UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MIRELLA BARONI

Silenciamento do gene *GDF15* e resposta à radioterapia e ao tratamento com temozolomida em linhagens celulares de glioblastoma

Ribeirão Preto – SP

2014

MIRELLA BARONI

Silenciamento do gene *GDF15* e resposta à radioterapia e ao tratamento com temozolomida em linhagens celulares de glioblastoma

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

Área de Concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica

Orientador: Carlos Alberto Scrideli

Ribeirão Preto – SP

2014

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

Baroni, Mirella

Silenciamento do gene *GDF15* e resposta à radioterapia e ao tratamento com temozolomida em linhagens celulares de glioblastoma. Ribeirão Preto, 2014.

78 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Diferenciação celular normal e neoplásica.

Orientador: Scrideli, Carlos Alberto.

1. GDF15. 2. shRNA. 3. Radioterapia. 4. Temozolomida.
5. Glioblastoma.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Mirella Baroni

Título: Silenciamento do gene *GDF15* e resposta à radioterapia e ao tratamento com temozolomida em linhagens celulares de glioblastoma.

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

Área de Concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico minha dissertação aos meus pais, Adalcio e Silvana, que são os meus exemplos de vida. Obrigada pelo apoio e incentivo, que permitiram que eu nunca desistisse dos meus sonhos. Minha eterna gratidão pelo amor, carinho, e também toda a dedicação que sempre tiveram por mim. Amo muito vocês!

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. *Carlos Alberto Scrideli* pela orientação desse trabalho, pelo apoio, e por colaborar imensamente com meu amadurecimento profissional. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. *Luiz Gonzaga Tone*, chefe do laboratório, pelo exemplo de liderança. Obrigada pela colaboração.

Às técnicas, *Rosane de Paula Gomes* e *Veridiana Kill Suazo*, pelo apoio e auxílio nos procedimentos técnicos.

Aos amigos e colegas de laboratório, *Augusto, Carol, Daniel, Kleiton, Vanessa, Mauricio, Lara, Lenisa, Gabriela M., Paola, Juli, Sol, Pamela, Regia, Karina*, pela amizade e pelo aprendizado nesses anos de convivência.

Aos amigos especiais, *Kátia, Deidiane, Gustavo e Gabriela*, pela grande amizade, pelo suporte nos momentos difíceis, e pelos incontáveis momentos felizes que passei com vocês. Adoro muito vocês!

Às minhas irmãs de coração, *Mariella (Pepita), Patricia (Pesq), Patricia (Son) e Maysa (Tete)*, pelo apoio, pela amizade sincera e pelas lembranças tão boas da melhor fase da minha vida. Amo vocês!

À minha amiga *Carla (Póket)*, que está sempre no meu coração. Obrigada por olhar por mim, mesmo de longe.

À minha família, tia *Rosana*, tio *Júnior*, irmão *Márcio*, cunhada *Débora* e, em especial, à minha *Vó Assumpção*, que é um exemplo de força. Obrigada a todos pelo carinho e amor.

Ao *Victor*, o qual sou muito grata por todo amor, compreensão, paciência e incentivo que foram indispensáveis nesse momento.

À *FAPESP*, pelo auxílio científico e financeiro.

*"Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!"*

Mário Quintana

Resumo/Abstract

BARONI, Mirella. Silenciamento do gene *GDF15* e resposta à radioterapia e ao tratamento com temozolomida em linhagens celulares de glioblastoma. 2014. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

O glioblastoma (GBM) é o mais comum e o mais maligno dos tumores primários cerebrais em adultos. Este tipo de tumor exhibe alterações genéticas complexas, que leva a progressão maligna e resistência aos tratamentos tradicionais. Entre as alterações genéticas, nosso grupo observou um aumento da expressão do gene *GDF15* em tumores primários de GBM quando comparados à substância branca não-neoplásica. O *GDF15* é um fator de crescimento que em condições fisiológicas normais está pouco expresso, mas em casos de inflamação e câncer sua expressão é aumentada. Níveis elevados de *GDF15* estão associados com pior prognóstico e com resistência aos tratamentos em diversos tipos de tumores. Esse projeto teve por objetivo correlacionar o silenciamento do *GDF15* com a sensibilidade à radioterapia e ao tratamento com a droga temozolomida (TMZ) em linhagens celulares de GBM pediátrico e adulto. Para analisar essas correlações foi realizada análise da expressão gênica do *GDF15* nas linhagens celulares de GBM por qRT-PCR. As linhagens de GBM adulto e pediátrico, que apresentaram maiores níveis de expressão, tiveram o *GDF15* silenciado pela técnica de transdução com RNA de interferência (shRNA). Após a comprovação da inibição do *GDF15*, foram feitos os tratamentos independentes (Radioterapia e TMZ) seguido dos estudos funcionais *in vitro*. Das 9 linhagens de GBM analisadas, 8 apresentaram expressão aumentada do *GDF15*. A linhagem de GBM pediátrico, KNS42, e a linhagem de GBM adulto, U343, foram as que mais expressaram *GDF15* em comparação com tecido não neoplásico. Após o silenciamento, houve alteração na capacidade clonogênica da linhagem KNS42 se comparada com o controle, mas não houve alteração na taxa de proliferação celular. A U343 não sofreu efeito da inibição do *GDF15*. O silenciamento associado com a TMZ teve efeito somente no aumento da proliferação celular da U343, com dados significantes após 72 horas de tratamento. A KNS42 não apresentou mudança na sensibilidade à TMZ após o silenciamento do *GDF15*. O silenciamento associado com radioterapia teve efeito na linhagem U343, que apresentou uma menor fração sobrevivente de colônias na linhagem silenciada, na dose de 4Gy, em comparação com a linhagem controle. A KNS42 não apresentou correlação entre o silenciamento e a resposta à radioterapia. Esses dados mostram que o silenciamento do *GDF15* promoveu respostas diferentes na linhagem U343 e na linhagem KNS42, que pode ser explicado pelas características moleculares distintas do GBM pediátrico e adulto.

Palavras chave: *GDF15*, shRNA, Temozolomida, Radioterapia, Glioblastoma.

BARONI, Mirella. *GDF15* knockdown and response to treatment with temozolomide and radiotherapy in glioblastoma cell lines. Thesis (M.Sc.) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Glioblastoma (GBM) is the most common and most malignant primary brain tumors in adults. Exhibits complex genetic changes that leads to malignant progression, and resistance to standard therapies. Among the genetic alterations, our group observed a high expression of *GDF15* in primary GBM tumors. The *GDF15* is a growth factor that under normal physiological conditions is weakly expressed but in case of inflammations and malignancies your expression is increased. The high level of *GDF15* is associated with poor prognosis and radio and chemoresistance in many types of tumors. This project aimed to correlate the silencing of *GDF15* with sensitivity to radiotherapy and TMZ in adult and child GBM cell lines. To analyze these correlations, was made the analysis of *GDF15* expression in GBM cell lines by qRT-PCR. The two cell lines that expressed more were transduced by the technique of short hairpin RNA (shRNA), which promoted the knockdown of *GDF15*. After verify the inhibition of *GDF15* gene and protein, were made independent treatments (radiotherapy and TMZ) followed by in vitro assays. Eight of nine GBM cells lines showed high expression of *GDF15*. The pediatric GBM cell line, KNS42 and adult GBM cell line, U343, had the higher expression of *GDF15* compared with normal tissue. After silencing, KNS42 showed decreased clonogenic capacity compared with control, but there was no change at cell proliferation. The U343 was not affected by *GDF15* inhibition. The silencing associated with TMZ only had effect in increasing proliferation of U343 with significant data after 72 hours of treatment. The KNS42 showed no change in sensitivity to TMZ after the *GDF15* silencing. The silencing associated with radiotherapy had effect at U343, which showed a lower fraction of surviving colonies in the silenced cell line at the 4Gy dose, compared with the control cell line. The KNS42 showed no correlation between silencing and sensitivity to radiotherapy. These data show that silencing of *GDF15* promoted different responses in U343 and KNS42 cell lines, which can be explained by different molecular characteristics of GBM pediatric and adult.

Keywords: *GDF15*, shRNA, Temozolomide, Radiotherapy, Glioblastoma.

Lista de Siglas e Abreviaturas

a - Anos

aa - Aminoácido

AKT - *Murine thymoma viral oncogene*

CDK1 - *Cyclin-dependent kinase 1*

cDNA - Ácido Desoxirribonucleico complementar

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EGF - *Epidermal Growth Factor*

EGFR - *Epidermal Growth Factor Receptor*

EGR1 - *Early Growth Response 1*

ERBB2/3 - *Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2/3*

FITC - Isotiocianato de Fluoresceína

GBM - Glioblastoma

GDF15 - *Growth Differentiation Factor 15*

GSK3 β - *Glycogen Synthase Kinase 3 beta*

Gy - Gray

h - Horas

HOXA9/10 - *Homeobox A9/10*

HPRT1 - *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*

IARC - International Agency for Research on Cancer

IC50 - *Half Maximal Inhibitory Concentration*

IDH1 - *Isocitrate Dehydrogenase 1*

INCA - Instituto Nacional do Câncer

kDa - Quilodalton

LOH - *Loss of heterozygosity*

MAPK - *Mitogen-activated Protein Kinase*

MEK (MAP2K7) - *Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 7*

mg/mL - Miligramas por Mililitro

MGMT - *O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase*

MIC-1 - *Macrophage Inhibitory Cytokine-1*

MOI - *Multiplicity of Infection*

mTOR - *Mechanistic Target of Rapamycin*

NAG-1 - *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Activated Protein-1*

nm - nanômetro

OMS – Organização Mundial de Saúde

p16 (CDKN2A) - *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A*

p53 – via do *Tumor Protein p53*

Pb – Pares de Base

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PDF - *Prostate-Derived Factor*

pH - Potencial Hidrogeniônico

PI - Iodeto de Propídeo

PI3K - *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*

PKA - *cAMP dependent protein kinase*

PKC - *Protein Kinase C*

PLAB - *Placental Bone Morphogenetic Protein*

PTEN - *Phosphatase and Tensin Homolog*

PTGF- β - *Placental Transforming Growth Factor-Beta*

qRT-PCR - *Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction*

RNA - Ácido Ribonucleico

SDS - *Sodium Dodecyl Sulfate*

shRNA - *Short Hairpin RNA*

SNC - Sistema Nervoso Central

SP1 - *Sp1 Transcription Factor*

SRC - *SRC Proto-Oncogene*

TBP - *TATA Box Binding Protein*

TBS - *Tris-buffered Saline*

TBS-T - *Tris-buffered Saline - Tween*

TGF- β - *Transforming Growth Factor-Beta*

TGF- β RII - *Transforming Growth Factor-Beta Receptor 2*

TMZ - Temozolomida

TP53 - *Tumor Protein p53*

u/mL - Unidade por mililitro

WHO - *World Health Organization*

µg/mL - Micrograma por mililitro

µL - Microlitro

µM - Micromolar

Lista de Figuras *e Tabelas*

Figura 1. Vias genéticas que direcionam para GBM primário e secundário.....	25
Figura 2. Estrutura do gene e da proteína GDF15 e mecanismos moleculares associados com processamento, secreção, armazenamento e ação autócrina/parácrina do GDF15.....	30
Figura 3. Eventos celulares envolvidos na regulação dos níveis de expressão do GDF15. E o GDF15 como potencial alvo terapêutico e biomarcador.....	31
Figura 4. A) Vetor pLKO.1 puro. B) Vetor pLKO com inserto da sequência de shRNA para o gene alvo	40
Figura 5. Nível de expressão gênica do <i>GDF15</i> nas linhagens celulares de GBM.....	48
Figura 6. Análise da expressão gênica da linhagem KNS42 após o silenciamento do gene <i>GDF15</i> em relação à linhagem controle.....	50
Figura 7. Análise da expressão gênica da linhagem U343 após o silenciamento do gene <i>GDF15</i> em relação à linhagem controle.....	52
Figura 8. Análise da expressão da proteína GDF15 na linhagem KNS42 após o silenciamento do gene <i>GDF15</i> em relação à linhagem controle, que foi transduzida apenas com o vetor pLKO puro	52
Figura 9. Análise da expressão da proteína GDF15 na linhagem U343 após o silenciamento do gene <i>GDF15</i> em relação à linhagem controle, que foi transduzida apenas com o vetor pLKO puro	53
Figura 10. Quantificação da inibição da expressão da proteína GDF15 na linhagem KNS42 após o silenciamento do gene <i>GDF15</i> em relação à linhagem controle, que foi transduzida apenas com o vetor pLKO puro	53
Figura 11. Quantificação da inibição da expressão da proteína GDF15 na linhagem U343 após o silenciamento do gene <i>GDF15</i> em relação à linhagem controle, que foi transduzida apenas com o vetor pLKO puro	54
Figura 12. Doubling time da linhagem KNS42. A viabilidade celular foi analisada a cada 24 horas por um período de 96 horas	55
Figura 13. Doubling time da linhagem U343. A viabilidade celular foi analisada a cada 24 horas por um período de 96 horas	55
Figura 14. Taxa da proliferação celular para a linhagem KNS42. A proliferação celular foi analisada a cada 24 horas por um período de 96 horas	56
Figura 15. Taxa da proliferação celular para a linhagem U343. A proliferação celular foi analisada a cada 24 horas por um período de 96 horas	56
Figura 16. Número de colônias formadas da linhagem KNS42 silenciada e a linhagem controle, após 7 dias em cultura sem tratamento.....	57
Figura 17. Número de colônias formadas da linhagem U343 silenciada e da linhagem controle, após 10 dias em cultura sem tratamento.....	57
Figura 18. Curvas de proliferação celular para a linhagem KNS42, silenciada e controle, após o tratamento com TMZ nos quatro tempos.....	58

