UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PRISCILA MARIA MANZINI RAMOS

**Avaliação dos efeitos antineoplásicos da inibição do NF- κ B
pelo DHMEQ (Dehidroximetilepoxiquinomicina) em
linhagens celulares de meduloblastoma**

RIBEIRÃO PRETO-SP

2014

PRISCILA MARIA MANZINI RAMOS

**Avaliação dos efeitos antineoplásicos da inibição do NF- κ B
pelo DHMEQ (Dehidroximetilepoxiquinomicina) em
linhagens celulares de meduloblastoma**

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

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

RIBEIRÃO PRETO-SP

2014

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

Ramos, Priscila Maria Manzini

Avaliação dos efeitos antineoplásicos da inibição do NF- κ B pelo DHMEQ (Dehidroximetilepoxiquinomicina) em linhagens celulares de meduloblastoma. Ribeirão Preto, 2014. 154 p. : il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Tone, Luiz Gonzaga.

1. Meduloblastoma. 2. NF- κ B. 3. DHMEQ. 4. p65. 5. Alvos terapêuticos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Priscila Maria Manzini Ramos

Avaliação dos efeitos antineoplásicos da inibição do NF- κ B pelo DHMEQ (Dehidroximetilepoxiquinomicina) em linhagens celulares de meduloblastoma

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: _____

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. **Luiz Gonzaga Tone**, pela oportunidade, confiança, apoio e auxílio no decorrer deste trabalho. Seu histórico profissional e pessoal foram inspiradores durante esse tempo de muitos aprendizados e desafios.

Ao Prof. Dr. **Carlos Alberto Scrideli** pela colaboração e pela ajuda prestadas a este trabalho.

À Dr^a. **Rosane Gomes de Paula Queiroz** pela amizade e ajuda na realização deste trabalho, além de todo suporte dado fora do laboratório em momentos importantes da minha vida. À técnica **Veridiana Kill Suazo Sant'Anna**, que também esteve presente em momentos profissionais e altamente descontraídos nesse período.

Às técnicas do laboratório de citogenética do Departamento de Pediatria **Aidé, Sônia, Malu, Lucimar, Rinaldo e Sarah** pelo apoio e agradável convivência.

Ao coordenador do curso de pós-graduação do Departamento de Genética Prof. Dr. **Ademilson Espencer Egea Soares** pela atenção, auxílio e apoio durante o doutorado e durante o período como aluna do programa PAE.

À Profa. Dra. **Elza Tiemi Sakamoto Hojo**, e a Dra. **Ana Paula de Lima Montaldi** pela colaboração na realização dos ensaios de ciclo celular deste trabalho.

À técnica **Patrícia Vianna Bonini Palma**, e à técnica **Camila Cristina de Oliveira Menezes Bonaldo** pela colaboração na realização dos ensaios de apoptose deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Harley Franciso de Oliveira** pela colaboração na realização dos ensaios de radiação deste trabalho.

Às secretárias do Departamento de Genética **Susie Adriana Penha Nalon, Maria Aparecida Oliveira Silva Elias e Silvia Santanna Consiglieri** pela atenção e apoio prestados durante toda a minha pós-graduação.

Às secretárias **Evelise Visconti Juliani** e **Helena Blanco**, pelo apoio e agradável convivência.

Às agências financiadoras **FAPESP**, pela concessão da bolsa de doutorado e financiamento deste projeto; **CNPq** e **FAEPA** pelo apoio indireto a esse projeto; e à **PRÓ-REITORIA** pelo auxílio financeiro concedido.

Aos companheiros de laboratório **Augusto, Daniel, Gabi, Guilherme, Gustavo, Karina, Kleiton, Maurício, Pamela, Mirela, Lara, Lenisa, Paola, Régia, Silvinha, Vanessa**: vou levar comigo muitas boas risadas!

Às queridas amigas **Julia A. Pezuk, Jaqueline C. de Oliveira, Andressa G. Morales, Fernanda Dahrouge Chiarot e Maria Sol Brassesco Anichinni**: vou levá-las no coração pra sempre! Imensamente agradecida por toda ajuda prestada não só profissionalmente, mas dividindo momentos muito importantes e inesquecíveis.

Aos meus velhos e bons amigos, que continuam fazendo parte da minha vida e que eu sei que vão continuar fazendo, mesmo de longe, mesmo nos vendo tão pouco.

Aos meus pais, **Maria de Lourdes M. Ramos** e **Milton Ramos**, e irmã **Fernanda M. M. Ramos**, que mesmo de longe, sempre estiveram muito perto, lutando, participando e vibrando em todos os momentos da minha vida. Amor e agradecimentos infinitos!

Ao meu marido e companheiro **Luiz Henrique Garcia Pereira**, a quem eu escolhi pra dividir todos os momentos da minha vida, e que faz parte de tudo há seis anos. Obrigada por conquistar comigo mais essa etapa, com todos os percalços e felicidades que cada batalha vencida traz embutida. Te amo!

RESUMO

RAMOS, P.M.M. **Avaliação dos efeitos anti-neoplásicos da inibição do NF- κ B pelo DHMEQ (Dehidroximetilepoxiquinomicina) em linhagens celulares de meduloblastoma.** 2014. 154 f. Tese (Doutorado em Biologia – Genética). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2014.

Meduloblastoma é um câncer do sistema nervoso central, altamente invasivo, de origem embrionária, localizado no cerebelo. É mais comum em crianças e corresponde a aproximadamente 20% de todos os tumores intracranianos pediátricos. Os tratamentos mais utilizados são cirurgia e quimioterapia, sendo que a radioterapia é aplicada somente em crianças com mais de 3 anos devido aos seus efeitos colaterais. Diversos estudos têm mostrado o papel do NF- κ B na regulação de genes envolvidos com o processo neoplásico. NF- κ B é um fator de transcrição chave na regulação da resposta imune e no processo de inflamação e está envolvido na regulação da transcrição de um grande número de genes relacionados ao processo de tumorigênese, além de ser constitutivamente ativo em diversos tipos de câncer, sendo um importante potencial alvo terapêutico. O DHMEQ (Dehidroximetilepoxiquinomicina) é uma droga que inibe a translocação do NF- κ B do citoplasma para o núcleo, inibindo assim a sua atuação como ativador transcricional. Vários trabalhos tem mostrado os efeitos antineoplásicos do DHMEQ em inúmeros tipos tumorais, entretanto, não há trabalhos que evidenciem esses efeitos em meduloblastoma. Assim, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos dessa droga nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76 de meduloblastoma pediátrico através de estudos funcionais e moleculares. Os resultados de proliferação demonstraram uma significativa diminuição do crescimento celular nas linhagens de meduloblastoma, inibindo cerca de 80, 70 e 60% nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76, respectivamente, na dose de 20 μ g/mL, e apresentou um IC₅₀ de 10 μ g/mL em 48h para as linhagens UW402 e UW473 e em 72h na linhagem ONS-76. Adicionalmente, elevou o nível de apoptose para 50, 17 e 31% nessas linhagens, respectivamente, inibiu fortemente a capacidade clonogênica, a migração e a invasão celular nas três linhagens e foi sinérgico na combinação com outros quimioterápicos em grande parte dos pontos de combinação, além de radiosensibilizar fortemente as três linhagens. Os resultados são congruentes com o potencial efeito antitumoral de DHMEQ.

ABSTRACT

RAMOS, P.M.M. **Evaluation of anti-neoplastic effects of NF- κ B inhibition by DHMEQ (Dehidroximetilepoxiquinomicina) in medulloblastoma cell lines.** 2014. 154 f. Thesis (PhD in Biology – Genetics). Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. Ribeirão Preto. 2014.

Medulloblastoma is a cancer of the central nervous system, highly invasive, of embryonic origin, located in the cerebellum. It is more common among children and accounts for approximately 20% of all pediatric intracranial tumors. The most common treatments are surgery and chemotherapy, and radiotherapy is only to children older than 3 years old due to its side effects. Several studies have demonstrated the role of NF- κ B in the regulation of genes involved in the neoplastic process. NF- κ B is a key transcription factor in the regulation of immune response and inflammation process, and it is involved in the transcriptional regulation of a large number of genes related to the tumorigenesis process, and constitutively active in many types of cancer, being an important potential therapeutic target. DHMEQ (Dehidroximetilepoxiquinomicina) is a drug that inhibits the translocation of NF- κ B from the cytoplasm to the nucleus, thus inhibiting its activity as a transcriptional activator. Several studies have shown the antineoplastic effects of DHMEQ in numerous tumor types, however, there is no surveys that have tested their effects in medulloblastoma. Thus, the present study aimed to evaluate the effects of this drug in UW402, UW473 and ONS-76 pediatric medulloblastoma cell lines through functional and molecular studies. The proliferation test results demonstrated a significant decrease in the cell growth in the medulloblastoma cell lines, inhibiting approximately 80, 70 and 60% for UW402, UW473 and ONS-76, respectively, at a dose of 20 μ g/mL, and showed an IC₅₀ of 10 μ g/mL at 48h for UW402 and UW473 and at 72h in ONS-76. Additionally, increased the level of apoptosis to 50, 17 and 31% in these cell lines, respectively, strongly inhibited the clonogenic capacity, the migration and cell invasion in the three lines and it was synergistic in combination with other chemotherapeutic agents in most combination points, and radiosensitization strongly the three cell lines. The results are congruent with the potential antitumor effect of DHMEQ.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Proliferação celular na linhagem UW402. O ensaio foi realizado nos tempos de 24, 48 e 72 horas, nas dosagens de 2,5; 5; 7,5; 10 e 20µg/mL. A altura as barras indicam a porcentagem de proliferação. O (*) indica as doses estatisticamente significantes ($p<0,05$) dentro de cada tempo comparadas com o DMSO. 48

Figura 2: Proliferação celular na linhagem UW473. O ensaio foi realizado nos tempos de 24, 48 e 72 horas, nas dosagens de 2,5; 5; 7,5; 10 e 20µg/mL. A altura as barras indicam a porcentagem de proliferação. O (*) indica as doses estatisticamente significantes ($p<0,05$) dentro de cada tempo, comparadas com o DMSO. 48

Figura 3: Proliferação celular na linhagem ONS-76. O ensaio foi realizado nos tempos de 24, 48 e 72 horas, nas dosagens de 2,5; 5; 7,5; 10 e 20µg/mL. A altura as barras indicam a porcentagem de proliferação relativa ao DMSO. O (*) indica as doses estatisticamente significantes ($p<0,05$) dentro de cada tempo, comparadas com o DMSO..... 49

Figura 4: Curva de crescimento celular da linhagem UW402 nos diferentes tratamentos e tempos. O eixo X apresenta os tempos dos tratamentos e o eixo Y o número de células por mL. 50

Figura 5: Curva de crescimento celular da linhagem UW473 nos diferentes tratamentos e tempos. O eixo X apresenta os tempos dos tratamentos e o eixo Y o número de células por mL. 51

Figura 6: Curva de crescimento celular da linhagem ONS-76 nos diferentes tratamentos e tempos. O eixo X apresenta os tempos dos tratamentos e o eixo Y o número de células por mL. 51

Figura 7: Porcentagem de apoptose por Anexina V e FITC nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76. Foram consideradas células marcadas com Anexina e células marcadas com Anexina e iodeto de propídeo. O ensaio foi realizado com tratamento de 48 horas, nas dosagens de 2,5; 5; 10; 15 e 20µg/mL. O (*) indica as doses estatisticamente significantes ($p<0,05$) comparadas com o DMSO. 52

Figura 8: Fração de sobrevivência no ensaio de capacidade clonogênica nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76. O ensaio foi realizado com tratamento de 48 horas, nas dosagens de 2,5; 5; 7,5 (exceto ONS-76), 10 e 20µg/mL. Foram consideradas colônias contendo no mínimo 50 células. O (*) indica as doses estatisticamente significantes ($p<0,05$) comparadas com o DMSO. 53

Figura 9: Análise da migração celular nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76. O ensaio foi realizado com tratamento de 24 horas, nas doses de 2,5; 5; 7,5; 10 e 20µg/mL com meio de cultura suplementado com 1% de soro. O (*) indica as doses estatisticamente significantes ($p<0,05$) comparadas com o DMSO, e T0 é o tempo zero, onde não houve migração. 54

Figura 10: Ensaio de invasão nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76 no tempo de 24h, nas doses de 2,5; 5; 10 e 20µg/mL, com meio de cultura suplementado com 1% de soro. A altura das barras representa o número de células que transpassou a barreira de matrigel e invadiu o outro lado da membrana. O (*) mostra as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparadas ao DMSO..... 55

Figura 11: Ciclo celular da linhagem UW402 nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120h, nos tratamentos de 2,5; 5; 7,5; 10 e 20µg/mL de DHMEQ. A altura das barras representa a porcentagem de células em diferentes fases do ciclo celular (G1, S e G2). O (*) mostra as diferenças estatisticamente significativas comparados ao DMSO, em cada fase do ciclo celular..... 57

Figura 12: Ciclo celular da linhagem UW473 nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120h, nos tratamentos de 2,5; 5; 7,5; 10 e 20µg/mL de DHMEQ. A altura das barras representa a porcentagem de células em diferentes fases do ciclo celular (G1, S e G2). O (*) mostra as diferenças estatisticamente significativas comparados ao DMSO, em cada fase do ciclo celular..... 58

Figura 13: Ciclo celular da linhagem ONS-76 nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120h, nos tratamentos de 2,5; 5; 7,5; 10 e 20µg/mL de DHMEQ. A altura das barras representa a porcentagem de células em diferentes fases do ciclo celular (G1, S e G2). O (*) mostra as diferenças estatisticamente significativas comparados ao DMSO, em cada fase do ciclo celular..... 59

Figura 14: Índice mitótico da linhagem UW402 no tempo de 24, 48 e 72h, em diferentes tratamentos. A altura das barras representa a porcentagem de metáfases observadas..... 60

Figura 15: Índice mitótico da linhagem UW473 no tempo de 24, 48 e 72h, em diferentes tratamentos. A altura das barras representa a porcentagem de metáfases observadas..... 61

Figura 16: Combinação simultânea com proporção constante das drogas DHMEQ e Cisplatina na UW402 no tempo de 48h. Os números de 1 a 5 no eixo X indicam a combinação de doses das drogas utilizadas..... 62

Figura 17: Combinação simultânea com proporção constante das drogas DHMEQ e Cisplatina na UW473 no tempo de 48h. Os números de 1 a 5 no eixo X indicam a combinação de doses das drogas utilizadas..... 63

Figura 18: Combinação simultânea com proporção fixa das drogas DHMEQ e Cisplatina na linhagem ONS-76 no tempo de 72h. Os números de 1 a 5 no eixo X indicam a combinação de doses das drogas utilizadas..... 63

Figura 19: Combinação simultânea com proporção constante das drogas DHMEQ e TMZ na UW402 no tempo de 48h. Os números de 1 a 6 no eixo X indicam a combinação de doses das drogas utilizadas..... 65

Figura 20: Combinação simultânea com proporção constante das drogas DHMEQ e TMZ na UW473 no tempo de 48h. Os números de 1 a 6 no eixo X indicam a combinação de doses das drogas utilizadas. 66

Figura 21: Combinação simultânea com proporção fixa das drogas DHMEQ e TMZ na linhagem ONS-76 no tempo de 72h. Os números de 1 a 6 no eixo X indicam a combinação de doses das drogas utilizadas. 66

Figura 22: Combinação simultânea com proporção constante das drogas DHMEQ e Etoposide na linhagem UW402 no tempo de 48h. Os números de 1 a 5 no eixo X indicam a combinação de doses das drogas utilizadas. 68

Figura 23: Combinação simultânea com proporção constante das drogas DHMEQ e Etoposide na linhagem UW473 no tempo de 48h. Os números de 1 a 5 no eixo X indicam a combinação de doses das drogas utilizadas. 68

Figura 24: Combinação simultânea com proporção constante das drogas DHMEQ e Etoposide na linhagem ONS-76 no tempo de 72h. Os números de 1 a 5 no eixo X indicam a combinação de doses das drogas utilizadas. 69

Figura 25: Expressão dos genes *p65*, *MRP1*, *LRP*, *EGFR* e *MMP-2* na linhagem UW402, em 6 e 12 horas de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ. A altura as barras indicam a quantificação da expressão gênica em relação ao controle DMSO. 74

Figura 26: Expressão dos genes *p65*, *MRP1*, *LRP*, *EGFR* e *MMP-2* na linhagem UW473, em 6 e 12 horas de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ. A altura as barras indicam a quantificação da expressão gênica em relação ao controle DMSO. 75

Figura 27: Expressão dos genes *p65*, *MRP1*, *LRP*, *EGFR* e *MMP-2* na linhagem ONS-76, em 6 e 12 horas de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ. A altura as barras indicam a quantificação da expressão gênica em relação ao controle DMSO. 75

Figura 28: análise da quantidade da proteína HIF1α nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76, nos tempos de 24, 48 e 72h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ. Em cada figura, a marca da esquerda representa o controle (DMSO) e, da direita o tratado. Os números abaixo de cada imagem dimensionam a diferença de coloração entre tratado e controle. 76

Figura 29: Análise da quantidade da proteína IκBα nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76, nos tempos de 24, 48 e 72h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ. Em cada figura, a marca da esquerda representa o controle (DMSO) e, da direita o tratado. Os números abaixo de cada imagem dimensionam a diferença de coloração entre tratado e controle. 77

Figura 30: Análise da quantidade da proteína LRP nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76, nos tempos de 24, 48 e 72h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ. Em cada figura, a marca da esquerda representa o controle (DMSO) e, da direita o tratado. Os números abaixo de cada imagem dimensionam a diferença de coloração entre tratado e controle. 78

Figura 31: Análise da quantidade da proteína MRP nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76, nos tempos de 24, 48 e 72h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ. Em cada figura, a marca da esquerda representa o controle (DMSO) e, da direita o tratado. Os números abaixo de cada imagem dimensionam a diferença de coloração entre tratado e controle. 79

Figura 32: Análise da quantidade das proteínas MMP-2 e MMP-9 nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76, no tempo de 24h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ em meio de cultura suplementado com 1% de SBF. Em cada figura, a marca da esquerda representa o controle (DMSO) e, da direita o tratado. Os números abaixo de cada imagem dimensionam a diferença de coloração entre tratado e controle. 80

Figura 33: *Western blotting* da proteína p65 (65 kDa) e do endógeno GAPDH (37 kDa) na linhagem UW402 nos tempos de 48 e 72h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ. 81

Figura 34: *Western blotting* da proteína p65 (65 kDa) e do endógeno GAPDH (37 kDa) na linhagem UW473 nos tempos de 48 e 72h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ. 81

Figura 35: *Western blotting* da proteína p65 (65 kDa) e do endógeno GAPDH (37 kDa) nas linhagens UW402 e UW473 nos tempos de 3 e 6h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ. 82

Figura 36: Imunofluorescência na linhagem UW402. Em azul, marcação nuclear com DAPI e em vermelho marcação pouco específica com anticorpo p65, nos tempos de 1, 3, 6 e 24h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ. A esquerda, sem tratamento com TNFα, e a direita com tratamento com TNFα. 83

Figura 37: Imunofluorescência na linhagem UW473. Em azul, marcação nuclear com DAPI e em vermelho marcação pouco específica com anticorpo p65, nos tempos de 1, 3, 6 e 24h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ. A esquerda, sem tratamento com TNFα, e a direita com tratamento com TNFα. 84

Figura 38: Imunofluorescência na linhagem UW473. Em azul, marcação nuclear com DAPI e em vermelho marcação pouco específica com anticorpo p65, nos tempos de 1, 3, 6 e 24h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ. A esquerda, sem tratamento com TNFα, e a direita com tratamento com TNFα. 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de IC_{50} em $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens UW402, UW473 e ONS-76, nos tempos de 24, 48 e 72h..... 49

Tabela 2: Combinação proporção fixa DHMEQ e CDDP. Fa (fração afetada), CI (índice de combinação) e DRI (índice de combinação de dose) para os diferentes pontos de combinação de DHMEQ (2,5; 5,0; 10 e $20\mu\text{g/mL}$) e Cisplatina (1,25; 2,5; 5,0 e $10\mu\text{M}$) nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76. CI=1 indica efeito aditivo, CI<1 indica efeito sinérgico e CI>1 indica efeito antagônico. 64

Tabela 3: Combinação proporção fixa DHMEQ e TMZ. Fa (fração afetada), CI (índice de combinação) e DRI (índice de combinação de dose) para os diferentes pontos de combinação de DHMEQ (2,5; 5,0; 10 e $20\mu\text{g/mL}$) e Cisplatina (500; 1000; 2000 e $4000\mu\text{M}$) nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76. CI=1 indica efeito aditivo, CI<1 indica efeito sinérgico e CI>1 indica efeito antagônico. 67

Tabela 4: Combinação proporção fixa DHMEQ e ETOP. Fa (fração afetada), CI (índice de combinação) e DRI (índice de combinação de dose) para os diferentes pontos de combinação de DHMEQ (2,5; 5,0; 10 e $20\mu\text{g/mL}$) e Etoposide (2; 4; 8 e $16\mu\text{M}$) nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76. CI=1 indica efeito aditivo, CI<1 indica efeito sinérgico e CI>1 indica efeito antagônico..... 69

Tabela 5: Combinação proporção não fixa DHMEQ e CDDP. Fa (fração afetada), CI (índice de combinação) e DRI (índice de combinação de dose) para os diferentes pontos de combinação de DHMEQ (2,5; 5,0; 10 e $20\mu\text{g/mL}$) e Cisplatina (1,25; 2,5; 5,0 e $10\mu\text{M}$) nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76. CI=1 indica efeito aditivo, CI<1 indica efeito sinérgico e CI>1 indica efeito antagônico. 70

Tabela 6: Combinação proporção não fixa DHMEQ e TMZ. Fa (fração afetada), CI (índice de combinação) e DRI (índice de combinação de dose) para os diferentes pontos de combinação de DHMEQ (2,5; 5,0; 10 e $20\mu\text{g/mL}$) e TMZ (500; 1000; 2000 e $4000\mu\text{M}$) nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76. CI=1 indica efeito aditivo, CI<1 indica efeito sinérgico e CI>1 indica efeito antagônico..... 71

Tabela 7: Combinação proporção não fixa DHMEQ e ETOP. Fa (fração afetada), CI (índice de combinação) e DRI (índice de combinação de dose) para os diferentes pontos de combinação de DHMEQ (2,5; 5,0; 10 e $20\mu\text{g/mL}$) e Etoposide (2; 4; 8 e $16\mu\text{M}$) nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76. CI=1 indica efeito aditivo, CI<1 indica efeito sinérgico e CI>1 indica efeito antagônico..... 72

Tabela 8: DHMEQ e radiação. Valores de DER nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76 nas doses de 2, 4 e 6Gy após tratamento com $10\mu\text{g/mL}$ de DHMEQ por 48h. *DER= radiação/radiação + DHMEQ..... 73

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µM	Micromolar
ABTA	<i>Americam Brain Tumor Association</i>
ANOVA	Análise de variância
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CA	Canada
CBTRUS	<i>Central Brain Tumor Registry of the United States</i>
CDDP	Cisplatina
CDK	Quinase dependente de ciclina
CI	<i>Combination indice</i> (índice de combinação)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEPC	Dietilpirocarbonato
DER	<i>Dose enhancement ratio</i>
DHEMQ	Dehidroximetilepoxiquinomicina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRI	<i>Dose reduction index</i> (índice de redução de dose)
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EFGR	Fator de crescimento epidérmico
EP	Eficiência de plaqueamento
ETOP	Etoposide
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fração afetada
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FS	Fração de sobrevida
Gy	Gray
H	Horas
HC	Hospital das Clínicas
HH	<i>Hedgehog</i>

INCA	Intituto Nacional do Cancer
MALT	<i>Mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MB	Meduloblastoma
MDR	Resistência à múltiplas drogas
mL	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro
NF-kB	<i>Nuclear Fator kappa B</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PI	Iodeto de propídeo
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time PCR</i> (PCR em tempo real quantitativo)
RHD	Domínio de homologia Rel
RIPA	<i>Radio-immunoprecipitation assay</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécie reativa de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
SBF	Soro bovino fetal
SDS-PAGE	Dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
SNC	Sistema nervoso central
TBS-T	<i>Tris buffered saline with tween</i>
TMZ	Temozolomida
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
USP	Universidade de São Paulo
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Meduloblastoma	17
1.2. <i>Nuclear Factor Kappa B</i> (NF- κ B).....	23
1.3. DHMEQ	27
2. JUSTIFICATIVA.....	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. Geral	33
3.2. Específicos.....	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. Linhagens celulares, cultivo celular e tratamento com DHMEQ	35
4.2. Ensaio funcionais	36
4.2.1. Ensaio de proliferação celular.....	36
4.2.2. Ensaio de curva de crescimento	36
4.2.3. Ensaio de apoptose	37
4.2.4. Capacidade clonogênica	37
4.2.5. Ensaio de migração celular.....	38
4.2.6. Ensaio de invasão celular	39
4.2.7. Ensaio de ciclo celular	39
4.2.8. Determinação do índice mitótico.....	39
4.3. Combinação de quimioterápicos	40
4.4. Potencial radiosensibilizante de DHMEQ	41
4.5. Ensaio moleculares	42
4.5.1. Extração de RNA	42
4.5.2. Extração de proteínas.....	42
4.5.3. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	43
4.5.4. <i>Dot blot</i>	43
4.5.5. <i>Western blotting</i>	44
4.5.6. Imunofluorescência.....	45
4.6. Análise estatística	45
5. RESULTADOS	47
5.1. Proliferação celular.....	47

5.2.	Curva de crescimento	49
5.3.	Apoptose	52
5.4.	Capacidade clonogênica	53
5.5.	Migração	54
5.6.	Invasão.....	55
5.7.	Ciclo celular.....	55
5.8.	Índice Mitótico	60
5.9.	Combinação de drogas	61
5.9.1.	DHMEQ + cisplatina	61
5.9.2.	Combinação DHMEQ + TMZ.....	64
5.9.3.	Combinação DHMEQ + Etoposide	67
5.9.4.	Combinação de proporção não fixa: 10µg/mL de DHMEQ + Cisplatina	70
5.9.5.	Combinação de proporção não fixa: 10µg/mL de DHMEQ + TMZ	71
5.9.6.	Combinação de proporção não fixa: 10µg/mL de DHMEQ + Etoposide	72
5.10.	Radiossensibilização de DHMEQ	73
5.11.	Expressão gênica.....	73
5.12.	<i>Dot blot</i>	76
5.13.	<i>Western blotting</i>	80
5.14.	Imunofluorescência.....	82
6.	DISCUSSÃO.....	87
6.1.	Considerações finais	102
7.	CONCLUSÕES.....	105
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
9.	ANEXOS.....	122

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

O câncer infantil corresponde a um grupo de várias doenças que têm em comum a proliferação descontrolada de células anormais e que pode ocorrer em qualquer local do organismo. Os tumores mais frequentes na infância e na adolescência são as leucemias, os do sistema nervoso central e linfomas. Também acometem crianças e adolescentes o neuroblastoma, tumor de Wilms, retinoblastoma, tumor germinativo, osteossarcoma e sarcomas. Assim como em países desenvolvidos, no Brasil, o câncer já representa a primeira causa de morte por doença entre crianças e adolescentes de 1 a 19 anos, para todas as regiões do país (INCA, s/data).

O câncer infanto-juvenil (abaixo de 19 anos) é considerado raro quando comparado com os tumores do adulto, correspondendo entre 2 e 3% de todos os tumores malignos. Estimativa realizada pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) para o biênio 2008/09 revela uma ocorrência de cerca de 9.890 casos por ano em crianças e adolescentes com até 18 anos de idade (INCA, 2008).

O progresso no desenvolvimento do tratamento do câncer na infância foi expressivo nas últimas quatro décadas. Estima-se que em torno de 70% das crianças acometidas por câncer podem ser curadas, se diagnosticadas precocemente e tratadas em centros especializados. A maioria dessas crianças terá boa qualidade de vida após o tratamento adequado (INCA, s/data).

1.1. Meduloblastoma

O meduloblastoma (MB) é um tumor de crescimento rápido e altamente invasivo de origem embrionária localizado no cerebelo, uma porção na parte inferior posterior do cérebro também chamada de fossa posterior, que controla o equilíbrio, a postura e outras funções motoras complexas (ABTA, 2012). É o tumor cerebral mais comum em crianças e, de acordo com o *Central Brain Tumor Registry of the United States* de 2008, esta neoplasia perfaz aproximadamente 20% de todos os tumores intracranianos em crianças e 40% de todos os tumores de fossa posterior pediátrico (CBTRUS, 2008) e é raro em adultos, representando apenas 0,4 a 1% de todos os tumores de sistema nervoso central (SNC).

A incidência da doença é de aproximadamente 0,6/100.000 em pacientes de 0 a 19 anos e sem mudanças significativas nas últimas duas décadas (Partap et al., 2009). O pico de incidência ocorre em crianças de 5 a 7 anos de idade, e 10% dos casos são diagnosticados no primeiro ano de vida. Aproximadamente 30% de todos os casos ocorrem em crianças com menos de 10 anos. A proporção racial é de 1,85 mais comum em brancos que negros, e entre os sexos é de 1,6 vez mais comum em meninos que em meninas (CBTRUS, 2008).

A maioria dos pacientes apresenta sintomas decorrentes do aumento da pressão intracraniana como irritabilidade excessiva, vômito, dor de cabeça, diplopia (visão dupla), nistagmos (movimentos oculares oscilatórios), perda da coordenação motora, entre outros (Dhall, 2009). Os critérios diagnósticos e fator de risco são baseados na idade do paciente, grau de possibilidade de ressecção cirúrgica, disseminação leptomenigeal e presença de metástases. O tratamento padrão envolve cirurgia e quimioterapia e são os procedimentos principais para adultos e crianças. Diferentes protocolos quimioterápicos são utilizados para o tratamento de MB: Temozolomida/Etoposide (oral), Cisplatina/Etoposide (intravenoso), Gemcitabina/ Oxaliplatina (intravenoso), um inibidor oral da via Sonic Hedgehog e Melfalano oral (Massimino et al., 2013). Radioterapia é aplicada somente para pacientes com mais de 3 anos de idade devido a seus efeitos colaterais (Packer et al., 1999; Packer et al., 2003; Grill et al., 2005; Geyer et al., 2005, Crawford et al., 2007). As taxas de sobrevida global para pacientes com MB atingiram 70-80% usando protocolos que combinam essas três abordagens de tratamento (Northcott et al., 2012).

Uma taxa de sobrevida de cinco anos para pacientes com risco padrão (prognóstico favorável) é de aproximadamente 70%. Para pacientes com alto risco (prognóstico desfavorável) a taxa de sobrevida de cinco anos é por volta de 40%, os quais o protocolo de tratamento inclui radiação seguido de altas doses de quimioterapia e resgate de células tronco autólogas (Grill e Bhangoo, 2007).

O grande dilema de tratamentos agressivos que envolvem cirurgia seguida de radioterapia cranioespinhal e quimioterapia é o risco de sequelas neurocognitivas, no crescimento e no sistema endócrino, levando a busca por tratamentos com menores efeitos tóxicos, que diminuam ou eliminem a radiação, que causa significantes efeitos tardios em pacientes com sobrevida longa (Packer et al., 2006; Srivastava e Nalbantoglu, 2010).

Histologicamente, o MB clássico é composto de pequenas células azuis, redondas, com núcleo denso e alto índice mitótico (Giangaspero et al., 2007). Na análise imuno-histoquímica, a maioria das células expressa marcadores neuronais como neurofilamentos, enolase neuroespecífica, sinaptofisina e proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (Hadjipanayis e Meir, 2009). O diagnóstico normalmente é feito por tomografia computadorizada, na qual o tumor aparece como uma massa homogênea e sólida na linha média da fossa posterior e é confirmado por ressonância magnética (Dhall, 2009).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* -WHO), o MB corresponde histologicamente a tumores de grau IV. Segundo a mesma organização, a doença pode ser classificada como MB clássico, MB desmoplásico/nodular, MB com nodularidade extensiva, MB anaplásico, MB de células grandes, medulomioblastoma e MB melanocítico.

