MARCEL BENADIBA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS
ENVOLVIDAS NO CONTROLE DO CICLO
CELULAR, APOPTOSE, ANGIOGÊNESE, INVASÃO
E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS C6 *IN VITRO* E *IN*
VIVO, APÓS O TRATAMENTO COM O ÁCIDO γ -
LINOLÊNICO (GLA) E COM UM NOVO
COMPLEXO DIRUTÊNICO CONTENDO
IBUPROFENO (Ru-Ibp)**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Biologia Celular e Tecidual).

São Paulo
2008

MARCEL BENADIBA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO
CONTROLE DO CICLO CELULAR, APOPTOSE,
ANGIOGÊNESE, INVASÃO E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS C6 *IN
VITRO* E *IN VIVO*, APÓS O TRATAMENTO COM O ÁCIDO γ -
LINOLÊNICO (GLA) E COM UM NOVO COMPLEXO
DIRUTÊNICO CONTENDO IBUPROFENO (Ru-Ibp)**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e
Tecidual

Orientador: Profa. Dra. Alison Colquhoun

São Paulo
2008

Aos **irmãos da mesinha de caridade** pelos
conselhos e direcionamentos espirituais.

Aos meus queridos pais **Moses e Rosa** pelo eterno
amor, carinho e incentivo que nunca me faltaram.

Aos meus queridos irmãos **Felix e Vidal** pelo
carinho, apoio e compreensão.

À minha querida esposa **Alisan** pela companhia,
respeito, paciência e sincero amor.

Aos meus **futuros filhos**.

AGRADECIMENTOS

À **Karina Lawrence Ramos** em especial os meus sinceros agradecimentos, pois sem ela eu não estaria aqui. Além do fato de me apresentar à Profa. Alison, sua paciência e atenção nos momentos mais difíceis do início das pesquisas ainda na iniciação científica foram cruciais para meu progresso no Doutorado.

À minha orientadora e segunda mãe **Alison Colquhoun**, que com sua humildade e paciência admiráveis me ensinou a ser o cientista apaixonado que hoje sou. Que apesar das dificuldades no mundo da pesquisa, não desanima nunca! Muito Obrigado Chefe!

Ao professor **Dr. Jarbas Arruda Bauer** pelo espaço em seu laboratório, respeito, risadas, conversas construtivas e pelas maravilhosas aulas que presenciei, das quais, com certeza, lembrarei sempre que estiver dando aula.

Às professoras **Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender** e **Dra. Marinilce Fagundes dos Santos** pelo importante acolhimento e agradabilíssima convivência.

À **Profa. Dra. Denise de Oliveira Silva** e à **Dra. Geise Ribeiro** do Instituto de Química da USP pela colaboração.

Ao **Prof. Dr. Rui Curi** e à **Dra. Thais Martins de Lima** do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP pela colaboração.

Aos meus colegas de laboratório: **Fábio Luiz Tavares** (que com muita paciência me ajudou nos meus primeiros PCRs), **Fio** (por todos os momentos que passamos no laboratório, incluindo nos finais de semana), **Juliano Andreoli Myialke** (pelos favores, paciência, palavras e pelas gargalhadas contagiantes e inconfundíveis), **Camila Sommerauer Franchim** (pelas incontáveis ajudas, gargalhadas, conversas e muito mais...), **Luiz Carnevali Junior** (pela amizade e companheirismo em diversos momentos), **Emília Ribeiro** (pela paciência e compreensão) e às recentes estagiárias **Débora** e **Renata**, que apesar do pouco tempo que estão no laboratório já considero grandes amigas.

À Celiana, Bete e Heloísa pelo indispensável apoio administrativo.

Ao pessoal da Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas pela atenção e exemplo profissional.

Ao pessoal do Xerox, pela eficiência, paciência e agradável convivência.

Aos demais professores e pós-graduandos e técnicos do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB-USP.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo suporte financeiro.

“Começemos desde já a entender essa grande verdade, de que está apenas em nós a cura de todos os males, destruindo a maior causa das doenças físicas e espirituais que atacam a humanidade: a falta de amor!”