Figura 19. Valores do IC50 da TMZ para a linhagem KNS42, silenciada e controle, a cada 24 horas de tratamento.	58
Figura 20. Curvas de proliferação celular da linhagem U343, silenciada e controle, após o tratamento com TMZ nos quatro tempos	59
Figura 21. Valores do IC50 da TMZ para a linhagem U343, silenciada e controle, a cada 24 horas de tratamento.....	59
Figura 22. Número de células Anexina V/PI positivas após 48 horas de tratamento com a TMZ. Análise da linhagem KSN42 transformada (<i>GDF15</i> -) em relação ao controle (vetor pLKO puro).....	60
Figura 23. Número de células Anexina V/PI positivas após 48 horas de tratamento com a TMZ. Análise da linhagem U343 transformada (<i>GDF15</i> -) em relação ao controle (vetor pLKO puro).....	60
Figura 24. Ensaio clonogênico das linhagens KNS42, <i>GDF15</i> - e controle, tratadas com TMZ (0 a 160 μ M)	61
Figura 25. Ensaio clonogênico das linhagens U343, <i>GDF15</i> - e controle, tratadas com TMZ (0 a 40 μ M)	61
Figura 26. Ensaio clonogênico das linhagens KNS42, <i>GDF15</i> - e controle, após a irradiação (0, 2, 4 e 6 Gy)	62
Figura 27. Ensaio clonogênico das linhagens KNS42, <i>GDF15</i> - e controle, após a irradiação (0, 2, 4 e 6 Gy)	62
 Tabela 1. Sistema de Classificação para os Astrocitomas da Organização Mundial da Saúde (WHO)	23
Tabela 2. Sequências utilizadas na construção dos vetores.....	39
Tabela 3. Caracterização das linhagens celulares de GBM, U343 e KNS42.	48
Tabela 4. Eficiência do silenciamento do <i>GDF15</i> dos clones A e B, nos diferentes MOIs e seus respectivos intervalos de confiança, para a linhagem KNS42.....	51
Tabela 5. Eficiência do silenciamento do <i>GDF15</i> dos clones A e C, nos diferentes MOIs e seus respectivos intervalos de confiança, para a linhagem U343	52

Sumário

1. Introdução	21
1.1. Câncer.....	22
1.2. Câncer no Sistema Nervoso Central.....	22
1.3. Glioblastoma.....	23
1.4. Fator de Crescimento e Diferenciação 15 – <i>GDF15</i>	29
2. Objetivos do Estudo	33
2.1. Objetivo Geral.....	34
2.2. Objetivos Específicos	34
3. Delineamento Experimental.....	35
4. Materiais e Métodos	37
4.1. Análise da expressão gênica do <i>GDF15</i> nas linhagens de GBM	38
a) Linhagens celulares e condições de cultura.....	38
b) Extração de RNA e síntese de cDNA.....	38
c) Análise da expressão gênica por qRT-PCR.....	38
4.2. Silenciamento gênico – RNA de interferência (shRNA)	39
a) Padronização do protocolo de transdução	41
• Titulação da puromicina	41
• Determinação do MOI (<i>Multiplicity of Infection</i>)	41
• Seleção das células transduzidas	41
b) Confirmação do silenciamento gênico e proteico	42
• Análise da expressão proteica (Western Blotting)	42
o Extração de proteínas.....	42
o Western Blotting	42
4.3. Caracterização das linhagens transduzidas.....	43
a) Determinação do tempo de duplicação (“ <i>doubling time</i> ”) celular	43
b) Ensaio de proliferação celular	43
c) Teste de sobrevivência clonogênica	44
4.4. Avaliação da sensibilização à droga TMZ após o silenciamento.....	44
a) Ensaio de proliferação celular	44
• IC50	45
b) Ensaio de apoptose	45
c) Teste de sobrevivência clonogênica	45
4.5. Avaliação da sensibilização à radioterapia após silenciamento	46
a) Teste de sobrevivência clonogênica	46
4.6. Análises estatísticas	46
5. Resultados	47

5.1.	Avaliação da expressão gênica do <i>GDF15</i> nas linhagens de GBM	48
5.2.	Silenciamento gênico – RNA de interferência (shRNA)	49
a)	Ensaio de titulação de puromicina	49
b)	Transdução das linhagens KNS42 e U343	49
•	Ensaio de viabilidade celular pós-transdução	49
•	Avaliação da eficiência do silenciamento gênico	50
•	Avaliação da eficiência do silenciamento proteico	52
5.3.	Caracterização das linhagens transduzidas	54
a)	Determinação do tempo de duplicação (“ <i>doubling time</i> ”) celular	54
b)	Ensaio de proliferação celular	55
c)	Teste de sobrevivência clonogênica	56
5.4.	Avaliação da sensibilização à droga TMZ após o silenciamento	57
a)	Ensaio de proliferação celular	57
b)	Ensaio de apoptose	60
c)	Teste de sobrevivência clonogênica	61
5.5.	Avaliação da sensibilização à radioterapia após o silenciamento	62
6.	Discussão	63
7.	Conclusões	69
8.	Referências Bibliográficas	71

1. Introdução

1.1. Câncer

O câncer resulta do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas na célula de origem, e após sucessivas mutações essa célula é capaz, de forma autônoma, de proliferar e migrar, formando o tecido tumoral (Stratton *et al.*, 2009).

De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (Iarc, do inglês International Agency for Research on Cancer), da Organização Mundial da Saúde (OMS), ocorreram 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no mundo e no nosso país (INCA, 2014).

1.2. Câncer no Sistema Nervoso Central

Os tumores malignos do sistema nervoso central afetam cerca de 1,3% de todos os cânceres e 2,2% de todas as mortes relacionadas ao câncer. A taxa de incidência mundial de tumores do Sistema Nervoso Central (SNC), em 2008, para os homens, foi de 3,9 por 100.000 pessoas e 3,2 por 100 mil pessoas para o sexo feminino. Observou-se um aumento global de novos casos de tumores do SNC em todo o mundo, especialmente nos países menos desenvolvidos (Lukaszewicz-Zaja *et al.*, 2014). Para o Brasil, no ano de 2014, estimam-se 4.960 casos novos de câncer do SNC em homens e 4.130 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,07 casos novos a cada 100 mil homens e 4,05 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2014).

A Organização Mundial da Saúde (WHO) classifica os tumores do SNC em diferentes categorias, baseado na suposta origem das células. Por essa classificação, os tumores derivados de tecido neuroepitelial compreendem grande parte daqueles frequentemente referidos como tumores encefálicos primários, tais como tumores astrocíticos, oligodendrogliais, neuroblásticos, embrionários, e outros. Os tumores gliais, genericamente denominados gliomas, são originados em células da glia – sendo denominados: astrocitomas (astrócitos), oligodendroglioma (oligodendrócitos), oligoastrocitoma (tumores com fatores morfológicos de astrócitos e oligodendrócitos) e ependimomas (células ependimárias) (Louis *et al.*, 2007).

Os gliomas constituem a forma mais comum de tumores encefálicos primários e possuem alguns subtipos distintos histologicamente. Muitos gliomas são malignos e altamente invasivos, o que os torna de difícil controle e impossibilita sua remoção completa por cirurgia, indicando, assim, sua alta letalidade. A habilidade dos gliomas para invadir o tecido neural circundante é caracterizada pela capacidade dessas células tumorais de ultrapassar a barreira da matriz extracelular. Sabe-se, por exemplo, que o processo de invasão tumoral consiste em vários estágios, incluindo interação da célula tumoral com ligantes da matriz extracelular, a destruição hidrolítica da matriz pela liberação de enzimas proteolíticas e a subsequente migração das células tumorais através da área de destruição (Park *et al.*, 2014).

Um dos subtipos dos gliomas são os astrocitomas, que podem apresentar comportamento diferente segundo a sua topografia, sendo classificados, segundo a WHO, em astrocitoma pilocítico (grau I) e astrocitomas difusamente infiltrantes que estão subdivididos em astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III) e glioblastoma (grau IV) (Tabela 1). A gradação dos astrocitomas está baseada no aumento do grau de anaplasia da célula tumoral que eventualmente determina o curso da doença (Louis *et al.*, 2007).

Tabela 1. Sistema de Classificação para os Astrocitomas da Organização Mundial da Saúde (WHO).

Classificação	Nome	Características Histológicas
I	Astrocitoma pilocítico	Sem células pleomórficas e baixo potencial de proliferação.
II	Astrocitoma de baixo grau	Baixa celularidade e mínima atipia nuclear.
III	Astrocitoma anaplásico	Anaplasia e atividade mitótica.
IV	Glioblastoma	Proliferação microvascular e necrose.

1.3. Glioblastoma

O astrocitoma de grau IV, o glioblastoma (GBM), representa, aproximadamente, 16% de todas as neoplasias intracranianas e 80% dos tumores astrocíticos, sendo o mais comum e o mais maligno dos tumores primários cerebrais em adultos (Sturm; de la Rocha *et al.*, 2014). Em crianças, aproximadamente 40%

de todos os tumores cerebrais são astrocitomas (gliomas) e, destes, 15-20% são gliomas malignos (grau III e IV) (Al-Saffar *et al.*, 2014). Algumas publicações relataram que há diferenças nas características clínicas e moleculares, mas não há diferenças histopatológicas em GBM de crianças quando comparadas com os adultos (Suri *et al.*, 2009).

A característica histopatológica do GBM é marcada pela atipia nuclear, pleomorfismo celular, alto poder proliferativo e atividade mitótica, proliferação endotelial e trombose vascular, além da presença de focos de necrose celular. Algumas lesões apresentam alto grau de celularidade e pleomorfismos nuclear com numerosas células gigantes multinucleadas. Seu diagnóstico histopatológico é melhor caracterizado pelo tecido do que pela morfologia celular, e este diagnóstico diferencial se dá pela alta vascularização, áreas necróticas e intensa atividade mitótica (Louis *et al.*, 2007).

O GBM pode ser classificado como primário ou secundário. O GBM primário ocorre pelo processo denominado “*de novo*”, o qual não há provas de um precursor menos maligno, enquanto GBM secundário se desenvolve a partir de um astrocitoma difuso inicialmente de baixo grau (grau II) ou astrocitoma anaplásico (grau III). A maioria dos GBMs (~90%) são primários. Os pacientes com GBM primário tendem a ser mais velhos (média de idade = 55 anos) do que pacientes com GBM secundário (média de idade = 40 anos). GBM secundário está associado a um melhor prognóstico e aumento do tempo de sobrevida global em comparação com GBM primário (Wilson, Karajannis & Harte, 2014).

Embora sendo indistinguíveis na histopatologia, GBMs primários e secundários evoluem a partir de diferentes precursores genéticos e possuem alterações genéticas distintas (Figura 1). As alterações genéticas mais comuns em GBM primário são a superexpressão do *EGFR* e mutações no *PTEN*. A alteração que é observada desde o início do desenvolvimento do GBM secundário, é a mutação no gene *TP53*. A perda de heterozigosidade 10q é a alteração mais frequente nos dois tipos (Ohgaki & Kheihues, 2007).