- MB clássico: apresenta muitas células indiferenciadas pequenas e azuis, altamente compactadas que podem formar rosetas de Homer-Wright (arranjos radiais nucleares entrelaçadas com muito citoplasma) (Crawford et al., 2007; Massimino et al., 2011).
- MB desmoplásico/nodular: acomete predominantemente a região lateral cerebelar principalmente em adolescentes e adultos. É frequentemente lobulado com limites precisos e componentes estromais, e é rico em colágeno (Rosenblum et al., 2004). Apresenta formações de zonas micronodulares com matriz fibrilar pobre, escassa reticulina e baixa celularidade de neurônios semelhantes à oligodendrócitos, com alta taxa de apoptose e baixo índice mitótico. É frequente em crianças menores de três anos e está associado ao prognóstico favorável em lactentes (Eberhart et al., 2001; Huse & Holland, 2010; Massimino et al., 2011).
- MB com extensa nodularidade: acomete principalmente lactentes e está associado a um bom prognóstico. Apresenta grandes áreas lobuladas devido a áreas livres de reticulina, geralmente alongadas (Massimino et al., 2011).
- MB anaplásico: possui células redondas grandes de núcleos arredondados e nucléolos proeminentes, com alta taxa de apoptose e proliferação. Este subtipo é caracterizado por um desenvolvimento agressivo e apresenta uma alta incidência de metástase (Brown et al., 2000; Huse & Holland, 2010).

- MB de células grandes: composto por células monomórficas grandes, redondas e com vesículas nucleares, com nucléolo abundante e citoplasma eosinófilo. Estas células geralmente se misturam com células de diferente morfologia, caracterizada por pleomorfismo nuclear (Massimino et al., 2011).
- Medulomioblastoma: se refere a qualquer variante de MB que contenha elementos rabdomioblásticos focais, imunorreatividade para desmina, mioglobulina e miosina rápida (Giangaspero et al., 2007).
- MB melanocítico: as células tumorais podem parecer melanócitos indiferenciados ou epiteliais, com formação de túbulos ou papilas; geralmente expressa a proteína S-100. Também pode ocorrer em qualquer variante de MB (Giangaspero et al., 2007).

O MB não é uma doença simples, mas corresponde a uma coleção de subgrupos de tumores clínica e molecularmente diversos (Cho et al., 2011; Kool et al., 2008; Northcott et al., 2011; Remke et al., 2011; Remke et al., 2011; Thompson et al., 2006).

Estudos moleculares conduzidos nas últimas décadas poderiam ser considerados para melhor caracterização e identificação do MB. Alterações em algumas vias de sinalização observadas em MB ajudaram no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos. Uma importante contribuição para o entendimento do MB veio de estudos de pacientes com síndrome de Gorlin e síndrome de Turcot. Essas síndromes conferem uma maior predisposição ao desenvolvimento de MB (Rossi et al., 2008).

A síndrome de Gorlin é caracterizada por mutações no gene *PTCH*, que codifica uma proteína transmembrana capaz de se ligar a proteínas de sinalização da família Hedgehog (HH) (Zurawel et al., 2000; Pomeroy e Sturla, 2003). Mutações em determinados genes da família HH podem levar a malformações severas do sistema nervoso central (Dellovade et al., 2006). *SHH* tem um papel ativo na formação especialmente do cerebelo, e é responsável pelo desenvolvimento da linha média facial e pela indução do tecido neural na mesoderme (Ingham et al., 2006).

A síndrome de Turcot está associada a mutações no gene *APC*, componente da via Wnt que coordena diversos processos no desenvolvimento, incluindo proliferação e destino de células progenitoras neuronais (Polkinghorn e Tarbell, 2006).

Estudos buscando aspectos específicos do MB levaram a uma classificação molecular da doença: tumores Shh, Wnt ou não-Shh/Wnt (Ellison, 2010). O subgrupo não-Shh/Wnt não está claramente associado com a ativação aberrante de uma via de sinalização, embora eles estejam associados com a superregulação de classes de genes específicos, como genes neuronais ou genes fotorreceptores (Kool et al., 2008).

Com os recentes avanços nas técnicas de análise de transcrição global do genoma, vários laboratórios começaram a subclassificar o MB com base no transcriptoma. Os quatro principais subgrupos até o momento são: Wnt, Shh, Grupo 3 e Grupo 4 (Taylor et al., 2012) e há evidências de subtipos dentro dos grupos (Cho et al., 2011).

O subgrupo Wnt é considerado um tumor de bom prognóstico, alcançando taxa de sobrevida maior que 90% (Clifford et al., 2006; Ellison et al., 2011; Northcott et al., 2011; Rogers et al., 2009). A maioria dos MB Wnt estudados até o momento possuem histologia clássica e este subtipo é frequentemente descrito como portador de mutações no gene *CTNNB1*, marcação imuno-histoquímica nuclear para β -catenina, e monossomia do cromossomo 6. Pode ocorrer em qualquer idade, mas são menos comuns em lactentes, e a proporção sexual nesta subclasse é de 1:1 (Taylor et al., 2012).

O subgrupo Shh está relacionado à via de sinalização Sonic Hedgehog que parece conduzir a iniciação tumoral na maioria dos casos. Ela foi identificada principalmente baseada no perfil transcricional (Cho et al., 2011; Kool et al., 2008; Northcott et al., 2011; Schwalbe et al., 2011), além de marcação imuno-histoquímica para SFRP1 ou GAB1 e deleção de 9q, região onde se localiza o gene *PTCH*. A incidência deste subgrupo é em crianças de 0 a 3 anos e adultos maiores de 16. Alguns estudos sugerem uma preponderância de ocorrência no sexo feminino, mas a proporção mais aceita é de 1:1 (Taylor et al., 2012). Quase todos os MB nodular/desmoplásico são do grupo Shh, embora essa não seja uma marca efetiva deste subgrupo, já que mais de 50% dos MB Shh não pertencem a esta classe histológica (Taylor et al., 2012).

O Grupo 3 possui como característica a expressão de um determinado conjunto de genes, a marcação imuno-histoquímica positiva para NPR3 e altos níveis de expressão de *MYC*, mas não de *MYCN* (Kool et al., 2008; Northcott et al., 2011). Amplificação e altos níveis de expressão do oncogene *OTX2* parecem estar

restritos aos grupos 3 e 4 (Adamson et al., 2010; de Hass et al., 2006). O grupo 3 apresenta mais frequentemente ganho do cromossomo 1q e/ou perda do cromossomo 5q e 10q (Taylor et al., 2012). É mais frequente em meninos, ocorre em crianças, sendo quase nunca observado em adultos e é comum a ocorrência de metástase, que confere um fator de risco de pior prognóstico (Northcott et al., 2011).

É neste subgrupo que mais claramente se observa uma subclassificação. O grupo 3 α inclui todos os pacientes com amplificação de *MYC* e com maior risco de recorrência e morte. O grupo 3 β não possui amplificação deste gene e são clinicamente mais similares aos pacientes do grupo 4 (Cho et al., 2011). O mau prognóstico dos pacientes do grupo 3 indica a importância desta classificação, a necessidade de biomarcadores práticos e da compreensão de sua patogênese (Taylor et al., 2012).

O grupo 4 é o que possui as maiores particularidades: menino, 7 anos de idade, histologia clássica e presença do isocromossomo 17q. Há também uma alta incidência de perda do cromossomo X em pacientes do sexo feminino, e a proporção de ocorrência neste sexo é duas vezes maior que em meninos. Um perfil transcricional agrupa este subgrupo e a imuno-histoquímica de *KCNA1* é sugerida como marcador, mas não requer validação (Northcott et al., 2011; Cho et al., 2011). Este subgrupo possui prognóstico intermediário e é o que menos se conhece sobre sua patogênese molecular.

Outras vias embrionárias e não embrionárias têm sido investigadas para melhor compreensão da biologia do MB. Estudos sugerem o envolvimento da via Notch, não associada a nenhuma síndrome, na desregulação dos receptores Notch 1 e Notch 2 no desenvolvimento de MB. Esta via está envolvida na determinação do destino celular e na diferenciação de vários tecidos e células (Sjolund et al., 2006).

Não há mais dúvidas de que somente a classificação histológica não é a melhor maneira de diagnosticar adequadamente o MB. Tumores transcricionalmente semelhantes compartilham características moleculares e clínicas semelhantes, e por isso são mais prováveis de possuírem alvos terapêuticos comuns.

1.2. **Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B)**

Este fator de transcrição foi descoberto em 1986 como um fator nuclear que se liga ao elemento potenciador da cadeia leve da imunoglobulina kappa de células B ativadas (Sen, 1986).

NF- κ B é um termo genérico que se refere ao fator de transcrição dimérico pertencente à família Rel (proteínas Rel ou NF-kappaB) e compreendem uma família de fatores de transcrição eucarióticos estruturalmente relacionados que são envolvidos no controle de um grande número de processos celulares e organismos normais, tais como respostas imunitárias e inflamatórias, processos de desenvolvimento, crescimento celular e apoptose. São expressos em quase todos os tipos de células e regulam muitos genes alvo com uma grande variedade de funções (May e Ghosh, 1998). Além disso, este fator de transcrição é constitutivamente ativo em algumas doenças incluindo o câncer, artrite, inflamação crônica, asma, doenças neurodegenerativas e doenças cardíacas (Gilmore, 1999).

Mamíferos expressam cinco proteínas Rel de duas classes. A primeira classe que é formada por RelA (p65), c-Rel (homólogo a v-Rel) e RelB, sintetizadas como produtos maduros e; os genes *NF- κ B1* e *NF- κ B2* da segunda classe, cujos produtos são sintetizados como longos precursores e sofrem processo proteolítico para produção das proteínas p50 e p52 maduras (Karin e Lin, 2002). Todos os cinco membros desta família de proteínas formam homo ou heterodímeros e partilham algumas características estruturais, incluindo um domínio de homologia Rel (RHD) que é essencial para a dimerização, bem como a ligação a elementos do DNA (May e Ghosh, 1997). A diversidade de combinações possíveis entre as proteínas da classe um e da classe dois contribuem para a regulação de diferentes grupos de genes. NF- κ B se refere comumente ao heterodímero p50-RelA, que é um dos mais propensos a formar dímeros e é o maior complexo Rel na maioria das células (Karin e Lin, 2002).

As proteínas inibitórias chamada I κ B ligam-se firmemente aos dímeros e os mantêm inativos no citoplasma em grandes complexos proteicos. Sinais como TNF α ou IL-1 ativam os dímeros para iniciarem uma via de sinalização que promove a fosforilação, a ubiquitinação e a posterior degradação de I κ B. Essa degradação expõe um sinal de localização nuclear nas proteínas NF- κ B que, agora, se deslocam para o núcleo e estimulam a transcrição de genes específicos. A fosforilação de I κ B

é realizada por uma serinotreonino-quinase específica, chamada I κ B quinase (IKK) (Alberts et al., 2004).

O NF- κ B é um fator de transcrição chave na regulação da resposta imune e no processo de inflamação atuando através da indução de vários genes incluindo genes codificadores de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (Karin e Ben-Neriah, 2000; Ghosh and Karin, 2002). Fatores relacionados ao processo inflamatório como TNF α , IL-6, IL-1, IL-8, entre outros, são potenciais ativadores de NF- κ B (Shen e Tergaonkar, 2009). Ele também está envolvido no processo de carcinogênese, uma vez que muitos oncogenes podem ser ativados por esse fator de transcrição.

Processo inflamatório e NF- κ B particularmente possuem um duplo papel em relação ao câncer. Por um lado, a ativação de NF- κ B é parte da defesa imune que ocorre para eliminar células transformadas, quando ocorre alta atividade de células imunitárias citotóxicas contra células do câncer (Disis, 2010). Por outro lado, este fator de transcrição está constitutivamente ativado em muitos tipos de câncer e pode exercer uma variedade de funções pró-tumorigênicas (Hoesel e Schmid, 2013). O papel do NF- κ B no câncer foi relatado em muitos estudos que mostram a ativação desse fator de transcrição em tumores sólidos e hematológicos (Lee et al, 2007).

Um número crescente de trabalhos tem sugerido que NF- κ B também induz a apoptose. Alguns modelos de camundongos e linhagens celulares com deficiência de NF- κ B evidenciam outra função do fator de transcrição: a inibição da apoptose (Karin e Lin, 2002). Utilizando um inibidor de NF- κ B, Dabaghmanesh et al. (2009) mostraram que genes antiapoptóticos são sub-regulados e genes pró-apoptóticos são super regulados. NF- κ B contribui com a morte celular superregulando transcrionalmente alguns alvos pró-apoptóticos como *FAS/CD95*, *FASL*, *DR4/TRAIL-R1* e *DR5 (TRAIL-R2)* (Kimura et al., 2003; Ravi et al., 2001), enquanto reprime seus alvos antiapoptóticos.

A função antiapoptótica do NF- κ B tem sido considerada como um mecanismo chave no processo de tumorigênese. Essa função é principalmente alcançada pela regulação da transcrição de um conjunto de proteínas antiapoptóticas que são capazes de inibir a morte celular por vias distintas (Shen e Tergaonkar, 2009). As proteínas antiapoptóticas reguladas por NF- κ B incluem proteínas inibidoras de apoptose IAPs 1 e 2, IAP ligadas ao X, proteína inibitória celular FLICE (cFLIP), Bcl-X_L, A1 (também conhecida como Bfl-1), TRAF1 e TRAF2 (Kucharczak et al., 2003).

Muitos oncogenes, incluindo *RAS*, *BCR-ABL* e *MYC*, podem ser ativados por NF- κ B. O oncogene *H-RAS* requer NF- κ B para induzir células normais à proliferação e tumorigênese (Jo et al., 2000). A proteína quimérica API2/MALT1, característica de linfomas MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*), atua como oncogene conferindo uma vantagem proliferativa a clones neoplásicos pela ativação da via de sinalização de NF- κ B e também por inibir a morte celular mediada por p53 (Stoffel e Levine, 2004). O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) tirosina quinase tem sido mostrado como promotor da transcrição de NF- κ B em câncer de ovário (Alberti et al., 2011).

Níveis elevados de receptores da família EGFR foram identificados como componentes comuns de vários tipos de câncer e parecem promover o crescimento de diversos tumores sólidos (Nicholson et al., 2001). Trabalhos relacionando o fator de transcrição NF- κ B e EGFR em câncer de mama (Biswas e Iglehart, 2006) e próstata (Kim et al., 2006) descrevem a inibição concomitante de NF- κ B e EGFR a partir de diferentes inibidores do fator transcrição.

A proliferação celular descontrolada e a deficiência da maquinaria de morte celular são duas importantes características do câncer. O NF- κ B é conhecido por controlar a expressão de alguns genes-chaves da regulação do ciclo celular como as ciclinas *D1*, *D2*, *D3* e *E1*, *C-MYC* e quinases dependentes de ciclina (*CDK 2*, *4*, *6*) (Shen e Tergaonkar, 2009). Este fator de transcrição também regula outros processos como a angiogênese, a qual depende de quimiocinas (*monocyte chemoattractant protein-1*, IL-8) e fatores de crescimento (TNF, VEGF) (Huang et al., 2000).

A metástase envolve uma complexa cascata de eventos biológicos que incluem adesão, migração e invasão, permitindo que células tumorais se desprendam do sítio primário e invadam e se proliferem em outros sítios. O NF- κ B controla um grupo de genes envolvidos nesse processo, como *VCAM-1*, *ICAM-1* e receptores de quimiocinas como o *CXCR4* (Huber et al., 2005; Basseres e Baldwin, 2006; Silva, 2004; Helbig et al., 2003). Matriz metaloproteinase 2 (*MMP-2*), *MMP-9* e *uPA* possuem um importante papel na invasão do tumor e na metástase, e são regulados por NF- κ B (Rangaswami et al., 2004).

A família dos genes HIF é conhecida por controlar a resposta celular a baixa tensão de oxigênio (Semenza, 2000). O envolvimento das vias NF- κ B e HIF foi muito documentada em nível proteico em resposta a estímulos de TNF α , colchicina e fator

de crescimento de hepatócitos (HGF) (Jung et al., 2003; Tacchini et al., 2004), e a ativação de subunidades de NF- κ B são importante fatores para contribuir na mediação da expressão de *HIF-1 α* e seus níveis basais de mRNA e proteínas (Bonello et al., 2007).

A transfecção transiente de plasmídeos repórteres de expressão em células desprovidas de atividade de NF- κ B endógeno mostraram que p52 tem capacidade intrínseca de ativação da transcrição: ele pode estimular a transcrição de Rel-A (p65) conduzida pela formação de heterodímeros p65/p52, enquanto, superexpressos, reprimem a transcrição pela formação de homodímeros p52/p52 inativos dependente de p65, indicando que o gene *NF- κ B2* codifica um fator de transcrição indutível de NF- κ B, com a capacidade de regular diferencialmente o fator de transcrição NF- κ B, dependendo da sua abundância no núcleo (Chang et al., 1994).

Devido a grande capacidade pleiotrópica de NF- κ B, que controla um grande número de genes, sua atividade é regulada em múltiplos níveis, e um primeiro nível é através das proteínas inibitórias I κ B e das quinases que fosforilam as I κ B, as IKK. Esses reguladores de NF- κ B são eles próprios NF- κ B dependentes, gerando um mecanismo de *feedback* autoregulatório (Oeckinghaus e Ghosh, 2009).

A resistência à drogas é uma das maiores causas de insucesso nas terapias contra o câncer. Entre muitos mecanismos de resistência, a clássica resistência a múltiplas drogas (MDR) mediada por transportadores transmembrana como MRP1 e LRP são um dos mecanismos mais importantes de resistência a várias drogas anticâncer em retinoblastoma. Curcumin é um potente inativador de NF- κ B e o trabalho de Das e Sahoo (2012) demonstrou uma inibição dose dependente da expressão gênica de *MRP-1* e *LRP* após tratamento com curcumin, além de outros trabalhos que relacionam a expressão de genes MDR ao fator de transcrição NF- κ B (Yang et al., 2003; Morais et al., 2010; Ronaldson et al., 2010).

Amplificações, rearranjos e outras alterações cromossômicas e genéticas envolvendo genes codificados por membros da família NF- κ B tem sido observados em muitos tumores sólidos e hematológicos (Rayet e Gelinas, 1999). A região 2p14-15 que contem o *locus* c-Rel humano está amplificado em 23% dos linfomas extranodal difuso de células B grandes e outros linfomas de célula B não-Hodgkin (Houldsworth et al., 1996). Rearranjos no *locus* Bcl3 em leucemia linfocítica crônica de células B resulta na super expressão de *BCL3*, um membro da família I κ B que

funciona como um coativador transcricional em associação com p50 e p52 (Lee et al., 2007).

Diversos estudos têm mostrado o papel do NF- κ B na regulação de genes envolvidos com o processo neoplásico. Além disso, há indícios de que sua inibição pode bloquear a progressão do tumor. Neste contexto, o NF- κ B torna-se um potencial alvo molecular contra o câncer (Shen e Tergaonkar, 2009). Em muitos estudos que visaram o NF- κ B como alvo, foi observada atividade antitumoral *in vitro* e/ou *in vivo* em cânceres de mama, próstata, melanoma e linfoblastoma, entre outros, por diferentes abordagens (Huang et al., 2000; Huang et al., 2001; Lesage et al., 2003).

1.3. DHMEQ

Existem mais de 800 compostos inibidores de NF- κ B (Gilmore e Garbati, 2011) e, assim, a utilidade fisiológica ou farmacológica de qualquer composto para a inibição da atividade de NF- κ B é pouco clara. No entanto, o conhecimento dos detalhes moleculares dessa via está permitindo o desenvolvimento de inibidores mais específicos e potentes e, de fato, alguns inibidores estão entrando em ensaios clínicos.

Nessa busca, Umezawa e Chaicharoenpong (2002) desenvolveram um novo inibidor de baixo peso molecular com base na estrutura do antibiótico epoxiquinomicina, que possui a estrutura ciclohexilepoxidona. Embora a epoxiquinomicina C não inibisse a ativação de NF- κ B induzida por TNF α , um dos compostos desenvolvido, dehidroximetilepoxiquinomicina (DHMEQ), conseguiu inibir sua ativação na linhagem de leucemia de células T, Jurkat.

DHMEQ (dehidroximetilepoxiquinomicina) é um potente inibidor de NF- κ B e seu principal mecanismo de ação é o bloqueio direto da translocação do fator de transcrição ativado para o núcleo, principalmente de p65 (RelA) (Watanabe et al., 2008). Esta droga tem se mostrado eficiente em impedir a ligação de NF- κ B ao DNA e atenuar a transcrição de genes alvo desse fator de transcrição, levando as células tumorais a apoptose em vários tipos de câncer, como de próstata, tireóide, mama, mieloma múltiplo e cabeça e pescoço (Wong et al., 2010). Além do efeito antitumoral, DHMEQ possui efeitos anti-inflamatórios e antifibrótico (Umezawa, 2006).

Carcinomas e leucemias frequentemente possuem ativação constitutiva de NF- κ B. DHMEQ inibe a atividade constitutiva desse fator de transcrição em várias linhagens desses tipos de câncer, além de inibir a secreção de citocinas inflamatórias em células cancerosas (Umezawa, 2006). Estudos realizados demonstraram uma boa atividade antitumoral de DHMEQ *in vivo* acompanhada de mínima ou nenhuma toxicidade (Kikuchi et al., 2003; Matsumoto et al., 2005; Watanabe et al., 2005).

Lampiasi et al. (2009) avaliaram o mecanismo molecular pelo qual DHMEQ exerce seu efeito antineoplásico em células de câncer de fígado. DHMEQ promove a geração de ROS (espécie reativa de oxigênio) que inibe o crescimento celular e a proliferação, aumenta a taxa de apoptose e provoca danos ao DNA. O principal mecanismo de ação de DHMEQ é mediado pelo estresse oxidativo.

A tumorigênese e a resistência contra apoptose e a quimioterápicos estão relacionadas à ativação de NF- κ B (Sarkar e Li, 2008; Cusack et al., 1999; Nakanishi e Toi, 2005). Togano et al. (2009) estudaram tumores sólidos que se tornaram resistentes a agentes quimioterápicos. Seus resultados indicaram que esses tumores podem ser mais facilmente tratados com inibidores de NF- κ B. DHMEQ pode ser um potencial fármaco candidato contra essas células de tumores sólidos resistentes.

Horiuchi et al. (2008) examinaram os efeitos de DHMEQ na inibição do crescimento e na indução da apoptose em linhagens celulares de sarcoma sinovial e mostraram que a droga suprime o crescimento e induz a apoptose, e a combinação de drogas citotóxicas e DHMEQ possui efeito aditivo contra essas linhagens.

Wong et al. (2010) demonstraram em seu trabalho que DHMEQ foi efetivo em inibir carcinoma nasofaríngeo, inibindo o crescimento tumoral juntamente com a indução da apoptose, interrupção do ciclo celular na fase G2/M e redução da expressão dos genes *EGFR*, *ciclina D1* e *survivina*.

O estudo de Kodaira et al. (2010) avaliou o possível efeito terapêutico de DHMEQ na linhagem celular de câncer de bexiga KU-19-19 e em modelo animal. A droga exerceu um efeito citotóxico e supressivo contra essa agressiva linhagem pela indução da apoptose, supressão da produção autócrina de várias citocinas e pela inibição da angiogênese *in vivo*.

DHMEQ inibiu a ativação de NF- κ B na linhagem T47D de câncer de mama, assim como a adesão celular a fibronectina induzidas por TNF α (Noma et al., 2012).

No trabalho de Kozakai et al. (2012), DHMEQ inibiu a atividade de NF- κ B induzida por irradiação e causando um aumento no efeito inibitório na formação de colônias e uma evidente parada do ciclo celular (G2/M) em linhagem de câncer de próstata.

Em um estudo *in vivo*, Suzuki et al. (2013) confirmaram os efeitos antineoplásicos de DHMEQ em câncer pancreático humano, especialmente em metástase de fígado, e reafirmaram que a droga é um promissor agente para tratamento clínico.

Trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram a inibição de NF- κ B por DHMEQ em linhagens de glioblastoma (Brassescio et al., 2013) e osteossarcoma (Castro-Gamero et al., 2012), mostrando significativo decréscimo na proliferação, invasão e migração, aumento da apoptose e parada do ciclo celular.

Este trabalho intencionou avaliar os efeitos antitumorais em linhagens pediátricas de MB, ainda não relatadas anteriormente.

2. Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

O tratamento de crianças com MB é um desafio devido à grande susceptibilidade do cérebro imaturo ao tratamento, induzindo déficits neurocognitivos. Vários grupos de estudos clínicos reconhecem a importância de altas doses de quimioterapia para atrasar ou evitar a radioterapia cranioespinhal, especialmente em pacientes com metástases ou doença residual (Rutkowski et al., 2010).

O grande dilema desses esquemas agressivos são as sequelas que se manifestam nos sistemas endócrino, cognitivo e no crescimento, levando a grandes esforços para se aperfeiçoar tratamentos com altas taxas de sucesso e mínima toxicidade (Srivastava e Nalbantoglu, 2010).

Assim, o DHMEQ, uma droga derivada de um antibiótico, tem se mostrado com baixa toxidade e altamente eficiente em bloquear o NF- κ B, um importante fator de transcrição, que controla a expressão de um grande número de genes relacionados à proliferação, apoptose, entre outros.

O uso dessa droga em linhagens pediátricas de MB ainda não foi relatado, porém um estudo preliminar do nosso grupo apresentou resultados estatisticamente significativos para proliferação celular após tratamento com DHMEQ em linhagens pediátricas de MB (Andrade et al., 2010). Portanto, estudar os efeitos da inibição do NF- κ B contribuirá com um possível novo alvo terapêutico para o tratamento deste tumor, além de ajudar na compreensão de sua biologia.

3. Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar o potencial terapêutico da droga DHMEQ em linhagens celulares de MB.

3.2. Específicos

- Avaliar o efeito antineoplásico do DHMEQ em linhagens pediátricas de MB através das técnicas de proliferação celular, índice mitótico, migração, invasão e apoptose;
- Avaliar o potencial quimio e radiosensibilizante de DHMEQ em linhagens celulares de MB através da combinação deste com diferentes quimioterápicos (Cisplatina, Temozolomida e Etoposide) e radioterapia;
- Avaliar o bloqueio de NF-κB através da observação de proteínas nucleares antes e após tratamento com DHMEQ;
- Avaliar a expressão de genes que tem NF-κB como fator de transcrição e que estão relacionados ao processo de carcinogênese, antes e após tratamento com DHMEQ.

4. Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no laboratório de Pediatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Todos os experimentos foram realizados pelo menos em triplicata, em três momentos diferentes. Foi utilizado como controle nos experimentos o meio de cultura com o veículo da droga (DMSO) na mesma quantidade do maior volume da droga utilizado (em todos os experimentos) e; meio de cultura somente.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (processo nº 14101/2010) (Anexo 1).

4.1. Linhagens celulares, cultivo celular e tratamento com DHMEQ

Foram utilizadas as linhagens UW402 e UW473 de MB pediátrico, cedidas gentilmente pelo Dr. Michael S. Bobola (Seattle Children's), e posteriormente incluída a linhagem ONS-76 também de MB pediátrico, adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ/UFRJ).

As células foram cultivadas em monocamadas com meio HAM-F10, para as linhagens UW402 e UW473, e em meio RPMI para a linhagem ONS-76, ambos suplementado com 1% de glutamina, 100 mg/ml de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina, e 10% de soro bovino fetal (SBF) (pH 7.2–7.4) em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C.

Os tratamentos *in vitro* com DHMEQ foram realizados nas concentrações de 2,5; 5; 7,5; 10; 15 e 20 µg/mL, em diferentes tempos, dependendo do método de investigação realizado.

A droga foi gentilmente cedida pelo Dr. Kazuo Umezawa, Department of Molecular Target Medicine Screening, Aichi Medical University.

4.2. Ensaios funcionais

4.2.1. Ensaio de proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada através do ensaio com o *kit* Cell Proliferation Kit II (XTT) (XTT II; Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN), de acordo com as instruções do fabricante. Foram semeadas 2000 células em quadruplicata em placas com 96 poços. Após tempo de aderência (24h), foram realizados diferentes tratamentos (2,5; 5; 7,5; 10 e 20µg/mL) nos tempos de 24, 48 e 72h. A cada intervalo, foi adicionado 10% do reagente em um volume final de 100µL e continuada a incubação por 3 horas para permitir a metabolização do sal e o aparecimento de coloração na solução. A absorbância foi lida nos filtros de 450 e 655nm em um leitor de placa iMax Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA), sendo o valor encontrado normalizado pelo controle DMSO.

Com os dados deste experimento foi calculado o IC₅₀ com o auxílio do programa Calcsyn 2.1 (Biosoft®), que corresponde à dose necessária para inibir 50% da proliferação celular. Primeiramente foram calculados os valores da fração afetada (FA) que correspondem à proporção de inibição em cada tratamento comparado ao controle, utilizando para isso os valores da média de todos os experimentos. A partir do FA foi calculado o valor do IC₅₀ para cada tempo de tratamento em cada linhagem. Foram utilizados ao menos três pontos para a construção da curva da relação dose-efeito. O valor do coeficiente de relação linear R foi rigorosamente avaliado. Ele é uma medida de ajustamento de um modelo estatístico linear e varia entre 0 e 1, indicando, em porcentagem, o quanto o modelo consegue explicar os valores observados. Quanto mais próximo de 1, mais explicativo é o modelo.

4.2.2. Ensaio de curva de crescimento

As células plaqueadas e tratadas com DHMEQ por 24, 48 e 72h foram ressuspensas. Em seguida, 10µL de solução celular foi incubada em solução de azul de tripan (*Triplan blue* / Merck, Frankfurter, Germany) a 0,5% de solução salina tamponada com fosfatos pH 7,4 (*Phosphate Buffer Saline* – PBS / Sigma, St. Louis, Missouri, USA), na proporção de 9/1. Após a homogeneização, a mistura foi

observada em câmara de Neubauer ao microscópio óptico e foi calculado o número de células por mL conforme a fórmula:

$$\text{Número de células por mL} = \frac{\text{número de células viáveis} \times 2 \times 10^4}{4}$$

A curva de crescimento para cada linhagem e para cada tratamento foi realizada a partir destes dados.

4.2.3. Ensaio de apoptose

Entre 40 e 60 mil células foram semeadas e tratadas por 48h, nas doses de 2,5; 5; 10; 15 e 20µg/mL em placa de seis poços. Após tripsinização e lavagem com PBS, as células foram ressuspensas em 300µL de solução tampão contendo 10µL de tampão de ligação. Em seguida foram adicionados 5µL de anexina V marcada com FITC e incubado por 15 minutos, à temperatura ambiente. Imediatamente antes da leitura do citômetro, adicionou-se 50µL de iodeto de propídeo (2µg/mL em PBS). Foram analisados 10.000 eventos no citômetro de fluxo BD FACSCalibur® (BD Bioscience, San José, CA, USA). A análise foi realizada no laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro da FMRP-USP, sob a responsabilidade da técnica Patrícia Vianna Bonini Palma. A percentagem de células em cada fase foi determinada de acordo à marcação com Anexina V (apoptose) e Anexina V e PI (apoptose final) presente na célula. Diferentemente dos outros ensaios realizados com DHMEQ, a dose de 7,5µg/mL foi substituída por 15µg/mL após testes iniciais para melhor observação da curva de aumento da quantidade de apoptose provocada pela droga.