Bezerra de Menezes

RESUMO

Benadiba M. Análise da expressão de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, apoptose, angiogênese, invasão e migração de células C6 de glioma de rato *in vitro* e *in vivo*, após o tratamento com o ácido γ -linolênico (GLA) e com um novo complexo dirutênico contendo Ibuprofeno (Ru-Ibp) [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Os gliomas são tumores cerebrais intracraniais caracterizados pelo seu rápido crescimento e pela sua resistência à quimioterapia e radioterapia atuais. Assim, a procura por novos agentes terapêuticos com múltiplos mecanismos de ação têm identificado o ácido gama-linolênico (GLA), antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) e compostos contendo Rutênio como possíveis candidatos. Dessa forma, a principal proposta deste projeto foi entender melhor o mecanismo de ação dessas drogas sobre as células C6 de glioma de rato. Foram analisadas proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, apoptose, angiogênese, invasão e migração através de RT-PCR e Western Blotting após tratamento *in vitro* e *in vivo*. Alterações da expressão de ciclina D1, E2F-1, pRb, p27, p21, p16, p65, c-myc, ERK1/2, nm23 α e β , MMP-2, Brevican GPI e Secretado, Tenascina-R, Tenascina-C, VEGF-A, Flt1, Flk1, Bax, PPAR γ , p53, COX-2, EP1, 2, 3 e 4, Ku70 e 80 foram encontradas. Em conclusão, o GLA e o complexo Rutênio-Ibuprofeno possuem múltiplos alvos que levam à inibição da proliferação celular.

Palavras-chave: C6. Glioma. Ácido γ -linolênico (GLA). Antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs). Rutênio. Expressão gênica. Expressão de proteínas.

ABSTRACT

Benadiba M. Analysis of the expression of proteins involved in cell cycle control, apoptosis, angiogenesis, migration and invasion of C6 rat glioma cells *in vitro* and *in vivo*, after treatment with γ -linolenic acid (GLA) and a novel ruthenium containing ibuprofen complex (Ru-Ibp) [Doctor Thesis]. São Paulo: Biomedical Sciences Institute of São Paulo University; 2008.

Gliomas are intracranial tumors of cerebral origin characterized for its rapid growth and resistance to both conventional chemotherapy and radiotherapy. The search for new therapeutics agents with multiple mechanisms of action has identified γ -linolenic acid (GLA), nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and Ruthenium containing compounds as possible candidates. The aim of this study was to better know the mechanism of action of these drugs on C6 rat glioma cells. Expression of proteins involved in control of the cell cycle, apoptosis, angiogenesis, invasion and migration was analyzed using RT-PCR and Western Blotting methods after treatment *in vitro* and *in vivo*. Alterations in cyclin D1, E2F-1, pRb, p27, p21, p16, p65, c-myc, ERK1/2, nm23 α e β , MMP-2, GPI and Secreted Brevican, Tenascin-R, Tenascin-C, VEGF-A, Flt1, Flk1, Bax, PPAR γ , p53, COX-2, EP1, 2, 3 and 4, Ku70 and 80 expression were observed. In conclusion, GLA and Ruthenium-Ibuprofen complex has multiple target wich translate into the inhibition of proliferation.

Key words: C6. Glioma. γ -linolenic acid (GLA). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Ruthenium. Gene expression. Protein expression.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: **Á**cido Araquidônico
AAS: **Á**cido acetilsalicílico ou Aspirina®
ADAMTS: Desintegrina-metaloproteases com um domínio idêntico à trombospondina
AINEs: **A**nti**i**nflamatórios **n**ão esteroidais
AKT ou PKB: Proteína cinase B
ALA: **Á**cido **α** -linolênico
AP-1: Proteína **a**tivadora-1
ARF: **R**egião **a**lternativa de **L**eitura do gene CDKN2A que codifica a proteína p14/p19
Bax: Antagonista do Bcl-2 (indutora de apoptose ou pro-apoptótica)
Bcl-2: célula **B** de **L**infoma-2 = proteína inibidora de apoptose (morte celular programada)
cAMP: **M**onofosfato de **a**denosina **c**íclico
CDK: **C**inase **d**ependente de **c**iclinas
CDKI: **I**nibidor de CDK
CDKN: Gene que codifica proteínas das famílias Ink e Cip/Kip: CDKN1A = p21; CDKN1B = p27; CDKN2A = p16; CDKN2B = p15
cDNA: **Á**cido **d**esoxirribonucleico **c**omplementar
c-Fos: Oncogene homólogo ao v-Fos (vírus de sarcoma **o**steogênico)
Cip/Kip: Família de **p**roteínas **c**inase **i**nibidoras de complexos Ciclina A/CDK1 ou 2, B/CDK1 ou E/CDK2
C-myc: Proteína similar ao oncogene viral de **M**ielocitomatose (V-myc) = Proto-oncogene que atua como fator de transcrição de outros genes.
COX-2: Ciclooxigenase-2
CRE: **E**lemento de **r**esposta ao **c**AMP
CREB: Proteína que liga o elemento que responde ao cAMP
DGLA: **Á**cido **d**ihomo- **γ** -linolênico
DHA: **Á**cido **d**ocosahexaenóico
DMSO: **D**imetil sulfóxido
DNA-PK: **P**roteína **c**inase dependente de DNA formada pelo complexo Ku70/80/DNA-PKcs
DNA-PKcs: Subunidade **c**atalítica da DNA-PK
E2F: **F**ator ativador da transcrição em eucariontes maiores 2
EFA: **Á**cidos **g**raxos **e**ssenciais, ou seja, que devem ser obtidos da dieta
EGF: **F**ator de crescimento **e**pidermal
EGFR: **R**eceptor do EGF
EP: Receptor de **p**rostaglandina **E**2 (EP1, 2, 3, 4)
EPA: **Á**cido eicosapentaenóico
ERK: **C**inase **r**egulada por sinais **e**xtracelulares
FACS: Citometria de fluxo
Flk-1 ou VEGFR-2: Receptor com um domínio cinase inserido relacionado ao gene KDR (receptor tirosina-cinase do tipo III)
Flt-1 ou VEGFR-1: Receptor tirosina-cinase relacionado ao gene FMS
GADD45: Proteínas que levam à **p**arada do **c**rescimento celular induzida por **d**anos ao **D**N
(GADD45 α , β e γ)
GAPDH: **G**liceraldeído-3-**f**osfato-**d**esidrogenase
GBM: **G**lioblastoma **m**ultiforme
GDP: **D**ifosfato de **g**uanosina

