebularina por 72hs.

DMSO	DNMT1	DNMT3A	DNMT3B	MGMT
Controle	1	1	1	1
100µM	1.62	0.61	1.85	0.33
200µM	1.51	0.68	3.11	0.13
300µM	1.61	0.54	2.76	0.11

A linhagem T98G foi utilizada neste ensaio por ser a única a expressar o gene *MGMT*.

4.3 Ensaios de proliferação celular nas linhagens de glioblastoma tratadas com ZB, TMZ e combinações de ZB+TMZ

Para os ensaios de proliferação celular as linhagens U251, SF188 e T98G foram tratadas com 50, 100, 200, 400µM de ZB, 250, 500, 1000, 2000µM de TMZ e combinações entre ZB+TMZ com as respectivas doses de cada droga. Os resultados dos ensaios são mostrados na figura 4.



Figura 4. Ensaios de proliferação celular em linhagens de glioblastoma U251(A, B e C), SF188 (D, E e F) e T98G (G, H e I) tratadas com Zebularina (50, 100, 200 e 400 μ M), Temozolomida (250, 500, 1000 e 2000 μ M) e combinações de Zebularina com Temozolomida. * Diferença significativa em relação ao controle (p<0.05).

A linhagem U251 mostrou diminuição da proliferação celular com doses a partir de 100μM de ZB (Figura 3A), 250μM de TMZ (Figura 3B) e 50+250μM de ZB+TMZ (Figura 3C).

A SF188 teve sua proliferação afetada com doses a partir de 100μ M de ZB (Figura 3D), 500μ M de TMZ (Figura 3E) e $100+500\mu$ M de ZB+TMZ (Figura 3F).

A linhagem T98G mostrou diminuição na proliferação a partir de 50µM de ZB (Figura 3G), 500µM de TMZ (Figura 3H) e 200+1000µM de ZB+TMZ (Figura 3I).

Os dados obtidos dos ensaios de proliferação celular e combinação foram analisados utilizando-se o programa Calcusyn® e os resultados são mostrados na tabela 5.

Tabela – 5. Relação entre dose e efeito da ZB, TMZ e combinações nas linhagens de glioblastoma (U251, SF188 e T98G) e índices de combinações analisadas através do programa Calcusyn.

Resultad	los das an	álises das	con	nbinaç	ões de Ze	bularina c	om Temoz	olor	nida (Calcusyn)
U251									
ZEBULAR	INA				TEMODAI				
DOSE	FA	DM	R		DOSE	FA	DM	R	
50µM	0,104	735,874		0,981	250µM	0,588	104,808		1,000
100µM	0,210				500µM	0,652			
200µM	0,275				1000µM	0,717			
400µM	0,370				2000µM	0,767			
ZEBULAR	INA+TEMO	DAL (1:5)							
ZB	TMZ	FA	CI		ZB(DRI)	TMZ(DRI)	R		
50µM	250µM	0,640		0,610	31,561	1,730	0,870		
100µM	500µM	0,606		1,736	12,992	0,603			
200µM	1000µM	0,727		0,929	13,476	1,169			
400µM	2000µM	0,760		1,234	8,479	0,896			
SF188									
ZEBULAR	INA				TEMODAI	2			
DOSE	FA	DM	R		DOSE	FA	DM	R	
50µM	0,028	523,057		0,929	250µM	0,163	1.090,655		0,960
100µM	0,170				500µM	0,401			
200µM	0,243				1000µM	0,482			
400µM	0,344				2000µM	0,612			
ZEBULAR	INA+TEMO	DAL (1:5)							
ZB	TMZ	FA	CI		ZB(DRI)	TMZ(DRI)	R		
50µM	250µM	0,229		1,060	4,170	1,220	0,971		
100µM	500µM	0,474		0,720	4,827	1,952			
200µM	1000µM	0,576		0,969	3,294	1,502			
400µM	2000µM	0,690		1,209	2,398	1,263			
T98G									
ZEBULAR	INA				TEMODAI	-			
DOSE	FA	DM	R		DOSE	FA	DM	R	
50µM	0,319	208,903		0,973	250µM	0,008	1.219,774		0,900
100µM	0,384				500µM	0,330			
200µM	0,455				1000µM	0,388			
400µM	0,622				2000µM	0,668			
ZEBULAR	INA+TEMO	DAL (1:5)							
ZB	TMZ	FA	CI		ZB(DRI)	TMZ(DRI)	R		
50µM	250µM	0,069		20,881	0,049	1,667	0,979		
100µM	500µM	0,227		4,575	0,257	1,469			
200µM	1000µM	0,413		2,699	0,571	1,054			
400µM	2000µM	0,541		2,979	0,691	0,653			

Abreviaturas: FA: Fração Afetada; DM: IC50 ou concentração necessária da droga para reduzir a proliferação celular em 50%; R: razão da curva dose efeito; DRI (dose-reduction index): Indica a proporção da redução da dose de uma determinada droga em uma combinação sinérgica que proporciona o mesmo efeito comparando-se com a dose da droga isolada.

Nos ensaios de proliferação celular, observou-se variação do DM (IC50) tanto para a ZB quanto para a TMZ entre as linhagens estudadas. O DM para a ZB observado foi de 735,874 μ M para a U251, 523,057 μ M para a SF188 e 208,903 μ M para a T98G. O DM para a TMZ foi de 104,808 μ M para a U251, 1090,655 μ M para a SF188 e 1219,774 μ M para a T98G (Tabela 5).

Na linhagem U251 as combinações de ZB+TMZ mostraram sinergia apenas para as menores doses utilizadas de 50 μ M de ZB + 250 μ M de TMZ (CI=0,61). A combinação de 200 μ M de ZB + 1000 μ M de TMZ mostrou efeito próximo ao aditivo (CI=0,93) e as outras combinações mostraram efeito antagônico (CI > 1).

A SF188 mostrou sinergia na combinação de 100 μ M de ZB + 500 μ M de TMZ (CI=0,72) e efeito próximo ao aditivo com 200 μ M de ZB + 1000 μ M de TMZ (CI=0,97). As Outras combinações de ZB com TMZ mostraram efeito antagônico (CI > 1).

Para a linhagem T98G não foi observado sinergia em nenhuma das combinações testadas CI > 1 (Tabela 5).

4.4 Ensaios de proliferação celular em culturas primárias de glioblastoma tratadas com zebularina

Os ensaios de proliferação celular foram realizados em triplicata em 5 culturas primárias de GBM tratadas com 50, 100, 200, 400 e 800µM de ZB por 72hs. A figura 5 mostra os obtidos nestes ensaios.



Figura 5. Ensaios de proliferação celular em 5 culturas primárias de GBM (A, B, C, D, E) e médias dos resultados nas 5 culturas (F). * Diferença significativa em relação aos controles (p<0,05).

Como pode ser observado na figura 5, a ZB diminuiu a proliferação celular a partir de 400 μ M na GM15 (A) e a partir de 50 μ M nas culturas primárias GM 17 (B) e GM 20 (C). As culturas GM27 (D) e GM28 (E) não mostraram diferenças significativas em relação às doses de ZB testadas neste trabalho. Em média a ZB diminuiu a proliferação nas 5 culturas primárias com doses a partir de 400 μ M (Figura 5F)

Os DMs de ZB para as culturas primárias foram de 681.38μ M para a GM27, 637.55μ M para a GM28, 567.48μ M para a GM15, 276.16μ M para a GM17 e 338.06μ M para a GM20. Em média o DM foi de 544.42μ M de ZB.

4.5 Ensaios de apoptose nas linhagens de glioblastoma tratadas com zebularina

As análises estatísticas dos dados obtidos dos experimentos de apoptose mostraram que a ZB aumenta a apoptose nas três linhagens de GBM (U251, SF188 e T98G) nas três concentrações testadas (100, 200 e 300μ M) como mostra a figura 6. Observou-se aumento significativo da apoptose comparandose os tratamentos de 100 e 200μ M de ZB (p<0,05), entretanto não foram observadas diferenças comparando-se 200 com 300μ M.



Figura 6. Ensaio de apoptose nas linhagens U251, SF188 e T98G tratadas com 100, 200 e 300μ M de ZB. *p<0.05 em relação aos controles.

A porcentagem de células marcadas com anexina + iodeto de propídio (PI) está relatada na tabela 6.

	U251	SF188	T98G
DMSO	2,97	5,94	10,37
	3,5	5,66	9,41
	3,98	5,32	10,49
100uM	18,35	47,14	31,38
	16,85	52	32,58
	18,98	47,7	28,93
200uM	28,18	62,69	64,04
	27,09	58,48	60,04
	26,23	59,8	63,14
300uM	23,98	59,1	68,55
	28,35	58,19	65,53
	25,09	60,32	65,74

Tabela – 6. Soma das porcentagens de células apopóticas (marcadas com anexina V) e porcentagem de células necróticas (Iodeto de propídio) observadas nas linhagens de glioblastoma tratadas com 100, 200 e 300μ M de ZB.

4.6 Ensaios clonogênicos nas linhagens de glioblastoma tratadas com zebularina, temozolomida e irradiadas

A figura 7 mostra os resultados do ensaio clonogênico nas linhagens U251, SF188 e T98G tratadas com 100 μ M de ZB, 10 μ M de TMZ e irradiadas com 2, 4 e 6Gys.



Figura 7. Ensaio clonogënico realizado nas linhagens de glioblastoma tratadas com ZB, TMZ e irradiadas com 0, 2, 4 e 6 Gy. Linhagens U251 (A), SF188 (B) e T98G (C). *diferen;a significativa (p<0.05) comparando-se com os controles (DMSO) em cada dose de radiação.

Na linhagem U251 tanto 100μ M de ZB quanto 10μ M de TMZ diminuíram a formação de colônias sem radiação (0Gy) e com as três doses de radiação testadas (2, 4 e 6Gy) comparando-se com os controles dos experimentos. Na dose de 2Gy a TMZ foi mais eficiente na U251 comparando-se com a ZB (p=0.002) (Figura7A). A SF188 mostrou diferenças somente para as doses de 4 e 6Gy tanto para o tratamento com ZB como TMZ (Figura7B).

Como pode ser observado na Figura7C, não houve diferenças entre os controles da linhagem T98G (DMSO -2, 4 e 6Gy) e T98G tratada com TMZ e irradiada com 2, 4 e 6Gys. Quando a T98G foi tratada com 100µM de ZB, observou-se diferenças significativas para todas as doses de radiação testadas em relação aos controles (Figura 7C).

4.7 Ensaio clonogênico e irradiação na linhagem MRC5 tratada com zebularina e temozolomida

Os ensaios de sobrevivência clonogênica na linhagem de fibroblastos humanos MRC5 mostrou que tanto 100μ M de ZB quanto 10μ M de TMZ diminuiram a formação de colônias em células irradiadas com 2Gy e não irradiadas (0Gy) como pode ser observado na Figura 8.



Figura 8. Ensaio clonogênico realizado na linhagem de fibroblastoma humanos MRC5 tratada com 100 μ M de ZB e 10 μ M de TMZ, não irradiada (0Gy) e irradiada com 2Gy. * Diferença significativa comparando-se com os controles (p<0.05).

Comparando-se os efeitos da ZB com a TMZ, observou-se que 10μ M de TMZ apresenta efeito mais citotóxico do que 100μ M de ZB linhagem de fibroblastos tanto para as células irradiadas quanto para não irradiadas (p<0,05).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O glioblastoma (GBM) é uma das formas mais letais de tumores do sistema nervoso central (SNC). Isso se deve em parte ao seu grande potencial invasivo o que torna a cirurgia extremamente difícil. Além da complexibilidade genômica o GBM apresenta heterogeneidade entre as células tumorais o que dificulta também a outras formas de tratamento. Atualmente a terapia para o GBM consiste na cirurgia, radioterapia e quimioterapia concomitante/adjuvante com temozolamida (TMZ), mas apesar dos avanços no tratamento a sobrevida dos pacientes se mantém extremamente baixa indicando a necessidade mais estudos relativos à patologia, etiologia e tratamento do GBM (Bai; Staedtke; Riggins, 2011).