4.2.4. Capacidade clonogênica

Os ensaios de sobrevivência clonogênica foram realizados segundo o protocolo de Franken et al., 2006. As células foram ressuspensas e, entre 400 e 500 células foram semeadas em triplicata, em placas de seis poços. O tratamento foi realizado 24 horas após o plaqueamento e incubadas durante 48h com meio contendo diferentes doses de DHMEQ (2,5; 5; 7,5; 10 e 20µg/mL; exceto dose de 7,5 µg/mL na linhagem ONS-76). Após esse período, o meio contendo droga foi retirado e as células foram lavadas com PBS antes de ser acrescentado meio de cultura completo, sem droga. As culturas foram incubadas em estufa a 37°C e 5%

CO₂ por 7 -15 dias, até que as colônias fossem visíveis, mas não confluentes. Para a visualização das colônias o meio de cultura foi retirado, as células lavadas com PBS, fixadas com metanol/ácido acético (3:1), e coradas com Giemsa. As colônias foram contadas com lupa, sendo consideradas somente aquelas com pelo menos 50 células. A partir desta contagem foi determinada a eficiência de plaqueamento (EP):

$$EP = \frac{\text{número de colônias formadas} \times 100}{\text{número de células plaqueadas}}$$

Com o qual foi calculada a Fração de Sobrevida (FS):

$$FS = \frac{\text{número de colônias formadas após o tratamento}}{\text{número de células semeadas} \times EP}$$

A EP é específica de cada linhagem, para cada condição de cultura e representa a percentagem de células que tem capacidade de formar colônias. A FS é específica de cada tratamento e representa a percentagem de células plaqueadas que após o tratamento ainda possuem capacidade de formar colônia. A partir dos dados de FS foram realizadas análises estatísticas.

4.2.5. Ensaio de migração celular

Este método é baseado na criação de uma lacuna artificial (risco) em uma monocamada de células confluentes. As células na borda da lacuna recém-criada tendem a migrar em direção a abertura para fechar o "risco" até o reestabelecimento do contato célula-célula (Liang et al., 2007). Para isso, foram semeadas 50.000 células em triplicata, em placas de 24 poços. Após 24 horas, foi descartado o meio de cultura, feito um risco (uma fissura na cultura celular), com o auxílio de uma ponteira, do tamanho do diâmetro do poço. O tempo zero (T0) foi fotografado nesse momento. Os poços dos tratamentos e controle foram lavados com PBS para retiradas das células que foram soltas e as células foram tratadas usando meio de cultura suplementado com 1% de SBF por 24 horas. Em seguida, o meio contendo droga foi descartado, os poços foram lavados com PBS, as células foram fixadas com metanol e posteriormente coradas com giemsa em tampão fosfato (1:30). Os poços foram fotografados e foi medida a largura do risco em seis pontos de cada poço.

4.2.6. Ensaio de invasão celular

Neste ensaio, 400 mil células foram semeadas no topo de uma matriz de matrigel depositada no fundo de um inserto, do kit BD Biocoat TM Matrigel TM Matrix–24 well plate (Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA). As células foram tratadas em meio de cultura suplementado com 1% de SBF e diferentes doses de DHMEQ (2,5; 5; 10 e 20µg/mL). Na parte inferior do inserto foi adicionado meio de cultura com 10% de SBF. Após a incubação a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas, as células que não invadiram foram removidas da parte superior do inserto com o auxílio de um *swab*. As células que invadiram e ficaram na parte externa da membrana no fundo do inserto foram fixadas com metanol 100% por 2 minutos, coradas com solução de azul de toluidina 1% e analisadas por microscopia óptica.

4.2.7. Ensaio de ciclo celular

Para este ensaio 60 mil células foram plaqueadas em placa de seis poços, e tratadas com DHMEQ em diferentes doses (2,5; 5; 7,5; 10 e 20µg/mL) durante 24, 48, 72, 96 e 120h. Após o tratamento, as células foram tripsinazadas, lavadas com PBS, fixadas com etanol 70% e estocadas em freezer a -20°C. Para a leitura, o material foi descongelado e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos, lavado com PBS 1X (filtrado e gelado) e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos novamente. Em seguida, foram acrescentados 200µl da solução PI (iodeto de propídeo 1 mg/mL, RNase 50 µg/mL, NPO4 0,2%) ao *pellet*, e o material foi avaliado em um citômetro de fluxo (Guava EasyCyte Mini). Foram analisados 5000 eventos utilizando o programa Guava CytoSoft 4.2.1. A análise foi feita no laboratório de Citogenética e Mutagênese do FMRP-USP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto-Hojo.

4.2.8. Determinação do índice mitótico

Esta metodologia verifica o número de células em divisão através da observação das mesmas em metáfase, quando os cromossomos estão altamente condensandos. Para isto, células cultivadas em frascos de 25cm² foram tratadas por 24, 48 e 72h com diferentes doses de DHMEQ (2,5; 5; 7,5; 10 e 20µg/mL). Após

este período foi aplicado 200µL de colchicina e incubado *overnight*. Então, as células foram lavadas com PBS, ressuspensas e em seguida incubadas em solução hipotônica (0,075M KCl) previamente aquecida (37°C) por 20 minutos. Posteriormente, as células foram fixadas duas vezes com metanol/ácido acético (3:1). Ao término do processo foram aplicadas duas gotas da amostra fixada sobre a superfície de uma lâmina previamente lavada. As lâminas foram coradas com solução de Giemsa em tampão fosfato (1:30) e com o auxílio de um microscópio óptico foram contabilizadas o número de células que estavam em metáfase dentro de uma contagem de 2000 células de cada tratamento.

4.3. Combinação de quimioterápicos

Para a combinação com DHMQ foram utilizadas as drogas Cisplatina (diluída em solução salina), Temozolomide (TMZ) e Etoposide (diluídas em DMSO), estocadas a uma concentração de 1,66 mM, 200 mM e 20 mM, respectivamente. Primeiramente foram realizados testes para definir o IC₅₀ de cada droga separadamente e, posteriormente, foram combinadas as concentrações definidas de cada quimioterápico com DHMEQ.

O ensaio de combinação foi realizado simultaneamente (drogas aplicadas ao mesmo tempo pelo mesmo período) por 48h para as linhagens UW402 e UW473 e 72h para a linhagem ONS-76, pois valores semelhantes de IC₅₀ foram encontrados nas três linhagens, porém no tempo de 72h para ONS-76. O método quantitativo utilizado para avaliar a interação das drogas foi o índice de combinação (CI, do inglês *combination index*), com base no método de Chou-Talalay (1977). A equação de CI determina o efeito da combinação sendo que CI=1 indica um efeito aditivo, CI<1 indica um efeito sinérgico e CI>1 indica um efeito antagônico. O índice de redução de dose (DRI, do inglês *dose reduction index*) indica, em uma combinação sinérgica, quanto de cada droga pode ser reduzido em um determinado ponto de combinação em comparação com as drogas isoladas para um mesmo efeito (Reynolds e Maurer, 2005). O IC₅₀, o índice de combinação e o índice de redução de dose foram calculados usando o programa Calcsyn 2.1 (Biosoft®).

O ensaio foi realizado pela análise de proliferação celular seguindo o mesmo protocolo de plaqueamento e análise (item 4.2.1). Os efeitos da combinação foram analisados por duas formas de delineamento experimental em análise pelo

programa Calcosyn 2.1 (Biosoft®). Em um primeiro momento foi realizado uma combinação de proporção fixa entre DHMEQ e as outras drogas, partindo do IC₅₀ de cada droga analisada separadamente e seguindo uma proporção constante entre os tratamentos. DHMEQ foi combinado com as drogas Cisplatina, TMZ e Etoposide no seguinte esquema:

DHMEQ (µg/mL)	Cisplatina (µM)
2,5	1,25
5,0	2,5
10,0	5,0
20,0	10,0

DHMEQ (µg/mL)	TMZ (µM)
2,5	500
5,0	1000
10,0	2000
20,0	4000

DHMEQ (µg/mL)	Etop (µM)
2,5	2
5,0	4
10,0	8
20,0	16

Posteriormente, a combinação foi de proporção não fixa, sendo fixada a dose do IC₅₀ de DHMEQ combinado com diferentes doses das outras drogas, para avaliar de maneira alternativa o poder de redução de dose que DHMEQ causa nas drogas já conhecidas.

DHMEQ (µg/mL)	Cisplatina (µM)
10	1,25
	2,5
	5,0
	10,0

DHMEQ (µg/mL)	TMZ (µM)
10	500
	1000
	2000
	4000

DHMEQ (µg/mL)	Etop (µM)
10	2
	4
	8
	16

4.4. Potencial radiosensibilizante de DHMEQ

A avaliação da combinação de DHMEQ e radiação ionizante foi realizada seguindo o mesmo protocolo do ensaio de sobrevivência clonogênica (item 4.2.4). As células plaqueadas foram pré-tratadas com 10µg/mL de DHMEQ por 48h. Após esse tempo, o meio de cultura contendo droga foi substituído por meio de cultura novo, sem droga, e as culturas foram submetidas à irradiação (radiação-γ, fonte ⁶⁰Co, aparelho Gammatron S-80, Siemens, 1,25 MeV, do HC-FMRPUSP) nas doses de 2, 4 e 6 Gy. Após a irradiação, as culturas foram incubadas de 7 a 10 dias até a formação de colônias e posteriormente fixadas com metanol e coradas com giemsa. O resultado é dado como a relação da cultura que sofreu radiação sem droga, pela

que sofreu radiação após tratamento com a droga (DER) (Tao et al., 2007). O valor de DER indica o quanto o tratamento com a droga foi mais eficaz do que a utilização somente da radiação. O ensaio de irradiação foi realizado no Departamento de Clínica Médica sob a responsabilidade do Prof. Dr Harley Francisco de Oliveira.

4.5. Ensaios moleculares

4.5.1. Extração de RNA

O mRNA foi extraído das culturas celulares utilizando o reagente Trizol LS (Invitrogen Inc, Carsdab, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, as células aderidas foram soltas pelo próprio reagente e colocadas em gelo. Foram acrescentado 200µL de clorofórmio e, após agitação, as células foram centrifugadas a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, acrescentado 500µL de isopropanol gelado e levado uma temperatura de -20°C para precipitar *overnight*. Após esse período, o material é centrifugado a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C, é descartado o sobrenadante e ao *pellet* acrescentado 1mL de álcool 75% para lavagem. Após centrifugação a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C, o *pellet* é seco em temperatura ambiente por 15 minutos e reidratado com 40µL de água DEPC.

O RNA extraído foi quantificado em espectofotômetro de microvolume (NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer, Thermoscientific) e para a síntese de cDNA foi utilizado o *kit* High Capacity (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), segundo as recomendações do fabricante.

4.5.2. Extração de proteínas

As proteínas foram extraídas de duas maneiras diferentes, dependendo da metodologia em que seriam utilizadas. Para análise da translocação de NF-κB para o núcleo foram utilizados extratos proteicos citoplasmáticos e nucleares. Para análise do efeito da inibição da translocação em outras proteínas foi utilizado extrato de proteína total.

A proteína total foi extraída com o reagente RIPA (RIPA buffer, Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de inibidor de fosfatase e 10% de inibidor de protease. As

células ressuspendidas foram lavadas com PBS e aproximadamente 30µL do reagente RIPA foram utilizados para homogeneizar o *pellet*. Após homogeneização, a solução foi mantida em gelo por pelo menos 20 minutos e então centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C. A proteína total extraída foi quantificada pela metodologia de Bradford, 1976.

Preparações de extratos proteicos nucleares e citoplasmáticos foram obtidos utilizando o kit CHEMICON®'s *Nuclear Extraction Kit*, segundo especificações do fabricante. As porções foram quantificadas sob a mesma metodologia de Bradford, 1976.

4.5.3. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

O qRT-PCR foi realizado no aparelho Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems, utilizando o corante SYBR® Green (Applied Biosystems by Life Technologies) e oligonucleotídeos iniciadores para os genes *p65*, *BCL2*, *EGFR*, *MRP1*, *LRP* e *MMP-2*. O volume final para cada reação foi de 12µL, sendo 5µL de amostra diluída (1/50), 6 µL do SYBR® Green Master Mix e, 1µL de *primer*. Foram utilizados como controle endógeno os genes *HPRT* e *Gusβ*. A quantificação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando o método $2^{\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

4.5.4. Dot blot

Alternativamente ao ensaio de expressão gênica, foi realizado o ensaio de *Dot blot* com o mesmo objetivo de visualizar o efeito da inibição de NF-κB por DHMEQ em proteínas codificadas por genes controlados por esse fator de transcrição. Foram utilizados anticorpos das proteínas MMP-2, MMP-9, LRP, MRP, HIF1α e IκBα. O ensaio foi realizado nos tempos de 24, 48 e 72h, e para as proteínas MMP-2 e MMP-9, no tempo de 24h com tratamento em meio de cultura suplementado com 1% de SBF, condição em que as metaloproteinases são ativadas em uma situação de invasão celular. A quantidade de proteína foi quantificada pela intensidade da cor de cada amostra através do programa ImageJ 1.46r e convertida em números para melhor visualização da diferença entre controle (DMSO). Quanto mais clara a

imagem, maior o valor e menor a quantidade de proteína; quanto mais escura a imagem, menor o valor e maior a quantidade de proteína.

Após procedimento de cultivo celular e tratamento, as células foram ressuspensas e lavadas com PBS para extração de proteína total conforme descrito no item 4.5.2. 50ng de proteína total extraída pelo reagente RIPA foram aplicadas em membranas de nitrocelulose, em um volume entre 2 e 8µL, fixado de acordo com normalização da amostra menos concentrada dentro de cada linhagem. Após secagem, as membranas foram incubadas em 5% de BSA dissolvido em TBS-T por 1h, em agitação. Em seguida, os anticorpos de interesse (MMP-2, MMP-9, MRP, LRP, IκBα, HIF-1α) foram diluídos na solução de TBS-T e BSA em uma concentração entre 1:250 a 1:500, e as membranas incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Após incubação, as membranas foram lavadas três vezes de 5 minutos com TBS-T. Em seguida, elas foram incubadas em anticorpo secundário (anti-mouse ou anti-rabbit) por 30 minutos em temperatura ambiente. Após retirada do anticorpo secundário, as membranas foram lavadas três vezes de 5 minutos com TBS-T, incubadas brevemente em ECL e observadas em fotodocumentador (ChemiDoc™ XRS+ System com Image Lab™ Software, Bio-Rad).

4.5.5. Western blotting

Para esta análise, extratos proteicos foram extraídos separadamente de cultura tratada com 10µg/mL em diferentes tempos (3, 6, 48 e 72h) e seu controle DMSO. Então, 80µg de cada amostra foram separadas por eletroforese SDS-PAGE (Laemmli, 1970). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e então incubadas em TBS-T 1% contendo 5% de solução bloqueadora (GE, Piscataway, NJ, EUA) por 1 hora, em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com o anticorpo primário da proteína de estudo (p65), diluído em uma proporção de 1:10000, de acordo com as instruções do fabricante (RabMAbs - ABCAM). As membranas foram então lavadas três vezes (10 minutos cada) com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário *Goat Polyclonal Secondary Antibody to Rabbit IgG - H&L (HRP)* (ABCAm) (1:2000 em TBS-T) por 1 hora em temperatura ambiente e lavada três vezes (10 minutos cada) com TBS-T. O anticorpo secundário foi visualizado através da utilização do *ECL™ Western blotting Analysis System* (Amersham GE

Healthcare) e a membrana observada diretamente em fotodocumentador (ChemiDoc™ XRS+ System com Image Lab™ Software, Bio-Rad).

4.5.6. Imunofluorescência

Foram semeadas 200 mil células em lamínulas esterilizadas (flambadas) depositadas no fundo de placas de seis poços. Após tempo de aderência (24h), a cultura foi tratada com 10µg/mL de DHMEQ e seu controle (DMSO), nos tempos de 1, 3, 6 e 24h. Concomitantemente, o mesmo par de tratamentos e controle de cada linhagem foi tratado com 10ng/mL de TNFα junto com DHMEQ ou DMSO, com o objetivo de aumentar a quantidade do fator de transcrição ativo na célula. Ao fim de cada tratamento, as células foram fixadas com paraformaldeído 2%, lavadas com PBS e foi seguido um protocolo contendo os seguintes passos, resumidamente: PBS 1X - Glicina 0,1M; PBS 1X-Triton (0,3%), PBS 1X- BSA 1%; incubar com anticorpo primário diluído em PBS 1X-BSA 1% por 1 hora (temperatura ambiente); incubar com anticorpo secundário em tampão PBS 1X-BSA 1% por 1 hora (temperatura ambiente, ao abrigo da luz); ao final, acrescentar 20µL de DAPI (diluição 1:80000) sobre a lamínula, montá-la invertida em uma lâmina de vidro e selar. As lâminas foram fotografadas em dois filtros (*Red Filter Set* e *Dapi Filter Set* ou *Blue Filter Set*) em microscópio de fluorescência (Nikon), e as fotos foram sobrepostas para análise.

4.6. Análise estatística

Para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre controle e tratado foi utilizado o software estatístico SigmaStat 3.5. Os ensaios funcionais foram avaliados pelo teste de Análise de Variância – ANOVA, seguido do pós-teste para tratamentos pareados de Holm-Sidak (Holm, S., 1979). Foi determinado um valor de p menor que 0,05 para definir nível de significância estatística.

A natureza da interação entre as drogas foi calculada pelo método de Chou-Talalay para determinar a taxa de combinação usando o programa Calcosyn (Chou e Talalay, 1984). Baseado nisto, valores de combinação <0.9 são considerados sinérgicos, >1.1 são antagonistas, e entre 0,9 e 1,1 são aditivos.

5. Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Proliferação celular

A proliferação celular descontrolada constitui uma característica marcante em tumores agressivos. As análises de variância (ANOVA $p < 0,05$) em todos os tempos, evidenciaram a existência de diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. Nas análises pareadas (Holm-Sidak $p < 0,05$) observou-se que houve diferença estatisticamente significativa nos tratamentos de 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ no tempo de 24 horas para as linhagens UW402 e UW473. Nos tempos de 48 e 72h, houve significância a partir do tratamento de 5 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem UW402 e 7,5 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem UW473, quando comparados ao DMSO. Para a linhagem ONS-76, houve diferença estatisticamente significativa em todas as doses e tempos de tratamento.

A droga causou uma inibição de cerca de 80 e 70% para as linhagens UW402 e UW473, respectivamente, na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, na média entre os três tempos. Na linhagem ONS76 a droga causou uma inibição de cerca de 60% na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, na média entre os três tempos. Os resultados do ensaio de proliferação celular nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76 tratadas com DHMEQ está ilustrado nas figuras 1, 2 e 3, respectivamente.

Figura 1: Proliferação celular na linhagem UW402. O ensaio foi realizado nos tempos de 24, 48 e 72 horas, nas dosagens de 2,5; 5; 7,5; 10 e 20µg/mL. A altura as barras indicam a porcentagem de proliferação. O (*) indica as doses estatisticamente significantes ($p < 0,05$) dentro de cada tempo comparadas com o DMSO.

Figura 2: Proliferação celular na linhagem UW473. O ensaio foi realizado nos tempos de 24, 48 e 72 horas, nas dosagens de 2,5; 5; 7,5; 10 e 20µg/mL. A altura as barras indicam a porcentagem de proliferação. O (*) indica as doses estatisticamente significantes ($p < 0,05$) dentro de cada tempo, comparadas com o DMSO.

Figura 3: Proliferação celular na linhagem ONS-76. O ensaio foi realizado nos tempos de 24, 48 e 72 horas, nas dosagens de 2,5; 5; 7,5; 10 e 20µg/mL. A altura as barras indicam a porcentagem de proliferação relativa ao DMSO. O (*) indica as doses estatisticamente significantes ($p < 0,05$) dentro de cada tempo, comparadas com o DMSO.

No cálculo do IC_{50} , o valor do coeficiente de relação linear R foi acima de 0,99 para os três tempos, nas três linhagens (recomendado $> 0,90$). Os valores de IC_{50} são apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Valores de IC_{50} em µg/mL para as linhagens UW402, UW473 e ONS-76, nos tempos de 24, 48 e 72h.

	24h	48h	72h
UW402	14,377	9,940	8,366
UW473	47,280	11,672	12,746
ONS76	21,823	11,646	11,528

5.2. Curva de crescimento

A diminuição da multiplicação das células tumorais é uns dos principais objetivos no tratamento contra o câncer. Neste ensaio que complementa o ensaio de proliferação celular, o crescimento celular apresentou-se nulo em relação ao número

inicial de células (~30000 células/mL para a linhagem UW402, ~26500 células/mL para a linhagem UW473 e ~33000 células/mL para a linhagem ONS-76) de modo tempo dependente nas linhagens UW402 e UW473 somente na concentração de 20µg/mL e na linhagem ONS-76 a partir da dose 5,0µg/mL, com menor crescimento celular nas maiores doses (Figuras 4, 5 e 6). A linhagem ONS-76 apresentou um crescimento muito mais acentuado, evidenciado pela diferença nas escalas dos gráficos.

Figura 4: Curva de crescimento celular da linhagem UW402 nos diferentes tratamentos e tempos. O eixo X apresenta os tempos dos tratamentos e o eixo Y o número de células por mL.

Figura 5: Curva de crescimento celular da linhagem UW473 nos diferentes tratamentos e tempos. O eixo X apresenta os tempos dos tratamentos e o eixo Y o número de células por mL.

Figura 6: Curva de crescimento celular da linhagem ONS-76 nos diferentes tratamentos e tempos. O eixo X apresenta os tempos dos tratamentos e o eixo Y o número de células por mL.

5.3. Apoptose

A apoptose é o processo pelo qual células ativadas passam por um programa de suicídio que resulta em morte celular individual. Anormalidades no controle da apoptose desempenham um papel importante na tumorigênese (Sato et al., 2006). A análise por ANOVA apontou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Na análise pareada de Holm Sidak, houve diferença estatisticamente significativa para as doses de 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$ na linhagem UW402, para as doses 10, 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$ na linhagem UW473 e, nas doses de 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$ na linhagem ONS-76, todas comparadas ao DMSO. A concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ de DHMEQ elevou para aproximadamente 50% de apoptose na linhagem UW402, 17% na linhagem UW473 e 31% para a linhagem ONS-76, após 48h de tratamento. (Figura 7).

Figura 7: Porcentagem de apoptose por Anexina V e FITC nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76. Foram consideradas células marcadas com Anexina e células marcadas com Anexina e iodeto de propídeo. O ensaio foi realizado com tratamento de 48 horas, nas dosagens de 2,5; 5; 10; 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$. O (*) indica as doses estatisticamente significantes ($p < 0,05$) comparadas com o DMSO.

5.4. Capacidade clonogênica

O ensaio de capacidade clonogênica é um ensaio de sobrevivência celular *in vitro* baseada na capacidade de uma única célula proliferar e formar uma colônia. Os resultados foram analisados utilizando a frações de sobrevivida (FS). Encontrou-se que a capacidade de formar colônias tende a diminuir com aumento da concentração da droga, mostrando-se estatisticamente significativo nas doses de 10 e de 20 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem UW402; 7,5; 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ para UW473 e; nas doses de 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem ONS76 (Figura 8). Nenhuma colônia foi observada no tratamento de 20 $\mu\text{g/mL}$ na linhagem ONS-76 e o tratamento de 7,5 $\mu\text{g/mL}$ não foi realizado para esta linhagem.

Figura 8: Fração de sobrevivida no ensaio de capacidade clonogênica nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76. O ensaio foi realizado com tratamento de 48 horas, nas dosagens de 2,5; 5; 7,5 (exceto ONS-76), 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$. Foram consideradas colônias contendo no mínimo 50 células. O (*) indica as doses estatisticamente significantes ($p < 0,05$) comparadas com o DMSO.

5.5. Migração

O ensaio de migração é um método simples que mimetiza a migração *in vivo*. A análise por ANOVA apontou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Na análise pareada de Holm Sidak com o DMSO foram observadas diferenças significativas nas concentrações 7,5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ na linhagem UW402 (Figura 9). Para as linhagens UW473 e ONS-76, a mesma análise estatística apontou diferença significativa para todos os tratamentos (Figura 9). Nas três linhagens houve diferença significativa entre o controle (DMSO), onde as células migraram livremente sem influência da droga, e T0 (tempo zero), onde não houve migração, pois as células foram fixadas logo após a confecção da fissura na cultura. Não há diferença estatisticamente significativa entre o tratamento de 10 $\mu\text{g/mL}$ e o controle T0, indicando que o nível de migração entre eles é semelhante. Na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ não foi possível avaliar o ensaio para as três linhagens, pois as células morreram devido ao tratamento e a falta de SBF.

Figura 9: Análise da migração celular nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76. O ensaio foi realizado com tratamento de 24 horas, nas doses de 2,5; 5; 7,5; 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ com meio de cultura suplementado com 1% de soro. O (*) indica as doses estatisticamente significantes ($p < 0,05$) comparadas com o DMSO, e T0 é o tempo zero, onde não houve migração.

5.6. Invasão

Os resultados do ensaio de invasão mostram diminuição da capacidade das células invadirem um novo ambiente após ultrapassar uma membrana de matrigel. A análise estatística por ANOVA apontou diferença significativa ($p < 0,05$) para as três linhagens e a análise pareada de Holm Sidak com o DMSO foram observadas diferenças significativas em todas as concentrações para a linhagem UW402 e ONS-76 (2,5; 5; 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) e nas concentrações de 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem UW473 (Figura 10).

Figura 10: Ensaio de invasão nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76 no tempo de 24h, nas doses de 2,5; 5; 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$, com meio de cultura suplementado com 1% de soro. A altura das barras representa o número de células que transpassou a barreira de matrigel e invadiu o outro lado da membrana. O (*) mostra as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparadas ao DMSO.

5.7. Ciclo celular

Análise do ciclo celular é um método em biologia celular que emprega citometria de fluxo para distinguir células em diferentes fases do ciclo celular. Anomalias do ciclo celular podem ser evidência de vários tipos de danos celulares

que levam a célula a interromper o ciclo celular em *checkpoints* para evitar possíveis transformações em uma célula de câncer (carcinogênese).

O resultado foi pouco esclarecedor em relação a ação de DHMEQ no ciclo celular. Há uma leve tendência a diminuição da porcentagem de células em G1 e aumento da porcentagem das células em G2 para a linhagem UW473 (Figura 12). Na linhagem UW402 não é possível observar o mesmo, e quase não há alteração do ciclo celular ao longo do tempo e das doses (Figura 11). Na linhagem ONS-76, há um discreto aumento da porcentagem de células em S na maior dose de DHMEQ nos tempos de 72, 96 e 120h (Figura 13).

A análise pareada de Holm Sidak apontou diferenças significativas ($p < 0,05$) para alguns tratamentos comparados com o DMSO, dentro dos diferentes tempos, apontados pelo (*) nas figuras.

Figura 11: Ciclo celular da linhagem UW402 nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120h, nos tratamentos de 2,5; 5; 7,5; 10 e 20µg/mL de DHMEQ. A altura das barras representa a porcentagem de células em diferentes fases do ciclo celular (G1, S e G2). O (*) mostra as diferenças estatisticamente significativas comparados ao DMSO, em cada fase do ciclo celular.

Figura 12: Ciclo celular da linhagem UW473 nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120h, nos tratamentos de 2,5; 5; 7,5; 10 e 20µg/mL de DHMEQ. A altura das barras representa a porcentagem de células em diferentes fases do ciclo celular (G1, S e G2). O (*) mostra as diferenças estatisticamente significativas comparados ao DMSO, em cada fase do ciclo celular.

Figura 13: Ciclo celular da linhagem ONS-76 nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120h, nos tratamentos de 2,5; 5; 7,5; 10 e 20µg/mL de DHMEQ. A altura das barras representa a porcentagem de células em diferentes fases do ciclo celular (G1, S e G2). O (*) mostra as diferenças estatisticamente significativas comparados ao DMSO, em cada fase do ciclo celular.

5.8. Índice Mitótico

O ensaio de índice mitótico avalia o número de células em mitose através da observação de metáfases, em uma preparação citogenética. As figuras 14 e 15 apresentam a porcentagem de células em metáfase nos tempos de 24, 48 e 72h, em diferentes tratamentos com DHMEQ, para as linhagens UW402, UW473 e ONS-76. A linhagem UW402 alcançou um máximo de 2% de metáfases no tratamento de 5µg/mL no tempo de 24h, enquanto que a linhagem UW473 alcançou no máximo 0,8% de metáfases no tratamento de 10µg/mL no mesmo tempo. Devido à baixa ocorrência de metáfases, não foi realizada a análise estatística. Não foram observadas metáfases na linhagem ONS-76.

Figura 14: Índice mitótico da linhagem UW402 nos tempo de 24, 48 e 72h, em diferentes tratamentos. A altura das barras representa a porcentagem de metáfases observadas.

Figura 15: Índice mitótico da linhagem UW473 nos tempo de 24, 48 e 72h, em diferentes tratamentos. A altura das barras representa a porcentagem de metáfases observadas.

5.9. Combinação de drogas

A combinação de drogas é um dos tratamentos mais amplamente utilizados para tratar doenças como o câncer. O principal objetivo é atingir efeitos sinérgicos com menor toxicidade, para atrasar ou minimizar a indução de resistência à droga (Chou, 2010).

5.9.1. DHMEQ + cisplatina

O índice da combinação de DHMEQ e Cisplatina indicou efeito predominantemente aditivo (CI entre 0,9 e 1,1) para as linhagens UW402 e UW473 em todos os pontos de combinação (exceto o ponto de 20µg/mL de DHMEQ com 10µM de Cisplatina na linhagem UW473, que apresentou CI de 1,199 que indica leve antagonismo). Para a linhagem ONS-76 o índice de combinação indicou efeito antagônico (CI > 1,5) em doses mais baixas, porém um efeito aditivo (CI entre 0,9 e 1,1) na dose mais alta de ambas as drogas.

O índice de redução de dose de cisplatina variou de 2,3 a 4,4 para as linhagens UW402 e UW473. Na linhagem ONS-76 o índice de redução de dose de cisplatina foi ao redor 0,6 nas doses mais baixas, mas alcançou 2,1 na dose mais

alta das drogas, indicando o quanto desta droga pode ser reduzido quando combinada com DHMEQ.

Os números de 1 a 5 no eixo X das figuras 16, 17 e 18 se referem às seguintes doses de cada droga:

Esquema de combinações		
	DHMEQ ($\mu\text{g/mL}$)	Cis (μM)
1	DMSO	Sol. Salina
2	2,5	1,25
3	5,0	2,5
4	10,0	5,0
5	20,0	10,0

Figura 16: Combinação simultânea com proporção constante das drogas DHMEQ e Cisplatina na UW402 no tempo de 48h. Os números de 1 a 5 no eixo X indicam a combinação de doses das drogas utilizadas.

Figura 17: Combinação simultânea com proporção constante das drogas DHMEQ e Cisplatina na UW473 no tempo de 48h. Os números de 1 a 5 no eixo X indicam a combinação de doses das drogas utilizadas.

Figura 18: Combinação simultânea com proporção fixa das drogas DHMEQ e Cisplatina na linhagem ONS-76 no tempo de 72h. Os números de 1 a 5 no eixo X indicam a combinação de doses das drogas utilizadas.

A tabela 2 apresenta de forma integral as doses das drogas, a fração de células afetadas pelo tratamento, o índice de combinação e o de redução de dose das duas drogas, para os três linhagens.

