Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Genética

Angel Mauricio Castro Gamero

**EFEITOS DA INIBIÇÃO TRANSCRICIONAL DE
SURVIVINA E *CDK1* ATRAVÉS DO ÁCIDO
TETRA-O-METIL NORDIHDROGUAJARÉTICO
EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA**

Ribeirão Preto
2012

**DOCTORADO
FMRP
2012**

**EFEITOS DA INIBIÇÃO TRANSCRICIONAL DE *SURVIVINA* E *CDK1*
ATRAVÉS DO ÁCIDO TETRA-O-METILNORDIHDROGUAIARÉTICO EM
CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA**

CASTRO GAMERO, AM

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Castro-Gamero, Angel Mauricio.

Efeitos da inibição transcricional de *Survivina* e *Cdk1* através do Ácido Tetra-O-Metil Nordihidroguaiarético em células de Glioblastoma/ Angel Mauricio Castro Gamero; orientador Luiz Gonzaga Tone. Ribeirão Preto, 2012.

119 f.: il. ; 30cm

Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Departamento de Genética. Área de concentração: Genética

1. Glioblastoma. 2. Survivina. 3. Cdk1. 4. Ácido Tetra-O-Metil Nordihidroguaiarético

Angel Mauricio Castro Gamero

**EFEITOS DA INIBIÇÃO TRANSCRICIONAL DE *SURVIVINA*
E *CDK1* ATRAVÉS DO ACIDO TETRA-O-METIL
NORDIHDROGUAIARÉTICO EM CÉLULAS DE
GLIOBLASTOMA**

Ribeirão Preto
2012

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Departamento de Genética

EFEITOS DA INIBIÇÃO TRANSCRICIONAL DE *SURVIVINA* E *CDK1* ATRAVÉS DO ACIDO TETRA-O-METIL NORDIHDROGUAJARÉTICO EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA

Angel Mauricio Castro Gamero

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração:
Genética

Orientador:
Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

Ribeirão Preto
2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

Angel Mauricio Castro-Gamero

Efeitos da inibição transcricional de *Survivina* e *Cdk1* através do
Acido Tetra-O-Metil Nordihidroguaiarético
em células de Glioblastoma

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração:
Genética

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Para a minha esposa Angela e
meu filho Ítalo, estímulos da minha vida.

Agradecimentos

Ao meu orientador **Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone**, quem me deu a oportunidade de crescer como pessoa e como profissional, me recebendo como orientando e colaborando intensamente com o meu desenvolvimento científico e intelectual durante todo esse tempo de pós-graduação.

Ao **Prof Dr. Carlos Scrideli** pelo seu apoio, confiança e disposição para todas as discussões próprias deste trabalho, assim como pelas idéias para aprimorá-lo.

À **Dra. Rosane Gomes Queiroz** pelo apoio, disponibilidade e sugestões importantes no desenvolvimento dos meus experimentos.

À **Dra. Vanessa da Silva Silveira** pelo apoio científico, disponibilidade e sugestões experimentais.

À **Dra. Maria Sol Brassesco Annichini** pelo apoio e profissionalismo demonstrado em todo este tempo de formação acadêmica.

À **Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões**, chefe do Departamento de Genética da FMRP/USP, pela atenção e apoios despendidos.

Ao **Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares**, coordenador da Pós-graduação do Departamento de Genética da FMRP/USP pelo apoio e exemplo de entrega constante.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e paciência em analisar este trabalho, enriquecendo-o com as suas críticas e sugestões.

Ao **Departamento de Genética** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em seu conjunto, pela oportunidade da realização do curso de mestrado e doutorado que finalizo agora.

Ao **Departamento de Puericultura e Pediatria** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo apoio prestado ao Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, local de realização de todos os meus experimentos.

Ao Laboratório do Citometria de Fluxo do **Hemocentro** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo apoio prestado na análise dos meus experimentos, representados por **Patrícia Vianna Bonini Palma, Camila Cristina de Oliveira Menezes Bonaldo e Daiane Fernanda dos Santos**.

Aos pacientes e seus familiares pela doação do material utilizado nesse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Elvis Terceiro Valera**, pela sua contribuição e disposição constante, assim como também pela sua experiência transmitida.

Ao **Prof. Dr. Luciano Nader Serafini** pela colaboração na caracterização patológica das amostras.

As funcionárias e amigas do laboratório de Citogenética-HC, **Sonia Aparecida Scandiussi, Aíde Barbosa dos Santos, Lucimar Laureano, Maria Lucia Machado e Sara Melho Padilha** pelo carinho, amizade e bom convívio, sempre prestas a ajudar.

Ao **Dr. Daniel Moreno**, pela verdadeira e fraterna amizade demonstrada desde que iniciamos a pós-graduação.

Ao **doutorando Kleiton Silva Borges**, parceiro de bancada e grande contribuinte da minha maturidade científica, pela amizade sincera e profissionalismo demonstrado diariamente, além dos momentos de discussão intensa sobre biologia do câncer, estratégias terapêuticas e sonhos de cura deste conjunto de doenças chamadas unificadamente “câncer”.

Ao **doutorando Augusto Faria Andrade** pela amizade e apoio científico e acadêmico constante, assim como pelas tantas correções no inglês dos resumos e manuscritos produzidos. Falou jô.

Aos amigos do laboratório de Citogenética e Biologia Molecular: **Gustavo, Priscilla, Regia, Jaqueline, Paola, July, Mirella, Pamela, Guilherme, Veridiana, Fernanda, e Andressa**, pelo companheirismo e agradável convívio nestes anos de pesquisa. Além de **Mayara Fujinami** que me acompanhou e apoio na fase experimental final da minha pesquisa. Muito obrigado a todos vocês.

Aos amigos que já não estão neste laboratório, mas que participaram do início da minha formação e que se transformaram em referência de doutores para mim: **Prof. Dr. Fabio Motta, Prof. Dra. Renata Canalle, Dra. Maria Angélica, Dr. Marcus Gomes, Dra. Karina Eterovic**.

Às secretarias, **Evelise Visconte, Susie Nalon, Maria Aparecida e Silvia** pela presteza em ajudar sempre.

À instituição **CAPES** pelo apoio financeiro.

À instituição **FAPESP** pelo apoio financeiro.

À instituição **FAEPA** pelo apoio financeiro.

Aos meus pais **Jorge e Maria Elena**, pelo amor, formação e valores que ensinaram para mim.

À **Angela**, minha companheira de sempre, pelo amor, pela fé, confiança e apoio incondicional, principalmente durante os meus fins de semana de laboratório, ou noites e madrugadas de estudo. Te amo. Ao meu filho **Italo**, para quem este doutorado e tese foram muitas vezes um irmão rival, com quem ele tinha que brigar por atenção. Te adoro meu filho.... Por você tudo este esforço.

A todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

CASTRO-GAMERO, AM. Efeitos da inibição transcricional de *Survivina* e *Cdk1* através do Ácido Tetra-O-Metil Nordihidroguaiarético em células de Glioblastoma; 2012,119p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O Glioblastoma é um dos tumores mais agressivos do sistema nervoso central e entre as diversas neoplasias possui um dos piores prognósticos. Mesmo com as novas estratégias de tratamento, a sobrevida de pacientes portadores de glioblastoma continua sendo muito baixa, sendo a temozolomida (TMZ) o agente mais comum usado no seu tratamento. O ácido tetra-o-metil nordihidroguaiarético (M4N), é um novo agente terapêutico que funciona como um repressor transcricional global de genes dependentes do fator de transcrição Sp1, tais como *Survivina* e *Cdk1*. No presente estudo, foram investigados os níveis de expressão do gene *Survivina*, suas variantes gênicas por *splicing* alternativo e *Cdk1* em amostras tumorais e linhagens celulares de GBM. Adicionalmente, foram investigados os efeitos do M4N em combinação ou não com TMZ e/ou radiação em culturas primárias e linhagens celulares de GBM. Ensaios de qRT-PCR foram realizados para determinar a expressão de mRNA das variantes gênicas de *Survivina* e *Cdk1*. A proliferação celular foi analisada pelo ensaio XTT e os níveis de apoptose e variações do ciclo celular foram determinados por citometria de fluxo. Análises de combinação de drogas utilizando diferentes estratégias de administração (simultânea e seqüencial) foram realizados baseados no método de Chou-Talalay em linhagens celulares e culturas primárias de GBM. Para os ensaios de sobrevivência clonogênica, foram utilizadas as doses de 2, 4 e 6 Gy de radiação gamma. Todas as variantes por *splicing* alternativo de *Survivina* e o gene *Cdk1* foram expressos em amostras (n=16) e linhagens celulares (n=6) de GBM, exceto a variante *Survivina-2B* que apenas foi expressa nas linhagens celulares de GBM. O tratamento com M4N diminuiu a expressão de *Cdk1*, *Survivina* e a variante *Survivina-ΔEx3*, enquanto que houve um aumento da expressão da variante *Survivina-2B*. O M4N diminuiu a proliferação celular de forma isolada e sinérgicamente quando combinada com TMZ. Além disso, o M4N aumentou os efeitos da radiação, principalmente quando associado com TMZ. O M4N causou morte celular apoptótica, diminuição do índice mitótico e parada do ciclo celular principalmente na fase

G2/M. Os resultados do presente estudo sugerem a potencial aplicação clínica de M4N em combinação com TMZ e radiação no tratamento do GBM.

Palavras Chaves: Glioblastoma, Survivina, Cdk1, Ácido Tetra-O-Metil Nordihidroguaiarético

ABSTRACT

CASTRO-GAMERO, AM. Effects of transcriptional inhibition of *Survivin* and *Cdk1* inhibition by Tetra-O-Methyl Nordihydroguaiaretic acid in glioblastoma cells; 2012, 119p. Thesis (Doctor Degree) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Glioblastoma (GBM), one of the most human malignant neoplasia, responds poorly to current treatment modalities, being temozolomide (TMZ) the most used drug in its treatment. Tetra-O-methyl Nordihydroguaiaretic Acid (M4N) is a global transcriptional repressor of genes dependents of Sp1 transcription factor, such as *Survivin* and *Cdk1*. In this study was evaluated the gene expression of *Survivin*, their spliced-variants and *Cdk1* in GBM samples and cell lines. Moreover, it was investigated the effects of M4N combined or not with TMZ and/or radiation on primary cultures and cell lines of GBM. qRT-PCR assays were performed to determine the *Survivin*-spliced variants and *Cdk1* gene mRNA expression in GBM tumor samples and cell lines. Cell proliferation was measured by XTT assay and cell cycle and apoptosis were determined by flow cytometry. Drug combination analyzes using different schedules of administration (simultaneous and sequential) were performed based in Chou-Talalay method on GBM cell lines and primary cultures. For clonogenic survival, it was used the doses of 2, 4, and 6 Gy of gamma radiation. All *Survivin*-spliced variants and *Cdk1* gene were expressed in GBM samples (n=16) and cell lines (n=6), except the *Survivin-2B* variant that was only expressed in GBM cell lines. M4N treatment down regulated the expression of *Cdk1*, *Survivin* and *Survivin-ΔEx3* variant, while the *Survivin-2B* variant was up-regulated. M4N decreased the cell proliferation separately and synergistically with TMZ, moreover it enhanced the radiation effects, mainly when associated with TMZ. M4N also induced apoptotic cell death, decreased mitotic index and arrested the cell cycle mainly in G2/M phase. Our results suggest a potential clinical application of M4N in combination with TMZ and radiation in GB treatment.

Keywords: Glioblastoma, *Survivin*, *Cdk1*, Tetra-o-methyl nordihydroguaiaretic acid

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Modo de ação molecular e modo de ação do M4N	26
Figura 2.	Protocolo de administração de drogas: M4N em combinação com TMZ	36
Figura 3.	Expressão gênica de <i>Survivina</i> , <i>Survivina-2B</i> , <i>Survivina-ΔEx3</i> e <i>Cdk1</i> por qRT-PCR em amostras de glioblastomas	43
Figura 4.	Expressão gênica de <i>Survivina</i> , <i>Survivina-2B</i> , <i>Survivina-ΔEx3</i> e <i>Cdk1</i> por qRT-PCR em linhagens celulares de glioblastomas	44
Figura 5.	M4N inibiu a proliferação de linhagens celulares de glioblastoma	46
Figura 6.	M4N inibiu a proliferação de culturas primárias de glioblastoma	47
Figura 7.	Interações dependentes da sequencia de administração entre M4N e TMZ nas linhagens celulares SF188, T98G, U251 e U343	50
Figura 8.	Efeitos da combinação entre M4N e TMZ em culturas primárias de glioblastoma	51
Figura 9.	M4N e TMZ diminuem a capacidade clonogênica das linhagens celulares de glioblastoma	53
Figura 10.	M4N radiosensibiliza a linhagem celular U343	54
Figura 11.	M4N aumenta a radiosensibilização causada por TMZ em células de glioblastoma	55
Figura 12.	M4N induz apoptose de uma maneira dose dependente em linhagens de glioblastoma	57
Figura 13.	M4N afeta o ciclo celular de linhagens de glioblastoma	59
Figura 14.	M4N reduz o índice mitótico de linhagens celulares de glioblastoma	59
Figura 15.	M4N desregula expressão gênica em linhagens celulares de glioblastoma	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Doses requeridas para induzir o 50% de inibição do crescimento celular (IC_{50}) nas linhagens celulares de glioblastoma	47
Tabela 2.	Valores de IC_{50} para M4N nas culturas primárias de glioblastoma	48
Tabela 3.	Efeitos do tratamento sobre a taxa do aumento de dose de radiação (DER) das linhagens celulares de glioblastoma SF188, T98G, U251 e U343	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>BIRC5</i>	<i>Baculoviral IAP Repeat-Containing 5</i>
Cdk1	Quinase dependente de ciclina 1
CI	Índice de combinação
CPGB	Cultura primária de glioblastoma
DER	Taxa do aumento de dose de radiação
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FS	Fração de sobrevivência
GBM	Glioblastoma
<i>HPRT</i>	<i>Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase</i>
M4N	Ácido tetra-o-metil nordihidroguaiarético
MGMT	O6-metilguanina-DNA-metiltransferase
MPF	<i>M-phase promoting factor</i>
MTIC	Monometil triazenoimidazol carboxamida
NT	Tecido não neoplásico
OMS	Organização Mundial da Saúde
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa
SNC	Sistema Nervoso Central
Sp1	<i>Specificity protein 1</i>
<i>TBP</i>	<i>TATA-box binding protein</i>
TMZ	Temozolomida
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SIMBOLOS

μL	microlitro
μm	micrometro
μM	micromolar
r.p.m.	revoluções por minuto
KCl	Cloreto de potássio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Câncer	19
1.2. Glioblastoma	19
1.3. Potenciais alvos terapêuticos em glioblastoma	22
1.4. Survivina	23
1.5. Quinase dependente de ciclina 1 (Cdk1)	24
1.6. Acido tetra-o-metil nordihidroguaiarético	25
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Pacientes	32
3.2. Microdissecção	32
3.3. Linhagens celulares e culturas primárias de glioblastoma (CPGBS)	33
3.4. Drogas	33
3.5. Extração de RNA e PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)	34
3.6. Ensaio de proliferação celular/viabilidade	35
3.6.1. Ensaio de proliferação <i>kit</i> XTT®	35
3.6.2. Ensaio de proliferação pela coloração com Giemsa	35
3.7. Análise de combinação de drogas	36
3.7.1. Exposição Simultânea de M4N e TMZ	37
3.7.2. Exposição Sequencial de M4N e TMZ	37
3.8. Capacidade Clonogênica	38
3.9. Apoptose	40
3.10. Análise do Ciclo Celular	40

3.11. Determinação do Índice Mitótico	41
3.12. Análise Estatística	41
4. RESULTADOS	42
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
8. APÊNDICE	85
9. ANEXOS	92

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Atualmente, o câncer pode ser definido com um sistema ecológico no quais células com diferentes alterações competem por sobreviver (Spencer et al., 2006). Essas alterações podem ser gênicas, cromosômicas, ou epigenéticas e consequentemente podem fornecer uma vantagem proliferativa a uma determinada célula (Cahill et al., 1999, Nicholson, Duesberg, 2009). Hanahan and Weinberg sugerem que seis alterações características podem conduzir coletivamente uma população de células normais tornarem-se uma neoplasia. Sendo estas: (i) autossuficiência em sinais proliferativos, (ii) insensibilidade aos sinais anti-proliferativos, (iii) evasão à morte celular programada (apoptose), (iv) infinito potencial replicativo, (v) capacidade de formar vasos sanguíneos (angiogênese), e (vi) invasão tecidual e disseminação sistêmica (metástase) (Hanahan, Weinberg, 2000). Quando essas alterações acontecem em um determinado tecido e local, estamos frente a uma neoplasia, tumor ou simplesmente câncer. Já clinicamente, o câncer pode ser classificado de acordo com diferentes critérios como, por exemplo, o tecido a partir do qual foi originado, à idade do paciente, etc. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) os diferentes tipos de tumores podem ser classificados em diferentes graus de acordo com a malignidade dos mesmos. Este tipo de classificação pode prever o comportamento biológico do tumor, a gravidade da doença e o prognóstico do paciente (Louis et al., 2007).

1.2 Glioblastoma

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) exibem uma elevada heterogeneidade genética e molecular, e consequentemente uma significativa heterogeneidade histopatológica. Entre eles, os tumores de origem glial (gliomas) representam o grupo de tumores mais comum do SNC, sendo classificados de acordo com o tipo de célula glial que dará origem ao tumor (Louis et al., 2007, Ohgaki, Kleihues, 2007).

Os gliomas astrocíticos originam-se a partir de astrócitos e se classificam de acordo com a identificação de características anaplásicas como atipia nuclear, pleomorfismo celular, atividade mitótica, hiperplasia endotelial e necrose (Louis et al., 2007). Baseada nesses

critérios, a OMS os subdivide em quatro categorias de malignidade: Astrocitoma pilocítico (Grau I), Astrocitoma difuso (Grau II), Astrocitoma Anaplásico (Grau III) e Glioblastoma (Grau IV).

O glioblastoma (GBM) é a forma mais comum e maligna dos gliomas, além de ser atualmente uma das neoplasias mais agressivas e incuráveis com uma sobrevida média de aproximadamente um ano (Lima et al. 2012). Os casos de GBM são diagnosticados na sua grande maioria (mais de 80% dos casos) de forma primária, ou seja, surgem de *novo* (também chamados de GBM primários). Por outro lado, eles também podem ser o resultado da progressão de tumores de baixo grau para um de maior malignidade (GBM secundário) (Kleihues, Ohgaki, 1999, Brandes et al., 2008). Essa divisão não tem repercussão prática com relação ao tratamento e nem evidencia uma diferença histológica marcante (Brandes et al., 2008, Louis et al., 2007, Ohgaki, Kleihues, 2007). Porém, algumas diferenças nas vias genéticas em cada grupo podem ser distinguidas. Além de ter um desenvolvimento rápido, os GBM primários (ou *de novo*) são caracterizados molecularmente pela perda de heterozigosidade (LOH) da região 10q, ampliações e/ou alta expressão do gene do receptor de crescimento epidérmico (*EGFR*), deleções nos genes *p16^{INK4A}* ou *p14^{ARF}*, mutações no gene *PTEN* e no *TP53* e outras alterações de menos frequência. O GBM secundário é mais raro, e ocorre como progressão do tumor de baixo grau, geralmente após meses ou anos de existência de um tumor astrocítico Grau II ou III. A genética deste subtipo de GBM é diferente, com maior frequência de mutações no *TP53*, LOH do cromossomo 17p e alta expressão do receptor do fator do crescimento derivado de plaqueta (*PDGFR*) (Ohgaki, Kleihues, 2007, De Groot, Milano, 2009, Grahovac et al., 2009, Ohgaki, Kleihues, 2009).

Histopatologicamente, o GBM é caracterizado por apresentar células pouco diferenciadas, redondas ou pleomórficas, com alta atividade celular e mitótica, núcleo atípico, áreas de necrose, proliferação microvascular (angiogênese) e heterogeneidade intratumoral (Reardon, Wen, 2006, Uddim et al., 2012). As células do GBM são altamente invasivas e proliferam difusamente fazendo com que o tumor não possua margens delimitadas, e, portanto não passível de ressecção completa, sendo esta a principal causa de sua recidiva (Jackson, et al., 2001).

Apesar de ser encontrado em qualquer faixa etária, este tumor afeta principalmente homens com mais de 40 anos sendo pouco frequente em crianças. Esse tumor geralmente é encontrado nos hemisférios cerebrais e devido ao seu rápido crescimento, os primeiros sintomas são decorrentes do aumento da pressão intracraniana. Cefaléia, convulsões, perda de

memória e alterações de comportamento são os sintomas mais frequentes (Brandes et al., 2008).

Entre as alternativas de tratamento, as técnicas de microcirurgia combinadas com a radioterapia e a quimioterapia, principalmente com o agente alquilante temozolomida (TMZ) são agora consideradas padrão para o tratamento do GBM (Lima et al., 2012). A TMZ é uma molécula lipofílica que após sua administração oral tem a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica. A um pH fisiológico, esta pro-droga é rapidamente convertida no seu metabólito ativo, a monometil triazenoimidazol carboxamida (MTIC), que é um potente agente metilante do DNA tendo entre seus principais produtos: N⁷-metilguanina (70%), O⁶-metilguanina (5%), e N³-metiladenina (9%). A O⁶-metilguanina é a principal responsável da citotoxicidade da TMZ, pois causa erros de pareamento com a timina durante os ciclos subsequentes da replicação do DNA, causando consequentemente quebras de fita simples e dupla do DNA e eventualmente morte celular (Friedman et al., 2000, Marchesi et al., 2007). Porém, sua eficiência como agente antitumoral depende da expressão celular da enzima O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT) (Pegg, 1990, Rabik et al., 2006), a qual remove os grupos metil da O⁶-metilguanina, atuando assim como enzima de reparo do DNA, representando um importante mecanismo de resistência à TMZ.