Sabe-se que aproximadamente metade dos pacientes portadores de GBM não respondem ao tratamento com TMZ indicando a necessidade de quimioterápicos alternativos para o tratamento deste tipo de tumor (Hegi et al., 2004). Entre as drogas recentemente utilizadas em estudos e na terapia contra o câncer destacam-se as drogas epigenéticas como os inibidores de histona desacetilases (iHDAC) e inibidores de DNA metiltransferases (iDNMT) que tem mostrado efeitos antineoplásicos promissores (Kelly; Carvalho; Jones., 2010).

Nos últimos anos muitos estudos relataram várias alterações em mecanismos epigenéticos como modificações de histonas e metilação do DNA em diversos tipos de neoplasias demonstrando o papel importante no desenvolvimento e progressão do câncer. Sabe-se que mecanismos epigenéticos também se encontram alterados no GMB e que essas alterações podem ser provocadas por anormalidades em fatores que controlam as modificações nas histonas e a metilação do DNA (Muntean; Hess, 2009; Nagarajan; Costello, 2009b).

O processo de metilação do DNA é controlado pelas DNA metil transferases (DNMTs) e representa um mecanismo epigenético fundamental para a diferenciação e memória celular. Aproximadamente metade dos genes no genoma humano, incluindo muitos microRNAs, possuem ilhas CpG em suas regiões promotoras e apresentam controle transcricional mediado por metilação. Consequentemente alterações na expressão das DNMTs podem afetar indiretamente a expressão de muitos desses genes (Ham et al., 2007; Jones; Baylin, 2002).

Sabe-se que a expressão das DNMTs varia entre os diferentes tecidos humanos e que o padrão global de metilação se altera durante o desenvolvimento do SNC. As DNMTs são fundamentais para a neurogênese e para as funções normais do SNC e há alguns anos já vem sendo relatadas alterações nas DNMT1, DNMT3A e DNMT3B associadas a diversos tipos de câncer (Nagarajan; Costello, 2009b; Robertson, 2001).

Neste estudo foram realizados experimentos de expressão dos genes *DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e MGMT* em 5 amostras de substância branca, 6 linhagens de GBM e 13 amostras de pacientes portadores de glioma grau I, 2 grau II e 18 de GBM.

A DNMT1 é uma DNA metiltransferase que atua principalmente na manutenção dos padrões de metilação durante as divisões celulares, mas recentemente descobriu-se que esta enzima também pode atuar em metilações novas no DNA. Sabe-se que a DNMT1 é altamente expressa no cérebro dos mamíferos e que o padrão de metilação em neurônios pós-mitóticos se altera em resposta a atividade neural. Acredita-se que uma de suas funções no cérebro esteja associada a esse processo, entretanto ainda não está clara a função específica da DNMT1 no desenvolvimento do GBM (Nagarajan; Costello, 2009b).

Apesar de seu papel importante para o desenvolvimento do SNC, neste estudo não foram observadas diferenças significativas na expressão do gene *DNMT1* entre as amostras de substância branca, gliomas e linhagens de GBM analisadas (Figura 2A e Tabela 3). A expressão relativa do gene *DNMT1* variou

de 0,49 a 0,83 nas amostras de substâncias brancas (média de 0,58) e de 0,09-2,50 (média de 0,65) em amostras de pacientes portadores de GBM. Em média a expressão do gene *DNMT1* foi ligeiramente maior nas amostras de GBM (0.65) comparando-se com as substâncias brancas (0.58) (Tabela 2), mas essa diferença não foi significativa.

Fanelli et al. (2008) reportaram aumento de duas a quatro vezes da expressão do gene *DNMT1* em GBM comparando-se duas linhagens e duas culturas primárias de GBM, com uma população de astrócitos normais e outra de células progenitoras neurais (Fanelli et al., 2008). Outro estudo também relatou aumento da expressão do gene *DNMT1* em GBM (n=56) comparando-se com amostras de substâncias brancas (n=10) (Kreth et al., 2011).

A hiperexpressão do gene *DNMT1* também têm sido relatada em outros tipos de câncer como coloretal, pulmão, pâncreas, mama, gástrico, renal, carcinoma hepatocelular, mucoepidermóide e carcinoma de células escamosas (Miremadi et al., 2007). Por outro lado, mutações no gene *DNMT1* foram relatadas em câncer coloretal, sugerindo que sua inativação possa estar envolvida no processo de carcinogênese (Kanai et al., 2003). Outros estudos mostraram que camundongos com o alelo *DNMT1* hipomórfico ou nulo desenvolvem linfoma de células T (Gaudet et al., 2003) e sarcomas (Eden et al., 2003).

Baseando-se nos dados observados em todos esses estudos citados, é possível que tanto a inativação quanto a expressão aumentada da DNMT1 estejam associadas ao processo de carcinogênese, mas neste estudo não foram observadas diferenças relativas à expressão do gene *DNMT1* em GBM.

A DNMT3A atua promovendo metilações novas do DNA. Esta enzima é a principal metiltransferase expressa em células tronco neurais e que é necessária para a neurogênese (Wu et al., 2010). Alguns estudos mostraram que a DNMT3A encontra-se hiperexpressa em vários tipos de câncer como carcinoma de células escamosas, carcinoma renal, coloretal, pancreático e carcinoma de células transicionais (Miremadi et al., 2007).

Ainda não está claro o papel da DNMT3A no GBM, mas sabe-se que essa enzima é expressa no SNC de murinos tanto no período pré-natal quanto no período pós-natal (Feng et al., 2005) e que camundongos com deleção do gene *DNMT3A* apresentam problemas neuromusculares (Nguyen et al 2007).

Comparando-se com as amostras de substância branca, neste trabalho foi observado expressão relativa menor do gene *DNMT3A* nas amostras de glioma grau I (p=0.028), nas linhagens (p=0,003) e amostras de GBM (p=0,009) (Figura 2B e tabela 3).

A baixa expressão do gene *DNMT3A* em GBM já foi relatada em outros trabalhos. Acredita-se que a expressão diminuída da *DNMT3A* observada em GBM esteja associada à desmetilação de regiões satélites pericentroméricas de células tronco neurais que causam instabilidade genética observada neste tipo de tumor e que esse evento possa estar envolvido no desenvolvimento do GBM (Fanelli et al, 2008).

Diferente dos resultados do presente trabalho e os dados obtidos por Fanelli et al. (2008) em que foi observada expressão diminuída do gene *DNMT3A* em GBM, no estudo realizado por Kreth et al. (2011) não foram verificadas diferenças significativas na expressão do gene *DNMT3A* em GBM comparando-se com amostras de substância branca.

Assim como a DNMT3A, a DNMT3B também atua nas metilações novas do DNA e o aumento da expressão do gene *DNMT3B* também tem sido associado a várias neoplasias como câncer de mama, coloretal, renal e carcinoma de células escamosas. Polimorfismos de base únicas no gene *DNMT3B* foram associados ao risco de desenvolvimento de câncer de mama e pulmão (Miremad et al., 2007).

Mutações no gene DNMT3B causam a Síndrome ICF (*immunodeficiency*, *centromere instability, facial anomalies syndrome*) em que uma das

características desta doença é a deficiência mental (Jim et al., 2007). Entretanto, análises de regiões codificadoras dos genes *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em populações de células tronco tumorais do SNC não revelaram mutações (Fanelli et al., 2008).

A proteína DNMT3B é expressa principalmente no período inicial da neurogênese (Feng et al., 2005) e apresenta expressão muito baixa em GBM em uma quantidade comparável a astrócitos humanos normais (Fanelli et al., 2008).

Neste trabalho não foram observadas diferenças significativas na expressão do gene *DNMT3B* comparando-se as substâncias brancas com as amostras de GBM (Figura 2C e Tabela 3), o que condiz com os resultados descritos no trabalho de Fanelli et al. (2008). O estudo realizado por Kreth et al. (2011) revelou aumento da expressão do gene *DNMT3B* em GBM de 3.2 vezes comparando-se cérebro normal, entretanto as relações entre o aumento da expressão desse gene e o desenvolvimento do GBM não são claras.

É possível que o número de amostras de GBM analisadas neste estudo (n=18) não foram suficientes para encontrarmos diferenças estatisticamente significativas em relação à expressão do gene *DNMT1* e *DNMT3b* comparandose com substâncias brancas (n=5) como descrito no trabalho de Kreth et al. (2011) onde foram analisadas 53 amostras de GBM e 10 de substâncias brancas.

Diferente dos genes supressores tumorais que geralmente apresentam expressão diminuída e oncogenes com expressão aumentada em tumores, a expressão das DNMTs pode estar tanto diminuída quanto aumentada dependendo do tipo de neoplasia. Pequenas alterações na expressão ou mutações nos genes *DNMT1, DNMT3A e DNMT3B* podem influenciar de forma indireta a expressão de muitos outros genes controlados por metilação e afetar a estabilidade do DNA (Hanahan; Weinberg, 2000; Miremad et al., 2007).

Paradoxalmente, a hipermetilação de regiões promotoras de genes específicos, pode provocar tanto o silenciamento de oncogenes quanto de genes supressores tumorais (Miremad et al., 2007). Isso pode explicar em parte a dificuldade de associação direta entre aumento ou diminuição da expressão de DNMTs em alguns tipos de câncer.

Alem disso sabe-se que as DNMTs são alvos de microRNAs indicando que outros fatores podem estar envolvidos no controle da expressão das DNMTs (Garzon et al., 2009; Ciafre et al., 2005).

Outro objetivo deste trabalho foi analisar a expressão do gene *MGMT* nas amostras de gliomas, substâncias brancas, linhagens de GBM e verificar as possíveis diferenças entre as amostras.

O estudo do *MGMT* em GBM é particularmente interessante porque esse gene codifica uma proteína de reparo do DNA que remove as lesões provocadas por agentes quimioterapêuticos alquilantes como a TMZ utilizada no tratamento do GBM (Hegi et al., 2004; Everhard et al., 2008).

Devido ao seu papel crítico no reparo do DNA, o silenciamento epigenético do *MGMT* está associado a um aumento no número de mutações e a um prognóstico desfavorável em GBM. Entretanto, vários estudos indicam que pacientes que apresentam hipermetilação do *MGMT* respondem melhor ao tratamento com TMZ do que pacientes que apresentam o *MGMT* não metilado (Burgess; Jenkins; Zangue, 2008; Hegi et al., 2004).

Alguns trabalhos mostram que a região promotora do gene *MGMT* encontra-se frequentemente metilada em vários tipos de câncer e que essa metilação esta correlacionada com sua expressão gênica (Esteller et al., 1999; Hegi et al., 2004; Everhard et al., 2008). Apesar da forte correlação entre a metilação da região promotora do gene *MGMT* e os níveis de mRNA produzidos, muitos estudos mostram que pelo menos 15% de vários tumores investigados apresentam correlação discordante indicando que outros mecanismos podem atuar no controle da expressão desse gene (Everhard et al., 2009; Kreith et al., 2011).

Sabe-se que além da hipermetilação do DNA, a dimetilação da histona H3-K9 e a desacetilação são outros dois mecanismos associados ao silenciamento gênico que também têm sido detectados na região promotora do *MGMT* (Burgess; Jenkins; Zangue, 2008).

Apesar da influência desses outros mecanismos no controle da expressão, atualmente o *status* de metilação e expressão do gene *MGMT* são considerados possíveis marcadores preditivos para a resposta ao tratamento com TMZ para pacientes portadores de GBM (Everhard et al., 2009; Hegi et al., 2004).

No presente trabalho verificou-se que houve expressão significativamente maior do *MGMT* nas substâncias brancas relação às linhagens (p=0,002) e amostras de GBM (p=0,001) estudadas. Observamos também que a expressão do *MGMT* foi maior em amostras de glioma grau I comparando-se com linhagens (p=0,001) e amostras de GBM (p=0,001), maior nas amostras de glioma grau II do que nas linhagens (p=0,037) e maior em GBM comparando-se com as linhagens (0,002) (Figura 2D e Tabela 3).