GFAP: **P**roteína **a**cídica **f**ibrilar das células da **g**lia
GLA: Ácido γ -linolênico
GPI: **G**licosil **f**osfatidil **i**nositol
GSK3: **C**inase que fosforila a sintase de **g**licogênio 3
GTP: **T**rifosfato de **g**uanosina
HA: Ácido **H**ialurônico
HER2, neu ou ErB-2: **R**eceptor do fator de crescimento **e**pidermal **h**umano 2 (Membro da família de proteínas ErbB ou família de EGFRs)
HIF: **F**ator **i**nduzido por **h**ipóxia
ICAP: **P**roteína **a**ssociada ao domínio **c**itoplasmático da **i**ntegrina
IKK: **C**inase do I κ B
Ink: Família de proteínas **c**inase **i**nibidoras de complexos Ciclina D/CDK4 ou 6
I κ B: **I**nibidor do NF- κ B
kDa: kilodalton (unidade de medida do peso molecular de proteínas)
Ku70/80 ou XRCC6/XRCC5: Subunidades regulatórias ligantes de DNA com 70 e 80kDa respectivamente que fazem parte da holoenzima DNA-PK
LA: Ácido **l**inoléico
MAPK: **C**inases de **p**roteínas **a**tivadas por **m**itógenos
MAPKK ou MEK: **C**inase que ativa as MAPK
MAPKKK, MAP3K, MKKK ou MEKK: **C**inase que ativa a cinase das MAPK
MDM2: **M**inutos **d**uplos **m**urinos 2 (“minutos duplos” são pequenos fragmentos de DNA extracromossomal) = proteína inibidora de p53
MEC: **M**atriz **e**xtracelular
MMPs: **M**etaloproteases da **m**atriz
MT-MMP: MMP ancorada à membrana plasmática via GPI ou transmembrana
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NAMI-A: Composto contendo rutênio (trans-imidazoldimetilsulfoxidotetraclororutenato)
NDPK-A e B ou nm23-H1 e H2: **C**inase **d**ifosfato **n**ucleosídica (conhecida em ratos como nm23 β e α respectivamente)
NF- κ B ou Rel: **F**ator nuclear de transcrição-kapaB
OMS: **O**rganização **m**undial de **s**aúde
P14 ou p19: Proteína de 14kDa ou 19kDa inibidoras de MDM2
P16: Proteína de 16kDa inibidora de CDK (CDKI) da família Ink
P21: Proteína de 21kDa inibidora de CDK (CDKI) da família Cip/Kip
P27: Proteína de 27kDa inibidora de CDK (CDKI) da família Cip/Kip
P50 ou NF- κ B1: Proteína de 50kDa que se liga ao p65 formando o heterodímero do NF- κ B
P53 ou TP53: proteína de 53kDa ou proteína tumoral 53, conhecida como supressora tumoral
P65 ou RelA: Proteína de 65kDa que se liga ao p50 formando o heterodímero do NF- κ B
PBS: **T**ampão **f**osfato **s**alino
PDGF: **F**ator de **c**rescimento **d**erivado das **p**laquetas
PDGFR: **R**eceptor do PDGF
PGE2: **P**rostaglandina do tipo **E**2
PI3K: **C**inase da posição 3 do **f**osfatidilinositol
PKA: Proteína **C**inase dependente do cAMP ou proteína **C**inase **A**
PKC: Proteína **C**inase **C**
PPAR: **R**eceptor **a**tivado pela **p**roliferação de **p**eroxisomos (receptor nuclear que funciona como fator de transcrição)