Figura modificada de Ohgaki e Kleihues, 2007

Figura 1. Vias genéticas que direcionam para GBM primário e secundário (adaptado de Ohgaki & Kleihues, 2007).

Outra alteração já bem descrita em GBM é a mutação no *IDH1*. Essa mutação foi descoberta nos casos de GBM secundário, o que permitiu distinguir melhor GBM primário e secundário. Antes o diagnóstico era realizado por evidências histológicas da presença de um possível precursor menos maligno (Ohgaki & Kleihues, 2013). Os primeiros estudos observaram que mutações no *IDH1* ocorrem em grande parte dos pacientes mais jovens, maioria desses com GBM secundário, e está relacionado com melhor prognóstico e aumento da sobrevida global (Parsons *et al.*, 2008). Curiosamente, essas mutações, são também encontradas em mais de 80% dos casos de astrocitoma anaplásico e astrocitoma difuso, que são precursores de GBM secundário (Ohgaki & Kleihues, 2013). Estudos subsequentes mostraram que a frequência dessas mutações é de 80% nos casos de GBM secundário e menos de 5% nos casos de GBM primário. Assim, *IDH1* é um marcador confiável para diagnóstico e prognóstico dos casos de GBM (Wilson, Karajannis & Harte, 2014).

Apesar das novas descobertas e avanços, o GBM é caracterizado por recorrência e pela alta taxa de letalidade, sendo o tempo médio de sobrevida de aproximadamente 12 meses para os pacientes adultos (Brat *et al.*, 2014). Apesar de

melhor prognóstico em comparação aos adultos, dados de um estudo mostraram que, na maioria dos casos de GBM infantil, a recorrência e morte ocorre dentro de 2 anos (Perkins *et al.*, 2011).

O tratamento cirúrgico para este tipo de tumor é dificultado devido a sua topografia difusa e localização variável. O GBM apresenta ramificações distantes da área central do tumor devido ao comportamento invasivo das células neoplásicas. Em casos extremos, pode apresentar um comportamento conhecido como *gliomatosis cerebri*, no qual o tumor apresenta uma região central mínima ou ausente e o cérebro é globalmente infiltrado por células neoplásicas. Desta forma, mesmo com cirurgias recorrentes, os pacientes normalmente vêm a óbito quando o tumor atinge regiões vitais do cérebro (Olar & Aldape, 2014).

O tratamento padrão para o GBM manteve-se estável por muitos anos e consiste essencialmente na ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia com o agente alquilante Temozolomida (TMZ). Atualmente a cirurgia seguida de radioterapia e quimioterapia adjuvante com TMZ tem sido utilizada como protocolo de tratamento padrão para a maioria dos pacientes, contudo, a sobrevida média mantém-se muito baixa (de 12 a 15 meses) e a sobrevida em 5 anos é inferior a 10% (Weller *et al.*, 2014). Devido ao escasso estudo dos GBMs pediátricos, estes pacientes têm sido tratados com base em dados de ensaios clínicos realizados em adultos. Entretanto, evidências moleculares têm demonstrado que esta parece não ser a melhor abordagem e que é necessário o desenvolvimento de marcadores e terapias específicas para este grupo de pacientes (MacDonald, Aguilera & Kramm, 2011).

O GBM apresenta diversos fatores que resultam em um tumor resistente à quimio- e radioterapia. A taxa de proliferação celular e, conseqüentemente, o crescimento da massa tumoral geralmente é maior que o ritmo de vascularização do tecido, tornando o suporte vascular limitado, desorganizado e não funcional. Estas características favorecem a um sistema deficiente na irrigação dos tecidos, no suprimento de oxigênio (hipóxia) e de nutrientes, comprometendo as funções biológicas do mesmo (Bedogni & Powell, 2009) que limita o crescimento do tumor (Khasraw & Lassman, 2010).

Isto pode ser observado tanto em modelos experimentais de câncer quanto em tumores sólidos humanos como o GBM, nos quais as células hipóxicas formam uma “barreira”. Esse delineamento da borda entre as células tumorais em torno dos

vasos sanguíneos e as áreas de necrose, resulta na ineficiente ação física da radiação e dificulta o acesso à droga (Wippold *et al.*, 2006). Além disso, como meio de obtenção de energia, em regiões de hipóxia, ocorre um aumento no metabolismo anaeróbico pelas células. Assim, o ciclo dinâmico de hipóxia/reoxigenação, sobrevivência/proliferação torna a célula tumoral mais agressiva, pois desencadeiam mudanças na via de reparação do DNA e na via de sinalização de morte/sobrevivência celular, resultando em mau prognóstico e resistência a quimio e radioterapia (Chiche, Brahimi-Horn & Pouyssegur, 2010).

Com relação à radiorresistência, é importante lembrar que no GBM as células apresentam-se em diversos estágios do ciclo celular e não apenas na fase G2/M que são as células-alvo preferenciais neste tratamento. Outro fator importante é que a radioterapia é um tratamento focal, e o GBM por sua natureza invasiva possui células em regiões bem distantes do foco tumoral, fazendo com que essas células não sejam atingidas pela radiação. Além disso, a dose de radiação necessária para que as células tumorais morram, acaba afetando também as células normais (Benouaich-Amiel, Simon & Delattre, 2005).

O GBM também é resistente à quimioterapia pela presença da barreira hematoencefálica que dificulta a passagem de drogas para o tecido nervoso (Lu & Shervington, 2008). A droga padrão para o tratamento dos pacientes é a TMZ, um agente alquilante que penetra na barreira encefálica. Esta é dada, geralmente, em baixa dose e concomitante com a radioterapia, seguido por doses padrão adjuvante (Cavaliere, Wen & Schiff, 2007).

A TMZ é um agente alquilante que adiciona um grupo metil nas bases púricas de DNA, produzindo O6-Guanina (6%), N7-Guanina (70%) e N3-Adenina, (9%). O tratamento com TMZ leva a morte celular primariamente pela metilação O6-Guanina. Esta modificação conduz ao pareamento da Guanina com a Timina durante a replicação do DNA e promove lesões na fita dupla que são difíceis de restaurar pelo sistema de reparação de pareamento incorreto do DNA, o que contribui para a morte celular. Como é uma molécula lipofílica, a TMZ é administrada por via oral e pode penetrar a barreira sangue-cérebro, com relativa facilidade e tem uma biodisponibilidade elevada (> 99%). A toxicidade da TMZ é típica de um agente de alquilação e incluem efeitos secundários hematológicos tais como linfopenia, trombocitopenia e leucopenia (St-Coeur *et al.*, 2013).

Infelizmente, resistência adquirida e inerente à TMZ é uma ocorrência comum em pacientes com GBM. Essa resistência em gliomas está fortemente correlacionada com o status da presença e atividade da enzima de reparo do DNA O6-MGMT. É uma enzima capaz de remover grupos metil da posição O6-Guanina e neutralizar os efeitos citotóxicos da TMZ, assim a expressão da proteína MGMT em tumores GBM pode aumentar significativamente a capacidade de resistência ao tratamento com TMZ (Hermisson *et al.*, 2006). A expressão de MGMT é reduzida por hipermetilação do promotor, resultando em aumento da sensibilidade, essa hipermetilação é detectada em 45-70% dos gliomas de alto grau (Hegi *et al.*, 2008).

Estes tratamentos, radioterapia e TMZ, também são prescritos em casos de GBMs pediátricos, mas suas respostas são diferentes quando comparados com o adulto. Essa diferença pode ser causada pelo GBM nas crianças ter uma entidade biológica distinta da dos adultos. Como por exemplo, o GBM adulto é associado muitas vezes com amplificação do gene *EGFR* (do inglês, *epidermal growth factor receptor*) e deleção do gene homólogo ao *PTEN* (do inglês, *phosphate and tensin*). Em contraste, no GBM pediátrico é observado com mais frequência, alterações no gene *TP53* e raramente exibe amplificação do *EGFR* e deleção do *PTEN* (Suri *et al.*, 2009). Este conhecimento e o fato que idade é um fator de bom prognóstico sugerem fortemente que existem diferenças biológicas em tumores pediátricos (Perkins *et al.*, 2011).

Todas essas dificuldades relativas à terapia para pacientes portadores de GBM indicam a necessidade de novas estratégias de tratamento. O advento das linhagens celulares de GBM e as recentes descobertas sobre a biologia desta neoplasia agressiva podem auxiliar-nos em propostas de terapias direcionadas às características moleculares deste tipo de câncer, que podem ser utilizadas isoladas ou como adjuvantes dos tratamentos convencionais (Yan, Zhang & Jiang, 2011). Neste sentido, nosso grupo analisou, pela técnica de microarranjo, o perfil gênico de tumores primários de GBM adulto e observou expressão alterada de diversos genes. Dentre os genes diferencialmente expressos o *GDF15* (do inglês, *Growth/Differentiation Factor 15*) está 476 vezes mais expresso nos tecidos tumorais dos pacientes com GBM em comparação com tecido nervoso não neoplásico quando validado pela técnica de qRT-PCR (Scrideli *et al.*, 2008).

1.4. Fator de Crescimento e Diferenciação 15 (GDF15)

O *GDF15* faz parte da superfamília *TGF- β* (do inglês, *Transforming Growth Factor-Beta*) e também é conhecido como *MIC-1* (do inglês, *Macrophage Inhibitory Cytokine-1*), *PDF* (do inglês, *Prostate-Derived Factor*), *PLAB* (do inglês, *Placental Bone Morphogenetic Protein*), *NAG-1* (do inglês, *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Activated Protein-1*), e *PTGF- β* (do inglês, *Placental Transforming Growth Factor-Beta*) (Strelau *et al.*, 2008).

O *GDF15* está localizado no cromossomo 19, na região p12-13.1 e consiste em uma sequência de DNA de 2746 pares de bases (pb) que compreendem dois éxons, separados por um único íntron. O processamento do *GDF15* que se inicia pela tradução do gene em um monômero que é composto por um pro-peptídeo de 167 aminoácidos (aa) e uma região da proteína madura de 112 aa. Durante o processamento proteolítico, acontece a dimerização desse monômero formando o precursor, este é clivado no sítio RXXR na posição 196 pela enzima furina. Essa clivagem proteolítica gera um pró-peptídeo N-terminal e um fragmento C-terminal que constitui a proteína madura de 25 kDa (Mimeault & Batra, 2010). Sob algumas circunstâncias, a proteína madura e o pró-peptídeo são secretados pelas células após a passagem por duas vias intracelulares diferentes (Bauskin *et al.*, 2000). Após a secreção, a proteína madura rapidamente se difunde para a circulação, mas o pró-peptídeo se liga a matriz extracelular e fica retido localmente (Figura 2) (Bauskin *et al.*, 2005). O receptor para *GDF15* ainda não é conhecido e sinaliza vias que ainda estão para ser descritas, mas estudos funcionais sugerem que utilize o receptor para *TGF- β* RII (Johnen *et al.*, 2007; De Jager *et al.*, 2011).

Figura 2. Estrutura do gene e da proteína GDF15 e mecanismos moleculares associados com processamento, secreção, armazenamento e ação autócrina/parácrina do GDF15. Figura adaptada de Wang, Baek & Eling, 2011 e Mimeault & Batra, 2010.

A placenta é o único tecido que expressa grandes quantidades de GDF15 em condições fisiológicas normais. Porém, há uma pequena expressão nos tecidos do pulmão, fígado e rim e em uma variedade de células epiteliais (Moore *et al.*, 2000; Tong *et al.*, 2004; Schober *et al.*, 2001; Bauskin *et al.*, 2006). Em condições como lesões, inflamação e câncer, a expressão do GDF15 é aumentada (Brown *et al.*, 2009; Welsh *et al.*, 2003) e tem sido considerada a citocina secretora chave na resposta celular às condições estressoras.

No diagnóstico de câncer de cólon, níveis séricos elevados de GDF15 foram associados a um pior prognóstico e uma reincidência precoce do câncer (Brown *et al.*, 2003). Outros estudos indicam resultados similares para melanoma (Boyle *et al.*, 2009), câncer pancreático (Bauskin *et al.*, 2010) e câncer da tireoide (Fluge *et al.*, 2006). Assim, estimar o nível sérico de GDF15 pode ser útil clinicamente para a

constatação de doenças inflamatórias e malignas como o câncer. (Brown *et al.*, 2007).