Os valores médios da expressão relativa do gene *MGMT* foram de 3,53 nas amostras de substância branca, de 2,80 nas amostras de glioma grau I, 1,01 em gliomas grau II, 0,74 em gliomas grau IV e 0,14 nas linhagens de GBM (Tabela 2).

Kreith et al. (2011) também relataram expressão maior do *MGMT* em substâncias brancas comparando-se com amostras de GBM e Astrocitomas Anaplásicos.

A inativação de genes que atuam no reparo do DNA é uma característica comum em neoplasias (Hanahan; Weinberg, 2000). É possível que a diminuição da expressão do gene *MTMT* de acordo com os graus de gliomas observada neste estudo, sendo maior nas amostras de substâncias brancas seguido de gliomas grau I, grau II e GBM, represente um dos fatores associados à evolução e agressividade dos gliomas. Apesar disso é importante ressaltar que houve grande variação na expressão desse gene nas amostras de glioma grau I (0,17 a 7,70) e o número de amostras de gliomas grau II foi muito baixo (n=2) (Figura

2D). Seria necessário o estudo de um número maior de amostras para confirmar essa hipótese.

Entre as 6 linhagens de glioblastoma estudadas somente a T98G expressou o gene *MGMT* e esta linhagem foi utilizada como calibrador para os experimentos de expressão gênica. Outro trabalho analisou a expressão do *MGMT* em 12 linhagens de gliomas malignos e mostrou que esse gene não é expresso, ou expresso em quantidades muito baixas na maioria das linhagens e que a T98G foi uma das 3 linhagens que expressaram o gene *MGMT* (Hermisson et al., 2006).

A análise da expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *MGMT* na linhagem T98G tratada com ZB teve como objetivo verificar se o tratamento com ZB pode alterar a expressão dos genes dos genes estudados. Nesses experimentos foi constatado que os tratamentos com 100, 200 e 300µM de ZB por 72 horas na linhagem T98G provocaram aumento da expressão dos genes *DNMT1 e DNMT3B* e diminuição da expressão do gene *DNMT3A e MGMT* como pode ser observado na (Figura 3 e Tabela 3).

Meador et al. (2010) também relataram que o tratamento de linhagens de GBM com ZB também promoveu aumento da expressão do gene *DNMT3b*, entretanto os mecanismos pelos quais a droga alterou a expressão desse gene não são claros.

Outro trabalho realizado por Kim et al. (2012) mostrou que o tratamento com ZB em linhagem de GBM provoca depleção da proteína DNMT1 e DNMT3A.

Os dados em relação ao aumento da expressão do gene *DNMT1* observados no presente trabalho e depleção da proteína DNMT1 após o tratamento com ZB descrito por Kim et al. (2012), indicam que outros mecanismos podem estar envolvidos na regulação da expressão proteica. Outra hipótese para explicar essas diferenças está relacionada ao mecanismo de ação da ZB. A ZB é um análogo de citidina que se incorpora no DNA formando

complexos covalentes com as DNMTs podendo provocar acúmulo dessas proteínas após o tratamento (Champion et al., 2010).

Sabe-se que inibidores de DNMTs podem provocar aumento da expressão de genes que apresentam suas regiões promotoras hipermetiladas, entretanto os mecanismos pelos quais um iDNMT provoca diminuição da expressão ainda não são claros. Possivelmente nesses casos, a droga pode atuar de forma indireta, aumentando a expressão de um microRNA que inibe a expressão de um determinado gene (Ham et al., 2007) mas outros experimentos seriam necessários para confirmar essa hipótese.

Entre os inibidores de DNMTs a zebularina (ZB) tem se destacado por apresentar estabilidade, baixa toxicidade (Cheng et al., 2004; Cang et al., 2010) e por mostrar efeitos antineoplásicos, em vários tipos de câncer como mama (Billan; Sobolewski; Davidson, 2010; Chen et al., 2012), ovário (Balch et al., 2008), intestino (Yoo et al., 2008), linfoma de células T (Herranz et al., 2006), leucemia mieloide aguda (Flotho et al., 2009) e leucemia linfoide aguda (Dados não publicados), mas pouco se sabe a respeito dos efeitos dessa droga em GBM.

Os ensaios de proliferação celular realizados neste trabalho tiveram como objetivo avaliar os efeitos da ZB isoladamente e em combinação TMZ nas linhagens de glioblastoma (U251, SF188 e T98G).

As linhagens U251 e SF188 o tratamento com ZB mostrou diminuição na proliferação celular com doses a partir de 100μ M enquanto para a linhagem T98G, 50μ M de ZB foi suficiente para diminuir a proliferação de forma significativa (p<0,05). O DM ou IC50 nas linhagens U251, SF188 e T98G foram de 735.9, 523.1 e 208.9 μ M de ZB respectivamente.

No trabalho de Meador et al. (2010) foram observados DM de 50 e 300µM de ZB nas linhagens de GBM MO59J e MO59K respectivamente. Comparando-se com o presente trabalho, as doses menores de DM descritas por Meador et al. (2010) podem estar associadas a características das linhagens estudadas. Neste estudo o tratamento com TMZ também mostrou variação entre as linhagens de GBM. Foi mais eficiente na linhagem U251, pois houve diminuição da proliferação a partir de 250μ M e para as linhagens SF188 e T98G foram necessárias doses a partir de 500μ M de TMZ (p<0,05). Os DMs foram de 104.8, 1090.1 e 1290.9 μ M de TMZ para as linhagens U251, SF188 e T98G respectivamente.

Hermisson et al. (2006) relataram que no tratamento de 12 linhagens de gliomas com TMZ por 72 horas as DMs variaram de 87 a 1290 μ M. Interessantemente no ensaio de proliferação celular, somente 1 linhagem apresentou DM menor do que 100 μ M, enquanto que nos ensaios de sobrevivência clonogênica 9 das 12 linhagens estudadas apresentaram DM menor do que 100 μ M de TMZ (Hermisson et al., 2006).

Para as análises de combinações das drogas foi utilizado o software Calcusyn (Cambirdge – Reino Unido 1997) por ter mostrado ser uma ferramenta eficiente para esse tipo de análise. O programa se baseia nos efeitos experimentais das drogas isoladas e combinações (Dose - Fração Afetada), fornecendo dados importantes para a análise dos efeitos das combinações (Chou, 2008; Chou, 2010).

Muitas vezes o uso de múltiplas drogas pode ser eficiente por atingirem vários alvos simultaneamente. Drogas com diferentes mecanismos de ação também podem atuar em um mesmo alvo de maneira mais eficiente. Os possíveis resultados favoráveis do sinergismo resultante de uma combinação de drogas incluem: aumento da eficácia do efeito terapêutico, diminuição da dosagem para manter ou aumentar a eficácia e diminuir a toxicidade, minimizar ou retardar os efeitos de resistência, proporcionar sinergismo específico contra o alvo. Para o alcance desses objetivos, as combinações de drogas têm sido utilizadas amplamente para o combate de doenças graves como o câncer (Chou, 2006; Chou, 2010).

Surpreendentemente, a maioria das combinações de ZB+TMZ testadas neste estudo apresentaram CI maior do que 1, indicando efeito antagônico dessas combinações nas linhagens U251, SF188 e T98G.

Na linhagem U251, das 5 combinações testadas, só foram observados CI menores do que 1 para 50+250 μ M (CI=0,610), 200+1000 μ M (CI=0,929) de ZB+TMZ. Na SF188 100+500 μ M (CI=0,720), 200+1000 μ M (CI=0,969) em combinações de ZB e TMZ respectivamente. Na linhagem T98G nenhuma das 5 combinações testadas apresentou efeito sinérgico (Tabela 3).

Como já foi descrito, uma combinação de drogas que apresente valores de CI<1 indica sinergia e CI>1antagonismo. Também é importante ressaltar que a determinação de sinergia e antagonismo não depende somente dos efeitos das drogas combinadas, mas depende também da relação entre as doses utilizadas nas combinações com os efeitos de cada dose isolada (Chou, 2006).

Os valores médios de CI observados nas 5 combinações de ZB+TMZ testadas em cada uma das linhagens U251, SF188 e T98G foram de 1.13; 0.99 e 7.78 respectivamente. Considerando os valores de CI e suas respectivas descrições relatadas na Tabela 1, de todas as doses utilizadas nas combinações realizadas neste estudo, só foi observado sinergismo no tratamento da linhagem U251 com 50+250µM de ZB e TMZ respectivamente (CI=0,610). Todas as outras combinações mostraram uma variação do CI que indicam sinergismo moderado (CI=0,72) até antagonismo muito forte (CI=20,88).

Quanto duas drogas são combinadas e sujeitas a uma série de diluições, a mistura biológica das duas drogas se comporta como uma terceira droga em relação à dose-efeito e para doenças graves como o câncer, altos níveis de sinergia são muito mais relevantes do ponto de vista terapêutico (Chou, 2006).

Considerando todos estes fatores, os resultados deste trabalho indicam que a maioria das doses utilizadas em combinações de ZB com TMZ não foram sinérgicas nas linhagens de GBM podendo não representar uma estratégia eficiente para a intervenção terapêutica, entretanto outros experimentos devem ser realizados para confirmar essas hipóteses.

Os ensaios de proliferação celular em culturas primárias de GBM tratadas com ZB mostraram variabilidade em relação à resposta. Como pode ser observado na figura 5 (A, B, C, D, E e F) as culturas primárias GM27 (D) e GM28 (E) não apresentaram diminuição significativa na proliferação com as doses de ZB testadas neste trabalho. A GM 15 (A) mostrou diminuição da proliferação com doses a partir de 400µM e as culturas GM17 (B) e GM20 (C) a partir de 50µM. Em média, a zebularina diminui a proliferação celular nas culturas primárias de glioblastoma com doses a partir de 400µM (Figura 5F). A DM nas 5 linhagens estudadas variou de 276.16µM de ZB (GM17) a 681.17µM (GM27).

Não foram encontrados outros estudos avaliando os efeitos da ZB em culturas primárias de GBM, mas acreditamos que a variação de resposta observada nas 5 culturas primárias de GBM pode estar associada a características peculiares de cada uma das culturas. Entretanto os resultados obtidos nesse estudo a partir dos experimentos nas culturas primárias devem ser observados com cautela, pois foram realizados em triplicata em apenas um momento devido à dificuldade de obtenção das células para a realização dos experimentos.

Os ensaios de apoptose nas linhagens de GBM tratadas com ZB mostraram que 100, 200 e 300μ M de ZB aumentaram a apoptose de forma significativa nas três linhagens de GBM analisadas (U251, SF188 e T98G). Entretanto não houve diferenças comparando-se as doses de 200 e 300μ M (Figura 6).

Experimentos em camundongos geneticamente modificados que desenvolvem câncer de mama mostraram que a ZB também promove apoptose *in vivo* (Chen et al ., 2012). Outro trabalho mostrou que a ZB também induz apoptose em linhagens de leucemia de células T (Ruiz-Magaña et al., 2012).

No trabalho de Meador at al. (2010) foi observado que o tratamento com 100 e 300 μ M de ZB por 72 horas induz apoptose de forma dose dependente na linhagem de GBM MO59J (Meador et al., 2010).

A evasão da apoptose é um evento importante no processo de carcinogênese e muitas vezes pode ocorrer devido a metilação anormal de genes associados a apoptose como o *BCL2, BAX* and *XAF1* (Hervouet; Vallette; Cartron, 2010) entretanto os mecanismos pelos quais a desmetilação provocada pela ZB promove apoptose não são conhecidos.

Os ensaios clonogênicos realizados neste estudo tiveram como objetivo avaliar o potencial de radiosensibilização da ZB e comparar com a TMZ em linhagens de GBM. As linhagens (U251, SF188 e T98G) foram tratadas com 100µM de ZB e 10µM de TMZ 48horas antes da irradiação. As doses de ZB e TMZ utilizadas foram escolhidas por serem as menores doses a mostrar diferenças em relação aos controles em experimentos prévios com linhagens não irradiadas, exceto para a linhagem T98G que não respondeu a doses altas de TMZ.