PTEN: **En**zima **f**osfatase e homóloga à **T**ensina, conhecida como supressora tumoral
PUFAs: **Á**cido **g**raxo **p**oliinsaturado
Raf: Proteína efetora da via do Ras
Ras: Proteína do vírus de **sarcoma de rato** = Família de pequenas proteínas que se ligam ao GTP
(Superfamília Ras de GTPases)
Rb ou pRb: **P**roteína **r**etinoblastoma
Rho: Subfamília de proteínas GTPases da família Ras, que incluem, entre outras, Rac1 e RhoA.
RNAm: **Á**cido **r**ibonucléico **m**ensageiro
ROS: **E**spécies **r**eativas de **o**xigénio
RT-PCR: **R**eação em **c**adeia da **p**olimerase-**T**ranscriptase **r**eversa
Ru-Asp: **R**utênio complexado quimicamente à **A**spirina[®]
Ru-Ibp: **R**utênio complexado quimicamente ao **I**buprofeno
Ru-Ind: **R**utênio complexado quimicamente à **I**ndometacina
Ru-Npx: **R**utênio complexado quimicamente ao **N**aproxeno
SDS: **D**odecilsulfato de **s**ódio
TBS: **T**ampão **T**ris **s**alino
Tiam-1: Proteína induzida por metástase e invasão de célula T de linfoma (modula a atividade de proteínas Rho ligantes de GTP)
TN-C: **T**enascina C (glicoproteína da MEC)
TNF: **F**actor de **n**ecrose **t**umoral
TNFR: **R**eceptor do TNF
TN-R: **T**enascina R (glicoproteína da MEC)
TRRAP: Proteína associada ao domínio de transformação e transativação
VEGF: **F**ator de **c**rescimento do **e**ndotélio **v**ascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral dos compostos dirutênicos	58
Figura 2. Estruturas moleculares dos AINEs	58
Figura 3. Análise do ciclo celular após tratamento com GLA <i>in vitro</i>	70
Figura 4. Análise do ciclo celular após tratamento com Ru-Ibp <i>in vitro</i>	71
Figura 5 Análises de FSC-H <i>in vitro</i> (Células controle)	72
Figura 6 Análises de FSC-H após tratamento com Ru-Ibp <i>in vitro</i>	73
Figura 7. Análise comparativa de C6 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	75
Figura 8. Comparação Tecido Tumoral versus Tecido Normal	79
Figura 9. Curva da expressão gênica após tratamento <i>in vitro</i> com GLA	85
Figura 10. Análise da proteína após tratamento <i>in vitro</i> com GLA.....	89
Figura 11. Razão da expressão protéica Bax/Bcl2 após tratamento <i>in vitro</i> com GLA	93
Figura 12. Análise do RNAm após tratamento <i>in vivo</i> com GLA	95
Figura 13. Análise da proteína após tratamento <i>in vivo</i> com GLA.....	100
Figura 14. Curva da expressão gênica após tratamento <i>in vitro</i> com Ru-Ibp.....	102
Figura 15. Curva da expressão protéica após tratamento <i>in vitro</i> com Ru-Ibp	106