Em estudo publicado por Stupp et al. (2005) mostrou que pacientes com GBM tratados com TMZ e radioterapia, com seis meses de TMZ adjuvante, apresentaram um aumento significativo da sobrevida comparado aos pacientes tratados somente com radioterapia (Stupp et al., 2005). Em publicação sucessiva o mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que este aumento na sobrevida foi obtido somente em pacientes cujos tumores apresentavam metilação no promotor do gene *MGMT*, evento que suprime a expressão e atividade do *MGMT* e causa sensibilidade à TMZ neste grupo de pacientes (Hegi et al., 2005). Esses resultados têm levado à associação TMZ-radioterapia a ser aceita como protocolo padrão para pacientes com GBM que não tenham o gene *MGMT* expresso, mesmo que o aumento na sobrevida desses pacientes seja somente de alguns meses e a sobrevida de cinco anos continue em menos de 5% de todos os casos (Stark et al., 2005, Tran, Rosental, 2010).

Por esses motivos, drogas com novos mecanismos de ação, assim como novas estratégias de combinação são urgentes e necessárias para superar a quimio-resistência, combater o comportamento agressivo e metastático, aumentar a eficiência do tratamento, reduzir os efeitos adversos da quimioterapia, e consequentemente, otimizar o prognóstico dos pacientes com GBM.

1.3 Potenciais alvos terapêuticos em glioblastoma

A eficiência das atuais terapias antitumorais (químio- e radioterapia) tem alcançado um limite no tratamento de muitos tumores incluindo o GBM, gerando a urgente necessidade de metodologias mais efetivas (Siebzehnruhl et al. 2011, Lima et al., 2012). O interesse atual consiste em encontrar drogas capazes de serem seletivas, atuando apenas nas células neoplásicas, sem afetar as normais. Esta estratégia alvo-dirigida é destinada, especificamente, a genes cujos produtos estão envolvidos na manutenção do fenótipo neoplásico (Leaf, 2004, Bai et al., 2011). Sob este fundamento, algumas drogas têm revolucionado o tratamento de certos tumores, por exemplo, rituximab[®] como terapia de linfoma Não-Hodgkin, e imatinib[®] no tratamento da leucemia mieloide crônica (Sawyers, 2004). Contudo, a grande maioria dos tumores ainda não apresenta resultados animadores, mostrando benefícios transientes ou nulos provavelmente devido a tentativa de controlar uma única via de sinalização celular (Altieri, 2008, Bai et al., 2011).

O câncer representa um conjunto de doenças extraordinariamente heterogêneas, afetadas tanto por alterações genéticas como epigenéticas. Além disso, é caracterizado pelo envolvimento de centenas de genes mutados e desregulados, expressão aberrante de microRNAs, instabilidade genética e aneuploidia (Vogelstein et al., 2004). É importante destacar que todas estas alterações culminam em duas características fundamentais, exibidas em todos os tipos de câncer: proliferação celular desregulada e bloqueio da apoptose (Evan et al., 2001). Devido a isto, o desenvolvimento de drogas antineoplásicas que possam afetar seletivamente as principais vias que controlam esses dois processos e que ao mesmo tempo atinjam exclusivamente células neoplásicas sem afetar células normais, representa o maior desafio da pesquisa oncológica nos últimos anos (Mayburd et al. 2008, Hu et al. 2012).

Apoiados por um melhor conhecimento da complexidade genética do GBM, diferentes pesquisas têm intensificado a busca de alvos que controlem essas duas vias de manutenção neoplásica. Duas proteínas têm recebido uma importante atenção na última década: a Survivina (codificada pelo gene *BIRC5*), que é uma pequena proteína inibidora de apoptose diferencialmente expressa em câncer (Altieri et al., 2006, 2008, Ryan et al., 2009); e a Quinase dependente de ciclina 1 (Cdk1), que é a principal reguladora da transição G2/M do ciclo celular (Bodey et al., 2002, Huang et al., 2006, Shapiro, 2006) e promotora de proliferação (Malumbres et al., 2001, 2009).

1.4 Survivina

Embora desempenhe diversas funções, a Survivina é considerada membro da família de proteínas inibidoras de apoptose (IAP). A sua síntese e degradação são reguladas de acordo com as fases do ciclo celular; encontrando-se expressa principalmente durante a fase G₂/M (Altieri, 2006). A Survivina tem múltiplas funções, porém, todas elas estão ligadas à homeostase celular, motivo pelo qual tem sido considerada como uma proteína “nodal”, capaz de interconectar redes de manutenção neoplásica (Altieri, 2008). Na sua função antiapoptótica, a Survivina atua tanto pela via dependente de caspases quanto pela via mitocondrial (Altieri, 2001). Além da função antiapoptótica, a Survivina está envolvida com o ponto de checagem do fuso mitótico e a regulação da segregação cromossômica durante a mitose (Li et al., 1998, Adams et al., 2001), agindo também como promotor da angiogênese (Altieri, 2008).

Geralmente, a expressão dessa proteína é indetectável nas células adultas, entretanto, pequenas quantidades são identificadas em células do timo, placenta, células endoteliais e em progenitores hematopoiéticos (CD34+) durante a mitose (Ambrosini et al., 1998). Além disso, a Survivina é seletivamente expressa em células transformadas e em inúmeras neoplasias humanas como carcinoma de pulmão, mama, colón, pâncreas, incluindo tumores do sistema nervoso central como o GBM (Adida et al., 1998, Monzó et al., 1999, Tanaka et al., 2000; Chakravarti et al., 2002, Katoh et al., 2003). Por outro lado, tem sido descrito que esta proteína confere resistência a diversos agentes antitumorais (Asanuma et al., 2000, Tran et al., 2002, Zaffaroni et al., 2002) e sua alta expressão está associada com um pior prognóstico numa variedade de neoplasias (Monzó et al., 1999, Altieri, 2003).

Em gliomas, a expressão desta proteína tem sido associada com resultados clínicos adversos e aumento do potencial maligno (Chakravarti et al., 2002, Katoh et al., 2003). A Survivina encontra-se significativamente expressa mais comumente em GBM primários (83%) do que em GBM secundários (46%) (Xie et al., 2006). Na presença de radiação, a Survivina induz o aumento do nível de reparo de DNA de dupla fita e o metabolismo das células de GBM, gerando radio-resistência (Chakravarti et al., 2004, Reichert et al., 2011).

A expressão quase exclusiva da Survivina em células neoplásicas, junto com a sua importância na manutenção de diversas redes de manutenção tumoral, como viabilidade, proliferação celular, apoptose, e radio-resistência, além de sua direta relação com a progressão neoplásica em gliomas, faz desta molécula um potencial alvo para o tratamento do câncer,

especialmente nos tumores agressivos como o GBM (Mita et al., 2008). Por outro lado, diferentes variantes gênicas por *splicing* alternativo, tais como *Survivina-2B* e *Survivina-ΔEx3*, tem sido também identificadas em GBM. *Survivina-ΔEx3* mostra um papel presumivelmente positivo na inibição da apoptose, enquanto que a *Survivina-2B* pode atuar como um fator próapoptótico (Altieri, 2003, Mahotka et al., 1999, Sampath, 2007, Wang et al., 2002, Zhu et al., 2004, Ling et al., 2007). Porém, pouco se conhece acerca das suas funções e o impacto biológico destas variantes gênicas em células de GBM.

1.5 Quinase dependente de ciclina 1 (Cdk1)

A Cdk1, também chamada proteína de controle da divisão celular 2 (CDC2 ou p34^{Cdc2}), faz parte da família das proteínas quinase dependentes de ciclinas (Cdks) e é a principal moduladora dos processos de iniciação e transição mitótica do ciclo celular (Wang et al., 2011). É uma proteína altamente conservada que regula a progressão do ciclo celular junto à Ciclina-B1. Ambas as moléculas formam o fator promotor da fase mitótica (chamado MPF, *M-phase promoting factor*) (Castedo et al., 2002) que promove a entrada das células em mitose através da fosforilação e ativação de enzimas que regulam a condensação cromatínica, desintegração da membrana nuclear e reorganização do citoesqueleto e dos microfilamentos específicos da mitose (mitose-específica) (Nigg et al., 2001, Castedo et al., 2004, Bassermann et al., 2005). Além de promover a proliferação celular, o complexo Cdk1/Ciclina-B1 tem sido recentemente implicado com a sobrevivência celular através da ativação do ponto de checagem mitótico (Shapiro et al., 2006). Por outro lado, a Cdk1 cumpre o papel de quinase fosforilando a proteína *Survivina* na treonina 34 (Thr³⁴). Este processo é crucial para estabilizar a *Survivina* durante a mitose (O'Connor et al., 2000, 2002).

As alterações na expressão do gene *Cdk1* são descritas como fatores que podem causar transformação e desenvolvimento tumoral (Tao et al., 1999) através de uma sinalização mitogênica aumentada, proliferação celular desregulada e instabilidade cromossômica e genômica, suportando o papel oncogênico desta (Malumbres et al., 2009). Diversos estudos têm demonstrado que a expressão da Cdk1 e do complexo Cdk1/Ciclina-B1 está correlacionada com o potencial maligno de diversas neoplasias (Ito et al., 2000, Hansel et al., 2005, Fluge et al., 2006). Bodey et al. (2002) determinaram que a alta expressão da Cdk1 pode ser considerada como um novo marcador de proliferação em tumores pediátricos do

SNC. Recentemente, Chen et al. (2008) encontraram uma significativa correlação positiva entre a expressão positiva de Cdk1/Ciclina-B1 e os graus de malignidade em gliomas, determinaram ainda que a alta expressão da Cdk1 pode promover a oncogênese e progressão de gliomas, enquanto que a inibição transcricional do gene *Cdk1* pode inibir a proliferação, induzir parada do ciclo celular em G2/M, e apoptose, tanto em modelos *in vivo* quanto *ex vivo* de gliomas (Chen et al., 2008).

Considerando que a Cdk1 possui um papel fundamental na regulação mitótica, promovendo proliferação e que apresenta uma alta expressão em gliomas de alto grau como o GBM, junto com a sua baixa ou nula expressão encontrada em tecidos diferenciados normais, tem-se considerado como um promissor alvo terapêutico.

1.6 Ácido tetra-o-metil nordihidroguaiarético

O ácido tetra-o-metil nordihidroguaiarético (também chamado M4N, terameprocol e EM-1421) é o derivado tetrametilado do ácido nordihidroguaiarético, um antioxidante lipofílico extraído e isolado a partir do arbusto creosoto *Larrea tridentata*. Diferentes estudos *in vitro* demonstram que o M4N apresenta propriedades antivirais, induz parada reversível do ciclo celular na fase G2 do ciclo celular em linhagens celulares de mamíferos, e exibe atividade antitumoral seletiva em vários modelos *in vivo* (Chen et al., 1998, Heller et al., 2001, Park et al., 2005).

Essas propriedades estão associadas à interrupção das atividades do fator de transcrição Sp1. Esta interrupção ocorre devido à ligação da molécula M4N à região promotora que contém a sequência consenso GGGCGG, sítio específico de ligação do fator de transcrição Sp1. Assim, genes Sp1-dependentes são reprimidos transcricionalmente (Craig et al., 2000, Huang et al., 2003, Chen et al., 1998, Hwu et al., 1998, Park et al., 2003, Huang et al., 2006) (**Fig. 1**).

Figura 1. Estrutura molecular e modo de ação do M4N. O M4N bloqueia a ligação do fator de transcrição Sp1 ao seu sítio consenso. Adaptado de Huang et al. (2006).

Desta maneira, o M4N inibe a transcrição do *BIRC5*, o gene que codifica a proteína antiapoptótica Survivina, que é altamente dependente de Sp1 (requerendo dois sítios críticos para este fator de transcrição) (Chang et al., 2004, Cheung et al., 2011, Ryan et al., 2009). O bloqueio do ciclo celular causado pelo M4N está relacionado com a inibição da transcrição do Cdk1, um gene também dependente de Sp1. Como descrito anteriormente, a Cdk1 é a principal reguladora da progressão do ciclo celular na transição G2/M e promotor do crescimento e proliferação celular, sendo desregulado em uma variedade de neoplasias, incluindo o GBM (Lu et al., 2010, Smolewski et al., 2008, Chang et al., 2004).

Visto que a atividade e estabilidade da Survivina durante a mitose dependem da fosforilação mediada por Cdk1, e a produção da Cdk1 é reduzida na presença do M4N, consequentemente a ativação da Survivina é significativamente diminuída. Este mecanismo de ação é consistente com os achados em modelos *in vivo*, onde células tumorais tratadas com M4N tornaram-se apoptóticas, enquanto os tecidos circundantes não neoplásicos (e não dependentes da Survivina), não foram afetados (Heller et al., 2001, Park et al., 2005).

A eficiência do M4N tem sido observada em linhagens celulares de melanoma, câncer de próstata, mama e colorectal, leucemias, e adenocarcinoma esofágico e em tumores humanos xenotransplantados de bexiga, melanoma, colón, mama e fígado (Park et al., 2005; Meyers et al., 2009, Hansel et al., 2005, Zhu et al., 2010, Mak et al., 2007, Lambert et al., 2001). O M4N distribui-se sistemicamente de maneira segura e eficaz após administração intravenosa, sendo detectado inclusive no tecido cerebral (Park et al., 2005), o que indica a capacidade desta molécula em atravessar a barreira hemato-encefálica. M4N também demonstrou atividade sinérgica quando foi combinado com os agentes quimioterápicos

doxorubicina e paclitaxel (Chang et al., 2006, Lopez et al., 2007). Estes estudos provêm ampla justificativa para explorar as propriedades do M4N como um novo e não tóxico agente antineoplásico, seja isoladamente ou em combinação com outros agentes.

O M4N tem sido estudado em pacientes com vários tipos de câncer, sendo administrado intratumoralmente, intravaginalmente, e intravenosamente (Lu et al., 2010, Smolewski et al., 2008, Lopez et al., 2007, Khanna et al., 2007, 2008, Dunphy et al., 2004). Foram observadas respostas parciais e completas em pacientes com neoplasia cervical intraepitelial após a aplicação tópica do M4N (teste clínico de Fase I e II) (Khanna et al., 2007, 2008). Já a administração tumoral em pacientes com tumores de cabeça e pescoço recorrentes resultou em necrose e ulceração do tumor dentro das duas primeiras semanas sem toxicidade sistêmica (Dunphy et al., 2004).

Devido ao seu particular e abrangente mecanismo de ação, além do seu baixo peso molecular, alta solubilidade lipídica, distribuição sistêmica segura, e seu perfil de toxicidade não mielossupressora, o M4N foi selecionado para avaliação farmacológica em 35 pacientes com gliomas de alto grau, dos quais 15 (43%) apresentavam diagnóstico de GBM. Neste primeiro estudo clínico, Grossman et al. (2012) não encontraram toxicidade mielossupressora após administração de M4N e determinaram a dose segura de (1700mg/dia/paciente) para futuros estudos. Por outro lado, descreveram a necessidade urgente de dados pré-clínicos que explorem as diferentes estratégias de combinação do M4N com temozolomida e radiação antes da realização de estudos clínicos mais extensos (Grossman et al., 2012).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS:

Avaliar a expressão do gene *Survivina*, suas variantes *Survivina-2B* e *Survivina-ΔEx3*, e do gene *Cdk1* em amostras de pacientes e em linhagens celulares de glioblastoma.

Estudar os efeitos do inibidor M4N em culturas primárias e linhagens celulares de glioblastoma em combinação com terapias de tratamento específicas como temozolomida e radiação ionizante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Analisar a expressão gênica de *Survivina*, *Survivina-2B*, *Survivina-ΔEx3*, e *Cdk1* em amostras tumorais e linhagens celulares de glioblastoma.

Analisar o efeito do inibidor M4N na proliferação de culturas primárias e linhagens celulares de glioblastoma.

Analisar os efeitos da combinação do inibidor M4N com TMZ em culturas primárias e linhagens celulares de glioblastoma.

Analisar os efeitos do inibidor M4N e da TMZ na capacidade clonogênica de linhagens celulares de glioblastoma.

Analisar os efeitos da combinação do inibidor M4N com TMZ e radiação e linhagens celulares de glioblastoma.

Analisar os efeitos do inibidor M4N no ciclo celular, índice mitótico, apoptose e expressão gênica de linhagens celulares de glioblastoma.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos segundo o fluxograma aqui representado:

3.1 Pacientes

Neste estudo foram utilizadas dezesseis amostras de pacientes com GBM, coletadas no centro cirúrgico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (FMRP-USP), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior, da Divisão de Neurocirurgia do Departamento de Cirurgia da FMRP-USP. Da mesma forma foram utilizadas seis amostras de tecido cerebral (substância branca) de pacientes que realizaram cirurgia para o tratamento de epilepsia. Todas as amostras foram obtidas após assinatura do termo de consentimento pelos pacientes ou seus responsáveis (Apêndice A). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP (Processo HCRP n° 8608/2009) em 12 de novembro de 2009 (Anexo A).

Após a coleta, as amostras foram destinadas para obtenção de cultura primária de GBM (CPGB) e para o armazenamento em nitrogênio líquido no Banco de Tumores do Laboratório de Oncologia Pediátrica do HC/FMRP/USP até sua utilização. O diagnóstico foi confirmado no departamento de Patologia da FMRP-USP.

3.2 Microdissecção

Todas as amostras coletadas foram submetidas à microdissecção no Laboratório de Patologia da FMRP-USP, sob a responsabilidade do Prof Dr. Luciano Neder, a fim de confirmar o diagnóstico, descartar o máximo de interferentes como tecido necrótico, tecido normal, bem como avaliar a integridade do tecido tumoral. Para a microdissecção, as amostras foram colocadas sobre plataforma previamente resfriada e protegida, imediatamente posicionadas na base de corte do criostato sob o gel *Tissue Tek*. Após um novo congelamento rápido em nitrogênio líquido, as amostras foram então posicionadas para o corte. Foram utilizados não mais que dois cortes por material com espessura de aproximadamente 8-10 µm, o corte foi imediatamente capturado com lamínula de vidro, corado por hematoxilina e eosina e avaliado por aposição de imagem.

3.3 Linhagens celulares e culturas primárias de GBM (CPGBs)

Neste estudo foram utilizadas as linhagens celulares de glioblastoma adulto U251, U343, T98G, U87 (adquiridas no American Type Culture Collection, USA), LN319 (gentilmente cedida pelo Dr. Frank Furnari -Ludwig Institute for Cancer Research, La Jolla, CA-USA) e a linhagem de glioblastoma pediátrico SF188 (gentilmente cedida pelo Dr. Michael S. Bobola -Department of Neurological Surgery, University of Washington, Seattle, WA-USA). As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² utilizando meio de cultura HAM F10 suplementado com 60 mg/L de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e 10% (v/v) de soro bovino fetal (SBF; Gibco BRL, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) num pH de 7,2-7,4 em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. Para propósitos de manutenção e expansão após confluência, as células foram enzimaticamente desprendidas das garrafas com 0,05 % tripsina (Gibco BRL, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), e a suspensão celular foi subsequentemente dividida em novas garrafas de cultura.

Para o estabelecimento das CPGBs, as amostras tumorais coletadas como previamente descrito foram desagregadas mecanicamente e enzimaticamente por aproximadamente 4h com 0,5 % collagenase tipo IV (Gibco BRL, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Após o tratamento enzimático, a suspensão celular foi colocada em meio de cultura HAM F10 suplementado com 10 % em garrafas de 75 cm² para seu crescimento durante aproximadamente uma semana. As culturas foram então mantidas e expandidas após confluência como descrito antes até um número baixo de passagens (P2-P7). Todos os ensaios moleculares e funcionais subsequentes foram realizados no Laboratório de Oncologia Pediátrica do HC/FMRP/USP.

3.4 Drogas

O Ácido Tetra-O-Metil Nordihidroguaiarético (M4N) foi adquirido na Cayman Chemical Co. (Ann Arbor MI, #70302), e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO; Mallinckrodt Chemical Works, St Louis, Missouri, USA) numa concentração estoque de 50 mM e estocada em alíquotas a -20°C. Essa solução estoque foi subsequentemente diluída em DMSO em concentrações menores e aquecida a 70°C por 3 h como recomendado por Chang et al. (2004), antes da adição no meio de cultura para os tratamentos *in vitro* numa concentração

final de 1 % DMSO. De maneira similar, a TMZ (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) foi diluída em DMSO numa concentração estoque de 200 mM, distribuída em alíquotas, armazenada a -20 °C e dissolvida em meio de cultura imediatamente antes dos experimentos.

3.5 Extração de RNA e PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Após microdissecção as amostras foram desagregadas mecanicamente em nitrogênio líquido e ressuspensas em PBS até obter uma suspensão celular homogênea. A extração do RNA dessas amostras e das linhagens celulares de GBM foi realizada através do reagente Trizol[®] (Gibco BRL, Life Technologies[®], Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado e a partir dele foi sintetizado o cDNA utilizando o *kit* High Capacity[®] (Applied Biosystems[®], Foster City, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

Os níveis de cDNA dos genes *Survivina*, *Survivina-2B*, *Survivina-ΔEx3*, e *Cdk1* foram mensurados no aparelho ABI 7500 Real Time PCR System (PE Applied Biosystems) utilizando as sondas TaqMan[®] para os genes *Survivin* (Hs00977612_mH), *Survivin-2B* (Hs03043575_m1), *Survivin-deltaEx3* (Hs03043576_m1), *Cdk1* (Hs00938777_m1). Como controles endógenos foram utilizados sondas para os genes *TBP* (*TATA-box binding protein*) (4326322E0811008), e *HPRT* (*hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*) (4310809E0502006) (Applied Biosystems), como recomendado por Valente et al. (2009). O volume final de cada reação foi otimizado para 12 μL (6,0 μL of TaqMan PCR Master Mix, 0,6 μL de sonda TaqMan e 5,4 μL de cDNA diluído 1:20). O qRT-PCR foi realizado em duplicata e um desvio padrão (DP) <0,5 entre as duplicatas foi considerado adequado. Os níveis de expressão gênica foram então descritos e analisados como a proporção entre *Survivin*, *Survivin-2B*, *Survivin-ΔEx3*, *Cdk1*, e os genes de referência *TBP* e *HPRT* em relação à media de expressão gênica desses genes em amostras não neoplásicas (substância branca). Para determinar os efeitos do M4N sobre a expressão gênica, as linhagens celulares SF188, T98G, U251 e U343 foram tratadas com 40 μM M4N por 6, 12 e 24 h. O RNA foi extraído e a qRT-PCR foi realizada como descrito previamente. Para esses experimentos, células controle (tratadas com DMSO) coletadas em 6, 12, e 24 h foram utilizadas como calibradores. Em todos os casos a quantificação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

3.6 Ensaio de proliferação celular/viabilidade

Para investigar os efeitos da inibição do crescimento do M4N isolado ou em combinação com TMZ, ensaios para avaliar a proliferação celular foram realizados. As linhagens celulares SF188, T98G, U251 e U343 foram semeadas em triplicata em placas de 96 poços numa concentração de 3×10^3 células/poço e cultivadas durante 24 h. Após esse tempo, as células foram tratadas com doses seriadas de M4N (0-80 μ M) ou TMZ (0-2000 μ M) por adicionais 24, 48 e 72 h. Similarmente, um total de onze CPGBs foram tratadas por 48 h com M4N, e quatro delas foram selecionadas para tratamento com M4N ou TMZ por 96 h. Em todos os casos, a proliferação foi analisada por dois ensaios de proliferação: ensaio de proliferação utilizando o *kit* XTT® e/ou coloração com Giemsa como publicado recentemente (Borges et al., 2012, Castro-Gamero et al., 2012, respectivamente).