Nestes experimentos a linhagem U251 mostrou diminuição na formação de colônias com 100 μ M de ZB, 10 μ M de TMZ sem radiação (0Gy) e com as três doses de radiação testadas (2, 4 e 6Gy) comparando-se com os controles. Para a dose de 2Gy de radiação a TMZ foi mais eficiente do que a ZB na linhagem U251 (p=0.002) (Figura7A). Em relação aos controles (0, 2, 4 e 6Gy) a SF188 mostrou diferenças somente para as doses de 4 e 6Gy tanto para o tratamento com ZB como TMZ (p<0.05), entretanto não foram observadas diferenças entre o tratamento com ZB e TMZ (Figura7B).

A T98G não mostrou diferenças entre os experimentos controles e tratamento com TMZ (10 μ M) quando a linhagem foi irradiada com 2, 4 e 6Gys. No tratamento com ZB (100 μ M), observaram-se diferenças significativas para todas as doses de radiação testadas em relação aos controles (Figura7C).

A resistência da linhagem T98G a TMZ (Figura 7C), já foi relatada em outros trabalhos (Kanzawa et al., 2003; Hermisson et al., 2006).

Uma possível explicação para a resistência da ao tratamento com TMZ pode ser o fato de que a T98G expressa o gene *MGMT* que codifica uma proteína reparo que atua na remoção de grupos *alquil* do DNA (Hegi et al., 2004).

Hermisson et al. (2006) mostraram que a linhagem T98G apresentou DM de 502 μ M comparando-se com 7 μ M de TMZ observado para a linhagem U87MG. Também foi observado que a atividade da proteína codificada pelo *MGMT* está fortemente correlacionada a resistência a TMZ em ensaios clonogênicos e que a expressão do *MGMT* é o principal indicador da resistência a essa droga (Hermisson et al., 2006).

Há algum tempo já vem sendo mostrado que grande parte dos pacientes portadores de GBM, não se beneficiam do tratamento com TMZ associado à radioterapia (Hegi et al., 2004; Hegi et al., 2005) indicando a necessidade do drogas alternativas que sensibilizem as células neoplásicas para a irradiação.

A ZB promove radiosensibilização em linhagens de câncer de pâncreas (Mia-Paca), carcinoma de próstata (DU145) (Dote et al., 2005) e câncer de pulmão (A549) (Kim et al., 2012). Também foi observado aumento da radiossensibilização nas linhagens de GBM U251 (Dote et al., 2005), U373MG (Kim et al., 2012) e MO59J (Meador et al., 2010) após o tratamento com ZB reforçando a ideia de que essa droga pode representar quimioterápico interessante para estudos de radiossensibilização em GBM.

Os mecanismos exatos pelos quais iDNMT promovem radiossensibilização em GBM ainda não são claros. Por um lado a desmetilação e reexpressão do gene *ATM* pode ativar mecanismos de reparo do DNA e diminuir a radiosensibilidade em GBM (Roy et al., 2006). Por outro lado, o tratamento com DNMTi pode promover reexpressão do gene *RUNX3*

Discussão | 71

aumentando a morte celular induzida por radiação promovendo aumento da radiossensibilidade (Sakakura et al., 2007).

Apesar disso, acredita-se que o principal mecanismo pelo qual iDNMTs causam radiossensibilização em GBM, esteja relacionado com a instabilidade genética provocada pela desmetilação do DNA e desregulação em mecanismos de reparo do DNA (De Schutter; Nuyts, 2009; Dote et al., 2005; Kim et al., 2012).

Outra investigação realizada neste trabalho foi relativa à citotoxicidade da ZB comparando-se com a TMZ em fibroblastos humanos. Para esta análise foram realizados ensaios clonogênicos na linhagem MRC5 tratada com 100 μ M de ZB e 10 μ M de TMZ não irradiada e irradiada (2Gy).

Comparando-se com os controles a linhagem MRC5 mostrou diminuição significativa na formação de colônias tanto no tratamento com ZB (100 μ M) como no tratamento com TMZ (10 μ M) nas culturas irradiadas (2Gy) e não irradiadas (0Gy) (Figura 8).

Houve menor formação de colônias após o tratamento com 10μ M de TMZ comparando-se com 100 μ M de ZB tanto nas culturas não irradiadas como nas irradiadas com 2Gy (p<0,05).

Um estudo comparou os efeitos da ZB em 7 linhagens celulares provenientes de vários tipos de câncer (bexiga, pâncreas, próstata, cólon e pulmão) com 4 linhagens de fibroblastos humanos (LD98, T-1, LD419 e CCD-1070Sk). Foi demonstrado que o tratamento contínuo com ZB por 8 dias sensibiliza preferencialmente células neoplásicas comparando-se com fibroblastos (Cheng et al., 2004). Entretanto não foram observados outros trabalhos na literatura que compararam os efeitos da ZB com a TMZ em linhagens GBM e de fibroblastos humanos.

Nos últimos anos a caracterização de alterações epigenéticas no câncer tem despertado interesse particular pelo fato de que essas alterações podem ser revertidas utilizando drogas epigenéticas como inibidores de DNMTs (De
Schutter; Nuytz., 2009). Entre os iDNMTs a ZB apresenta propriedades interessantes para a utilização terapêutica (Cheng et al., 2004). Alem disso a ZB tem mostrado efeitos antineoplásicos e promove radiosensibilização em linhagens GBM o que torna essa droga interessante para o estudo nesse tipo de neoplasia (Dote et al., 2005; Meador et al., 2010; Kim et al., 2012).

No presente estudo foi observado que a ZB promove diminuição da proliferação celular, apoptose, diminuição na formação de colônias em linhagens de GBM irradiadas e não irradiadas. A ZB também diminuiu a formação de colônias na linhagem T98G resistente a TMZ e mostrou menor toxicidade em linhagem de fibroblastos.

Todas essas características da ZB citadas e os resultados obtidos no presente trabalho indicam que essa droga é um alvo em potencial para a realização de experimentos *in vivo* e futuramente pode representar um quimioterápico alternativo a TMZ para a radiosensibilização em pacientes portadores de GBM.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os genes *DNMT3A* e *MGMT* apresentaram expressão maior nas amostras de SB comparando-se com gliomas e linhagens de GBM. O gene *DNMT3B* foi mais expresso nas linhagens de GBM comparando-se com as SB. O gene *DNMT1* não mostrou diferenças significativas entre as amostras analisadas.

A zebularina promoveu diminuição na proliferação celular e aumento da apoptose nas linhagens de glioblastoma.

As combinações de zebularina com temozolomida não mostraram sinergia na grande maioria das doses testadas.

As culturas primárias de glioblastoma mostraram grande variação na resposta ao tratamento com zebularina.

A zebularina promoveu diminuição na formação de colônias em linhagens de glioblastoma irradiadas e não irradiadas e na linhagem T98G que foi resistente ao tratamento com temozolomida

A temozolomida ($10\mu M$) diminuiu a formação de colônias de forma significativa comparando-se com a zebularina ($100\mu M$) na linhagem de fibroblastos humanos MCR5.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a ZB pode representar um alvo terapêutico interessante para o estudo em glioblastoma.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bai RY, Staedtkea V, Riggins GJ. Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. Trends in Molecular Medicine. 2011;17(6):301-12.

Balch C, Yan P, Craft T, Young S, Skalnik DG, Huang TH, et al. Antimitogenic and chemosensitizing effects of the methylation inhibitor zebularine in ovarian cancer. Molecular Cancer Therapy. 2005;4(10):1505-14.

Ben-Kasus T, Ben-Zvi Z, Marquez VE, Kelley JA, Agbaria R. Metabolic activation of zebularine, a novel DNA methylation inhibitor, in human bladder carcinoma cells. Biochemical Pharmacology. 2005;70:121–133.

Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The Mammalian Epigenome. Cell. 2007;128 669-681.

Billam M, Sobolewski MD, Davidson NE. Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells. Breast Cancer Research Treatment. 2010;120(3):581-92.

Brandes AA, Tososni A, Enrico F. Glioblastoma in adults. Critical Rewiew in Oncology/Hematology. 2008;67:139-152.

Brassesco MS, Valera ET, Neder L, Castro-Gamero AM, Arruda D, Machado HR, et al. Polyploidy in atypical choroid plexus papilloma of the posterior fossa. Neuropathology. 2009;29:293-298.

Burgess R, Jenkins R, Zangue Z. Epigenetic changes in gliomas. Cancer Biology Therapy. 2008;7(9):1326-34.

Cadieux B, Ching TT, Vanden-Berg SR, Costello JF. Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation.Cancer Research. 2006;66:8469-76.

Cang S, Lu Q, Ma Y, Liu D. Clinical Advanceds in Hypomethylating Agents Targeting Epigenetic Pathwawys. Current Cancer Drug Targets. 2010 10:539:545. Champion C, Guianvarc'h D, Sénamaud-Beaufort C, Jurkowska RZ, Jeltsch A, Ponger L, et al. Mechanistic insights on the inhibition of c5 DNA methyltransferases by zebularine. PLoS One. 2010;5(8):1-11.

Chang JE, Khuntia D, Robins HI, Mehta MP. Radiotherapy and radiosensitizers in the treatment of glioblastoma multiforme. Clinical Advances in Hematology Oncology. 2007;5(11):894-902.

Chen M, Shabashvili D, Nawab A, Yang SX, Dyer LM, Brown KD, et al. DNA methyltransferase inhibitor, zebularine, delays tumor growth and induces apoptosis in a genetically engineered mouse model of breast cancer. Molecular Cancer Therapy. 2012;11(2):370-82.

Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, Ye W, Greer S, Marquez VE, et al. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. Journal of National Cancer Institute. 2003;95(5):399-409.

Cheng JC, Yoo CB, Weisenberger DJ, Chuang J, Wozniak C, Liang G, et al. Preferential response of cancer cells to zebularine. Cancer Cell. 2004;6(2):151-158.

Chou TC. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. Cancer Research. 2010;70(2):440-446.

Chou TC. Preclinical versus clinical drug combination studies. Leukemia & Lymphoma. 2008;49(11):2059-2080.

Chou TC. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. Pharmacological Reviews. 2006;58:621-681.

Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. Biochemical and Biophysical Research Communication. 2005;334:1351-1358.

Cortez CC, Jones PA. Chromatin, Cancer and Drug Therapies. Mutation Research. 2008;647(1-2):44-51.

De Schutter H, Nuyts S. Radiosensitizing potential of epigenetic anticancer drugs. Anticancer Agents in Medicinal Chemistry. 2009;9(1):99-108.

Dote H, Cerna D, Burgan WE, Carter DJ, Cerra M, Hollingshead MG, et al. Enhancement of in vitro and in vivo tumor cell radiosensitivity by the DNA methylation inhibitor zebularine. Clinical cancer research. 2005;11(12):4571-4579.

Ducasse M, Brown MA. Epigenetic Aberrations and Cancer. Molecular Cancer. 2006;5(60):1-10.

Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. Science. 2003;300:455.

Ertel A, Verghese A, Byers SW, Ochs M, Tozeren A. Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. Molecular Cancer. 2006;5(55):1-13.

Esteller M, Almouzni G. How epigenetics integrates nuclear functions. European Molecular Biology Organization (EMBO) reports. 2005;6:624-628.

Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. Cancer Research. 1999;59:793-797.

Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumoursuppressor genes. British Journal of Cancer. 2006;94:179-183.

Everhard S, Tost J, Abdalaoui HE, Crinière E, Busato F, Marie Y, et al. Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. Neuro Oncology. 2009;11(4):348-356.

Fanelli M, Caprodossi S, Ricci-Vitiani L, Porcellini A, Tomassoni-Ardori F, Amatori S, et al. Loss of pericentromeric DNA methylation pattern in human glioblastoma is associated with altered DNA methyltransferases expression and involves the stem cell compartment. Oncogene. 2008; 27, 358-365.

Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. Nature Reviews Cancer. 2004;4:143-153.

Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. Lancet Oncology. 2009;10:223-232.

Feng J, Chang H, Li E, Fan G. Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system. Journal of Neuroscience Research. 2005;79:734-746.

Flotho C, Claus R, Batz C, Schneider M, Sandrock I, Ihde S, et al. The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. Leukemia. 2009;(6):1019-1028.

Gallinari P, Di Marco S, Jones P, Pallaoro M, Steinkühler C. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. Cell Research. 2007;17:195-211.

Galm O, Herman JG, Baylin SB. The Fundamental Role of Epigenetics in Hematopoietic Malignancies. Blood Reviews. 2006;20:1-13.

Garzon R, Liu S, Fabbri M, Liu Z, Heaphy CE, Callegari E, et al. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. Blood. 2009;113:6411-6418.

Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. Science. 2003,300,489-492.

Grant R. Overview: brain tumour diagnosis and management: Royal College of physicians guidelines. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry. 2004;75(II):S18-S23.

Han L, Witmer PD, Casey E, Valle D, Sukumar S. DNA methylation regulates MicroRNA expression. Cancer Biology Therapy. 2007;6(8):1284-8.

Hanahan D, Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100(1):57-70.

Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. Clinical Cancer Research. 2004;10:1871-1874.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, Tribolet N, Weller M, et al. *MGMT* Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. New England Journal of Medicine. 2005;352(10):997-1003.

Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. New England Journal of Medicine. 2003;349(21):2042-2054.

Hermisson M, Klumpp A, Wick W, Wischhusen J, Nagel G, Roos W, et al. O6methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. Journal of Neurochemical. 2006;96:766-976.

Herranz M, Martín-Caballero J, Fraga MF, Ruiz-Cabello J, Flores JM, Desco M, et al. The novel DNA methylation inhibitor zebularine is effective against the development of murine T-cell lymphoma. Blood. 2006;107(3):1174-1177.

Hervouet E, Vallette FM, Cartron PF. Impact of the DNA methyltransferases expression on the methylation status of apoptosis-associated genes in glioblastoma multiforme. Cell Death and Disease. 2010;1(8):1-9.

Holland EC. Glioblastoma multiforme: The terminator. Proceedings of the Nationa Academy of Science. 2000;97(12):6242-6244.

Jair KW, Bachman K.E, Suzuki H, Ting AH, Rhee I, Yen RW, et al. De novo CpG island methylation in human cancer cells. Cancer Research, 2006;66:682-692.

Jeltsch A. Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. Current Topics in Microbioogy and. Immunology. 2006;301:203-225.

Jim B, Tao Q, Peng J, Soo HM, Wu W, Ying J, et al. DNA methyltransferase 3B (DNMT3B) mutations in ICF syndrome lead to altered epigenetic modifications and aberrant expression of genes regulating development, neurogenesis and immune function. Human Genetic Moleculars. 2007;17(5):690-709.

Jones PA, Baylin SB. The Fundamental Role of Epigenetics Events in Cancer. Nature Reviews Genetic. 2002;3:415-428.

Kanai Y, Ushijima S, Nakanishi Y, Sakamoto M, Hirohashi S. Mutation of the DNA methyltransferase (DNMT) 1 gene in human colorectal cancers. Cancer Letters. 2003;192:75-82.

Kanzawa T, Bedwell J, Kondo Y, Kondo S, Germano IM. Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant gliomas cell lines. Journal of Neurosurgery. 2003;99(6):1047-52.

Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. Nature Biotechnology. 2010;28(10):1069-1078.

Kim HJ, Kim JH, Chie EK, Park DY, Kim IA, Kim H. DNMT (DNA methyltransferase) inhibitors radiosensitize human cancer cells by suppressing DNA repair activity. Radiation Oncology. 2012,7(39):1-22.

Kitange GJ, Carlson BL, Schroeder MA, Grogan PT, Lamont JD, Decker PA, et al. Induction of MGMT expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts. Neuro Oncology. 2009;11(3):281-291.

Kleihues, P, Ohgaki, H. Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. Toxicologic Patology. 2000;28(1):167-170.

Kreth S, Thon N, Eigenbrod S, Lutz J, Ledderose C, Egensperger R, et al. O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) mRNA Expression Predicts Outcome in Malignant Glioma Independent of MGMT Promoter Methylation. Plos one. 2011;6(2):1-10.

Kurkjian C, Kummar S, Murgo AJ. DNA Methylation: Its Role in Cancer Development and Therapy Curr Probl Cancer. 2008;32(5):187-235.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T) Method. Methods. 2001;25:402-408.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. Acta Neuropathologica. 2007;114:97-109.

Lu Q, Qiu X, Hu N, Wen H, Su Y, Richardson BC. Epigenetics, disease, and therapeutic interventions. Ageing Research Reviews. 2006;5:449-467.

Marquez VE, Kelley JA, Agbaria R, Ben-Kasus T, Cheng JC, Yoo CB, et al. Zebularine: a unique molecule for an epigenetically based strategy in cancer chemotherapy. Annals of the New York Academy of Sciences. 2005;1058:246-254.

Marquez VE, Kelley JA, Agbaria R, Ben-Kasus T, Cheng JC, Yoo CB, et al. The evolution of our understanding on glioma. Brain Pathology. 2008;18(3):455-463.

Meador JA, Su Y, Ravanat JL, Balajee AS. DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)-deficient human glioblastoma cells are preferentially sensitized by Zebularine. Carcinogenesis. 2010;31(2):184-191.

Minniti G, Muni R, Lanzetta G, Marchetti P, Enrici RM. Chemotherapy for Glioblastoma: Current Treatment and Future Perspectives for Cytotoxic and Targeted Agents. Anticancer Research. 2009;29:5171-5184.

Miremadi A, Oestergaard MZ, Pharoah PD, Caldas C. Cancer genetics of epigenetic genes. Human Molecular Genetics. 2007;16(1):R28–49.

Muntean AG, Hess JL. Epigenetic Dysregulation in Cancer. The American Journal of Pathology. 2009;175(4):1353-1361.

Nagarajan RP, Costello JF. Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme. Seminars in Cancer Biology. 2009a;19:188-197.

Nagarajan RP, Costello JF. Molecular Epigenetics and Genetics in Neuro-Oncology. The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics. 2009b;6:436-446.

Natsume A, Kondo Y, Ito M, Motomura K, Wakabayashi T, Yoshida J. Epigenetic aberrations and therapeutic implications in gliomas. Cancer Science. 2010;101(6):1331-1336.

Nguyen S, Meletis K, Fu D, Jhaveri S, Jaenisch R. Ablation of de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in the nervous system leads to neuromuscular defects and shortened lifespan. Developmental Dynamics. 2007;236:1663-1676.

Ohgaki, H, Kleihues, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. The American Journal of Pathology. 2007;170(5):1445-1453.

Rajendran G, Shanmuganandam K, Bendre A, Mujumdar D, Goel A, Shiras A. Epigenetic regulation of DNA methyltransferases: DNMT1 and DNMT3B in gliomas. Journal of Neurooncology. 2011;104:483-494.

Reardon DA, Rich JN, Friedman HS, Bigner DD. Recent advances in the treatment of malignant astrocytoma. Journal of Clinical Oncology. 2006;24:1253-1265.

Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. Nature. 2002;416:552-556.

Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a, and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. Nucleic Acids Research, 1999;27:2291–2298.

Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. Oncogene. 2001;20:3139-3155

Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. Molecular Oncology. 2007;1:19-25.

Roy K, Wang L, Makrigiorgos GM, Price BD. Methylation of the ATM promoter in glioma cells alters ionizing radiation sensitivity. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2006;344(3):821-826.

Ruiz-Magaña MJ, Rodríguez-Vargas JM, Morales JC, Saldivia MA, Schulze-Osthoff K, Ruiz-Ruiz C. The DNA methyltransferase inhibitors zebularine and decitabine induce mitochondria-mediated apoptosis and DNA damage in p53 mutant leukemic T cells. International Journal of Cancer. 2012;130(5):195-207.

Sakakura C, Miyagawa K, Fukuda KI, Nakashima S, Yoshikawa T, Kin S, et al. Frequent silencing of RUNX3 in esophageal squamous cell carcinomas is associated with radioresistance and poor prognosis. Oncogene. 2007;26:5927-5938.

Stark A, Nabavi A, Mehdorn A, Blömer U. Glioblastoma multiforme: report of 267 cases treated at a single institution. Surgical Neurology. 2005;63:62-196.

Straetemans R,'Brien TO, Wouters L, Dun JV, Janicot M, Bijnens L, et al. Design and Analysis of Drug Combination Experiments Biometrical Journal. 2005;47(3):299-308.

Tang M, Xu W, Wang Q, Xiao W, Xu R. Potential of DNMT and its Epigenetic Regulation for Lung Cancer Therapy. Current Genomics. 2009;10(5):336-52.

Ting AH, McGarvey KM, Baylin SB. The Cancer Epigenome – Components and Funcional Correlates. Genes & Development. 2006;20:3215-3231.

ValenteV, Teixeira SA, Neder L, Okamoto OK, Oba-Shinjo SM, Marie SKN, et al. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. BMC Molecular Biology. 2009;10(17):1-11.

Weinhold B. Epigenetics: The Science of Change. Environmental Health Perspectives. 2006;114(3):160-167.

Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. New England Journal of Medicine. 2008;359:492-507.

Wu H, Coskun V, Tao J, Xie W, Ge W, Yoshikawa K, et al. Dnmt3a-Dependent Nonpromoter DNA Methylation Facilitates Transcription of Neurogenic Genes. Science. 2010;329(5990):444-448.

Yan H. Parsons W ,Jin G. McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. *IDH1* and *IDH2* Mutations in Gliomas. The New England Journal of Medicine. 2009;360(8):765-773.

Yan W, Zhang W, Jiang T. Oncogene addiction in gliomas: Implications for molecular target therapy. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2011;30(58):1-5.

Yoo CB, Cheng JC, Jones PA. Zebularine: a new drug for epigenetic therapy. Biochemical Society Transactions. 2004;32(6):910-912.

Yoo CB, Chuang JC, Byun HM, Egger G, Yang AS, Dubeau L, et al. Long-term epigenetic therapy with oral zebularine has minimal side effects and prevents intestinal tumors in mice. Cancer Prevention Research. 2008;1(4):233-40.

Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. Nature Reviews. 2006;5:37-50

Zhou H, Miki R, Eeva M, Fike FM, Seligson D, Yang L, et al. Reciprocal regulation of SOCS 1 and SOCS3 enhances resistance to ionizing radiation in glioblastoma multiforme. Clinical Cancer Research. 2007;13:2344-2353.

Zhou L, Cheng X, Connolly BA, Dickman MJ, Hurd PJ, Hornby DP. Zebularine: A Novel DNA Methylation Inhibitor that Forms a Covalent Complex with DNA Methyltransferases Journal of Molecular Biology. 2002;321(4):591-599.