Tabela 2: Combinação de proporção fixa de DHMEQ e CDDP. Fa (fração afetada), CI (índice de combinação) e DRI (índice de combinação de dose) para os diferentes pontos de combinação de DHMEQ (2,5; 5,0; 10 e 20µg/mL) e Cisplatina (1,25; 2,5; 5,0 e 10µM) nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76. CI=1 indica efeito aditivo, CI<1 indica efeito sinérgico e CI>1 indica efeito antagônico.

	DHMEQ (µg/mL)	CDDP (µM)	Fa	CI	DRI CDDP	DRI DHMEQ
UW402	2,5	1,25	0,272	0,977	3,398	1,466
	5	2,5	0,390	1,100	2,926	1,319
	10	5	0,552	1,096	2,831	1,346
	20	10	0,726	0,966	3,081	1,559
UW473	2,5	1,25	0,342	1,096	4,451	1,147
	5	2,5	0,506	1,077	3,680	1,242
	10	5	0,689	0,973	3,267	1,500
	20	10	0,782	1,199	2,334	1,297
ONS-76	5	2,5	0,2552	2,337	0,611	1,430
	10	5	0,4296	2,381	0,647	1,197
	20	10	0,8461	0,919	2,157	2,195

5.9.2. Combinação DHMEQ + TMZ

Na combinação de DHMEQ com TMZ, na linhagem UW402 o índice de combinação variou de antagonista (CI=1,5) no ponto de menor dose de ambas as drogas, para sinérgica (CI=0,62) no ponto de 5µg/mL de DHMEQ e 1000µM de TMZ, levando a um índice de redução de dose de 2,1. Para linhagem UW473, todos os pontos de combinação foram sinérgicos, indicando um índice de redução de dose de TMZ de até 37 vezes com a combinação de 2,5µg/mL de DHMEQ. O CI da combinação entre DHMEQ e TMZ na linhagem ONS-76 variou de 0,9 a 1,2 de forma crescente com o aumento das doses, se mostrando, portanto, uma combinação quase aditiva (CI entre 0,9 e 1,1), com tendência ao antagonismo com o aumento das doses, e o índice de redução de dose variou de 1,5 a 1,7 para a droga TMZ.

Os números de 1 a 6 no eixo X das figuras 19, 20 e 21 se referem às seguintes doses de cada droga:

Esquema de combinações		
	DHMEQ ($\mu\text{g/mL}$)	TMZ (μM)
1	Controle (meio de cultura)	
2	DMSO	DMSO
3	2,5	500
4	5,0	1000
5	10,0	2000
6	20,0	4000

Figura 19: Combinação simultânea com proporção constante das drogas DHMEQ e TMZ na UW402 no tempo de 48h. Os números de 1 a 6 no eixo X indicam a combinação de doses das drogas utilizadas.

Figura 20: Combinação simultânea com proporção constante das drogas DHMEQ e TMZ na UW473 no tempo de 48h. Os números de 1 a 6 no eixo X indicam a combinação de doses das drogas utilizadas.

Figura 21: Combinação simultânea com proporção fixa das drogas DHMEQ e TMZ na linhagem ONS-76 no tempo de 72h. Os números de 1 a 6 no eixo X indicam a combinação de doses das drogas utilizadas.

A tabela 3 apresenta de forma integral as doses das drogas, a fração de células afetadas pelo tratamento, o índice de combinação e o de redução de dose das duas drogas, para os quatro pontos utilizados para a construção da curva dose-efeito.

Tabela 3: Combinação de proporção fixa de DHMEQ e TMZ. Fa (fração afetada), CI (índice de combinação) e DRI (índice de combinação de dose) para os diferentes pontos de combinação de DHMEQ (2,5; 5,0; 10 e 20µg/mL) e Cisplatina (500; 1000; 2000 e 4000µM) nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76. CI=1 indica efeito aditivo, CI<1 indica efeito sinérgico e CI>1 indica efeito antagônico.

	DHMEQ (µg/mL)	TMZ (µM)	Fa	CI	DRI TMZ	DRI DHMEQ
UW402	2,5	500	0,122	1,537	1,040	1,739
	5	1000	0,236	0,619	2,142	6,596
	20	4000	0,391	0,597	1,984	10,747
UW473	2,5	500	0,612	0,242	37,242	4,657
	10	2000	0,738	0,427	20,111	2,653
	20	4000	0,762	0,712	11,923	1,592
ONS76	2,5	500	0,3152	0,926	1,569	3,470
	5	1000	0,4557	1,005	1,626	2,565
	10	2000	0,5752	1,253	1,462	1,756
	20	4000	0,7343	1,287	1,745	1,400

5.9.3. Combinação DHMEQ + Etoposide

O CI da combinação entre DHMEQ e Etoposide foi sinérgica em todos os pontos para as três linhagens, com DRI do Etoposide chegando a 51 para a linhagem UW402, 16 para a linhagem UW473 e 87 na linhagem ONS-76, na dose mais alta das drogas.

Os números de 1 a 5 no eixo X das figuras 22, 23 e 24 se referem às seguintes doses de cada droga:

Esquema de combinações		
	DHMEQ (µg/mL)	Etop (µM)
1	DMSO	DMSO
2	2,5	2
3	5,0	4
4	10,0	8
5	20,0	16

Figura 22: Combinação simultânea com proporção constante das drogas DHMEQ e Etoposide na linhagem UW402 no tempo de 48h. Os números de 1 a 5 no eixo X indicam a combinação de doses das drogas utilizadas.

Figura 23: Combinação simultânea com proporção constante das drogas DHMEQ e Etoposide na linhagem UW473 no tempo de 48h. Os números de 1 a 5 no eixo X indicam a combinação de doses das drogas utilizadas.

Figura 24: Combinação simultânea com proporção constante das drogas DHMEQ e Etoposide na linhagem ONS-76 no tempo de 72h. Os números de 1 a 5 no eixo X indicam a combinação de doses das drogas utilizadas.

A tabela 4 apresenta de forma integral as doses das drogas, a fração de células afetadas pelo tratamento, o índice de combinação e o de redução de dose das duas drogas, para os pontos utilizados para a construção da curva dose-efeito de cada linhagem.

Tabela 4: Combinação de proporção fixa de DHMEQ e ETOP. Fa (fração afetada), CI (índice de combinação) e DRI (índice de combinação de dose) para os diferentes pontos de combinação de DHMEQ (2,5; 5,0; 10 e 20 μ g/mL) e Etoposide (2; 4; 8 e 16 μ M) nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76. CI=1 indica efeito aditivo, CI<1 indica efeito sinérgico e CI>1 indica efeito antagônico.

	DHMEQ (μ g/mL)	Etop (μ M)	Fa	CI	DRI ETOP	DRI DHMEQ
UW402	2,5	2	0,4534	0,497	2,725	7,715
	5	4	0,5265	0,404	4,890	5,003
	10	8	0,6908	0,235	51,292	4,647
UW473	2,5	2	0,4689	0,503	2,964	6,042
	5	4	0,5654	0,404	6,590	3,969
	10	8	0,6585	0,449	14,970	2,618
ONS-76	2,5	2	0,4063	0,687	2,150	4,497
	5	4	0,5141	0,589	3,937	2,989
	10	8	0,7143	0,420	25,571	2,622
	20	16	0,8263	0,512	87,003	1,997

5.9.4. Combinação de proporção não fixa: 10µg/mL de DHMEQ + Cisplatina

O IC₅₀ de DHMEQ (10µg/mL) foi combinado com diferentes doses de Cisplatina por 48h para as linhagens UW402 e UW473 e 72h para a linhagem ONS-76.

A combinação de proporção não fixa para a linhagem UW402 variou de sinérgica na menor dose de Cisplatina (1,25µM) com o maior índice de redução de dose (4,063), até uma combinação antagônica na maior dose de cisplatina (10µM), com um índice de redução de dose de 0,91. Para a linhagem UW473 a combinação foi antagônica em todas as concentrações de Cisplatina e índice de redução de dose entre 1,1 e 2,3. E na linhagem ONS-76 a combinação de Cisplatina com 10µg/mL de DHMEQ foi sinérgica em todas as doses, com índice de redução dose de até 10,5 na dose mais baixa de Cisplatina.

A tabela 5 apresenta de forma integral as doses das drogas, a fração de células afetadas pelo tratamento, o índice de combinação e o de redução de dose das duas drogas, para os pontos utilizados para a análise.

Tabela 5: Combinação de proporção não fixa de DHMEQ e CDDP. Fa (fração afetada), CI (índice de combinação) e DRI (índice de combinação de dose) para os diferentes pontos de combinação de DHMEQ (2,5; 5,0; 10 e 20µg/mL) e Cisplatina (1,25; 2,5; 5,0 e 10µM) nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76. CI=1 indica efeito aditivo, CI<1 indica efeito sinérgico e CI>1 indica efeito antagônico.

	DHMEQ (µg/mL)	CDDP (µM)	Fa	CI	DRI CDDP	DRI DHMEQ
UW402	10	1,25	0,4879	0,806	4,063	1,785
		2,5	0,5797	0,731	3,042	2,489
		5	0,6368	0,830	1,977	3,088
		10	0,6191	1,446	0,910	2,885
UW473	10	1,25	0,4506	1,283	1,924	1,309
		2,5	0,5716	1,136	1,676	1,854
		10	0,6250	2,312	0,540	2,173
ONS76	10	1,25	0,7671	0,316	10,585	4,516
		2,5	0,7713	0,402	5,413	4,614
		10	0,8058	0,786	1,649	5,574

5.9.5. Combinação de proporção não fixa: 10µg/mL de DHMEQ + TMZ

O IC₅₀ de DHMEQ (10µg/mL) foi combinado com diferentes doses de TMZ por 48h para as linhagens UW402 e UW473 e 72h para a linhagem ONS-76.

A combinação de proporção não fixa para a linhagem UW402 foi sinérgica em todas as doses de TMZ em combinação com 10µg/mL de DHMEQ. O índice de redução de dose foi de até 11,9 na menor dose de TMZ (500µM). Para a linhagem UW473, a combinação foi predominantemente sinérgica, com índice de redução de dose de até 3,7 na menor dose de TMZ. Na linhagem ONS-76 a combinação também foi predominantemente sinérgica, com índice de redução de dose de 6,3 também na menor dose de TMZ.

A tabela 6 apresenta de forma integral as doses das drogas, a fração de células afetadas pelo tratamento, o índice de combinação e o de redução de dose das duas drogas, para os pontos utilizados para a análise.

Tabela 6: Combinação de proporção não fixa de DHMEQ e TMZ. Fa (fração afetada), CI (índice de combinação) e DRI (índice de combinação de dose) para os diferentes pontos de combinação de DHMEQ (2,5; 5,0; 10 e 20µg/mL) e TMZ (500; 1000; 2000 e 4000µM) nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76. CI=1 indica efeito aditivo, CI<1 indica efeito sinérgico e CI>1 indica efeito antagônico.

	DHMEQ (µg/mL)	TMZ (µM)	Fa	CI	DRI TMZ	DRI DHMEQ
UW402	10	500	0,6245	0,132	11,987	20,391
		1000	0,6497	0,188	6,864	23,674
		2000	0,6609	0,313	3,651	25,340
UW473	10	500	0,6688	0,457	3,763	5,230
		1000	0,6831	0,675	2,023	5,530
		2000	0,7023	1,061	1,119	5,975
ONS76	10	500	0,5904	0,630	6,312	2,122
		1000	0,6058	0,738	3,412	2,250
		2000	0,6397	0,881	2,035	2,567
		4000	0,6893	1,067	1,335	3,146

5.9.6. Combinação de proporção não fixa: 10µg/mL de DHMEQ + Etoposide

O IC₅₀ de DHMEQ (10µg/mL) foi combinado com diferentes doses de Etoposide por 48h para as linhagens UW402 e UW473 e 72h para a linhagem ONS-76.

A combinação de Etoposide com 10µg/mL de DHMEQ foi parcialmente sinérgica nas doses mais baixas de Etoposide na linhagem UW402, com índice de redução de dose de 2,5, e parcialmente antagônica nas doses mais altas da droga. Na linhagem UW473 a combinação foi antagônica em todas as doses, com índice de combinação de no máximo 1,3. Para a linhagem ONS-76 a combinação foi fortemente sinérgica, e o índice de redução de dose alcançou 220 na menor dose de Etoposide.

A tabela 7 apresenta de forma integral as doses das drogas, a fração de células afetadas pelo tratamento, o índice de combinação e o de redução de dose das duas drogas, para os pontos utilizados para a análise.

Tabela 7: Combinação de proporção não fixa de DHMEQ e ETOP. Fa (fração afetada), CI (índice de combinação) e DRI (índice de combinação de dose) para os diferentes pontos de combinação de DHMEQ (2,5; 5,0; 10 e 20µg/mL) e Etoposide (2; 4; 8 e 16µM) nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76. CI=1 indica efeito aditivo, CI<1 indica efeito sinérgico e CI>1 indica efeito antagônico.

	DHMEQ (µg/mL)	ETOP (µM)	Fa	CI	DRI ETOP	DRI DHMEQ
UW402	10	2	0,4526	0,892	2,686	1,923
		4	0,4886	0,853	2,526	2,187
		8	0,4999	1,090	1,537	2,276
		16	0,5035	1,654	0,819	2,306
UW473	10	2	0,4171	1,524	1,322	1,303
		4	0,4383	1,806	0,923	1,385
		8	0,4932	1,545	1,079	1,618
		16	0,4952	2,414	0,556	1,627
ONS76	10	2	0,7638	0,230	220,308	4,441
		8	0,7693	0,236	60,247	4,566
		16	0,7853	0,226	39,742	4,969

5.10. Radiossensibilização de DHMEQ

Para verificar o potencial radiossensibilizante de DHMEQ, foi realizado o ensaio de capacidade clonogênica, devido ao tipo de dano que a radiação provoca nas células, afetando sua capacidade de se replicar e a integridade desta replicação a longo prazo. As células que sobrevivem ao tratamento e mantêm a integridade reprodutiva *in vitro* são chamadas clonogênicas, e podem ser visualizadas formando colônias após um maior tempo de incubação.

Após 48h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ as células foram irradiadas com radiação-γ em diferentes doses e houve significativa redução da capacidade clonogênica nas três linhagens. Os valores de DER estão apresentados na tabela 8 e indicam o quanto o tratamento com a droga foi mais eficaz do que a utilização somente da radiação.

Tabela 8: DHMEQ e radiação. Valores de DER nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76 nas doses de 2, 4 e 6Gy após tratamento com 10µg/mL de DHMEQ por 48h. *DER= radiação/radiação + DHMEQ

	DER*		
	UW402	UW473	ONS-76
2Gy	1,71	1,22	16,8
4Gy	1,97	1,36	76,4
6Gy	2,68	1,48	625

5.11. Expressão gênica

O fator de transcrição NFκB, molécula alvo da droga DHMEQ, controla um grande número de genes relacionados a diferentes processos celulares, e muitos desses genes estão ligados ao processo carcinogênico. Os genes escolhidos para serem analisados foram *p65*, *MRP1*, *LRP*, *EGFR*, *MMP-2*, baseados na descrição da literatura por serem alvo de NF-κB, já descritos em trabalhos de MB e por terem papel importante em diversos processos celulares. A expressão de cada gene após o tratamento foi comparada a expressão sem o tratamento, com o veículo DMSO, no mesmo tempo.

Diversos testes foram realizados para a escolha do melhor tempo de visualização do efeito da inibição de NF- κ B sob a expressão de genes por ele controlado. Porém, após várias repetições, o ensaio não se mostrou reprodutível, mesmo realizado nas mesmas condições, gerando resultados desencontrados e não confiáveis, com desvios padrão inaceitáveis. As figuras 25, 26 e 27 mostram os resultados em 6 e 12h de tratamento, nas três linhagens.

Figura 25: Expressão dos genes *p65*, *MRP1*, *LRP*, *EGFR* e *MMP-2* na linhagem UW402, em 6 e 12 horas de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ. A altura as barras indicam a quantificação da expressão gênica em relação ao controle DMSO.

Figura 26: Expressão dos genes *p65*, *MRP1*, *LRP*, *EGFR* e *MMP-2* na linhagem UW473, em 6 e 12 horas de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ. A altura as barras indicam a quantificação da expressão gênica em relação ao controle DMSO.

Figura 27: Expressão dos genes *p65*, *MRP1*, *LRP*, *EGFR* e *MMP-2* na linhagem ONS-76, em 6 e 12 horas de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ. A altura as barras indicam a quantificação da expressão gênica em relação ao controle DMSO.

5.12. Dot blot

A quantidade de proteína foi analisada pela intensidade da cor de cada amostra e convertida em números para melhor visualização da diferença entre controle (DMSO), a esquerda, e tratado, a direita. Quanto mais clara a imagem, maior o valor e menor a quantidade de proteína; quanto mais escura a imagem, menor o valor e maior a quantidade de proteína.

Para o gene HIF1 α houve uma discreta diminuição da quantidade de proteínas na linhagem UW402 no tempo de 48h e na linhagem UW473 no tempo de 24h. Na linhagem ONS-76 parece ter havido aumento dessa proteína com o tratamento, nos tempos de 24 e 48h (Figura 28).

HIF1 α				
	UW402	UW473	ONS-76	
24h	58,45 50,00	28,20 55,00	133,33 53,00	
48h	54,50 109,85	81,56 75,58	159,65 84,68	
72h	104,37 95,54	92,52 92,08	132,37 122,0	

Figura 28: Análise da quantidade da proteína HIF1 α nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76, nos tempos de 24, 48 e 72h de tratamento com 10 μ g/mL de DHMEQ. Em cada figura, a marca da esquerda representa o controle (DMSO) e, da direita o tratado. Os números abaixo de cada imagem dimensionam a diferença de coloração entre tratado e controle.

Para a proteína I κ B α houve uma discreta diminuição da quantidade de proteínas na linhagem UW402 no tempo de 24h e um aumento da mesma no tempo

de 72h. Na linhagem UW473 é possível observar uma diminuição no tempo de 24h e um aumento no tempo de 48h. Na linhagem ONS-76 nenhuma diminuição foi evidente nos três tempos e parece ter havido aumento dessa proteína com o tratamento de 48h (Figura 29).

I κ B α			
	UW402	UW473	ONS-76
24h	 8,29 49,55	 15,71 43,22	 44,88 53,35
48h	 31,28 34,58	 33,95 15,39	 98,43 62,03
72h	 56,39 6,07	 9,11 4,46	 69,71 71,46

Figura 29: Análise da quantidade da proteína I κ B α nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76, nos tempos de 24, 48 e 72h de tratamento com 10 μ g/mL de DHMEQ. Em cada figura, a marca da esquerda representa o controle (DMSO) e, da direita o tratado. Os números abaixo de cada imagem dimensionam a diferença de coloração entre tratado e controle.

Para a proteína LRP, os números que quantificam as cores mostram uma diminuição na quantidade de proteínas na linhagem UW402 com 48h de tratamento e na linhagem UW473 com 72h de tratamento. Na linhagem ONS-76 a diminuição observada no tempo de 72h é discreta, além de um pequeno aumento nos tempos de 24 e 48h (Figura 30).

LRP			
	UW402	UW473	NOS-76
24h	138,43 118,72	71,97 55,53	69,42 56,34
48h	9,04 28,15	46,59 44,44	97,26 65,29
72h	125,79 152,61	118,03 154,72	162,34 174,29

Figura 30: Análise da quantidade da proteína LRP nas linhagens UW402, UW473 e NOS-76, nos tempos de 24, 48 e 72h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ. Em cada figura, a marca da esquerda representa o controle (DMSO) e, da direita o tratado. Os números abaixo de cada imagem dimensionam a diferença de coloração entre tratado e controle.

Para a proteína MRP houve diminuição da quantidade de proteína na linhagem UW402 no tempo de 72h e na linhagem NOS-76 no tempo de 48h. Na linhagem UW473 no tempo de 48h e NOS-76 no tempo de 24h é possível observar um aumento na quantidade de proteína após o tratamento (Figura 31).

MRP			
	UW402	UW473	ONS-76
24h	61,07 61,42	24,44 42,20	17,66 5,33
48h	94,98 99,29	55,82 14,61	9,19 69,80
72h	4,38 38,79	3,58 14,98	76,26 88,59

Figura 31: Análise da quantidade da proteína MRP nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76, nos tempos de 24, 48 e 72h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ. Em cada figura, a marca da esquerda representa o controle (DMSO) e, da direita o tratado. Os números abaixo de cada imagem dimensionam a diferença de coloração entre tratado e controle.

Para as proteínas MMP-2 e MMP-9, analisadas sob condição de meio suplementado com 1% de SBF, houve uma discreta diminuição da primeira na linhagem ONS-76 e uma também discreta diminuição da segunda na linhagem UW402 (Figura 32).

Figura 32: Análise da quantidade das proteínas MMP-2 e MMP-9 nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76, no tempo de 24h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ em meio de cultura suplementado com 1% de SBF. Em cada figura, a marca da esquerda representa o controle (DMSO) e, da direita o tratado. Os números abaixo de cada imagem dimensionam a diferença de coloração entre tratado e controle.

5.13. Western blotting

Para a análise da inibição da translocação de NF-κB para o núcleo, foi realizado o ensaio de *western blotting*, para mensurar a quantidade da proteína (anticorpo para a porção p65 do fator de transcrição) no núcleo e citoplasma, antes e após o tratamento. Na fração nuclear das linhagens UW402 e UW473 não é possível observar diminuição de p65 no tratamento de 48 e 72h, após normalização como o endógeno (Figuras 33 e 34). O ensaio não foi realizado na linhagem ONS-76 devido a problemas de contaminação durante o experimento.

Figura 33: *Western blotting* da proteína p65 (65 kDa) e do endógeno GAPDH (37 kDa) na linhagem UW402 nos tempos de 48 e 72h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ.

Figura 34: *Western blotting* da proteína p65 (65 kDa) e do endógeno GAPDH (37 kDa) na linhagem UW473 nos tempos de 48 e 72h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ.

Após repetição do ensaio com os tempos de 3 e 6h de tratamento, não houve diferença significativa no menor tempo para ambas linhagens, e no maior tempo houve aumento de p65 para a linhagem UW473 e discreta diminuição na linhagem UW402, como observado na figura que mostra apenas a fração proteica nuclear, antes e após o tratamento com 10µg/mL de DHMEQ.

Figura 35: *Western blotting* da proteína p65 (65 kDa) e do endógeno GAPDH (37 kDa) nas linhagens UW402 e UW473 nos tempos de 3 e 6h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ.

5.14. Imunofluorescência

Como forma alternativa de evidenciar a inibição da translocação de NF-κB para o núcleo, foi realizado o ensaio de imunofluorescência, que visa a marcação do anticorpo com fluorescência e hibridização do mesmo diretamente nas células, sem a necessidade de extração proteica.

Os resultados mostraram uma marcação não homogênea entre os tratamentos e linhagens, sendo impossível atestar a eficácia do ensaio e do tratamento, especialmente pela falta de um controle positivo (Figuras 36, 37 e 38).

UW402

Figura 36: Imunofluorescência na linhagem UW402. Em azul, marcação nuclear com DAPI e em vermelho marcação pouco específica com anticorpo p65, nos tempos de 1, 3, 6 e 24h de tratamento com 10 μ g/mL de DHMEQ. A esquerda, sem tratamento com TNF α , e a direita com tratamento com TNF α .

UW473

Figura 37: Imunofluorescência na linhagem UW473. Em azul, marcação nuclear com DAPI e em vermelho marcação pouco específica com anticorpo p65, nos tempos de 1, 3, 6 e 24h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ. A esquerda, sem tratamento com TNF α , e a direita com tratamento com TNF α .

ONS-76

Figura 38: Imunofluorescência na linhagem ONS-76. Em azul, marcação nuclear com DAPI e em vermelho marcação pouco específica com anticorpo p65, nos tempos de 1, 3, 6 e 24h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ. A esquerda, sem tratamento com TNF α , e a direita com tratamento com TNF α .

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

Meduloblastoma é um tipo de câncer do sistema nervoso central comum na infância. É uma doença agressiva e invasiva e o atual conhecimento sobre a biologia do MB não fornece uma completa explicação sobre a ocorrência da doença, propriedades proliferativas, atividade migratória e resistência à quimioterapia (Spiller et al., 2011).

As melhorias na taxa de sobrevivência estão estagnadas durante a última década, e a natureza agressiva de terapias atuais muitas vezes levam a sequelas neurológicas e neurocognitivas em longo prazo. Isto faz com que se priorize a busca pelo desenvolvimento de novas terapias mais específicas para os pacientes diagnosticados com MB (Pomeroy e Cho, 2011).

Nos últimos 25 anos, o Fator Nuclear kappa B (NF- κ B) tem sido descrito e caracterizado em diversos modelos normais e patológicos, envolvido na resposta imune, crescimento celular, morte celular por apoptose, adesão e angiogênese (Beinke e Ley, 2004).

Dehidroximetilepoxiquinomicina (DHMEQ) é uma pequena molécula recentemente sintetizada, que inibe o NF- κ B ligando-se diretamente aos componentes da via canônica e não-canônica do fator de transcrição para impedir sua ligação com o DNA, inibindo sua translocação para o núcleo (Fukushima et al., 2012). Várias moléculas visando à via do NF- κ B em diferentes pontos da cascata de sinalização foram desenvolvidas. Entre elas, o DHMEQ é o único que inibe a translocação de NF- κ B para o núcleo, anulando, portanto, sua função (Fukushima et al., 2012).

O efeito inibitório de DHMEQ em diferentes tipos de tumores tem sido relatado em diversos trabalhos, incluindo câncer de tireóide, próstata, mama, carcinomas hepatocelular, uroteliais e nasofaríngeo, leucemia de células T do adulto, mieloma múltiplo, linfoma de células B, sarcoma sinovial, melanoma uveal, câncer gástrico, glioblastoma, câncer de pulmão, entre outros (Kikuchi et al., 2003; Starenki et al., 2004; Matsumoto et al., 2005; Watanabe et al., 2005; Watanabe et al., 2005; Horiuchi et al., 2008; Dabaghmanesh et al., 2009; Lampiasi e tal, 2009; Kodaira et al., 2010; Dror et al., 2010; Mino et al., 2011; Brassesco et al., 2013; Togano et al., 2014).

Vários testes funcionais para avaliar o efeito de DHMEQ no bloqueio de NF- κ B e sua consequência na dinâmica celular foram realizados neste projeto. A diminuição da viabilidade celular das células tumorais é um dos principais objetivos no tratamento contra o câncer. No presente estudo, o ensaio de proliferação celular foi realizado em diferentes doses e tempos, mostrando a eficiência da droga na inibição da proliferação para as três linhagens, chegando a aproximadamente 70% em média de inibição da proliferação nas maiores concentrações da droga (Figuras 1, 2 e 3). A linhagem ONS-76 se mostrou mais sensível, com inibição estatisticamente significativa para os três tempos (24, 48 e 72h) desde a menor dose utilizada (2,5 μ g/mL).

Complementando o ensaio de proliferação celular, ao tratar as três linhagens de MB com DHMEQ foi observada uma diminuição da curva de crescimento celular na maior concentração da droga (20 μ g/mL), sendo observada uma maior sensibilidade na linhagem ONS-76, cuja curva de crescimento foi menor em doses mais baixas (Figuras 4, 5 e 6).

Diversos trabalhos testaram o efeito antiproliferativo da inibição de NF- κ B em diferentes tipos tumorais com resultados corroborativos ao deste estudo. Ho et al. (2010) estudaram a inibição mediada por DHMEQ associada a uma eficácia antitumoral em linhagens celulares de carcinoma nasofaríngeo, o qual demonstrou um efeito inibitório de crescimento dose-dependente em todas as linhagens celulares testadas deste tipo tumoral. Para avaliar a influência do NF- κ B na proliferação celular em carcinoma renal, Sato et al. (2006) cultivaram a linhagem KU19-20 por 48h na ausência e presença de DHMEQ (5-20mg/ml) e observaram inibição da proliferação celular de maneira dose-dependente. Em outro estudo, Yasuda et al. (2011) forneceram a primeira evidência de que a droga DHMEQ inibiu significativamente o crescimento de duas linhagens de carcinoma escamoso oral, sugerindo que a ativação do NF- κ B desempenha um papel vital na proliferação celular deste tipo de carcinoma. O trabalho de Castro-Gamero et al. (2012) também mostrou diminuição da proliferação tempo e dose dependente nas linhagens HOS e MG-63 de osteossarcoma, após tratamento com DHMEQ.

O IC₅₀ é a medida da eficácia de um composto na inibição de uma função biológica ou bioquímica. Esta medida quantitativa indica o quanto de um determinado medicamento ou substância (inibidor) é necessária para inibir um determinado processo biológico pela metade. O IC₅₀ para linhagem UW402 foi

aproximadamente 37% menor nos tempos de 48 e 72h em relação ao tempo de 24h, enquanto que para a linhagem UW473 houve um decréscimo de 75% da dose necessária para inibir 50% da proliferação celular nos tempos de 48 e 72h em relação ao menor tempo (Tabela 1). O IC_{50} para linhagem ONS-76 foi aproximadamente 53% menor nos tempos de 48 e 72h em relação ao tempo de 24h, alcançando seu menor valor (11,5µg/mL) em 72h.

Os resultados que avaliaram a taxa de apoptose pré e pós tratamentos mostraram uma tendência à indução de apoptose nas três linhagens, alcançando valores próximos de 50, 31 e 18% de apoptose nas linhagens UW402, ONS-76 e UW473, respectivamente, na maior concentração utilizada da droga (20µg/mL), sendo a dose de 10µg/mL suficiente para a linhagem UW402 alcançar a mesma porcentagem de apoptose que a linhagem UW473 alcançou com uma dose maior. Já a linhagem ONS-76, mais sensível, apresentou aumento estatisticamente significativo a partir da dose de 5µg/mL (Figura 7).

Lampiasi et al. (2009) demonstraram que o DHMEQ promove a geração de espécie reativa de oxigênio (ROS) causando a inibição no crescimento e a proliferação celular, e levando a um aumento da apoptose. DHMEQ causa ativação do retículo endoplasmático em resposta ao estresse, levando a inibição do crescimento celular. A produção de ROS induzida por DHMEQ também provocou danos ao DNA em células de câncer de fígado.

O trabalho de Kimura et al. (2007) revelou que DHMEQ inibiu a proliferação e induziu a apoptose em linfoma de Burkitt humano nas linhagens celulares HS-Sultan e Daudi, acompanhados pela ativação de caspase-3. A apoptose foi confirmada pela coloração anexina V/PI e pelo aparecimento de corpos apoptóticos nessas linhagens por coloração com Giemsa. Estes resultados foram compatíveis com outros trabalhos que demonstraram que DHMEQ induz apoptose através da via caspase-dependente em vários tipos de câncer, como próstata, mama, células escamosas de cabeça e pescoço, mieloma, leucemia de células T do adulto, osteossarcoma e glioblastoma (Ariga et al., 2002; Kikuchi et al., 2003; Starenki et al., 2004; Matsumoto et al., 2005; Ohsugi et al., 2005; Tatetsu et al., 2005; Castro-Gamero et al., 2012; Brassesco et al., 2013). No trabalho de Brassesco et al. (2013), cinco das seis linhagens de glioblastomas analisadas tiveram aumento da taxa de apoptose após 48h de tratamento com 20µg/mL de DHMEQ, acompanhada de aumento nos níveis

da atividade da caspase-3 e redução da expressão dos genes *BCL2*, *BCL-XL* e *XIAP*.