3.6.1 Ensaio de proliferação *kit* XTT®

Após os tratamentos, o meio de cultura foi removido e substituído por meio de cultura contendo 10 μ L do reagente XTT (3 mg/mL) (XTT II; Roche Molecular Biochemicals, IN, USA) em cada poço. As placas foram então incubadas por 2 h a 37 °C e o produto formazan foi quantificado a 450 nm de absorbância com referencia de 650 nm utilizando um leitor iMark microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Os valores mostrados representam a média e o desvio padrão dos tratamentos em relação aos experimentos controle (DMSO), de no mínimo três experimentos independentes.

A partir destes dados, foram obtidos os valores de IC₅₀ que é definido como a concentração necessária para uma redução de 50 % na proliferação usando o programa Calcsyn (Biosoft, Ferguson, Missouri, USA).

3.6.2 Ensaio de proliferação pela coloração com Giemsa

Para confirmar os resultados de inibição do crescimento obtido, foram realizados ensaios de proliferação pelo método de coloração com Giemsa. Após os tratamentos, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com 1 X PBS, fixadas com metanol

absoluto e coradas com o corante Giemsa (1 %). As células foram então lavadas com água, e o corante foi removido com 100 µL de metanol absoluto por poço. O valor da absorbância de cada poço foi determinado a 655 nm utilizando um leitor iMark microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Os experimentos foram realizados em triplicata em três momentos independentes.

3.7 Análise de combinação de drogas

Após a determinação dos valores de IC₅₀ para M4N e TMZ de cada tipo celular (linhagens celulares e culturas primárias), as células foram tratadas com três diferentes modos de exposição de drogas: simultânea (M4N+TMZ), sequencial com M4N seguido por TMZ (M4N/TMZ) e sequencial com TMZ seguido por M4N (TMZ/M4N), usando combinações de drogas de razão constante para as linhagens celulares como recomendado por Chou Talalay (1984). Para CPGBs, exposições similares utilizando doses fixas de 20 µM ou 40 µM de M4N, e 500 µM de TMZ foram utilizadas (Fig. 2).

Figura 2. Protocolo de administração de drogas: M4N em combinação com TMZ. Células foram plaqueadas em triplicata e expostas a diferentes concentrações de drogas. Na parte superior do diagrama se apresentam os tempos de tratamento para linhagens celulares (24 e 48 h) e culturas primárias de glioblastoma (CPGBs) (48 e 96 h). As células foram expostas ao M4N e TMZ simultaneamente (M4N+TMZ), sequencialmente com M4N antes de TMZ (M4N/TMZ), e sequencialmente com TMZ antes de M4N (TMZ/M4N).

3.7.1 Exposição Simultânea de M4N e TMZ

As linhagens celulares SF188, T98G, U251 e U343 foram semeadas em placas de 96 poços como descrito anteriormente. As células foram então tratadas simultaneamente com ambas as drogas numa proporção constante de concentrações que correspondeu a 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 vezes o valor do IC₅₀ individual, quando possível. Devido às diferenças na sensibilidade entre os tipos celulares, a proporção molar 1 : 25 para SF188 e T98G e 1 : 9.375 para U251 e U343 foram utilizadas. Após 48 h e 96 h de exposição, a inibição da proliferação foi quantificada para as linhagens celulares e CPGBs, respectivamente (Fig.2).

3.7.2 Exposição Sequencial de M4N e TMZ

Utilizando o mesmo esquema experimental descrito anteriormente, após 24 h do plaqueamento, o meio de cultura foi retirado e substituído por um meio de cultura contendo a primeira droga. Após incubação por 24 h ou 48 h (linhagens celulares ou CPGB, respectivamente), o meio foi aspirado, as células foram lavadas com 1X PBS, e um novo meio de cultura contendo a segunda droga foi adicionado para incubação por mais 24 h ou 48 h (linhagens celulares ou CPGB, respectivamente). No final deste tempo, a inibição do crescimento foi avaliada (Fig. 2).

Em todos os casos, os efeitos das interações entre M4N e TMZ foram analisados usando o programa Calcsyn. Este programa permite calcular o índice de combinação (CI) para cada ponto de combinação, que indica a existência de uma interação entre as drogas aditiva se for igual a 1 (CI=1), antagônica se for maior do que 1 (CI>1), ou sinérgica se for menor que 1 (CI<1).

O calculo dos valores de CIs é realizado baseado na formula:

$$CI = (D)_1 / ((D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2)$$

Onde (D_x)₁ e (D_x)₂ são as concentrações de M4N ou TMZ como droga única, que induz a x % de inibição do crescimento celular. (D)₁ e (D)₂ indicam a concentração das drogas combinadas que inibe o x % do crescimento celular. (D_x)₁ e (D_x)₂ foram calculados pela

equação de Chou e Talalay (Chou, Talalay, 1984), que determina a inibição do 50 % do crescimento celular causada pela combinação:

$$D_x = D_m[FA/(1-FA)]^{1/m}$$

Onde, D_m é a dose de combinação necessária para inibir o 50 % do crescimento celular, FA é a fração celular afetada, e m é a inclinação da curva obtida. Os resultados foram avaliados através das médias dos **CI**s atingidos com as **FA**s de 0,5; 0,75; 0,90 e 0,95.

O programa Calcsyn também calcula o Índice de Redução de Dose (DRI), que estima quanto uma determinada dose de um determinado agente numa combinação pode ser reduzida para conseguir o mesmo efeito do que com o agente em tratamento isolado. Combinações de drogas que atuam sinergicamente podem ser identificadas como aquelas que exibem valores de DRI significantes.

3.8 Capacidade Clonogênica

Os efeitos do M4N e TMZ sobre a capacidade clonogênica foram avaliados de acordo com o protocolo de Franken, et al. (2006). Suspensões celulares das linhagens SF188, T98G, U251 e U343 foram semeadas numa densidade de 300 células/poço em placas de seis poços. Após 24 h de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações de M4N ou TMZ e incubadas em estufa a 37 °C durante 48 h. Uma vez terminado o tempo de tratamento, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com 1 X PBS, e meio sem droga foi acrescentado para permitir o crescimento de colônias durante aproximadamente 7-10 dias a 37 °C. Após esse tempo, o meio de cultura foi retirado, as células lavadas com PBS, fixadas com metanol absoluto e coradas com 1 % Giemsa. As colônias com pelo menos 50 células foram contabilizadas com lupa, e foi determinada a eficiência de plaqueamento (EP) sob a fórmula:

$$EP = \frac{\text{Nº de colonias formadas}}{\text{Nº de células plaqueadas}} \times 100$$

Com o qual foi calculada a fração de sobrevivência (FS), sob a fórmula:

$$FS = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de colônias formadas após o tratamento}}{\text{N}^{\circ} \text{ de células plaqueadas} \times EP}$$

A EP é própria de cada linhagem para cada condição de cultura e representa a percentagem de células que têm a capacidade de formar colônias. A FS é específica de cada tratamento e representa a percentagem de células plaqueadas que após o tratamento ainda apresentam a capacidade de formar colônia. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes. A partir dos dados de FS foram realizadas as análises estatísticas.

Por outro lado, para realizar os ensaios de combinação de drogas em associação com radioterapia foram utilizados os valores de IC₅₀ clonogênicos, definidos como a concentração necessária para uma redução de 50 % na capacidade clonogênica (ou FS de 50 %) calculada usando o programa Calcsyn (Biosoft, Ferguson, Missouri, USA). Posteriormente, as células foram semeadas como descrito anteriormente, e tratadas com M4N (IC₅₀), TMZ (IC₅₀) ou M4N+TMZ por 48 h. As células foram então lavadas com 1X PBS e meio ausente de drogas foi acrescentado antes de serem irradiadas utilizando um aparelho Gammatron S-80 equipado com uma fonte de Cobalto-60 (Siemens Medical Systems, Inc., South Iselin, USA). A taxa de dose foi de 3,20 Gy/min e as doses foram 0, 2, 4 e 6 Gy. As células irradiadas foram então incubadas a 37°C por 7-10 dias, fixadas com metanol absoluto, tingidas com Giemsa, e subsequentemente contadas. Os valores de EP e FS influenciados pela radiação foram obtidos, além da taxa do aumento de dose de radiação (DER, *radiation dose enhancement ratio*) que é calculada como proporção de células sobreviventes com radiação isolada comparada com a combinação de radiação e diferentes exposições de drogas. Radiosensibilização é o termo usado quando o tratamento incrementa a sensibilidade das células à radiação. Assim, um DER=1 sugere um efeito de radiação aditivo, DER>1 sugere um efeito supra-aditivo à radiação, e um DER<1 sugere um efeito sub-aditivo. Os valores representam a media e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

3.9 Apoptose

A taxa de apoptose foi determinada a través da tinação com AnexinaV/Iodeto de Propídeo como previamente descrito por Castro-Gamero et al. (2012). Após o tratamento com M4N, as células SF188, T98G, U251 e U343 foram tripsinizadas, centrifugadas a 1000 r.p.m. por 5 min, lavadas com 1 X PBS gelado e ressuspendidas em 300 μ L de 1 X Tampão de ligação para anexina V (BD Biosciences Pharmigen, San Jose, California, USA). As células foram então marcadas com 5 μ L de Anexina-Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (*Annexin V fluorescein isothiocyanate* - BD Biosciences Pharmigen, San Jose, California, USA) e 50 μ L de uma solução de 50 μ M de iodeto de propídeo (PI), e analisadas usando um citômetro de fluxo BD FACSCalibur (BD Biosciences Pharmigen) contabilizando um total de 10000 eventos por tratamento. Os valores representam a media e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

3.10 Análise do Ciclo Celular

Com o objetivo de analisar os potenciais efeitos do M4N nas mudanças no ciclo celular de células de GBM, foram semeadas $1,5 \times 10^5$ células das linhagens SF188, T98G, U251 e U343 em placas de seis poços e após 24 h de incubação, as células foram tratadas com 40 μ M (SF188 e T98G) ou 20 μ M (U251 e U343) por 24 h. As células foram então tripsinizadas, lavadas com 1 X PBS e marcadas com iodeto de propídeo (PI) usando o *CycleTESTTM PLUS DNA reagent kit* (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA). O conteúdo de DNA das células marcadas foi imediatamente analisado usando um citômetro de fluxo BD FACSCalibur (BD Biosciences Pharmigen) contabilizando um total de 10000 eventos por tratamento. As porcentagens de células em fase G0/G1, fase S e Fase G2/M foram calculadas usando o programa ModFit LT (Verity Software House, CA). Os valores representam a media e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

3.11 Determinação do Índice Mitótico

Culturas celulares crescendo exponencialmente das linhagens SF188, T98G, U251 e U343 foram tratadas com diferentes concentrações de M4N por 48 h a 37 °C. As células foram então lavadas com 1 X PBS e tripsinizadas com 0,05 % de tripsina. Meio de cultura completo foi acrescentado antes da centrifugação a 1000 r.p.m. por 5 min. O meio de cultura foi descartado e as células coletadas foram tratadas com solução hipotônica de cloreto de potasio (KCl; 0,075 mol/l), fixadas com metanol: ácido acético (3:1) e lavadas com metanol: ácido acético gelado. As preparações citológicas foram então aplicadas sobre lâminas de microscopia e subsequentemente tingidas com uma solução 1 % Giemsa. O índice mitótico foi determinado como a porcentagem de células mitóticas numa população de 1000 células aleatoriamente analisadas. Um total de 2000 células foi analisado por tratamento. Os valores representam a media e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

3.12 Análise Estatística

A análise estatística para a expressão gênica foi realizada usando o teste não paramétrico de Mann Whitney. Para os testes funcionais foi usada a análise de varianza ANOVA (one-way e two-way), acompanhado do pós-teste não paramétrico de Bonferroni. Todos os testes incluíram comparações com amostras não tratadas ou como informadas no texto. A significância estatística foi indicada como * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. O efeito do M4N, TMZ, a combinação M4N+TMZ, e a dose de irradiação sobre a porcentagem do número de colônias foi testado por regressão logística. Todas as análises foram realizadas usando o programa estatístico SPSS17.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA). Os resultados são apresentados como o valor da media $\pm$ desvio padrão (DP). As porcentagens de expressão gênica, proliferação celular, sinergismo, sobrevivência clonogênica e radiosensibilização, apoptose, ciclo celular e índice mitótico foram apresentados graficamente em forma de histogramas usando o programa GraphPad Prism version 4.0.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Expressão gênica de *Survivin*, *Survivin-2B*, *Survivin-ΔEx3* e *Cdk1* em amostras e linhagens celulares de GBM

Para o estudo da expressão gênica foram utilizadas 16 amostras tumorais e seis linhagens celulares de GBM, assim como também seis amostras de tecido não neoplásico (substância branca) (NT). Após a quantificação relativa por qRT-PCR, foi encontrado que os genes *Survivin*, *Survivin-ΔEx3* e *Cdk1* foram significativamente expressos em amostras tumorais quando comparados com amostras de tecido não neoplásico (NT). Por outro lado a expressão de *Survivin-2B* nas amostras tumorais não foi significativamente diferente do que a apresentada pelas amostras de tecido não-neoplásico (Fig. 3).

Figura 3. Expressão gênica de *Survivin*, *Survivin-2B*, *Survivin-ΔEx3* e *Cdk1* por qRT-PCR em amostras de glioblastomas. Os níveis de expressão gênica de *Survivin* (A), *Survivin-2B* (B), *Survivin-ΔEx3* (C) e *Cdk1* (D) são mostrados em glioblastoma (GBM) (n=16) e tecido não neoplásico (NT) (n=6). Os níveis de expressão são indicados como a razão entre os genes alvo e os dois genes de referência (*TBP* e *HPRT*) para corrigir a variação nas quantidades de RNA. A linha contínua corresponde ao valor da média. Valores significativos de $p < 0,05$.

Adicionalmente, foi encontrado que todas as variantes gênicas de *Survivina* foram expressas em todas as linhagens celulares, sendo que a variante *Survivina* foi a mais expressa entre elas, principalmente na linhagem SF188 e U251, seguida pela variante *Survivin-ΔEx3*. A variante *Survivin-2B* foi a menos expressa entre elas. Por outro lado, todas as linhagens expressaram o gene *Cdk1*, principalmente a SF188 e U343 (Fig.4).

Figura 4. Expressão gênica de Survivin, Survivin-2B, Survivin-ΔEx3 e Cdk1 por qRT-PCR em linhagens celulares de glioblastomas. Os níveis de expressão gênica de *Survivin* (■), *Survivin-2B* (■), *Survivin-ΔEx3* (□) e *Cdk1* (▨) são mostrados em seis linhagens de glioblastoma. Os níveis de expressão são indicados como a razão entre os genes alvo e os dois genes de referencia (*TBP* e *HPRT*) para corrigir a variação nas quantidades de RNA e normalizados com a expressão gênica de tecido não neoplásico.

4.2 M4N inibe a proliferação de células de GBM

Neste estudo foi investigado o impacto do M4N na proliferação celular das linhagens celulares SF188, T98G, U251 e U343. M4N foi capaz de inibir a proliferação celular em todas as linhagens celulares de maneira dose e tempo dependente ($p < 0,05$), exceto para as células SF188 que exibiram uma inibição da proliferação apenas dose dependente ($p=0,009$) (Fig. 5). Uma significativa inibição do crescimento ($p<0,05$) foi detectada a partir de 48h do tratamento usando 40 μM M4N nas células T98G, U251 e U343, e 80 μM M4N nas células SF188. O efeito mais intenso foi observado com a dose de 80 μM M4N às 72 h de tratamento, quando a inibição do crescimento alcançou 60-80 % em todas as linhagens celulares. A determinação dos valores de IC_{50} -M4N após 48 h de exposição corroborou a marcada sensibilidade das células T98G, U251 e U343, e a relativa resistência das SF188 (Tabela 1).

Para ampliar a relevância destes resultados, foram testadas as respostas de CPGBs ao M4N. Um total de onze CPGBs foram incluídas na análise exibindo uma variedade de valores de IC_{50} -M4N em 48 h (18,4-282,2 μM). A maioria das CPGBs apresentou uma resposta dose dependente ao M4N, sendo o efeito mais intenso alcançado com a dose de 80 μM ($p<0,05$) (Fig. 6, Tabela 2). Os valores de IC_{50} -M4N foram drasticamente diminuídos em quatro CPGBs após o tratamento de M4N por 96h (GB27, GB28, GB45, and GB49) (Tabela 2). Todos estes resultados demonstram que o M4N foi eficiente na inibição da proliferação celular de células de GBM.

Adicionalmente a quimiosensibilidade à TMZ foi determinada para os ensaios de combinação de drogas. Linhagens celulares e CPGBs foram tratadas por 48 e 96 h, respectivamente com doses seriadas de TMZ. Nas linhagens celulares, as curvas de dose-resposta (Apêndice B) e os valores de IC_{50} -TMZ obtidos mostraram uma alta sensibilidade das células U251 e U343, e uma relativa resistência das células SF188 e T98G (Tabela 1). Nas CPGBs, os valores de IC_{50} foram menos heterogêneos e em torno de 500 μM como mostrado pelas curvas de proliferação (Apêndice C).

Desta forma, baseada nos valores de IC_{50} de cada droga, foi definida então a proporção molar de combinação de 1:25 (M4N:TMZ) para as linhagens SF188 e T98G, e 1:9,375 para as linhagens U251 e U343.

Figura 5. M4N inibiu a proliferação de linhagens celulares de glioblastoma. As linhagens celulares de glioblastoma SF188 (A), T98G (B), U251 (C) e U343 (D) foram cultivadas em presença de varias concentrações de M4N (0-80μM), por 24, 48 e 72h. A proliferação celular foi mensurada pelo *kit* XTT. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Tabela 1. Doses requeridas para induzir o 50% de inibição do crescimento celular (IC_{50}) nas linhagens celulares de GBM. Os valores foram obtidos no programa Calcsyn para o tratamento com M4N e TMZ por 48h. Valores representam a media $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes.

Linhagem celular	IC_{50} (μ M)		Proporção molar IC_{50} (M4N): IC_{50} (TMZ)	Proporção molar usada nas combinações
	M4N 48 h	TMZ 48 h		
SF188	171,39 $\pm$ 8,3	4464,2 $\pm$ 92,4	1 : 26,05	1 : 25
T98G	87,5 $\pm$ 2,2	2062,0 $\pm$ 26,1	1 : 23,65	1 : 25
U343	81,41 $\pm$ 4,6	664,56 $\pm$ 11,8	1 : 8,16	1 : 9,375
U251	64,27 $\pm$ 6,1	396,74 $\pm$ 9,4	1 : 6,17	1 : 9,375

Figura 6. M4N inibiu a proliferação de culturas primárias de glioblastoma. As culturas primárias de glioblastoma (CPGBs) foram cultivadas em presença de varias concentrações de M4N (0-80 μ M), por 48 h. A proliferação celular foi mensurada pelo *kit* XTT. * $p < 0,05$.

Tabela 2. Valores de IC₅₀ para M4N nas CPGBs. Os valores foram obtidos no programa Calcsyn para o tratamento em onze CPGBs com M4N por 48h. As culturas GB27, GB28, GB45 e GB49 foram adicionalmente tratadas com M4N por 96 h.

CPGBs	IC ₅₀ 48 h M4N (μM)	IC ₅₀ 96 h M4N (μM)
GB12	250,39	---
GM15	175,87	---
GM16	85,71	---
GM17	18214	---
GM20	282,20	---
GM22	169,00	---
GM27	68,71	25,13
GM28	n.p*	20,86
GM41	75,76	---
GM45	21,88	9,00
GM49	18,43	7,11

* Não foi possível calcular IC₅₀

4.3 M4N atua sinergicamente com TMZ em células de GBM

Nesta investigação foram determinados os efeitos da combinação de M4N e TMZ em linhagens celulares, representados pelo DRI, o CI e os níveis de dose-efeito da inibição do crescimento (ED_{50} – ED_{95}) (resumidos na Tabela S1 no Apêndice D).

Três diferentes estratégias de exposição de drogas foram testados (exposição simultânea M4N+TMZ, sequencial M4N→TMZ ou sequencial M4N→TMZ) com índices molares proporcionais aos valores individuais de IC_{50} como definido previamente (1:25 e 1:9,735). A Figura 7 e a Tabela S1 (no Apêndice D) apresentam o sinergismo dependente da sequência de exposição às drogas M4N e TMZ. A exposição simultânea de ambas as drogas (M4N+TMZ) por 48 h resultou em sinergismo em todas as linhagens celulares e em todos os níveis de fração afetada ($CI < 1$, Fig. 7 A-D), exceto para as células T98G que apresentaram a efeito sinérgico até uma fração afetada de 65 % (Fig. 7 B). Similarmente, quando a sequência de administração TMZ→M4N foi utilizada, efeitos sinérgicos foram encontrados em todos os níveis de inibição da proliferação ($CI < 1$; Fig. 7 I-L). A exposição sequencial com M4N seguido por TMZ (M4N→TMZ) produziu efeitos antagônicos em células T98G e U251 em todos os níveis de fração afetada ($CI > 1$, Fig. 7 F,H), em células SF188 produz efeitos antagônicos apenas até 35 % de inibição da proliferação celular (Fig. 7E), e em células U343 produziu efeitos sinérgicos até 75 % de inibição (Fig. 7G).

