**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA**

PAMELA VIANI DE ANDRADE

**Inibidor de histona deacetilase (HDACi) como possível radiosensibilizante em linhagens
celulares de glioblastoma pediátrico**

Ribeirão Preto

2015

PAMELA VIANI DE ANDRADE

Inibidor de histona deacetilase (HDACi) como possível radiosensibilizante em linhagens celulares de glioblastoma pediátrico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Orientador: Prof Dr. Elvis Terci Valera

**Ribeirão Preto
2015**

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

Andrade, Pamela Viani

Inibidor de histona deacetilase (HDACi) como possível radiosensibilizante em linhagens celulares de glioblastoma pediátrico. Ribeirão Preto, 2015.

74 p: il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Departamento de Puericultura e Pediatria. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Orientador: Dr. Elvis Terci Valera

1. Glioblastoma pediátrico. 2. Inibidor de Histona Deacetilase. 3. PCI-24781. 4. Raiosensibilizante. 5. Quebras de dupla fita.

Apoio e suporte financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 2013/15891-8)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

FOLHA DE APROVAÇÃO

Pamela Viani de Andrade

Inibidor de histona deacetilase (HDACi) como possível radiosensibilizante em linhagens celulares de glioblastoma pediátrico.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Aprovado: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho a minha família: Newton, Iêda, Paola,
Poliane e Guilherme por ser a base da minha formação
e pelo apoio e amor incondicional. E aos amigos
sempre presentes em todas as etapas.*

Agradecimentos

Ao meu orientador **Prof. Dr. Elvis Terci Valera**, que me deu a oportunidade de crescer como profissional, me recebendo como orientando e pela paciência, confiança, atenção e disponibilidade durante todo esse tempo de pós graduação.

Aos **Prof Dr. Luiz Gonzaga Tone** e **Prof Dr. Carlos Scrideli** pelo apoio, disponibilidade e disposição pela ajuda dispensada sempre que necessária.

Ao **Prof. Dr. Harley Francisco de Oliveira** pela disponibilidade e ajuda nos experimentos realizados neste trabalho.

À **Dra. Rosane Gomes Queiroz** pela amizade, apoio, disponibilidade e contribuição para todas as minhas atividades no laboratório.

Aos amigos e companheiros de trabalho **Augusto Faria Andrade, Veridiana Kill Suazo, Vanessa da Silva Silveira, Kleiton Silva Borges e Angel Maurício Castro Gamero** pela paciência, ensino, profissionalismo, apoio científico, disponibilidade e sugestões experimentais durante todo esse tempo. Vocês foram essenciais para meu crescimento profissional.

Às minhas queridas amigas **Mayara Missoni Fujinami** e **Carolina Alves Ferreira**, que sempre me escutaram, aconselharam e estiveram comigo durante todas as fases desse trabalho como grandes amigas e companheiras de laboratório.

Aos meus amigos de laboratório **Camila, Daniel, Gabi Molinari, Gabi Vieira, Gustavo, Karina, Lara, Lenisa, Dra. Maria Sol, Mariana, Mirella, Paola e Régia** . Obrigada pela torcida e apoio em todos os momentos durante a realização deste trabalho.

Às funcionárias do laboratório de Citogenética-HC, **Sonia Aparecida Scandiussi, Aíde Barbosa dos Santos, Lucimar Laureano, e Sara Melho Padilha** pelo apoio e agradável convivência.

Ao **Departamento de Pediatria e Puericultura** do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP em seu conjunto, e à secretária do departamento **Sandra Eugênio de Oliveira** pela oportunidade da realização do mestrado.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de mestrado. E **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais, **Newton** e **Iêda**, pelo amor incondicional, apoio, formação e valores que me ensinaram e por me mostrarem como batalhar pelos meus sonhos com honestidade. Às minhas irmãs **Paola** e **Poliane** e sobrinho **Guilherme**, por todo o amor e carinho sempre.

Às minhas amigas queridas de Ribeirão Preto, **Ana Caroline** , **Ernna**, **Maraiza** e **Rafaela** que tornaram minha experiência nessa nova cidade mais feliz.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

“A recompensa pelo trabalho bem feito é a oportunidade de fazer mais.”

Jonas Salk

RESUMO

ANDRADE, PV. Inibidor de histona deacetilase (HDACi) como possível radiosensibilizante em linhagens celulares de glioblastoma pediátrico. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015, 74p.

O glioblastoma (GBM) é considerado um dos tumores mais agressivos do sistema nervoso central (SNC). Mesmo com o uso de protocolos modernos de tratamento o prognóstico se mantém bastante reservado, sendo que crianças com GBM apresentam uma sobrevida média de 12 a 15 meses. Mecanismos epigenéticos podem interferir no processo de carcinogênese, sendo que a acetilação do DNA pode modular a expressão de genes que atuam no controle do ciclo celular, contribuindo assim para o desenvolvimento e progressão de neoplasias. Estudos clínicos demonstram que inibidores de histonas deacetilases (HDACs), em monoterapia ou combinados a outros agentes antineoplásicos, são clinicamente ativos e bem tolerados no tratamento de uma ampla variedade de tumores. Estes inibidores podem sensibilizar a resposta celular à irradiação ionizante, possibilitando uma redução nas doses-padrão utilizadas, minimizando os efeitos colaterais a curto e longo prazo. A radiação ionizante induz dano no DNA e é geralmente aceito que quebras da dupla-fita (DSBs) é o tipo de lesão mais severa relacionada à sobrevivência celular e preservação da integridade genômica. No presente estudo, avaliamos o potencial efeito radiosensibilizante do PCI-24781, um novo e potente pan-inibidor de HDAC nas linhagens celulares de GBM pediátrico SF188 e KNS42. Foram comparadas as taxas de proliferação celular, clonogenicidade e apoptose das linhagens SF188 e KNS42 com ou sem tratamento com PCI-24781. Também foram comparadas as taxas de clonogenicidade das linhagens SF188 e KNS42 que foram irradiadas com ou sem tratamento prévio com PCI-24781. Adicionalmente, foram avaliados os efeitos do PCI-24781 na expressão de algumas das principais proteínas responsáveis pelo reparo de quebras da dupla-fita ocasionadas pela irradiação. Para os ensaios de proliferação celular foram utilizados os tempo de 24, 48, 72 e 96h, para apoptose, 48h e para capacidade clonogênica sem irradiação o tempo de 48h, em diferentes doses de PCI-24781 (0,25 - 16 μ M). O inibidor bloqueou significativamente a proliferação celular ($p<0,05$), induziu morte por apoptose ($p<0,05$) e reduziu a capacidade na formação de colônias ($p<0,001$) em ambas as linhagens. No ensaio para avaliação da radiosensibilidade, foram utilizadas as doses do IC30

de cada linhagem do ensaio clonogênico seguida de diferentes doses de irradiação. Ambas as linhagens apresentaram uma significativa ($p<0,001$) diminuição na formação de colônias em todas as doses de irradiação. A linhagem mais resistente à droga, SF188 foi escolhida para estudo do reparo de quebras da dupla-fita ocasionadas pela irradiação. As expressões da proteína Rad51, importante na via de reparo por recombinação homóloga (HR), e das proteínas DNA-PKcs, Ku70 e Ku86, importantes na via de reparo por união terminal não-homóloga (NHEJ) apresentaram uma maior diminuição quando a linhagem irradiada foi previamente tratada com PCI-24781 em comparação à radioterapia exclusiva. Estes achados demonstram que o inibidor de histona PCI-24781 apresenta um importante papel como agente radiosensibilizante, comprometendo o reparo das quebras de dupla-fita em células de GBM pediátrico tratadas com radioterapia.

Palavras-chave: Glioblastoma, radiação, epigenética, inibidores de HDAC, quebras de dupla-fita.

ABSTRACT

ANDRADE, PV. Histone inhibitor as a putative radiosensitizer in pediatric glioblastoma cell lines. Dissertation (Master Degree) Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, 2015, 74p.

Glioblastoma (GBM) is considered one of the most aggressive tumors to affect the central nervous system (CNS). Even employing modern treatment protocols the prognosis remains very poor, with children affected by GBM presenting a median survival rate of 12 to 15 months. Epigenetic mechanisms may interfere with the process of tumorigenesis, and DNA acetylation can modulate the expression of genes that contribute in cell cycle control and participate to the development and progression of cancer. Clinical studies demonstrate that histone deacetylase inhibitors (HDACs), alone or in combination with other antineoplastic agents, are clinically active and well tolerated in the treatment of a wide variety of tumors. These inhibitors may sensitize the cellular response to ionizing radiation, enabling the reduction in standard doses of radiation, ultimately minimizing both short and long-term side effects. Ionizing radiation induces DNA damage and it is generally accepted that the double-stranded breaks (DSBs) is the most severe type of injury related to cell survival and preservation of genomic integrity. In the present study, we evaluated the potential radiosensitizer effect of PCI-24781, a novel potent pan-HDAC inhibitor in the pediatric GBM cell lines SF188 and KNS42. We compared the cell proliferation rates, apoptosis of clonogenicity of KNS42 and SF188, with or without treatment with PCI-24781. Moreover, clonogenicity rates were compared between cell lines that were irradiated with or without prior treatment with PCI-24781. Additionally, we evaluated the effects of PCI-24781 in the expression of some of the major proteins responsible for the repair of double-stranded breaks caused by the irradiation. For the cell proliferation assays, the times of 24, 48, 72 and 96 hours were used, for apoptosis, the time of 48h and clonogenic capacity without irradiation, the time of 48h, and different doses of PCI-24781 (0,25 - 16 μ M). The inhibitor significantly blocked cell proliferation ($p < 0,05$), inducing cell death by apoptosis ($p < 0,05$) and reducing the colony forming ability ($p < 0,001$) of both lineages. In the assays to evaluate the radiosensitivity, the IC30 doses of the clonogenic assays were used for each cell-line after different doses of irradiation. Both lineages showed a significant decrease ($p < 0,001$) in colony formation at all doses of irradiation. The most resistant cell-line to the drug, SF188, was

chosen to study the double-strand breaks repair caused by irradiation. The Rad51 protein levels, critical for homologous recombination (HR), and the DNA-PKcs proteins Ku70 and Ku86, important for DNA repair through non-homologous end joining (NHEJ) showed significant decrease in expression when cell-line was treated with PCI-24781 prior to radiotherapy. These data demonstrates that the histone deacetylase inhibitor PCI-24781 plays an important role as a radiosensitizer agent, compromising the repair of double-strand breaks in pediatric GBM cells following irradiation.