No estudo realizado por Shnaper e colaboradores em 2009, observou-se que o alto nível de GDF15 no fluido cérebro-espinhal está relacionado com uma menor taxa de sobrevida em pacientes com GBM. Além de ser explorado para o diagnóstico e prognóstico do câncer, a própria proteína GDF15, expressa pelas células tumorais, pode também servir como um alvo para intervenção terapêutica (Figura 3).

Figura 3. Eventos celulares envolvidos na regulação dos níveis de expressão do GDF15. E o GDF15 é indicado como potencial alvo terapêutico e biomarcador. Figura adaptada de Mimeault & Batra, 2010.

Vários estudos delinearam cascatas moleculares que associam o *GDF15* com a progressão do tumor. Por exemplo, a expressão elevada do *GDF15*, em linhagem celular de câncer gástrico, aumentou significativamente a atividade e expressão do ativador da uroquinase e seu receptor, que são pré-requisitos para a capacidade de invasão tumoral (Lee *et al.*, 2003). Em células de câncer de mama, o *GDF15* também tem demonstrado que participa na progressão maligna através da indução de transativação do receptor de EGF, ERBB2, e ERBB3 e a ativação de c-SRC (Park, Lee & Lee, 2010). No entanto, o *GDF15* também pode ter propriedade anti-

tumorigênica e atividade pró-apoptótica, pela primeira vez identificada em câncer colorrectal (Baek *et al.*, 2005).

Várias vias regulam a expressão do *GDF15*, entre elas a SP1, p53, EGR1, PKC, PKA, MEK, MAPK e PI3K/AKT. A propriedade anti-tumorigênica de *GDF15*, em parte, tem sido atribuída à sua regulamentação pelo supressor de tumor *EGR1* (Baek *et al.*, 2005). No trabalho de Cheng, Chang e Leung (2011) mostrou a relação entre o *GDF15* e o gene *TP53*, neste estudo foi demonstrado que a alta expressão do *TP53* selvagem (sem mutação) induz a expressão e secreção do *GDF15*, o que resulta na atenuação na motilidade das células tumorais. Além da importância do *GDF15* no diagnóstico e no desenvolvimento do câncer, há estudos que demonstram sua relação com a resistência ao tratamento quimioterápico (Corre *et al.*, 2012) e à radioterapia (Chang *et al.*, 2007).

Há alguns trabalhos com *GDF15* em GBM, o estudo de Roth *et al.* (2010) mostrou, por imunohistoquímica e por PCR em tempo real, que em tumores primários e em linhagens celulares há a expressão alterada de *GDF15*, e que este está mais expresso em comparação ao tecido nervoso não neoplásico. Este estudo observou que ao inibir o *GDF15* com anticorpo houve uma diminuição da proliferação em algumas linhagens celulares, mas não houve diferença na taxa de apoptose. Este trabalho também inibiu o *GDF15* em camundongo e foi constatado uma diminuição no tamanho do tumor e um aumento do tempo de sobrevivência. Porém, no estudo de Kadowaki e colaboradores (2012), revela baixa expressão do *GDF15* nas linhagens de GBM, e ao hiperexpressá-lo acarreta um aumento da taxa de apoptose e uma menor formação de colônias.

Há evidências de que o *GDF15* pode apresentar um importante papel na tumorigênese em diversos cânceres, mas seu papel em GBM ainda não está claro. Em conjunto, estas informações evidenciam a importância da caracterização do *GDF15* em gliomas para uma melhor compreensão da biologia tumoral.

2. Objetivos da Estudo

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o impacto funcional da inibição do *GDF15* combinado com radioterapia e quimioterapia convencional (Temozolomida) e verificar seus efeitos *in vitro* em linhagens celulares de GBM pediátrico e adulto.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar a expressão gênica do *GDF15* nas linhagens celulares de GBM por qRT-PCR;
- Silenciar o gene *GDF15* por RNA de interferência (shRNA) em linhagens celulares de GBM e verificar o seu efeito na proliferação e na capacidade clonogênica;
- Nas linhagens celulares selecionadas, avaliar a associação entre o silenciamento gênico com o tratamento com a droga TMZ e analisar o efeito dessa associação na proliferação, na taxa de apoptose e no ensaio clonogênico.
- Nas linhagens celulares selecionadas, avaliar a associação entre o silenciamento gênico com a irradiação e analisar o efeito dessa associação na capacidade clonogênica.

3. Delineamento

Experimental

4. Materiais e Métodos

4.1. Análise da expressão gênica do *GDF15* nas linhagens de GBM

a) Linhagem Celular e Condições de Cultura: As linhagens celulares de GBM utilizadas no experimento foram: U343, T98G, U251, MO59K, U138, LN319, U87, SF188 e KNS42. As linhagens celulares T98G, U251, U343 e U87, foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC, VA, EUA), as linhagens LN319 e SF188 (GBM pediátrico) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Frank Furnari (Ludwig Institute for Cancer Research, La Jolla, CA, EUA) e pelos Drs. Nada Jabado e Damien Faury (McGill University, Canadá), respectivamente. A linhagem de GBM pediátrico, KNS42, foi adquirida do Banco de Células do Japão (JCRB Cell Bank – National Institute of Biomedical Innovation). As linhagens celulares foram cultivadas em meio HAM/F10 suplementado com 1% de glutamina, 100 mg/ml de estreptomicina, 100 u/ml de penicilina, e 10% de soro bovino fetal (pH 7.2– 7.4) em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. Foram feitos testes que avaliaram os marcadores moleculares em todas as linhagens celulares de GBM, comprovando a origem e que não há contaminação com outras linhagens.

b) Extração de RNA e síntese de cDNA: As linhagens celulares de GBM tiveram seu RNA total extraído utilizando o reagente TRIZOL® (Invitrogen Inc, Carsdab, CA, EUA) segundo as especificações do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada com o kit High Capacity® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

c) Análise da expressão gênica por qRT-PCR: Para quantificar a expressão do gene *GDF15* em todas as linhagens, foi realizada a técnica de qRT-PCR com a utilização do equipamento ABI PRISMTM 7500 Sequence Detection Systems (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), por monitorização contínua de fluorescência por sondas Taqman® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. As diferenças na quantidade de cDNA total adicionada a cada reação do gene *GDF15* (número catálogo: Hs00171132_m1) foram normalizadas utilizando 2 genes, *TBP* (número catálogo: Hs00427620_m1) e *HPRT1* (número catálogo: Hs02800695_m1), como controle interno. Foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para a quantificação relativa da expressão

gênica, sendo utilizada como calibrador substância branca não neoplásica (Livak & Schmittgen, 2001).

4.2. Silenciamento gênico – RNA de interferência (shRNA)

No intuito de produzir o silenciamento gênico estável, foram utilizadas moléculas de shRNA (siRNA sintetizadas na forma de pequenos grampos: *short hairpin* RNA – shRNA) clonadas em partículas lentivirais. Posteriormente, as linhagens celulares foram transduzidas e o vetor utilizado foi inserido de maneira estável no genoma da célula. Para o gene alvo analisado foi utilizado um conjunto de cinco clones lentivirais validados (shRNA específicos; (*Mission RNA* Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA). Para a construção dos clones lentivirais foram utilizadas as sequências descritas na Tabela 1, clonadas no vetor pLKO. O gene de resistência à puromicina também foi clonado para permitir o processo de seleção das células transduzidas. Para o controle negativo dos experimentos, as células foram transduzidas com o vetor pLKO puro (Figura 4A e 1B).

Tabela 2. Sequências utilizadas na construção dos vetores.

NM_0864 - <i>Growth Differentiation Factor 15</i> (GDF15)	
A.	CCGGCCCTCAGAGTTGCACTCCGAACCTCGAGTTCGGAGTGCAACTCTGAGGGTTTTTG
B.	CCGGGCTCCAGACCTATGATGACTTCTCGAGAAGTCATCATAGGTCTGGAGCTTTTTTG
C.	CCGGAGACTCCAGATTCCGAGAGTTCTCGAGAACTCTCGGAATCTGGAGTCTTTTTTG
D.	CCGGCCGGATACTCACGCCAGAAGTCTCGAGACTTCTGGCGTGAGTATCCGGTTTTTG
E.	CCGGCTATGATGACTTGTTAGCCAACTCGAGTTGGCTAACAAGTCATCATAGTTTTTG

a) Padronização do protocolo de transdução: O primeiro passo realizado antes do início da transdução foi o ensaio de titulação da puromicina para determinar a concentração letal (curva de mortalidade celular) do antibiótico para cada linhagem estudada.

- **Titulação da puromicina:** Para o ensaio de titulação da puromicina, 2×10^3 células foram semeadas em placas de cultivo de 96 poços. As células foram tratadas com diferentes concentrações de puromicina na faixa de 0 a $10 \mu\text{g/mL}$. Para cada tratamento, foram semeadas em quadruplicata e, em seguida, incubadas por 24, 48, 72, 96 e 120 horas a 37°C . A cada intervalo, foi realizada a remoção do meio de cultura, foi fixado com metanol e corado com Giemsa. As placas foram então descoradas e a leitura foi realizada na absorbância de 655 nm utilizando o aparelho iMark Microplate Absorbance Reader (Biorad Laboratories, Inc, CA, EUA). Os experimentos foram repetidos três vezes em quadruplicata. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e comparados com os resultados de células não tratadas (controle).

- **Determinação do MOI (multiplicity of infection):** Primeiramente, para continuação da transdução para produção do silenciamento gênico, escolhemos as duas linhagens que apresentaram o maior nível de expressão de *GDF15*. Após determinada a concentração de puromicina a ser utilizada para a seleção determinou-se a multiplicidade de infecção (MOI), que é o número de partículas virais transdutoras por célula. Para as linhagens estudadas foram determinadas as melhores concentrações de acordo com o seguinte protocolo: as células de GBM foram semeadas (1×10^4 células) em placas de cultivo de 96 poços com volume final de $100 \mu\text{L}$ poço. As partículas lentivirais foram adicionadas em concentrações que variaram de 0 a 1,5 MOI. Para o gene *GDF15* foram utilizados os clones A, B e C. Cada clone continha uma concentração final de partículas de 10^6 partículas/mL. 1. (MOI = titulação viral (total de partículas transdutoras (TU)/mL) x volume de vírus/ número de células).

- **Seleção das células transduzidas:** Após a adição das partículas lentivirais às células, a placa de cultivo foi centrifugada por $800 \times g$ por 30 minutos a 32°C . No dia seguinte, o meio de cultura, contendo as partículas lentivirais, foi descartado e foi adicionado um novo meio de cultura. Após 2 dias de cultivo, o meio

de cultura contendo puromicina foi utilizado para iniciar a seleção dos clones. Essa seleção, com duração aproximada de 4 semanas, ocorreu pela morte celular das células que não tiveram a inserção do vetor que contem o gene de resistência a puromicina.

b) Confirmação do silenciamento gênico e proteico: A confirmação do silenciamento gênico (e cálculo da porcentagem de silenciamento) foi realizada por meio da técnica de qRT-PCR quantitativa, a qual o protocolo já foi descrito anteriormente. Também foi feita a confirmação do silenciamento em nível proteico por *Western Blotting*, utilizando como controle a linhagem transduzida somente com vetor puro pLKO.

➤ **Análise da expressão proteica - Western Blotting**

- **Extração de proteínas:** Após a seleção das células transduzidas, foi realizada a extração de proteína total das duas linhagens que mais expressaram *GDF15*. 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), utilizando-se uma solução de soro albumina bovina (BSA, 0,1 mg/mL) como padrão. Os valores de absorbância foram obtidos através da leitura em espectrofotômetro (leitor de micro placas) utilizando-se o comprimento de onda de 595 nm, utilizando o leitor *iMark Microplate Absorbance Reader* (BioRad Laboratories, Inc, CA, EUA).

- **Western Blotting:** A metodologia utilizada, seguida de acordo com Sambrook e colaboradores (1989), foi modificada como descrito a seguir. Concentrações iguais (40µg) de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12%, 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 ou *overnight*. Em seguida ocorreu a incubação com os anticorpos primários específicos (anti *GDF15*, *Santa Cruz Biotechnology*, número catálogo: sc-377195; anti β -actina, *Santa Cruz*

Biotechnology, EUA, número catálogo: sc-47778) por uma hora ou *overnight*, e posteriormente as lavagens da membrana em TBS-T (3 lavagens x 10'). 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).