Também foram realizados experimentos de combinação de drogas em quatro CPGBs usando 20 μ M M4N (GB45 e GB49) ou 40 μ M (GB27 e GB28) de M4N, todas associadas com 500 μ M TMZ, utilizando as mesmas três estratégias de exposição de drogas mencionadas anteriormente. Similarmente com o encontrado em linhagens celulares, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre o tratamento com as drogas isoladas e os tratamentos com exposição simultânea e exposição sequencial TMZ→M4N nas culturas GB27 e GB49, enquanto que a sequência de administração inversa (M4N→TMZ) não produz diferenças estatísticas nas mesmas células (Fig. 8A,D). Para a cultura GB28 todas as três combinações de drogas resultaram em maior citotoxicidade do que os tratamentos isolados com M4N e TMZ (Fig. 8B). Contrariamente, em células GB45 não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos isolados e as combinações de drogas (Fig. 8C).

Portanto, todos esses resultados demonstraram que a combinação de M4N com TMZ causaram efeitos sinérgicos em células de GBM, preferencialmente quando a administração simultânea e sequencial com TMZ seguida de M4N foram utilizadas.

Figura 7. Interações dependentes da sequência de administração entre M4N e TMZ nas linhagens celulares SF188, T98G, U251 e U343. Determinação dos índices de combinação (CI) nas linhagens celulares de glioblastoma expostas a M4N e TMZ utilizando três diferentes estratégias de combinação: administração simultânea por 48h (A-D); administração sequencial M4N→TMZ, 24h cada droga (E-H); e administração sequencial TMZ→M4N, 24h cada droga (I-L). Os valores entre parêntesis representam as proporções molares utilizadas na combinação entre as drogas M4N:TMZ para as linhagens SF188 e T98G (1:25) e U251 e U343 (1:9,375). A linha pontuada (---) define o valor de CI=1 e indica aditivismo, CIs superiores ou inferiores indicam antagonismo ou sinergismo, respectivamente. Cruzes representam os valores de CI obtidos experimentalmente e as linhas contínuas representam CIs derivados computadorizadamente nos níveis de efeito desde 0-100 % de inibição da proliferação (*Fractional Effect*) de acordo com o programa Calcsyn.

Figura 8. Efeitos da combinação entre M4N e TMZ em culturas primárias de glioblastoma. As culturas primárias de glioblastoma GB27 (A), GB28 (B), GB45 (C) e GB49 (D) foram tratadas com M4N (40 μM ou 20 μM) e TMZ (500 μM) utilizando três diferentes estratégias de combinação: administração simultânea por 96 h (M4N+TMZ); administração sequencial M4N→TMZ (M4N/TMZ), 48h cada droga; e administração sequencial TMZ→M4N (TMZ/M4N), 48 h cada droga. Diferenças significantes entre os tratamentos combinados e os tratamentos isolados são mostradas com * $p < 0,05$.

4.4 M4N reduz a capacidade clonogênica e potencializa o efeito da radiação em células de GBM, principalmente quando combinado com TMZ

Através de experimentos de clonogenicidade, foi determinado que o M4N diminuiu significativamente a capacidade de formar colônias das linhagens SF188, U251 e U343 a partir da dose de 20 μ M M4N, e da linhagem T98G desde a dose de 40 μ M. Para todas as linhagens o efeito mais intenso foi obtido com a dose de 80 μ M M4N. Os valores de IC₅₀-clonogênicos obtidos posteriormente confirmaram a relativa resistência da linhagem T98G (Fig. 9A). Similarmente, ensaios clonogênicos testando diferentes doses de TMZ nas mesmas linhagens celulares demonstraram a alta resistência da linhagem T98G frente à TMZ, a mesma que foi corroborada pelo alto valor de IC₅₀ obtido (Fig. 9B).

Posteriormente, as linhagens celulares foram tratadas com os IC₅₀s das drogas M4N e TMZ em associação com radiação para determinar seus efeitos radiosensibilizantes. Assim, foi encontrado que o tratamento com M4N isolado radiosensibilizou apenas à linhagem celular U343 ($p < 0,001$) (Fig. 10D). A combinação do M4N com a TMZ aumentou significativamente os efeitos da radiação quando comparada com o tratamento isolado do M4N e da TMZ em todas as linhagens celulares testadas (Fig. 11). O efeito mais intenso foi alcançado com a maior dose de radiação utilizada em todas as linhagens celulares (6 Gy), como indicado pelos valores DER de 6,33; 1,59; 5,29 e 5,01 para as linhagens SF188, T98G, U251 e U343, respectivamente (Tabela 3).

Por tanto, o tratamento com M4N foi capaz de sensibilizar células de glioblastoma à radiação e incrementar a radiosensibilização causada por TMZ.

Figura 9. M4N e TMZ diminuem a capacidade clonogênica das linhagens celulares de glioblastoma. Células SF188, T98G, U251 e U343 foram tratadas com M4N (A) ou TMZ (B) durante 48 h e cultivadas durante 7-10 dias para formação de colônias. Células não tratadas (controle) e células tratadas apenas com o veículo DMSO (0 μ M) serviram como controles. As colônias formadas foram normalizadas à eficiência de plaqueamento (EP) e a fração de sobrevivência obtida foi comparada com o tratamento do veículo DMSO (0 μ M). Insertos em cada gráfico indicam o valor de IC₅₀ obtido para cada droga em todas as linhagens pelo programa Calcsyn. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 10. M4N radiosensibiliza a linhagem celular U343. Células das linhagens SF188 (A), T98G (B), U251 (C) e U343 (D) foram tratadas com DMSO (□) ou M4N (■) por 48h e após expostas a radiação (0-6 Gy). Após 7-10 dias, as colônias foram tingidas e contadas. Os valores mostrados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Para todas as linhagens celulares os valores de P obtidos por regressão linear são mostrados (DMSO *versus* M4N). Radiosensibilização só foi observada para a linhagem U343.

Figura 11. M4N aumenta a radiosensibilização causada por TMZ em células de glioblastoma. Células das linhagens SF188 (A), T98G (B), U251 (C) e U343 (D) foram tratadas com TMZ (□) ou M4N+TMZ (■) por 48h e após expostas a radiação (0-6 Gy). Após 7-10 dias, as colônias foram tingidas e contadas. Os valores mostrados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Para todas as linhagens celulares os valores de P obtidos por regressão linear são mostrados (TMZ *versus* M4N+TMZ). Aumento do potencial radiosensibilizante foi observado em todas as linhagens testadas.

Tabela 3. Efeitos do tratamento sobre a taxa do aumento de dose de radiação (DER) das linhagens celulares de glioblastoma SF188, T98G, U251 e U343

Linhagem celular	Tratamento	2 Gy	4 Gy	6 Gy
SF188	M4N	1,06	1,10	1,12
	TMZ	1,43	1,83	2,77
	M4N+TMZ	2,24	2,91	6,33
T98G	M4N	1,06	1,13	1,01
	TMZ	1,08	1,52	1,19
	M4N+TMZ	1,19	1,51	1,59
U251	M4N	1,05	1,11	1,17
	TMZ	1,21	1,67	2,76
	M4N+TMZ	1,80	2,35	5,29
U343	M4N	1,11	1,39	1,58
	TMZ	1,52	1,94	1,92
	M4N+TMZ	1,89	3,25	5,01

Foram destacados em negrita os valores de DER obtidos apartir de diferenças significativas de regressão lineal, como previamente descrito.

4.5 M4N causa morte celular apoptótica nas linhagens celulares de glioblastoma

Para determinar se M4N induz apoptose em linhagens celulares de GBM, foi utilizado o ensaio de anexina V/iodeto de propídeo. Como se apresenta na Figura 12, as células controle não tratadas e aquelas tratadas apenas com o veículo DMSO se mostraram viáveis como esperado, enquanto que o número de células apoptóticas aumentaram em células tratadas com M4N (células Anexina V-positivas) de uma maneira dose dependente. A análise estatística mostrou uma diferença significativa a partir da dose de 10 μ M em todas as linhagens celulares, principalmente na linhagem T98G que mostrou um 83 % de células apoptóticas nesta dose. O efeito mais drástico foi obtido utilizando 30 μ M de M4N, principalmente nas linhagens SF188 e T98G, com 92 % e 90 % de células apoptóticas, respectivamente (Fig. 12).

Figura 12. M4N induz apoptose de uma maneira dose dependente em linhagens de glioblastoma. Células apoptóticas foram identificadas por citometria de fluxo. Células não tratadas (Controle) e células tratadas apenas com o veículo DMSO (0 μ M) ou concentrações seriadas de M4N (10-30 μ M) foram incubadas por 48h antes de serem coletadas e submetidas à análise de citometria de fluxo. O gráfico mostra a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.6 M4N alterou o ciclo celular e reduziu o índice mitótico das linhagens de glioblastoma

Neste estudo foram avaliados os efeitos do M4N sobre o ciclo celular das linhagens SF188, T98G, U251 e U343. Como demonstra a Figura 13, o M4N induziu um pequeno, mas significativo, incremento no número de células em fase G2/M nas linhagens T98G, U251 e U343 (6%, 3,5% e 5% de incremento, respectivamente). Em contraste, o tratamento com M4N levou a uma significativa parada na fase G0/G1 na linhagem celular SF188 (Fig. 13A) com um 17% de incremento da população G0/G1, acompanhado por uma redução de 13% da população em fase S. Adicionalmente a Figura 14 apresenta a redução significativa do índice mitótico causado pelo M4N, começando com a dose de 10 μ M e 20 μ M para as linhagens T98G e SF188, respectivamente, e 40 μ M de M4N para ambas as linhagens U251 e U343. Apesar de que o maior efeito foi obtido com 80 μ M de M4N nas linhagens U343, U251 e T98G (90 %, 94 % e 72 % de redução, respectivamente), apenas uma redução de 62 % foi alcançada na linhagem SF188 nesta concentração (Fig. 14).

Figura 13. M4N afeta o ciclo celular de linhagens de glioblastoma. As células SF188 (A), T98G (B), U251 (C) e U343 (D) foram tratadas com DMSO ou M4N durante 24h. A porcentagem das células em varias fases do ciclo celular foram marcadas com o *Kit CycleTEST™ PLUS DNA* e analisadas por citometria de fluxo. Os valores são mostrados como a media ± desvio padrão de três experimentos independentes. * indica $p < 0,05$; comparado com o veículo controle (DMSO).

Figura 14. M4N reduz o índice mitótico de linhagens celulares de glioblastoma. As linhagens SF188, T98G, U251 e U343 foram tratadas com doses seriadas de M4N (0-80 μM). Um total de 2000 células foram contabilizadas em cada experimento. Os dados representam media ± desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.7 M4N alterou a expressão gênica das linhagens celulares de glioblastoma

Este estudo investigou a expressão gênica de *Survivina*, *Survivina-2B*, *Survivina-ΔEx3*, e *Cdk1* nas linhagens SF188, T98G, U251 e U343 após o tratamento com M4N através de procedimentos de qRT-PCR anteriormente descritos (Fig. 15). O M4N (40 μM) diminuiu significativamente o nível de expressão de *Survivina* de uma maneira tempo dependente nas linhagens T98G, U251 e U343 com o efeito mais intenso no tempo de 24 h (17 %, 30 % e 46 % comparado ao controle, respectivamente). Apesar de que a redução da expressão desta variante gênica não foi estatisticamente significativa em células SF188, foi observada uma tendência para isto (Fig. 15A). Além disso, o M4N também diminuiu os níveis de expressão da variante *Survivina-ΔEx3* e do gene *Cdk1* nas linhagens U251 e U343 após 24 h de exposição à droga (Fig. 15C,D). De maneira interessante, o M4N causou um aumento da expressão da variante *Survivina-2B* em células T98G ($p < 0,001$) e uma tendência para isto em células SF188, enquanto que reduziu a expressão desta variante gênica em células U343 (Fig. 15B).

Figura 15. M4N desregula expressão gênica em linhagens celulares de glioblastoma. Os níveis de expressão gênica de *Survivina* (A), *Survivina-2B* (B), *Survivina-ΔEx3* (C) e *Cdk1* (D) foram mensurados após 6, 12 e 24 h da administração de M4N (40 μ M) nas linhagens celulares SF188, T98G, U251 e U343. Os gráficos mostram o valor da média $\pm$ desvio padrão de experimentos de qRT-PCR realizados independentemente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Apesar da maior compreensão dos mecanismos envolvidos com a regulação molecular do GBM, muitas terapias alvo-específicas não têm atingido às expectativas esperadas e o prognóstico desta neoplasia ainda permanece desfavorável (Khasraw et al., 2010, Ohgaki, Kleihues et al., 2007, Shirahata et al., 2009). Mesmo assim, entre todas essas tentativas, uma conclusão evidente é que monoterapias resultam em efeitos discretos devido provavelmente à existência de vias moleculares funcionalmente redundantes (Perry et al., 2012). Desta forma, moléculas que são diferencialmente expressas no câncer, mas que ao mesmo tempo intersectam múltiplas vias de sinalização necessárias para a manutenção do fenótipo neoplásico, representam melhores opções para a terapia alvo-específica (Perry et al., 2012, Lackner et al., 2012). A proteína antiapoptótica Survivin e o principal regulador do ciclo celular Cdk1 apresentam essas propriedades e representam desde há poucos anos importantes moléculas para a terapia alvo-específica numa grande variedade de tumores, incluindo o GBM (Altieri, 2008, Shapiro, 2006).

Na primeira fase do presente estudo foram analisados os níveis de expressão do gene *Survivin* e suas variantes por *splicing* alternativo *Survivina-2B* e *Survivina-ΔEx3*, assim como do gene *Cdk1* em amostras tumorais, linhagens celulares de GBM, e em amostras de tecido não neoplásico usando qRT-PCR. Vários estudos têm descrito a expressão do mRNA de *Survivina* e suas variantes gênicas, porém esses estudos utilizaram análises de RT-PCR qualitativo ou análises de Northern blot (Islam et al., 2000, Monzo et al., 1999, Sarela et al., 2000; Shinozawa et al., 2000). Naqueles estudos onde a técnica de PCR em tempo real foi utilizada, a grande maioria investigou apenas o mRNA de *Survivina* (Asanuma et al., 2000; Kappler et al., 2001, Moriai et al., 2001). O primeiro estudo quantitativo investigando a expressão de *Survivina* e suas variantes foi realizado por Mahotka, et al (1999) em amostras de carcinoma renal. Apenas um estudo investigou quantitativamente a expressão de *Survivina* e suas variantes gênicas em amostras tumorais e linhagens celulares de GBM utilizando Taqman RT-PCR (Yamada et al., 2003). Da mesma forma que Yamada et al. (2003), na presente investigação os níveis de expressão gênica de *Survivina* e *Survivina-ΔEx3* foram significativamente encontrados expressas em amostras tumorais e linhagens celulares de GBM quando comparadas com amostras de tecido não neoplásico, enquanto que a expressão da variante *Survivin-2B* não apresentou diferenças significativas quando comparadas com tecido não neoplásico. Por outro lado, e como previamente descrito por Chen et al. (2008), foi

encontrada uma significativa expressão do gene *Cdk1* em amostras tumorais e em linhagens celulares de glioblastoma do que em tecido não neoplásico.

Desta forma, esses resultados foram correspondentes com o descrito pela literatura e ofereceram evidências suficientes para analisar a inibição desses alvos como potenciais alternativas no tratamento do GBM. Desafortunadamente, não foi possível investigar a relação entre a expressão desses genes e o prognóstico desta neoplasia devido ao limitado número de casos avaliados aqui. Maiores estudos devem ser realizados para determinar essa relação, principalmente entre a expressão das variantes gênicas *Survivina-2B* e *Survivina-ΔEx3* e a sobrevida dos pacientes.

Numa segunda fase do estudo, foram realizados ensaios funcionais de inibição com o agente M4N, um inibidor transcricional de genes dependentes do fator de transcrição Sp1, tais como *Survivina* e *Cdk1*, em células de GBM. Para isso, foram selecionadas as linhagens celulares de glioblastoma baseadas no alto nível de expressão de *Survivina*: SF188 (linhagem proveniente de um glioblastoma pediátrico), U251 e U343. Também foi selecionada a linhagem T98G que de acordo com a literatura (Bobola et al., 1996, Chalmers et al., 2009) apresenta expressão e atividade do gene de resistência *MGMT* (Brassescio MS, Comunicação pessoal).

Foi encontrado que M4N atuou inibindo eficientemente a proliferação celular das linhagens celulares selecionadas, assim como também das culturas primárias de GBM. Por serem as análises realizadas com culturas primárias de tecidos neoplásicos consideradas um modelo mais representativo dos tumores *in vivo* do que as linhagens celulares neoplásicas estabelecidas (Qian et al. 2006, Borges et al., 2012), é relevante destacar nesta investigação o alto efeito anti-proliferativo do M4N em células de GBM.

Efeitos da inibição da proliferação do M4N sobre linhagens celulares neoplásicas e vários tipos de tumores xenotransplantados têm sido descritos por diversos autores, incluindo melanoma (Lambert et al., 2001, Meyers et al., 2009), carcinoma de próstata, carcinoma hepatocelular, colorrectal, mama (Park et al., 2005), leucemia (Mak et al., 2007, Zhu et al., 2010), adenocarcinoma esofágico (Hansel et al., 2005), câncer cervical e carcinoma de bexiga (Lopez et al., 2007). Nossa investigação indica que o GBM é um alvo promissor para a terapia com M4N.

Recentemente, um estudo clínico de fase I conduzido por Grossman et al. (2012) em pacientes com gliomas recorrentes de alto grau, incluindo glioblastomas, encontrou dados farmacocinéticos encorajadores e sugeriu que o M4N poderia ser potencialmente combinado

com radiação e temozolomida em gliomas de alto grau recentemente diagnosticados, tais como o GBM, para otimizar seu tratamento.

Para testar esta hipótese e para determinar as interações entre esses agentes, o presente estudo utilizou ensaios de combinação de drogas entre M4N e TMZ testando três diferentes estratégias de administração, em linhagens celulares e quatro culturas primárias de GBM. Assim, foi observado que tanto a administração simultânea como o tratamento sequencial com TMZ seguido de M4N (TMZ→M4N) exibiram efeitos sinérgicos nas quatro linhagens celulares e em três das quatro culturas primárias investigadas. Em contraste, a sequência reversa (M4N→TMZ) levou a um efeito principalmente antagônico nessas células.

Uma provável explicação para este antagonismo pode ser encontrada no estudo de Chang et al. (2004) que descreveram através de ensaios *in vitro* que as propriedades antiproliferativas do M4N são revertidas após a remoção do agente do meio de cultura, mesmo que nesse estudo as células investigadas tenham sido tratadas até com 72h de exposição ao M4N. Assim, as células de GBM do presente estudo recuperariam seu potencial proliferativo na ausência do M4N. Subsequentemente, a administração de TMZ poderia ativar diferentes mecanismos de resistência descritos por Liu et al. (2006), entre eles, a ativação da expressão de Survivina. Desta forma, é possível inferir que, mecanismos reversíveis do M4N e ativação de resistência celular provocada pela TMZ poderiam influenciar no antagonismo registrado no tratamento M4N→TMZ. Para a sequência de administração TMZ→M4N, um mecanismo inverso poderia explicar o sinergismo encontrado.

Os resultados sinérgicos da combinação simultânea e sequencial TMZ→M4N, obtidos neste estudo, permitem não só corroborar o potencial efeito quimiossensibilizante do M4N quando combinado simultaneamente com TMZ, o que já foi demonstrado para outras drogas quimioterápicas convencionais como a doxorrubicina e o paclitaxel (Chang et al., 2006, Lopez et al., 2007), mas também permitem reconhecer a vital importância da sequência de administração de drogas quimioterápicas sobre a eficiência antitumoral (Shah, Schwartz, 2000, 2001), como demonstrado pela combinação sinérgica TMZ→M4N.

Este trabalho também investigou o potencial radiosensibilizante de M4N através de ensaios clonogênicos. Foi encontrado que o tratamento com M4N isolado aumentou significativamente a sensibilidade à radiação apenas na linhagem celular U343, a única p53 proficiente do grupo estudado (**Anexo B**). É conhecido que o dano ao DNA causado por radiação estabiliza a proteína p53 e consequentemente ativa seu papel como repressor transcricional de *Survivina* (Hoffman et al., 2002, Yamamoto et al., 2008). Desta maneira,

células p53 proficientes capazes de bloquear a transcrição de *Survivina* poderiam ser mais susceptíveis à combinação M4N→radiação, enquanto células p53 deficientes (p53^{mut}) tais como SF188, T98G e U251 (Ishii et al., 1999; Anexo B) seriam resistentes ao M4N, como foi demonstrado pelo presente estudo. Porém, é possível acreditar que este mecanismo de resistência pode ser contornado com uma sequência de administração terapêutica diferente, onde a radiação seja seguida do tratamento com M4N (radiação→M4N), como realizado por Sun et al. (2011) em células de carcinoma de pulmão de células não pequenas.

Por outro lado, a combinação de M4N e TMZ aumentou significativamente a sensibilidade de todas as linhagens celulares de GBM à radiação quando comparadas com o tratamento das duas drogas isoladas. Foi previamente descrito que a inibição de *Survivina* por outras estratégias como siRNA, oligonucleotídeos antisense ou moléculas pequenas como o YM155 aumenta a radiosensibilidade de células neoplásicas (Iwasa et al., 2008, Cao et al., 2004, Rodel et al., 2008, Kami et al., 2005). O único estudo avaliando esse potencial radiosensibilizante utilizando M4N foi o desenvolvido por Sun et al. (2011), porém, não foi investigada sua associação com nenhum agente quimioterápico. No presente estudo, foi investigado o efeito radiosensibilizante causado pela combinação de M4N e um agente quimioterápico, que como nosso estudo sugere é dependente do *status* do p53 e da sequência de administração da droga.

Muitas investigações têm demonstrado que o tratamento com M4N aplicado a diferentes células tumorais humanas *in vitro* e em modelos xenotransplantados induz apoptose pela supressão do gene antiapoptótico *Survivina*, e parada do ciclo celular através da diminuição da expressão do gene promotor de proliferação Cdk1 (Chang et al., 2004, Park et al., 2005, Sun et al., 2011). Apesar de que a resistência a apoptose é uma característica intrínseca do glioblastoma, na presente investigação foi demonstrado que o M4N induz morte celular apoptótica de uma maneira dose dependente em todas as células de glioblastoma investigadas, atingindo níveis de até 92 % e 90 % nas linhagens SF188 e T98G, respectivamente. Adicionalmente, foram investigadas as mudanças no ciclo celular induzidas pelo M4N, e se encontrou um discreto, mas significativo, incremento da população celular em fase G2/M nas células T98G, U251 e U343 após 24 h de tratamento. A linhagem SF188 exibiu uma particular resposta com uma parada significativa do ciclo celular em fase G0/G1, e uma diminuição menos intensa do índice mitótico quando comparada com as outras linhagens celulares estudadas.