Keywords: Glioblastoma, radiation, epigenetics, HDAC inhibitors, double-strand breaks

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do inibidor de histona deacetilase PCI-24781	25
Figura 2. Análise da proliferação celular na linhagem SF188 após o tratamento com PCI-24781.....	38
Figura 3. Análise da proliferação celular na linhagem KNS42 após o tratamento com PCI-24781.....	39
Figura 4. Porcentagem de células anexina-V positivas após o tratamento com PCI-24781 nas linhagens SF188 e KNS42	40
Figura 5. Porcentagem de colônias após o tratamento com PCI-24781 nas linhagens SF188 e KNS42	41
Figura 6. PCI-24781 radiosensibiliza a linhagem SF188	42
Figura 7. PCI-24781 radiosensibiliza a linhagem KNS42	42
Figura 8. A) PCI-24781 diminui a expressão da proteína RAD51 importante no reparo das quebras de dupla-fita causadas pela irradiação através da via de recombinação homóloga (HR). B) Razão entre a proteína RAD51 e o endógeno	44
Figura 9. A) PCI-24781 diminui a expressão da proteína Ku70 importante no reparo das quebras de dupla-fita causadas pela irradiação através da via de união terminal não-homóloga (NHEJ). B) Razão entre a proteína Ku70 e o endógeno GAPDH	45
Figura 10. A) PCI-24781 diminui a expressão da proteína Ku86, importante no reparo das quebras de dupla-fita causadas pela irradiação através da via de união terminal não-homóloga (NHEJ). B) Razão entre a proteína Ku86 e o endógeno GAPDH	46

Figura 11. A) PCI-24781 diminui a expressão da proteína DNA-PKcs, importante no reparo das quebras de dupla-fita causadas pela irradiação através da via de união terminal não-homóloga (NHEJ). B) Razão entre a proteína DNA-PKcs e o endógeno GAPDH 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDDP	Cisplatina ou cis-diaminodicloropatina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSB	Double strand break – Quebra de dupla-fita
EP	Eficiência de plaqueamento
FS	Fração de sobrevivência
GBM	Glioblastoma
Gy	Gray
HAT	Histona acetil transferase
HDAC	Histona deacetilase
HDACi	Inibidor de histona deacetilase
HR	Recombinação homóloga
kDa	Kilodalton
MGMT	O-6-methylguanine-DNA-methyltransferase
mM	milimolar
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
NHEJ	União terminal não homóloga
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão salina fosfato
PI	Iodeto de propídeo
RNA	Ácido ribonucleico
SBF	Soro bovino fetal
SNC	Sistema nervoso central
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TMZ	Temozolomida
μL	microlitro
μM	micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Glioblastoma.....	20
1.2 Radioterapia em crianças	22
1.3 Epigenética e câncer	23
1.4 Quebras de dupla-fita de DNA (DSB).....	26
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivos gerais	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Linhagens Celulares e Condições de Cultura	31
3.2 Inibidor de histona deacetilase e tratamentos	32
3.3 Ensaio Funcionais	32
3.3.1 Ensaio de Proliferação Celular.....	32
3.3.2 Ensaio de apoptose	33
3.3.3 Ensaio clonogênico	33
3.3.4 Expressão proteica - Western Blotting.....	35
3.4 Análise estatística	35
4. RESULTADOS	38
4.1 Efeitos do inibidor PCI-24781 na proliferação celular	38
4.2 Efeitos do inibidor PCI-24781 na indução de apoptose	39
4.3 Efeitos do inibidor PCI-24781 na capacidade clonogênica	40
4.4 Efeito radiosensibilizante do inibidor PCI-24781 na capacidade clonogênica.....	41
4.5 Efeito do inibidor PCI-24781 na expressão de proteínas responsáveis pelo reparo das quebras de dupla-fita.....	43
5. DISCUSSÃO	49

5.1 Efeitos do Inibidor PCI-24781 na proliferação celular.....	49
5.2 Efeitos do inibidor PCI-24781 na morte celular por apoptose	51
5.3 Efeitos do inibidor PCI-24781 na capacidade clonogênica	53
5.4 Efeito radiosensibilizante do inibidor PCI-24781 na capacidade clonogênica.....	53
5.5 Efeito do inibidor PCI-24781 na expressão de proteínas responsáveis pelo reparo das quebras de dupla-fita, induzidas pela irradiação.....	54
 6. CONCLUSÕES	 58
 7. REFERÊNCIAS	 60

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Glioblastoma

Os gliomas são os tumores mais frequentes do sistema nervoso central (SNC). Eles se originam a partir das células da glia e podem ser classificados de acordo com os tipos celulares de origem. A classificação atual considera os seguintes subgrupos: gliais, ependimários, da oligodendroglia, tumores do plexo coróide e astrocíticos (Louis et al., 2007; Ohgaki; Kleihues, 2007). São de diferenciação astrocítica originam-se a partir de astrócitos e são classificados conforme as características morfológicas e de proliferação celular observadas no tecido. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), são subdivididos em quatro grupos: astrocitoma pilocítico (glioma grau I), astrocitoma difuso (glioma grau II), astrocitoma anaplásico (glioma grau III) e glioblastoma (glioma grau IV - GBM). O glioma grau I é considerado um tumor de baixo grau de malignidade e geralmente curável quando realizada a ressecção cirúrgica completa. Gliomas grau II e III são localmente invasivos e podem progredir para lesões mais agressivas, especialmente em adultos, apresentando prognóstico desfavorável em relação aos glioma grau I (Holland, 2000; Louis et al., 2007; Ohgaki; Kleihues, 2007).

O glioma grau IV ou GBM é considerado o tumor mais agressivo e mais frequente do SNC, em adultos, representando cerca de 65% dos casos. Em crianças este é um tumor relativamente raro, mas também bastante agressivo. Quando o GBM é diagnosticado primariamente ou quando surge *de novo*, é chamado de glioblastoma primário. Nos casos em que se origina em decorrência da transformação de um tumor de baixo grau ou anaplásico, é chamado de glioblastoma secundário (Bai; Staedtkea; Riggins, 2011; Brandes et al., 2008; Holland, 2000; Louis et al., 2007; Ohgaki; Kleihues, 2007). GBMs primários geralmente se desenvolvem em indivíduos de idade avançada (média de 55 anos), enquanto GBMs secundários são encontrados em indivíduos de meia-idade (aproximadamente 39 anos de idade). Em pacientes jovens, é mais uniformemente distribuído entre os gêneros, e apresentam uma melhor sobrevida. (Xie et al., 2005; Adamson, et al., 2009; Furnari et al., 2007). Crianças muito raramente apresentam GBM secundário, sendo a maioria dos casos pediátricos diagnosticados como GBM primário.

Apesar de ocorrer em qualquer faixa etária, o glioblastoma se manifesta principalmente em indivíduos do sexo masculino maiores de 40 anos e é pouco frequente em pacientes pediátricos (Brandes et al., 2008). Este tumor representa aproximadamente 3% de todas as neoplasias do SNC na infância. Devido a esta baixa incidência, estudos sobre glioblastomas pediátricos são menos frequentes que em adultos, sendo o conhecimento biológico sobre esta neoplasia relativamente limitado em crianças. (Song et al., 2010).

As manifestações clínicas do GBM são influenciadas pela idade do paciente, localização anatômica da neoplasia, tamanho e taxa de crescimento do tumor. Frequentemente, o quadro clínico inclui: dores de cabeça, tonturas progressivas, convulsões, aumento da pressão intracraniana, déficits neurológicos focais ou mudanças no estado mental (Grossman; Batara, 2004).

Geneticamente o GBM frequentemente apresenta alterações em fatores envolvidos no controle do ciclo celular a exemplo de mutações no *TP53*, no *PTEN*, supressão do gene *RB*, do *INK4a-ARF*, amplificação de *CDK4* e mutações pontuais no receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) (Holland, 2000; Ohgaki; Kleihues, 2007). Também estão associados ao desenvolvimento do GBM deleções no fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR) responsável pela ativação das vias de sinais de transdução, deleções associadas ao cromossomo 19q e 22q, ganho no cromossomo 7 e perda de material genético no cromossomo 10 (Fujisawa et al., 2000; Noushmehr et al., 2010). Estudos translacionais clínicos e moleculares realizados em glioblastoma em adultos demonstraram que a hipermetilação do promotor MGMT está correlacionada com o prognóstico da doença (Esteller et al., 2000; Hegi et al., 2005; Krex et al., 2007). De modo semelhante ao observado em adultos, alguns autores sugerem que o GBM em pacientes pediátricos também possui o promotor do gene MGMT metilado. Esta característica está associada com um melhor prognóstico em pacientes tratados com TMZ (Barone et al., 2006; Donson et al., 2005).

GBMs pediátricos possuem um padrão de alterações genéticas distinto dos adultos. O aumento da expressão da proteína EGFR é observado em 23-40% dos pacientes, assim como mutações do gene p53, ocorrendo em aproximadamente 33-63% dos pacientes (Dohrmann; Farwell; Flannery, 1976; Suri et al., 2009).

Outra característica importante do glioblastoma é a heterogeneidade genética intratumoral, ou seja, o tumor apresenta clones distintos dentro de uma mesma população celular (Holland, 2000; Ohgaki; Kleihues, 2007). Yan et al. (2009) encontraram que determinadas mutações nos genes IDH1 e IDH2 presentes em gliomas grau II, III e glioblastomas secundários, podem determinar a transformação de gliomas de baixo grau para alto grau. Estas mutações também podem auxiliar na distinção entre glioma grau I e grau II além dos critérios histopatológicos clássicos (Yan et al., 2009).

O tratamento convencional para o GBM não sofreu alterações substanciais nos últimos anos e consiste essencialmente na ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. A quimioterapia geralmente é utilizada para inibir a replicação dos clones ou provocar danos no DNA para a indução da apoptose celular (Chang et al., 2007; Holland, 2000). Esta terapia multimodal tem sido utilizada como protocolo de tratamento padrão para a maioria dos pacientes e ainda assim, a sobrevida média

se mantém baixa (de 12 a 15 meses) (Minniti et al., 2009). Em apenas 10% dos pacientes com GBM a sobrevida média alcança os 5 anos (Bai; Staedtke; Riggins, 2011).

A Temozolomida é o quimioterápico de tratamento padrão para adultos e crianças com gliomas de alto grau, mas se mostra pouco eficaz no tratamento em pacientes pediátricos (MacDonald et al., 2011). Estudos mostraram que pacientes pediátricos com gliomas de alto grau não se beneficiam com o tratamento por temozolomida (Broniscer et al., 2006; Nicholson et al., 2007). Ainda não foi encontrado um quimioterápico que responda melhor que a temozolomida, destacando-se assim a necessidade de novas abordagens para tratamento, que melhore a sobrevida desses pacientes (MacDonald et al., 2011).

A radioterapia pós ressecção, nas doses de 50-60Gy, pode promover aumento na sobrevida dos pacientes. Entretanto doses acima de 60Gy resultam em aumento da toxicidade afetando a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes adultos irradiados (Chang et al., 2007). Estas dificuldades relativas à terapia para pacientes portadores de GBM indicam a necessidade de novas estratégias de tratamento como combinações de drogas e terapias direcionadas de acordo com as características moleculares e perfil genômico dos pacientes (Yan; Zhang; Jiang, 2011).

Existe, portanto a necessidade de estudos que possam apontar novos alvos terapêuticos em GBM. Estes estudos podem incluir drogas que controlam alterações epigenéticas, que são de considerável interesse como alvos para terapia do câncer, justificado por sua função vital nos processos celulares que levam a oncogênese (Singh et al., 2011).

1.2 Radioterapia em crianças

Avanços terapêuticos em oncologia pediátrica permitiu um aumento no número de crianças que apresentam sobrevida longa pós-tratamento. Entretanto, tanto a quimioterapia quanto a radioterapia são potencialmente tóxicas e contribuem para uma significativa morbidade e mortalidade neste grupo de pacientes (de Ville de Goyet; Moniotte; Brichard, 2012).

Alguns dos efeitos colaterais a curto prazo da irradiação em crianças incluem náusea, vômito, dermatite pela irradiação, alopecia, fadiga e síndrome de sonolência. Os efeitos a longo prazo incluem necrose induzida pela irradiação, perda auditiva, hipoplasia e deformidades ósseas de áreas irradiadas, acidente vascular cerebral, neoplasias secundárias malignas, disfunção endócrina e efeitos neurocognitivos (Minturn; Fisher, 2013).