4.3. Caracterização das linhagens transduzidas

Para caracterizar se houve diferença no crescimento celular após o silenciamento, foram realizados ensaios que avaliaram o tempo de duplicação da população celular, a proliferação celular e também a formação de colônias das duas linhagens transduzidas, todos os ensaios utilizaram como controle a linhagem transduzida pelo vetor pLKO puro.

a) Determinação do tempo de duplicação (“*doubling time*”) celular: Para determinar o tempo de duplicação da população celular de cada uma das linhagens, 2×10^3 células foram semeadas em triplicata em placas de 24 poços e contadas a cada 24h durante 5 dias. Durante as contagens foi utilizado o corante azul de trypan para a avaliação da viabilidade celular. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

b) 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 quadruplicata em placas de 96 poços. As células foram incubadas por 24, 48, 72 e 96 horas. A cada intervalo, foi adicionada uma solução de Resazurina na placa (5% do volume inicial no poço). A placa foi incubada por 6h nas condições de cultura padrão. O reagente azul não fluorescente foi 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. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

c) Teste de sobrevivência clonogênica: Após o silenciamento, as células foram tripsinizadas, sendo semeadas 300 células em placas de cultura em triplicata. As culturas foram incubadas em estufa a 37°C por 7-15 dias, até que as colônias fossem visíveis, mas não confluentes. Para a visualização das colônias o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol, e coradas com Giemsa. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

4.4. Avaliação da sensibilização à droga TMZ após o silenciamento

Após o silenciamento, as linhagens celulares foram tratadas com a droga TMZ para determinar a sensibilidade das células e analisar o seu efeito na proliferação, na apoptose e na capacidade clonogênica. A TMZ foi adquirida da Sigma-Aldrich do Brasil. A solução estoque da TMZ foi preparada em DMSO filtrada em filtro millipore (0,5 µm), e estocada a -20°C. Para o tratamento controle foi utilizado DMSO na porcentagem corresponde a maior dose, e todas as outras doses foram normalizadas com a mesma quantidade de DMSO.

a) 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 quadruplicata em placas de 96 poços. As células foram tratadas com a TMZ nas concentrações de 250, 500, 1000 e 1500 µM e incubadas por 24, 48, 72 e 96 horas. A cada intervalo, foi adicionada uma solução de Resazurina na placa (5% do volume inicial no poço). A placa foi incubada por 6h nas condições de cultura padrão. A solução de Resazurina é um reagente azul não fluorescente que, ao estar em contato com células metabolicamente ativas, sofre redução através de enzimas desidrogenases, formando outro reagente, denominado resorufina. A resorufina é altamente fluorescente com pico de absorbância de 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. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

- **IC50:** Para o cálculo do IC50 (concentração inibitória para 50% das células) da droga TMZ foi utilizado o *software* CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, U.K.). Para cada experimento foram utilizados os dados obtidos na proliferação celular, através da análise da fração celular afetada após o tratamento com pelas quatro doses da droga. Foram realizados três experimentos independentes e a média dos valores de IC50 obtidos foram utilizados para o cálculo da significância estatística.

b) 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) (BD Biosciences Pharmigen, USA) e células necróticas com iodeto de propídio. Anexina V é uma molécula que apresenta alta afinidade pela fosfatidilserina, se ligando a esta especificamente. A fosfatidilserina é um 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 positiva com iodeto de propídio indica que as células perderam a integridade da membrana.

Como os valores do IC50 de cada linhagem foram diferentes, utilizou-se os valores intermediários de 250 e 500 μM de TMZ para a realização do ensaio de apoptose. Após 48 horas de tratamento, 5×10^4 células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 min a 4°C, lavadas com PBS gelado e depois ressuspensas em 300 μL de tampão de ligação 1X (BD Biosciences Pharmigen, USA). As células foram então marcadas com 5 μL de anexina e 50 μL de uma solução de iodeto de propídio (PI) e incubadas, protegidas da luz, em temperatura ambiente. As células foram analisadas com um citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

c) Teste de sobrevivência clonogênica: Após o silenciamento, as células foram tripsinizadas, sendo semeadas 300 células em placas de cultura. Com base no estudo de Borges e colaboradores (2012), o tratamento foi realizado com doses menores do que as utilizadas no ensaio de proliferação celular. Após o plaqueamento, as células foram tratadas por 72h com doses que variaram de 5 até 160 μM de TMZ, dependendo da resistência da linhagem. As culturas foram incubadas em estufa a 37°C por 7-15 dias, até que as colônias fossem visíveis, mas

não confluentes. Para a visualização das colônias o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol, e coradas com Giemsa. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

4.5. Avaliação da sensibilização à Radioterapia após o silenciamento

Para avaliação da sensibilidade à radiação, as células foram irradiadas e foi realizado o teste de capacidade clonogênica, assim sendo possível avaliar a relação do silenciamento do gene alvo com a radioterapia nas duas linhagens de GBM pediátrico e adulto.

a) Teste de sobrevivência clonogênica: Antes da irradiação, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas para plaqueamento de 300 células em placas de cultivo, foi realizado 2 experimentos independentes em triplicata. As linhagens foram irradiadas nas doses de 0, 2, 4 e 6 Gy no Setor de Radioterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Harley Francisco de Oliveira. O tempo de emissão foi calculado de acordo com a dose a ser utilizada, sendo sempre considerado o decaimento do radioisótopo. As culturas foram incubadas em estufa a 37°C por 7-15 dias, até que as colônias fossem visíveis, mas não confluentes. Para a visualização das colônias o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol, e coradas com Giemsa. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

4.6. Análises Estatísticas

A análise estatística dos dados foi realizada com auxílio do programa SPSS 20.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) considerando os resultados significativos valores de $p < 0.05$. Para os ensaios funcionais de proliferação celular, ensaio clonogênico e apoptose, foram utilizados os testes *t-student*, Anova One Way e pós-teste de Bonferroni.

5. Resultados

5.1. Avaliação da expressão gênica do *GDF15* nas linhagens de GBM

Primeiramente foi avaliado o nível de expressão gênica do alvo *GDF15* em linhagens celulares de GBM com o intuito de selecionar as linhagens que mais expressavam o alvo a ser silenciado. A análise de expressão foi realizada nas seguintes linhagens: U343, T98G, U251, MO59K, U138, LN319, U87, SF188 e KNS42. Dentre elas, as linhagens KNS42, U343, T98G e SF188, apresentaram os maiores níveis de expressão do gene *GDF15*. Apenas a linhagem celular MO59K apresentou uma expressão igual a substância branca. As outras linhagens apresentaram no mínimo uma expressão 5 vezes maior do *GDF15* comparado ao controle (Figura 5).

Para a realização dos experimentos foram selecionadas as linhagens KNS42 e U343, por apresentarem alto nível de expressão gênica do alvo, a qual foi 194 e 22 vezes maior em comparação com a substância branca, respectivamente. E essas linhagens representam tanto GBM pediátrico, KNS42, como GBM de adulto, U343, e possuem características moleculares distintas (Tabela 3).

Figura 5. Nível de expressão gênica do *GDF15* nas linhagens celulares de GBM (SB=substância branca não neoplásica).

Tabela 3. Caracterização das linhagens celulares de GBM, U343 e KNS42.

	Idade	Gênero	TP53	MGMT	PTEN
U343	54 a	Masculino	Selvagem	Metilado	Selvagem
KNS42	16 a	Masculino	Mutado	Metilado	Selvagem

5.2. Silenciamento gênico – RNA de interferência (shRNA)

a) Ensaio de titulação da puromicina

Anteriormente ao início dos ensaios de transdução para o silenciamento do alvo a ser estudado, foi realizado o ensaio de titulação da puromicina nas linhagens U343 e KNS42, para se determinar a concentração letal de puromicina. As linhagens foram cultivadas em meio contendo puromicina em concentrações que variaram de 0 a 10µg/mL.

A concentração ótima de puromicina que foi utilizada para a seleção das linhagens pós-transdução foi determinada utilizando-se como critério a menor dose de puromicina capaz de matar 100% das células no período máximo de 6 dias. Dessa forma, a concentração de puromicina determinada para ser utilizada nos ensaios subsequentes foi de 2,5µg/mL para as 2 linhagens.

b) Transdução das linhagens celulares KNS42 e U343

- Ensaio de viabilidade celular pós-transdução

Para a transdução da linhagem KNS42 foram testados 2 clones de lentivírus, A e B, e cada clone foi utilizado em 3 unidades de multiplicidade viral (MOI), 0,5; 1,0 e 1,5. Após o ensaio de titulação viral todas as concentrações do clone A apresentaram sucesso na transdução, e o clone B, somente o MOI de 0,5 obteve sucesso. Para a transdução da linhagem U343 foram testados 2 clones de lentivírus, A e C, e cada clone foi utilizado também 3 unidades de MOIs diferentes. Após o ensaio de titulação viral todas as concentrações do clone C apresentaram sucesso na transdução, e o clone A, somente o MOI de 1,0 obteve sucesso. As linhagens transduzidas, observadas pela seleção com o meio com o antibiótico puromicina apresentaram viabilidade superior a 90% ao longo de todo o período de seleção que durou por volta de 4 semanas. Após o período de seleção as linhagens transduzida, pelos diferentes clones e MOIs, foram submetidas à confirmação do silenciamento gênico, conforme descrito no tópico subsequente.

Uma vez confirmado o silenciamento dos alvos, seguiu-se o processo de isolamento das células transduzidas para o estabelecimento das linhagens transformadas como descrito a seguir. As células transduzidas foram então cultivadas em meio contendo puromicina para a seleção de células resistentes para

a expansão da cultura celular. Após 6 semanas foi estabelecida as linhagens transformadas: KNS42_GDF15- e U343_GDF15-, além dessas foram geradas as linhagens controle: KNS42_controle e U343_controle, contendo apenas o vetor puro denominado pLKO.

- **Avaliação da eficiência do silenciamento gênico**

Para a confirmação do silenciamento gênico do alvo *GDF15*, as linhagens transformadas foram submetidas à análise de expressão gênica por meio da técnica de RT-PCR quantitativa.

As células KNS42 transduzidas pelo clone A apresentaram uma redução média da expressão de *GDF15* de 95,4%, e pelo clone B houve uma redução de 97,87% em relação ao controle contendo o vetor pLKO puro. Os dados de expressão relativa da linhagem transduzida pelos diferentes clones e concentrações estão representados na figura 6. E na tabela 4 está descrita a eficiência do silenciamento dos clones A e B, em seus diferentes MOIs, e os respectivos intervalos de confiança.

Figura 6. Análise da expressão gênica da linhagem KNS42 após o silenciamento do gene *GDF15* em relação à linhagem controle.

Tabela 4. Eficiência do silenciamento do *GDF15* dos clones A e B, nos diferentes MOIs e seus respectivos intervalos de confiança, para a linhagem KNS42.

	Porcentagem de <i>Knock Down</i>	Intervalo de Confiança 95%	
KNS42_GDF15- (clone A_moi 0,5)	96,61	96,13	97,03
KNS42_GDF15- (clone A_moi 1,0)	94,36	94,11	94,60
KNS42_GDF15- (clone A_moi 1,5)	95,24	95,03	95,44
KNS42_GDF15- (clone B_moi 0,5)	97,87	97,79	97,95

Apesar do sucesso no processo de transdução da U343 pelo clone C com o moi de 1,5, não houve detecção pela técnica de qRT-PCR do silenciamento gênico. Já as outras duas concentrações lentivirais do clone C apresentaram uma redução média da expressão de *GDF15* de 70,25%, e pelo clone A houve uma redução de 60,43% em relação ao controle. Os dados de expressão relativa da linhagem transduzida pelos diferentes clones e concentrações estão representados na figura 7. E na tabela 5 está descrita a eficiência do silenciamento dos clones C e A em seus diferentes MOIs, e os respectivos intervalos de confiança.

Figura 7. Análise da expressão gênica da linhagem U343 após o silenciamento do gene *GDF15* em relação à linhagem controle.