Apesar de que muitos estudos indicam que o M4N causa parada do ciclo celular na fase G2/M, alguns estudos descreveram que o M4N pode alterar de forma dinâmica o ciclo celular de células neoplásicas, com um incremento precoce das células na fase G1/G0 e um subsequente aumento da população celular na fase G2/M após 48 h de exposição ao agente, causado provavelmente pela atividade de proteínas de checagem do ciclo celular que funcionam na entrada da síntese de DNA e na entrada à fase G1/G0 (Lambert et al., 2001). Assim, é de importância destacar que adicionais investigações são necessárias para aprimorar o conhecimento sobre a dinâmica da progressão do ciclo celular influenciada pelo agente M4N em células de GBM, especialmente na linhagem SF188.

A linhagem SF188 mostrou os maiores níveis de expressão gênica tanto de *Survivina* quanto de *Cdk1* em relação às outras linhagens celulares, característica que poderia ser a responsável pela relativa resistência proliferativa desta linhagem ao M4N quando comparada à T98G, U251 e U343, como verificado pelos valores de IC₅₀ obtidos. Estes resultados são associados também com a redução menos intensa da transcrição de *Survivina* e *Cdk1* causada pelo M4N, investigada por qRT-PCR neste estudo. Apesar disso, a linhagem SF188 mostrou uma alta sensibilidade apoptótica mediada pelo M4N e o maior efeito sinérgico quando tratado com a associação M4N e TMZ comparado com as outras linhagens de glioblastoma.

Recentemente, Bax et al. (2009), encontrou que a linhagem SF188 apresenta uma alta porcentagem de células tronco CD133+. Sabe-se que populações de células CD133+ são radio e quimioresistentes, inclusive ao agente TMZ (Liu et al., 2006), e que a proporção dessas células num determinado tumor se correlaciona inversamente com uma melhor resposta clínica em pacientes com glioma independentemente do grau tumoral (Zeppernick et al., 2008) e a sobrevida dos pacientes com glioblastoma (Ardebili et al., 2011). Além disso, Jin, et al. (2010) encontraram que a expressão de *Survivina* em células tronco tumorais (CD133+) é significativamente maior do que em células neoplásicas CD133 negativas, podendo adquirir resistência à TMZ através de um aumento da expressão de *Survivina* entre outros genes (Liu et al., 2006). Por esses motivos, é possível considerar que na linhagem SF188, certas populações celulares, tais como células CD133+, poderiam ser as responsáveis da resistência à TMZ (como previamente encontrado nos ensaios de proliferação) e também da susceptibilidade à apoptose após o tratamento com M4N, apesar da discreta redução da transcrição de *Survivina* observada na população celular total desta linhagem. Adicionais estudos são necessários para determinar se existem diferenças de expressão de *Survivina* entre

subpopulações celulares específicas dentro desta linhagem celular, e se estas diferenças são as responsáveis pela susceptibilidade a agentes como o M4N.

Além disso, todas essas interessantes diferenças entre a linhagem de glioblastoma pediátrica SF188 e as linhagens de glioblastoma mostradas neste estudo são consistentes com diferentes linhas de evidencia clínica e molecular que sugerem que glioblastomas pediátricos são realmente diferentes de glioblastomas adultos (Gaspar et al., 2010, Valera et al., 2009, Bax et al., 2009).

Entre os outros efeitos do M4N analisados neste trabalho, foi encontrado que o M4N diminuiu a expressão da variante gênica *Survivina-ΔEx3* em células U251 e U343, e aumentou significativamente o mRNA de *Survivina-2B* em células T98G com uma tendência à isto em células SF188. Embora esses interessantes dados poderiam contribuir com a hipótese de que *Survivina-ΔEx3* desenvolve um papel positivo na inibição da apoptose enquanto que *Survivina-2B* representa um fator proapoptótico (Altieri, 2003, Mahotka et al., 1999, Sampath, 2007, Wang et al., 2002, Zhu et al., 2004, Ling et al., 2007), a redução da transcrição de *Survivina-2B* em células U343 tratadas com M4N sugere que esses conceitos ainda são controversos como já descrito por outros autores (Zheng et al., 2011, Jacob et al., 2012).

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A expressão gênica de *Survivina*, *Survivina-ΔEx3* e *Cdk1* foi significativamente maior em amostras tumorais do que em amostras de tecido não neoplásico. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre a expressão de *Survivina-2B* em amostras de pacientes e em amostras de tecido não neoplásico. Todas as linhagens de glioblastoma utilizadas nesta investigação expressam os genes estudados.

O tratamento com o M4N inibiu a proliferação de linhagens celulares e culturas primárias de glioblastoma.

A combinação do M4N com a TMZ produz preferencialmente efeitos sinérgicos quando combinados simultaneamente ou com a sequência TMZ seguida de M4N (TMZ→M4N). Contrariamente, a sequência inversa M4N→TMZ resultou principalmente em efeitos antagônicos em linhagens celulares e culturas primárias de glioblastoma.

O tratamento com o M4N isolado radiosensibilizou apenas células da linhagem U343, proficientes em p53. Por outro lado, a associação do M4N com a TMZ foi capaz de aumentar a radiosensibilização causada apenas pela TMZ.

M4N alterou o ciclo celular, diminuiu o índice mitótico, aumentou apoptose e desregulou a expressão gênica de linhagens celulares de glioblastoma.

O M4N pode ser considerado um promissor agente para o tratamento com o glioblastoma, inclusive se associado com as terapias atuais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- Adams, RR, Carmena, M, Earnshaw, WC. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol* 2001;11(2):49–54.
- Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC. Anti-apoptosis gene, surviving ,and prognosis of neuroblastoma. *Lancet*. 1998; 351(9106):882-3.
- Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003; 22:8581-8589. doi:10.1038/sj.onc.1207113
- Altieri DC. New wirings in the survivin networks. *Oncogene* 2008; 27:6276–6284. doi:10.1038/onc.2008.303
- Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 2001;7(12):542-7.
- Altieri, DC. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr. Opin. Cell Biol* 2006; 18, 609–615.
- Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem* 1998; 273:11177-11182. doi:10.1074/jbc.273.18.11177
- Ardebili SY, Zajc I, Gole B, Campos B, Herold-Mende C, Drmota S, et al. CD133/prominin1 is prognostic for GBM patient's survival, but inversely correlated with cysteine cathepsins' expression in glioblastoma derived spheroids. *Radiol Oncol*. 2011 Jun;45(2):102-15
- Asanuma K, Moriai R, Yajima T, Yagihashi A, Yamada M, Kobayashi D, et al. Survivin as a radioresistance factor in pancreatic cancer. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91:1204–1209.
- Bai RY, Staedtke V, Riggins GJ. Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. *Trends Mol Med*. 2011 Jun;17(6):301-12.
- Bassermann F, Peschel C, Duyster J. Mitotic Entry: A Matter of Oscillating Destruction. *Cell Cycle* 2005; 4:11, 1515-1517.
- Bassi C, Mello SS, Cardoso RS, Godoy PD, Fachin AL, Junta CM, et al. Transcriptional changes in U343 MG-a glioblastoma cell line exposed to ionizing radiation. *Hum Exp Toxicol* 2008 Dec; 27(12):919-29.
- Bax DA, Little SE, Gaspar N, Perryman L, Marshall L, Viana-Pereira M, et al. Molecular and phenotypic characterisation of paediatric gliomas cell lines as models for

- preclinical drug development. PLoS One 2009; 4(4):e5209. doi:10.1371/journal.pone.0005209
- Bobola MS, Tseng SH, Blank A, Berger MS, Silber JR. Role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in resistance of human brain tumor cell lines to the clinically relevant methylating agents temozolomide and streptozotocin. Clin Cancer Res. 1996 Apr;2(4):735-41.
- Bodey B, Siegel SE, Kaiser HE. Expression of proline-directed protein kinase, (p34cdc2/p58cyclin A), a novel cell proliferation marker in childhood brain tumors. In Vivo 2002; 16:589-94.
- Borges KS, Castro-Gamero AM, Moreno DA, da Silva Silveira V, Brassesco MS, de Paula Queiroz RG, et al. Inhibition of Aurora kinases enhances chemosensitivity to temozolomide and causes radiosensitization in glioblastoma cells. J Cancer Res Clin Oncol 2012; 138(3):405-14. doi:10.1007/s00432-011-1111-0
- Brandes AA, Tososni A, Enrico F. Glioblastoma in adults. Critical Review in Oncology/Hematology 2008; 67:139-152.
- Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and Darwinian selection in tumours. Trends Cell Biol 1999; 9: M57–M60.
- Cao C, Mu Y, Hallahan DE, Lu B. XIAP and survivin as therapeutic targets for radiation sensitization in preclinical models of lung cancer. Oncogene 2004; 23:7047–7052. doi:10.1038/sj.onc.1207929
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. Oncogene 2004; 23, 2825–2837.
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Kroemer G. Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. Cell Death and Differentiation 2002; 9, 1287-1293.
- Castro-Gamero AM, Borges KS, da Silva Silveira V, Lira RC, de Paula Gomes Queiroz R, Valera FC, et al. Inhibition of nuclear factor-κB by dehydroxymethylepoxyquinomicin induces schedule-dependent chemosensitivity to anticancer drugs and enhances chemoinduced apoptosis in osteosarcoma cells. Anticancer Drugs 2012; 23(6):638-50. doi:10.1097/CAD.0b013e328350e835
- Chakravarti A, Noll E, Black PM, Finkelstein DF, Finkelstein DM, Dyson NJ, et al. Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. J Clin Oncol 2002; 20(4):1063-8.

- Chakravarti A, Zhai GG, Zhang M, Malhotra R, Latham DE, Delaney MA, et al. Survivin enhances radiation resistance in primary human glioblastoma cells via caspase-independent mechanisms. *Oncogene* 2004; 23:7494–7506. doi:10.1038/sj.onc.1208049
- Chalmers AJ, Ruff EM, Martindale C, Lovegrove N, Short SC. Cytotoxic effects of temozolomide and radiation are additive- and schedule-dependent. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009 Dec 1;75(5):1511-9.
- Chang CC, Heller JD, Kuo J, Huang RC. Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid induces growth arrest and cellular apoptosis by inhibiting Cdc2 and survivin expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(36):13239–13244. doi:10.1073/pnas.0405407101
- Chang CC, Liang YC, Klutz A, Hsu CI, Lin CF, Mold DE, et al. Reversal of multidrug resistance by two nordihydroguaiaretic acid derivatives, M4N and maltose-M3N, and their use in combination with doxorubicin or paclitaxel. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58:640–53.
- Chen H, Huang Q, Dong J, Zhai DZ, Wang AD, Lan Q. Overexpression of CDC2/CyclinB1 in gliomas, and CDC2 depletion inhibits proliferation of human glioma cells in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 2008; 8:29. doi:10.1186/1471-2407-8-29
- Chen H, Teng L, Li JN, Park R, Mold DE, Gnabre J, et al. Antiviral activities of methylated nordihydroguaiaretic acids. 2. targeting herpes simplex virus replication by the mutation insensitive transcription inhibitor tetra-O-methyl-NDGA. *J Med Chem.* 1998;41:3001–3007.
- Cheung CH, Cheng L, Chang KY, Chen HH, Chang JY. Investigations of survivin: the past, present and future. *Front Biosci.* 2011 Jan 1;16:952-61.
- Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984; 22:27–55
- Craig J, Callahan M, Huang RC, DeLucia AL. Inhibition of human papillomavirus type 16 gene expression by nordihydroguaiaretic acid plant lignan derivatives. *Antiviral Res.* 2000; 47:19–28.
- de Groot J, Milano V. Improving the prognosis for patients with glioblastoma: the rationale for targeting Src. *J Neurooncol.* 2009 Nov; 95(2):151-63

- Dunphy FR, Dukelow KK, Provenzal J, Crawford J. Phase I clinical results of intralesional injection of tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid (M4N) in refractory head and neck cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 2004; 23:#5614.
- Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411:342–8.
- Fluge Ø, Bruland O, Akslen LA, Lillehaug JR, Varhaug JE. Gene expression in poorly differentiated papillary thyroid carcinomas. *Thyroid* 2006, 16:161-75.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 2006; 1:2315–2319. doi:10.1038/nprot.2006.339
- Friedman HS, Kerby T, Calvert H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res*. 2000 Jul; 6(7):2585-97.
- Gaspar N, Sharp SY, Eccles SA, Gowan S, Popov S, Jones C, et al. Mechanistic evaluation of the novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 in adult and pediatric glioblastoma. *Mol Cancer Ther* 2010; 9(5):1219-33. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0683.
- Grahovac G, Tomac D, Lambasa S, Zoric A, Habek M. Cerebellar glioblastomas: pathophysiology, clinical presentation and management. *Acta Neurochir (Wien)*. 2009 Jun; 151(6):653-7. Epub 2009 Mar 25.
- Grossman SA, Ye X, Peereboom D, Rosenfeld MR, Mikkelsen T, Supko JG, et al. Phase I study of terameprocol in patients with recurrent high-grade gliomas. *Neuro-Oncology* 2012; 14(4):511-7. doi:10.1093/neuonc/nor230
- Hagemann C, Anacker J, Haas S, Riesner D, Schömig B, Ernestus RI, et al. Comparative expression pattern of Matrix-Metalloproteinases in human glioblastoma cell-lines and primary cultures. *BMC Res Notes*. 2010 Nov 10;3:293.
- Hanahan D, Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell* 2010; 100: 57–70.
- Hansel DE, Dhara S, Huang RC, Ashfaq R, Deasel M, Shimada Y. CDC2/CDK1 expression in esophageal adenocarcinoma and precursor lesions serves as a diagnostic and cancer progression marker and potential novel drug target. *Am J Surg Pathol* 2005; 29:390–399.
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10; 352(10):997-1003.

- Heller JD, Kuo J, Wu TC, Kast WM, Huang RC. Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid induces G2 arrest in mammalian cells and exhibits tumoricidal activity in vivo. *Cancer Res* 2001; 61:5499–5504.
- Hendruschk S, Wiedemuth R, Aigner A, Töpfer K, Cartellieri M, Martin D, et al. RNA interference targeting survivin exerts antitumoral effects in vitro and in established glioma xenografts in vivo. *Neuro Oncol.* 2011 Oct; 13(10):1074-89. Epub 2011 Jul 25.
- Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the antiapoptotic survivin gene by wild type p53. *J. Biol. Chem* 2002; 277(5): 3247–3257. doi:10.1074/jbc.M106643200
- Hu J, Kesari S. The molecular basis for novel therapies. *Cancer J.* 2012 Jan-Feb; 18(1):32–9.
- Huang RC, Chang CC, Mold D. Survivin-dependent and -independent pathways and the induction of cancer cell death by tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid. *Semin Oncol.* 2006 Aug;33(4):479-85.
- Huang RC, Li Y, Giza PE, Gnabre JN, Abd-Elazem IS, King KY, et al. Novel antiviral agent tetraglycylated nordihydroguaiaretic acid hydrochloride as a host-dependent viral inhibitor. *Antiviral Res* 2003; 58:57–64.
- Hwu JR, Tseng WN, Gnabre J, Giza P, Huang RC. Antiviral activities of methylated nordihydroguaiaretic acids. 1. synthesis, structure identification, and inhibition of tat-regulated HIV transactivation. *J Med Chem.* 1998;41:2994–3000.
- Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, et al. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* 1999; 9(3):469-79.
- Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, et al. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene.* 2000 Feb 3;19(5):617-23.
- Ito Y, Takeda T, Sakon M, Monden M, Tsujimoto M, Matsuura N. Expression and prognostic role of cyclin-dependent kinase 1 (cdc2) in hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2000, 59:68-74.
- Iwasa T, Okamoto I, Suzuki M, Nakahara T, Yamanaka K, Hatashita E, et al. Radiosensitizing effect of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in

- non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2008; 14:6496–6504. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0468
- Jackson RJ, Fuller GN, Abi-Said D, Lang FF, Gokaslan ZL, Shi WM, et al. Limitations of stereotactic biopsy in the initial management of gliomas. *Neuro Oncol*. 2001 Jul; 3(3):193-200.
- Jacob NK, Cooley JV, Shirai K, Chakravarti A. Survivin splice variants are not essential for mitotic progression or inhibition of apoptosis induced by doxorubicin and radiation. *Onco Targets Ther* 2012; 5:7-20. doi:10.2147/OTT.S28147
- Jarjour AA, Durko M, Luk TL, Marçal N, Shekarabi M, Kennedy TE. Autocrine netrin function inhibits glioma cell motility and promotes focal adhesion formation. *PLoS One*. 2011;6(9):e25408. Epub 2011 Sep 28.
- Jin F, Zhao L, Guo YJ, Zhao WJ, Zhang H, Wang HT, et al. Influence of Etoposide on anti-apoptotic and multidrug resistance-associated protein genes in CD133 positive U251 glioblastoma stem-like cells. *Brain Res*. 2010 Jun 8;1336:103-11. Epub 2010 Apr 11.
- Jung TY, Jung S, Moon KS, Kim IY, Kang SS, Kim YH, et al. Changes of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation and MGMT protein expression after adjuvant treatment in glioblastoma. *Oncol Rep*. 2010 May;23(5):1269-76.
- Kami K, Doi R, Koizumi M, Toyoda E, Mori T, Ito D, et al. Downregulation of survivin by siRNA diminishes radioresistance of pancreatic cancer cells. *Surgery* 2005; 138:299–305. doi:10.1016/j.surg.2005.05.009
- Kappler M, Köhler T, Kampf C, Diestelkötter P, Würl P, Schmitz M, et al. Increased survivin transcript levels: an independent negative predictor of survival in soft tissue sarcoma patients. *Int J Cancer*. 2001 Nov 20;95(6):360-3.
- Katoh M, Wilmotte R, Belkouch MC, de Tribolet N, Pizzolato G, Dietrich PY. Survivin in brain tumors: an attractive target for immunotherapy. *J Neurooncol*. 2003; 64(1-2):71-6.
- Khanna N, Dalby R, Connor A, Church A, Stern J, Frazer N. Phase I clinical trial of repeat dose terameprocol vaginal ointment in healthy female volunteers. *Sex Transm Dis*. 2008;35:577–582.
- Khanna N, Dalby R, Tan M, Arnold S, Stern J, Frazer N. Phase I/II clinical safety studies of terameprocol vaginal ointment. *Gynecol Oncol*. 2007;107:554–562.

- Khasraw M, Lassman AB. Advances in the treatment of malignant gliomas. *Curr Oncol Rep* 2010; 12:26–33. doi:10.1007/s11912-009-0077-4
- Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol* 1999; 1(1): 44–51.
- Lackner MR, Wilson TR, Settleman J. Mechanisms of acquired resistance to targeted cancer therapies. *Future Oncol* 2012; 8(8):999-1014. doi:10.2217/fon.12.86
- Lambert JD, Meyers RO, Timmermann BN, Dorr RT. Tetra-O-methylnordihydroguaiaretic acid inhibits melanoma in vivo. *Cancer Lett* 2001; 171:47–56. doi:10.1016/S0304-3835(01)00560-2
- Leaf, C. Why we're losing the war on cancer (and how to win it). *Fortune* 2004; 149, 76–97.
- Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; 396:580–584.
- Lima FR, Kahn SA, Soletti RC, Biasoli D, Alves T, da Fonseca AC, et al. Glioblastoma: Therapeutic challenges, what lies ahead. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jun 5;1826(2):338-349.
- Ling X, Cheng Q, Black JD, Li F. Forced expression of survivin-2B abrogates mitotic cells and induces mitochondria-dependent apoptosis by blockade of tubulin polymerization and modulation of Bcl-2, Bax, and survivin. *J Biol Chem* 2007; 28237:27204–14. doi:10.1074/jbc.M705161200
- Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006; 5:67. doi:10.1186/1476-4598-5-67
- 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(4):402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lopez RA, Goodman AB, Rhodes M, Blomberg JA, Heller J. The anticancer activity of the transcription inhibitor terameprocol (meso-tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid) formulated for systemic administration. *Anticancer Drugs* 2007; 18:933–939. doi:10.1097/CAD.0b013e32813148e0
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System *Acta Neuropathol* 2007; 114:97–109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4

- Lü JM, Nurko J, Weakley SM, Jiang J, Kougias P, Lin PH, et al. Molecular mechanisms and clinical applications of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and its derivatives: An update. *Med Sci Monit.* 2010; 16:RA93–100.
- Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res* 1999; 59(24):6097–102.
- Mak DH, Schober WD, Chen W, Heller J, Andreeff M, Carter BZ. Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid inhibits growth and induces death of leukemia cells independent of Cdc2 and survivin. *Leuk Lymphoma* 2007; 48:774–785. doi:10.1080/10428190601186143
- Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 222–231.
- Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(3):153-166. doi:10.1038/nrc2602
- Marchesi F, Turriziani M, Tortorelli G, Avvisati G, Torino F, De Vecchis L. Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacol Res.* 2007 Oct;56(4):275-87. Epub 2007 Aug 9.
- Mayburd AL, Golovchikova I, Mulshine JL. Successful anti-cancer drug targets able to pass FDA review demonstrate the identifiable signature distinct from the signatures of random genes and initially proposed targets. *Bioinformatics.* 2008 Feb 1;24(3):389-95.
- Meyers RO, Lambert JD, Hajicek N, Pourpak A, Kalaitzis JA, Dorr RT. Synthesis, characterization, and anti-melanoma activity of tetra-O-substituted analogs of nordihydroguaiaretic acid. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19:4752–4755. doi:10.1016/j.bmcl.2009.06.063
- Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* 2008; 14(16):5000-5.
- Monzó M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sánchez JJ, Maestre J, et al. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* 1999; 17(7):2100-4.