O desenvolvimento de neoplasias secundárias vem há muito tempo sendo reconhecida como um possível efeito tardio do tratamento utilizado para o câncer infantil (Li; Cassady; Jaffe, 1975). Um número elevado de neoplasias, secundárias e subsequentes foi relatado entre os sobreviventes de praticamente todos os tipos de câncer infantil. (Walter, et al., 1998). No entanto, a classificação

do risco sofre variações de acordo com o tipo da neoplasia secundária, do diagnóstico do tumor primário, idade do paciente quando diagnosticado inicialmente, e do tratamento do tumor primário (Meadows et al., 1985; Neglia et al., 2001; Mike; Meadows; D'Angio, 1982; Garwicz et al., 2000)

Crianças que receberam irradiação profilática ou terapêutica no SNC apresentam maior risco de segundo tumor quando comparadas com aquelas não irradiadas. Dentre as neoplasias secundárias relatadas em crianças que sobreviveram ao câncer, aquelas pertencentes ao grupo dos tumores do sistema nervoso central (SNC) são os mais devastadores (Neglia et al., 2006).

1.3 Epigenética e câncer

O termo epigenética refere-se a modificações químicas no DNA ou na cromatina que provocam alterações na expressão gênica sem que ocorram mudanças na sequência do DNA. Esses mecanismos são reversíveis e podem ser transmitidos durante as divisões celulares (Galm; Herman; Baylin, 2006; Lehmann; Brakensiek; Kreipe, 2004; Kanwal; Gupta, 2012). Os principais mecanismos epigenéticos são representados pela metilação do DNA, pela ação de pequenos RNAs não codificantes e pelas modificações das proteínas histonas que determinam a estrutura e atividade de diferentes regiões da cromatina e estão envolvidas na memória e identidade celular (Bernstein; Meissner; Lander, 2007; Ducasse; Brown, 2006; Lu et al., 2006; Ropero; Esteller, 2007; Kanwal; Gupta 2012).

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

Entre os diversos tipos de modificações nas histonas, a acetilação é a mais bem caracterizada e desempenha um papel importante na modulação da expressão de genes que atuam no controle do ciclo celular e contribuem para o desenvolvimento e progressão de neoplasias (Bernstein; Meissner; Lander, 2007; Delcuve; Khan; Davie, 2012; Masetti et al, 2011; Ropero; Esteller, 2007; Sharma; Kelly; Jones, 2010; Tan et al., 2010).

A acetilação das histonas é realizada por enzimas chamadas histonas acetiltransferases (HATs) que adicionam radicais acetil nos resíduos de lisina das proteínas histonas resultando na descompactação da cromatina e atividade transcricional. Por outro lado, as histonas desacetilases (HDACs) atuam removendo os radicais acetil e recrutamento de complexos co-repressores resultando na compactação da cromatina e silenciamento gênico (Hildmann; Riester, 2007; Minucci; Pelicci, 2006; Ropero; Esteller, 2007).

Atualmente, as HDACs são consideradas um dos alvos mais promissores para o desenvolvimento de drogas utilizadas na terapia contra o câncer (Minucci; Pelicci, 2006). De acordo com análises filogenéticas e de sequências homólogas, a família das HDACs consiste em, pelo menos, 18 membros divididas em duas famílias e quatro classes em células eucarióticas. Essas duas famílias são a família clássica e a das sirtuínas. As HDACs são categorizadas em classe I (HDACs 1, 2, 3 e 8), classe IIa (HDACs 4, 5, 7 e 9), classe IIb (HDACs 6 e 10), classe III, conhecida como família das sirtuínas (Sirt1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) e classe IV (HDAC 11) (Balasubramanian; Verner; Buggy, 2009). As classes I e II têm o zinco como cofator, de modo que elas são hidrolases que contêm zinco. Classe III, no qual são uma série de famílias Sir2 dependentes de NAD, diferem das outras classes de HDACs. As HDACs de classe I e II são reconhecidas por estarem envolvidas na patogênese do câncer (Rikiishi H, 2011).

Os inibidores de HDACs (HDACi) fazem parte de uma nova classe de agentes que atuam sobre a regulação da expressão gênica e tem mostrado diversos efeitos como parada do crescimento celular, diferenciação e indução de apoptose em diversos tipos de neoplasias. Além disso, células não-neoplásicas são mais resistentes aos efeitos dos iHDACs comparando-se com células neoplásicas (Bernhard et al., 2001; Bi; Jiang, 2006; Drummond et al., 2005; Marks; Richon; Rifkind, 2000; Minucci; Pelicci, 2006; Park et al., 2004; Romanski et al., 2004).

Vários compostos naturais e sintéticos são conhecidos por inibirem HDACs. Uma vez que os inibidores de HDAC não inibem todas as isoformas de HDAC na mesma medida, estes agentes podem ser agrupados em pan-inibidores e inibidores específicos da classe I (Balasubramanian; Verner; Buggy, 2009). Ácidos hidroxâmicos (TSA, SAHA, LAQ284 e CBHA) e ácidos piroxâmicos (PXD101 e CRA-026440) são pan-inibidores de HDACs que tem como alvo as classes I, II e IV de HDACs, possuindo atividade em concentrações nanomoleculares (Xu; Parmigiani; Marks, 2007). Por outro lado, ácidos carboxílicos (ácido valpróico e butirato de sódio) e benzamidas (MS275, CI-994, e MGCD0103) ou tetrapeptídeos cíclicos (trapoxina, depsipeptídeo e spiruchostatina A) são inibidores de HDACs específicos da classe I (Marks; Xu, 2009).

O ácido hidroxâmico PCI-24781 (antigo CRA-024781) (Figura1) é um pan-inibidor, que inibe principalmente HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6, HDAC8 e HDAC10 em concentrações nanomolares.

Atualmente, vários destes compostos estão sendo testados em estudos clínicos de fase I e fase II. As estratégias em estudos pré-clínicos incluem testes destes compostos isolados ou associados à irradiação ionizante e outros agentes que causam dano no DNA. (Buggy et al., 2006). A inibição do reparo do DNA resultou em um efeito sinérgico sobre a apoptose quando combinado com outros agentes (Banuelos et al., 2007; Adimoolam et al., 2007).

Um estudo clínico em fase I realizado em pacientes com tumor sólido avançado, demonstrou que o PCI-24781 foi bem tolerado após administração intravenosa ou por via oral. Eventos adversos incluíam anemia, trombocitopenia, diarreia, náusea, fadiga e vômito (Undevia et al., 2008).

Figura 1. Estrutura química do inibidor de histona deacetilase PCI-24781 (WHO Drug Information, 2011).

Embora a base molecular do funcionamento dos HDACi ainda não esteja totalmente estabelecida, estudos clínicos demonstram que essas drogas, combinadas com outros agentes terapêuticos, são clinicamente ativas e muito bem toleradas no tratamento de uma grande variedade de tumores (Bi; Jiang, 2006; Drummond et al., 2005; Masetti et al., 2011; Tan et al., 2010; Yoo; Jones, 2006). Devido aos bons resultados obtidos em pacientes adultos portadores de síndrome mielodisplásica e leucemias agudas, os inibidores de HDACs começaram a ser utilizados em triagens clínicas com pacientes pediátricos (Masetti et al., 2011).

Estudos têm indicado que os inibidores de HDAC podem modular a resposta celular à radiação ionizante. O consenso geral é de que os inibidores de HDAC aumentam a sensibilidade das células à radiação, atuando na modulação da regulação do ciclo celular, principalmente na parada da fase G1, inibição da síntese de DNA e da apoptose (Zhang et al., 2004; Camphausen et al., 2005; Nome et al., 2005; Karagiannis et al., 2005). Pelo fato da hiperacetilação das histonas resultarem na descompactação da cromatina, tornando-a transcritionalmente ativa, é possível que haja um aumento no número de sítios para que ocorram danos no DNA induzidos pela radiação (Karagiannis

et al., 2005). No entanto, não encontramos na literatura estudos pré-clínicos que avaliem os efeitos *in vitro* dos HDACi sobre a radiosensibilização em modelos de GBM pediátrico.

Os HDACi tornam a cromatina em uma estrutura aberta, sendo mais acessível a danos externos. Sob inibição da HDAC, a radiação ionizante pode atuar de forma mais eficiente a induzir quebras de dupla-fita (DSB) potencialmente letais, sendo o tipo de lesão mais severa relacionada à sobrevivência celular e preservação da integridade genômica (Chinnaiyan et al., 2005).

1.4 Quebras de dupla-fita de DNA (DSB)

Apesar dos avanços nos tratamentos, a radiação continua sendo uma das modalidades mais eficientes no tratamento de tumores sólidos. A radiação ionizante induz diversos danos no DNA, entre eles as quebras de dupla-fita (DSB).

DSB é definida como duas quebras simultâneas nas fitas opostas da hélice do DNA. Um requisito necessário para a formação de DSB é de que as duas quebras devam estar próximas o suficiente uma da outra (< 12 pares de bases). Assim o pareamento de bases e estrutura da cromatina é incapaz de manter as extremidades quebradas do DNA justapostas. Apesar das células serem capazes de se adaptar a baixos níveis de danos irreparáveis no DNA, apenas uma DSB já é potencialmente citotóxica ou em certos tipos celulares pode até induzir apoptose (Lee et al., 1998; Rich et al., 2000; Khanna; Jackson, 2001).

A resposta das células normais as DSBs incluem detecção e reparo dessas lesões radioinduzidas por proteínas sensoras de danos no DNA e proteínas de reparo do DNA, respectivamente. Os inibidores de HDAC rompem esses dois processos: eles desfazem a associação das enzimas HDAC com as proteínas sensoras ATM e 53 BP1 e eles alteram o status de acetilação de proteínas envolvidas tanto pela recombinação homóloga (HR) quanto pela união terminal não-homóloga (NHEJ). Estes mecanismos resultam em um aumento no número de DSBs juntamente com uma diminuição no reparo dessas lesões (Goh et al., 2001; Munshi et al., 2005; Chinnaiyan et al., 2005; Munshi et al., 2006).

A recombinação homóloga (HR) é o mecanismo de reparo de DSB mais preciso, no qual sua ausência pode levar a grandes rearranjos genômicos e consequentemente a uma instabilidade genômica. Na HR, uma sequência homóloga de DNA em uma cromátide irmã é usada como modelo para o reparo da fita quebrada. (Hoeijmakers, 2001). Uma vez que as cromátides irmãs estão presentes durante a fase S e G2 do ciclo celular, o reparo através de HR ocorre apenas durante estas fases do ciclo celular. As quebras são primeiramente reconhecidas pelo complexo MRN (MRE11-RAD50-NBS1), juntamente com a interação da proteína CtBP (proteína ligante a uma porção C-terminal). Esse complexo MRN corta as extremidades 5' e 3' da dupla quebra que logo

será revestida pela proteína de replicação A (RPA). A RPA é então substituída pela proteína RAD51, esse processo é mediado pelas proteínas BRCA2 e PALB2, resultando na formação de filamentos nucleoproteicos, em seguida ocorre a invasão na cromátide irmã intacta. Devido a essa invasão, um loop será formado e as duas cromátides irmãs irão se conectar formando assim duas junções de Holliday. Após a síntese de DNA pelas DNA polimerases e a ligação das duas fitas, através de DNA ligases, as duas junções de Holliday são desfeitas pela ação catalítica de resolvases, levando assim ao reparo completo (Moynahan & Jasin, 2010).

Ao contrário da HR, o reparo pela união terminal não-homóloga (NHEJ) é uma forma menos precisa de reparo de DSB, pois as duas terminações da molécula de DNA quebrada são processados para formar extremidades compatíveis que serão ligadas diretamente sem se basear em uma molécula de DNA não danificada. Esse mecanismo é sujeito a uma maior ocorrência de erros, já que não necessita de uma homologia de sequência para ocorrer o reparo, sendo assim pequenas deleções ou inserções podem ocorrer. NHEJ é o principal mecanismo de reparo durante as fases G0-G1 e início da fase S no ciclo celular (Delacôte & Lopez, 2008). Na via NHEJ, o heterodímero Ku70/Ku86 (Ku86 também é conhecido como Ku80) ATP dependente é a primeira proteína a se ligar as extremidades danificadas do DNA no sítio das quebras da dupla-fita. (Mimori; Hardin, 1986; de Vries et al., 1989; Falzon et al., 1993). A ligação do heterodímero a extremidade danificada do DNA recruta outro membro da família PIKK, conhecida como subunidade catalítica da proteína quinase DNA-dependente (DNA-PKcs) (Chiu et al., 1998; Hammarsten; Chu, 1998; West et al., 1998).