Tabela 5. Eficiência do silenciamento do *GDF15* dos clones A e C, nos diferentes MOIs e seus respectivos intervalos de confiança, para a linhagem U343.

	Porcentagem de <i>Knock Down</i>	Intervalo de Confiança 95%	
U343_ <i>GDF15</i> - (clone C_moi 0,5)	73,67	69,15	77,54
U343_ <i>GDF15</i> - (clone C_moi 1,0)	66,84	65,36	68,27
U343_ <i>GDF15</i> - (clone A_moi 1,5)	60,43	58,28	62,47

• Avaliação da eficiência do silenciamento proteico

Após a confirmação do silenciamento gênico nas linhagens, foi feita a análise da expressão proteica. Tanto a linhagem KNS42, como a linhagem U343, apresentaram redução nos níveis da expressão proteica do *GDF15* avaliada por *Western blotting* (Figura 8 e 9).

Ao quantificar essa redução, foi observado que a menor taxa de expressão do *GDF15*, na KNS42, ocorreu na transdução com clone B_moi 0,5, que levou a redução de 70% da expressão proteica (Figura 10). Na U343, o menor nível de expressão ocorreu na transdução com clone C_moi 1,0, com redução de 72% da expressão proteica do *GDF15* (Figura 11).

Figura 8. Análise da expressão da proteína *GDF15* na linhagem KNS42 após o silenciamento do gene *GDF15* em relação à linhagem controle, que foi transduzida apenas com o vetor pLKO puro.

Figura 9. Análise da expressão da proteína GDF15 na linhagem U343 após o silenciamento do gene *GDF15* em relação à linhagem controle, que foi transduzida apenas com o vetor pLKO puro.

Figura 10. Quantificação da inibição da expressão da proteína GDF15 na linhagem KNS42 após o silenciamento do gene *GDF15* em relação à linhagem controle, que foi transduzida apenas com o vetor pLKO puro.

Figura 11. Quantificação da inibição da expressão da proteína GDF15 na linhagem U343 após o silenciamento do gene *GDF15* em relação à linhagem controle, que foi transduzida apenas com o vetor pLKO puro.

5.3. Caracterização das Linhagens Transduzidas

Após a confirmação do silenciamento gênico e proteico foi escolhida, para continuar os ensaios funcionais, a linhagem transformada que obteve a menor expressão do GDF15. Para KNS42, foi escolhida a linhagem que foi transduzida pelo clone lentiviral B com o MOI de 0,5 e para U343 foi escolhida a linhagem que foi transduzida pelo clone lentiviral C com o MOI de 1,0.

a) Determinação do tempo de duplicação (“*doubling time*”) celular: Após o estabelecimento das linhagens transformadas foi realizada um ensaio para determinação do *doubling time* celular para avaliar se o silenciamento do gene *GDF15* modificou a taxa de duplicação da população celular. Após um ensaio de 120 horas determinamos o tempo de duplicação das linhagens KNS42 e U343 que foi de 20,28 e 27,08 horas respectivamente. As linhagens silenciadas para o gene *GDF15* apresentaram um leve aumento nesse tempo em relação às linhagens não transduzidas e as taxas observadas foram de 22,37 e 30,47 horas para as linhagens KNS42_GDF15- e U343_GDF15- respectivamente, porém esta diferença não foi

estatisticamente significativa. As Figuras 12 e 13 mostram os resultados dos experimentos de *doubling time* nas linhagens KNS42 e U343 respectivamente.

Figura 12. *Doubling time* da linhagem KNS42. A viabilidade celular foi analisada a cada 24 horas por um período de 96 horas. O experimento foi realizado em duplicata e o gráfico representa a média dos experimentos.

Figura 13. *Doubling time* da linhagem U343. A viabilidade celular foi analisada a cada 24 horas por um período de 96 horas. O experimento foi realizado em duplicata e o gráfico representa a média dos experimentos.

b) Ensaio de Proliferação Celular: Além dos dados de duplicação da população celular, foram obtidos os dados da proliferação celular. Esses dados são similares aos observados no ensaio de *doubling time*, o qual também não revelou diferença na taxa da proliferação celular entre as linhagens celulares silenciadas e seus respectivos controles (Figura 14 e 15).

Figura 14. Taxa da proliferação celular para a linhagem KNS42. A proliferação celular foi analisada a cada 24 horas por um período de 96 horas. O experimento foi realizado em triplicata e o gráfico representa a média dos experimentos.

Figura 15. Taxa da proliferação celular para a linhagem U343. A proliferação celular foi analisada a cada 24 horas por um período de 96 horas. O experimento foi realizado em triplicata e o gráfico representa a média dos experimentos.

c) Teste de sobrevivência clonogênica: Outro parâmetro utilizado para verificar a diferença entre a linhagem transduzida e o controle foi a capacidade de formação de colônias. Na KNS42 houve uma diferença significativa entre a linhagem silenciada e a linhagem controle. Na figura 16 podemos observar uma redução do número de colônias formadas na linhagem KNS42_GDF15-. Já a U343, o silenciamento do *GDF15* não alterou sua capacidade de formação de colônias (Figura 17).

Figura 16. Número de colônias formadas da linhagem KNS42 silenciada e a linhagem controle, após 7 dias em cultura sem tratamento (* $p < 0,05$).

Figura 17. Número de colônias formadas da linhagem U343 silenciada e da linhagem controle, após 10 dias em cultura sem tratamento.

5.4. Avaliação da sensibilização à droga TMZ após o silenciamento

a) Ensaios de Proliferação Celular: Para analisar a sensibilidade ao quimioterápico TMZ nas linhagens KNS42 e U343 foram realizados 3 ensaios independentes de proliferação celular após o tratamento com quatro doses e em quatro tempos de incubação. Para a linhagem KNS42, em nenhum dos tempos houve diferença na taxa de proliferação celular se for comparado a linhagem transduzida, KNS42_GDF15-, com a linhagem transduzida somente com vetor puro, KNS42_controle (Figura 18). Com os dados da proliferação calculamos o IC50 da TMZ para todos os tempos, esses valores não foram diferentes para KNS42_GDF15- e KNS42_controle (Figura 19).

Figura 18. Curvas de proliferação celular para a linhagem KNS42, silenciada e controle, após o tratamento com TMZ nos quatro tempos. Foram realizados três experimentos independentes e o gráfico representa a média dos experimentos relativa a média do tratamento com DMSO.

Figura 19. Valores do IC50 da TMZ para a linhagem KNS42 a cada 24 horas de tratamento. Representativo de 3 experimentos independentes em triplicata. [TMZ] = Concentração de TMZ.

Para a linhagem U343, observamos uma tendência de maior taxa de proliferação celular na linhagem silenciada (U343_GDF15-) quando comparada a linhagem controle (U343_controle), porém ela se mostrou estatisticamente

significativa apenas no tempo de 72 horas (Figura 20). Apesar dessa diferença da proliferação após 72 horas de tratamento, não foi observada diferença significativa no IC₅₀ da TMZ entre a linhagem transduzida e controle (Figura 21).

Figura 20. Curvas de proliferação celular da linhagem U343, silenciada e controle, após o tratamento com TMZ nos quatro tempos. Foram realizados três experimentos independentes e o gráfico representa a média dos experimentos relativa a média do tratamento com DMSO. (* $p < 0,05$).

Figura 21. Valores do IC₅₀ da TMZ para a linhagem U343 a cada 24 horas de tratamento. Representativo de 3 experimentos independentes em triplicata. [TMZ] = Concentração de TMZ.

b) Ensaio de Apoptose: Para avaliar se o silenciamento do gene proposto neste estudo estava associado à regulação do processo de indução de apoptose frente ao efeito da TMZ, as linhagens KNS42 e U343 silenciadas e seus respectivos controles foram submetidas ao tratamento com a TMZ em duas doses por 48 horas. A porcentagem de células apoptóticas foi contabilizada após a marcação positiva com anexina-V e PI. Não houve diferença na taxa de apoptose para as duas linhagens silenciadas quando comparadas com os respectivos controles. A linhagem U343 mostra-se mais sensível ao tratamento com TMZ em relação a linhagem KNS42 (Figura 22 e 23).

Figura 22. Número de células Anexina V/PI positivas após 48 horas de tratamento com a TMZ. Análise da linhagem KSN42 transformada (*GDF15*-) em relação ao controle (vetor pLKO puro).

Figura 23. Número de células Anexina V/PI positivas após 48 horas de tratamento com a TMZ. Análise da linhagem U343 transformada (*GDF15*-) em relação ao controle (vetor pLKO puro).

c) Teste de Capacidade Clonogênica: Outro parâmetro utilizado para avaliar o efeito da TMZ sobre as linhagens silenciadas foi a capacidade de formação de colônias após o tratamento. Foram feitos 2 ensaios independentes em triplicata, nos quais as células foram tratadas por 72 horas em 4 doses diferentes. A linhagem KNS42_GDF15- teve uma maior formação de colônias se comparado com a linhagem KNS42_controle, mas quando tratadas com TMZ, não foi observado essa diferença (Figura 24).

Figura 24. Ensaio clonogênico das linhagens KNS42, GDF15- e controle, tratadas com TMZ (0 a 160 µM). Representativo de 2 experimentos.

Quando comparada a linhagem U343_GDF15- e a U343_controle não houve diferença na formação de colônias, tanto nos dados onde não houve tratamento quanto após o tratamento com TMZ (Figuras 17 e 25). Como foi visto também na proliferação e na apoptose, a linhagem U343 é mais sensível ao tratamento com TMZ do que a linhagem KNS42, qual a formação de colônias após o tratamento com uma dose baixa foi praticamente extinta.

Figura 25. Ensaio clonogênico das linhagens U343, GDF15- e controle, tratadas com TMZ (0 a 40 µM). Representativo de 2 experimentos.

5.5. Avaliação da sensibilização à Radioterapia após o silenciamento

Após as células serem irradiadas foi realizado o teste de capacidade clonogênica. O ensaio realizado com a KNS42 demonstrou que a radiação foi efetiva para diminuir a formação de colônias quando comparado com o controle não irradiado, mas não houve diferença quando comparada a linhagem silenciada e a linhagem controle (Figura 26). A U343 foi mais radorresistente que a KNS42, e quando teve *GDF15* silenciado, apresentou uma menor fração sobrevivente, com o dado significativo na dose de 4Gy (Figura 27).

Figura 26. Ensaio clonogênico das linhagens KNS42, GDF15- e controle, após a irradiação (0, 2, 4 e 6 Gy). Representativo de 2 experimentos.

Figura 27. Ensaio clonogênico das linhagens KNS42, GDF15- e controle, após a irradiação (0, 2, 4 e 6 Gy). Representativo de 2 experimentos.

6. Discussão

O gene *GDF15* codifica uma citocina que possui múltiplas funções em diversas patologias, incluindo a inflamação, doenças cardiovasculares, obesidade e câncer (Unsicker, Spittau & Krieglstein, 2013).

Fatores de crescimento secretados, como citocinas e hormônios são frequentemente encontrados com expressão elevada em células tumorais. O aumento dos níveis de circulação destas proteínas não só pode ser explorado para o diagnóstico e prognóstico do câncer, como a própria proteína, expressa pelas células tumorais, pode também servir como um alvo para intervenção terapêutica.

O *GDF15* encontra-se entre os genes que possuem elevados níveis de expressão associado ao tumor (Welsh *et al.*, 2003). Os primeiros estudos de pesquisa com *GDF15* relataram que sua expressão estava significativamente elevada no soro de pacientes com câncer de próstata metastático, câncer de mama e carcinoma colorretal. Além disso, uma forte associação entre níveis séricos, grau histopatológico maligno, proliferação celular *in vitro* e progressão metastática tem sido frequentemente documentado (Bauskin *et al.*, 2006).

Em um estudo do nosso grupo de pesquisa foi observado uma expressão elevada do *GDF15* em amostras de tumores primários de GBM, este estava 476 vezes mais expresso em comparação à substância branca não neoplásica (Scrideli *et al.*, 2008). Além dessa expressão alterada nas amostras de tumores, nesse atual estudo foi observado também uma alta expressão nas linhagens celulares de GBM, as quais apenas uma linhagem apresentou a mesma expressão que o tecido não neoplásico, e as outras linhagens possuem pelo menos 5 vezes mais a expressão desse gene. De forma semelhante ao observado neste estudo, Strelau e outros (2008) relataram que a expressão de *GDF15* está alterada em GBM, com hiperexpressão do *GDF15* em 10 linhagens celulares.