8. ANEXOS

8. ANEXOS

8.1 ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO 84 (88) www.hcrp.usp.br USP - RIBEIRÃO Ribeirão Preto, 08 de dezembro de 2009 Oficio nº 4111/2009 CEP/MGV Prezados Senhores, O trabalho intitulado "ESTUDO DOS EFEITOS DA INIBIÇÃO DAS DNA METIL-TRANSFERASES (DNMT1, DNMT3A E DNMT3B) EM GLIOBLASTOMA" foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 300ª Reunião Ordinária realizada em 07/12/2009 e enquadrado na categoria: APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com o Processo HCRP nº 8607/2009. Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS. Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa. Atenciosamente. arcia Trelamore DR" MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP Ilustríssimos Senhores DANIEL ANTUNES MORENO PROF. DR. LUIZ GONZAGA TONE (Orientador) Depto. de Puericultura e Pediatria Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4 Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

8.2 ANEXO 2 – Artigo

Anti-Cancer Drugs

Zebularine decreases cell proliferation, colony formation, induces apoptosis and causes radiosensibilization in glioblastoma cell lines

Manuscript Number:			
Full Title:	Zebularine decreases cell proliferation, colony formation, induces apoptosis and causes radiosensibilization in glioblastoma cell lines		
Article Type:	Original Study		
Section/Category:	Pre-Clinical Report		
Keywords:	Glioblastoma; Zebularine; Temozolomide; Radiation.		
Corresponding Author:	Daniel Antunes Moreno School of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo - SP Brazil Ribeirão Preto, BRAZIL		
Corresponding Author Secondary Information:			
Corresponding Author's Institution:	School of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo - SP Brazil		
Corresponding Author's Secondary Institution:			
First Author:	Daniel Antunes Moreno		
First Author Secondary Information:			
Order of Authors:	Daniel Antunes Moreno		
	Kleiton Silva Borges, MS		
	Angel Mauricio Castro-Gamero, MS		
	Rosane Gomes de Paula Queiroz, PhD		
	Carlos Alberto Scrideli, PhD		
	Luiz Gonzaga Tone, PhD		
Order of Authors Secondary Information:			

Zebularine decreases cell proliferation, colony formation, induces apoptosis and causes radiosensibilization in glioblastoma cell lines

Effects of zebularine in glioblastoma

Daniel A Moreno^a, Kleiton S Borges^a, Angel M Castro-Gamero^a, Rosane G P Queiroz^b, Carlos A Scrideli^b, Luiz G Tone^b.

Departments of ^aGenetics and ^bPediatrics, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Corresponding author: Daniel Antunes Moreno

Email: danielmoreno@usp.br

Phone number +551691222852/ Fax +551636022297

Adress: Hospital das Clínicas - Bloco G 1º. Andar, sala 218,- FMRP/USP. Av Bandeirantes 3900, campus universitário, Monte Alegre - Ribeirão Preto / SP Brasil CEP: 14049-900. No conflict of interest

Financial Support: Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), process number 2009/50118-2.

Abstract

Glioblastoma is the most frequent and aggressive glioma. Currently, surgery, radiotherapy and chemotherapy adjuvant/concomitant with temozolomide has been the standard treatment protocol but survival is still extremely poor. In addition most patients do not respond to temozolomide indicating the need for alternative chemotherapy. Zebularine is a stable and slight toxic DNA metiltransferase inhibitor (DNMTi) that showed promising effects in cancer but little is known about zebularine in glioblastoma. The objectives of this study were to analyze the effects of zebularine combined or not with temozolomide in irradiated/nonirradiated glioblastoma and fibroblast cell lines. Proliferation (XTT), clonogenic, radiation and apoptosis (Anexin V) assays were performed in three glioblastoma (U251, SF88, T98G) and one fibroblast (MRC5) cell lines. For statistical analysis we used SPSS17 software (oneway ANOVA). It was observed decrease in cell proliferation from 50-100µM of zebularine and 250-500µM of temozolomide in GBM cell lines (p<0.05) but was not observed synergism in most combinations doses. Zebularine (100μ M) and temozolomide (10μ M) decrease colony formation in non-irradiated/irradiated U251 and SF188 cell lines (p<0.05). T98G did not responded to temozolomide but showed response to zebularine (p<0.05). In MRC5 temozolomide (10µM) was more cytotoxic than zebularine (100µM) (p<0.05). Zebularine (100µM) increased apoptosis in all glioblastoma cell lines analyzed. Results obtained in this study can indicate that zebularine decreases cell proliferation, colony formation in temozolomide resistant glioblastoma cell line, is less toxic than temozolomide and may be an interesting therapeutic target for future studies in glioblastoma.

Key words: Glioblastoma, Zebularine, Temozolomide, Radiation.

Introduction

Gliomas arise from glial cells and are the most common central nervous system tumors. They are divided in four groups: pilocytic astrocytoma (grade I), difuse astrocytoma (grade II), anaplastic astrocytoma (grade III) and glioblastoma (grade IV or GBM). GBM is one of the most aggressive forms of central nervous system (CNS) tumors and most frequent glioma representing 65% cases. This type of tumor can occur in any age but it's rare in children [1,2,3,4,5].

Some characteristics of GBM as the absence of anatomical boundaries, invasive potential, genetic complexity and cellular heterogeneity make difficult therapeutic intervention. [4,5,6; 7; 8]. Despite advances in treatment, currently therapy for most GBM patients consists in surgery followed by radiotherapy and concomitant/adjuvant chemotherapy with temozolomide (TMZ). but the median survival remains very low (12 to 15 months) [9,10]. Moreover approximately half of GBM patients present demethylation and/or expression of *MGMT* (O6-methylguanine-DNA methyltransferase) that encodes a DNA repair protein which removes alkyl groups of the O6 position of guanine, and do not respond to chemotherapy with DNA alkylating agent TMZ. This group of patients has no benefit from TMZ plus radiotherapy treatment indicating the need of alternative chemotherapic drugs [11, 12, 13].

Besides genetic alterations, GBM has multiple epigenetic alterations like changes in histone modifications and DNA methylation. Epigenetic is a term used to inheritable and potentially reversible mechanisms that alter gene expression without changes in DNA sequence. Genome wide hypomethylation occurs at a high frequency in GBM affecting the genetic stability in this tumor. Locus specific hypermetilation promoter regions that results in silencing of suppressor tumor genes is also frequent in GBM and some of these abnormalities can be reversible using epigenetic drugs like DNA methyltransferases inhibitors (DNMTi) [14, 15, 16].

Recently several DNMTi agents as Azacitidine (5-azacitidine; 5-Aza-CR; Vidaza) and Decitabine (5-Aza-2-desoxicitidine; 5-Aza-CdR; Dacogen) has been used in clinical trials and treatment of myelodysplastic syndromes and acute leukemias showing promising effects in many types of cancer [17,18]. Although showing anticancer effects, these drugs are considered to be relatively unstable and toxic agents [19].

Zebularine (ZB) is a cytidine analog described as a potent DNMTi that acts by forming a covalent complex with DNA methyltransferases (DNMT) when incorporated into DNA [20]

that showed low cytotoxicity, high chemical stability and acts preferentially in cancer cells. It is considered a promising agent for cancer treatment, but little is known about effects of ZB in GBM [16, 17, 19, 20]. Then the objectives of this study were to analyze the effects of ZB combined or not with TMZ in irradiated/non-irradiated GBM and fibroblast cell lines.

Methods

Cell lines

In this study were included three GBM cell lines (U251, SF188, T98G) and one human fibroblasts cell line (MRC5). T98G, U251 e MRC5 were purchased from the American Type Culture Collection, (ATCC, VA, EUA). Pediatric GBM cell line SF188 was kindly provided by Dr Michael S. Bobola (Department of Neurological Surgery, University of Washington, Seattle, WA). Cultures were maintained in HAM F10 medium (Gibco BRL, Life Technologies ®, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100U/mL) and streptomycin (100µg/mL) (Sigma ® Chemical Co., St. Louis , MO, USA) in a humidified atmosphere containing 5% CO2 at 37 ° C. This study was approved by Ethic committee of School of Medicine of Ribeirão Preto/University of São Paulo – Brazil (Process HCRP 8607/2009).

Drugs

Zebularine was obtained from Tocris Bioscience – USA and temozolomide from Sigma Aldrich \mathbb{R} – USA. The compounds were diluted in DMSO stored at -20°C. Stock solutions were prepared at 100mM of ZB and 200mM of TMZ. Drugs were added at HAM medium at maximum 0.8% of DMSO before being applied in cell cultures.

Cell Proliferation and drug combination assays

Cell Proliferation assays were performed at a least three separate experiments in triplicate using XTT kit (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). Cells were seeded in 96-well plates at 3 x 10^3 per well and maintained in culture. After 24 h, cells were treated with drugs maintained for 72 hours with 50, 100, 200, 400µM of ZB, 250, 500, 1000, 2000µM of TMZ and respectively combinations (1:5 proportion). The plates were incubated for 2 h at 37°C, and the formazan product was measured at 450 nm using an iMark microplate reader (Bio-Rad Laboratories). Combination assays was based on the method described by Chou and Talalay (1984) and the drug-induced cytotoxic synergy was analyzed using the CalcuSyn software (Biosoft, Cambridge, UK) assuming that combination index (CI) of 1 indicates an

additive drug interaction, whereas a CI > 1 is antagonistic and a score lower than 1 is synergistic [22].

ZB and TMZ doses used for the combination experiments were based on the recommendations described by Chou [23] and so as not to exceed the maximum DMSO concentration adopted for this study (0.8%).

Apoptosis assays

GBM cell lines (U251, SF188 and T98G) were treated with 100, 200 and 300 μ M of ZB for 96 hours. Apoptotic cell death was determined by labeling with Annexin V - fluorescein isothiocyanate (FITC) (BD Biosciences Pharmigen, USA). Briefly, after drug treatment, 150.000 cells were trypsinized and centrifuged at 1.000 rpm for 5 min at 4°C, washed with ice-cold PBS and then resuspended in 300 μ L of 1X Annexin V binding buVer (BD Biosciences Pharmigen, USA). Cells were stained with 5 μ L of annexin V-FITC and 50 μ L of a solution 50 μ M propidium iodide (PI) and incubated at room temperature in the dark. The samples were analyzed using a BD FACSCaliburTM Flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Radiation clonogenic survival assay

The clonogenic assays in GBM (U251, T98G, and SF188) and fibroblasts (MRC5) cell lines were performed in triplicate in at least two different times. Cultures were treated with 100 μ M of ZB and 10 μ M of TMZ, subjected to irradiation (2, 4 and 6Gy). MRC5 was subjected only to 2Gy. Drug doses were chosen to be the lower doses that showed significant differences compared to control experiments without radiation in GBM cell lines.

Three hundred cells were plated in 1ml of HAM medium per dish at 12 well plates. After 24 hours were performed treatment with ZB (100 μ M), TMZ (10 μ M) and the cultures were incubated for 48 hours in a humidified atmosphere containing 5% of CO2 at 37 ° C. After that, cells were irradiated with 2, 4 and 6 Gy of X-ray radiation (3.20 Gy/min) using a Gammatron S-80 device equipped with a Cobalt-60 source (Siemens Medical Systems, Inc., South Iselin, USA). The irradiated cells were then cultured in a incubator with 5% of CO2 at 37°C for an additional 10–14 days. Individual colonies (more than 50 cells per colony) were fixed with methanol, stained with crystal violet and subsequently counted. The survival fraction was calculated in relation to controls values.

Statistical Analyses

The statistical analysis was performed using SPSS 17.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) using One Way ANOVA and Bonferroni post-test considering p < 0.05 statistically significant results for functional assays of cell proliferation, clonogenic and apoptosis.

Results

Cell proliferation and drug combinations assays

GBM cell lines U251, SF188 and T98G were treated with ZB (50, 100, 200, 400 μ M), TMZ (250, 500, 1000, 2000 μ M) and respectively doses combinations of these drugs. The results are showed at figure 1.

ZB decreased significantly the cell proliferation at doses of 100- 400 μ M in U251 and SF188 cell lines and at doses of 50-400 μ M at T98G (p<0.05) (Figure 1A). Doses of 500-2000 μ M of TMZ decreased cell proliferation in SF188 and T98G and doses of 250-2000 μ M in U251 (p<0.05) (Figure 1B). ZB and TMZ combinations doses from 50+250, 100+500 and 200+1000 μ M decreased cell proliferation in U251, SF188 and T98G cell lines respectively (p<0.05) (Figure 1C).

The results obtained from cell proliferation assays were analyzed using Calcusyn® software. ZB growth inhibition of 50% (IC50) observed were 735.9 μ M for U251, 523.1 μ M for SF188 and 208.9 μ M for T98G cell line. TMZ IC50 values were 104.8 μ M for U251, 1090.7 μ M for SF188 and 1219.8 μ M for T98G cell line.