Durante a quebra da dupla-fita, algumas bases são danificadas, as DNA-PKcs formam um complexo com uma nuclease específica chamada Artemis, que cliva as extremidades de DNA causadas por radiação ionizante. (Jeggo; O'Neill, 2002; Lieber et al., 2003; Rooney et al., 2003). Seguindo a montagem do complexo de DNA-Ku-DNA-PKcs e processamento final do DNA, as lacunas são restauradas pelas DNA polimerases e as extremidades de DNA são ligadas pelo complexo XRCC4-DNA-ligase-IV (Teo; Jackson, 1997; Wilson et al., 1997).

As quebras de dupla-fita (sinais) são detectadas por sensores que ativam as cascatas de proteínas quinases (transdução) resultando em amplificação e diversificação do sinal através de uma série de moléculas efetoras (Richardson; Jasin, 2000). O destino final – sobrevivência ou morte – de uma célula irradiada depende do tipo e do nível de dano no DNA. Levando em conta essas considerações, vários mecanismos para um melhor resultado através de uma combinação de HDACi e irradiação tem sido proposto. Um efeito aditivo é possível devido aos diferentes mecanismos citotóxicos associados a cada modalidade ou o efeito sinérgico pode ser uma consequência da habilidade dos HDACi de modularem a estrutura da cromatina e regularem a expressão gênica através da acetilação das histonas (Chinnaiyan et al., 2005).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar os efeitos do inibidor de HDAC (PCI-24781) como possível agente radiosensibilizante nas linhagens de glioblastoma pediátrico SF188 e KNS42.

2.2 Objetivos específicos

Analisar o efeito do inibidor de histona deacetilase, PCI-24781, nas taxas de proliferação celular, capacidade clonogênica e taxa de apoptose das linhagens SF188 e KNS42 com e sem tratamento com PCI-24781.

Analisar o efeito radiosensibilizante do inibidor PCI-24781 na capacidade clonogênica das linhagens SF188 e KNS42 com e sem irradiação.

Avaliar se o PCI-24781 altera a expressão de proteínas presentes nas principais vias responsáveis pelo reparo das quebras de dupla-fita de DNA, causadas pela irradiação: proteína Rad51, o heterodímero Ku70/Ku86 e DNA-PKcs.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos segundo o fluxograma aqui representado:

3.1 Linhagens Celulares e Condições de Cultura

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens de glioblastoma pediátrico SF188 (gentilmente cedida por Nada Jabado e Damien Faury – McGill University – Canadá) e KNS42 (obtida da Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank através do Banco de Células de Rio de Janeiro). As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas de 75 cm² utilizando para a linhagem SF188 meio de cultura HAM F10 suplementado com 60 mg/L de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e 10% (v/v) de soro bovino fetal (SBF; Gibco BRL, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) pH de 7,2-7,4 em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. Para a linhagem KNS42 utilizou-se meio de cultura MEM suplementado com 60 mg/L de penicilina, 100 mg/mL de

estreptomicina e 5% (v/v) de soro bovino fetal (SBF; Gibco BRL, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) pH de 7,2-7,4 em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C.

A linhagem SF188 é originada de um paciente masculino de 8 anos. Apresenta mutação no TP53 no códon 266 (GGA(Gly)/GAA(Glu)), não apresenta mutações no PTEN, não apresenta alterações nos genes p16, p14ARF e não é tumorigênica (Ishii et al., 1999). A linhagem KNS42 é originada de um paciente masculino de 16 anos com GBM primário localizado no lóbulo frontoparietal direito. Apresenta mutação no TP53 no códon 342(GGA(Arg)/TGA(Stop)) (Bax et al., 2009).

3.2 Inibidor de histona deacetilase e tratamentos

De acordo com a literatura e experimentos pilotos realizados, uma solução estoque do inibidor de histona deacetilase PCI-24781 (Selleckchem, Houston, Texas, USA) foi preparada em uma concentração final de 50mM em dimetilsulfóxido (DMSO; Mallinckrodt Chemical Works, St Louis, Missouri, USA) e estocado em alíquotas a -80°C. Soluções de trabalho de 10mM foram preparadas também em DMSO e guardadas em alíquotas a -80°C.

A droga foi adicionada em meio de cultura e homogenizadas antes de serem aplicadas à cultura de células. Neste estudo foi utilizada quantidade máxima de DMSO de 0,1% nos experimentos. Todos os controles foram normalizados adicionando-se a mesma quantidade de DMSO utilizada nas células tratadas.

As células foram tratadas por 24, 48, 72 e 96 horas em concentrações de PCI-24781 de 0,5, 1, 2, 4, 8 e 16 µM para os ensaios de proliferação; em concentrações de PCI-24781 de 2, 4, 8 e 16 µM para os ensaios de apoptose; em concentrações de PCI-24781 de 0,25, 0,5, 1 e 2 µM para os ensaios de clonogenicidade sem irradiação; para realização dos ensaios de clonogenicidade em combinação com irradiação foram utilizados os valores de IC₃₀ da proliferação, que é definido como a concentração necessária para uma redução de 30 % na proliferação, sendo definido para SF188 o valor de 0,25 µM e para KNS42 o valor de 0,15 µM, e para a realização da análise da expressão das proteínas responsáveis pelo reparo das quebras de dupla-fita, foi também utilizado o valor de IC₃₀ para a linhagem SF188 no valor de 0,25 µM.

3.3 Ensaios Funcionais

3.3.1 Ensaio de Proliferação Celular

A proliferação celular foi avaliada através do ensaio com o Kit Resazurin Cell Viability, de acordo com as recomendações do fabricante. Foram semeadas 2×10^3 células em placas de 96 poços e mantidas em condições de cultura por 24h. Após este período as células foram tratadas com o HDACi nas concentrações de 0,5, 1, 2, 4, 8 e 16 μM e incubadas por 24, 48, 72 e 96 horas. A cada intervalo de tratamento, foram adicionadas uma solução de Resazurina na placa (10% do volume inicial no poço). As placas foram incubadas por 4h nas condições de cultura padrão. O reagente azul não fluorescente é reduzido a resorufina altamente fluorescente através de enzimas desidrogenase presentes em células metabolicamente ativas com pico de absorbância 570 nm. A absorbância foi lida no leitor de placa iMax Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA) sendo o valor encontrado proporcional a quantidade de células em proliferação. A partir destes dados, foram obtidos os valores de IC50 e IC30 que é definido como a concentração necessária para uma redução de 50 % e 30% na proliferação usando o programa Calcsyn (Biosoft, Ferguson, Missouri, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes.

3.3.2 Ensaio de apoptose

O ensaio para detecção de morte celular foi realizado através da marcação de células apoptóticas com Anexina V – Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (*Annexin V fluorescein isothiocyanate* - BD Biosciences Pharmigen, San Jose, California, USA) e células necróticas com iodeto de propídio (PI). Anexina V é uma molécula que apresenta alta afinidade pela fosfatidilserina, se ligando a esta especificamente. A fosfatidilserina é um fosfolípido presente na face interna da membrana das células. Sua externalização ocorre durante o processo de apoptose e serve como um sinal para que as células sejam removidas. A marcação com iodeto de propídio indica que as células perderam a integridade da membrana.

Após tratamento de 48h com nas concentrações de 2, 4, 8 e 16 μM do inibidor PCI-24781, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1000 r.p.m. por 5 min, lavadas com 1 X PBS gelado e ressuspensas em 300 μL de 1 X Tampão de ligação para anexina V (BD Biosciences Pharmigen, San Jose, California, USA). As células foram então marcadas com 5 μL de Anexina V e 50 μL de uma solução de 50 μM de iodeto de propídeo (PI), e analisadas usando um citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences Pharmigen) contabilizando um total de 10000 eventos por tratamento. Os valores representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

3.3.3 Ensaio clonogênico

Os efeitos do inibidor PCI-24781 sobre a capacidade clonogênica foi avaliado de acordo com o protocolo de Franken, et al. (2006). Suspensões celulares das linhagens SF188 e KNS42 foram semeadas numa densidade de 300 células/poço em placas de seis poços. Após 24 h de incubação, as células foram tratadas nas concentrações de 0,25, 0,5, 1 e 2 μ M de PCI-24781 e incubadas em estufa a 37 °C durante 48 h. Uma vez finalizado o tempo de tratamento, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com 1 X PBS, e meio sem droga foi acrescentado para permitir o crescimento de colônias durante aproximadamente 7- 10 dias a 37 °C. Após esse tempo, o meio de cultura foi retirado, as células lavadas com PBS, fixadas com metanol absoluto e coradas com 1 % Giemsa. As colônias com pelo menos 50 células foram contabilizadas com lupa, e foi determinada a eficiência de plaqueamento (EP) sob a fórmula:

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

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

$$FS = \frac{\text{Nº de colônias formadas após o tratamento}}{\text{Nº de células plaqueadas} \times EP}$$

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

Para realizar o ensaio de combinação do inibidor em associação com radioterapia foram utilizados os valores de IC30, definidos como a concentração necessária para uma redução de 30 % na proliferação celular, calculada usando o programa Calcsyn (Biosoft, Ferguson, Missouri, USA). Posteriormente, as células foram semeadas como descrito anteriormente, e tratadas com PCI-24781 por 48 h. As células foram então lavadas com 1X PBS e meio ausente de drogas foi acrescentado antes de serem irradiadas utilizando um aparelho RS-2000 X-Ray Irradiator Biological System (Rad Source Technologies, Inc., Suwanee, USA). A taxa de dose foi de 1,115 Gy/min e as doses foram 0, 0,5, 1, 2 e 4Gy. As células irradiadas foram então incubadas a 37°C por 7-10 dias, fixadas com metanol absoluto, coradas com Giemsa, e subsequentemente contadas. Os valores representam a media e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

3.3.4 Expressão proteica - Western Blotting

- Extração de proteínas

A extração de proteína total foi realizada utilizando-se o tampão de lise RIPA® (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) juntamente com inibidores de protease e fosfatase, seguindo-se as recomendações do fabricante. Posteriormente a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976). Uma solução de soro albumina bovina (BSA, 0,1 mg/mL) foi utilizada como padrão. Os valores de absorbância foram obtidos através da leitura em espectrofotômetro iMax Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) utilizando-se o comprimento de onda de 595 nm.

- Western Blotting

A metodologia utilizada, seguida de acordo com Sambrook e colaboradores (1989), foi modificada como descrito a seguir. Concentrações iguais (60µg) de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 10%, utilizando-se o sistema Mini Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad, EUA). Após o processo de transferência para a membrana de nitrocelulose, seguiu-se o processo de imunodeteção. As membranas foram bloqueadas em solução non fat- Milk 5% em TBST (0,1%) por uma hora. Em seguida ocorreu a incubação com os anticorpos primário específicos para cada proteína, overnight e anti-GAPDH e anti-βactina, (Santa Cruz Biotechnology, EUA) por uma hora. Posteriormente as membranas foram lavadas com TBST (5 lavagens de 5 minutos cada). Finalmente, seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário adequado, conjugado a uma enzima horseradish peroxidase e mais um ciclo de lavagem. A revelação foi realizada através do emprego do substrato quimioluminescente ECLTM (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) e a visualização no aparelho ChemiDOC XRS (Bio-Rad, EUA).