A capacidade de uma célula de formar colônias é um requisito fundamental para que aconteça a metástase, pois após as células migrarem, estas ainda precisam conservar a capacidade de colonizar o novo ambiente. Isto faz com que a avaliação da capacidade clonogênica seja importante nos estudos que analisam potenciais alvos para o tratamento de câncer (Eccles e Welc, 2007). A sobrevivência clonogênica é também um importante critério de sobrevivência celular em resposta a agentes antitumorais, pois a morte celular pode ocorrer após algumas divisões celulares. DHMEQ se mostrou eficiente em impedir a formação e a progressão de colônias de forma significativa nas maiores concentrações testadas (10 e 20 µg/mL) com 48h de tratamento para as linhagens UW402 e UW473 (Figura 8). Para a linhagem ONS-76 não foi realizado o ensaio com a dose de 7,5 µg/mL, pois esta linhagem apresentou maior sensibilidade à droga, que se mostrou eficiente em impedir a formação e a progressão de colônias de forma significativa a partir da dose de 5 µg/mL com 48h de tratamento (Figura 8). Nenhuma colônia foi observada no tratamento de 20 µg/mL, havendo inibição completa da formação de colônias para esta linhagem.

Pajonk et al. (1999) mostraram em células PC3 de carcinoma de próstata e HD-MyZ de linfoma de Hodgkin transduzidas com um vetor adenovírus contendo o gene supressor IκB, um bloqueador de NF-κB, uma considerável redução da clonogenicidade (7,4% contra 19,6% do controle não transduzido). Bentires-Alj et al. (2003), investigaram as consequências da inibição de NF-κB na sobrevivência clonogênica nas linhagens celulares HCT15-H e HCT15-79 de carcinoma de cólon transfectadas por um plasmídeo contendo um inibidor IκB mutado e não induzível, tratadas com Daunomicina e TNFα, em diferentes concentrações por 48h, observando-se redução da capacidade clonogênica em ambas as linhagens. No trabalho de Brassesco et al. (2013), DHMEQ inibiu significativamente a formação de colônias em todas as concentrações testadas (2,5 - 10 µg/mL) após 48h de tratamento em linhagens de glioblastoma, e no trabalho de Castro-Gamero et al. (2012), DHMEQ inibiu a formação de colônias na linhagem HOS de osteossarcoma na dose de 10 µg/mL também após 48h de tratamento.

A inibição de NF-κB por DHMEQ reflete em diversos aspectos celulares, podendo ser observado através dos estudos funcionais e entre eles o ensaio de

migração em “risco” (*Scratch Assay*), que é um método direto e econômico para o estudo da migração de células *in vitro*. O ensaio de migração apresentou resultados interessantes para as três linhagens, com valores de migração celular nas maiores doses próximo ao observado no controle em tempo zero (T0). Estes resultados mostraram-se estatisticamente diferentes do controle DMSO, onde houve migração celular na ausência da droga. O ensaio de migração para as linhagens UW473 e ONS-76 apresentou significativa redução da migração celular, com diferença estatisticamente significativa desde a menor concentração da droga (2,5µg/mL). A linhagem UW402 mostrou diminuição da migração estatisticamente significativa nas doses de 7,5 e 10µg/mL (Figura 9). Possivelmente, poderiam ser observados valores de migração mais próximos aos obtidos no controle em tempo zero (T0), caso o ensaio tivesse resistido a maior concentração da droga (20µg/mL) e a falta de meio suplementado por soro bovino fetal.

Em concordância com estes resultados, Park et al. (2010) reportaram o efeito da inibição de NF-κB por siRNA no ensaio de migração celular em células epiteliais da lente e encontraram alto grau de supressão da migração celular na linhagem HLE B-3. Os trabalhos de Castro-Gamero et al. (2012) e Brassesco et al. (2013) mostraram inibição significativa na migração celular pelo mesmo ensaio em linhagens de osteossarcoma e glioblastoma, respectivamente. DHMEQ também reduziu a migração nas linhagens HONE-1 e HK1, de carcinoma nasofaríngeo, em 72 e 43%, respectivamente (Wong et al., 2010).

A disseminação de células tumorais para órgãos distantes e sua proliferação nesses locais é uma das marcas da progressão do tumor, estando quase invariavelmente associada a uma evolução fatal da doença (Gyrd-Hansen e Meier, 2010). Atividade sinalizadora aberrante e aumentada de NF-κB tem sido amplamente documentada em células de câncer, com implicações na disseminação do tumor metastático (Rayet e Gelinas, 1999; Naugler e Karin, 2008).

O ensaio de invasão baseado em uma matriz de matrigel mostrou inibição da invasão estatisticamente significativa nas doses de 5, 10 e 20µg/mL para a linhagem UW473. Para a linhagem UW402 e ONS-76 o ensaio de invasão mostrou inibição da invasão estatisticamente significativa em todas as doses de DHMEQ utilizadas. Em concordância com os resultados encontrados, Suzuki et al. (2013) demonstraram em um recente trabalho que DHMEQ inibiu a invasão celular em modelo animal de metástase de fígado de câncer pancreático, especialmente combinado com outras

drogas. Huang et al. (2001) demonstram que a supressão de NF- κ B em células humanas de câncer de próstata pela transfecção de I κ B α M inibe suas propriedades tumorigênicas e metastáticas em camundongos Nude por supressão da angiogênese e invasão, e ressaltam um trabalho anterior do grupo em células de melanoma metastático humano, quando foi observada diminuição da angiogênese e metástase após bloqueio da atividade de NF- κ B (Huang et al., 2000).

A ativação do NF- κ B em células de câncer pode aumentar sua progressão por meio da ativação do crescimento de células cancerosas, resistência à apoptose e aumento da atividade metastática (Pikarsky et al., 2004). Mino et al. (2011) evidenciam a alta atividade de NF- κ B em linhagens celulares de câncer gástrico com comportamento altamente metastático, e a inibição da atividade de NF- κ B pelo DHMEQ causando a supressão da disseminação peritoneal. DHMEQ inibiu a ativação constitutiva de NF- κ B na linhagem RGM1 de carcinoma de ovário causando inibição da invasão celular nesta linhagem altamente invasiva (Miyanish et al., 2010). Castro-Gamero et al. (2012) mostraram 36 e 24% de inibição da invasão nas linhagens HOS e MG-63 de osteossarcoma, respectivamente, utilizando 10 μ g/mL de DHMEQ. O trabalho de Brassesco et al. (2013) mostrou inibições entre 48 e 97% de invasão celular em seis linhagens de glioblastoma.

Apesar dos resultados obtidos no ensaio de invasão, estudos adicionais são necessários para determinar se a inibição NF- κ B poderia evitar a migração de células de MB ou a metástase, especialmente porque esta é uma característica de MB ainda não muito bem compreendida (Spiller et al., 2011).

Os resultados obtidos no ensaio de ciclo celular e de índice mitótico deste estudo não relacionam a droga DHMEQ à parada em mitose nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76. O baixo índice de metáfases observadas tanto no controle (DMSO) quanto nas diferentes concentrações da droga pode indicar que DHMEQ não induz uma parada em mitose e as células conseguem progredir no ciclo celular, em congruência aos resultados de Iimuro et al. (1998), que haviam observado uma diminuição do índice mitótico durante a regeneração hepática após inibição de NF- κ B em 24 e 48h, propondo que a inibição de NF- κ B resulta em apoptose nas fases S ou G2 do ciclo celular durante a regeneração hepática, e não na parada do ciclo celular.

Também não pôde ser observada uma clara parada em nenhuma das fases do ciclo para as três linhagens. As três linhagens não apresentaram uma evidente

alteração do ciclo celular nas diferentes doses da droga ou ao longo do tempo. Discretas alterações podem ser observadas como o aumento de células em S na linhagem ONS-76 nos maiores tempos e maior dose de DHMEQ (Figura 13), e o aumento de células em G2 em detrimento de G1 na linhagem UW473 nos maiores tempos e doses de DHMEQ (Figura 12). Embora esses aumentos tenham força estatística, não é claro um padrão de alteração, evidenciado principalmente pela linhagem UW402, que pouca mudança sofreu no padrão normal do ciclo celular (Figura 11).

Estudos anteriores demonstraram que em vários tipos de câncer o DHMEQ inibe a progressão do ciclo celular causando parada na fase G1 o que pode contribuir com seu efeito inibitório de proliferação (Watanabe et al., 2005; Nishimura et al., 2006). Yasuda et al. (2011) estudaram o efeito de DHMEQ no ciclo celular em duas linhagens de carcinoma de células escamosas após 48h de tratamento, e observaram diminuição das células na fase S e parada das células em G1, para ambas linhagens.

Embora a atividade de NF- κ B esteja implicada principalmente na regulação G1/S do ciclo celular (Hinz et al., 1999), estudos recentes indicam seu envolvimento na regulação de G2/M em linhagens de carcinoma nasofaríngeo e de glioblastoma (Ho et al., 2010; Fukushima et al., 2012). Brassesco et al. (2013) também observaram acúmulo das células em G2/M em linhagens de glioblastoma. Em outro estudo, o tratamento de DHMEQ combinado a radiação em células de câncer de próstata, mostrou acentuada parada das células em G2/M nas linhagens LNCaP e PC-3 (Kozakai et al., 2012) e Wong et al. (2010) também observaram parada em G2/M em duas linhagens de carcinoma nasofaríngeo. Ou seja, não há um consenso claro sobre a influência de DHMEQ no ciclo celular, havendo poucos trabalhos que apontam como ocorre esta regulação.

A combinação de drogas é uma prática amplamente utilizada no combate ao câncer e a grande maioria das combinações atualmente empregadas tem sido desenvolvida empiricamente. Como o crescente número de novas drogas, aumenta o número possível de combinações de forma quase exponencial. O desenvolvimento de robustos testes pré-clínicos para avaliar a combinação de drogas possibilita redução de custos no desenvolvimento de combinações clinicamente úteis.

O tratamento de MB envolve a utilização principalmente das drogas Cisplatina, Vincristina e Lomustine. Alguns trabalhos mostram a utilização da droga

Temozolomida em pacientes com MB com resultados muito positivos (Barone et al., 2006). Um trabalho com pacientes apresenta uma combinação de drogas utilizando Cisplatina, Ifosfamida e Etoposide como uma das mais comumente aplicadas para o tratamento de MB (Saito et al., 2011).

O presente estudo combinou DHMEQ com as drogas Cisplatina, TMZ e Etoposide a fim de verificar o índice de redução de dose destas drogas, uma vez que elas trazem efeitos colaterais, ao contrário do que DHMEQ tem mostrado em estudos *in vivo*.

Cisplatina é uma droga de primeira linha utilizada no tratamento de MB, entre outros tumores (Tajbakhsh et al., 2008). A toxicidade da cisplatina é atribuída a sua habilidade de se ligar ao DNA, causando ligação cruzada intracadeias e consequente distorção da estrutura do DNA, dobrando e desenrolando a dupla hélice (Jordan e Carmo-Fonseca, 2000).

TMZ é um agente metilante do DNA que tem uma boa atividade antitumoral *in vitro*. Estudos pré-clínicos mostraram bons efeitos em linhagens celulares de tumores cerebrais, como astrocitoma e glioblastoma. Devido a sua relativa baixa toxicidade e bons resultados em tumores de sistema nervoso central, demonstrados em estudos pré-clínicos e de fase I e II em adultos, TMZ pode ser um interessante agente para tumores cerebrais pediátricos (Barone et al., 2006).

Etoposide é um agente citotóxico pertencente ao grupo de drogas inibidoras de topoisomerases. A droga forma um complexo ternário com o DNA e a enzima topoisomerase II, impede a religação das cadeias de DNA e promove a quebra da molécula. Como as células do câncer contam com mais enzima do que as células saudáveis, uma vez que se dividem mais rapidamente, a droga provoca erros na síntese de DNA e promove a apoptose das células tumorais (Hande, 1998; Gordaliza et al., 2004).

A combinação de cisplatina com DHMEQ nas linhagens UW402 e UW473 apresentou índice de combinação aditivo (CI entre 0,9 e 1,1) para praticamente todos os pontos de combinação (Tabela 2), mostrando-se ser uma combinação vantajosa, podendo haver uma redução de dose de Cisplatina de aproximadamente três vezes com uso simultâneo de DHMEQ. Já na linhagem ONS-76 o índice de combinação foi antagônico nas menores doses (CI de aproximadamente 2,3) e aditivo para a maior dose das drogas (CI de 0,9), podendo haver uma redução de

dose de Cisplatina de aproximadamente duas vezes com uso simultâneo de DHMEQ nas maiores doses das drogas.

Visualizando de maneira diferente esta combinação, foi fixada a dose de DHMEQ e variada a dose de Cisplatina para as três linhagens, em uma combinação de proporção não fixa (Tabela 5).

Na combinação de 10µg/mL de DHMEQ com diversas doses de Cisplatina foi possível ver que a combinação foi sinérgica para as linhagens UW402 e ONS-76 (exceto maior dose de Cisplatina na linhagem UW402), com significativo índice de redução de dose para ambas as linhagens, chegando a quatro vezes para UW402 e 10 vezes para ONS-76. Na linhagem UW473, cuja combinação de proporção fixa havia sido aditiva em todos os pontos, se mostrou antagônica, condizente com a falta de sinergismo da combinação das drogas nesta linhagem.

Poma et al. (2006) encontraram um efeito sinérgico na combinação de DHMEQ com Cisplatina em linhagens de carcinoma hepatocelular. Da mesma maneira, Ruan et al. (2006) encontraram que DHMEQ sinergisticamente acentua os efeitos citotóxicos da Cisplatina em duas linhagens de células de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço. Katsman et al. (2007) reportaram que o tratamento da linhagens Ramos e Daudi com DHMEQ as sensibilizaram ao tratamento com Cisplatina e Etoposide. Em outro estudo dos mesmos autores, DHMEQ sensibilizou linhagens de carcinoma de próstata, levando-as a apoptose induzida por Cisplatina. Castro-Gamero et al. (2012) também mostraram efeito sinérgico de DHMEQ e Cisplatina em linhagens de osteossarcoma e hipotetizaram que DHMEQ impediria qualquer possibilidade de resistência mediada por Cisplatina.

Da mesma forma, a combinação de DHMEQ com TMZ foi principalmente sinérgica (CI menor que 1) nas linhagens UW402 e UW473, chegando a alcançar uma redução de dose de 37 vezes na linhagem UW473, que se mostrou menos sensível a DHMEQ em outros ensaios. A combinação de DHMEQ com TMZ na linhagem ONS-76 também foi principalmente sinérgica (CI menor que 1) nas menores doses, chegando a alcançar uma redução de dose de 3,4 vezes. Nas maiores doses a combinação foi levemente antagônica, com CI de aproximadamente 1,2 (Tabela 3).

Na combinação de proporção não fixa com a droga TMZ o resultado foi sinérgico para praticamente todos os pontos de combinação nas três linhagens (exceto maior dose de TMZ nas linhagens UW402 e ONS-76, em que a combinação

se mostrou aditiva). O índice de redução de dose foi importante, especialmente por ter sido maior nas menores doses de TMZ, chegando a 11 vezes na linhagem UW402, três vezes na linhagem UW473 e seis vezes na linhagem ONS-76 (Tabela 6).

Caporali et al. (2012) combinaram a inibição de RelA por siRNA com TMZ e encontraram aumento estatisticamente significante da sensibilidade das células HCT116 (câncer colo-retal) e M10 (melanoma metastático) a droga TMZ, levando a acreditar que a inibição do fator de transcrição por DHMEQ causaria o mesmo efeito de sensibilização a TMZ e consequente redução de dose desta droga.

Celastrol é um tradicional produto natural chinês que tem como possível mecanismo de ação a inibição de NF- κ B. O trabalho de Chen et al. (2009) mostrou um efeito antitumoral sinérgico na combinação de Celastrol e TMZ em células de melanoma. Brassesco et al. (2013) combinaram DHMEQ e TMZ em linhagens de glioblastoma e observou aumento da sensibilidade das linhagens a TMZ, evidenciado pela proliferação celular e ativação da caspase-3.

DHMEQ foi combinado também com Etoposide nas três linhagens em estudo. A combinação foi sinérgica em todos os pontos da combinação de proporção fixa para as três linhagens ($CI < 0,9$), com altos índices de redução de dose principalmente na maior dose de Etoposide (Tabela 4). Para a combinação de proporção não fixa com Etoposide os resultados foram diferentes para cada linhagem. Na linhagem UW402 a combinação foi parte sinérgica, nas menores doses de Etoposide, passando a aditiva e chegando a antagônica na maior dose da droga, e o índice de redução de dose chegou a 2,6 vezes. Na linhagem UW473 a combinação foi toda antagônica, mostrando-se pouco vantajosa. Já na linhagem ONS-76, a combinação com DHMEQ foi sinérgica em todos os pontos, com considerável índice de redução de dose da droga Etoposide, chegando a 220 vezes (Tabela 7).

Meley et al. (2010) relatam em seu trabalho que há uma resistência de diferentes células de MB ao tratamento com Etoposide e sugerem um possível mecanismo que envolve ativação da via do NF- κ B por esta droga. Neste trabalho, os autores mostram uma proteção às células de MB usando diferentes inibidores da via do NF- κ B, favorecendo a apoptose induzida por Etoposide. Jazirehi et al. (2005) encontraram aumento dos níveis de apoptose nas linhagens Ramos e Daudi quando sensibilizadas por inibidores de NF- κ B e tratadas com Etoposide. Morotti et al.

(2006) mostram que diferentes inibidores deste fator de transcrição também estimulam apoptose induzida por Etoposide na linhagem K562. Um trabalho apresenta a combinação de DHMEQ com Etoposide (Watanabe et al., 2007) em células de Hodgkin/Reed–Sternberg (H-RS) e apresenta redução na viabilidade celular na linhagem KMH2 assim como aumento do nível de apoptose com o uso de DHMEQ junto a drogas inibidoras de topoisomerase. Assim, o trabalho mostra que DHMEQ acentua os efeitos da citotoxicidade dos inibidores de etopoisomerasas a partir da inibição da entrada do fator de transcrição NF- κ B no núcleo, concordando com os resultados observados para as linhagens de MB em estudo.

Utilizando as duas abordagens de combinação das drogas, é possível reforçar os dados de CI e DRI obtidos, além de ser uma maneira diferente de visualizar os efeitos da combinação, uma vez que fixando a dose da droga em estudo, mais facilmente se observa o quanto da outra droga pode ser reduzida para se alcançar o mesmo efeito. Houve alguns pontos de divergência entre as duas abordagens do ensaio de combinação (proporção fixa e não fixa), como por exemplo, a combinação de 10 μ g/mL de DHMEQ e 2000 μ M de TMZ na linhagem UW473, que num primeiro momento foi altamente vantajosa com DRI de 20 vezes e quando realizada num segundo momento, não apresentou efeito algum. Porém DHMEQ atuou principalmente de forma positiva com as três drogas, nas três linhagens.

A radioterapia é uma técnica amplamente utilizada no tratamento de MB, porém ela pode trazer efeitos colaterais a longo prazo, além de ser somente utilizada em crianças maiores de 3 anos. Os estudos com novas drogas e suas potenciais características radiosensibilizantes podem ajudar no tratamento de tumores do sistema nervoso pediátricos.

O presente estudo avaliou o potencial radiosensibilizante de DHMEQ em linhagens de MB. Os resultados encontrados mostram que a radiação utilizada com a droga foi de 1,71 a 2,68 vezes mais eficiente na linhagem UW402 e de 1,22 a 1,48 vez mais eficiente na linhagem UW473. Para a linhagem ONS-76 a radiação utilizada com a droga foi de 16,8 a 625 vezes mais eficiente do que o uso da radiação sozinha (Tabela 8).

Em concordância com nossos achados, Baldwin (2001) relatou que a inibição de NF- κ B acentua a radiação ionizante em uma revisão sobre o fator de transcrição. Qiao et al. (2012) utilizaram Curcumin, um outro inibidor de NF- κ B, para potencializar os efeitos da radiação em células de linfoma de Burkitt. Em um trabalho recente,

Kozakai et al. (2012) mostraram que a combinação de DHMEQ com radiação ionizante em linhagens de câncer de próstata acentua a inibição da capacidade clonogênica, do crescimento celular e diminui acentuadamente o volume tumoral no ensaio *in vivo*. Brassesco et al. (2013) apresentaram que o pré-tratamento com 10µg/mL de DHMEQ sensibiliza linhagens celulares de glioblastoma ao tratamento com radiação ionizante.

Para avaliar os efeitos de DHMEQ na expressão gênica, alguns genes relacionados à importantes processos da carcinogênese (apoptose, proliferação celular, metástase, entre outros) foram analisados. Os genes escolhidos foram *p65*, *MRP1*, *LRP*, *EGFR*, *MMP-2*, baseados na descrição da literatura por serem alvo de NF-κB, já descritos em trabalhos de MB e por terem papel importante em diversos processos celulares. Observando-se o desvio padrão nos gráficos (Figuras 25, 26 e 27) é possível constatar que não houve resultados semelhantes entre as replicatas experimentais, porém, embora não haja força estatística, é possível observar uma diminuição da expressão dos genes *LRP* e *EGFR* para as três linhagens e, para as linhagens UW402 e ONS-76, ainda houve redução da expressão do gene *MMP-2*. Os genes *p65* e *MRP1* quase não sofreram influência na expressão, e para a linhagem ONS-76, os resultados da repetição dos experimentos foram contrastantes. Outros tempos de tratamento foram testados como 3, 24 e 48h (dados não mostrados), sem resultados relevantes.

Por conta da natureza altamente pleiotrópica de NF-κB e o controle desses genes não ser exclusivamente feito por esse fator de transcrição, é possível que haja inúmeras vias que contornam a falta de NF-κB nuclear, para que haja homeostasia da expressão desses genes na célula. Além disso, mesmo que controlada as condições gerais da cultura celular para que os experimentos fossem realizados sob condições semelhantes, é possível que pequenas variações possam influenciar a quantificação da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real, que é uma técnica muito sensível. As variações observadas podem não ser exclusivamente no tratamento e sua influência na expressão gênica, mas como também na quantificação após a extração de RNA e síntese de cDNA.

A inibição de NF-κB causa profundos efeitos na expressão gênica por mecanismos diretos e indiretos. Resultados de *array* de expressão confirmaram a diminuição da expressão de muitos genes alvos de NF-κB no trabalho de Dabaghmanesh et al. (2009). Entre os genes hipoexpressos após a inibição do

fator de transcrição estão *BCL-xL*, *Myc*, *CCR5*, *NF-κB1* e *FAS*. Brassesco et al. (2013) analisaram a expressão dos genes *BCL-2*, *BCL-XL*, *XIAP*, *MMP-2*, *MMP-14*, *uPA*, *TIMP-2* e *MGMT* e observaram que em apenas uma das linhagens estudadas não houve redução da expressão dos genes relacionados a apoptose (*BCL-2*, *BCL-XL*, *XIAP*) em nenhuma das duas concentrações de DHMEQ testadas. Nas outras cinco linhagens houve redução da expressão desses genes em 5µg/mL, 10µg/mL ou ambas as concentrações da droga. Para os genes *MMP-2* e *TIMP-2* houve redução da expressão em cinco das seis linhagens e os genes *MMP-14* e *uPA*, em quatro das seis linhagens, nas doses de 5µg/mL, 10µg/mL ou ambas as concentrações. A expressão do gene *MGMT* foi analisada em duas linhagens e houve considerável diminuição da expressão nas três doses de DHMEQ utilizadas para as duas linhagens.

Suzuki et al. (2013) observaram diminuição da expressão de *MMP-9* associada a diminuição da invasão após tratamento com DHMEQ em modelo animal de metástase de fígado de câncer pancreático. O mesmo trabalho apresenta diminuição da expressão dos genes *Ciclina D1* e *IL-8*. Mino et al. (2011) mostram diminuição da expressão de integrinas após tratamento com DHMEQ por 2h em linhagem de câncer gástrico. Watanabe et al. (2005) encontraram diminuição da expressão dos genes *Ciclina D1*, *Ciclina D2*, *BCL-XL*, *c-FLIP* e *VEGF* após 16h de tratamento com 10µg/mL de DHMEQ em linhagens de mieloma múltiplo. O trabalho de Wong et al. (2010) demonstraram diminuição da expressão de EGFR através da técnica de *Western blotting* após 24h de tratamento com 25µg/mL de DHMEQ em células de carcinoma nasofaríngeo.

Alternativamente a esse experimento, com o objetivo de mostrar a influência da inibição de NF-κB na expressão de outros genes, foi realizada a técnica de *Dot Blot*, que visa quantificar proteínas visualmente através da hibridização de anticorpo específico diretamente no extrato de proteína total. É uma forma mais rápida e menos laboriosa para observar se houve redução na quantidade de proteínas em resposta a redução da expressão de seus respectivos genes. Para isso foram avaliadas as proteínas *MMP-2*, *MMP-9*, *LRP*, *MRP*, *HIF1α* e *IκBα*, após tratamento com 10µg/mL por 24, 48 e 72h.

Os resultados apontaram algumas diminuições na quantidade de proteínas presente nas células, como a de *HIF1α* na linhagem UW402 em 48h; *IκBα* nas linhagens UW402 e UW473 em 24h; *LRP* nas mesmas linhagens em 72h; *MRP* nas

linhagens UW402 e UW473 em 72h e ONS-76 em 48h; MMP-2 na linhagem ONS-76 e MMP-9 na linhagem UW402, no tempo de 24h com tratamento em meio de cultura suplementado com 1% de SBF. Por outro lado, alguns aumentos também puderam ser observados, especialmente na linhagem ONS-76 (Figuras 28-32).

O ensaio de *Western blotting* foi realizado com o objetivo de evidenciar a inibição que DHMEQ causa na translocação de NF- κ B para o núcleo. Para isso o anticorpo para a subunidade p65 do fator de transcrição foi utilizado em extratos proteicos nucleares e citoplasmáticos para quantificação do fator de transcrição antes e após o tratamento, dentro e fora do núcleo. Em um primeiro momento, as proteínas foram extraídas após tratamento de 48 e 72h, seguindo resultados de trabalhos anteriores (Yasuda et al., 2011). Posteriormente, baseando-se em outros trabalhos que utilizaram um menor tempo de tratamento (Starenki et al., 2004; Kimura et al., 2007; Castro-Gamero et al., 2012), foram testados os tempos de 3 e 6h.

Após extensa tentativa de padronização, primeiramente com as linhagens UW402 e UW473, levando em consideração somente a fração nuclear em 48h de tratamento houve discreta diminuição da quantidade da proteína, o que não foi observado no tempo de 72h. O mesmo foi observado para a fração citoplasmática, embora fosse esperado que houvesse aumento desta após o tratamento por haver acúmulo no citoplasma em resposta a inibição da translocação para o núcleo (Figuras 33 e 34). A linhagem ONS-76 não foi avaliada devido a repetidas contaminações ocorridas durante a cultura. Yasuda et al. (2011) encontraram diminuição de p65 citoplasmático após 24 e 48h de tratamento com 10 μ g/mL de DHMEQ em duas linhagens celulares de carcinoma oral de células escamosas e no núcleo houve diminuição apenas em uma linhagem após 48h de tratamento, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho. Um trabalho com linhagens celulares de células T humanas utilizou 10 μ g/mL de DHMEQ para testar a inibição da ativação da replicação de vírus HIV-1 e houve diminuição significativa da quantidade de p65 nuclear após 24h de tratamento (Miyake et al., 2010). Shinoda et al. (2010) também mostram que o pré-tratamento com 5 μ g/mL de DHMEQ inibe completamente a ativação de p65 por pelo menos 24h com ausência de toxicidade em células dendríticas humanas.

Os ensaios em 3 e 6h foram realizados somente com a fração nuclear por ter sido insuficiente a quantidade de proteína citoplasmática extraída. Embora um

menor tempo pudesse ser mais favorável para visualizar a inibição da translocação por se tratar de um evento imediato, foi observado leve aumento da quantidade de proteína na linhagem UW473, especialmente em 6h, e nenhuma alteração na linhagem UW402 para os dois tempos (Figura 35). Ausência de alteração da quantidade de NF- κ B também foi observada no trabalho de Kimura et al. (2007), que ao tratar duas linhagens de linfoma de Burkitt com 10 μ g/mL de DHMEQ por até 1h, não encontrou alteração na quantidade de p65 citoplasmático e nuclear. Ao contrário de Starenki et al. (2004) que no mesmo tempo e concentração de DHMEQ observaram diminuição da quantidade de p65 em uma linhagem de câncer de tireóide. Castro-Gamero et al. (2012) trataram duas linhagens de osteossarcoma com 10 μ g/mL de DHMEQ por 3h e encontraram significativa diminuição da quantidade de p65 nuclear.

Na tentativa de visualizar de outra maneira a inibição da translocação de NF- κ B para o núcleo, foi realizado o ensaio de imunofluorescência, que hibridiza o anticorpo de interesse (p65) diretamente nas células cultivada sobre lamínulas. Um anticorpo secundário marcado com fluorescência confere tal característica, podendo ser visualizado em microscópio de fluorescência. Neste ensaio foi acrescentado um experimento paralelo com tratamento concomitante com TNF α , para estimular a quantidade do fator de transcrição ativo a ser hibridizado pelo anticorpo e favorecer a observação da inibição.

Em alguns pontos observa-se uma diminuição da marcação em vermelho que representa o anticorpo para a proteína p65, como na linhagem UW402 em 1 e 6h com TNF α e, 3 e 24h sem TNF α ; 1h com TNF α e, 3h sem TNF α na linhagem UW473 e; 6h com e sem TNF α na linhagem ONS-76 (Figuras 36, 37 e 38). Contudo, a marcação foi irregular, pouco específica e pouco nítida, não podendo levar a uma conclusão clara. A falta de um controle positivo para a marcação desse anticorpo que pudesse atestar a eficiência da técnica também contribuiu para a falta de um resultado claro e confiável.

Suzuki et al. (2013) utilizaram o mesmo ensaio com o mesmo objetivo em amostra de modelo animal de metástase de fígado de câncer pancreático e observaram inibição da translocação do fator de transcrição após tratamento com DHMEQ. Em um ensaio semelhante, Watanabe et al. (2005) observaram bloqueio da localização nuclear de p65 através de microscopia de fluorescência em células de mieloma múltiplo e o mesmo autor em 2007 mostrou esta inibição da

translocação para o núcleo após tratamento com 10µg/mL de DHMEQ por 6h em células de Hodgkin/Reed-Sternberg em análise com microscopia confocal de imunofluorescência.

6.1. Considerações finais

Os resultados obtidos nos ensaios funcionais não deixam dúvidas sobre os efeitos de DHMEQ nestas linhagens de MB pediátrico. Diminuição da proliferação, da capacidade clonogênica, da invasão, da migração e aumento do nível de apoptose são dados suficientemente fortes para concluir que DHMEQ possui efeitos antitumorais na sua ação sobre o fator de transcrição NF-κB e controla de forma indireta os genes responsáveis por esses processos biológicos intimamente relacionados à carcinogênese, assim como também a alta eficiência de DHMEQ na radiosensibilização destas linhagens.

A linhagem ONS-76 foi a mais sensível à droga, mostrando resultados estatisticamente significativos nestes experimentos nas menores doses de DHMEQ. As linhagens UW402 e UW473 alternaram maior ou menor sensibilidade dependendo do experimento, porém a concentração do IC₅₀ foi suficiente para gerar resultados estatisticamente significantes para quase todos os experimentos nas três linhagens, exceto os ensaios de capacidade clonogênica e apoptose pra a linhagem UW402.

Os ensaios de capacidade clonogênica, migração e invasão celular, que incluem em seus processos metodológicos a fixação das células e fotodocumentação, não só mostram o efeito de DHMEQ naquele processo celular, como também evidencia claras alterações morfológicas das células que resistiram as maiores doses da droga.

Os ensaios de combinação de drogas geraram uma interessante observação: a linhagem mais sensível a DHMEQ, ONS-76, foi a que menos resultou interessante à combinação de drogas, exceto com Etoposide. A combinação de DHMEQ com Cisplatina e TMZ se mostrou pouco vantajosa para esta linhagem, ao contrário do que foi observado para as outras duas linhagens.