Combinations of 50μ M + 250μ M and 200μ M + 1000μ M of ZB and TMZ showed synergy (CI=0,61) and near addictive effect (CI=0.93) respectively in U251 cell line. Combinations of $100 + 500\mu$ M and $200 + 1000\mu$ M showed moderate synergy (CI=0.72) and near addictive effect (CI=0.97) in SF188. All other combinations showed antagonistic effect (CI>1) (Table 1).

Apoptosis assays

Apoptosis experiments showed that 100, 200 and 300 μ M of ZB increased apoptosis significantly in glioblastoma cell lines U251, SF188 and T98G when compared with controls (p<0.05). The graphic of figure 2 represents the sum of percentage of cells labeled with anexin V and propidium iodite (PI) in GBM cell lines after ZB treatments.

Clonogenic assays of glioblastoma cell lines treated with zebularine, temozolomide and irradiated

Clonogenic assays were made in triplicate at least in 3 different times in glioblastoma cell lines (U251, SF188 and T98G) treated with TMZ ($10\mu M$) and ZB ($100\mu M$) and irradiated with 2, 4 and 6 Gy (Figure 3).

U251 treated with ZB (100 μ M) and TMZ (10 μ M) showed decrease of colony formation for all radiation doses tested when compared to controls (p<0.05). At 2Gy TMZ was more efficient in U251 compared to ZB (p=0.002) (Figure 3A). SF188 showed these differences only to 4 and 6 Gy compared to controls (Figure 3B). It was not observed differences in T98G irradiated with 2, 4 and 6Gy treated with TMZ (10 μ M) comparing controls but this cell line was sensitive to ZB (100 μ M) with 2, 4 and 6Gy (p<0.05) (Figure 3C).

Clonogenic assay of fibroblast cell line (MRC5) treated with ZB, TMZ and irradiated

The survival clonogenic assay was made at MRC5 to compare the cytotoxic effects of ZB (100μ M) and TMZ (10μ M) in non-irradiated and irradiated (2Gy) fibroblastic cell line. The results of these experiments showed that ZB (100μ M) and TMZ (10μ M) decreased colony formation in MRC5 cell line irradiated (2Gy) and non irradiated (0Gy) (p<0.05) (Figure 4). Comparing ZB (100μ M) with TMZ (10μ M) it was observed that TMZ decreased significant higher colony formation in irradiated with 2Gy (p=0.038) and non-irradiated (0Gy) MRC5 cell line (p=0.030).

Discussion

Glioblstoma (GBM) is an agressive and lethal brain tumor characterized for cytogenetic complexibility, genetic and epigenetic alterations. The cellular heterogenity and difuse topography due to invasive potential make difficult the therapeutic intervention. Actually surgery, radiotherapy and concomitant/adjuvant chemotherapy with temozolomide (TMZ) is used as standard treatment protocol for many GBM patients. Despite advanceds in treatment approximately half of GBM patients do not respond to TMZ plus radiotherapy and survival remais extremely poor [1, 3, 4, 5].

Therapeutic intervention in epigenetic mechanisms in GBM can be a great choice because these mechanisms are altered in this tumor and DNA methyltransferases inhibitors (DNMTi) have shown promising results in many types of cancers [17, 24, 25]. Zebularine (ZB) is a DNMTi which have interesting proprieties for cancer therapy including stability, low toxicity and preferentially action against cancer cells [19]. Some studies have demonstrated that ZB promotes radiosensibility in GBM cell lines [26, 27].

Due to these ZB characteristics we decide to investigate and compare the effects of ZB and TMZ in GBM and fibroblast cell lines irradiated and non-irradiated. For these purposes, first we investigated the effects of ZB (50-400 μ M) isolate and in combination with TMZ (250-2000 μ M) on glioblastoma cell lines by proliferation assays. Subsequently were performed apoptosis assay in GBM cell lines treated with ZB. Finally we analyzed the capacity of colony formation of GBM and fibroblasts cell lines treated with ZB, TMZ, irradiated and non-irradiated.

In the cell proliferation assays the IC50 values of treatment with ZB showed variation in GBM cell lines. The IC50 values were 735.9; 523.1 and 208.9 μ M in U251, SF188 and T98G cell lines respectively. It was observed significant decreased of cell proliferation at doses of 100-400 μ M in U251 and SF188 and 50-400 μ M of ZB in T98G cell line (Figure 1A) (p<0.05). The lower dose used of ZB (50 μ M) decreased significant cell proliferation in T98G cell line that showed the lower IC50 value (208.9 μ M) comparing with the others GBM cell lines.

ZB also showed anti-neoplastic effects ovary cancer [28], intestine [29], T cell lymphoma [30] and acute myeloid leukemia [31, 32]. One study reported IC50 values form 100-150µM of ZB in two breast cancer cell lines treated for 96 hours [33]. Another study reported ZB IC50 values of 50 and 300µM on GBM cell lines MO59J MO59K respectively [27] Comparing with the present work, the lower IC50 of ZB doses described in other studies [27, 33] may be associated with characteristics of the cell lines studied or methodological differences as ZB time exposition.

In this study, treatment with TMZ also showed variation of response among GMB cell lines. TMZ decreased cell proliferation from 250-2000 μ M in U251 and from 500-2000 μ M on SF188 and T98G cell lines (Figure 1B) (p <0.05). TMZ IC50 values were 104.8, 1090.7, 1219.8 μ M in U251, T98G, and SF188 cell lines respectively.

Another study including 12 gliomas cell lines treated with TMZ for 72 hours also reported variation of IC50 values from 87 to 1290 μ M in cell proliferation assays. High concentrations of TMZ were used in GBM cell lines suggesting cytostatic effects in the proliferation assays [34].

For ZB and TMZ combinations analysis was used Calcusyn software (Cambirdge - United Kingdom 1997). The program is based on the experimental effects (Dose and fraction

affected) of isolated drugs and combinations providing important data for drug combinations analysis as IC50 and combination index (CI) [23, 35].

The use of multiple drugs may be effective for achieving a variety of targets simultaneously or act on the same target more efficiently. The possible favorable result of synergism produced by a drug combination include increasing the effectiveness, lowering the dose and decrease toxicity. To achieve these goals, the combinations of drugs have been widely used to combat serious diseases like cancer [35, 36].

Surprisingly, the majority of the ZB and TMZ dose combinations tested in this study showed no synergism. On U251 cell line it was observed CI less than 1 in 50 + 250 μ M (CI = 0.610), 200 +1000 μ M (IC = 0.929) of TMZ+ZB. In SF188 100+500 μ M (CI = 0.720), 200+1000 μ M (CI = 0.969) in combinations of ZB and TMZ respectively. T98G cell line showed no synergistic effect for all doses combinations tested.

When two drugs are combined and subjected to a series of dilutions the biological mixture behaves as a third drug and sometimes may show less efficiency comparing with isolated drugs [36]. According description of synergism or antagonism in drug combination studies using the combination index method described for Chou and Talahay (1984), in this study was observed synergism only in U251 cell line treated with 50 + 250 μ M of ZB + TMZ (IC = 0.610). All other dose combinations showed a variation of the CI indicating moderate synergism (CI = 0.72) to very strong antagonism (CI = 20.88). Considering that for serious diseases such cancer, high levels of synergy are more therapeutically relevant [22, 36], results obtained in this study indicate that ZB and TMZ combinations should not represent an efficient strategy for therapeutic intervention but other drugs combinations may represent an interesting area for studies of GBM therapy.

Apoptosis assays in GBM cell lines U251, SF188 and T98G treated with 100, 200 and 300 μ M of ZB showed increase of apoptosis from 100 μ M of ZB in the three cell lines analyzed compared to control experiments but there was no significant differences comparing doses of 200 and 300 μ M indicating that dose of 200 μ M of ZB reach a plateau in apoptosis assays.

Studies have demonstrated that ZB causes apoptosis in breast cancer [37], T-cell leukemia [38] and doses of 100 and 300 μ M for 72 hours exposure also showed dose-dependent apoptosis in GBM cell line MO59J [27].

Disruption of apoptosis is an important event for cancer progression [39]. It is hypothesized that aberrant methylation of apoptosis associated genes like *BCL2*, *BAX* and *XAF1* may be involved in apoptosis evasion observed in gliomas [40], however the mechanisms which demethylation caused by ZB promotes apoptosis are not totally known.

The clonogenic assays performed in this study evaluated the radiosensitization potential of ZB comparing with TMZ in GBM lines. ZB (100μ M) and TMZ (10μ M) were chosen to be the lowest doses that showed significant differences in non-irradiated GBM cell lines compared to controls in prior experiments, excepted for T98G cell line which did not responded to TMZ.

Treatments with ZB and TMZ showed similar results in U251 cell line, excepted for 2Gy radiation dose that TMZ was more efficient (p=0.002) (Figure 3A).

SF188 revealed significant differences only in 4 and 6Gy for ZB and TMZ treatment comparing to controls and there were no differences comparing ZB and TMZ treatment in this cell line (Figure 3B). These data indicating that ZB (100μ M) and TMZ (10μ M) have similar effects in irradiated and non-irradiated U251 and SF188 GBM cell lines.

Furthermore T98G irradiated with 2, 4 and 6Gys showed no differences between the control experiments and TMZ treatment. ZB showed significant differences in all radiation doses tested compared to control and TMZ treatment (Figure 3C) indicating the effectiveness of ZB in this TMZ resistant GBM cell line.

T98G resistance to TMZ was related in other studies [34, 41]. A possible explanation for the resistance to alkylant agent TMZ is that T98G express *MGMT* gene encoding a protein witch acts on DNA repair removing alkyl group from DNA [42]. MGMT activity is strongly correlated with resistance to TMZ in clonogenic assays and the expression of MGMT is the primary indicator of resistance to this drug [34].

The resistance to TMZ was also associated with *MGMT* demethylation and expression in most GBM patientes indicating the need for alternative drugs to sensitize the GBM cells to irradiation [13, 42].

ZB promotes radiosensibilization in pancreatic (Mia-Paca), prostate carcinoma (DU145) [26] and lung cancer (A549) cell lines [43]. The GBM cell lines U251 [26], U373MG [43] and MO59J [27] also showed increase of radiosensitivity after ZB treatment supporting the idea that ZB may be an important chemotherapeutic target for studies of radiosensitivity in GBM.

The exact mechanisms which DNMTi cause radiosensitization in GBM are still unclear. On one hand demethylation and gene re-expression of *ATM* gene can activate DNA repair mechanisms and decrease the radiosensitivity in GBM [44]. On the other hand, treatment with DNMTi (5-aza-2-deoxycytidine) promotes restatement of the *RUNX3* which increases radiation induced cell death and radiosensitivity [45].

It is believed that the mechanisms which DNMTi promotes radiosensitization is related to genetic instability caused by globlal DNA demethylation and deregulation in DNA repair [26, 43, 46].

Another investigation conducted in this work was about cytotoxicity of ZB compared with TMZ in human fibroblasts. For this analysis, clonogenic assays were performed in MRC5 cell line treated with ZB (100 μ M) and TMZ (100 μ M) non-irradiated and irradiated with 2Gy. Compared with experiments controls, MRC5 showed a significant reduction in the colonies formation for both ZB (100 μ M) and TMZ (10 μ M) treatments in irradiated with 2Gy and non-irradiated cultures (Figure 4). But when was compared TMZ (10 μ M) with ZB (100 μ M) in both non-irradiated and irradiated MRC5 was observed lower colony formation after TMZ treatment with indicating that 10 μ M of TMZ is more cytotoxic than 100 μ M of ZB in

A study compared the effects of ZB in 7 cancer cell lines (bladder, pancreas, prostate, colon and lung) with 4 human fibroblasts cell lines (LD98, T-1, and CCD-1070Sk LD419) and demonstrated that continuous ZB treatment for 8 days sensitize preferentially neoplastic cells compared with fibroblasts [19]. However we did not found other studies in the literature that compared the effects of ZB with TMZ in GBM and fibroblasts cell lines.

In recent years the characterization of epigenetic alterations in cancer has aroused particular interest because these changes can be reversed using epigenetic drugs as DNMTi [46]. Among the DNMTi, ZB have interesting properties to cancer therapy [19]. Moreover ZB has shown antineoplastic effects and promotes radiosensitization GBM cell lines which make this interesting drug to study this type of neoplasm [26, 27, 43].