Para o melhor entendimento do papel do *GDF15* na biologia do GBM, foi realizado nesse estudo o seu silenciamento, em duas linhagens que apresentaram sua maior expressão, a linhagem KNS42 (GBM pediátrico) e a linhagem U343 (GBM adulto), que expressaram 194 e 22 vezes mais o *GDF15* em comparação ao tecido não neoplásico, respectivamente.

Após o silenciamento, foi observada na KNS42 uma menor capacidade de formação de colônias, mas não houve alteração na taxa de proliferação celular. Já o silenciamento na U343 não alterou a capacidade de formação de colônias e também não alterou a taxa de proliferação celular. Roth e colaboradores (2010)

demonstraram que a inibição do *GDF15* na linhagem de glioma de camundongo promoveu uma diminuição da proliferação celular e um aumento da resposta imune. Entretanto, em outro estudo não foram todas as linhagens de GBM apresentaram a diminuição na taxa de proliferação celular após o silenciamento do *GDF15* (Strelau *et al.*, 2008).

A alteração na proliferação celular pode ser relacionada pelo envolvimento do *GDF15* em diversas vias, como SP1, p53, EGR1, PKC, PKA, MEK, MAPK e PI3K/AKT, as quais já foram descritas no processo da carcinogênese (Shimizu *et al.*, 2013). Uma das principais vias que está bem descrita na literatura, que regula a expressão do *GDF15*, é a via do p53, mas no caso da linhagem em estudo, a KNS42, este gene está mutado. Em alguns tumores já foi relatado ativação do *GDF15* independente dessa via, incluindo GBM (Strelau *et al.*, 2008).

Outra possível via que foi vista ativada na linhagem KNS42, é a via de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/AKT envolvida na transdução do sinal por meio de receptores da tirosina-quinase (Bax *et al.*, 2009). A ativação da via PI3K/AKT desencadeia uma cascata de respostas envolvidas na sobrevivência, na proliferação e no crescimento celular. A PI3K catalisa a geração de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato, que constitui um segundo mensageiro para ativar outros componentes, tais como a AKT. Subsequentemente, o AKT ativado provoca a fosforilação de numerosos alvos, entre eles o GSK que comprovadamente regula a expressão do *GDF15* (Yamaguchi *et al.*, 2004).

Essa via, PI3K/AKT, pode ter sido alterada após o silenciamento do *GDF15*, levando a uma inibição do crescimento celular, e uma consequente diminuição no número de colônias formadas pela linhagem KNS42. Uma justificativa para não ter ocorrido alteração na taxa de proliferação celular, é o *GDF15* ser um alvo terminal dessa via, acarretando uma resposta mais demorada ao silenciamento. Com essa resposta mais tardia o efeito mais proeminente do silenciamento ocorre em experimentos que possuem uma maior duração, como no caso do teste da capacidade clonogênica.

Além do envolvimento do *GDF15* na proliferação celular tumoral, há estudos que demonstram sua relação com a resistência ao tratamento quimioterápico. Linhagens celulares de câncer da próstata, como a DU-145 ou PC3, com superexpressão de *GDF15*, apresentaram resistência às drogas, Docetaxel e Mitoxantrona (Huang *et al.*, 2007). O *GDF15* também conferiu resistência aos

quimioterápicos Melfalano, Bortezomib e Lenalidomida nas linhagens celulares de mieloma, MM1.S e MOLP-6 (Corre *et al.*, 2012).

No caso do GBM, o tratamento quimioterápico tradicional é a droga TMZ. A TMZ é um agente alquilante que adiciona um grupamento metil nas bases púricas do DNA. O tratamento com TMZ leva a morte celular primariamente pela metilação do O6-Guanina. Esta modificação conduz ao pareamento da guanina com a timina durante a replicação do DNA e promove lesões na fita dupla que são difíceis de reparar contribuindo para a morte celular (St-Coeur *et al.*, 2013). Infelizmente, resistência inerente e adquirida a TMZ é uma ocorrência comum em pacientes com GBM.

Para diminuir a resistência ao tratamento com TMZ alguns trabalhos associaram com a inibição de um alvo, como no estudo de Borges e colaboradores (2012), que ao inibir a Aurora quinase A e B sensibilizou ao tratamento com TMZ, diminuindo a proliferação celular em linhagens celulares de GBM. No caso do *GDF15*, não há dados na literatura da sua associação ao tratamento com TMZ ou com outras drogas alquilantes, por isso, propusemos investigar esta relação.

Após o tratamento com a TMZ não houve diferença na taxa de proliferação celular, apoptose e capacidade clonogênica na linhagem KNS42 quando comparada a linhagem controle. Para a linhagem U343, o silenciamento do gene *GDF15* ocasionou uma maior taxa de proliferação celular após 72 horas de tratamento nas doses de 250, 500 e 1000µM de TMZ, quando compara a linhagem controle, entretanto não foram observadas alterações na taxa de apoptose e na capacidade clonogênica. Como os outros membros da superfamília TGF-β, o *GDF15* pode ter efeitos opostos dependendo do contexto celular, estágio da doença, ou microambiente.

Alguns estudos têm documentado a sua atividade antitumorigênica, e outros mostraram um papel pro-tumorigênica (Eling *et al.*, 2006). Estes efeitos contraditórios do *GDF15* já foram observados em diversos tipos de tumores. Um dos primeiros estudos que relata o *GDF15* com ação antitumorigênica é o trabalho de Baek e colaboradores, que identifica a ativação do *GDF15* dependente do supressor tumoral *EGR1* em linhagens celulares de carcinoma colorretal,

Na próstata, o *GDF15* é induzido por estresse celular, por exemplo, dano tecidual ou inflamação, e fisiologicamente protege o local da lesão de uma reação inadequada do sistema imune. Porém, em condições patológicas, como o

desenvolvimento do câncer de próstata, o GDF15 é induzido como resultado de estresse celular, como alterações e/ou destruição da arquitetura do tecido da próstata, induzindo um status de imunoproteção do sítio tumoral (Vaňhara *et al.*, 2012).

No caso do GBM, essa contradição também ocorre, por exemplo, nos estudos de Strelau (2008) e Roth (2010), mostram elevada expressão do *GDF15* nas linhagens de GBM e sua inibição leva a diminuição da proliferação celular, já no estudo de Kadowaki e colaboradores (2012) revela baixa expressão do *GDF15* nas linhagens de GBM, e ao hiperexpressá-lo acarreta a um aumento da taxa de apoptose e uma menor formação de colônias. Neste estudo, ele observou que a região promotora do *GDF15* possui sítios que são ativados pelas vias supressoras tumorais, como p53, EGR1 e AKT/GSK-3 β . Esses sítios estão hipermetilados em GBM, ocasionando a diminuição da expressão do *GDF15*, que leva a um aumento da proliferação celular.

Além desses dados, ao comparar as duas linhagens, foi possível observar que a resposta ao tratamento com TMZ foi diferente, a linhagem U343 mostrou-se mais sensível ao tratamento do que a linhagem KNS42. Essa diferença pode estar relacionada com a expressão do *TP53*, pois a KNS42 possui o gene mutado e a U343 possui o gene selvagem. Foi relatado no trabalho de Roos e colaboradores (2007) que linhagens celulares de glioma que possuem o *TP53* mutado são mais resistentes ao tratamento com TMZ, o estudo foi embasado na taxa de apoptose, a qual teve um maior valor quando a linhagem possuía a mutação no *TP53*.

Outra explicação para a resistência da KNS42 seria a presença da proteína reparadora MGMT, mas no estudo de Gaspar e colaboradores (2010) mostrou que o promotor do *MGMT* está metilado, e não há a expressão da proteína na linhagem KNS42, ele sugere que a resistência deva ocorrer pela expressão alterada dos genes *HOXA9/HOXA10*. As HOX são essenciais durante o desenvolvimento embrionário e são conhecidas por estarem envolvidas em diversos tumores, incluindo GBM (Abdel-Fattah e al., 2006). Costa e colaboradores (2010) propõem que HOXA9 exerce efeitos anti-apoptóticos e pro-proliferativos após a sua ativação através de um mecanismo epigenético controlado por PI3K e independente de mTOR, O que demonstra um papel importante da família HOX na biologia tumoral e na resistência a drogas alquilantes na linhagem KNS42.

A diferença na resposta ao tratamento com TMZ, nas duas linhagens, pode ser explicado pelo fato da expressão de diversos genes no GBM pediátrico ser diferente da expressão no GBM adulto, como por exemplo, a alteração do *PTEN* e amplificação *EGFR* raramente acontece em casos de GBM pediátrico, já nos casos de GBM adulto é mais frequente, o que demonstra uma causa molecular distinta na formação do tumor conforme a idade (Pollack *et al.*, 2006).

Além da utilização da TMZ, é realizada a radioterapia para o tratamento do GBM. O padrão atual de radioterapia para pacientes com GBM é focal, com a terapia fracionada na cavidade que teve ressecção da massa tumoral e uma margem de 2 cm de tecido cerebral circundante. A radiação ionizante induz quebras de fita simples e dupla no DNA de células em proliferação (Wilson, Karajannis & Harte, 2014). Alguns estudos tem associado a inibição de um alvo específico e um aumento na efetividade da radioterapia. Por exemplo, o trabalho de Castro-Gamero e colaboradores (2013) mostrou a relação entre a inibição de genes que são dependentes do fator de transcrição SP1, como *Survivina* e *CDK1*, e a sensibilização a radioterapia concomitante ao tratamento com TMZ em linhagens celulares de GBM.

Em nosso estudo, foi visto que o silenciamento do *GDF15* sensibilizou a linhagem adulta U343 na radiação ionizante na dose de 4Gy. A única associação entre *GDF15* e radioterapia é o estudo de Chang e outros (2007), estes relatam que linhagens celulares radorresistentes de tumor da nasofaringe apresentam uma hiperexpressão do *GDF15*, e ao ser silenciado, essas linhagens se mostraram menos resistentes à radioterapia. Em adição, é observado que o silenciamento promoveu o aumento de células na fase G2-M, o que pode explicar a sensibilização à radiação. A KSN42 foi mais sensível à radioterapia independente do *GDF15*, essa diferença pode ser atribuída pela diferença dos genes que estão ativados nas duas linhagens.

Com esses dados podemos observar que as respostas, da linhagem U343 e KNS42 ao silenciamento e também aos tratamentos, TMZ e radioterapia, foram distintas, o que pode ser explicado pela diferença das características moleculares, pois a U343 e a KNS42 possuem diferentes vias que estão ativadas, o que pode ocasionar efeitos celulares diversos.

7. Conclusões

- ✓ Das 9 linhagens de GBM analisadas, 8 apresentaram expressão elevada do *GDF15*, sugerindo uma maior expressão deste gene em GBM.
- ✓ Após o silenciamento, houve alteração na capacidade clonogênica da linhagem KNS42 se comparada com o controle, mas não houve alteração na taxa de proliferação celular. A U343 não sofreu efeito da inibição do *GDF15*, sugerindo comportamento diferente deste gene de acordo com perfil genético.
- ✓ O silenciamento associado com a TMZ teve efeito somente no aumento da proliferação celular da U343, com dados significantes após 72 horas de tratamento. A KNS42 não apresentou mudança na sensibilidade à TMZ após o silenciamento do *GDF15*, sugerindo comportamento diferente deste gene de acordo com perfil genético.
- ✓ O silenciamento associado com radioterapia teve efeito na linhagem U343, que apresentou uma menor fração sobrevivente de colônias na linhagem silenciada, na dose de 4Gy, em comparação com a linhagem controle. A KNS42 não apresentou correlação entre o silenciamento e a sensibilidade à radioterapia.
- ✓ Esses dados mostram que o silenciamento do *GDF15* promoveu respostas diferentes na linhagem U343 e na linhagem KNS42, que pode ser explicado pelas características moleculares distintas do GBM pediátrico e adulto.