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1. Drogas desenvolvidas para inibir alguns dos diversos alvos moleculares dos gliomas	22
Esquema 2. Controle do ciclo celular e apoptose através das vias do p53 e do Rb	24
Esquema 3. Representação esquemática das interações de diversas proteínas que atuam no controle do ciclo celular	26
Esquema 4. Ku como uma oncoproteína ou uma proteína supressora de tumor.....	31
Esquema 5. Esquema da via do fator nuclear-kB ativado por drogas anticâncer e radiação ultravioleta (UV)	33
Esquema 6. Esquema básico do processo de angiogênese em resposta ao crescimento tumoral	39
Esquema 7. Modelo esquemático da regulação da transcrição da ciclooxigenase-2 (COX2) pelo Nm23 β	41
Esquema 8. Metabolismo dos EFAs.....	43
Esquema 9. Suposto mecanismo de ação dos PUFAs	48
Esquema 10. Formação da PGE2 e seu papel funcional.....	50
Esquema 11. Vias de sinalização PGE2-receptores EP	51
Esquema 12. Possíveis mecanismos de ação dos AINEs e COXIBs	55
Esquema 13. Representação esquemática do tumor de C6 <i>in vivo</i>	109
Esquema 14. Mecanismo de ação do GLA <i>in vitro</i>	113
Esquema 15. Mecanismo de ação do GLA <i>in vivo</i>	123
Esquema 16. Suposto envolvimento das vias do p53 e do pRb no mecanismo de ação do Ru-Ibp	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados do Ensaio de MTT <i>in vitro</i>	66
Tabela 2. Contagem do Número de Células <i>in vitro</i>	68
Tabela 3. Viabilidade celular <i>in vitro</i>	68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Gliomas – Classificação, Epidemiologia e Opções de Tratamento	20
1.2 Mecanismos da Progressão Tumoral em Gliomas	23
<i>1.2.1 Processos ligados ao controle da progressão do ciclo celular e apoptose.....</i>	<i>24</i>
<u>1.2.1.1 O complexo heterodimérico Ku e sua relação com a neoplasia.....</u>	<u>29</u>
<u>1.2.1.2 O fator nuclear kB e sua relação com a neoplasia.....</u>	<u>31</u>
<i>1.2.2 Processos ligados à angiogênese, invasão e migração.....</i>	<i>34</i>
<u>1.2.2.1 A proteína nm23 e sua relação com a neoplasia.....</u>	<u>39</u>
1.3 Ácido γ-Linolênico (GLA) e Câncer	42
1.4 Antiinflamatórios Não Esteroidais (AINEs) e o Câncer	49
1.5 Compostos de Rutênio e o Câncer.....	55
2 OBJETIVOS	59
3 MATERIAIS E MÉTODOS	61
3.1 Cultivo de Células.....	61
3.2 Ensaio Colorimétrico de MTT	61
3.3 Contagem de Células e Viabilidade Celular	61
3.4 FACS.....	62
3.5 Implantação das Células C6 em Ratos	62
3.6 Coleta do Tumor e do Contra-Lateral.....	62
3.7 RT-PCR	63
3.8 Western Blotting.....	64
3.9 Análise dos Dados	65
4 RESULTADOS	66
4.1 Ensaios de MTT <i>in vitro</i>	66
4.2 Ensaios de proliferação celular <i>in vitro</i> usando compostos dirutênicos contendo antiinflamatórios não-esteróides (AINEs).....	67
4.3 Análise de FACS após tratamento <i>in vitro</i> com GLA e Ru-Ibp	69
4.4 Panorama da expressão gênica das células C6 nas condições <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	74
<i>4.4.1 Comparação <i>in vitro</i> versus <i>in vivo</i>.....</i>	<i>74</i>

4.4.2 Comparação: tecido tumoral versus tecido normal	78
4.5 Tratamento <i>in vitro</i> com GLA	83
4.5.1 Análise da Expressão do RNAm	83
4.5.2 Análise da Expressão da Proteína	88
4.6 Tratamento <i>in vivo</i> com GLA.....	94
4.6.1 Análise da Expressão do RNAm	94
4.6.2 Análise da Expressão da Proteína	99
4.7 Tratamento <i>in vitro</i> com Ru-Ibp	101
4.7.1 Análise da Expressão do RNAm	101
4.7.2 Análise da Expressão da Proteína	105
5 DISCUSSÃO	107
5.1 Perfil da Expressão Gênica de C6 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	107
5.2 Mecanismo de Ação do GLA sobre o Controle do Ciclo Celular e Apoptose das Células C6 <i>in vitro</i>.....	110
5.3 Efeito do GLA sobre a Expressão de Proteínas Relacionadas à Invasão, Migração e Angiogênese nas Células C6 <i>in vitro</i>.....	114
5.4 Ação do GLA sobre o tumor de C6 <i>in vivo</i>.....	116
5.4.1 Mecanismo de Ação do GLA sobre o Controle do Ciclo Celular e Apoptose das células C6 <i>in vivo</i>	116
5.4.2 Mecanismo de Ação do GLA sobre o Controle da Migração, Invasão e Angiogênese <i>in vivo</i>	119
5.3 Mecanismo de Ação do Ru-Ibp sobre as células C6 <i>in vitro</i>	124
6 CONCLUSÕES.....	132
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
ANEXO A.....	161
ANEXO B.....	162
ANEXO C.....	169

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gliomas – Classificação, Epidemiologia e Opções de Tratamento

Os gliomas são tumores intracraniais de origem glial (células da glia) que possuem uma habilidade em invadir os arredores do tecido normal, sendo altamente infiltrativos, tornando-se difíceis de controlá-los e praticamente impossível de removê-los totalmente em uma cirurgia, contribuindo para uma reincidência e um conseqüente aumento nos índices de mortalidade e morbidez dessa doença (Nutt et al., 2001). Os gliomas são classificados em astrocitomas, oligodendrogliomas e oligoastrocitomas, e são histologicamente relacionados em grau I, II, III e IV, segundo a organização mundial de saúde (OMS). O mais agressivo é o astrocitoma grau IV, o qual é chamado de glioblastoma multiforme (GBM). Em vários casos glioblastomas multiformes reincidem em um tempo de 6-12 meses, ao passo que astrocitomas anaplásicos reaparecem depois de 18-36 meses. A reincidência ocorre em aproximadamente 80% dos casos com um crescimento de 2-3cm da margem da lesão original (Nieder et al., 2000).