In the present study we observed that the ZB decreased cell proliferation, promotes apoptosis and decreased colony formation in non-irradiated and irradiated GBM cell lines. ZB also decreased colony formation in the line T98G TMZ resistant cell line and showed lower toxicity in fibroblasts.

All these ZB proprieties mentioned and the results obtained in this study indicate that this drug is a potential subject for *in vivo* experiments and may represent a future alternative chemotherapy to TMZ for radiosensitization in GBM.

Acknowledgements

fibroblasts.

We thank Patrícia Vianna Bonini Palma, Camila Cristina de Oliveira Menezes Bonaldo and Daiane Fernanda dos Santos, Hemocentro-FMRP-USP, Ribeirão Preto, Brazil, for their assistance with the Flow cytometry. Dr Harley Francisco de Oliveira and his group for assistance in radiation assays FMRP-USP. Financial Support from Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and Department of Genetics of School of Medicine of Ribeirão Preto of University of São Paulo.

References

[1] Bai RY, Staedtkea V, Riggins GJ. Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. *Trends in Molecular Medicine* 2011; 17(6):301-312.

[2] Brandes, AA, Tososni, A, Enrico, F. Glioblastoma in adults. *Critical Review in Oncology/Hematology* 2008; 67:139-152.

[3] Holland, E. C. Glioblastoma multiforme: The terminator. Proceedings of the Nationa Academy of Science 2000; 97(12):6242–6244.

[4] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007
WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica* 2007; 114:97-109.

[5] Ohgaki, H, Kleihues, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American Journal of Pathology* 2007; 170(5):1445-1453.

[6] Grant, R. Overview: brain tumour diagnosis and management: Royal College of physicians guidelines. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 2004; 75(II):S18-S23.

[7] Kleihues, P, Ohgaki, H. Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. *Toxicologic Patology* 2000; 28(1):167-170.

[8] Stark A, Nabavi A, Mehdorn A, Blömer U. Glioblastoma multiforme: report of 267 cases treated at a single institution. *Surgical Neurology* 2005; 63:62-196.

[9] Minniti G, Muni R, Lanzetta G, Marchetti P, Enrici RM. Chemotherapy for Glioblastoma: Current Treatment and Future Perspectives for Cytotoxic and Targeted Agents. *Anticancer Research* 2009; 29:5171-5184.

[10] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 2005; 352(10):987-96.

[11] Everhard S, Tost J, Abdalaoui HE, Crinière E, Busato F, Marie Y, et al. Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro Oncology* 2009; 11(4):348-356.

[12] Kitange GJ, Carlson BL, Schroeder MA, Grogan PT, Lamont JD, Decker PA, et al. Induction of MGMT expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts. *Neuro Oncology* 2009; 11(3): 281–291.

[13] Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, Tribolet N, Weller M, et al. *MGMT* Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 2005; 352(10):997-1003.

[14] Nagarajan R.P., Costello J.F. Molecular Epigenetics and Genetics in Neuro-Oncology. *The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics* 2009; 6:436–446.

[15] Natsume A, Kondo Y, Ito M, Motomura K, Wakabayashi T, Yoshida J. Epigenetic aberrations and therapeutic implications in gliomas. *Cancer Science* 2010; 101(6):1331-1336.

[16] Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature Reviews* 2006; 5: 37-50.

[17] Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nature Biotechnology* 2010; 28(10):1069-1078.

[18] Cang S, Lu Q, Ma Y, Liu D. Clinical Advanceds in Hypomethylating Agents Targeting Epigenetic Pathwawys. *Current Cancer Drug Targets* 2010; 10:539:545.

[19] Cheng JC, Yoo CB, Weisenberger DJ, Chuang J, Wozniak C, Liang G, et al. Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell* 2004; 6(2):151-158.

[20] Champion C, Guianvarc'h D, Sénamaud-Beaufort C, Jurkowska RZ, Jeltsch A, Ponger L, et al. Mechanistic insights on the inhibition of c5 DNA methyltransferases by zebularine. *PLoS One* 2010; 5(8):e12388.

[21] Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, Ye W, Greer S, Marquez VE, et al. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularina. *Journal of National Cancer Institute* 2003; 95(5):399-409.

[22] Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advanced Enzyme Regulation* 1984; 22:27–55.

[23] Chou TC. Preclinical versus clinical drug combination studies. *Leukemia & Lymphoma* 2008; 49(11):2059–2080.

[24] Nagarajan RP, Costello JF. Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme. *Seminars in Cancer Biology* 2009; 19:188–197.

[25] Yoo CB, Cheng JC, Jones PA. Zebularine: a new drug for epigenetic therapy. *Biochemical Society Transactions* 2004; 32(6):910-912.

[26] Dote H, Cerna D, Burgan WE, Carter DJ, Cerra M, Hollingshead MG, et al. Enhancement of in vitro and in vivo tumor cell radiosensitivity by the DNA methylation inhibitor zebularine. *Clinical Cancer Research* 2005; 11(12):4571-9.

[27] Meador JA, Su Y, Ravanat JL, Balajee AS. DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)deficient human glioblastoma cells are preferentially sensitized by Zebularine. *Carcinogenesis* 2010; 31(2):184–191.

[28] Balch C, Yan P, Craft T, Young S, Skalnik DG, Huang TH, et al. Antimitogenic and chemosensitizing effects of the methylation inhibitor zebularine in ovarian cancer. *Molecular Cancer Therapy* 2005; 4(10):1505-14.

[29] Yoo CB, Chuang JC, Byun HM, Egger G, Yang AS, Dubeau L, et al. Long-term epigenetic therapy with oral zebularine has minimal side effects and prevents intestinal tumors in mice. *Cancer Prevention Research* 2008; 1(4):233-40.

[30] Herranz M, Martín-Caballero J, Fraga MF, Ruiz-Cabello J, Flores JM, Desco M, et al. The novel DNA methylation inhibitor zebularine is effective against the development of murine T-cell lymphoma. *Blood* 2006; 107(3):1174-7.

[31] Scott SA, Lakshimikuttysamma A, Sheridan DP, Sanche SE, Geyer CR, DeCoteau JF. Zebularine inhibits human acute myeloid leukemia cell growth in vitro in association with p15INK4B demethylation and reexpression. *Experimental Hematology* 2007; 35(2):263-73.

[32] Flotho C, Claus R, Batz C, Schneider M, Sandrock I, Ihde S, et al. The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 2009; (6):1019-28.

[33] Billam M, Sobolewski MD, Davidson NE. Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells. *Breast Cancer Research Treatment* 2010; 120(3):581-92.

[34] Hermisson M, Klumpp A, Wick W, Wischhusen J, Nagel G, Roos W, et al. O6methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *Journal of Neurochemical* 2006 ;96:766–76.

[35] Chou TC. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Research* 2010; 70(2): 440-446.

[36] Chou TC. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacological Reviews* 2006; 58:621–681.

[37] Chen M, Shabashvili D, Nawab A, Yang SX, Dyer LM, Brown KD, et al. DNA methyltransferase inhibitor, zebularine, delays tumor growth and induces apoptosis in a

genetically engineered mouse model of breast cancer. *Molecular Cancer Therapy* 2012; 11(2):370-82.

[38] Ruiz-Magaña MJ, Rodríguez-Vargas JM, Morales JC, Saldivia MA, Schulze-Osthoff K, Ruiz-Ruiz C. The DNA methyltransferase inhibitors zebularine and decitabine induce mitochondria-mediated apoptosis and DNA damage in p53 mutant leukemic T cells. *International Journal of Cancer* 2012;130(5):1195-207.

[39] Hanahan, D., and Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100(1):57-70.

[40] Hervouet E, Vallette FM, Cartron PF. Impact of the DNA methyltransferases expression on the methylation status of apoptosis-associated genes in glioblastoma multiforme. *Cell Death and Disease* 2010;1(8):1-9.

[41] Kanzawa T, Bedwell J, Kondo Y, Kondo S, Germano IM. Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant gliomas cell lines. *Journal of Neurosurgery* 2003; 99(6):1047-52.

[42] Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clinical Cancer Research* 2004; 10:1871–1874.

[43] Kim HJ, Kim JH, Chie EK, Park DY, Kim IA, Kim H. DNMT (DNA methyltransferase) inhibitors radiosensitize human cancer cells by suppressing DNA repair activity. *Radiation Oncology* 2012, 7(39):1-22.

[44] Roy K, Wang L, Makrigiorgos GM, Price BD. Methylation of the ATM promoter in glioma cells alters ionizing radiation sensitivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006; 344(3):821-6.

[45] Sakakura C, Miyagawa K, Fukuda KI, Nakashima S, Yoshikawa T, Kin S, et al.. Frequent silencing of RUNX3 in esophageal squamous cell carcinomas is associated with radioresistance and poor prognosis. *Oncogene* 2007; 26:5927-5938.

[46] De Schutter H, Nuyts S. Radiosensitizing potential of epigenetic anticancer drugs. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry* 2009; 9(1):99-108.



Figure Legends

Figure1. Results of cell proliferation assay after 72 hours treatment with zebularine (A) temozolomide (B) and combinations of zebularine + temozolomide (C) in U251, SF188 and T98G glioblastoma cell lines. *Significant differences compared to controls (p<0.05).



Figure2. Apoptosis assays on glioblastoma cell lines U251, SF188 and T98G treated for 96 hours with 100, 200 e 300μ M of ZB. *Significant differences compared to controls (p<0.05).



Figure 3. Clonogenic assays of glioblastoma cell lines U251 (A), SF188 (B) and T98G (C) treated with ZB (100 μ M), TMZ (10 μ M) for 48 hours and irradiated with 0, 2, 4 e 6 Gy. *Significant differences compared to controls (0, 2, 4 and 6Gy) (p<0.05).



Figure 4. Clonogenic assay in fibroblast cell line MRC5 treated with 100µM of Zebularine (ZB) or 10µM temozolomide (TMZ) for 48 hours, irradiated (2Gy) and non irradiated (0Gy). *Significant differences compared to controls (p<0.05).

Doses			CI		
ZB (µM)	TMZ (µM)	U251	SF188	T98G	
50	250	0.61	1.06	20.88	
100	500	1.74	0.72	4.58	
200	1000	0.93	0.97	2.70	
400	2000	1.23	1.21	2.98	

Table 1 - Doses of zebularine and temozolomide used in combination experiments and thecombination index (CI) for glioblastoma cell lines U251, SF188 and T98G.

Legend of Table 1. ZB: Zebularine, TMZ: Temozolomide, CI: Combination Index
8.3 ANEXO 3 - Comprovante de submissão do artigo

Correio :: Mensagens: ACD Submission Confirmation for Zebularine...

https://webmail.usp.br/message.php?mailbox=INBOX&index=1710

Situação da Quota: 70,23 MB / 100,00	MB (70,23%)
proliferation, colony formation, induces apopto	Zebularine decreases cell sis and causes
Marcar como: Mover Copiar Esta mensagem para	Retornar para Mensagens 👍 🖨
zcluir Responder Encaminhar Redirecionar Ver Discussão Recusar l alvar como Imprimir Cabeçalhos	Remetente Admitir Remetente Código Fonte
Data: 24 May 2012 14:30:11 -0400 [15:30:11 BRT] De: Anti-Cancer Drugs <m.sluyser@planet.nl> ====================================</m.sluyser@planet.nl>	cell proliferation, colony formation, induces
May 24, 2012	
Dear Mr Moreno,	
Your submission entitled "Zebularine decreases cell pr induces apoptosis and causes radiosensibilization in g received by the journal editorial office.	oliferation, colony formation, lioblastoma cell lines" has been
You will be able to check on the progress of your pape Manager as an author.	r by logging on to Editorial
http://acd.edmgr.com/	
Your username is: danielmoreno Your password is:	
Your manuscript will be given a reference number short	1у.
Thank you for submitting your work to this journal.	17
Kind Regards.	
······································	