3.4 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes. Para a análise foi considerada a média e desvio padrão dos experimentos realizados e avaliados através do teste de variância One Way ANOVA e Two Way ANOVA acompanhado do pós-teste não paramétrico de Bonferroni.

O efeito do HDACi PCI-2478, a combinação e a dose de irradiação sobre a porcentagem do número de colônias foi testado por regressão logística.

Todas as análises foram realizadas usando o programa estatístico SPSS 20.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA). Valores de $p < 0,05$ foram adotados para o nível de significância estatística.

As porcentagens de proliferação celular, sobrevivência clonogênica, radiosensibilização e apoptose foram apresentados graficamente em forma de histogramas usando o programa GraphPad Prism version 5.0.

A quantificação das proteínas foi realizada usando-se o programa Image J versão 1.49t (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos do inibidor PCI-24781 na proliferação celular

Neste estudo foi investigado o impacto do PCI-24781 na proliferação celular, utilizando-se os tempos de 24h, 48h, 72h e 96h, nas doses de 0,5, 1, 2, 4, 8 e 16 μM nas linhagens celulares SF188 e KNS42. Uma significativa inibição do crescimento ($p < 0,05$) em relação ao controle foi detectada nos tempos de 48h e 96h do tratamento a partir da dose de 2 μM . Para o tempo de 72h essa inibição ocorreu a partir da dose de 4 μM . E no tempo de 24h a única dose significativa em relação ao controle foi a de 8 μM (Figura 2). Para a linhagem KNS42 foi observada uma significativa inibição do crescimento ($p < 0,05$) em relação ao controle nas doses de 2, 4, 8 e 16 μM nos tempos de 48h e 72h, e no tempo de 96h, já a partir da dose de 1 μM . Não houve inibição significativa no tempo de 24h (Figura 3).

Figura 2. Análise da proliferação celular na linhagem SF188 após o tratamento com PCI-24781. * $p < 0,05$, células tratadas quando comparadas em relação ao controle.

Figura 3. Análise da proliferação celular na linhagem KNS42 após o tratamento com PCI-24781. * $p < 0,05$, células tratadas quando comparadas em relação ao controle.

4.2 Efeitos do inibidor PCI-24781 na indução de apoptose

Para determinar se PCI-24781 induz apoptose em linhagens celulares de GBM pediátrico, foi avaliada a porcentagem de células apoptóticas após marcação com anexina-V e PI. A apoptose foi realizada usando o tempo de 48h, nas doses de 2, 4, 8 e 16 μM , nas linhagens de glioblastoma pediátrico SF188 e KNS42. Todas as doses apresentaram um efeito de aumento da apoptose significativo em relação ao controle ($p < 0,05$). É possível observar que a partir da dose de 2 μM , em ambas as linhagens, o efeito na taxa de morte já é bastante significativo em relação ao controle, demonstrando que apenas uma pequena quantidade do inibidor PCI-24781 é capaz que induzir uma resposta na morte celular por apoptose. A linhagem SF188 apresentou uma taxa de morte celular por apoptose, na dose máxima, de quase 40% e a linhagem KNS42 uma taxa de morte, na dose máxima, de 55% (Figura 4).

Figura 4. Porcentagem de células anexina-V positivas após o tratamento com PCI-24781 nas linhagens SF188 e KNS42. * $p < 0,05$, células tratadas quando comparadas em relação ao controle.

4.3 Efeitos do inibidor PCI-24781 na capacidade clonogênica

Com o objetivo de analisar a capacidade de formar colônias após o tratamento com PCI-24781, foi realizado o teste de capacidade clonogênica no tempo de 48h, nas doses de 0,25, 0,5, 1 e 2 μM , nas linhagens de GBM pediátrico SF188 e KNS42. A análise revelou que todas as doses apresentaram uma queda significativa na formação de colônias em relação ao controle ($p < 0,001$). A linhagem SF188 apresentou uma diminuição na formação de colônias de quase 99% na dose máxima e a KNS42 não formou colônias na dose máxima (Figura 5).

Figura 5. Porcentagem de colônias após o tratamento com PCI-24781 nas linhagens SF188 e KNS42. * $p < 0,001$, células tratadas quando comparadas em relação ao controle.

4.4 Efeito radiosensibilizante do inibidor PCI-24781 na capacidade clonogênica

Para determinar o efeito radiosensibilizante do PCI-24781, as linhagens SF188 e KNS42 foram tratadas com o IC30 do inibidor encontrado no ensaio de proliferação para cada linhagem, sendo 0,25 μM para a SF188 e 0,15 μM para a KNS42, em associação com radiação sendo as doses de irradiação utilizadas de 0,5, 1, 2 e 4 Gy. Foi encontrado que o tratamento com o inibidor radiosensibilizou ambas as linhagens, apresentando o maior efeito na linhagem KNS42. A linhagem SF188 apresentou uma diminuição na formação de colônias quase nula no tratamento com a irradiação sozinha e de 45% no tratamento com o PCI-24781 e a dose máxima de irradiação (Figura 6) e a KNS42 apresentou uma diminuição na formação de colônias de 20% na irradiação sozinha e 70% no tratamento com o PCI-24781 e a dose máxima de irradiação utilizada (Figura 7). Portanto, o tratamento com PCI-24781 foi capaz de sensibilizar ambas as linhagens à radiação.

Figura 6. PCI-24781 radiosensibiliza a linhagem SF188. * $p<0,001$. Os valores mostrados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Para todas as linhagens celulares os valores de P obtidos por regressão linear são mostrados (DMSO *versus* PCI-24781).

Figura 7. PCI-24781 radiosensibiliza a linhagem KNS42. * $p<0,001$. Os valores mostrados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Para todas as linhagens celulares os valores de P obtidos por regressão linear são mostrados (DMSO *versus* PCI-24781).

4.5 Efeito do inibidor PCI-24781 na expressão de proteínas responsáveis pelo reparo das quebras de dupla-fita

Através de western blot avaliamos a capacidade do PCI-24781 em alterar a expressão de algumas proteínas presentes nas principais vias responsáveis pelo reparo das quebras de dupla-fita, induzidas pela irradiação: proteína RAD51, importante na via de recombinação homóloga (HR), o heterodímero Ku70/Ku86 e a proteína DNA-PKcs importantes na união terminal não-homóloga (NHEJ). Para a realização da análise, foi utilizado o valor de IC₃₀ do PCI-24782 para a linhagem SF188 no valor de 0,25 μ M por 48h e os valores de irradiação foram de 4 e 6Gy. As proteínas foram coletadas após 4h de exposição à irradiação.

Nossos resultados mostraram que o PCI-24781 se mostrou competente em diminuir a eficiência da linhagem SF188 em reparar as DSB induzidas pela irradiação, diminuindo a expressão das proteínas. Para as proteínas Ku 70, Ku 86 e DNA-PKcs foi observado apenas uma pequena diferença entre o tratamento com PCI-24781 sozinho quando comparado com o combinado. A diminuição mais evidente foi na proteína RAD51, presente na via HR. Para todas as proteínas, o tratamento com PCI-24781 seguido de 6 Gy de irradiação foi o que demonstrou maior inibição.

Figura 8. A) PCI-24781 diminui a expressão da proteína RAD51 importante no reparo das quebras de dupla-fita causadas pela irradiação através da via de recombinação homóloga (HR). B) Razão entre a proteína RAD51 e o endógeno β - actina.

B

Figura 9. A) PCI-24781 diminui a expressão da proteína Ku70 importante no reparo das quebras de dupla-fita causadas pela irradiação através da via de união terminal não-homóloga (NHEJ). B) Razão entre a proteína Ku70 e o endógeno GAPDH.

Figura 10. A) PCI-24781 diminui a expressão da proteína Ku86, importante no reparo das quebras de dupla-fita causadas pela irradiação através da via de união terminal não-homóloga (NHEJ). B) Razão entre a proteína Ku86 e o endógeno GAPDH.

A

B

Figura 11. A) PCI-24781 diminui a expressão da proteína DNA-PKcs, importante no reparo das quebras de dupla-fita causadas pela irradiação através da via de união terminal não-homóloga (NHEJ). B) Razão entre a proteína DNA-PKcs e o endógeno GAPDH.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), os gliomas de alto grau são divididos em astrocitoma anaplásico (glioma grau III) e glioblastoma (glioma grau IV - GBM) (Kleihues, et al., 2002). O glioma grau IV ou GBM é considerado o tumor mais agressivo e mais frequente do SNC em adultos, representando cerca de 65% dos casos. Em crianças este é um tumor relativamente raro, mas bastante agressivo.

Os gliomas de alto grau representam cerca de 3 a 7% dos tumores primários recém-diagnosticados em crianças (CBTRUS, 2009). O GBM, juntamente com o astrocitoma anaplásico, representam apenas 20% dos tumores cerebrais supratentoriais em pacientes pediátricos, afetando igualmente pacientes de ambos os sexos e apresentando um pico de incidência durante a adolescência (Pollack, 1994; Perkins et al., 2011).

Na maioria dos protocolos, a radioterapia é considerada tratamento padrão após a ressecção cirúrgica em crianças maiores de 3 anos de idade. Em crianças menores de 3 anos frequentemente se emprega a quimioterapia após a ressecção cirúrgica na tentativa de postergar ou mesmo evitar o tratamento radioterápico (Packer et al., 1993). Estas dificuldades relativas à terapia para pacientes portadores de GBM apontam para a necessidade de novas estratégias de tratamento como combinações de drogas e terapias direcionadas de acordo com as características moleculares e perfil genômico dos pacientes (Yan; Zhang; Jiang, 2011).

Os inibidores de HDACs (HDACi) fazem parte de uma nova classe de agentes que atuam sobre a regulação da expressão gênica e tem demonstrado diversos efeitos antineoplásicos como parada do crescimento celular, diferenciação e indução de apoptose em diversos tipos de neoplasias. Além disso, células não-neoplásicas são menos sensíveis aos efeitos dos iHDACs comparando-se com células neoplásicas (Bernhard et al., 2001; Bi; Jiang, 2006; Drummond et al., 2005; Marks; Richon; Rifkind, 2000; Minucci; Pelicci, 2006; Park et al., 2004; Romanski et al., 2004).

Neste estudo foram realizados ensaios funcionais com o inibidor de histona deacetilase PCI-24781, um ácido hidroxâmico e pan-inibidor que inibe HDACs em concentrações micromolares. Para isso foram selecionadas duas linhagens celulares de glioblastoma pediátrico, a SF188 e a KNS42.

5.1 Efeitos do Inibidor PCI-24781 na proliferação celular

A proliferação celular descontrolada constitui uma característica marcante em tumores agressivos, inclusive no glioblastoma (Kamb et al., 2007; Ohgaki et al., 2009). No presente estudo, foi encontrado que o inibidor PCI-24781 causa eficientemente a inibição da proliferação celular em

ambas as linhagens celulares. A linhagem celular SF188 se mostrou mais resistente em relação à linhagem KNS42. Essa diferença entre as linhagens pode ser explicada por diferentes fatores como o tempo de duplicação das linhagens e importantes genes que estão ativados ou desativados em diferentes vias. Dentre esses fatores, linhagem SF188 possui a via MAPK ativada através da fosforilação de ERK1/2 (Bax, et al., 2009). Essas quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK) têm função relacionada principalmente ao crescimento e sobrevivência celular. Uma vez fosforiladas e ativadas as ERK1/2 podem fosforilar e estimular a atividade de diversos fatores de transcrição, regulando desse modo a expressão gênica, dentre eles genes envolvidos na progressão do ciclo celular e crescimento tumoral (Pearson ET AL., 2002; Johnson & Lapadat, 2002). Esse pode ser um grande fator responsável pela resistência da linhagem SF188 ao inibidor de HDAC PCI-24781.