No Brasil, segundo dados do INCA, a incidência de tumores do Sistema Nervoso Central (incluindo glioblastoma multiforme, entre outros) em 2007 foi da ordem de 10.000 novos casos. Os tumores cerebrais são raros, mas sua incidência e mortalidade vêm aumentando ao longo das últimas décadas em vários países, inclusive no Brasil. As taxas de mortalidade por esta neoplasia, ajustadas por idade pela população mundial, cresceram de 3,35/100 mil nas décadas de 80 e 90 para 5,35/100 mil em 2007 de acordo com dados do DATASUS e projeções. Esses tipos de tumores são o segundo tipo mais freqüente em crianças, e sua incidência nos adultos aumenta conforme a idade avança. Existem dezenas de tipos de neoplasias do SNC reconhecidas pela OMS. Os gliomas malignos do hemisfério cerebral em adultos e meduloblastomas no cerebelo em crianças são os mais comuns e mais estudados. Embora a causa da maioria das neoplasias do SNC pareça enigmática, certas associações são evidentes. Estudos epidemiológicos em adultos e crianças têm relacionado exposição à radiação e subsequente desenvolvimento de tumores no SNC. Gliomas e meduloblastomas também ocorrem em famílias implicando numa etiologia genética em alguns casos (Louis et al., 2002).

As únicas opções de tratamento para este tipo de tumor são quimioterapia, radioterapia e cirurgia. Esta última geralmente vem seguida da radio/quimioterapia, na tentativa de eliminar as células que eventualmente sobram após a ressecção cirúrgica do tumor. Todavia, é

praticamente impossível a eliminação completa das células tumorais, o que favorece uma alta reincidência deste tumor. Daí a importância do surgimento de novas opções de tratamento, de preferência com múltiplos mecanismos de ação, a fim de atingir tanto as células que estão em constante proliferação como aquelas que estão invadindo os tecidos adjacentes.

Comparando-se estudos na literatura vemos que muito tem se avançado sobre os mecanismos biológicos e moleculares dos gliomas de alto grau, além dos fatores associados ao crescimento e progressão desse tumor (Nieder et al., 2006). Isso acabou repercutindo no desenvolvimento de uma imensidão de novas drogas capazes de atuar em diversos desses alvos moleculares (Esquema 1), todavia, não se mostraram muito eficazes até agora (Wong et al., 2007; Hoelzinger et al., 2007). Algumas dessas drogas em fase I e II de estudos clínicos mostram que ainda não são uma boa opção de tratamento, uma vez que acarretam pouco ou nenhum benefício para o paciente (Wong et al., 2007; Hoelzinger et al., 2007). Usando essas drogas em terapias combinadas ocorre uma melhora da eficácia, todavia aumenta os efeitos colaterais. Outro fator que contribui para o difícil tratamento dos gliomas com essas drogas é a penetração limitada das mesmas no sistema nervoso central (drogas pouco lipofílicas), isso combinado com um ativo efluxo da mesma, mediado pela glicoproteína P na barreira hematoencefálica (Wong et al., 2007; Dai et al., 2003). Dessa forma, o tratamento dos gliomas ainda deixa a desejar.

Um estudo recente mostrou que até o mais favorável grupo de pacientes tratados com radioterapia mais temozolomida (droga mais utilizada na atualidade para este tipo de tumor) no pós-operatório obtiveram uma sobrevida média de apenas 22 meses (Hegi et al., 2005), ou seja, 10 meses a mais do que a média. Certamente esses resultados foram obtidos em grupos pequenos de pacientes altamente selecionados, cujos tratamentos foram FSRT (radioterapia estereotática fracionada) (maioria com quimioterapia adicional), radiocirurgia, ou re-resecção mais um tratamento fotodinâmico, RIT (radioimunoterapia) e temozolomida ou PCV (procarbazona-lomustina-vincristina) mais injeção local de mitoxantrona (Stylli et al., 2005; Vordermark et al., 2005; Grosu et al., 2005; Bartolomei et al., 2004; Boiardi et al., 2001).