- Moriai R, Asanuma K, Kobayashi D, Yajima T, Yagihashi A, Yamada M, et al. Quantitative analysis of the anti-apoptotic gene survivin expression in malignant haematopoietic cells. *Anticancer Res* 2001 Jan-Feb; 21(1B):595-600.
- Nicholson JM, Duesberg P. On the karyotypic origin and evolution of cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009 Oct 15; 194(2):96-110.
- Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2001, 2:21–32.
- O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, et al. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97(24):13103–13107. doi:10.1073ypnas.240390697
- O'Connor DS, Wall NR, Porter AC, Altieri DC. A p34cdc2 survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell.* 2002 Jul;2(1):43-54.
- Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007; 170:1445–1453. doi: 10.2353/ajpath.2007.070011
- Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci.* 2009 Dec;100(12):2235-41.
- Oppel F, Müller N, Schackert G, Hendruschk S, Martin D, Geiger KD, et al. SOX2-RNAi attenuates S-phase entry and induces RhoA-dependent switch to protease-independent amoeboid migration in human glioma cells. *Mol Cancer.* 2011 Nov 9; 10:137.
- Park R, Chang CC, Liang YC, Chung Y, Henry RA, Lin E, et al. Systemic treatment with tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid suppresses the growth of human xenograft tumors. *Clin Cancer Res* 2005; 11:4601–4609 doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2188
- Park R, Giza PE, Mold DE, Huang RC. Inhibition of HSV-1 replication and reactivation by the mutation-insensitive transcription inhibitor tetra-O-glycyl-nordihydroguaiaretic acid. *Antiviral Res.* 2003;58:35–45.
- Pegg AE. Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res.* 1990 Oct 1;50(19):6119-29.
- Pereira EL, Lima PD, Khayat AS, Bahia MO, Bezerra FS, Andrade-Neto M, et al. Inhibitory effect of pisosterol on human glioblastoma cell lines with C-MYC amplification. *J Appl Toxicol.* 2010 Nov 9. doi: 10.1002/jat.1596. [Epub ahead of print]

- Perry J, Okamoto M, Guiou M, Shirai K, Errett A, Chakravarti A. Novel therapies in glioblastoma. *Neurol Res Int* 2012; 2012:428565. doi:10.1155/2012/428565
- Qian X, LaRochelle WJ, Ara G, Wu F, Petersen KD, Thougard A, et al. Activity of PXD101, a histone deacetylase inhibitor, in preclinical ovarian cancer studies. *Mol Cancer Ther* 2006; 5:2086–2095.
- Rabik CA, Njoku MC, Dolan ME. Inactivation of O6-alkylguanine DNA alkyltransferase as a means to enhance chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 2006 Jun;32(4):261-76. Epub 2006 May 15.
- Reardon DA, Wen PY. Therapeutic advances in the treatment of glioblastoma: rationale and potential role of targeted agents. *Oncologist*. 2006 Feb; 11(2):152-64. Review.
- Reichert S, Rödel C, Mirsch J, Harter PN, Tomicic MT, Mittelbronn M, et al. Survivin inhibition and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism to overcome radioresistance in glioblastoma. *Radiother Oncol* 2011; 101(1):51-8. doi:10.1016/j.radonc.2011.06.037
- Rödel F, Frey B, Leitmann W, Capalbo G, Weiss C, Rödel C. Survivin antisense oligonucleotides effectively radiosensitize colorectal cancer cells in both tissue culture and murine xenograft models. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 71:247–255. doi:10.1016/j.ijrobp.2008.02.011
- Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. Survivin: A new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 2009; 35:553-562. doi:10.1016/j.ctrv.2009.05.003
- Sampath J, Pelus LM. Alternative splice variants of survivin as potential targets in cancer. *Curr Drug Discov Technol* 2007; 43:174–91
- Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut*. 2000 May;46(5):645-50.
- Sawyers, C. Targeted cancer therapy. *Nature* 2004; 432, 294–297.
- Shah MA, Schwartz GK. The relevance of drug sequence in combination chemotherapy. *Drug Resist Updat* 2000; 3(6):335-356. doi: 10.1054/drup.2000.0165
- Shah MA, Schwartz GK. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2001; 7(8):2168–81.
- Shapiro GI. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol* 2006; 24(11):1770-83. doi:10.1200/JCO.2005.03.7689

- Shinozawa I, Inokuchi K, Wakabayashi I, Dan K. Disturbed expression of the anti-apoptosis gene, survivin, and EPR-1 in hematological malignancies. *Leuk Res.* 2000 Nov;24(11):965-70.
- Shirahata M, Oba S, Iwao-Koizumi K, Saito S, Ueno N, Oda M, et al. Using gene expression profiling to identify a prognostic molecular spectrum in gliomas. *Cancer Sci.* 2009; 100:165–172. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.01002.x
- Siebzehnruhl FA, Reynolds BA, Vescovi A, Steindler DA, Deleyrolle LP. The origins of glioma: E Pluribus Unum? *Glia.* 2011 Aug; 59(8):1135-47. doi: 10.1002/glia.21143. Epub 2011 Feb 23.
- Smolewski P. Terameprocol, a novel site-specific transcription inhibitor with anticancer activity. *IDrugs.* 2008; 11:204–214
- Spencer SL, Gerety RA, Pienta KJ, Forrest S. Modeling somatic evolution in tumorigenesis. *PLoS Comput Biol.* 2006 Aug 18; 2(8):e108.
- Stark AM, Nabavi A, Mehdorn HM, Blömer U. Glioblastoma multiforme-report of 267 cases treated at a single institution. *Surg Neurol.* 2005 Feb; 63(2):162-9; discussion 169.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10; 352(10):987-96.
- Sun Y, Giacalone NJ, Lu B. Terameprocol (tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid), an inhibitor of Sp1-mediated survivin transcription, induces radiosensitization in non-small cell lung carcinoma. *J Thorac Oncol* 2011; 6(1):8-14. doi:10.1097/JTO.0b013e3181fa646a.
- Sundberg AL, Gedda L, Orlova A, Bruskin A, Blomquist E, Carlsson J, et al. [177Lu]Bz-DTPA-EGF: Preclinical characterization of a potential radionuclide targeting agent against glioma. *Cancer Biother Radiopharm.* 2004 Apr; 19(2):195-204.
- Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000;6(1):127 -34.
- Tao W, Zhang S, Turenchalk GS, Stewart RA, St John MA, Chen W, et al. Human homologue of the *Drosophila melanogaster* lats tumour suppressor modulates CDC2 activity. *Nat. Genet* 1999; 21, 177–181.

- Tran B, Rosenthal MA. Survival comparison between glioblastoma multiforme and other incurable cancers. *J Clin Neurosci*. 2010 Apr; 17(4):417-21. Epub 2010 Feb 18.
- Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:4349–4354.
- Uddin S, Jarmi T, Hariharan S. Glioblastoma multiforme. Available at <http://www.emedicine.com/NEURO/topic147.htm>. 05 de Maio de 2012
- Valente V, Teixeira SA, Neder L, Okamoto OK, Oba-Shinjo SM, Marie SK, et al. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol* 2009; 3;10:17. doi:10.1186/1471-2199-10-17
- Valera ET, de Freitas Cortez MA, de Paula Queiroz RG, de Oliveira FM, Brassesco MS, Jabado N, et al. Pediatric glioblastoma cell line shows different patterns of expression of transmembrane ABC transporters after in vitro exposure to vinblastine. *Childs Nerv Syst* 2009; 25(1):39-45. doi: 10.1007/s00381-008-0740-3
- Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Med* 2004; 10, 789–799.
- Wang HW, Sharp TV, Koumi A, Koentges G, Boshoff C. Characterization of an anti-apoptotic glycoprotein encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpes virus which resembles a spliced variant of human survivin. *EMBO J* 2002; 21(11):2602–15. doi:10.1093/emboj/21.11.2602
- Wang Q, Su L, Liu N, Zhang L, Xu W, Fang H. Cyclin dependent kinase 1 inhibitors: a review of recent progress. *Curr Med Chem* 2011; 18(13):2025-43.
- Wang ZH, Tian XX, Cheng Y, Yam GH, Ng HK, Ding MX, et al. Association of EGFR gene fragments with nuclear matrices in glioblastoma cell lines. *Anticancer Res*. 1998 Nov-Dec; 18(6A):4329-32.
- Xie D, Zeng YX, Wang HJ, Wen JM, Tao Y, Sham JS, et al. Expression of cytoplasmic and nuclear Survivin in primary and secondary human glioblastoma. *Br J Cancer*. 2006 Jan 16; 94(1):108-14.
- Yamada Y, Kuroiwa T, Nakagawa T, Kajimoto Y, Dohi T, Azuma H, et al. Transcriptional expression of survivin and its splice variants in brain tumors in humans. *J Neurosurg* 2003; 99(4):738-45.

- Yamamoto H, Ngan CY, Monden M. Cancer cells survive with survivin. *Cancer Sci* 2008; 99(9):1709-14. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00870.x
- Yin D, Chen W, O'Kelly J, Lu D, Ham M, Doan NB, et al. Connective tissue growth factor associated with oncogenic activities and drug resistance in glioblastoma multiforme. *Int J Cancer*. 2010 Nov 15; 127(10):2257-67.
- Zaffaroni N, Daidone MG. Survivin expression and resistance to anticancer treatments: perspectives for new therapeutic interventions. *Drug Resist Updat* 2002; 5:65–72.
- Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke BM, Becker N, et al. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res* 2008 Jan 1;14(1):123-9.
- Zheng WY, Kang YY, Li LF, Xu YX, Ma XY. Levels of effectiveness of gene therapies targeting survivin and its splice variants in human breast cancer cells. *Drug Discov Ther* 2011; 5(6):293-8. doi: 10.5582/ddt.2011.v5.6.293
- Zhu N, Gu L, Findley HW, Li F, Zhou M. An alternatively spliced survivin variant is positively regulated by p53 and sensitizes leukemia cells to chemotherapy. *Oncogene* 2004; 2345:7545–51. doi:10.1038/sj.onc.1208038
- Zhu X, Ma Y, Liu D. Novel agents and regimens for acute myeloid leukemia: 2009 ASH annual meeting highlights. *J Hematol Oncol* 2010; 3:17. doi:10.1186/1756-8722-3-17

APÊNDICE

8. APÊNDICE

8.1 APÊNDICE A. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO TRABALHO: Efeitos da inibição da Survivina em Glioblastoma

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone.

Orientando: Angel Mauricio Castro Gamero.

O Glioblastoma é um dos tumores mais agressivos do sistema nervoso central e entre as diversas neoplasias possui um dos piores prognósticos. Mesmo com as novas estratégias de tratamento, a sobrevivência de pacientes portadores de glioblastoma continua sendo muito baixa. Neste contexto, a análise dos efeitos da inibição de fatores que contribuem com as características neoplásicas, é fundamental para um maior entendimento da biologia deste tumor, e ainda mais para o desenvolvimento de terapias alternativas e mais eficientes. O objetivo desta investigação é de avaliar os efeitos da inibição da SURVIVINA, uma proteína chave na fisiopatologia tumoral, a mesma que tem sido inibida e fornecido resultados muito promissórios em outras neoplasias, e por esse mesmo motivo, torna-se interessante a realização de experimentos em glioblastoma.

O seu familiar ou responsável não será submetido a nenhum procedimento (coleta de sangue, cirurgias, biopsias, raio-X, etc) para a elaboração deste projeto, pois o material de estudo será obtido durante os exames e procedimentos de rotina para o diagnóstico e tratamento dos pacientes, não trazendo nenhum risco ou sofrimento adicional.

Durante a realização desta pesquisa não haverá nenhum custo para os familiares ou responsáveis dos pacientes que estejam participando da mesma.

O paciente e seus responsáveis serão garantidos ainda o que segue:

1. O esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e outras situações relacionadas com a pesquisa.
2. A liberdade de retirar o consentimento e deixar de participar do estudo em qualquer momento, sem que isto traga prejuízo à continuidade do tratamento do paciente.
3. A segurança de que o paciente não será identificado e que será mantido o caráter confidencial de todas as informações obtidas com o paciente, com seus familiares ou no prontuário médico.
4. O compromisso de que quando solicitado, serão prestadas aos responsáveis do paciente informações atualizadas durante o estudo.
5. O compromisso de que o paciente será devidamente acompanhada e assistida durante todo o período de participação do projeto, bem como a de que será garantida a continuidade de seu tratamento após a conclusão dos trabalhos de pesquisa.
6. O ressarcimento de eventuais despesas decorrentes da participação do paciente na pesquisa, assim como a indenização, a título de cobertura material, da reparação de danos imediatos ou tardios decorrentes da participação do paciente na pesquisa que será realizada na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas sobre a pesquisa e sobre a ética em pesquisa. O principal investigador é Angel Mauricio Castro Gamero que pode ser encontrado no endereço Laboratório de Oncopediatria, sala 212,

primeiro andar do Bloco G, Hospital Das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP), situado na Av. Bandeirantes, 3900. Campus Universitário. Monte Alegre – CEP 14.048-900 – Ribeirão Preto –SP. Telefone: (16) 3602-2671 ou pelo e-mail amcgen@usp.br. Você poderá entrar em contato, caso sinta necessidade, com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP no mesmo hospital pelo telefone (16) 3602-2228 ou pelo e-mail cep@hcrp.fmrp.usp.br

Eu _____ tenho sido devidamente esclarecido (a) sobre todas as questões que constam no documento, especialmente no que diz respeito aos objetivos da pesquisa, aos procedimentos que serão realizados, aos riscos e benefícios, a forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como a forma de indenização por danos decorrentes da pesquisa. Declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que foram assegurados e que concordo inteiramente e de livre vontade que meu familiar (a) _____ participe desta pesquisa.

Ribeirão Preto _____ de _____ de _____.

Assinatura do Responsável pelo Paciente.

Assinatura do Pesquisador Responsável

8.2 Apêndice B. Quimiosensibilidade à TMZ nas linhagens de glioblastoma.

Apêndice B. TMZ inibiu a proliferação de linhagens celulares de glioblastoma. As linhagens celulares de glioblastoma SF188 (A), T98G (B), U251 (C) e U343 (D) foram cultivadas em presença de varias concentrações de TMZ (0-2000 μ M) por 24, 48 e 72 h. A proliferação celular foi mensurada pelo *kit XTT*. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

8.3 Apêndice C. Quimiosensibilidade à TMZ nas culturas primárias de glioblastoma.

Apêndice C. TMZ inibiu a proliferação de culturas primárias de glioblastoma. As culturas primárias de glioblastoma GB27 (A), GB28 (B), GB45 (C) e GB49 (D) foram cultivadas em presença de varias concentrações de TMZ (0-2000μM) por 96 h. A proliferação celular foi mensurada pelo *kit* XTT. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

8.4 Apêndice D.

Tabela S1. Valores de CI e DRI de acordo com as diferentes estratégias de exposição da combinação das drogas M4N e TMZ nas linhagens celulares de GBM SF188, T98G, U343 e U251.

Linhagem celular	Estratégia de combinação	Drogas e combinações (razão constante)	Parametros*			Valores de CI em				Valores de DRI em			
			<i>Dm</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	ED ₅₀	ED ₇₅	ED ₉₀	ED ₉₅	ED ₅₀	ED ₇₅	ED ₉₀	ED ₉₅
SF188	M4N+TMZ	M4N	171,4	0,79	0,96					5,24	8,09	12,49	16,78
		TMZ	4464,2	1,08	1,08					5,46	5,76	6,08	6,31
		M4N+TMZ (1:25)	32,7+817,7	1,14	0,99	0,37	0,29	0,24	0,22				
	M4N→TMZ	M4N	171,4	0,79	0,96					2,59	5,04	9,82	15,45
		TMZ	4464,2	1,08	1,08					2,70	3,59	4,78	5,81
		M4N/TMZ (1:25)	66,3+1656,4	1,51	0,97	0,76	0,48	0,31	0,24				
	TMZ→M4N	M4N	171,4	0,79	0,96					4,86	5,87	7,10	8,08
		TMZ	4464,2	1,08	1,08					5,06	4,18	3,46	3,03
		TMZ/M4N (25:1)	882,7+35,3	0,91	0,96	0,40	0,41	0,43	0,45				
T98G	M4N+TMZ	M4N	87,55	1,32	0,90					2,55	1,58	0,97	0,70
		TMZ	2061,9	1,18	0,98					2,40	1,64	1,12	0,86
		M4N+TMZ (1:25)	34,4+858,9	0,84	0,98	0,81	1,25	1,92	2,59				
	M4N→TMZ	M4N	87,55	1,32	0,90					1,15	1,17	1,20	1,22
		TMZ	2061,9	1,18	0,98					1,83	1,22	1,38	1,49
		M4N/TMZ (1:25)	76,1+1903,2	1,36	0,99	1,79	1,67	1,56	1,49				

U343	TMZ→M4N	M4N	87,55	1,32	0,90					2,15	2,09	2,05	2,01
		TMZ	2061,9	1,18	0,98					2,02	2,18	2,35	2,47
		TMZ/M4N (25:1)	1020,1+40,8	1,29	0,93	0,96	0,94	0,91	0,90				
	M4N+TMZ	M4N	81,4	1,66	0,99					2,68	2,38	2,12	1,96
		TMZ	664,6	1,16	0,92					2,33	2,78	3,29	3,70
		M4N+TMZ (1:9,375)	30,4+285,3	1,41	0,98	0,80	0,78	0,77	0,78				
	M4N→TMZ	M4N	81,4	1,66	0,99					3,13	1,78	1,02	0,70
		TMZ	664,6	1,16	0,92					2,72	2,07	1,58	1,32
		M4N/TMZ (1:9,375)	26,1+244,2	0,90	0,99	0,69	1,04	1,61	2,20				
	TMZ→M4N	M4N	81,4	1,66	0,99					4,00	2,41	1,45	1,03
		TMZ	664,6	1,16	0,92					3,49	2,80	2,25	1,94
		TMZ/M4N (9.375:1)	190,6+20,3	0,94	0,96	0,54	0,77	1,13	1,48				
U251	M4N+TMZ	M4N	64,2	2,05	0,96					4,43	1,94	0,85	0,48
		TMZ	396,7	0,70	0,94					2,92	3,58	4,39	5,04
		M4N+TMZ (1:9.375)	14,5+135,9	0,81	0,97	0,57	0,78	1,41	2,27				
	M4N→TMZ	M4N	64,2	2,05	0,96					1,68	0,99	0,57	0,40
		TMZ	396,7	0,70	0,94					1,10	1,81	2,96	4,14
		M4N/TMZ (1:9.375)	38,3+359,2	1,02	0,97	1,50	1,57	2,08	2,76				
	TMZ→M4N	M4N	64,2	2,05	0,96					7,78	2,12	0,58	0,24
		TMZ	396,7	0,70	0,94					5,13	3,92	2,99	2,49
		TMZ/M4N (9.375:1)	77,3+8,2	0,60	0,90	0,32	0,73	2,07	4,59				

Apresentam-se em **negrito** os valores de CI<1 e valores de DRI>1 que indicam efeito sinérgico com uma consequente redução de dose da droga referida nas frações afetadas ED50, ED75, ED90 e ED95. *Dm*, *m* e *r* representam a dose de IC₅₀, inclinação da curva obtida (*slope*) e o coeficiente de correlação linear (conformidade da curva), respectivamente.

9. ANEXO

9.1 ANEXO A. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

Ribeirão Preto, 12 de novembro de 2009

Ofício nº 3825/2009
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“EFEITOS DA INIBIÇÃO DA SURVIVINA EM GLIOBLASTOMA”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 298ª Reunião Ordinária realizada em 09/11/2009 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 8608/2009.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-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.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
ANGEL MAURICIO CASTRO GAMERO
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.fmrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

9.2 Anexo B. Caracterização Molecular das linhagens celulares de glioblastoma utilizadas no presente estudo.

SF188: Originada de um paciente masculino de 8 anos com GBM primário localizado no lóbulo frontal direito.

Apresenta mutação no TP53 no códon 266 (GGA(Gly)→GAA(Glu))

Não apresenta mutações no PTEN

Não apresenta alterações nos genes p16, p14ARF

Não tumorigênica

T98G: Originada de um paciente masculino de 61 anos com GBM primário.

Apresenta mutação no TP53 no códon 237/237 (ATG(Met) →ATA(Ile)).

Mutação no PTEN no codon 42 (CTT(Leu) →CGT (Arg)).

Apresenta deleção no p16 e no p14ARF.

Não tumorigênica

U251: Originada desde um paciente masculino de 75 anos com GBM primário localizado no lóbulo parietal esquerdo.

Apresenta mutação no TP53 no códon 273/273 (CGT(Arg) →CAT(His)).

Apresenta mutação no PTEN no códon 241 (TTT →TTT TT).

Deleção no p16 (exons 1-3) e no p14ARF.

É tumorigênica.

U343: Originada desde um paciente masculino com Astrocitoma Anaplásico localizado no lóbulo Temporal direito.

Não apresenta mutações no TP53.

Apresenta mutação no PTEN no códon 124 (TGT(Cys) →TCT(Ser)).

Apresenta deleção no p16 e no p14ARF.

É tumorigênica.

FONTE: Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, et al. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* 1999; 9(3):469-79.

Apesar de que esta linhagem celular tem sido descrita como de uma origem de astrocitoma anaplásico, muitos estudos a têm utilizado e descrito como linhagem de glioblastoma (Bassi et al, 2008, Oppel et al, 2011, Jarjour et al, 2011, Hendruschk et al, 2011, Hagemann et al, 2010, Pereira et al, 2010, Jung et al, 2010, Yin et al, 2010 Sundberg et al, 2004, Wang et al, 1998).

9.3 Anexo C. Manuscrito para submissão

Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid, an inhibitor of Sp1-mediated survivin transcription, induces apoptosis and acts synergistically with chemo-radiotherapy in glioblastoma cells.

Angel Mauricio Castro-Gamero¹, Kleiton Silva Borges¹, Daniel Antunes Moreno¹, Veridiana Kill Suazo², Mayara Missono Fujinami², Rosane de Paula Gomes Queiroz², Harley Francisco de Oliveira³, Carlos Gilberto Carlotti Jr.⁴, Carlos Alberto Scrideli², Luiz Gonzaga Tone².