Os efeitos de DHMEQ no ciclo celular não ficaram claros. Análises moleculares poderiam melhor explicar a influência da droga no controle do ciclo

celular ou uma corroboração com os dados funcionais para ajudar a concluir a baixa influência da inibição de NF- κ B na dinâmica do ciclo celular em linhagens de MB.

Os ensaios moleculares não geraram resultados esclarecedores e corroborativos com a literatura sobre a influência de DHMEQ na expressão dos genes analisados e nem da eficiência da inibição da translocação de NF- κ B para o núcleo, relatado e mostrado em diversos trabalhos.

Novos estudos podem ser agregados para melhor compreender os efeitos de DHMEQ e da inibição de NF- κ B em MB, incluindo análise de um maior número de linhagens e até mesmo linhagens primárias. Relacionar o uso dessa droga aos subtipos moleculares de MB também pode ser uma interessante progressão deste estudo, uma vez que a importância de se subclassificar as doenças em busca de alvos moleculares específicos se torna cada vez mais evidente. Um próximo passo muito importante é a realização de experimentos com DHMEQ em MB induzido em modelo animal.

7. Conclusões

7. CONCLUSÕES

DHMEQ inibiu significativamente a proliferação, a capacidade clonogênica, a migração e a invasão;

DHMEQ induziu significativamente a apoptose e a radio e quimiossensibilização;

DHMEQ alterou a expressão de proteínas (HIF1 α , I κ B α , MRP, LRP, MMP-2, MMP-9), cujos genes são controlados por NF- κ B;

DHMEQ possui evidentes efeitos antineoplásicos em linhagens de MB pediátrico, configurando-se um importante potencial agente terapêutico para esse tipo de câncer.

8. Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamson, D. C., Shi, Q., Wortham, M., Northcott, P.A., Di, C., Duncan, C. G., Li, J., McLendon, R. E., Bigner, D. D., Taylor, M. D., Yan, H. OTX2 is critical for the maintenance and progression of Shh-independent medulloblastomas. *Cancer Res.* 2010; 70:181–191.
- Alberti, C., Pinciroli, P., Valeri, B., Ferri, R., Ditto, A., Umezawa, K., Sensi, M., Canevari, S., Tomassetti, A. Ligand-dependent EGFR activation induces the co-expression of IL-6 and PAI-1 via the NF- κ B pathway in advanced-stage epithelial ovarian cancer. *Oncogene.* 2011; 31: 4139–4149.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2004). *Biologia molecular da célula.* Veiga, A.B.G. et al. (trad), 4ª edição. Porto Alegre: Artmed.
- ABTA (American Brain Tumor Association) (2012). *Medulloblastoma.* Chicago: ABTA. 28pp.
- Andrade, A.F., Castro-Gamero, A.M., Moreno, D.A., Borges, K.S., Queiróz, R.G.P., Umezawa, K., Tone, L.G., Scrideli, C.A. Inibição do NF-KB pelo dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) causa diminuição da proliferação em linhagens pediátricas de medulloblastoma, mas não em linhagens pediátricas de leucemia. In XII Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica. Expo Unimed Curitiba, PR, 2010. Resumo dos Trabalhos. Setembro, 2010, p.114.
- Ariga, A., Namekawa, J., Matsumoto, N., Inoue, J., Umezawa, K. Inhibition of tumor necrosis factor- α -induced nuclear translocation and activation of NF- κ B by dehydroxymethylepoxyquinomicin. *J Biol Chem.* 2002; 277: 24625–24630.
- Baldwin, A.S. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *J Clin Invest.* 2001; 107: 241–246.
- Barone, G., Maurizi, P., Tamburrini, G., Riccardi, R. Role of temozolomide in pediatric brain tumors. *Childs Nerv Syst.* 2006; 22(7): 652-661.
- Basseres, D.S., Baldwin, A.S. Nuclear factor- κ B and inhibitor of κ B kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene.* 2006; 25: 6817–6830.
- Beinke, S., Ley, S. C. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochem. J.* 2004; 382: 393-409.
- Bentires-Alj, M., Barbu, V., Fillet, M., Chariot, A., Relic, B., Jacobs, N., et al. NF- κ B transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene.* 2003; 22(1): 90-97.
- Biswas, D. K., Iglehart, J. D. Linkage between EGFR family receptors and nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling in breast cancer. *J Cell Physiol.* 2006; 209(3): 645-652.

Bonello, S., Zahringer, C., BelAiba, R. S., Djordjevic, T., Hess, J., Michiels, C., Kietzmann, T., Görlach, A. Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NF κ B site. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 755–761.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 1976; 72: 248-254.

Brassesco, M. S., Roberto, G. M., Morales, A. G., Oliveira, J. C., Delsin, L. E. A., Pezuk, J. A., Valera, E. T., Carlotti Jr., C. G., Rego, E. M., Oliveira, H. F., Scrideli, C. A., Umezawa, K. Tone, L. G. Inhibition of NF- κ B by Dehydroxymethylepoxyquinomicin Suppresses Invasion and Synergistically Potentiates Temozolomide and γ -Radiation Cytotoxicity in Glioblastoma Cells. *Chemotherapy Research and Practice.* 2013; 16p.

Brown, H. G., Kepner, J. L., Perlman, E. J., et al. Large cell/anaplastic medulloblastoma: a Pediatric Oncology Group Study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000; 59:857-865.

Caporali, S., Levati, L., Graziani, G., Muzi, A., Atzori, M. G., Bonmassar, E., Palmieri, G., Ascierto, P. A., D'Atri, S. NF- κ B is activated in response to temozolomide in an AKT-dependent manner and confers protection against the growth suppressive effect of the drug. *J Transl Med.* 2012; 10: 252.

Castro-Gamero, A. M., Borges, K. S., Silveira, V. S., Lira, R. C. P., Queiroz, R. P. G., Valera, F. C. P., Scrideli, C. A., Umezawa, K., Tone, L. G. Inhibition of nuclear factor- κ B by dehydroxymethylepoxyquinomicin induces schedule-dependent chemosensitivity to anticancer drugs and enhances chemoinduced apoptosis in osteosarcoma cells. *Anti-Cancer Drugs.* 2012; 23: 638–650.

CBTRUS, Central Brain Tumor Registry of the United States (2007-2008). Primary brain tumors in the United States, Statis- tical Report (2000-2004), Years of Data Collected. Chicago: Author.

Chang, C. C, Zhang, J., Lombardi, L., Neri, A., Dalla-Favera, R. Mechanism of expression and role in transcriptional control of the proto-oncogene NF-KB-2/LYT-10. *Oncogene.* 1994; 9(3): 923-33.

Chen, M., Rose, A. E., Doudican, N., Osman, I., Orlow, S. J. Celastrol Synergistically Enhances Temozolomide Cytotoxicity in Melanoma Cells. *Mol Cancer Res.* 2009; 7: 1946.

Cho, Y. J., Tsherniak, A., Tamayo, P., Santagata, S., Ligon, A., Greulich, H., Berhoukim, R., Amani, V., Goumnerova, L., Eberhart, C. G., Lau, C. C., Olson, J. M., Gilbertson, R. J., Gajjar, A., Delattre, O., Kool, M., Ligon, K., Meyerson, M., Mesirov, J. P., Pomeroy, S. L. Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 1424–1430.

Chou, T. C., Talalay, P. A simple generalized equation for the analysis of multiple inhibitions of Michaelis-Menten kinetic systems. *J. Biol. Chem.* 1977; 252: 6438-6442.

Chou, T. C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Res.* 2010; 70: 440-446.

Chou, T. C., Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984; 22: 27-55.

Clifford, S., Lusher, M., Lindsey, J., Langdon, J., Gilbertson, R., Straughton, D., Ellison, D. Wnt/wingless pathway activation and chromosome 6 loss characterise a distinct molecular sub-group of medulloblastomas associated with a favourable prognosis. *Cell Cycle.* 2006; 5: 2666-2670.

Crawford, J. R., MacDonald, T.J., Packer, R.J. Medulloblastoma in childhood: new biological advances. *Lancet Neurol.* 2007; 6: 1073-1085.

Cusack, J. C., Liu, R., Baldwin, A. S. NF-kappa B and chemoresistance: potentiation of cancer drugs via inhibition of NF-kappa B, *Drug Resist. Updat.* 1999; 2: 271-273.

Dabaghmanesh, N., Matsubara, A., Miyake, A., Nakano, K., Ishida, T., Katano, H., Horie, R., Umezawa, K., Watanabe, T. Transient inhibition of NF-kB by DHMEQ induces cell death of primary effusion lymphoma without HHV-8 reactivation. *Cancer Science.* 2009; v. 100, 4, p. 737-746.

Das, M., Sahoo, S. K. Folate Decorated Dual Drug Loaded Nanoparticle: Role of Curcumin in Enhancing Therapeutic Potential of Nutlin-3a by Reversing Multidrug Resistance. *PLoS One.* 2012; 7(3): e32920.

de Hass, T., Oussoren, E., Grajkowska, W., Perek-Polnik, M., Popovic, M., Zadavec-Zalatel, L., Perera, M., Corte, G., Wirths, O., van Sluis, P., Pietsch, T., Troost, D., Baas, F., Versteeg, R., Kool, M. OTX1 and OTX2 expression correlates with the clinicopathologic classification of medulloblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006; 65: 1-11.

Dellovade, T., Romer, J. T., Curran, T., Rubin, L. L. The hedgehog pathway and neurological disorders. *Annu Rev Neurosci.* 2006; 29: 539-563.

Dhall, G. Medulloblastoma. *J Child Neurol.* 2009; 24(11): 1418-1430.

Disis, M. L. Immune regulation of cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 4531-4538.

Dror, R., Lederman, M., Umezawa, K., Barak, V., Pe'er, J., Chowers, I. Characterizing the involvement of the nuclear factor-kappa B (NF-kB) transcription factor in uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.* 2010; 51: 1811-1816.

Eberhart, C.G., Kaufman, W.E., Tihan, T., Burger, P.C. Apoptosis, neuronal maturation and neurotrophin expression within medulloblastoma nodules. *J Neurophatol Exp Neurol*. 2001; 60:462-469.

Eccles, S. A., Welch, D. R. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet*. 2007; 369(9574): 1742-1757.

Ellison, D. W., Dalton, J., Kocak, M., Nicholson, S. L., Fraga, C., Neale, G., Kenney, A. M., Brat, D. J., Perry, A., Yong, W. H., Taylor, R. E., Bailey, S., Clifford, S. C., Gilbertson, R. J. Medulloblastoma: clinico-pathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups. *Acta Neuropathol*. 2011; 121: 381–396.

Ellison, D. W. Childhood medulloblastoma: novel approaches to the classification of a heterogeneous disease. *Acta Neuropathol*. 2010; 120: 305–316.

Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006; 1(5): 2315-2319.

Fukushima, T., Kawaguchi, M., Yorita, K., Tanaka, H., Takeshima, H., Umezawa, K., Kataoka, H. Antitumor effect of dehydroxymethylepoxyquinomicin, a small molecule inhibitor of nuclear factor- κ B, on glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2012; 14(1): 19-28.

Geyer, J. R., Sposto, R., Jennings, M., Boyett, J. M., Axtell, R. A., Breiger, D., Broxson, E., Donahue, B., Finlay, J. L., Goldwein, J. W., Heier, L. A., Johnson, D., Mazewski, C., Miller, D. C., Packer, R., Puccetti, D., Radcliffe, J., Tao, M. L., Shiminski-Maher, T. Multiagent chemotherapy and deferred radiotherapy in infants with malignant brain tumors: a report from the children's cancer group. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 7621–7631.

Ghosh, S., Karin, M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell*. 2002; 109(Suppl): S81–96.

Giangaspero, F., et al. (2007). Embryonal Tumor – Medulloblastoma *in* Louis, D.N. et al. (ed.) WHO Classification of Tumor of the Central Nervous System, 4ª edição. Lyon: International Agency for Research on Cancer, p. 132-140.

Gilmore, T. D. The Rel/NF- κ B signal transduction pathway: introduction. *Oncogene*. 1999; 18: 6842-6844.

Gilmore, T. D., Garbati, M. R. Inhibition of NF- κ B signaling as a strategy in disease therapy. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2011, v.349, pp. 245–263.

Gordaliza, M., García, P. A., del Corral, J. M., Castro, M. A., Gómez-Zurita, M. A. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicon*. 2004; 44 (4): 441-459.

Grill, J., Bhangoo, R. Recent development in chemotherapy of paediatric brain tumours. *Curr Opin Oncol*. 2007; 19: 612–615.

Grill, J., Sainte-Rose, C., Jouvett, A., Gentet, J.C., Lejars, O., Frappaz, D., Doz, F., Rialland, X., Pichon, F., Bertozzi, A.I., Chastagner, P., Couanet, D., Habrand, J.L., Raquin, M.A., Le Deley, M.C., Kalifa, C. Treatment of medulloblastoma with postoperative chemotherapy alone: an SFOP prospective trial in young children. *Lancet Oncol.* 2005; 6: 573–580.

Gyrd-Hansen, M., Meier, P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nature reviews Cancer.* 2010; 10(8): 561-574.

Hadjiapanayis, C. G., Meir, E. G. V. Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends Mol Med.* 2009; 15(11): 519-530.

Hande, K.R. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European Journal of Cancer.* 1998; 34 (10): 1514-1521.

Helbig, G., Christopherson, K. W. I. I., Bhat-Nakshatri, P., et al. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem.* 2003; 278: 21631–21638.

Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheidereit, C., Strauss, M. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition, *Mol. Cell. Biol.* 1999; 19(4): 2690–2698.

Ho, J., Wong, T., Wai, V., Lui, Y., Umezawa, K., Ho, Y., et al. A small molecule inhibitor of NF-κB, dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), suppresses growth and invasion of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells. *Cancer Letters.* 2010; 287(1): 23-32.

Hoesel, B., Schmid, J. A. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and câncer. *Molecular Cancer.* 2013; 12: 86.

Holm, S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics.* 1979; 6(2): 65–70.

Horiuchi, K., Morioka, H., Nishimoto, K., et al. Growth suppression and apoptosis induction in synovial sarcoma cell lines by a novel NF-kappaB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ). *Cancer letters.* 2008; 272 (2): 336-344.

Houldsworth, J., Mathew, S., Rao, P. H., Dyomina, K., Louie, D. C., Parsa, N., Offit, K., Chaganti, R. S. REL proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma. *Blood.* 1996; 87: 25–29.

Huang, S., DeGuzman, A., Bucana, C. D., Fidler, I. J. Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 2573–2581.

Huang, S., Pettaway, C. A., Uehara, H., Bucana, C. D., Fidler, I. J. Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene.* 2001; 20(31): 4188–4197.

Huber, M. A., Krau, T.N., Beug, H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol.* 2005; 17: 548–558.

Huse, J. T., Holland, E. C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(5):319-31.

Imuro, Y., Nishiura, T., Hellerbrand, C., Behrns, K. E., Schoonhoven, R., Grisham, J. W., et al. NFkappaB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *The Journal of clinical investigation*, 1998; 101(4): 802-811.

Ingham, P. W., Placzek, M. Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. *Nat Rev Genet.* 2006; 7: 841–850.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Câncer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade. / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2008. 220 p.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Câncer infantil. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/infantil>>. Acesso em 5 de fev. 2014.

Jazirehi, A. R., Bonavida, B. Cellular and molecular signal transduction pathways modulated by rituximab (rituxan, anti-CD20 mAb) in non-Hodgkin's lymphoma: implications in chemosensitization and therapeutic intervention. *Oncogene.* 2005; 24: 2121-2143

Jo, H., Zhang, R., Zhang, H., McKinsey, T.A., Shao, J., Beauchamp, R.D., Ballard, D.W., Liang, P. NF-kappa B is required for H-ras oncogene induced abnormal cell proliferation and tumorigenesis. *Oncogene.* 2000; 19: 841–849.

Jordan, P., Carmo-Fonseca, M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci.* 2000; 57: 1229–1235.

Jung, Y., Isaacs, J. S., Lee, S., Trepel, J., Liu, Z.G., Neckers, L. Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor κ B activation. *Biochem. J.*, 2003; 370: 1011–1017.

Kim, J. H., Xu, C., Keum, Y. S., Reddy, B., Conney, A., Kong, A. N. T. Inhibition of EGFR signaling in human prostate cancer PC-3 cells by combination treatment with b-phenylethyl isothiocyanate and curcumin. *Carcinogenesis* vol. 2006; 27(3): 475–482.

Karin, M., Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: 621–663.

Karin, M., Lin, A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol.* 2002; 3: 221–227.

Katsman, A., Umezawa, K., Bonavida, B. Reversal of resistance to cytotoxic cancer therapies: DHMEQ as a chemo-sensitizing and immuno-sensitizing agent. *Drug Resistance Updates.* 2007; 10: 1–12.

Kikuchi, E., Horiguchi, Y., Nakashima, J., Kuroda, K., Oya, M., Ohigashi, T., Takahashi, N., Shima, Y., Umezawa, K., Murai, M. Suppression of hormone-refractory prostate cancer by a novel nuclear factor kappaB inhibitor in nude mice, *Cancer Res.* 2003; 63 (1): 107–110.

Kimura, M., Haisa, M., Uetsuka, H., Takaoka, M., Ohkawa, T., Kawashima, R., Yamatsuji, T., Gunduz, M., Kaneda, Y., Tanaka, N., Naomoto, Y. TNF combined with IFN-alpha accelerates NF-kappaB-mediated apoptosis through enhancement of Fas expression in colon cancer cells. *Cell Death Differ.* 2003; 10: 718–728.

Kimura, N., Miyakawa, Y., Kohmura, K., Umezawa, K., Ikeda, Y., Kizaki, M., et al. Targeting NF-kappaB and induction of apoptosis by novel NF-kappaB inhibitor dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) in Burkitt lymphoma cells. *Leukemia research.* 2007; 31(11): 1529-1535.

Kodaira, K., Kikuchi, E., Kosugi, M., et al. Potent cytotoxic effect of a novel nuclear factor-kappaB inhibitor dehydroxymethylepoxyquinomicin on human bladder cancer cells producing various cytokines. *Urology.* 2010; 75 (4): 805-812.

Kool, M., Koster, J., Bunt, J., Hasselt, N. E., Lakeman, A., van Sluis, P., Troost, D., Meeteren, N. S., Caron, H. N., Cloos, J., Masic, A., Ylstra, B., Grajkowska, W., Hartmann, W., Pietsch, T., Ellison, D., Clifford, S. C., Versteeg, R. Integrated genomics identifies five medullo-blastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One.* 2008; 3: e3088.

Kozakai, N., Kikuchi, E., Hasegawa, M., Suzuki, E., Ide, H., Miyajima, A., Horiguchi, Y., Nakashima, J., Umezawa, K., Shigematsu, N., Oya, M. Enhancement of radiosensitivity by a unique novel NF- κ B inhibitor, DHMEQ, in prostate cancer. *Br J Cancer.* 2012; 107(4): 652-657.

Kucharczak, J., Simmons, M. J., Fan, Y., Gelinas, C. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer—role of Rel/NF- κ B in the regulation of apoptosis. *Oncogene.* 2003; 22: 8961–8982.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680-685.

Lampiasi, N., Azzolina, A., Alessandro, N. D., et al. Antitumor Effects of Dehydroxymethylepoxyquinomicin, a Novel Nuclear Factor-K B Inhibitor in Human Liver Cancer Cells Are Mediated through a Reactive Oxygen Species-Dependent Mechanism. *Molecular Pharmacology.* 2009; 76 (2): 290-300.

Lee, C. H., Jeon, Y. T., Kim, S. H., Song, Y. S. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors*. 2007; 29(1): 19-35.

Lesage, D., Metelev, V., Borisova, O., Dolinnaya, N., Oretskaya, T., Baran-Marszak, F., Taillandier, E., Raphael, M., Fagard, R. Specific covalent binding of a NF-kappaB decoy hairpin oligonucleotide targeted to the p50 subunit and induction of apoptosis. *FEBS Lett*. 2003; 547 (1-3): 115-118.

Liang, C., Park, A. Y., Guan, J. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*. 2007; 2(2): 329-333.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. 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.

Matsumoto, G., Namekawa, J., Muta, M., Nakamura, T., Bando, H., Tohyama, K., Toi, M., Umezawa, K. Targeting of nuclear factor kappaB pathways by dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel inhibitor of breast carcinomas: antitumor and antiangiogenic potential in vivo. *Clin. Cancer Res*. 2005; 11 (3): 1287-1293.

Massimino, M., Casanova, M., Polastri, D., Biassoni, V., Modena, P., Pecori, E., Schiavello, E., De Pava, M. V., Indini, A., Rampini, P., Bauer, D., Catania, S., Podda, M., Gandola, L. Relapse in medulloblastoma: what can be done after abandoning high-dose chemotherapy? A mono-institutional experience. *Childs Nerv Syst*. 2013; 29: 1107-1112.

Massimino, M., Giangaspero, F., Garrè, M. L., Gandola, L., Poggi, G., Biassoni, V., Gatta, G., Rutkowski, S. Childhood medulloblastoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011 Jul;79(1):65-83.

May, M. J., Ghosh, S. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol*. 1997, 8: 63-73.

May, M. J, Ghosh S. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today*. 1998, 19: 80-88.

Meley, D., Spiller, D. G., White1, M. R. H., McDowell, H., Pizer, B., Se´e, V. p53-mediated delayed NF-jB activity enhances etoposide-induced cell death in medulloblastoma. *Cell Death and Disease*. 2010; 1: e41.

Mino, K., Ozaki, M., Nakanishi, K., Haga, S., Sato, M., Kina, M., Takahashi, M., Takahashi, N., Kataoka, A., Yanagihara, K., Ochiya, T., Kamiyama, T., Umezawa, K., Todo, S. Inhibition of nuclear factor-kappaB suppresses peritoneal dissemination of gastric cancer by blocking cancer cell adhesion. *Cancer Sci*. 2011; 102(5): 1052-1058.

Miyake, A., Ishida, T., Yamagishi, M., Hara, T., Umezawa, K., Watanabe, T., Horie, R. Inhibition of active HIV-1 replication by NF-kB inhibitor DHMEQ. *Microbes and Infection*. 2010; 12: 400-408.

Miyanishi, N., Suzuki, Y., Simizu, S., Kuwabara, Y., Bannob, K., Umezawa, K. Involvement of autocrine CXCL12/CXCR4 system in the regulation of ovarian carcinoma cell invasion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010; 403: 154–159.

Morais, C., Gobe, G., Johnson, D. W., Healy, H. Inhibition of nuclear factor kappa B transcription activity drives a synergistic effect of pyrrolidine dithiocarbamate and cisplatin for treatment of renal cell carcinoma. *Apoptosis*. 2010; 15(4): 412–425.

Morotti, A.; Cilloni, D., Pautasso, M.,Messa, F., Arruga, F., Defilippi, I., Carturan, S., Catalano, R., Rosso, V., Chiarenza, A., Taulli, R., Bracco, E.,Rege-Cambrin, G., Gottardi, E., Saglio, G. NF- κ B Inhibition as a Strategy to Enhance Etoposide-Induced Apoptosis in K562 Cell Line. *American Journal of Hematology*. 2006; 81: 938–945.

Nakanishi, C., Toi, M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs, *Nat. Rev. Cancer*. 2005; 5: 297–309.

Naugler, W., Karin, M. NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev*. 2008; 18: 19–26.

Nicholson, R. I., Gee, J. M., Harper, M. E. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 2001; 37 Suppl 4: S9-15.

Nishimura, D., Ishikawa, H., Matsumoto, K., Shibata, H., Motoyoshi, Y., Fukuta, M., Kawashimo, H., Goto, T., Taura, N., Ichikawa, T., Hamasaki, K., Nakao, K., Umezawa, K., Eguchi, K. DHMEQ, a novel NF- κ B inhibitor, induces apoptosis and cell-cycle arrest in human hepatoma cells, *Int. J. Oncol*. 2006; 29(3): 713–719.

Noma, N., Simizu, S., Kambayashi, Y., Kabe, Y., Suematsu, M., Umezawa, K. Involvement of NF- κ B-mediated expression of galectin-3-binding protein in TNF- α -induced breast cancer cell adhesion. *Oncol Rep*. 2012; 27(6): 2080-2084.

Northcott, P. A., Jones, D .T. W., Kool, M., Robinson, G. W., Gilbertson, R. J., Cho, Y. J., Pomeroy, S. L., Korshunov, A., Lichter, P., Taylor, M. D., Pfister, S. M. Medulloblastoma: The End of the Beginning. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(12): 818–834.

Northcott, P., Korshunov, A., Witt, H., Hielscher, T., Eberhart, C., Mack, S., Bouffet, E., Clifford, S., Hawkins, C., French, P., Rutka, J., Pfister, S., Taylor, M. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 1408–1414.

Oeckinghaus, A., Ghosh, S. The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009; 1(4): a34.

Ohnishi, T., Horie, R., Kumasaka, T., Ishida, A., Ishida, T., Yamaguchi, K., et al. In vivo antitumor activity of the NF-kappaB inhibitor dehydroxymethylepoxyquinomicin in a mouse model of adult T-cell leukemia. *Carcinogenesis*. 2005; 26: 1382–1388.

Packer, R. J., Cogen, P., Vezina, G., Rorke, L.B. Medulloblastoma: clinical and biologic aspects. *Neuro Oncol.* 1999; 1: 232–25.

Packer, R. J., Gajjar, A., Vezina, G. Phase III study of craniospinal radiation therapy followed by adjuvant chemotherapy for newly diagnosed average-risk medulloblastoma. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 4202-4208.

Packer, R. J., Rood, B. R., MacDonald, T.J. Medulloblastoma: present concepts of stratification into risk groups. *Pediatr Neurosurg.* 2003; 39: 60–67.

Pajonk, F., Pajonk, K., McBride, W. H. Inhibition of NF-kappaB, clonogenicity, and radiosensitivity of human cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91(22): 1956-1960.

Park, H. L., Kim, I., Lee, K., Choi, J., Park, M., Joo, C., et al. Effects of nuclear factor-kappaB small interfering RNA on posterior capsule opacification. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2010; 51(9): 4707-4715.

Partap, S., Curran, E.K., Propp, J. M., Le, G. M., Sainani, K. L., Fisher, P. G. Medulloblastoma incidence has not changed over time: a CBTRUS study. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2009; 31(12): 970-971.

Pikarsky, E., Porat, R. M., Stein, I., et al. NF-kB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature.* 2004; 431: 461-466.

Polkinghorn, W. R., Tarbell, N. J. Medulloblastoma: tumorigenesis, current clinical paradigm, and efforts to improve risk stratification. *Nat Clin Pract Oncol.* 2006; 4: 295-304.

Poma, P., Notarbartolo, M., Labbozzetta, M., Sanguedolce, R., Alaimo, A., Carina, V., Maurici, A., Cusimano, A., Cervello, M., D'alessandro N. Antitumor effects of the novel NF-κB inhibitor dehydroxymethyl-epoxyquinomicin on human hepatic cancer cells: Analysis of synergy with cisplatin and of possible correlation with inhibition of pro-survival genes and IL-6 production. *International Journal of Oncology* 2006; 28: 923-930.

Pomeroy, S. L., Cho, Y. Molecular fingerprints of medulloblastoma and their application to clinical practice. *Future Oncol.* 2011; 7 (3): 327–329.

Pomeroy, S.L., Sturla, L.M. Molecular biology of medulloblastoma therapy. *Pediatr Neurosurg.* 2003; 39: 299-304.

Qiao, q., Jiang, Y., Li, G. Curcumin improves the antitumor effect of X-ray irradiation by blocking the NF-κB pathway: an in-vitro study of lymphoma. *Anti-Cancer Drugs.* 2012; 23: 597–605.

Rangaswami, H., Bulbule, A., Kundu, G. C. Nuclear factor-inducing kinase plays a crucial role in osteopontin-induced MAPK/IkappaBalpha kinase-dependent nuclear factor kappaB-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. *J Biol Chem.* 2004; 279: 38921–38935.

Ravi, R., Bedi, G. C., Engstrom, L. W., Zeng, Q., Mookerjee, B., Gelinas, C., Fuchs, E.J., Bedi, A. Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat Cell Biol.* 2001; 3: 409–416.

Rayet, B., Gelinas, C. Aberrant rel/NF-kB genes and activity in human cancer. *Oncogene.* 1999; 18: 6938–6947.

Reynolds, C. P.; Maurer, B. J. Evaluating response to antineoplastic drug combinations in tissue culture models. *In: Methods in molecular medicine*, vol 110: Chemosensitivity: Vol 1: *In vitro* assays. Ed. Blumenthal, R.D. Totowa, NJ: Human Press Inc. pp. 173-183, 2005.

Remke, M., Hielscher, T., Northcott, P. A., Witt, H., Ryzhova, M., Wittmann, A., Benner, A., von Deimling, A., Scheurlen, W., Perry, A., Croul, S., Kulozik, A. E., Lichter, P., Taylor, M. D., Pfister, S. M., Korshunov, A. A. Adult medulloblastoma comprises three major molecular variants. *J Clin Oncol.* 2011; 29(19): 2717–2723.

Rogers, H. A, Miller, S., Lowe, J., Brundler, M. A., Coyle, B., Grundy, R. G. An investigation of WNT pathway activation and association with survival in central nervous system primitive neuroectodermal tumours (CNS PNET). *Br J Cancer.* 2009; 100: 1292–1302.

Ronaldson, P. T., Ashraf, T., Bendayan, R. Regulation of multidrug resistance protein 1 by tumor necrosis factor alpha in cultured glial cells: involvement of nuclear factor-kappaB and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways. *Mol Pharmacol.* 2010; 77(4): 644-659.

Rosenblum, M. K., Bilbao, J. M., Ang, L. C. Neuromuscular system. *In: Juan Rosai (ed.). Rosai and Ackerman's Surgical Pathology.* 9th ed. St Louis, Mo: Mosby Co; 2004:2551-2557.

Rossi, A., Caracciolo, V., Russo, G., Reiss, K., Giordano, A. Medulloblastoma: From Molecular Pathology to Therapy. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(4): 971-976.

Ruan, H., Masuda, M., Ito, A., Umezawa, K., Nakashima, T., Yasumatsu, R., Kuratomi, Y., Yamamoto, T., Weinstein, I. B., Komune, S. Effects of a novel NF-kB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), on growth, apoptosis, gene expression, and chemosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Head Neck.* 2006; 28(2): 158-165.

Rutkowski, S., Cohen, B., Finlay, J., Luksch, R., Ridola, V., Valteau-Couanet, D., Hara, J., Garre, M.L., Grill, J. Medulloblastoma in young children. *Pediatr Blood Cancer.* 2010; 54(4): 635-637.

Sarkar, F.H., Li, Y. NF-kappaB: a potential target for cancer chemoprevention and therapy. *Front. Biosci.* 2008; 13: 2950–2959.

Saito, R., Kumabe, T., Sonoda, Y., Kanamori, M., Yamashita, Y., Watanabe, M., Tominaga, T. Combination chemotherapy with ifosfamide, cisplatin, and etoposide for

medulloblastoma: single-institute experience and differences in efficacy for subgroups of medulloblastoma. *Childs Nerv Syst.* 2011; 27: 1399–1406.

Sato, A., Oya, M., Ito, K., Mizuno, R., Horiguchi, Y., Umezawa, K., et al. Survivin associates with cell proliferation in renal cancer cells: regulation of survivin expression by insulin-like growth factor-1, interferon-gamma and a novel NF-kappaB inhibitor. *International journal of oncology*, 2006; 28(4): 841-846.

Schwalbe, E. C., Lindsey, J. C., Straughton, D., Hogg, T. L., Cole, M., Megahed, H., Ryan, S. L., Lusher, M. E., Taylor, M. D., Gilbertson, R. J., Ellison, D. W., Bailey, S., Clifford, S. C. Rapid diagnosis of medulloblastoma molecular subgroups. *Clin Cancer Res.* 2011; 17: 1883–1894.