Efeitos da inibição da proliferação do PCI-24781 sobre linhagens celulares neoplásicas têm sido descritos em literatura. Lopez et al. (2011), avaliando linhagens de tumores malignos da bainha dos nervos periféricos (TMBNP), analisaram o efeito do inibidor PCI-24781 e de outros dois inibidores de HDAC, SAHA e MS-275 na proliferação celular. Quatro linhagens de TMBNP se mostraram sensíveis em relação ao tratamento com PCI-24781, apresentando um IC₅₀ entre 0,1 μ M e 0,35 μ M no tempo de 48h. Doses mais elevadas dos inibidores SAHA e MS-275 foram necessárias para se atingir o mesmo efeito inibitório do inibidor PCI-24718 na proliferação celular. Os mesmos autores avaliaram os efeitos dos inibidores PCI-24781 e SAHA na inibição da proliferação em linhagens de sarcoma de partes moles. Foram encontrados resultados semelhantes ao presente estudo; o inibidor PCI-24781 diminui em até 90% a proliferação celular de três linhagens no tempo de 48h e na dose máxima de 5 μ M, sendo mais potente que o inibidor SAHA que inibiu 80% utilizando-se o mesmo tempo e dose (Lopez et al., 2009). Em ambos os trabalhos de Lopez et al., o PCI-24781 induziu uma inibição da proliferação dose e tempo dependente. Neste trabalho não encontramos uma relação dose e tempo dependente, como observado no estudo com linhagens de tumores malignos da bainha dos nervos periféricos (TMBNP) e sarcoma de partes moles. Este achado pode estar relacionado com a resposta específica das linhagens celulares SF188 e KNS42.

Yang et al. (2011), avaliaram o efeito do inibidor PCI-24781 isoladamente e em combinação com doxorubicina na proliferação celular em linhagens celulares de osteossarcoma, sarcoma de Ewing e condrossarcoma. As linhagens foram tratadas por diferentes concentrações do PCI-24781 (0,05 μ M a 5 μ M) por um período de 7 dias, apresentaram uma inibição de até 80% de crescimento. Um pré-tratamento com diferentes doses do inibidor sensibilizou as linhagens para o tratamento com doxorubicina.

He et al. (2014) avaliaram, em linhagens de tumor gástrico, o efeito do PCI-24781 em monoterapia e em combinação com cisplatina (CDDP), um quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de tumor gástrico. Foi observada uma inibição de até 90% da proliferação em ambas as linhagens na dose de 4 μ M no tempo de 48h, apresentando um IC50 entre 0,31 e 0,35 μ M. Foi encontrado também um efeito sinérgico para o tratamento do PCI-24781 em combinação com CDDP.

Zhan et al. (2013) avaliaram em linhagens celulares de neuroblastoma o efeito do PCI-24781 (0.03 - 10 mM) por 24h na proliferação celular. Três linhagens foram sensíveis ao inibidor apresentando uma inibição na proliferação que variava de 80 a 90%. Diferentemente do presente estudo, Zhan et al. (2013) utilizou concentrações em mM para obter o efeito semelhante.

Em literatura existem algumas descrições de experimentos *in vivo* que objetivaram investigar os possíveis mecanismos envolvidos no efeito terapêutico do iHDACs PCI-24781 na inibição da proliferação celular em ratos BK5.erbB2 com carcinoma de bexiga. Cerca de 80% dos ratos tratados apresentaram eficácia terapêutica, evitando a progressão da doença. Análise por western blot sugeriu que a regulação negativa de ErbB2 e p-ErbB2 totais é o principal elemento molecular que media esse efeito inibitório do PCI-24781 (Kitamura et al., 2012).

Gressette et al. (2014) também observaram, em ratos nude com carcinoma de nasofaringe, inibição da proliferação celular com o uso de PCI-24781 em combinação com CDDP ou irradiação. O resultado foi uma elevada inibição do crescimento tumoral quando comparado com os tratamentos das drogas isoladamente. Para a combinação com irradiação, foi usada uma dose de 1Gy nos modelos xenográficos, apresentando também uma elevada inibição do crescimento tumoral quando comparado com os tratamentos das drogas sozinhas.

Já foi previamente descrito que a hiperacetilação das histonas, causada pelos inibidores de HDAC, é a responsável pelo efeito antiproliferativo dos inibidores, e isso provavelmente ocorre devido a alterações específicas na expressão de genes envolvidos na progressão da fase G1 para S (Dalvai & Bystricky, 2010).

5.2 Efeitos do inibidor PCI-24781 na morte celular por apoptose

A indução de apoptose é um dos efeitos desejados no tratamento de células tumorais com drogas específicas (Collins et al., 2006; Portugal et al., 2009). A apoptose é um processo altamente controlado de morte celular que tem um papel importante no desenvolvimento e na prevenção do câncer (Cotter, 2009). Os resultados observados no presente estudo mostraram que o HDACi PCI-24781 foi capaz de induzir morte por apoptose em ambas as linhagens.

A exposição das células a fatores estressores pode ativar o gene supressor de tumor *p53*, importante fator de transcrição, levando a parada do ciclo celular ou apoptose (Haupt, et al., 2003). Apesar das duas linhagens apresentarem o *p53* mutado, o menor efeito do inibidor foi observado apenas na linhagem SF188. Este mesmo efeito pró-apoptótico da droga foi descrito por Lopez et al. (2011) em linhagens celulares de tumores malignos da bainha dos nervos periféricos, havendo apoptose em cerca de 45% após 0,5 μ M no tempo de 48h. Os mesmos autores também avaliaram o efeito pró apoptótico em linhagens de sarcoma de tecido mole e obtiveram uma taxa de apoptose de cerca 70% na dose de 0,5 μ mol/L no tempo de 96h (Lopez et al., 2009). Estes resultados se mostraram semelhantes aos encontrados no presente estudo.

Em estudo realizado por Zhan et al. (2013), linhagens de neuroblastoma tratadas com PCI-24781 em uma dose de 0,5 μ M por 96h indicaram que a expressão de importantes proteínas envolvidas na via da apoptose estavam elevadas, incluindo Bad, Bax, caspase 3, caspase 8, Fas, p21, p53 e DR4, sugerindo que o iHDACs PCI-24781 ativa tanto a via intrínseca quanto extrínseca da apoptose.

Rivera-Del Valle et al. (2010) analisaram o efeito no aumento da apoptose pelo PCI-24781 através do monitoramento e medição da atividade da caspase-3 em uma linhagem de leucemia. A linhagem foi tratada por PCI-24781 na dose de 0,01 μ M - 10 μ M no tempo de 24h, as células após o tratamento foram coradas com PI, onde se observou uma fragmentação no DNA dose-dependente a partir da menor dose. Os autores analisaram através de western blot que o tratamento da linhagem com PCI-24781 aumentava a ativação da caspase 3, responsável pela indução da fragmentação do DNA causada por apoptose.

O mesmo foi relatado por Yang et al. (2011), que utilizaram linhagens de sarcomas ósseos tratados com PCI-24781 isoladamente ou em combinação com doxorrubicina. A expressão da caspase 3/7 se apresentou mais elevada na combinação das drogas do que no tratamento com as drogas sozinhas, demonstrando um aumento da apoptose nestas linhagens tumorais expostas ao inibidor PCI-24781.

Bhalla et al. (2014) observaram um efeito dose-dependente em linhagens de linfoma. Após 48h de tratamento com PCI-24781 (0,5 - 2 μ mol/L), obteve-se uma morte por apoptose na maior dose de cerca de 80% para a maioria das linhagens e 60% para uma linhagem mais resistente. No mesmo estudo eles avaliaram o efeito da combinação de PCI-24781 com bortezomida, obtendo um efeito sinérgico.

Recentemente, He et al. (2014) analisaram em tumores gástricos, em modelos xenográficos, o efeito do PCI-24781 isoladamente e combinado. Quando associado com CDDP, a taxa de apoptose aumentou de apenas 16% da droga isolada para mais de 50% em combinação.

Estes estudos de combinação indicam que o HDACi PCI-24781 pode ser uma interessante escolha para estudo clínico de terapia de associação de drogas de primeira linha para o tratamento de neoplasias.

5.3 Efeitos do inibidor PCI-24781 na capacidade clonogênica

Em relação à capacidade clonogênica, foi possível observar que após o tratamento houve uma diminuição significativa na formação de colônias em ambas as linhagens. O mesmo foi observado por Lopez et al. (2009) em linhagens celulares de sarcoma de tecidos moles, em que compararam a capacidade clonogênica das linhagens tratadas com PCI-24781 (0,5 μ M) e SAHA (2 μ M) por 48h. PCI-24781 apresentou uma maior resposta em relação ao SAHA, diminuindo em até 100% a capacidade clonogênica.

O mesmo foi demonstrado em carcinoma de nasofaringe (Gressette et al., 2014) e em tumores gástricos (He et al., 2014), onde a eficiência em reduzir a capacidade de formar colônias do PCI-24781 foi relatada. Além da forma isolada, a combinação com quimioterápicos ou radioterapia mostrou-se igualmente eficiente. A combinação de PCI-24781 com CDDP se mostrou mais eficiente em diminuir a capacidade de formação de colônias quando comparada com as drogas sozinhas. A combinação com irradiação (1Gy – 3Gy) também se mostrou mais eficiente com cerca de 80% de diminuição na capacidade de formação de colônias quando comparada com os tratamentos isolados.

Estes dados de proliferação celular, morte por apoptose e capacidade clonogênica corroboram para a conclusão que o PCI-24781 apresenta importante potencial terapêutico *in vitro* para o tratamento de glioblastoma pediátrico.

5.4 Efeito radiosensibilizante do inibidor PCI-24781 na capacidade clonogênica

Este trabalho investigou também o potencial radiosensibilizante do PCI-24781 através de ensaios clonogênicos. Foi encontrado que o tratamento com o inibidor aumentou significativamente a sensibilidade à radiação, principalmente na linhagem KNS42 que apresentou uma diminuição na formação de colônias de 70%. A linhagem SF188 apresentou uma diminuição de 45% na formação de colônias na dose máxima de irradiação.

Outros trabalhos também avaliaram o efeito radiosensibilizante do PCI-24781 através da capacidade clonogênica. Adimoolam et al. (2007) avaliaram em linhagens de tumores de colón o potencial radiosensibilizante do inibidor com um pré tratamento na dose de 1,0 μ M nos tempos de

2, 6, 16 e 24h seguido de 2, 4 e 6 Gy de irradiação. O PCI-24781 sensibilizou todas as linhagens, apresentando uma queda na formação de colônias de mais de 90%.

O mesmo foi relatado para outros tumores. Munshi et al. (2005), avaliaram o efeito radiosensibilizante de vários HDACi, como butirato de sódio (NaB), fenilbutirato, tributirina e tricostatina A em linhagens de melanoma. As linhagens foram expostas a tratamento prévio de 24h com diferentes doses dos inibidores seguidos de exposição à radiação de 2, 4, 6 e 8 Gy. Todas as linhagens se mostraram sensíveis após o tratamento com os diferentes HDACi. Eles também encontraram que após o tratamento com os diferentes HDACi houve um acúmulo de acetilação na H4, mas que o efeito radiosensibilizante provocado nas linhagens não era influenciado por essa hiperacetilação, sendo esse mecanismo de radiosensibilidade provocado pelos HDACi desconhecido.

Chen et al. (2012) avaliaram o efeito radiosensibilizante do HDACi ácido hidroxâmico suberoilânilida (SAHA) em linhagens de mieloma. As três linhagens se mostraram sensíveis à irradiação após o tratamento com SAHA.