¹Department of Genetics, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

²Department of Pediatrics, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

³Department of Clinical Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil

⁴Department of Anatomy and Surgery, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil

Correspondence to:

Angel Mauricio Castro Gamero

Laboratório de Pediatria, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, Bloco G, Av. Bandeirantes 3900, 14048-900 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Tel: + 55 16 3602 2671; fax: + 55 16 3602 2297; e-mail: amcgen@gmail.com

Abstract

Glioblastoma (GBM), one of the most human malignant neoplasia, responds poorly to current treatment modalities, being temozolomide (TMZ) the most used drug in its treatment. Tetra-O-methyl Nordihydroguaiaretic Acid (M4N) is a global transcriptional repressor of genes dependents of Sp1 transcription factor, such as *Survivin* and *Cdk1*. In this study was evaluated the gene expression of *Survivin*, their spliced-variants and *Cdk1* in GBM samples and cell lines. Moreover, it was investigated the effects of M4N combined or not with TMZ and/or radiation on primary cultures and cell lines of GBM.

qRT-PCR assays were performed to determine the *survivin*-spliced variants and *Cdk1* gene mRNA expression in GBM tumor samples and cell lines. Cell proliferation was measured by XTT assay and cell cycle and apoptosis were determined by flow cytometry. Drug combination analyzes using different schedules of administration (simultaneous and sequential) were performed based in Chou-Talalay method on GBM cell lines and primary cultures. For clonogenic survival, it was used the doses of 2, 4, and 6 Gy of gamma radiation.

All *Survivin*-spliced variants and *Cdk1* gene were expressed in GBM samples (n=16) and cell lines (n=6), except the *Survivin-2B* variant that was only expressed in GBM cell lines. M4N treatment down regulated the expression of *Cdk1*, *Survivin* and *Survivin-ΔEx3* variant, while the *Survivin-2B* variant was up-regulated. M4N decreased the cell proliferation separately and synergistically with TMZ, moreover it enhanced the radiation effects, mainly when associated with TMZ. M4N also induced apoptotic cell death, decreased mitotic index and arrested the cell cycle mainly in G2/M phase.

Our results suggest a potential clinical application of M4N in combination with TMZ and radiation in GB treatment.

Keywords: *Cdk1* gene, Drug combination, Glioblastoma, M4N, Temozolomide, *Survivin* gene.

Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most common primary malignant brain tumor [1]. Despite advancements in surgery, radiation (RT), and chemotherapy [2], the median survival is 12-15 months [3]. Currently, temozolomide (TMZ) is the main drug used in GBM therapy, acting through alkylation at the O-6 position of guanine. Both TMZ and RT therapy can induce DNA damage and improve prognosis of GBM patients, however its efficacy is hindered partly by alterations in the apoptotic and cell cycle mechanisms of cancer cells [4, 5], becoming these promising targets for the development of novel and more efficient therapeutic agents.

Survivin protein has been considered an ideal target for cancer treatment due its high and unique expression in most human tumors and their critical role in control of cell division and inhibition of apoptosis [6-10]. Its high expression in malignant brain tumor, particularly in GBM [11], has been strongly associated with poor prognosis and resistance to chemo- and radiotherapy [12, 13], suggesting that survivin represent a promising target for GBM therapy. Moreover, several survivin splice variants, such as survivin- Δ Ex3 and survivin-2B, have also been identified in GBM thus far and little is known about their function in these cells.

To efficiently perform its role during mitotic processes, it is critically necessary that survivin to be phosphorylated by cyclin-dependent kinase 1 [14]. The cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is a master modulator in the initiation and transition process through mitosis during cell cycle [15]. The high expression and activity of Cdk1 protein is often observed in several human cancers [16, 17] and associated with tumor progression [18], including GBM [19], suggesting Cdk1 as promising target for therapy of GBM.

The tetra-*o*-methyl nordihydroguaiaretic acid (also known as M4N, terameprocol, and EM1421), blocks cell cycle progression by inhibiting gene expression of *Cdk1* [20] and simultaneously promotes apoptosis by inhibiting expression of the *survivin* gene [21]. Recently, a Phase I clinical trial in patients with recurrent high-grade gliomas showed an adequate tolerance pharmacokinetic and a promissory anti-tumor activity. However, this previous study recommended the conduction of preclinical studies of combined therapy with TMZ and RT prior to initiating human toxicity and efficacy studies activity [22].

The aim of the present study was to evaluate the gene expression of *survivin* variants and *Cdk1* gene in GBM tumor samples and cell lines. Moreover, we demonstrated the potent anti-GBM activity of M4N in both GBM cell lines and primary cultures, as well as its synergistic effects when combined with TMZ and RT. Additionally, our study shows that M4N deregulated cell cycle, caused apoptosis, and altered gene expression in GBM cell lines.

Material and Methods

Patients analyzed

Twenty six fresh-frozen microdissected tumor samples were obtained from macrodissected glioblastomas according to the WHO classification [23], from subjects admitted for diagnosis and treatment to the University Hospital of the School of Medicine of Ribeirão Preto, SP, Brazil. Six samples of microdissected non-neoplastic brain tissue (white matter) were obtained from patients who had undergone surgery for the treatment of epilepsy. The average age of the patients was 44.3 years; among these three corresponded to pediatric patients. Ten

subjects were men and 6 were women. The study was approved by the Institutional Research Ethics Committee (protocol number 8608/2009).

Cell culture and primary culture

Human adult GBM cell lines (U251, U343, T98G, U87, LN319) and a pediatric GBM cell line (SF188) were obtained and grown as previously published [24]. The GBM primary cultures (GBPCs) were derived from the biopsy specimens of GBM patients under a protocol approved by the institutional review board at the University Hospital of the School of Medicine of Ribeirão Preto, SP, Brazil. Cultures were obtained according to Brassesco et al. [25] and maintained at low passage numbers (p2–p6) under standard culture conditions.

Reagents

M4N was purchased from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor MI, #70302). M4N was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO; Mallinckrodt Chemical Works, St Louis, Missouri, USA) at 50 mM. Stock solution was then warmed at 70°C for 3 h as recommended by Chang et al. [21], before the addition to the cell culture medium at a final DMSO concentration of 1%. TMZ (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) was also diluted in DMSO at stock concentration of 200 mM. Stock solutions were kept at – 20°C and dissolved in culture medium immediately before the experiments.

RNA isolation and reverse transcription-PCR

mRNA was extracted from cell lines and tumor samples using the Trizol® reagent (Gibco BRL, Life technologies®, Carlsbad, CA, USA). Complementary DNA (cDNA) was obtained with the High Capacity® kit (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) according to the manufacturers' instructions. cDNA levels of genes *Survivin*, *Survivin-2B*, *Survivin-ΔEx3*, and *CDK1* were measured using an ABI 7500 Real Time PCR System (PE Applied Biosystems). Amplifications were obtained using TaqMan® probes: *Survivin* (Hs00977612_mH), *Survivin-2B* (Hs03043575_m1), *Survivin-deltaEx3* (Hs03043576_m1), *CDK1* (Hs00938777_m1), *TBP* (4326322E0811008), and *HPRT* (4310809E0502006) (Applied Biosystems). The relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [26] with two internal controls, *TBP* and *HPRT*, as recommended by Valente, et al [27]. To determinate the effects of M4N on gene expression of *survivin*, their spliced variants and *Cdk1* gene, the cell lines SF188, T98G, U251, and U343 were treated with 40 μM of M4N for 6, 12, and 24 h. In these experiments, control cells (DMSO) collected at the same treatment times were used as calibrators.

Growth inhibition assays

Growth inhibition was determined by two proliferation assays: XTT-assay and/or Giemsa-staining of attached cells as previously published [24, 28]. SF188, T98G, U251, and U343 cells were seeded at 3×10^3 cells/well in 96-well plates. After attachment, cells were treated with serial doses of M4N or TMZ for 24, 48, and 72 h.

Similarly, eleven GBPCs were treated for 48 h with M4N, and four of them were additionally treated with M4N or TMZ for 96 h. The IC_{50} (the drug concentration that inhibits cell proliferation by 50% compared with controls) was calculated using CalcuSyn software (Biosoft, Ferguson, Missouri, USA).

Combination Drug Analysis

The interaction between M4N and TMZ was analyzed using CalcuSyn. For analyses of combinations, increasing doses of each drug were used according their equipotent molar ratio for each cell line through three different exposures schedules: simultaneous, sequential with TMZ after M4N, and sequential with M4N after TMZ. For GBPCs, similar exposures using the fixed doses 20 μ M or 40 μ M M4N, and 500 μ M TMZ were performed. For simultaneous exposure in cell lines and GBPCs, treatments of 48 h or 96 h were used, respectively. For sequential exposure, the treatments with each drug were for 24h or 48h for the cell lines or GBPCs, respectively. Combination indexes (CIs) were generated for each set of combinations and synergistic ($CI < 1$), additive ($CI = 1$), or antagonistic effects ($CI > 1$) were calculated by the Chou and Talalay equation [29] using CalcuSyn software. The dose reduction index (DRI) represents the measure of how much the dose of each drug in a synergistic combination may be reduced at a given effect level compared with the dose of each drug alone [29].

Clonogenic assay

The effects of M4N and TMZ on clonogenic capacity were evaluated according to Franken's protocol [30]. Single cell suspensions of 300 cells/well were seeded in six-well plates and once attached, were treated with serial concentrations of M4N or TMZ for 48 h. After treatment, the culture medium was exchanged by a drug-free medium for incubation for 7–10 days. Next, surviving colonies were fixed with methanol and stained with Giemsa stain. The colonies with more than 50 cells were scored. These data was used to calculate the relative survival fraction and clonogenic IC_{50} values (concentration for reduction of 50% survival fraction) calculated using the CalcuSyn software. The IC_{50} values for each drug were used for combination experiments. Cells were treated with M4N, TMZ, or M4N+TMZ for 48h and then irradiated, cultured, and further analyzed as described by Borges et al. [24]. In all cases, three independent experiments were performed.

Apoptosis assessment, cell cycle analysis and mitotic index determination

Cells were treated with M4N for 48h and apoptotic cell death was determined as previously published [28]. For cell cycle analysis, sub-confluent cultures were exposed to 40 μ M M4N (SF188 and T98G cells) or 20 μ M M4N (U251 and U343 cells) for 24 h. Cells were trypsinized, washed with 1X PBS, and stained with propidium iodide (PI) using the CycleTESTTM PLUS DNA reagent kit (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA). The cell DNA content was immediately analyzed using a FACSCalibur (Becton Dickinson, NJ). The percentages of cells in each cell cycle phase were calculated using ModFit LT software (Verity Software House, CA). For apoptosis and cell cycle assays at least 10,000 cells were measured per experiment. For mitotic index determination, exponentially growing cultures were treated with 0-80 μ M M4N for 48 h and harvested as previously published [28]. In all cases, three independent experiments were performed.

Statistical analysis

Statistical analysis for gene expression was performed using Mann Whitney non-parametric test. For functional studies was used one-way or two-way ANOVA, followed by nonparametric Bonferroni's test, as appropriate. The effect of M4N and its combinations on colony formation was tested by logistic regression. Statistical significance was considered when $P < 0.05$. Data analysis was carried out using the SPSS17.0 statistical software package (SPSS, Chicago, Illinois, USA). Results are reported as means $\pm$ SDs.

Results

Expression of survivin-spliced variants and CDK1 in GBM samples and cell lines

We found that *survivin*, *survivin-ΔEx3* and *Cdk1* were significantly expressed in tumor samples, while *survivin-2B* expression was no significantly different than normal samples (**Fig. 1A-D**). We also found that all *survivin* splice variants were expressed in all cell lines, being that *survivin* variant was the most expressed in cell lines, mainly in SF188 and U251 cells. The *Cdk1* gene expression was found in all cell lines, mainly in SF188 and U343 cells (**Fig. 1E**).

M4N inhibited cell proliferation of GBM cell lines.

The SF188, T98G, U251 and U343 cells were sensitive to M4N showing an inhibited growth in a dose- and time-dependent manner ($p < 0.05$) except to SF188 cells that only displayed a dose-dependent inhibition ($p = 0.009$) (**Fig. 2 A-D**). The 48h- IC_{50} values corroborated the remarkable sensitivity of T98G, U251 and U343 cells, and a relative resistance of SF188 cells (**Table 1**). To expand the relevance of our findings, we assessed the response of GBPCs to M4N. A total of eleven GBPCs were included in the analysis exhibiting a variety of IC_{50} values at 48 h (18.4 – 282.2 μ M). We found that most GBPCs showed a dose-dependent response to M4N (**Fig. 2E, Table 2**). The M4N- IC_{50} values were drastically diminished in four GBPCs after M4N-treatment for 96 h (GB27, GB28, GB45, and GB49) (**Table 2**). Our results demonstrate that M4N was efficient in inhibiting the proliferation of GBM cells.

Additionally, the chemo-sensitivity for TMZ of cell lines and GBPCs was determined by drug combination assays (**Supplementary Data Fig. S1-S2**). The IC_{50} values obtained showed the high sensitivity for TMZ on U251 and U343 cells and a relative resistance of SF188 and T98G cells (**Table 1**). Taken together, it was defined the molar ratios proportional to IC_{50} values as 1:25 (M4N:TMZ) for SF188 and T98G, and 1:9.375 (M4N:TMZ) for U251 and U343.

M4N acts synergistically with TMZ in GBM cells.

We determined the combination effects of M4N and TMZ in cell lines, as represented by the DRI, the CI and the dose-effect levels of cell growth inhibition (ED_{50} – ED_{95}) (summarized in **Supplementary Data Table S1**).

The **Figure 3** illustrates the schedule-dependent synergism between M4N and TMZ. Simultaneous exposure of both drugs (M4N+TMZ) for 48 h resulted in synergism in all cell lines and in all the ranges of affected fraction ($CI < 1$, **Fig. 3 A-D**), except the T98G cell line that showed a synergistic effect only up to 65% of affected fraction (**Fig. 3 B**). Similarly, the sequence TMZ→M4N showed mainly synergistic effects at all affected fractions in all cell lines ($CI < 1$; **Fig. 3 I-L**). The sequential exposure M4N→TMZ produced antagonistic effects in T98G and U251 cells in all the ranges of affected fraction ($CI > 1$, **Fig. 3 F,H**), in SF188 produced antagonistic effects only until 35% of affected fraction (**Fig. 3E**), and in U343 cells produced synergistic effect until 75% of affected fraction (**Fig. 3G**).

We also performed drug combination assays on four GBPCs using 20 μ M (GB45 and GB49) or 40 μ M (GB27 and GB28) of M4N and 500 μ M TMZ with the same three different schedules described above (**Fig. 4**). Similarly as found in cell lines, we found significant differences between the isolated drugs treatment and combination of both simultaneous exposure and sequential exposure TMZ→M4N (GB27 and GB49), whereas the inverse sequence M4N→TMZ did not produce statistical differences in these cells (**Fig. 4 A,D**). For GB28 cells, all the three drug combination modes resulted in a greater cytotoxicity than TMZ and M4N alone (**Fig. 4B**). Conversely, in GB45 cells it was not found statistical differences between isolated drugs treatment and drug combinations (**Fig. 4C**).

Taken together, these data suggest that the combination of M4N and TMZ caused a synergistic effect in GBM cells preferentially when it was used simultaneous combination or sequential exposure TMZ→M4N.

M4N enhanced the response to radiation in glioblastoma cell lines, especially when combined with TMZ

After determination of clonogenic IC_{50} values for each drug (**Supplementary Data Fig. S3**), it was performed combination assays with both drugs (IC_{50}) and radiation. Thus, M4N alone significantly enhanced the radiosensitivity of only U343 cells ($p < 0.001$) (**Supplementary Data Fig. S4**). On the other hand, the combination of M4N with TMZ significantly enhanced the effects of radiation in all cell lines when compared with the drugs alone (**Fig. 5**). The strongest effect was achieved in the highest irradiation dose (6 Gy) in all cell lines, as indicated by dose enhancement ratios of 6.33, 1.59, 5.29, and 5.01 for SF188, T98G, U251, and U343 cell, respectively (**Table 3**). Thus, M4N treatment is able to sensitize GBM cell lines to radiation and may increase the radiosensitization caused by TMZ.

M4N caused apoptotic cell death, altered the cell cycle and decreased the mitotic index in GBM cell lines.

The number of apoptotic cells increased in M4N-treated cells (annexin-V-positive cells) in a dose-dependent manner. The strongest effect was obtained with 30 μ M of M4N, mainly in SF188 and T98G cells, with 92% and 90% of apoptotic cells, respectively (**Fig. 6A**). Moreover, M4N decreased significantly the mitotic index in GBM cell lines (**Fig. 6B**). Although the strongest effect was obtained with 80 μ M M4N in U343, U251 and T98G cells (90%, 94% and 72%, respectively), only a 62% decrease was achieved in SF188 cell line with this concentration (**Fig. 6B**). Additionally, as shown in **Figure 6D-F**, M4N induced a small, but significant, increase in the number of cells in G2/M phase in T98G, U251 and U343 cell lines (6%, 3.5% and 5% increase,

respectively). In contrast, the treatment with 40 μ M M4N induced a significant arrest in G0/G1 phase in SF188 cell line (**Fig. 6C**) with a 17% increase of G0/G1 population, accompanied by a 13% reduction of S-phase population.

Effect of M4N on gene expression in GBM cell lines

Further, gene expression in SF188, T98G, U251 and U343 cells was investigated after M4N treatment at 6, 12 and 24 h through qRT-PCR procedures (**Fig. 7**). M4N (40 μ M) down-regulated *Survivin* mRNA levels in a time-dependent shape in T98G, U251 and U343 cells with the strongest effect at 24 h (17%, 30% and 46% of the control, respectively). Although down-regulation of this splice variant was not statistically different in SF188 cells, we observed a tendency toward it. Moreover, M4N also decreased mRNA levels of *Survivin- Δ Ex3* gene variant and *Cdk1* gene in U251 and U343 cells at 24h. Interestingly, M4N caused a significant increase of *Survivin-2B* expression in T98G cells ($p < 0.001$), a tendency toward it in SF188 cells, and a decrease of expression of this gene variant in U343 cells (**Fig. 7**).

Discussion

GBM is an aggressive tumor in which efficient treatment options are limited and new therapies with novel mechanisms of action are urgently required [1, 31, 32]. Currently, molecules that are differentially expressed in cancer and intersect multiple pathways required for tumor maintenance are considered better choices to cancer targeted therapy [33, 34]. The anti-apoptotic *Survivin* and the main regulator of cell cycle *Cdk1* embodies these properties and represent important molecules to target-specific therapy of many tumors, including GBM [31, 35, 36].

In this study, we report for the first time an investigation about the effects of M4N, a transcriptional inhibitor of Sp1-dependent genes, such as *survivin* and *Cdk1*, on GBM cells. Here, we analyzed the gene expression of *survivin* and its splice variants: *survivin- Δ Ex3* and *survivin-2B*, as well as of *Cdk1* gene in GBM tumor samples, GBM cell lines, and normal samples by using quantitative qRT-PCR. To date, only one successful quantitative analysis of *survivin* splice variants using TaqMan qRT-PCR in GBM samples have been reported [37]. Likewise Yamada, et al. [37], we found that *survivin* and *survivin- Δ Ex3* mRNA expression was significantly found in GBM samples and cell lines, while that gene expression of *survivin-2B* in GBM tumor samples did not differ from normal samples. Moreover, we also showed higher *Cdk1* mRNA expression in all GBM tumor samples and cell lines than normal samples, similarly to Chen, et al. [19]. All these data provide enough evidence to evaluate these both targets as potential alternatives for GBM treatment.

We also found that M4N acted efficiently inhibiting cell growth in cell lines and GBPCs. Since primary tumor cultures are believed to reflect more accurately the *in vivo* tumors than established cancer cell lines [24, 38], we considered highlighted the anti-growth capacity of M4N on these cells. Growth inhibitory effects of M4N on cancer cells lines and various kinds of xenograft tumors have been reported elsewhere [39-45]. Our study indicates that GBM is an additional promising target of the M4N therapy.

We performed drug combination assays between M4N and TMZ using three different strategies of schedule administration in cell lines and four GBPCs. We observed that both simultaneous combination (M4N+TMZ) and

sequential treatment (TMZ→M4N) exhibited synergistic effects while the reverse sequence (M4N→TMZ) yielded a preferential antagonistic effect. The antagonism resulted of M4N→TMZ could be explained by the recovery of growth caused by removal of M4N [21], together with activation of mechanisms of TMZ-mediated cell resistance as up-regulation of survivin [46].

Interestingly, the combination results obtained in this study permits not only demonstrate a potent chemosensitizing effect of M4N when simultaneously combined with TMZ, but also recognize the critical importance of sequence of chemotherapeutic drug administration on antitumor efficacy [47], as demonstrated by synergistic combination TMZ→M4N.

Our investigation also evaluated the radio-sensitizing potential of M4N through clonogenic assays. We found that M4N treatment alone significantly enhanced the sensitivity to radiation of U343 cell line (the only p53 proficient). It is known that, radiation-mediated DNA damage stabilizes p53 protein and consequently active its role as a transcriptional repressor of *survivin* [48, 49]. Thus, p53-proficient cells that are able to block survivin transcription could be more susceptible to combination M4N→radiation, whereas p53-deficient cells such as SF188, T98G, and U251 cells [50] are shown as M4N-resistant, as demonstrated in our study. However, other drug administration schedule could overcome this resistance mechanism, as performed by Sun, et al. [51] in cells of non-small cell lung carcinoma, with an administration of radiation followed by M4N treatment (radiation→M4N). Thus, we believe that radiosensitizing effect of M4N could be schedule- and p53 status-dependent.

Interestingly, the combination of M4N and TMZ significantly enhanced the sensitivity of all GBM cell lines to radiation treatment when compared to drugs treatment alone. It has been previously demonstrated that survivin inhibition by other strategies enhanced the radiosensitivity of cancer cells [52-55], however, this is the first description of the radiosensitization caused by the combination of M4N and a chemotherapeutic agent.

M4N treatment of several human tumor cells *in vitro* and xenograft models results in induction of apoptosis by suppressing *survivin* gene and arrest cell cycle associated with diminished expression of *Cdk1* [21, 41, 51]. Thus, although resistance to apoptosis is intrinsically characteristic of GBM [56, 57], M4N was able to induce apoptosis in a dose-dependent manner in all GBM cell lines, mainly in SF188 cells. In addition, we evaluated the cell cycle changes and found a mild, but significant, increase of cell population in G2/M phase in T98G, U251, and U343 cells after 24h-M4N treatment. Interestingly, SF188 cell line displayed a particular response with an increase of cell population in G0/G1 phase and lower reduction of mitotic index when compared to others cell lines.