Semenza, G. L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 2000; 88: 1474–148.

Sen, R., Baltimore, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell.* 1986; 46: 705-716.

Shen, H. M., Tergaonkar, V. NF-kappaB signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy. *Apoptosis.* 2009; 14(4): 348-363.

Shinoda, K., Nakagawa, K., Kosaka, T., Tanaka, N., Maeda, T., Kono, H., Mizuno, R., Kikuchi, E., Miyajima, A., Umezawa, K., Oya, M. Regulation of human dendritic cells by a novel specific nuclear factor-kB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin. *Human Immunology.* 2010; 71: 763–770.

Silva, D. Signaling pathways responsible for cancer cell invasion as targets for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2004; 4: 327–336.

Sjolund, J., Manetopoulos, C., Stockhausen, M. T., Axelson, H. The notch pathway in cancer: differentiation gone awry. *Eur J Cancer.* 2005; 41: 2620–2629.

Spiller, S. E., Logsdon, N. J., Deckard, L., Sontheimer, H. Inhibition of nuclear factor kappa-B signaling reduces growth in medulloblastoma in vivo. *BMC cancer.* 2011; 11(1): 136.

Srivastava, V. K., Nalbantoglu, J. The cellular and developmental biology of edulloblastoma: Current perspectives on experimental therapeutics. *Cancer Biology & Therapy.* 2010; 9(11): 843-852.

Starenki, D. V., Namba, H., Saenko, V. A., Ohtsuru, A., Maeda, S., Umezawa, K., et al. Induction of thyroid cancer cell apoptosis by a novel nuclear factor kappaB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 6821–6829.

Stoffel, A., Levine, A. J. Activation of NF-kappaB by the API2/MALT1 fusions inhibits p53 dependant but not FAS induced apoptosis: a directional link between NF-kappaB and p53. *Cell Cycle.* 2004; 3: 1017–1020.

Suzuki, K., Aiura, K., Matsuda, S., Itano, O., Takeuchi, O., Umezawa, K., Kitagawa, Y. Clin Combined effect of dehydroxymethylepoxyquinomicin and gemcitabine in a mouse model of liver metastasis of pancreatic cancer. *Exp Metastasis*. 2013; 30(4): 381-392.

Tacchini, L., De Ponti, C., Matteucci, E., Follis, R. and Desiderio, M. A. Hepatocyte growth factor-activated NF- κ B regulates HIF-1 activity and ODC expression, implicated in survival, differently in different carcinoma cell lines. *Carcinogenesis*. 2004; 25: 2089–2100.

Tatetsu, H., Okuno, Y., Nakamura, M., Matsuno, F., Sonoki, T., Taniguchi, I., et al. Dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel nuclear factor-kappaB inhibitor, induces apoptosis in multiple myeloma cells in an IkappaBalpha-independent manner. *Mol Cancer Ther*. 2005; 4: 1114–1120.

Tajbakhsh, M., Houghton, P. J., Morton, C. L., Kolb, E. A., Gorlick, R., Maris, J. M., Keir, S. T., Wu, J., Reynolds, C. P., Smith, M. A., Lock, R. B. Initial testing of Cisplatin by the Pediatric Preclinical Testing Program. *Pediatr Blood Cancer*. 2008; 50: 992– 1000.

Tao, Y., Zhang, P., Frascogna, V., Lecluse, Y., Auperin, A., Bourhis, J., Deutsch, E. Enhancement of radiation response by inhibition of Aurora-A kinase using siRNA or a selective Aurora kinase inhibitor PHA680632 in p53-deficient cancer cells. *Br J Cancer*. 2007; 97(12):1664-72.

Taylor, M. D., Northcott, P. A., Korshunov, A., Remke, M., Cho, Y. J., Clifford, S. C., Eberhart, C. G., Parsons, D. W., Rutkowski, S., Gajjar, A., Ellison, D. W., Lichter, P., Gilbertson, R. J., Pomeroy, S. L., Kool, M., Pfister, S. M. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol*. 2012; 123: 465–472.

Taylor, M. D, Lichter, P., Pfister, S. M. FSTL5 is a marker of poor prognosis in non-WNT/Non-SHH medulloblastoma. *J Clin Oncol*. 2011; 29(29): 3852–3861.

Thompson, M. C., Fuller, C., Hogg, T. L., Dalton, J., Finkelstein, D., Lau, C. C., Chintagumpala, M., Adesina, A., Ashley, D. M., Kellie, S. J., Taylor, M. D., Curran, T., Gajjar, A., Gilbertson, R. J. Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol*. 2006; 24(12): 1924-1931.

Togano, T., Sasaki, M., Watanabe, M., et al. Induction of oncogene addiction shift to NF- κ B by camptothecin in solid tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009; 390(1): 60-64.

Togano, T., Watanabe, M., Itoh, K., Umezawa K., Masudad, N., Higashihara, M., Horie, R. Activation of Akt involves resistance to NF- κ B inhibition and abrogation of both triggers synergistic apoptosis in lung adenocarcinoma cells. *Lung Cancer*. 2014; 83: 139–145.

Umezawa, K., Chaicharoenpong, C. Molecular design and biological activities of NF-kappaB inhibitors. *Mol Cells*. 2002; 14(2): 163-167.

Umezawa, K. Inhibition of tumor growth by NF-kappaB inhibitors. *Cancer Sci.* 2006; 97: 990–995.

Watanabe, M., Dewan, M. Z., Okamura, T., Sasaki, M., Itoh, K., Higashihara, M., Mizoguchi, H., et al. A novel NF-kappaB inhibitor DHMEQ selectively targets constitutive NF-kappaB activity and induces apoptosis of multiple myeloma cells in vitro and in vivo. *International journal of cancer.* 2005; 114(1): 32–38.

Watanabe, M., Dewan, M. Z., Taira, M., Shoda, M., Honda, M., Sata, T., Higashihara, M., Kadin, M. E., Watanabe, T., Yamamoto, N., Umezawa, K., Horie, R. IκBα independent induction of NF-κB and its inhibition by DHMEQ in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Laboratory Investigation.* 2007; 87: 372–382.

Watanabe, M., Nakashima, M., Togano, T., Higashihara, M., Watanabe, T., Umezawa, K., Horie, R. Identification of the RelA domain responsible for action of a new NF-kappaB inhibitor DHMEQ. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 376 (2): 310–314.

Watanabe, M., Ohsugi, T., Shoda, M., Ishida, T., Aizawa, S., Maruyama-Nagai, M., Utsunomiya, A., Koga, S., Yamada, Y., Kamihira, S., Okayama, A., Kikuchi, H., Uozumi, K., Yamaguchi, K., Higashihara, M., Umezawa, K., Watanabe, T., Horie, R. Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF-kappaB, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T-cell leukemia. *Blood.* 2005; 106 (7): 2462–2471.

Wong, J. H., Lui, V. W., Umezawa, K., Ho, Y., Wong, E.Y., Ng, M.H., Cheng, S.H., Tsang, C. M., Tsao, S. W., Chan, A. T. A small molecule inhibitor of NF-kappaB, dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), suppresses growth and invasion of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells. *Cancer Lett.* 2010; 287(1): 23-32.

Yasuda, A., Kondoa, S., Nagumoa, T., Tsukamoto, H., Mukudaia, Y., Umezawa, K., Shintani, S. Anti-tumor activity of dehydroxymethylepoxyquinomicin against human oral squamous cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Oral Oncology.* 2011; Available online.

Zurawel, R. H., Allen, C., Wchsler-Reya, R., Scott, M.P., Raffel, C. Evidence that haploinsufficiency of Ptch leads to medulloblastoma in mice. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000; 28: 77-81.

9. Anexos

9. ANEXOS

ANEXO 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Ribeirão Preto, 09 de fevereiro de 2011

Ofício nº 435/2011
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTI-NEOPLÁSICOS DA INIBIÇÃO DO NFκB PELO DHMEQ (DEHYDROXYMETHYLEPOXYQUINOMICIN) EM LINHAGENS CELULARES DE MEDULOBLASTOMA”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 317ª Reunião Ordinária realizada em 07/02/2011 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 14101/2010.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente,

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

Ilustríssimos Senhores
PRISCILA MARIA MANZINI RAMOS
PROF. DR. LUIZ GONZAGA TONE (Orientador)
Laboratório de Oncopediatria – Bloco G

ANEXO 2: manuscrito do artigo a ser publicado resultante da tese (BMC Cancer)

Evaluation of anti-neoplastic effects of NF- κ B inhibition by DHMEQ (Dehidroximetilepoxiquinomicina) in medulloblastoma cell lines

Priscila Maria Manzini Ramos^{1*} - primanzini@yahoo.com.br

Júlia Alejandra Pezuk¹ – juliapezuk@usp.br

Angel Mauricio Castro Guamero¹ - amcgen@gmail.com

Carlos Alberto Scrideli¹ - cascrideli@fmrp.usp.br

Kazuo Umezawa² – umezawa@aichi-med-u.ac.jp

Luiz Gonzaga Tone¹ – lgtone@fmrp.usp.br

1 – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. Av. Bandeirantes, 3900 – Monte Alegre – Ribeirão Preto – SP – Brazil. CEP 14049-900

2 – Department of Molecular Target Medicine Screening, Aichi Medical University. Nagakute, Aichi, 480-1195, JAPAN.

* corresponding author

ABSTRACT

Background: Medulloblastoma is a pediatric cancer of the central nervous system, highly invasive, of embryonic origin, located in the cerebellum. The most common treatments are surgery and chemotherapy, and radiotherapy is only to children older than 3 years old due to its side effects. NF- κ B is a key transcription factor in the regulation of immune response and inflammation process, and it is involved in the transcriptional regulation of a large number of genes related to the tumorigenesis process, and constitutively active in many types of cancer, being an important potential therapeutic target. DHMEQ (Dehidroximetilepoxiquinomicina) is a drug that inhibits the translocation of NF- κ B from the cytoplasm to the nucleus, thus inhibiting its activity as a transcriptional activator. Several studies have shown the antineoplastic effects of DHMEQ in numerous tumor types, however, there is no surveys that have tested their effects in medulloblastoma. **Methods:** the present study evaluated the effects of DHMEQ in UW402, UW473 and ONS-76 pediatric medulloblastoma cell lines through proliferation, clonogenic capacity, apoptosis, invasion and migration assays, besides drug combination and radio sensitization assays. **Results:** the proliferation test results demonstrated a significant decrease in the cell growth, strongly inhibition of the clonogenic capacity and the migration and cell invasion in the three medulloblastoma cell lines. Additionally, increased the level of apoptosis, it was synergistic in combination with other chemotherapeutic agents in most combination points, and radiosensitization strongly the three cell lines. **Conclusions:** the results are congruent with the potential antitumor effect of DHMEQ and pointed clearly the possible use of it as new therapeutic agent to medulloblastoma treatment.

Keywords (3-10): DHMEQ; NF κ B; medulloblastoma; molecular target

Evaluation of anti-neoplastic effects of NF- κ B inhibition by DHMEQ (Dehidroximetilepoxiquinomicina) in medulloblastoma cell lines

RAMOS, P. M. M., PEZUK, J. A., CASTRO-GAMERO, A. M., SCRIDELI, C. A., UMEZAWA, K., TONE, L. G.

Background

Medulloblastoma (MB) is a rapid growth and highly invasive tumor of embryonic origin located in the cerebellum. It is the most common brain tumor in children and, according to the Central Brain Tumor Registry of the United States this tumor accounts for approximately 20% of all intracranial tumors in children and 40% of all pediatric posterior fossa tumors [1]. Disease incidence is approximately 0.6/100,000 in patients 0-19 years old [2]. Standard treatment involves surgery and chemotherapy and they are major procedures for adults and children. Radiotherapy is applied only to patients with more than 3 years old due to their side effects [3; 4; 5; 6; 7]. The overall survival rates for patients with MB reached 70-80% using protocols that combine these three treatment approaches [8]. The great dilemma of aggressive treatments involving surgery followed by craniospinal radiotherapy and chemotherapy is the risk of neurocognitive sequelae in growth and endocrine system, leading the search for treatments with low toxic effects that reduce or eliminate radiation, which causes significant late effects in patients with long survival [9; 10].

NF- κ B is a heterodimer of Rel family proteins including p65, RelB, cRel, p50 and p52. There are canonical NF- κ B mainly consisting of p65/ p50 heterodimers and non-canonical NF- κ B mainly consisting of RelB/p52. Canonical NF- κ B is important for natural immunity and general inflammation, and its mechanism of activation has been extensively studied. On the other hand, non-canonical NF- κ B is more important in B-cell maturation and the etiology of autoimmune diseases [11]. Moreover, recent reports have suggested that the non-canonical pathway is also important in cancer progression [12]. Activation of NF- κ B in cancer cells can increase its progression through the increased of cancer cell proliferation, resistance to apoptosis and increased metastatic activity [13].

More than 800 therapeutic compounds that inhibit either activation or function of NF- κ B have been identified, including a variety of natural and synthetic molecules [14] which in turn have shown growth inhibitory effects in this high grade tumor [15; 16; 17; 18; 19; 20].

Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) is a newly synthesized small molecule that inhibits NF- κ B by binding directly to components of the canonical and non-canonical pathway of the transcription factor to prevent its binding to DNA, inhibiting its translocation to the nucleus [21]. This drug has been shown to be effective in attenuating the transcription of target genes of this transcription factor, leading to tumor cell apoptosis in several types of cancer such as prostate, thyroid, breast, multiple myeloma and head and neck [22]. As constitutive activation is present in a wide variety of tumor types outros [23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35] but it is the first time that DHMEQ effects are showed in medulloblastoma cell lines.

Methods

Cell culture

UW402 and UW473 of MB pediatric cell lines, kindly granted by Dr. Michael S. Bobola (Seattle Children's), and ONS-76 also pediatric MB cell line, acquired the Bank of Cells of Rio de Janeiro (BCRJ UFRJ) were used. UW402 and UW473 were cultured in HAM-F10 and ONS-76 in RPMI medium, both supplemented with either 100 mg/ml of streptomycin, 100 U/ml of penicillin and 10% fetal bovine serum (FBS) (pH 7.2-7.4), in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. For maintenance purposes, all cell lines were passaged once or twice a week using 0.05% trypsin in 0.02% EDTA. The medium was changed twice a week under all culture conditions.

Chemical and treatment

DHMEQ was synthesize as previously described [36] and was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO; Mal-linckrodt Chemical Works, St Louis, Missouri, USA) at a stock concentration of 10 mg/mL.

For combinatorial treatments, powdered Cisplatin (CDDP) was dissolved in saline at 1.66 mM/L. Temozolomide (TMZ) and Etoposide was diluted in DMSO according to the manufacturer's instructions, in a stock solution of 200mM and 20mM, respectively. The three drugs were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Corresponding control cultures received an equal volume of solvent (final concentration in culture medium was always less than 0.2%).

Cell proliferation assay

Inhibitory effects of DHMEQ on cell proliferation were determined using the XTT assay (XTT II; Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). Briefly, equal amounts of cells were seeded in 96-well flat-bottom plates (3,000 cells/well) and allowed to grow overnight. Subsequently, cells were treated with different concentrations of DHMEQ (2.5, 5, 7.5, 10 and 20 μ g/mL). After treatment, the culture medium was removed and replaced with medium containing 10 μ L of XTT dye (3mg/mL) in each well. The plates were incubated for 3h at 37°C and results were interpreted by using an iMark microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Cells treated with the same concentrations of DMSO served as controls.

Clonogenic capacity assay

The effects of DHMEQ on clonogenic capacity were evaluated according to Franken's protocol [37]. Single cell suspensions of 500 cells were seeded in 6-well plates and treated with DHMEQ at different concentrations (2.5, 5, 7.5, 10, and 20 μ g/ml) for 48h. After that period, the culture medium was replaced with drug-free medium. The cell cultures were incubated for 7-10 days, and then the colonies were fixed with methanol and stained with Giemsa. Only colonies with >50 cells were counted. The plating efficacy (PE) that represents the percentage of cells seeded which grow in to colonies under a specific culture condition of a given cell line, was calculated as the percentage of counted colonies/seeded cells * 100. The surviving fractions (SF) were determined as the number of colonies formed for a specific treatment/ number of cells seed * PE [37].

Apoptosis

Apoptotic cell death was determined by labeling with annexin V fluorescein isothiocyanate (BD Biosciences Pharmigen, San Jose, California, USA). Briefly, after drug treatment, 100,000 cells were trypsinized and centrifuged at 1000 rpm for 5 min at 4°C, washed with ice-cold PBS, and then resuspended in 300ml of 1x annexin V binding buffer (BD Biosciences Pharmigen). Cells were stained with 5ml annexin V fluorescein isothiocyanate and 50ml of a solution of 50 mM/L propidium iodide, and incubated at room temperature in the dark. The samples were analyzed using a BD FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences Pharmigen).

Cell migration assay

To measure the effects of DHMEQ on cell migration, we used the Liang protocol [38], with slight modifications. Briefly cells were grown to confluence, scratch wounds were then created using a pipet tip (200 μ L), and the wound site was photographed digitally at time zero. Cells were then treated with different concentrations of DHMEQ and subcultured for 24h in medium supplemented with only 1% FBS. This low percentage of serum is used in the growth media to minimize cell proliferation and to prevent apoptosis and/or cell detachment. After that period, cells were fixed with methanol and briefly stained with Giemsa. Cell migration was visualized at x100 magnification by light microscopy and photographed using a coupled Moticam 1000 digital camera (Motic Instruments Inc., Richmond, British Columbia, Canada). Cell migration rate was calculated as the distance (nanometers) travelled by the cells in this area over time. Data are the averages of triplicate determinations.

Cellular invasion

Briefly, the three cell lines were treated with DHMEQ in a dose-dependent manner for 48h in a 75 cm² flask and transferred to the top of Matrigel-coated invasion chambers (24-well insert, 8- μ m pore size; Becton Dickinson & Co., NJ, USA) in a serum-free HAM-F10. Medium containing 10% fetal calf serum was added to the lower chamber as a chemoattractant. After 22h of incubation, noninvading cells were removed from the upper surface of the membrane by scrubbing with moistened swabs. The invasive cells attached to the lower surface of the membrane insert were fixed in 100% methanol for 10min and stained with Giemsa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Membranes were then removed from the insert housing with scalpel blade, placed on a microscope slide, mounted with Entellan, and cover slipped. Invading cells were photographed under the microscope at 100x magnification and counted with the ImageJ software.

Drug combination assay

Subconfluent cells were exposed to 10 μ g/mL of DHMEQ simultaneously to different doses of CDDP (1.25, 2.5, 5 and 10 μ M), TMZ (500, 1000, 2000 and 4000 μ M) and Etoposide (2, 4, 8 and 16 μ M), for 48h to UW402 and UW473 lines, and 72h to ONS-76 line. One outlier point was excluded of the analysis. Drug interactions

were analyzed using the CalcuSyn software package (BioSoft), which is based on the median effect model of Chou and Talalay [39]. A combination index (CI) score of 1 indicated an additive drug interaction, whereas a CI score more than 1 was antagonistic, and a score less than 1 was synergistic. CalcuSyn software (BioSoft) was also used to calculate the dose reduction index (DRI) of drug combinations. The DRI estimates the extent to which the dose of one or more agents in the combination can be reduced to achieve effect levels that are comparable with those achieved with single agents. Drug combinations that act synergistically can be identified as those exhibiting significant dose reduction values (i.e. a given measured effect will be observed at dose(s) significantly lower than expected on the basis of single-agent activities). The potential chemosensitizing effect of DHMEQ was evaluated by XTT assay, previously described.

Cell Irradiation

To test the effects of DHMEQ on radiosensitizing the cell lines, clonogenic assay were performed. Single cell suspensions of 500 cells were seeded in 6-well plates and treated with DHMEQ (10 μ g/mL) for 24h. After that period, the culture medium was replaced with drug-free medium, and cells were exposed to 2, 4, and 6 Gy of irradiation delivered by a γ -rays ^{60}Co source at a dose rate of about 0.47Gy/min, using a Gammatron S-80 equipment (Siemens Medical Systems Inc., Iselin, NJ, USA) at the University Clinical Hospital (FMRP-USP). The radiation dose enhancement ratio (DER) by DHMEQ was calculated using the following formula: $\text{DER} = (\text{surviving fraction at an indicated dose of radiation alone})/(\text{surviving fraction at an indicated dose of radiation} + \text{DHMEQ})$. Dose enhancement ratio = 1 denotes an additive radiation effect and $\text{DER} > 1$ a supraadditive effect as against a subadditive effect in the case of $\text{DER} < 1$ [40].

Statistical analysis

Statistical analyses were performed by using the SigmaStat software (Jandel Scientific Company, SanRafael, CA, USA). Two-Way Repeated Measures Analysis of Variance (ANOVA) followed by the Holm-Sidak Pairwise Multiple Comparison was used to establish whether significant differences existed between groups. All tests were carried out for $\alpha = 0.05$. Effective concentrations (IC_{50}) were analyzed using the CalcuSyn software v2.0 (Biosoft, Ferguson, MO). This program provides a measure

of the combined drug interaction by the generation of a combination index (CI) value. The CI value is based on the multiple drug-effect equation of Chou and Talalay [41] and defines the drug interactions as synergistic CI value <1 , additive CI value $=1$, or antagonistic CI value >1 . Calcosyn software was also used to calculate the dose reduction index (DRI) of drug combinations which estimates the extent to which the dose of one or more agents in the combination can be reduced to achieve effect levels that are comparable with those achieved with single agents [41].

Results

DHMEQ inhibits cell proliferation in MB cell lines

DHMEQ significantly inhibited cell proliferation in dose- and time-dependent manner in the three MB cell lines when compared to DMSO ($p < 0.05$) control. We observed a statistically significant difference in 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$ treatments at 24 hours for UW402 and UW473 lines. At 48 and 72h, there was significant reduction in 5 $\mu\text{g/mL}$ treatment for UW402 and 7.5 $\mu\text{g/mL}$ for UW473, compared to DMSO. For ONS-76 there was statistically significant difference at all doses and treatment times. This trial also provided the IC_{50} value, which was set at the time of 48h 10 $\mu\text{g/mL}$ for UW402 and UW473 and 72h for ONS-76 cell line.

Figure 1. Cell proliferation in the UW402 cell line. The assay was performed in 24, 48 and 72 hours at doses of 2.5, 5, 7.5, 10 and 20µg/mL. The height of the bars indicate the percentage of proliferation. The (*) indicates statistically significant dose ($p < 0.05$) within each time compared with DMSO.

Figure 2. Cell proliferation in the UW473 cell line. The assay was performed in 24, 48 and 72 hours at doses of 2.5, 5, 7.5, 10 and 20µg/mL. The height of the bars indicate the percentage of proliferation. The (*) indicates statistically significant dose ($p < 0.05$) within each time compared with DMSO.

Figure 3. Cell proliferation in the ONS-76 cell line. The assay was performed in 24, 48 and 72 hours at doses of 2.5, 5, 7.5, 10 and 20µg/mL. The height of the bars indicate the percentage of proliferation. The (*) indicates statistically significant dose ($p < 0.05$) within each time compared with DMSO.

Apoptosis

After 48h treatment with DHMEQ, there was a statistically significant increased in apoptosis rate ($p < 0.05$) at doses of 15 and 20µg/mL in UW402, at the doses 10, 15 and 20µg/mL in UW473 strain and at doses of 5, 10, 15 and 20µg/mL in ONS-76 cell line, compared to DMSO control. The concentration of 20µg/mL of DHMEQ increased to approximately 50, 17 and 31% of apoptosis in UW402, UW473 and ONS-76 cell lines, respectively.

Figure 4: Percentage of apoptosis in Annexin V and FITC stain in the UW402, UW473 and ONS-76 cell lines. Annexin labeled cells and Annexin and propidium iodide labeled cells were considered. The assay was performed with treatment for 48h at doses of 2.5, 5, 10, 15 and 20µg/mL. The (*) indicates statistically significant dose ($p < 0.05$) compared with DMSO.

Clonogenic capacity

DHMEQ inhibited in a dose-dependent manner the formation and progression of colonies after 48h of treatment, and it was statistically significant ($p < 0.05$) at doses of 10 and 20µg/mL for UW402, 10 and 20µg/mL for UW473 and 5, 10 and 20µg/mL for ONS76 cell line. The results were analyzed using the fractional survival (FS).

Figura 5: Fraction survival in clonogenic capacity assay in UW402, UW473 and ONS-76 assay. The assay was performed with treatment for 48 hours at doses of 2.5, 5, 10 and 20µg/mL. Colonies were considered containing at least 50 cells. The (*) indicates statistically significant dose ($p < 0.05$) compared with DMSO.

Migration and Invasion

DHMEQ efficiently inhibited cell migration and invasion in the three MB cell lines studied. In Wound Healing assay there were significant differences ($p < 0.05$) compared to DMSO control at concentrations of 7.5 to 10µg/mL in UW402. UW473 and ONS-76 cell lines showed the same statistical difference significant for all treatments. There was no statistically significant difference between the highest dose of DHMEQ (10ug/mL) and T0 control (time zero) when the test was fixed and photographed immediately after wound be made, indicating that the level of migration between them is similar, or that is, the drug effectively inhibits cell migration. The results of the invasion assay showed decreased ability of cells to invade a new environment after overcoming a matrigel membrane, with a significant difference ($p < 0.05$) at all concentrations (2.5, 5, 10 and 20µg/mL) for UW402 and ONS-76, and at 5, 10 and 20µg/mL to UW473 cell line, compared to DMSO.

Figure 6. Analysis of cell migration in UW402, UW473 and ONS-76 cell lines. The assay was performed 24h treatment at doses of 2.5, 5, 7.5, 10 and 20µg/mL with culture medium supplemented with 1% serum. The (*) indicates statistically significant dose ($p < 0.05$) compared with DMSO, and T0 is the time zero where no migration.

Figure 7: Invasion assay in UW402, UW473 and ONS-76 cell lines in 24h of treatment at doses of 2.5, 5, 10 and 20µg/mL with culture medium supplemented with 1% serum. The height of the bars represents the number of cells that pierced the wall

and invaded the other side of the matrigel membrane. The (*) shows significant differences ($p < 0.05$) compared to DMSO.

Chemosensitizing

To determine whether DHMEQ sensitizes MB cell lines to conventional chemotherapy drugs, we measured the effects of combined treatments. As the cell lines were sensitive to three drugs and considering that low concentrations of chemotherapy are most practical for clinical use, we aimed to use the lowest possible dose in these experiments. In this context, cells were exposed to 10mg/ml DHMEQ and to low concentrations of either CDDP, TMZ and Etoposide. As shown in Table 2, DHMEQ acted synergistically ($CI < 1$) in UW402 and ONS-76 cell lines in the three drugs (except in combination with 8uM of Etoposide in UW402 line). The same combinations in UW473 cell line were synergic only with low doses of TMZ. DRI values obtained with these drug combinations were the highest for ONS-76, whose combination with DHMEQ can reduce in 6-fold the dose of TMZ, CDDP 10-fold and 220-fold the dose of Etoposide. Another interesting observations is the lowest concentration of the drug, the higher is the DRI value. These results showed that DHMEQ (10mg/ml) acts synergistically with TMZ in the three MB cell lines and with CDDP and Etoposide in the UW402 e ONS-76 MB cell lines.

Table 1. CI (combination index) e DRI (dose reduction index) to different combination points of 10ug/mL of DHMEQ with different doses of Cisplatin (CDDP), Temozolomide (TMZ) and Etoposide (ETOP) in the UW402, UW473 and ONS-76 cell lines. $CI=1$ means additive effect, $CI<1$ means synergic effect and $CI>1$ means antagonist effect.

	DHMEQ ($\mu\text{g/mL}$)	CDDP (μM)	CI	DRI CDDP	TMZ (μM)	CI	DRI TMZ	ETOP (μM)	CI	DRI ETOP
UW402	10	1.25	0.806	4.063	500	0.132	11.987	2	0.892	2.686
		2.5	0.731	3.042	1000	0.188	6.864	4	0.853	2.526
		5	0.830	1.977	2000	0.313	3.651	8	1.090	1.537
UW473	10	1.25	1.283	1.924	500	0.457	3.763	2	1.524	1.322
		2.5	1.136	1.676	1000	0.675	2.023	4	1.806	0.923
		10	2.312	0.540	2000	1.061	1.119	8	1.545	1.079
ONS76	10	1.25	0.316	10.585	500	0.630	6.312	2	0.230	220.308
		2.5	0.402	5.413	1000	0.738	3.412	8	0.236	60.247
		10	0.786	1.649	2000	0.881	2.035	16	0.226	39.742

Radiosensitizing

After 48h pretreatment with 10µg/mL of DHMEQ cells were irradiated with 2, 4 and 6 Gy of γ -radiation and there was a significant reduction of clonogenic capacity in the three cell lines. The result is given as the ratio of the group suffered no drug radiation, by that suffered radiation after treatment with the drug (DER). The DER value indicates how much the treatment with the drug was more effective than the use of radiation only (Table 2).

Table 2. DER values in UW402, UW473 and ONS-76 cell lines at the doses of 2, 4 and 6 Gy after the treatment with 10µg/mL of DHMEQ for 48h. *DER= radiation/radiation + DHMEQ

	DER*		
	UW402	UW473	ONS-76
2Gy	1.71	1.22	16.8
4Gy	1.97	1.36	76.4
6Gy	2.68	1.48	625

Discussion

The progress in the development of cancer treatment in children has been significant over the past four decades. It is estimated that around 70% of children cancer can be cured if diagnosed early and treated in specialized centers [42]. The great dilemma of aggressive treatments is the risk of neurocognitive sequelae in growth and endocrine system, leading the search for treatments with low toxicity. DHMEQ is a newly synthesized small molecule that inhibits the NF- κ B by binding directly to components of the canonical and non-canonical pathway transcription factor preventing its binding to DNA, and inhibiting its translocation to the nucleus [21]. Aberrant signaling and increased activity of NF- κ B has been widely reported in cancer cells, with implications in the spread of metastatic tumors [43; 44].

The inhibitory effect of DHMEQ in different types of tumors has been reported in several papers including thyroid, prostate, breast, hepatocellular, nasopharyngeal and urothelial carcinomas, adult T leukemia cells, multiple myeloma, B cell lymphoma, synovial sarcoma, melanoma uveal, gastric cancer, glioblastoma, lung cancer, among others [23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35].

In this study, the cell proliferation assay was performed at different doses and times, showing the effectiveness of the drug in inhibiting proliferation in all three cell lines (UW402, UW473 and ONS-76), reaching approximately 70% in average inhibition of proliferation at the highest concentrations of the drug. The ONS-76 line was more sensitive, with a statistically significant inhibition for the three times (24, 48 and 72h) since the lowest dose used. Several studies tested the antiproliferative effect of inhibition of NF- κ B in different tumor types corroborating the results of this study. Ho et al. [45] demonstrated a dose-dependent growth inhibitory effect in nasopharyngeal carcinoma cell lines. Sato et al. [46] cultivated KU19-20 cell line, of renal carcinoma, for 48h and observed inhibition of cell proliferation in a dose-dependent manner. In another study, Yasuda et al. [47] provided the first evidence that the drug DHMEQ significantly inhibited growth of both cell lines of oral squamous cell carcinoma. The work of Castro-Gamero et al. [48] also showed decreased proliferation time and dose-dependent in two cell lines of osteosarcoma, MG-63 and HOS, after treatment with DHMEQ.