8. Referências Bibliográficas

- Abdel-Fattah R, Xiao A, Bomgardner D, *et al.* Differential expression of HOX genes in neoplastic and non-neoplastic human astrocytes. *J Pathol.* 2006;209:15–24.
- Al-Saffar NM, Marshall LV, Jackson LE, *et al.* Lactate and choline metabolites detected in vitro by nuclear magnetic resonance spectroscopy are potential metabolic biomarkers for PI3K inhibition in pediatric glioblastoma. *PLoS One.* 2014;1;9(8):e103835.
- Baek SJ, Kim JS, Moore SM *et al.* Cyclooxygenase inhibitors induce the expression of the tumor suppressor gene EGR-1, which results in the up-regulation of NAG-1, an antitumorigenic protein. *Mol Pharmacol.* 2005;67(2):356–64.
- Bauskin A, Zhang H, Fairlie W, *et al.* The propeptide of macrophage inhibitory cytokine (MIC-1), a TGF- β superfamily member, acts as a quality control determinant for correctly folded MIC-1. *EMBO J.* 2000;19:2212–2220.
- Bauskin A, Brown D, Junankar S, *et al.* The propeptide mediates formation of stromal stores of PROMIC-1: Role in determining prostate cancer outcome. *Cancer Res* 2005;65:2330–2336.
- Bauskin A, Brown D, Kuffner T, *et al.* Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumorigenesis and diagnosis of cancer. *Cancer Res.* 2006;66: 4983–4986.
- Bauskin A, Jiang L, Luo X, *et al.* The TGF- β superfamily cytokine MIC-1/GDF15: Secretory mechanisms facilitate creation of latent stromal stores. *J Interferon Cytokine Res.* 2010;30:389–397.
- Bax DA, Little SE, Gaspar N, *et al.* Molecular and phenotypic characterisation of paediatric glioma cell lines as models for preclinical drug development. *PLoS One.* 2009;4(4):e5209.
- Bedogni B & Powell MB. Hypoxia, melanocytes and melanoma - survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22(2):166-74.
- Benouaich-Amiel A, Simon JM & Delattre JY. Concomitant radiotherapy with chemotherapy in patients with glioblastoma. *Bull Cancer.* 2005;1;92(12):1065-72.

- Borges KS, Castro-Gamero AM, Moreno DA, *et al.* Inhibition of Aurora kinases enhances chemosensitivity to temozolomide and causes radiosensitization in glioblastoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012;138(3), 405-14.
- Brat DJ, Ryken TC, Kalkanis SN, Olson JJ. The role of neuropathology in the management of progressive glioblastoma : a systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *J Neurooncol.* 2014;118(3):461-78.
- Boyle GM, Pedley J, Martyn AC, *et al.* Macrophage inhibitory cytokine-1 is overexpressed in malignant melanoma and is associated with tumorigenicity. *J Invest Dermatol* 2009;129:383–391.
- Brown DA, Moore J, Johnen H, *et al.* Serum macrophage inhibitory cytokine 1 in rheumatoid arthritis: A potential marker of erosive joint destruction. *Arthritis Rheum.* 2007;56:753–764.
- Brown D, Lindmark F, Stattin P, *et al.* Macrophage inhibitory cytokine 1: A new prognostic marker in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15:6658–6664.
- Brown D, Ward R, Buckhaults P, *et al.* MIC-1 serum level and genotype: Associations with progress and prognosis of colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2003;9:2642–2650.
- .Castro-Gamero AM, Borges KS, Moreno DA, *et al.* Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid, an inhibitor of Sp1-mediated survivin transcription, induces apoptosis and acts synergistically with chemo-radiotherapy in glioblastoma cells. *Invest New Drugs.* 2013;31(4):858-70.
- Cavaliere R, Wen PY & Schiff D. Novel therapies for malignant gliomas. *Neurol Clin.* 2007;25(4):1141-71.
- Chang JTC, Chan SH, Lin CY, *et al.* Differentially expressed genes in radioresistant nasopharyngeal cancer cells: gp96 and GDF15. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(8):2271-9.
- Cheng JC, Chang HM & Leung PCK. Wild-type p53 attenuates cancer cell motility by inducing growth differentiation factor-15 expression. *Endocrinology.* 2011;152(8), 2987-95.

- Chiche J, Brahimi-Horn MC & Pouyssegur J. Tumor hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J. Cell. Mo.* 2010;Med. 14: 4.
- Corre J, Labat E, Espagnol N *et al.* Bioactivity and prognostic significance of growth differentiation factor GDF15 secreted by bone marrow mesenchymal stem cells in multiple myeloma. *Cancer Res.* 2012;72:1395–1406.
- Costa BM, Smith JS, Chen Y, *et al.* Reversing HOXA9 oncogene activation by PI3K inhibition: epigenetic mechanism and prognostic significance in human glioblastoma. *Cancer Res.* 2010;70: 453–62.
- de Jager, SCA, Bermudez, B, Bot, I, *et al.* Growth differentiation factor 15 deficiency protects against atherosclerosis by attenuating CCR2-mediated macrophage chemotaxis. *J. Exp. Med.* 2011;208: 217-225.
- de la Rocha AM, Sampron N, Alonso MM, Matheu A. Role of SOX family of transcription factors in central nervous system tumors. *Am J Cancer Res.* 2014;16;4(4):312-24.
- Eling TE, Baek SJ, Shim M *et al.* NSAID activated gene (NAG-1), a modulator of tumorigenesis. *J Biochem Mol Biol.* 2006;39: 649 – 655.
- Fluge O, Bruland O, Akslen L, *et al.* Gene expression in poorly differentiated papillary thyroid carcinomas. *Thyroid.* 2006;16:161–175.
- Gaspar N, Marshall L, Perryman L, *et al.* MGMT-independent temozolomide resistance in pediatric glioblastoma cells associated with a PI3-kinase-mediated HOX/stem cell gene signature. *Cancer Res.* 2010;70(22):9243-52.
- Hegi ME, Liu L, Herman JG, *et al.* Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol.* 2008;26:4189–99.
- Hermisson M, Klumpp A, Wick W, *et al.* O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *J Neurochem.* 2006;96:766–76.

- Huang CY, Beer TM, Higano CS *et al.* Molecular alterations in prostate carcinomas that associate with in vivo exposure to chemotherapy: Identification of a cytoprotective mechanism involving growth differentiation factor 15. *Clin Cancer Res.* 2007;13:5825–5833.
- INCA, 2014. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.
- Johnen H, Lin S, Kuffner T, *et al.* Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF- β superfamily cytokine MIC-1. *Nat Med.* 2007;13:1333–1340.
- Kadowaki M, Yoshioka H, Kamitani H, *et al.* DNA methylation-mediated silencing of nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene (NAG-1/GDF15) in glioma cell lines. *Int J Cancer.* 2012;15;130(2):267-77.
- Khasraw M & Lassman AB. Advances in the treatment of malignant gliomas. *Curr Oncol Rep.* 2010;12:26–33.
- Lee DH, Yang Y, Lee SJ, *et al.* Macrophage inhibitory cytokine-1 induces the invasiveness of gastric cancer cells by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator system. *Cancer Research* 2003;63: 4648–55.
- Livak KJ & Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$. *Methods.* 2001;25(4):402–408.
- Louis DN, Ohgaki, H, Wiestler, OD, *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97-109.
- Lu C & Shervington A. Chemoresistance in gliomas. *Mol Cell Biochem.* 2008;312(1-2):71-80.
- Lukaszewicz-Zajac M, Mroczko B, Kornhuber J, Lewczuk P. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in the tumors of central nervous system (CNS). *J Neural Transm.* 2014;121(5):469-77.
- MacDonald TJ, Aguilera D & Kramm CM. Treatment of high-grade glioma in children and adolescents. *Neuro Oncol.* 2011;13(10):1049-58.

- Mimeault M, Batra SK. Divergent molecular mechanisms underlying the pleiotropic functions of macrophage inhibitory cytokine-1 in cancer. *J Cell Physiol*. 2010 Sep;224(3):626-35.
- Moore A, Brown D, Fairlie W, *et al*. The transforming growth factor- α superfamily cytokine macrophage inhibitory cytokine-1 is present in high concentrations in the serum of pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:4781–4788.
- Ohgaki H & Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19:764–72.
- Ohgaki H & Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*. 2007;170(5):1445-53.
- Olar A & Aldape KD. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J Pathol*. 2014;232(2):165-77.
- Park YJ, Lee H & Lee JH. Macrophage inhibitory cytokine-1 transactivates ErbB family receptors via the activation of Src in SK-BR-3 human breast cancer cells. *BMB Reports*. 2010;43:91–6.
- Park JY, Lee JE, Park JB, *et al*. Roles of Long Non-Coding RNAs on Tumorigenesis and Glioma Development. *Brain Tumor Res Treat*. 2014;2(1):1-6.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, *et al*. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321:1807–12.
- Perkins SM, Rubin JB, Leonard JR, *et al*. Glioblastoma in Children: A Single-Institution Experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011;80(4), 1117-1121.
- Pollack IF, Hamilton RL, James CD, *et al*. Rarity of PTEN deletions and EGFR amplification in malignant gliomas of childhood: results from the Children's Cancer Group 945 cohort. *J Neurosurg*. 2006;105:418–424.
- Roos WP, Batista LF, Naumann SC, *et al*. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide- induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene*. 2007;26:186-197.

- Roth P, Junker M, Tritschler I, *et al.* GDF15 contributes to proliferation and immune escape of malignant gliomas. *Clin Cancer Res.* 2010;16(15):3851-9.
- Schober A, Bottner M, Strelau J, *et al.* Expression of growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 (GDF15/MIC-1) in the perinatal, adult, and injured rat brain. *J Comp Neurol.* 2001;439:32–45.
- Scrideli CA, Carlotti CG, Okamoto OK, *et al.* Gene expression profile analysis of primary glioblastomas and non-neoplastic brain tissue: identification of potential target genes by oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. *J Neurooncol.* 2008;88(3):281-91.
- Shimizu S, Kadowaki M, Yoshioka H, *et al.* Proteasome inhibitor MG132 induces NAG-1/GDF15 expression through the p38 MAPK pathway in glioblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;25;430(4):1277-82.
- Shnaper S, Desbaillets I, Brown DA, *et al.* Elevated levels of MIC-1/GDF15 in the cerebrospinal fluid of patients are associated with glioblastoma and worse outcome. *Int J Cancer.* 2009;125:2624-2630.
- St-Coeur PD, Touaibia M, Cuperlovic-Culf M, Morin P Jr. Leveraging metabolomics to assess the next generation of temozolomide-based therapeutic approaches for glioblastomas. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2013;11(4):199-206.
- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature.* 2009;9;458(7239):719-24.
- Strelau J, Schmeer C, Peterziel H, *et al.* Expression and putative functions of GDF-15, a member of the TGF-beta superfamily, in human glioma and glioblastoma cell lines. *Cancer Lett.* 2008;18;270(1):30-9.
- Sturm D, Bender S, Jones DT, *et al.* Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(2):92-107.
- Suri V, Das P, Jain A, *et al.* Pediatric glioblastomas: a histopathological and molecular genetic study. *Neuro Oncol.* 2009;11: 274–280.
- Tong S, Marjono B, Brown D, *et al.*, 2004. Serum concentrations of macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC 1) as a predictor of miscarriage. *Lancet*; 363:129–130.

- Unsicker K, Spittau B & Krieglstein K. The multiple facets of the TGF- β family cytokine growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013;24(4):373-84.
- Vaňhara P, Hampl A, Kozubík A, Souček K. Growth/differentiation factor-15: prostate cancer suppressor or promoter? *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2012;15(4):320-8.
- Wang X, Baek SJ & Eling T. COX inhibitors directly alter gene expression: role in cancer prevention? *Cancer Metastasis Rev.* 2011;30(3-4):641-57.
- Weller M, van den Bent M, Hopkins K, *et al.* EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol.* 2014;15(9):e395-e403.
- Welsh JB, Sapinoso LM, Kern SG, *et al.* Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003;100:3410–3415.
- Wilson TA, Karajannis MA, & Harte DH. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg Neurol Int.* 2014;5:64
- Wippold FJ, Lammle M., Anatelli F, *et al.* Neuropathology for the neuroradiologist: palisades and pseudopalisades. *AJNR Am.J. Neuroradiol.* 2006;27:2037-41.
- Yamaguchi K, Lee SH, Eling TE, Baek SJ. Identification of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) as a novel downstream target of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3 β pathway. *J Biol Chem.* 2004;279(48):49617-23.
- Yan W, Zhang W & Jiang T. Oncogene addiction in gliomas: Implications for molecular target therapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30(58):1-5.