Assim, um intenso tratamento local é sempre uma estratégia de maior sucesso, embora pudemos observar através desses estudos que as terapias para gliomas continuam bem agressivas, sem garantir a melhora da qualidade de vida do paciente. Dessa forma, o tratamento de gliomas de alto grau, permanece difícil, pois não se tem muito acesso às células tumorais que se infiltraram no cérebro normal, sendo, portanto necessário o surgimento de terapias adicionais e/ou adjuvantes menos agressivas e com menos efeitos colaterais, além de propiciarem um aumento da sobrevida média com melhora da qualidade de vida do paciente.

Esquema 1. Drogas desenvolvidas para inibir alguns dos diversos alvos moleculares dos gliomas. Diversas drogas como o Imatinib, o qual se encontra em fase I/II de estudos clínicos atuam inibindo receptores de membrana como no caso o PDGFR (receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas). GF=fator de crescimento (p/ ex: VEGF, PDGF). PI3K=fosfatidilinositol-3 cinase; PIP2 e PIP3=fosfatidilinositol di e trifosfatado respectivamente; PTEN=proteína fosfatase e tensina homóloga; NF-κB=fator nuclear de transcrição κB; AKT=proteína cinase B; Ras=proteína ativadora da Raf; Raf=proteína ativadora da MEK; mTOR=alvo em mamíferos da rapamicina; MEK=cinase que ativa as MAPK (proteínas cinases ativadas por mitógenos); ERK=cinase regulada por sinais extracelulares; Bad=proteína proapoptótica; GSK3=cinase sintase de glicogênio 3. Modificado de: Wong et al., 2007.

O tratamento cirúrgico dos gliomas é comprometido pela natureza invasiva das células do tumor, infiltração de áreas adjacentes do tecido cerebral ou até mesmo pela repopulação de células que sobram após ressecção cirúrgica. A definição da massa tumoral por tomografia computadorizada (CT), tomografia de emissão de um único fóton (SPET) e imagem de ressonância magnética (MRI) é somente efetiva para a localização da doença, e a maioria das estratégias terapêuticas como cirurgia citorrredutiva ou radioterapia somente reduz a massa tumoral, sem destruir as células de glioblastoma que invadem o tecido cerebral adjacente. A quimioterapia desenhada para matar células neoplásicas em divisão, além de inespecífica, permanece ineficiente para as células que não estão se dividindo, as quais eventualmente

formam tumores secundários em relação ao tumor primário. O estudo dos mecanismos do ciclo celular, apoptose, angiogênese, invasão e migração, em conjunto podem impor terapias que não somente removem o tumor primário, mas também eliminam as células que saíram do tumor e invadiram tecidos adjacentes. Dessa forma, modelos que mostram a progressão tumoral em glioblastomas são muito importantes no estudo de novos tratamentos que impeçam a continuidade desses processos.

1.2 Mecanismos da Progressão Tumoral em Gliomas

Embora se observe na literatura os acontecimentos celulares relacionados ao controle do ciclo celular, apoptose, angiogênese, invasão e migração de forma separada, é possível reparar neste trabalho que todos os processos podem e/ou estão intimamente relacionados (Anexo A), tornando difícil tratá-los individualmente.

Evans et al. (2003) propuseram um interessante esquema representativo associando os quatro graus dos gliomas e suas anormalidades genéticas: aumento da expressão de fatores de crescimento e/ou receptores, como sendo o evento inicial (Grau-I); mutação do p53 (Grau-II); desprendimento da proteína Retinoblastoma (Rb), frequentemente através da queda da expressão do p16 (Grau-III); ativação da telomerase (Grau-IV). Tradicionalmente, os GBMs são classificados em primário e secundário baseado nas suas características genéticas e clínicas, embora as características morfológicas e microscópicas de ambos os subtipos são indistinguíveis. Por definição, os GBMs primários também chamados *de novo* são aqueles que surgem já com características de um tumor com grau IV de malignidade. Já o GBM secundário se desenvolveu a partir de um astrocitoma de baixo grau evoluindo gradativamente até se tornar um astrocitoma de alto grau ou GBM. Os GBMs primários, os quais contam 95% dos casos, surgem então após uma curta história clínica, tipicamente afetam pacientes mais velhos, exibem uma predominância para o sexo masculino e frequentemente mostram uma sinalização da via fosfatidil inositol 3 cinase/Proteína cinase B ou AKT (PI3K/AKT) aberrante devido à alta expressão do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) ou perda ou deleção da fosfatase e tensina homólogas do cromossomo 10 (PTEN) (Reardon et al., 2006). Porém, como já dito, além dessas proteínas, existem outras igualmente importantes que se relacionam entre si, ocorrendo assim, a progressão tumoral de fato.