The apoptosis assay also showed increase rate of cell death in the three cell lines, reaching values close to 50, 31 and 18% of apoptosis in the UW402, UW473 and ONS-76 cell lines, respectively, at the highest concentration of the drug used (20 μ g/mL). Furthermore, 10 μ g/mL of DHMEQ in UW402 cell line achieve the same percentage of apoptosis that UW473 cell line in a higher dose. ONS-76 cell line, more sensitive, showed a statistically significant increase from the dose 5 μ g/mL.

Lampiasi et al. [30] demonstrated that DHMEQ promotes the generation of reactive oxygen species (ROS) causing inhibition in cell growth and proliferation, leading to increased apoptosis. The work of Kimura et al. [49] showed that DHMEQ inhibited proliferation and induced apoptosis in human Burkitt lymphoma HS-Sultan and Daudi cell lines, followed by activation of caspase-3. Apoptosis was confirmed by annexin V/PI staining and the appearance of apoptotic bodies in these cell lines by Giemsa staining. These results were consistent with other studies that demonstrated that DHMEQ induces apoptosis through caspase-dependent pathway in several types of cancer such as prostate, breast, squamous cell head and neck, myeloma, adult T-cell leukemia, glioblastoma and osteosarcoma [23; 24; 25; 34; 48; 50; 51; 52;]. In the Brassesco et al. [34] work, five out of the six glioblastoma cell lines analyzed, showed increase apoptosis rate after 48h of treatment with 20 μ g/mL of

DHMEQ accompanied by increased levels of caspase-3 activity and reduced expression of genes *BCL2*, *BCL-XL* and *XIAP*.

The ability of a cell to form colonies is a pre requisite for metastasis happens because after the cells migrate, they still need to retain the ability to colonize the new environment. This makes the assessment of clonogenic capacity an important test to analyze the potential targets cancer treatment [53]. DHMEQ was significantly effective in preventing the formation and the progression of colonies in the highest concentrations tested (10 and 20µg/mL) with 48h of treatment to UW402 and UW473 cell lines. The ONS-76 cell line showed greater sensitivity to the drug, which showed significantly effectiveness in preventing the formation and progression of colonies from the dose of 5µg/mL with 48h treatment.

Pajonk et al. [54] showed in PC3 prostate carcinoma cell lines and HD-MYZ Hodgkin's lymphoma transduced with adenovirus vector containing the suppressor gene IκB, a blocking of NF-κB, a considerable reduction in clonogenicity. Bentires-Alj et al. [55] investigated the effects of inhibition of NF-κB in clonogenic survival in HCT15-H and HCT15-79 colon carcinoma cell lines transfected by a plasmid containing a mutant IκB inhibitor noninducible treated with Daunomycin and TNF in different concentrations for 48 hours, with a reduction of clonogenic capacity in both cell lines. In the work of Brassesco et al. [34], DHMEQ significantly inhibited colony formation in all tested concentrations (2.5-10µg/mL) after 48h of treatment in glioblastoma cell lines, and Castro-Gamero et al. [48], showed that DHMEQ inhibited colony formation in HOS osteosarcoma cell line at a dose of 10µg/mL, also after 48h of treatment.

The scratch assay is a simple and direct method to study cell migration. The migration test for ONS-76 and UW473 cell lines showed a significant reduction in cell migration with a statistically significant difference from the lowest concentration of the drug (2.5mg/mL). UW402 cell line showed decreased migration statistically significant at doses of 7.5 to 10µg/mL. In agreement with these results, Park et al. [56] reported the effect of NF-κB inhibition by siRNA in the cell migration assay in lens epithelial cells and found a high degree of cell migration suppression in HLE B-3 cell line. Castro-Gamero et al. [48] and Brassesco et al. [34] showed significant inhibition of cell migration by the same assay in osteosarcoma and glioblastoma cell lines, respectively. DHMEQ also reduced migration in the HK1 and HONE-1 cell lines of nasopharyngeal carcinoma in 72 and 43%, respectively [22].

The spread of tumor cells to distant organs and their proliferation in these sites is a hallmark of tumor progression, being almost invariably associated with a fatal disease development [57]. The invasion assay based on a matrix of Matrigel showed statistically significant inhibition of tumor invasion at all doses of DHMEQ for the UW402 and ONS-76 cell lines, and the doses of 5, 10 and 20µg/mL for UW473 cell line. Suzuki et al. [58] demonstrated in a recent survey that DHMEQ inhibited cell invasion in a mouse model of liver metastasis of pancreatic cancer, especially in combination with other drugs. Huang et al. [59] showed that the suppression of NF-κB in human prostate cancer cells by transfection of IκBαM inhibits their tumorigenic and metastatic properties in nude mice by suppressing angiogenesis and invasion. The same authors emphasized in a previous work of the group in metastatic melanoma cell human, which decreased angiogenesis and metastasis observed after blocking the activity of NF-κB [60]. Castro-Gamero et al. [48] showed 36 and 24% inhibition of invasion on MG-63 and HOS osteosarcoma cell lines, respectively, using the 10µg/mL DHMEQ and, Brassesco et al. [34] showed inhibition between 48 and 97% cell invasion in six cell lines of glioblastoma.

Combination of drugs is a widely used practice in the fight against cancer and the vast majority of the combinations currently used have been developed empirically. As an increasing number of new drugs increases the number of possible combinations almost exponentially. The development of robust pre-clinical tests to assess drug combination enables cost reduction in the development of clinically useful combinations. This study combined DHMEQ with the drugs Cisplatin, Etoposide and TMZ in order to verify the dose reduction index of these drugs, since they cause side effects, contrary to what has been shown with DHMEQ *in vivo* studies.

The combination of 10µg/mL of DHMEQ with various doses of Cisplatin was synergistic for UW402 and ONS-76 cell lines (except in the higher dose of Cisplatin in UW402 cell line), with significant reduction of dose reduction index for both cell lines, reaching four-fold to UW402 and 10-fold to ONS-76. In UW473, the combination was antagonistic, showing little benefit to this cell line. Poma et al. [61] found a synergistic effect in combination with Cisplatin in hepatocellular carcinoma cell lines. Likewise, Ruan et al. [62] found that DHMEQ synergistically enhances the cytotoxic effects of Cisplatin in two squamous carcinoma of the head and neck cell lines. Castro-Gamero et al. [48] also showed synergistic effect of DHMEQ and

Cisplatin in osteosarcoma cell lines and hypothesizes that DHMEQ prevent any possibility of mediated Cisplatin resistance.

DHMEQ in combination with TMZ resulted synergistic combination for almost all points of combination in the three cell lines (except higher dose of TMZ in cell lines UW402 and ONS-76, where the combination showed additive). The dose reduction index was important, especially for being higher in smaller doses of TMZ, reaching 11-fold in UW402, three-fold in UW473 and six-fold in ONS-76 cell line. Caporali et al. [63] combined inhibition of RelA by siRNA and TMZ and found a significant increase in the sensitivity of HCT116 (colorectal cancer) and M10 (metastatic melanoma) drug cells to TMZ, leading to believe that inhibition of the transcription factor caused by DHMEQ would have the same effect of sensitization to TMZ and consequent dose reduction of this drug. The work of Chen et al. [64] showed a synergistic antitumor effect of the combination Celastrol (an inhibitor of NF- κ B) and TMZ in melanoma cells. Brassesco et al. [34] combined DHMEQ and TMZ in glioblastoma cell lines and observed increased sensitivity of the cell lines to TMZ, evidenced by the proliferation assay and activation of caspase-3.

DHMEQ and Etoposide in combination had different results for each cell line. In UW402 the combination was synergistic on lower doses of Etoposide, with a tendency to antagonism with dose increasing and dose reduction index reaching 2.6-fold. The combination to UW473 was completely antagonistic, and it proved to be advantageous. In ONS-76 cell line, the combination with DHMEQ was synergistic at all points, with considerable dose reduction index of Etoposide, reaching 220-fold. Meley et al. [65] reported in their study that there is a resistance of different MB cells to treatment with Etoposide and they suggest a possible mechanism involving activation of the NF- κ B pathway by this drug. In this work, the authors showed a protection to the cells of MB using different inhibitors of the NF- κ B, favoring apoptosis induced by Etoposide. Morotti et al. [66] showed that different inhibitors of this transcription factor also stimulate Etoposide-induced apoptosis in K562 cells. Katsman et al. [67] reported that treatment of lines Ramos and Daudi by DHMEQ sensitized to Cisplatin and Etoposide. A survey presented the combination of Etoposide with DHMEQ [68] in Hodgkin/Reed-Sternberg (H-RS) cells and showed a reduction in cell viability in KMH2 cell line, well as increased levels of apoptosis using DHMEQ with topoisomerase inhibitor drugs. Thus, the work showed that DHMEQ accentuates the effects of cytotoxicity of inhibitors etopoisomerases from inhibition of

the transcription factor NF- κ B, agreeing with the results observed for the MB cell lines under study.

Radiation therapy is a widely used technique in the treatment of MB, but it can causes long-term side effects, and it is only used in children over 3 years old. The studies of new drugs and their potential radio-sensitizing features may help in the treatment of pediatric tumors of the nervous system. The results showed that the radiation used with the drug was 1.71 to 2.68-fold more effective on UW402, 1.22 to 1.48-fold in UW473 and 16.8 to 625-fold to ONS-76 cell line. Baldwin [69] reported that NF- κ B inhibition enhances ionizing radiation, in a review of the transcription factor. Qiao et al. [70] used Curcumin, another inhibitor of NF- κ B, to potentiate the effects of radiation on Burkitt's lymphoma cells. In a recent work, Kozakai et al. [71] showed that DHMEQ combined with ionizing radiation in prostate cancer cell lines highlights the inhibition of clonogenic capacity of cell growth and markedly reduces tumor volume in an *in vivo* assay. Brassesco et al. [34] showed that pre-treatment with 10 μ g/mL DHMEQ sensitized glioblastoma cell lines to treatment with ionizing radiation.

Conclusions

This study showed the antineoplastic effects of DHMEQ in MB cell lines through the observation of decreased proliferation, clonogenic capacity, migration, invasion, and increased rate of apoptosis. In addition, also showed the beneficial effects of the drug combination with other chemotherapeutic and radiation. The results pointed clearly the possible use of DHMEQ as new therapeutic agent to MB treatment and, reinforce the importance and utility of pre-clinical analysis of potential drugs. Molecular and *in vivo* studies of DHMEQ effects MB cell lines may contribute to a greater understanding of the action of DHMEQ and approach the drug to patients resistant to current treatments used.

List of abbreviations

µg	Microgram
µm	Micrometer
µM	Micromolar
µL	Microliter
ANOVA	Analysis of Variance
BCRJ	Cell bank of the Rio de Janeiro
°C	Degrees celsius
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry of the United States
CDDP	Cisplatina
CI	Combination index
cm ²	Square centimeter
CO ₂	Carbon dioxide
DER	Dose enhancement ratio
DHEMQ	Dehidroximetilepoxiquinomicina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid
DRI	Dose reduction index
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ETOP	Etoposide
FBS	Fetal bovine sérum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FMRP	Ribeirão Preto Medical School, University Of São Paulo
FS	Fractional survival
Gy	Gray
H	Hours
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration
INCA	Instituto National Cancer
L	Liter
MB	Meduloblastoma
Mg	Milligram
Min	Minutes
mL	Milliliter

mM	Millimolar
NF-kB	Nuclear Fator kappa B
PBS	Phosphate Buffer Saline
PE	Plating efficacy
ROS	Reactive oxygen species
RPM	Rotations per minute
SF	Surviving fractions
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
T0	Time zero
TMZ	Temozolomida
UFRJ	Federal University of Rio de Janeiro
U	Unit
USA	United States of America
USP	University of São Paulo

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

PMMR, AMCG and LGT participated equally in the design of the study. PMMR did most of the laboratory experiments. JAP contributed acquisition of part of the experiments and the revision of the manuscript. PMMR and JAP analyzed the data. KU provided the drug (DHMEQ). PMMR, JAP, AMCG, KU, CAS and LGT discussed the results. PMMR and LGT wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors are grateful to Rosane Gomes de Paula Queiroz and Veridiana Kill Suazo for their help in technical suport; Dr. Harley Francisco de Oliveira for his help in radiation assay; Patrícia Vianna Bonini Palma for her help in apoptosis assay; Financial support for this study was provided by FAPESP, CNPq and FAEPA.

References

- [1] CBTRUS, Central Brain Tumor Registry of the United States (2007-2008). Primary brain tumors in the United States, Statistical Report (2000-2004), Years of Data Collected. Chicago: Author.
- [2] Partap, S, Curran, EK, Propp, JM, Le, GM, Sainani, KL, Fisher, PG: **Medulloblastoma incidence has not changed over time: a CBTRUS study.** *J Pediatr Hematol Oncol* 2009; **31(12)**: 970-971.
- [3] Packer, RJ, Cogen, P, Vezina, G, Rorke, LB: **Medulloblastoma: clinical and biologic aspects.** *Neuro Oncol* 1999; **1**: 232–25.
- [4] Packer, RJ, Rood, BR, MacDonald, TJ: **Medulloblastoma: present concepts of stratification into risk groups.** *Pediatr Neurosurg* 2003; **39**: 60–67.
- [5] Grill, J, Sainte-Rose, C, Jouvet, A, Gentet, JC, Lejars, O, Frappaz, D, Doz, F, Rialland, X, Pichon, F, Bertozzi, AI, Chastagner, P, Couanet, D, Habrand, JL, Raquin, MA, Le Deley, MC, Kalifa, C: **Treatment of medulloblastoma with postoperative chemotherapy alone: an SFOP prospective trial in young children.** *Lancet Oncol* 2005; **6**: 573–580.
- [6] Geyer, JR, Spoto, R, Jennings, M, Boyett, JM, Axtell, RA, Breiger, D, Broxson, E, Donahue, B, Finlay, JL, Goldwein, JW, Heier, LA, Johnson, D, Mazewski, C, Miller, DC, Packer, R, Puccetti, D, Radcliffe, J, Tao, ML, Shiminski-Maher, T: **Multiagent chemotherapy and deferred radiotherapy in infants with malignant brain tumors: a report from the children's cancer group.** *J Clin Oncol* 2005; **23**: 7621–7631.
- [7] Crawford, JR, MacDonald, TJ, Packer, RJ: **Medulloblastoma in childhood: new biological advances.** *Lancet Neurol* 2007; **6**: 1073–1085.
- [8] Northcott, PA, Jones, DTW, Kool, M, Robinson, GW, Gilbertson, RJ, Cho, YJ, Pomeroy, SL, Korshunov, A, Lichter, P, Taylor, MD, Pfister, SM: **Medulloblastomics: The End of the Beginning.** *Nat Rev Cancer* 2012; **12(12)**: 818–834.
- [9] Packer, RJ, Gajjar, A, Vezina, G: **Phase III study of craniospinal radiation therapy followed by adjuvant chemotherapy for newly diagnosed average-risk medulloblastoma.** *J Clin Oncol* 2006; **24**: 4202-4208.
- [10] Srivastava, VK, Nalbantoglu, J: **The cellular and developmental biology of medulloblastoma: Current perspectives on experimental therapeutics.** *Cancer Biology & Therapy* 2010; **9(11)**: 843-852.
- [11] Sun, SC: **Non-canonical NF-κB signaling pathway.** *Cell Res.* 2011, **21**:71–85.
- [12] Saitoh, Y, Yamamoto, N, Dewan, MZ, Sugimoto, H, Martinez Bruyn, VJ, Iwasaki, Y, Matsubara, K, Qi, X, Saitoh, T, Imoto, I, Inazawa, J, Utsunomiya, A, Watanabe, T, Masuda, T, Yamamoto, N, Yamaoka, S: **Overexpressed NF-kappaB-**

inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood* 2008; **111**:5118–5129.

[13] Pikarsky, E, Porat, RM, Stein, I, et al: **NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer.** *Nature* 2004; **431**: 461-466.

[14] Gilmore, TD, Garbati, MR: **Inhibition of NF- κ B signaling as a strategy in disease therapy.** *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2011; **349**: 245–263.

[15] Robe PA, Bentires-Alj M, Bonif M, Rogister B, Deprez M, Haddada H, Khac MT, Jolois O, Erkmen K, Merville MP, Black PM, Bours V: **In vitro and in vivo activity of the nuclear factor- κ B inhibitor sulfasalazine in human glioblastomas.** *Clinical Cancer Research* 2004, **10**(16):5595–5603.

[16] Dhandapani KM, Mahesh VB, Brann DW: **Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NF- κ B transcription factors.** *Journal of Neurochemistry* 2007, **102**(2):522–538.

[17] Kesanakurti D, Sareddy GR, Babu PP, Kirti PB: **Mustard NPR1, a mammalian I κ B homologue inhibits NF- κ B activation in human GBM cell lines.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009, **390**(3):427–433.

[18] Aguilar-Morante D, Morales-Garcia JA, Sanz-Sancristobal M, Garcia-Cabezas MA, Santos A, Perez-Castillo A: **Inhibition of glioblastoma growth by the thiadiazolidinone compound TDZD-8.** *PLoS One* 2010, **5**(11):e13879.

[19] Fujiwara Y, Komohara Y, Ikeda T, Takeya M: **Corosolic acid inhibits glioblastoma cell proliferation by suppressing the activation of signal transducer and activator of transcription-3 and nuclear factor-kappa B in tumor cells and tumor-associated macrophages.** *Cancer Science* 2011, **102**(1):206–211.

[20] Zanutto-Filho A, Braganhol E, R. Schröder R, de Souza LH, Dalmolin RJ, Pasquali MA, Gelain DP, Battastini AN, Moreira JC: **NF- κ B inhibitors induce cell death in glioblastomas.** *Biochemical Pharmacology* 2011, **81**(3):412–424.

[21] Fukushima, T, Kawaguchi, M, Yorita, K, Tanaka, H, Takeshima, H, Umezawa, K, Kataoka. H: **Antitumor effect of dehydroxymethylepoxyquinomicin, a small molecule inhibitor of nuclear factor- κ B, on glioblastoma.** *Neuro Oncol* 2012; **14**(1): 19-28.

[22] Wong, JH, Lui, VW, Umezawa, K, Ho, Y, Wong, EY, Ng, MH, Cheng, SH, Tsang, CM, Tsao, SW, Chan, AT: **A small molecule inhibitor of NF- κ B, dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), suppresses growth and invasion of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells.** *Cancer Lett* 2010; **287**(1): 23-32.

[23] Kikuchi, E, Horiguchi, Y, Nakashima, J, Kuroda, K, Oya, M, Ohigashi, T, Takahashi, N, Shima, Y, Umezawa, K, Murai, M: **Suppression of hormone-refractory prostate cancer by a novel nuclear factor kappaB inhibitor in nude mice.** *Cancer Res* 2003; **63**(1): 107–110.

- [24] Starenki, DV, Namba, H, Saenko, VA, Ohtsuru, A, Maeda, S, Umezawa, K, et al: **Induction of thyroid cancer cell apoptosis by a novel nuclear factor kappaB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin.** *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 6821–6829.
- [25] Matsumoto, G, Namekawa, J, Muta, M, Nakamura, T, Bando, H, Tohyama, K, Toi, M, Umezawa, K: **Targeting of nuclear factor kappaB pathways by dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel inhibitor of breast carcinomas: antitumor and antiangiogenic potential in vivo.** *Clin. Cancer Res* 2005; **11(3)**: 1287–1293.
- [26] Watanabe, M, Dewan, MZ, Okamura, T, Sasaki, M, Itoh, K, Higashihara, M, Mizoguchi, H, et al: **A novel NF-kappaB inhibitor DHMEQ selectively targets constitutive NF-kappaB activity and induces apoptosis of multiple myeloma cells in vitro and in vivo.** *International Journal of Cancer* 2005; **114(1)**: 32–38.
- [27] Watanabe, M, Ohsugi, T, Shoda, M, Ishida, T, Aizawa, S, Maruyama-Nagai, M, Utsunomiya, A, Koga, S, Yamada, Y, Kamihira, S, Okayama, A, Kikuchi, H, Uozumi, K, Yamaguchi, K, Higashihara, M, Umezawa, K, Watanabe, T, Horie, R. **Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF-kappaB, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T-cell leukemia.** *Blood* 2005; **106 (7)**: 2462–2471.
- [28] Horiuchi, K, Morioka, H, Nishimoto, K, et al: **Growth suppression and apoptosis induction in synovial sarcoma cell lines by a novel NF-kappaB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ).** *Cancer letters* 2008; **272 (2)**: 336-344.
- [29] Dabaghmanesh, N, Matsubara, A, Miyake, A, Nakano, K, Ishida, T, Katano, H, Horie, R, Umezawa, K, Watanabe, T: **Transient inhibition of NF-kB by DHMEQ induces cell death of primary effusion lymphoma without HHV-8 reactivation.** *Cancer Science* 2009; **100 (4)**: 737–746.
- [30] Lampiasi, N, Azzolina, A, Alessandro, ND, et al: **Antitumor Effects of Dehydroxymethylepoxyquinomicin, a Novel Nuclear Factor-K B Inhibitor in Human Liver Cancer Cells Are Mediated through a Reactive Oxygen Species-Dependent Mechanism.** *Molecular Pharmacology* 2009; **76(2)**: 290-300.
- [31] Kodaira, K, Kikuchi, E, Kosugi, M, et al: **Potent cytotoxic effect of a novel nuclear factor-kappaB inhibitor dehydroxymethylepoxyquinomicin on human bladder cancer cells producing various cytokines.** *Urology* 2010; **75(4)**: 805-812.
- [32] Dror, R, Lederman, M, Umezawa, K, Barak, V, Pe'er, J, Chowers, I: **Characterizing the involvement of the nuclear factor-kappa B (NF-kB) transcription factor in uveal melanoma.** *Invest. Ophthalmol. Vis Sci* 2010; **51**: 1811-1816.
- [33] Mino, K, Ozaki, M, Nakanishi, K, Haga, S, Sato, M, Kina, M, Takahashi, M, Takahashi, N, Kataoka, A, Yanagihara, K, Ochiya, T, Kamiyama, T, Umezawa, K,

Todo, S: **Inhibition of nuclear factor-kappaB suppresses peritoneal dissemination of gastric cancer by blocking cancer cell adhesion.** *Cancer Sci* 2011; **102(5)**: 1052–1058.

[34] Brassesco MS, Roberto GM, Morales AG, Oliveira JC, Delsin LEA, Pezuk JA, Valera ET, Carlotti Jr. CG, Rego EM, Oliveira HF, Scrideli CA, Umezawa K, Tone LG: **Inhibition of NF- κ B by Dehydroxymethylepoxyquinomicin Suppresses Invasion and Synergistically Potentiates Temozolomide and γ -Radiation Cytotoxicity in Glioblastoma Cells.** *Chemotherapy Research and Practice* 2013, **2013**:16p.

[35] Togano, T, Sasaki, M, Watanabe, M, et al: **Induction of oncogene addiction shift to NF-jB by camptothecin in solid tumor cells.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009; **390(1)**: 60-64.

[36] Umezawa, K, Chaicharoenpong, C: **Molecular design and biological activities of NF-kappaB inhibitors.** *Mol Cells* 2002; **14**:163–167.

[37] Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C: **Clonogenic assay of cells in vitro.** *Nat Protoc* 2006; **1**:2315–2319.

[38] Liang CC, Park AY, Guan JL: **In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro.** *Nat Prot* 2007; **2**:329–333.

[39] Chou TC. **Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies.** *Pharmacol Rev* 2006; **58**:621–681.

[40] Tao Y, Zhang P, Frascogna V, Lecluse Y, Auperin A, Bourhis J, Deutsch E: **Enhancement of radiation response by inhibition of Aurora-A kinase using siRNA or a selective Aurora kinase inhibitor PHA680632 in p53-deficient cancer cells.** *Br J Cancer* 2007; **97(12)**:1664-72.

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

[42] Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Câncer infantil. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/infantil>>. Acesso em 5 de fev. 2014.

[43] Rayet, B, Gelinas, C: **Aberrant rel/NF- κ B genes and activity in human cancer.** *Oncogene* 1999; **18**: 6938–6947.

[44] Naugler, W, Karin, M: **NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms.** *Curr Opin Genet Dev* 2008; **18**: 19–26.

[45] Ho, J, Wong, T, Wai, V, Lui, Y, Umezawa, K, Ho, Y, et al: **A small molecule inhibitor of NF- κ B, dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), suppresses**

growth and invasion of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells. *Cancer Letters* 2010; **287(1)**: 23-32.

[46] Sato, A, Oya, M, Ito, K, Mizuno, R, Horiguchi, Y, Umezawa, K, et AL: **Survivin associates with cell proliferation in renal cancer cells: regulation of survivin expression by insulin-like growth factor-1, interferon-gamma and a novel NF-kappaB inhibitor.** *International journal of oncology* 2006; **28(4)**: 841-846.

[47] Yasuda, A, Kondoa, S, Nagumoa, T, Tsukamoto, H, Mukudaia, Y, Umezawa, K, Shintani, S: **Anti-tumor activity of dehydroxymethylepoxyquinomicin against human oral squamous cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo.** *Oral Oncology* 2011; Available online.

[48] Castro-Gamero AM, Borges KS, Silveira VS, Lira RCP, Queiroz RPG, Valera FCP, Scrideli CA, Umezawa K, Tone LG: **Inhibition of nuclear factor-kB by dehydroxymethylepoxyquinomicin induces schedule-dependent chemosensitivity to anticancer drugs and enhances chemoinduced apoptosis in osteosarcoma cells.** *Anti-Cancer Drugs* 2012, **23**:638–650.

[49] Kimura, N, Miyakawa, Y, Kohmura, K, Umezawa, K, Ikeda, Y, Kizaki, M., et al: **Targeting NF-kappaB and induction of apoptosis by novel NF-kappaB inhibitor dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) in Burkitt lymphoma cells.** *Leukemia Research* 2007; **31(11)**: 1529-1535.

[50] Ariga A, Namekawa J, Matsumoto N, Inoue J, Umezawa K: **Inhibition of tumor necrosis factor-alpha-induced nuclear translocation and activation of NF-kappa B by dehydroxymethylepoxyquinomicin.** *J Biol Chem* 2002, **277**:24625–24630.

[51] Ohsugi, T, Horie, R, Kumasaka, T, Ishida, A, Ishida, T, Yamaguchi, K, et al: **In vivo antitumor activity of the NF-kappaB inhibitor dehydroxymethylepoxyquinomicin in a mouse model of adult T-cell leukemia.** *Carcinogenesis* 2005; **26**: 1382–1388.

[52] Tatetsu, H, Okuno, Y, Nakamura, M, Matsuno, F, Sonoki, T, Taniguchi, I, et al: **Dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel nuclear factor-kappaB inhibitor, induces apoptosis in multiple myeloma cells in an IkappaBalpha-independent manner.** *Mol Cancer Ther* 2005; **4**: 1114–1120.

[53] Eccles, SA, Welch, DR: **Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies.** *Lancet* 2007; **369(9574)**: 1742-1757.

[54] Pajonk, F, Pajonk, K, McBride, WH: **Inhibition of NF-kappaB, clonogenicity, and radiosensitivity of human cancer cells.** *J Natl Cancer Inst* 1999; **91(22)**: 1956-1960.

[55] Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, Chariot A, Relic B, Jacobs N, Gielsen J, Merville MP, Bours V: **NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells.** *Oncogene* 2003, **22(1)**:90-97.

[56] Park, HL, Kim, I, Lee, K, Choi, J, Park, M, Joo, C, et al: **Effects of nuclear factor-kappaB small interfering RNA on posterior capsule opacification.** *Investigative ophthalmology & Visual Science* 2010; **51(9)**: 4707-4715.

[57] Gyrd-Hansen, M, Meier, P: **IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer.** *Nature reviews Cancer* 2010; **10(8)**: 561-574.

[58] Suzuki, K, Aiura, K, Matsuda, S, Itano, O, Takeuchi, O, Umezawa, K, Kitagawa, Y: **Clin Combined effect of dehydroxymethylepoxyquinomicin and gemcitabine in a mouse model of liver metastasis of pancreatic cancer.** *Exp Metastasis* 2013; **30(4)**: 381-392.

[59] Huang, S, Pettaway, CA, Uehara, H, Bucana, CD, Fidler, IJ: **Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis.** *Oncogene* 2001; **20(31)**: 4188–4197.

[60] Huang, S, DeGuzman, A, Bucana, CD, Fidler, IJ: **Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice.** *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 2573–2581.

[61] Poma, P, Notarbartolo, M, Labbozzetta, M, Sanguedolce, R, Alaimo, A, Carina, V, Maurici, A, Cusimano, A, Cervello, M, D'alessandro N: **Antitumor effects of the novel NF-κB inhibitor dehydroxymethyl-epoxyquinomicin on human hepatic cancer cells: Analysis of synergy with cisplatin and of possible correlation with inhibition of pro-survival genes and IL-6 production.** *International Journal of Oncology* 2006; **28**: 923-930.

[62] Ruan, H, Masuda, M, Ito, A, Umezawa, K, Nakashima, T, Yasumatsu, R, Kuratomi, Y, Yamamoto, T, Weinstein, IB, Komune. S: **Effects of a novel NF-κB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), on growth, apoptosis, gene expression, and chemosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma cell lines.** *Head Neck* 2006; **28(2)**: 158-165.

[63] Caporali S, Levati L, Graziani G, Muzi A, Atzori MG, Bonmassar E, Palmieri G, Ascierto PA, D'Atri S: **NF-κB is activated in response to temozolomide in an AKT-dependent manner and confers protection against the growth suppressive effect of the drug.** *J Transl Med* 2012, **10**:252.

[64] Chen, M, Rose, AE., Doudican, N, Osman, I, Orlow, SJ: **Celastrol Synergistically Enhances Temozolomide Cytotoxicity in Melanoma Cells.** *Mol Cancer Res* 2009; **7**: 1946.

[65] Meley, D, Spiller, DG, White1, MRH, McDowell, H, Pizer, B, Se´e, V: **p53-mediated delayed NF-jB activity enhances etoposide-induced cell death in medulloblastoma.** *Cell Death and Disease* 2010; **1**: e41.

[66] Morotti, A, Cilloni, D, Pautasso, M, Messa, F, Arruga, F, Defilippi, I, Carturan, S, Catalano, R, Rosso, V, Chiarenza, A, Taulli, R, Bracco, E, Rege-Cambrin, G, Gottardi, E, Saglio, G: **NF-κB Inhibition as a Strategy to Enhance Etoposide-**

Induced Apoptosis in K562 Cell Line. *American Journal of Hematology* 2006; **81**: 938–945.

[67] Katsman, A, Umezawa, K, Bonavida, B: **Reversal of resistance to cytotoxic cancer therapies: DHMEQ as a chemo-sensitizing and immuno-sensitizing agent.** *Drug Resistance Updates* 2007; **10**: 1–12.

[68] Watanabe, M, Dewan, MZ, Taira, M, Shoda, M, Honda, M, Sata, T, Higashihara, M, Kadin, ME, Watanabe, T, Yamamoto, N, Umezawa, K, Horie, R: **I κ B α independent induction of NF- κ B and its inhibition by DHMEQ in Hodgkin/Reed-Sternberg cells.** *Laboratory Investigation* 2007; **87**: 372–382.

[69] Baldwin AS: **Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB.** *J Clin Invest* 2001, **107**:241–246.

[70] Qiao, Q, Jiang, Y, Li, G: **Curcumin improves the antitumor effect of X-ray irradiation by blocking the NF-jB pathway: an in-vitro study of lymphoma.** *Anti-Cancer Drugs* 2012; **23**: 597–605.

[71] Kozakai, N, Kikuchi, E, Hasegawa, M, Suzuki, E, Ide, H, Miyajima, A, Horiguchi, Y, Nakashima, J, Umezawa, K, Shigematsu, N, Oya, M: **Enhancement of radiosensitivity by a unique novel NF- κ B inhibitor, DHMEQ, in prostate cancer.** *Br J Cancer* 2012; **107**(4): 652-657.