Chen et al. (2009) também avaliaram a capacidade radiosensibilizante do HDACi ácido valpróico (VPA) em duas linhagens de tumor de cólon, uma apresentando mutação no p53 e outra não. A linhagem não mutada para p53 apresentou uma diminuição maior na capacidade de formar colônias sugerindo que o p53 apresenta um importante papel na modulação do efeito dos HDACi.

Blattmann, et al. (2010) também avaliaram o efeito radiosensibilizante do HDACi SAHA em linhagens de osteossarcoma e rabdomiossarcoma. Todas as linhagens se mostraram sensíveis à irradiação após o tratamento com SAHA, apresentando queda na formação de colônias de quase 100%.

Xiao et al. (2013) também avaliaram o efeito radiosensibilizante do HDACi LBH589 em linhagens de câncer de próstata. Todas as linhagens se mostraram sensíveis à irradiação após o tratamento com LBH589.

HDACi são considerados adequados para combinação com radioterapia por causa dos efeitos biológicos relevantes causados no processo de resposta a danos no DNA. Os trabalhos citados demonstram esse poder radiosensibilizante desses inibidores.

5.5 Efeito do inibidor PCI-24781 na expressão de proteínas responsáveis pelo reparo das quebras de dupla-fita, induzidas pela irradiação

A radiação é uma importante modalidade no tratamento de diversos tumores. DSBs são as principais lesões formadas em resposta à irradiação, e o reparo dessas lesões é fundamental para determinar a radiosensibilidade. Portanto, agentes como inibidores de HDAC, que tem como alvos

as HDACs, importantes no processo de condensação da estrutura do DNA transcrição, também desfazem a resposta entre DNA/proteína causada pela irradiação ionizante, se apresenta como importante agente radiosensibilizante (Ward, 1994).

Neste presente estudo, a fim de validar os efeitos radiosensibilizantes encontrados, avaliamos o efeito do PCI-24781 na resposta da linhagem SF188 em reparar os danos causados pela irradiação, afetando proteínas de duas importantes vias de reparo, recombinação homóloga (HR) e a união terminal não-homóloga (NHEJ).

Nossos resultados mostraram que o PCI-24781, afetou a expressão de importantes proteínas tanto da via HR, a proteína RAD51, como da via NHEJ, as proteínas KU70, Ku86 e DNA-PKcs, nos levando a crer que o inibidor se mostrou competente em diminuir a eficiência da linhagem SF188 em reparar as DSB induzidas pela irradiação. RAD51 é uma importante proteína, responsável por mediar a busca por uma sequência homóloga de DNA para ser usada como modelo e pela formação da junção das moléculas entre a fita danificada e a não danificada (Raderschall et al., 2002).

É descrito que baixos níveis dessas proteínas responsáveis pelo reparo das DSBs aumentam o efeito radiosensibilizante das células.

Nosso trabalho foi o primeiro a avaliar o efeito do HDACi, PCI-24781 nos níveis de expressão de proteínas envolvidas com o reparo de dupla fita em linhagens de glioblastoma pediátrico.

Outros autores também avaliaram o potencial radiosensibilizante de HDACi na capacidade de diminuir o reparo de danos em diferentes linhagens tumorais. Chen et al., (2012) mostraram que o HDACi, SAHA, reduziu significativamente a expressão da proteína RAD51 em linhagens de mieloma. A avaliação foi através da contagem de *foci* formados nos sítios de quebra. O tratamento com SAHA nas linhagens não alterou a expressão das proteínas Ku70, Ku86 e DNA-PKcs. Esses resultados sugerem que o efeito do inibidor interfere na via HR e não na NHEJ. Uma possível explicação dada por Chen et al. seria a ocorrência simultânea de muitas quebras de dupla-fita e a célula não conseguiria reparar os danos devido a esse elevado número de quebras, levando à morte por apoptose.

Ao contrário do observado por Chen et al., Munshi et al., (2006) demonstraram que o HDACi, SAHA reduziu significativamente a expressão das proteínas Ku70 e Ku86 em linhagens de melanoma tratadas com diferentes concentrações do inibidor. Foi observada uma diminuição significativa nas expressões dessas proteínas já a partir da menor dose de SAHA e irradiação, quando comprados com SAHA isoladamente. Efeitos semelhantes foram observados no tratamento de SAHA em combinação com irradiação, onde foi observado que o tratamento diminuiu a

expressão da proteína Ku86 em linhagens de osteossarcoma e rabdomiossarcoma (Blattmann et al, 2010) e DNA-PKcs e RAD51 em linhagens de tumor de próstata e glioma (Chinnaiyan et al., 2005).

Chen et al., (2009) avaliaram a capacidade radiosensibilizante do HDACi ácido valpróico (VPA) em duas linhagens de tumor de colón, uma apresentando mutação no *p53* e outra livre de mutação. A linhagem não mutada para *p53* apresentou uma maior diminuição na expressão das proteínas Ku70, ku86, DNA-PKcs e RDA51, tendo então o *p53* importante papel na modulação do efeito dos HADCi.

Entretanto, apesar do grande interesse em se combinar inibidores de HDAC com radiação como uma forma de estratégia clínica para o tratamento de tumores, o exato mecanismo molecular do efeito radiosensibilizante desses inibidores ainda não é bem conhecido. A inibição das HDACs facilita o relaxamento e abertura da cromatina, tornando-a mais sensível aos danos causados pela radiação e modificando também a transcrição de diferentes genes, sendo que esses dois processos apresentam importante papel na regulação da radiosensibilidade. Além disso, genes transcricionalmente ativos demonstraram ser mais sensíveis a danos no DNA produzidos pela radiação ionizante, formando assim uma interação antitumoral favorável entre os inibidores de HDAC e a radiação. Uma explicação para esse aumento na resposta a radiação seguido do tratamento com HDACi poderia se dar pelo efeito desses inibidores nos processos de reparo de DNA. Frequentemente, a radiosensibilidade é controlada pela capacidade da célula em reparar eficientemente as lesões no DNA provocadas pela radiação, principalmente o reparo das quebras de dupla-fita (Haber, 2000; Jeggo, 1998; Khanna & Jackson, 2001).

Portanto, nosso estudo sugere que o HDACi PCI-24781 possa diminuir a capacidade da linhagem de glioblastoma pediátrico SF188 em reparar os danos no DNA induzidos pela radiação, aumentando assim a radiosensibilidade da linhagem.

Os achados aqui relatados reforçam a necessidade de se explorar o desenvolvimento de estratégias voltadas à sensibilização de células tumorais humanas às terapias existentes contra o câncer que possam se somar aos tratamentos antineoplásicos clássicos de promoção de danos ao DNA.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- O inibidor de HDAC PCI-24781 inibiu a proliferação celular das linhagens de glioblastoma pediátrico SF188 e KNS42, sendo o efeito mais intenso observado na linhagem KNS42;
- O inibidor de HDAC PCI-24781 também reduziu a capacidade das células em formar colônias em ambas as linhagens;
- O inibidor aumentou a taxa de apoptose em ambas as linhagens, sendo o efeito mais intenso observado na linhagem também na linhagem KNS42;
- O inibidor apresentou efeito radiosensibilizante na capacidade de formar colônias, seguido de irradiação em ambas as linhagens, sendo o efeito mais intenso observado na linhagem também na linhagem KNS42;
- O inibidor também apresentou efeito radiosensibilizante ao alterar a expressão de proteínas de duas importantes vias de reparo, a recombinação homóloga (HR) e a união terminal não-homóloga (NHEJ);
- Todos os dados encontrados no presente trabalho sugerem que o PCI-24781 pode ser considerado um agente com bom potencial para estudo de modelos *in vivo* de tratamento do glioblastoma pediátrico.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK, et al. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18:1061-1083.

Adcock IM, Ford P, Ito K, Barnes, PJ. *Epigenetics and Airways Disease* 2006;7:1-19.

Adimoolam S, Sirisawad M, Chen J, Thiemann P, Ford JM, Buggy JJ: HDAC inhibitor PCI-24781 decreases RAD51 expression and inhibits homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:19482-19487.

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

Balasubramanian S, Verner E, Buggy JJ. Isoformspecific histone deacetylase inhibitors: the next step? *Cancer Letters*. 2009;280(2):211-221.

Banuelos CA, Banath JP, MacPhail SH, Zhao J, Reitsema T, Olive PL: Radiosensitization by the histone deacetylase inhibitor PCI-24781. *Clin Cancer Res*. 2007;13:6816-6826.

Barone G, Maurizi P, Tamburrini G, Riccardi R: Role of temozolomide in pediatric brain tumors. *Childs Nerv Syst* 2006;22(7):652-61.

Bax DA, Little SE, Gaspar N, Perryman L, Marshall L, Viana-Pereira M, et al. Molecular and phenotypic characterisation of paediatric glioma cell lines as models for preclinical drug development. *PLoS One* 2009; 4(4):e5209.

Bernhard D, Skvortsov S, Tinhofer I, Hubl H, Greil R, Csordas A, Kofer R. Inhibition of histone deacetylase activity enhances Fas receptor-mediated apoptosis in leukemic lymphoblasts. *Cell Death and Differentiation*. 2001;8:1014-1021.

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

Bhalla S, Balasubramanian S, David K, Sirisawad M, Buggy J, Mauro L, et al. PCI-24781 induces caspase and reactive oxygen species-dependent apoptosis through NF-kappaB mechanisms and is synergistic with bortezomib in lymphoma cells. *Clin Cancer Res*. 2009;15(10):3354-3365.

Bi G, Jiang G. The molecular mechanism of HDAC inhibitors in anticancer effects. *Cellular & Molecular Immunology*. 2006;3(4):285-290.

Blattmann C, Oertel S, Ehemann V, Thiemann M, Huber PE, Bischof M, et al. Enhancement of radiation response in osteosarcoma and rhabdomyosarcoma cell lines by histone deacetylase inhibition. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010; 78(1):237-245.

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

Broniscer A, Chintagumpala M, Fouladi M, Krasin MJ, Kocak M, Bowers DC, et al. Temozolomide after radiotherapy for newly diagnosed high-grade glioma and unfavorable low-grade glioma in children. *J Neurooncol*. 2006;76:313–319.

Buggy JJ, Cao ZA, Bass KE, Verner E, Balasubramanian S, Liu L, et al: CRA- 024781: a novel synthetic inhibitor of histone deacetylase enzymes with antitumor activity in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther.* 2006;5:1309-1317.

Camphausen K, Cerna D, Scott T, Sproull M, Burgan WE, Cerra MA, Fine H, Tofilon PJ. Enhancement of in vitro and in vivo tumor cell radiosensitivity by valproic acid. *Int J Cancer* 2005;114:380-6.

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

Chen X, Wong P, Radany E, Wong JY. HDAC inhibitor, valproic acid, induces p53-dependent radiosensitization of colon cancer cells. *Cancer Biother Radiopharm* 2009 ;24(6):689-699.

Chen X, Wong P, Radany EH, Stark JM, Laulier C, Wong JY. Suberoylanilide hydroxamic acid as a radiosensitizer through modulation of RAD51 protein and inhibition of homology-directed repair in multiple myeloma. *Mol Cancer Res* 2012; 10(8):1052-1064.

Chinnaiyan P, Vallabhaneni G, Armstrong E, Huang SM, Harari P M. Modulation of radiation response by histone deacetylase inhibition. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2005;62:223-229.

Chiu CY, Cary RB, Chen DJ, Peterson SR, Stewart PL. Cryo-EM imaging of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase. *J Mol Biol.* 1998;284(4):1075–1081.