Concerning SF188, this cell line showed the highest gene expression levels of both *Survivin* and *Cdk1*, as well as an elevated proliferative resistance toward M4N when compared to T98G, U343 and U251 cell lines, probably due to less profound down-regulation transcription of *Survivin* and *Cdk1* in SF188 cells. Nevertheless, SF188 showed high M4N-mediated apoptotic sensitivity and the strongest synergistic effect when combined with TMZ compared to other cell lines. All these interesting differences between this SF188 pediatric GBM cell line and adult cell lines shown here are consistent with several lines of clinical and molecular evidence suggesting that pediatric GBMs are indeed different from adult GBMs [58-60].

We also report that M4N decreased mRNA levels of *Survivin-ΔEx3* in U251 and U343 cells, significantly increased mRNA *survivin-2B* in T98G cells. Although these interesting data could contribute with the sight that *survivin-ΔEx3* play a positive role in inhibiting apoptosis while *survivin-2B* act as a pro-apoptotic factor [8, 61-

65], the down regulation of *survivin-2B* observed in M4N-treated U343 cells (*p53* proficient) suggest that these concepts are yet controversial [66,67].

In conclusion, this study showed that M4N induced growth arrest and apoptosis of GBM cells. Furthermore, drug combination analysis supported the potential of M4N as an agent chemo- and radio-sensitizing in GBM, suggesting rational schedules administration that may have clinical use in GBM therapy. Moreover, our data also points to biological differences between pediatric and adult GBM cells related to their response levels. Taken together, we propose that M4N may be a promising tool for adjuvant therapy and for enhancing the efficacy of conventional treatment modalities for GBM.

Acknowledgments

We would like to thank Augusto Faria Andrade from Department of Genetics of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil for their assistance with manuscript editing. We also 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. Financial Support from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, process number 2009/50118-2), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo is acknowledged.

Competing interests.

The authors declare that they have no competing interests.

Bibliographic References

1. Khasraw M, Lassman AB (2010) Advances in the treatment of malignant gliomas. *Curr Oncol Rep* 12:26–33. doi:10.1007/s11912-009-0077-4
2. Benítez JA, Domínguez-Monzón G, Segovia J (2008) Conventional and gene therapy strategies for the treatment of brain tumors. *Curr Med Chem* 15:729–742.
3. Henson JW (2006) Treatment of glioblastoma multiforme: a new standard. *Arch Neurol* 63:337–41.
4. Verheij M, Bartelink H (2000) Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res* 301:133–142. doi:10.1007/s004410000188
5. Shah MA, Schwartz GK (2001) Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 7(8):2168–81.
6. Sah NK, Khan Z, Khan GJ, Bisen PS (2006) Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett* 244:164–171. doi:10.1016/j.canlet.2006.03.007
7. Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC (1998) Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem* 273:11177–11182. doi:10.1074/jbc.273.18.11177
8. Altieri DC (2003) Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 22:8581–8589. doi:10.1038/sj.onc.1207113
9. Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ (2009) Survivin: A new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 35:553–562. doi:10.1016/j.ctrv.2009.05.003

10. Blanc-Brude OP, Mesri M, Wall NR, Plescia J, Dohi T, Altieri DC (2003) Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: Initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor-associated angiogenesis. *Clin Cancer Res* 9:2683-2692.
11. Chakravarti A, Noll E, Black PM, Finkelstein DF, Finkelstein DM, Dyson NJ, Loeffler JS (2002) Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. *J Clin Oncol* 20(4):1063-8.
12. Chakravarti A, Zhai GG, Zhang M, Malhotra R, Latham DE, Delaney MA, Robe P, Nestler U, Song Q, Loeffler J (2004) Survivin enhances radiation resistance in primary human glioblastoma cells via caspase-independent mechanisms. *Oncogene* 23:7494–7506. doi:10.1038/sj.onc.1208049
13. Reichert S, Rödel C, Mirsch J, Harter PN, Tomicic MT, Mittelbronn M, Kaina B, Rödel F. (2011) Survivin inhibition and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism to overcome radioresistance in glioblastoma. *Radiother Oncol* 101(1):51-8. doi:10.1016/j.radonc.2011.06.037
14. O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC (2000) Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(24):13103–13107. doi:10.1073/pnas.240390697
15. Wang Q, Su L, Liu N, Zhang L, Xu W, Fang H (2011) Cyclin dependent kinase 1 inhibitors: a review of recent progress. *Curr Med Chem* 18(13):2025-43.
16. Malumbres M, Barbacid M (2001) To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 222–231.
17. Malumbres M, Barbacid M (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9(3):153-166. doi:10.1038/nrc2602
18. Bodey B, Siegel SE, Kaiser HE (2002) Expression of proline-directed protein kinase, (p34cdc2/p58cyclin A), a novel cell proliferation marker in childhood brain tumors. *In Vivo* 16:589-94.
19. Chen H, Huang Q, Dong J, Zhai DZ, Wang AD, Lan Q (2008) Overexpression of CDC2/CyclinB1 in gliomas, and CDC2 depletion inhibits proliferation of human glioma cells in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 8:29. doi:10.1186/1471-2407-8-29
20. Heller JD, Kuo J, Wu TC, Kast WM, Huang RC (2001) Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid induces G2 arrest in mammalian cells and exhibits tumoricidal activity in vivo. *Cancer Res* 61:5499–5504.
21. Chang CC, Heller JD, Kuo J, Huang RC (2004) Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid induces growth arrest and cellular apoptosis by inhibiting Cdc2 and survivin expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(36):13239–13244. doi:10.1073/pnas.0405407101
22. Grossman SA, Ye X, Peereboom D, Rosenfeld MR, Mikkelsen T, Supko JG, Desideri S; Adult Brain Tumor Consortium (2012) Phase I study of terameprocol in patients with recurrent high-grade gliomas. *Neuro-Oncology* 14(4):511-7. doi:10.1093/neuonc/nor230
23. Louis DN, Ohgaki, H, Wiestler, OD (2007) The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System *Acta Neuropathol* 114:97–109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4
24. Borges KS, Castro-Gamero AM, Moreno DA, da Silva Silveira V, Brassesco MS, de Paula Queiroz RG, de Oliveira HF, Carlotti CG Jr, Scrideli CA, Tone LG (2012) Inhibition of Aurora kinases enhances chemosensitivity to temozolomide and causes radiosensitization in glioblastoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 138(3):405-14. doi:10.1007/s00432-011-1111-0
25. Brassesco MS, Valera ET, Neder L, Castro-Gamero AM, Arruda D, Machado HR, Sakamoto-Hojo ET, Tone LG (2009) Polyploidy in atypical choroid plexus papilloma of the posterior fossa. *Neuropathology* 29:293–298. doi:10.1111/j.1440-1789.2008.00949.x
26. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
27. Valente V, Teixeira SA, Neder L, Okamoto OK, Oba-Shinjo SM, Marie SK, Scrideli CA, Paçó-Larson ML, Carlotti CG Jr (2009) Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol* 3;10:17. doi:10.1186/1471-2199-10-17
28. Castro-Gamero AM, Borges KS, da Silva Silveira V, Lira RC, de Paula Gomes Queiroz R, Valera FC, Scrideli CA, Umezawa K, Tone LG (2012) Inhibition of nuclear factor-κB by dehydroxymethylepoxyquinomicin induces schedule-dependent chemosensitivity to anticancer drugs

- and enhances chemoinduced apoptosis in osteosarcoma cells. *Anticancer Drugs* 23(6):638-50. doi:10.1097/CAD.0b013e328350e835
29. Chou TC, Talalay P (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22:27–55
 30. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1:2315–2319. doi:10.1038/nprot.2006.339
 31. Ohgaki H, Kleihues P (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170:1445–1453. doi: 10.2353/ajpath.2007.070011
 32. Shirahata M, Oba S, Iwao-Koizumi K, Saito S, Ueno N, Oda M, Hashimoto N, Ishii S, Takahashi JA, Kato K (2009) Using gene expression profiling to identify a prognostic molecular spectrum in gliomas. *Cancer Sci* 100:165–172. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.01002.x
 33. Perry J, Okamoto M, Guiou M, Shirai K, Errett A, Chakravarti A (2012) Novel therapies in glioblastoma. *Neurol Res Int* 2012:428565. doi:10.1155/2012/428565
 34. Lackner MR, Wilson TR, Settleman J (2012) Mechanisms of acquired resistance to targeted cancer therapies. *Future Oncol* 8(8):999-1014. doi:10.2217/fon.12.86
 35. Altieri DC (2008) New wirings in the survivin networks. *Oncogene* 27:6276–6284. doi:10.1038/onc.2008.303
 36. Shapiro GI (2006) Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol* 24(11):1770-83. doi:10.1200/JCO.2005.03.7689
 37. Yamada Y, Kuroiwa T, Nakagawa T, Kajimoto Y, Dohi T, Azuma H, Tsuji M, Kami K, Miyatake S (2003) Transcriptional expression of survivin and its splice variants in brain tumors in humans. *J Neurosurg* 99(4):738-45.
 38. Qian X, LaRochelle WJ, Ara G, Wu F, Petersen KD, Thougard A, Sehested M, Lichenstein HS, Jeffers M (2006) Activity of PXD101, a histone deacetylase inhibitor, in preclinical ovarian cancer studies. *Mol Cancer Ther* 5:2086–2095.
 39. Lambert JD, Meyers RO, Timmermann BN, Dorr RT (2001) Tetra-O-methylnordihydroguaiaretic acid inhibits melanoma in vivo. *Cancer Lett* 171:47–56. doi:10.1016/S0304-3835(01)00560-2
 40. Meyers RO, Lambert JD, Hajicek N, Pourpak A, Kalaitzis JA, Dorr RT (2009) Synthesis, characterization, and anti-melanoma activity of tetra-O-substituted analogs of nordihydroguaiaretic acid. *Bioorg Med Chem Lett* 19:4752–4755. doi:10.1016/j.bmcl.2009.06.063
 41. Park R, Chang CC, Liang YC, Chung Y, Henry RA, Lin E, Mold DE, Huang RC (2005) Systemic treatment with tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid suppresses the growth of human xenograft tumors. *Clin Cancer Res* 11:4601–4609 doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2188
 42. Mak DH, Schober WD, Chen W, Heller J, Andreeff M, Carter BZ (2007) Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid inhibits growth and induces death of leukemia cells independent of Cdc2 and survivin. *Leuk Lymphoma* 48:774–785. doi:10.1080/10428190601186143
 43. Zhu X, Ma Y, Liu D (2010) Novel agents and regimens for acute myeloid leukemia: 2009 ASH annual meeting highlights. *J Hematol Oncol* 3:17. doi:10.1186/1756-8722-3-17
 44. Hansel DE, Dhara S, Huang RC, et al (2005) CDC2/CDK1 expression in esophageal adenocarcinoma and precursor lesions serves as a diagnostic and cancer progression marker and potential novel drug target. *Am J Surg Pathol* 29:390–399.
 45. Lopez RA, Goodman AB, Rhodes M, Blomberg JA, Heller J (2007) The anticancer activity of the transcription inhibitor terameprocol (meso-tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid) formulated for systemic administration. *Anticancer Drugs* 18:933–939. doi:10.1097/CAD.0b013e32813148e0
 46. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS (2006) Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 5:67. doi:10.1186/1476-4598-5-67
 47. Shah MA, Schwartz GK (2000) The relevance of drug sequence in combination chemotherapy. *Drug Resist Updat* 3(6):335-356. doi: 10.1054/drup.2000.0165
 48. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M (2002) Transcriptional repression of the antiapoptotic survivin gene by wild type p53. *J. Biol. Chem.* 277(5): 3247–3257. doi:10.1074/jbc.M106643200

49. Yamamoto H, Ngan CY, Monden M (2008) Cancer cells survive with survivin. *Cancer Sci* 99(9):1709-14. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00870.x
50. Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, Van Meir EG (1999) Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* 9(3):469-79.
51. Sun Y, Giacalone NJ, Lu B (2011) Terameprocin (tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid), an inhibitor of Sp1-mediated survivin transcription, induces radiosensitization in non-small cell lung carcinoma. *J Thorac Oncol* 6(1):8-14. doi:10.1097/JTO.0b013e3181fa646a.
52. Iwasa T, Okamoto I, Suzuki M, et al. (2008) Radiosensitizing effect of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 14:6496–6504. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0468
53. Cao C, Mu Y, Hallahan DE, Lu B (2004) XIAP and survivin as therapeutic targets for radiation sensitization in preclinical models of lung cancer. *Oncogene* 23:7047–7052. doi:10.1038/sj.onc.1207929
54. Rödel F, Frey B, Leitmann W, Capalbo G, Weiss C, Rödel C (2008) Survivin antisense oligonucleotides effectively radiosensitize colorectal cancer cells in both tissue culture and murine xenograft models. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 71:247–255. doi:10.1016/j.ijrobp.2008.02.011
55. Kami K, Doi R, Koizumi M, Toyoda E, Mori T, Ito D, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Wada M, Miyatake S, Imamura M (2005) Downregulation of survivin by siRNA diminishes radioresistance of pancreatic cancer cells. *Surgery* 138:299–305. doi:10.1016/j.surg.2005.05.009
56. Eisele G, Weller M (2011) Targeting apoptosis pathways in glioblastoma. *Cancer Lett* [Epub ahead of print] doi:10.1016/j.canlet.2010.12.012
57. Sgorbissa A, Tomasella A, Potu H, Manini I, Brancolini C (2001) Type I IFNs signaling and apoptosis resistance in glioblastoma cells. *Apoptosis* 16(12):1229-44. doi: 10.1007/s10495-011-0639-4
58. Gaspar N, Sharp SY, Eccles SA, Gowan S, Popov S, Jones C, Pearson A, Vassal G, Workman P (2010) Mechanistic evaluation of the novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 in adult and pediatric glioblastoma. *Mol Cancer Ther* 9(5):1219-33. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0683.
59. Valera ET, de Freitas Cortez MA, de Paula Queiroz RG, de Oliveira FM, Brassesco MS, Jabado N, Faury D, Bobola MS, Machado HR, Scrideli CA, Tone LG (2009) Pediatric glioblastoma cell line shows different patterns of expression of transmembrane ABC transporters after in vitro exposure to vinblastine. *Childs Nerv Syst* 25(1):39-45. doi: 10.1007/s00381-008-0740-3
60. Bax DA, Little SE, Gaspar N, et al (2009) Molecular and phenotypic characterisation of paediatric gliomas cell lines as models for preclinical drug development. *PLoS One* 4(4):e5209. doi:10.1371/journal.pone.0005209
61. Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD (1999) Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res* 59:6097–102.
62. Sampath J, Pelus LM (2007) Alternative splice variants of survivin as potential targets in cancer. *Curr Drug Discov Technol* 4:174–91
63. Wang HW, Sharp TV, Koumi A, Koentges G, Boshoff C (2002) Characterization of an anti-apoptotic glycoprotein encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpes virus which resembles a spliced variant of human survivin. *EMBO J* 21(11):2602–15. doi:10.1093/emboj/21.11.2602
64. Zhu N, Gu L, Findley HW, Li F, Zhou M (2004) An alternatively spliced survivin variant is positively regulated by p53 and sensitizes leukemia cells to chemotherapy. *Oncogene* 23:7545–51. doi:10.1038/sj.onc.1208038
65. Ling X, Cheng Q, Black JD, Li F (2007) Forced expression of survivin-2B abrogates mitotic cells and induces mitochondria-dependent apoptosis by blockade of tubulin polymerization and modulation of Bcl-2, Bax, and survivin. *J Biol Chem* 282:27204–14. doi:10.1074/jbc.M705161200
66. Zheng WY, Kang YY, Li LF, Xu YX, Ma XY (2011) Levels of effectiveness of gene therapies targeting survivin and its splice variants in human breast cancer cells. *Drug Discov Ther* 5(6):293-8. doi: 10.5582/ddt.2011.v5.6.293

67. Jacob NK, Cooley JV, Shirai K, Chakravarti A (2012) Survivin splice variants are not essential for mitotic progression or inhibition of apoptosis induced by doxorubicin and radiation. *Onco Targets Ther* 5:7-20. doi:10.2147/OTT.S28147

Tables

Table 1. Doses required for induce 50% inhibition of cell growth (IC₅₀) in GBM cell lines

Cell line	IC ₅₀ (μM)		Ratio	
	M4N 48 h	TMZ 48 h	IC ₅₀ (M4N): IC ₅₀ (TMZ)	Ratio used in combinations
SF188	171.39 ± 8.3	4464.2 ± 92.4	1 : 26.05	1 : 25
T98G	87.5 ± 2.2	2062.0 ± 26.1	1 : 23.65	1 : 25
U343	81.41 ± 4.6	664.56 ± 11.8	1 : 8.16	1 : 9.375
U251	64.27 ± 6.1	396.74 ± 9.4	1 : 6.17	1 : 9375

Table 2. IC₅₀ values for M4N in GBM primary cultures

Tumor samples	IC ₅₀ 48 h M4N (μM)	IC ₅₀ 96 h M4N (μM)
GB12	250.39	---
GM15	175.87	---
GM16	85.714	---
GM17	182.14	---
GM20	282.20	---
GM22	169.00	---
GM27	68.714	25.13
GM28	n.p*	20.86
GM41	75.756	---
GM45	21.883	9.00
GM49	18.431	7.113

* It was not possible to calculate IC₅₀

Table 3. Effects of treatment on the dose enhancement ratio (DER) of glioblastoma cell lines SF188, T98G, U251, and U343

Cell line	Treatment	2 Gy	4 Gy	6 Gy
SF188	M4N	1.06	1.10	1.12
	TMZ	1.43	1.83	2.77
	M4N+TMZ	2.24	2.91	6.33
T98G	M4N	1.06	1.13	1.01
	TMZ	1.08	1.52	1.19
	M4N+TMZ	1.19	1.51	1.59
U251	M4N	1.05	1.11	1.17
	TMZ	1.21	1.67	2.76
	M4N+TMZ	1.80	2.35	5.29
U343	M4N	1.11	1.39	1.58
	TMZ	1.52	1.94	1.92
	M4N+TMZ	1.89	3.25	5.01

Figures legends.

Fig.1 *Survivin*, *Survivin-2B*, *Survivin-ΔEx3* and *Cdk1* mRNA expression in the samples of glioblastoma tumor and cell lines. Relative expression levels of *Survivin* (A), *Survivin-2B* (B), *Survivin-ΔEx3* (C) and *Cdk1* (D) are shown in glioblastoma samples [GBM samples] (n=16) and non-neoplastic brain tissue [NT] (n=6). The relative expression levels of the same genes in six cell lines are shown (E). Expression levels are displayed as a ratio between the target genes and two reference genes (*TBP* and *HPRT*) to correct for variation in the amounts of RNA. The line corresponds to the median value (A-D). The p values are shown for indicate statistical differences.

Fig.2 M4N inhibited the cell proliferation of glioblastoma cells. SF188 (A), T98G (B), U251 (C), and U343 (D) glioblastoma cell lines and eleven primary cultures of glioblastoma tumors (E) were cultures in the presence of serial concentrations of M4N (0-80 μM) for 24, 48, and 72 h for cell lines and 48 h for the primary cultures. Proliferation was measured with the XTT kit. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001

Fig.3 Sequence-dependent interactions between M4N and TMZ in SF188, T98G, U343 and U251 cells *in vitro*. Plots of the combination index (CI) from glioblastoma cell lines exposed to M4N and TMZ using different schedules of administration: simultaneous 48-h exposures (A-D); sequential exposures M4N→TMZ, 24-h each (E-H); and sequential exposures TMZ→M4N, 24-h each (I-L) at different molar ratios of the two agents (M4N:TMZ). The line across the CI value of 1 indicates additivity; CIs above and below indicate antagonism and synergism, respectively. Crosses represent the CIs of the actual data points and continuous lines represent

computer-derived CIs at effect levels ranging from 10-100% inhibition of clonal growth according with Calcsyn software.

Fig.4 Combination effects between M4N and TMZ in primary cultures of glioblastoma. The primary cultures GB27 (A), GB28 (B), GB45 (C) and GB49 (D) were treated with M4N (40 μ M or 20 μ M) and TMZ (500 μ M) using three different schedules of administration: simultaneous 96-h exposures (M4N+TMZ); sequential exposures M4N $\rightarrow$ TMZ (M4N/TMZ) , 48-h each; and sequential exposures TMZ $\rightarrow$ M4N (TMZ/M4N), 48-h each. Significant differences between combined treatments and isolated treatments are shown. * P <0.05

Fig.5 M4N enhanced the radio-sensitizing effects of TMZ in glioblastoma cell lines. SF188 (A), T98G (B), U251 (C), and U343 (D) glioblastoma cell lines were treated with clonogenic IC₅₀ values of M4N and TMZ alone or combined for 48 h and then were exposed to radiation (0-6 Gy). After 7-10 days colonies were stained and scored. Values shown are the means $\pm$ SD of three separate experiments. The P values for clonogenic survival obtained by linear regression are shown.

Fig. 6 M4N causes apoptotic cell death, diminishes mitotic index (MI), and alters the cell cycle of glioblastoma cell lines. For apoptosis assay, cell lines were incubated with increasing amounts of M4N (0-30 μ M) for 48 h before being collected, and subjected to flow cytometry analysis. Percentage of Annexin-V-positive cells is showed (A). For MI scoring, cell lines were treated with serial doses of M4N (0-80 μ M) for 48 h before being collected. A total of 1000 cells were scored in each experiment (B). For cell cycle determination, SF188 (C), T98G (D), U251 (E), and U343 (F) cell lines were treated with vehicle control (DMSO) or M4N (20 or 40 μ M) for 24 h before being collected, and subjected to flow cytometry analysis using CycleTESTTM PLUS DNA reagent kit. In all cases data represent mean $\pm$ SD of three independent experiments. * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001

Fig. 7 M4N deregulates gene expression of glioblastoma cell lines. The cell lines were treated for 6, 12, and 24 h with 40 μ M M4N. The level of expression of the different mRNAs was assessed by qRT-PCR as reported in Materials and methods and displayed as a ratio between the target genes and two reference genes (*TBP* and *HPRT*) to correct for variation in the amounts of RNA. Cells treated with vehicle alone (Control) collected at the same treatment times were used as calibrators. Data are shown as mean $\pm$ SE of three independent experiments. * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001

Figures

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

Fig. 7

Fig. S1 (Supplementary data)

Fig. S2 (Supplementary data)

Fig. S3 (Supplementary data)

Fig. S4. (Supplementary data)