Cliby WA, Roberts CJ, Cimprich KA, Stringer CM, Lamb JR, Schreiber SL et al. Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints. *EMBO J.* 1998; 17(1):159–169.

Collins I, Workman P. New approaches to molecular cancer therapeutics. *Nat Chem Biol.* 2006; 2(12):689-700.

Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(7):501-7.

Dalvai M, Bystricky K. The role of histone modifications and variants in regulating gene expression in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; 15(1):19-33.

Das KK, Mehrotra A, Nair AP, Kumar S, Srivastava AK, Sahu RN, Kumar R. Pediatric glioblastoma: clinico-radiological profile and factors affecting the outcome. *Childs Nerv Syst.* 2012.

de Ville de Goyet M, Moniotte S, Brichard B. Cardiotoxicity of childhood cancer treatment: update and current knowledge on long-term follow-up. *Pediatr Hematol Oncol* 2012;29(5):395-414.

de Vries E, van Driel W, Bergsma WG, Arnberg AC, van der Vliet PC. HeLa nuclear protein recognizing DNA termini and translocating on DNA forming a regular DNA-multimeric protein complex. *J Mol Biol.* 1989;208(1):65–78.

Delacôte F, Lopez BS. Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: the trans-S double-strand break repair model. *Cell Cycle* 2008;7:33–38.

Delcuve GP, Khan DH, Davie JR. Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clin Epigenetics*. 2012;4(1):5.

Dohrmann GJ, Farwell JR, Flannery JT: Glioblastoma multiforme in children. *J Neurosurg* 1976;44: 442-448.

Donson AM, Addo-Yobo SO, Handler MH, Gore L, Foreman NK: MGMT promoter methylation correlates with survival benefit and sensitivity to temozolomide in pediatric glioblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48(4):403-7.

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

Drummond, DC, Noble CH, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC. Clinical Development Of Histone Deacetylase Inhibitors As Anticancer Agents. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2005; 45: 495-528.

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al: Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000;343(23):1740.

Falzon M, Fewell JW, Kuff EL. EBP-80, a transcription factor closely resembling the human autoantigen Ku, recognizes single- to double-strand transitions in DNA. *J Biol Chem*. 1993;268:10546–10552.

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1:2315–2319. doi:10.1038/nprot.2006.339.

Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P, et al: Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest* 2000;80(1):65-72.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al: Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 2007;21: 2683-2710.

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

Garwicz S, Anderson H, Olsen JH, Dollner H, Hertz H, Jonmundsson G, et al. Second malignant neoplasms after cancer in childhood and adolescence: a population-based case-control study in the 5 Nordic countries. The Nordic Society for Pediatric Hematology and Oncology. The Association of the Nordic Cancer Registries. *Int J Cancer* 2000;88:672-678.

Goh M, Chen F, Paulsen MT, Yeager AM, Dyer ES, Ljungman M. Phenylbutyrate attenuates the expression of Bcl- X(L), DNA-PK, caveolin-1, and VEGF in prostate cancer cells. *Neoplasia*. 2001; 3:331-338.

Grossman SA, Batarra JF: Current management of glioblastoma multiforme. *Semin Oncol* 2004;31: 635-644.

Haber JE. Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet* 2000; 16:259–264.

Hammarsten O, Chu G. DNA-dependent protein kinase: DNA binding and activation in the absence of Ku. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(2):525–530.

Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 20):4077-4085.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al: MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352(10):997-1003.

Hildmann C, Riester D, Schwienhorst A. Histone deacetylases - an important class of cellular regulators with a variety of functions. *Applied Microbiology & Biotechnology* 2007; 253 (7): 1-11.

Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001;411:366–374.

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

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

Jackson SP. Detecting, signalling and repairing DNA double-strand breaks. *Biochem Soc Trans* 2001; 29:655–661.

Jeggo PA. Identification of genes involved in repair of DNA doublestrand breaks in mammalian cells. *Radiat Res* 1998; Suppl 150:80–91.

Jeggo P, O'Neill P. The Greek Goddess, Artemis, reveals the secrets of her cleavage. *DNA Repair* (Amsterdam). 2002;1(9):771–777.

Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; 298(5600):1911-2.

Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet*. 2012;81(4):303-11.

Karagiannis TC, Kn H, El-Osta A. The histone deacetylase inhibitor, trichostatin a, enhances radiation sensitivity and accumulation of gammaH2A.X. *Cancer Biol Ther* 2005; 4:787-93.

Kastan MB, Lim DS, Kim ST, Xu B, Canman C. Multiple signaling pathways involving ATM. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2000;65:521–526.

Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*. 2001;27(3):247–254.

Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, et al: Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 2007;130(Pt 10):2596-606.

Lee SE, Moore JK, Holmes A, Umez K, Kolodner RD, Haber JE. *Saccharomyces* Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell*. 1998;94(3):399–409.

Lehmann U, Brakensiek K, Kreipe H. Role of epigenetic changes in hematological malignancies. *Annals of Hematology* 2004; 83: 137-152.

Li FP, Cassady JR, Jaffe N. Risk of second tumors in survivors of childhood cancer. *Cancer* 1975;35:1230-1235.

Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(9):712–720.

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

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

MacDonald TJ, Aguilera D, Kramm CM. Treatment of high-grade glioma in children and adolescents. *Neuro Oncol.* 2011;13(10):1049-1058.

Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *Journal of the National Cancer Institute.* 2000; 92(15): 1210-1215.

Marks PA, Xu WS. Histone deacetylase inhibitors: potential in cancer therapy. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2009;107(4):600-8.

Masetti R, Serravalle S, Biagi C, Pession A. The Role of HDACs Inhibitors in Childhood and Adolescence Acute Leukemias. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2011;148046: 1-9.

Meadows AT, Baum E, Fossati-Bellani F, Green D, Jenkin RD, Marsden B, et al. Second malignant neoplasms in children: an update from the Late Effects Study Group. *J Clin Oncol* 1985; 3:532-538.

Mike V, Meadows AT, D'Angio GJ. Incidence of second malignant neoplasms in children: results of an international study. *Lancet* 1982;2:1326-1331.

Mimori T, Hardin JA. Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *J Biol Chem*. 1986;261(22):10375–10379.

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

Minturn JE, Fisher MJ. Glioma in children. *Curr Treat Options Neurol*. 2013;15(3):316-27.

Minucci S, Pelicci PG. Histone Deacetylase Inhibitors and the Promise of Epigenetic (and more) Treatments for Cancer. *Nature Reviews Cancer* 2006; 6: 38-51.

Moynahan ME, Jasin M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11(3):196-207.

Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T, Tanaka T, Hobbs ML, Tucker SL, et al. Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. *Clin. Cancer Res*. 2005;11:4912-4922.

Munshi A, Tanaka T, Hobbs ML, Tucker SL, Richon VM, Meyn RE. Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, enhances the response of human tumor cells to ionizing radiation through prolongation of gamma-H2AX foci. *Mol. Cancer Ther*. 2006;5:1967-1974.

Neglia JP, Friedman DL, Yasui Y, Mertens AC, Hammond S, Stovall M, et al. Second malignant neoplasms in five-year survivors of childhood cancer: childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:618-629.

Neglia JP, Robison LL, Stovall M, Liu Y, Packer RJ, Hammond S, et al. New primary neoplasms of the central nervous system in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(21):1528-37.

Nicholson HS, Kretschmar CS, Krailo M, , Bernstein M, Kadota R, Fort D, et al. Phase 2 study of temozolomide in children and adolescents with recurrent central nervous system tumors: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer*. 2007;110:1542–1550.

Nome RV, Bratland A, Harman G, Fodstad O, Andersson Y, Ree AH. Cell cycle checkpoint signaling involved in histone deacetylase inhibition and radiation-induced cell death. *Mol Cancer Ther* 2005; 4:1231-8.

Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, et al: Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 2010;17(5):510-2.

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

Park JH, Jung Y, Kim TY, Kim SG, Jong HS, Lee JW, Kim DK, Lee JS, Kim NK, Kim TY, Bang YJ. Class I Histone Deacetylase-Selective Novel Synthetic Inhibitors Potently Inhibit Human Tumor Proliferation. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 5271-5281.

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001; 22(2):153-183.

Portugal J, Bataller M, Mansilla S. Cell death pathways in response to antitumor therapy. *Tumori.* 2009;95(4):409-21.

Raderschall E, Stout K, Freier S, Suckow V, Schweiger S, Haaf T. Elevated levels of Rad51 recombination protein in tumor cells. *Cancer Res* 2002; 62:219–25.

Rich T, Allen RL, Wyllie AH. Defying death after DNA damage. *Nature.* 2000;407(6805):777–783.

Richardson C, Jasin M. Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature.* 2000;405(6787):697–700.

Rikiishi H. Autophagic and Apoptotic Effects of HDAC Inhibitors on Cancer Cells. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:830260

Romanski A, Bacic B, Bug G, Pfeifer H, Gul H, Remiszewski S, Hoelzer D, Atadja P, Ruthardt, M. Ottmann OG. Use of a novel histone deacetylase inhibitor to induce apoptosis in cell lines of acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2004; 89: 419-426.

Rooney S, Alt FW, Lombard D, Whitlow S, Eckersdorff M, Fleming J et al. Defective DNA repair and increased genomic instability in Artemis-deficient murine cells. *J Exp Med.* 2003;197(5):553–565.

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

Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010 Jan;31(1):27-36.

Sherr CJ, Weber JD. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev.* 2000;10(1):94–9.

Singh MM, Manton CA, Bhat KP, Tsai WW, Aldape K, Barton MC, et al. Inhibition of LSD1 sensitizes glioblastomas cells to histone deacetylase inhibitors. *Neuro Oncol* 2011;13(8):894-903.

Song KS, Phi JH, Cho BK, Wang KC, Lee JY, Kim DG, et al. Long-term outcomes in children with glioblastoma. *J Neurosurg Pediatr* 2010;6(2):145-149.

Suri V, Das P, Pathak P, Jain A, Sharma MC, Borkar SA, et al: Pediatric glioblastomas: a histopathological and molecular genetic study. *Neuro Oncol* 2009;11(3):274-80.

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, 97:1664–1672.

Teo SH, Jackson SP. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* DNA ligase IV: involvement in DNA double-strand break repair. *EMBO J.* 1997;16(15):4788–4795.

Undavia SD, Janisch L, Schilsky RL, Lounsbury D, Balasubramanian S, Mani C, et al. Phase I study of the safety, pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) of the histone deacetylase inhibitor (HDACi) PCI-24781. *J Clin Oncol.* 2008;44(12):1684-92.

Walter AW, Hancock ML, Pui CH, Hudson MM, Ochs JS, Rivera GK, et al. Secondary brain tumors in children treated for acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children's Research Hospital. *J Clin Oncol* 1998;16 3761-3767.

Ward JF. The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. *Int J Radiat Biol* 1994; 66:427–32.

West RB, Yaneva M, Lieber MR. Productive and nonproductive complexes of Ku and DNA-dependent protein kinase at DNA termini. *Mol Cell Biol*. 1998;18(10):5908–5920.

WHO Drug Infotmation. 2011;25(2):151-218.

Wilson TE, Grawunder U, Lieber MR. Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining. *Nature*. 1997;388(6641):495–498.

Xie D, Zeng YX, Wang HJ, Tai LS, Wen JM, Tao Y, et al: Amplification and overexpression of epidermal growth factor receptor gene in glioblastomas of Chinese patients correlates with patient's age but not with tumor's clinicopathological pathway. *Acta Neuropathol* 2005;110: 481-489.

Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*. 2007;26(37):5541-52.

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

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

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

Zhang Y, Jung M, Dritschilo A, Jung M. Enhancement of radiation sensitivity of human squamous carcinoma cells by histone deacetylase inhibitors. *Radiat Res* 2004; 161:667-74.