1.2.1 Processos ligados ao controle da progressão do ciclo celular e apoptose

Em se tratando do controle do ciclo celular e apoptose, são duas as vias reguladoras, as quais permitem que haja a progressão tumoral, especialmente em gliomas (Stewart et al., 2001; Ivanchuk et al., 2001; Mainprize et al., 2001). As duas principais proteínas destas duas rotas são a proteína Retinoblastoma (Rb) e o p53 (Esquema 2).

Esquema 2. Controle do ciclo celular e apoptose através das vias do p53 e do Rb. O p16 está envolvido na via do Rb onde ele se liga ao CDK4 para inibir a fosforilação do Rb (pRb). O p14 se complexa com MDM2 e p53 para estabilizar o próprio p53 e prevenir sua degradação. Modificado de Ivanchuk et al., 2001.

A fosforilação do Rb por cinases dependentes de ciclinas (CDK) é necessária para a passagem pelo ponto de restrição da fase G1 do ciclo celular. Estudos recentes mostraram que a proteína Rb é fosforilada por diferentes tipos de CDKs, assim como diferentes complexos: CDK2-ciclina A, CDK2-ciclina E, CDK4-ciclina D, mostrando diferentes sítios de fosforilação na pRb (Zarkowska et al., 1997). Sendo assim, um complexo pode complementar o outro na progressão da célula para a fase S (Lee et al., 2000). Similarmente, o p53 pode impedir que as células passem pelos pontos de restrição das fases G1 e G2, além de poder induzir a célula à apoptose. A ausência do tipo selvagem de p53 é o achado mais comum das anormalidades encontradas em astrocitomas grau II, atingindo cerca de 60% destes tumores e 37% dos GBMs (Reifenberger et al., 1998). Duas proteínas são codificadas pelo mesmo gene supressor de tumor *CDKN2A*, o qual se encontra frequentemente silenciado ou hipermetilado em gliomas malignos: p16^{INK4A} e p14^{ARF}. O p16^{INK4A} bloqueia a fosforilação de Rb através da

inibição do complexo CDK4/6-ciclina D1. Isso impede que o Rb libere o fator de transcrição E2F, impedindo assim a transcrição de genes necessários para a passagem pelo ponto de restrição na fase G1 e conseqüente progressão do ciclo celular. Sendo assim, uma ou outra anormalidade relacionada a essa via está presente em 90% dos casos de GBM e são, com muito poucas exceções, mutuamente exclusivas (Reinfenberger et al., 1998). Por outro lado p14^{ARF} previne a degradação de p53, a fim de que este esteja presente para inibir uma possível progressão descontrolada do ciclo celular. Dessa forma, o p53 pode atuar através da ativação de Bax, uma proteína pró-apoptótica que induz a liberação do citocromo *c* pela mitocôndria através da inibição da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (inibidor de apoptose de célula B de linfoma-2) levando assim a célula à apoptose. Por outro lado, a ativação de p53 pode levar a uma subseqüente ativação de p21. Esta proteína, por sua vez, é um membro da família Cip/Kip dos inibidores de CDK (CDKI), uma família que inclui p27^{Kip1} e p57^{Kip2}. Ao contrário do p21, p27 não é regulado pelo p53, todavia as proteínas Cip/Kip podem atuar como reguladores positivos do ciclo celular, facilitando a formação do complexo CDK-ciclina D. Elas são também potentes inibidoras da progressão do ciclo celular quando elas bloqueiam a atividade de cinase associada aos complexos ciclina E/CDK2 ou ciclina A/CDK2. O resultado final dependerá dos níveis dessas proteínas, sendo que baixos níveis estimulam e altos níveis inibem os complexos ciclina-CDK (Esquema 3).

Em resumo, o controle da progressão do ciclo celular se deve pela ligação do E2F em Rb por reguladores positivos da progressão do ciclo celular ou através da ativação de repressores transcricionais como o HBP1, um alvo da proteína retinoblastoma (Shih et al., 1998). A resistência à apoptose mediada pelo Rb pode estar relacionada com o controle da atividade do E2F-1. Na ausência de Rb, a expressão desregulada de E2F-1 pode levar a uma expressão aumentada de proteínas como p14^{ARF} favorecendo a apoptose mediada pelo p53. Além disso, a via do Rb regula a expressão de genes tecido-específicos. Sabendo-se então que o Rb é um alvo funcional dos CDKIs o crescimento de gliomas pode ser atribuído ao efeito das proteínas p16, p15, p21 e p27. Dessa forma, a alta expressão de p16, por exemplo, pode diminuir a expressão da proteína Rb, minimizando o efeito anti-apoptótico dessa proteína e sensibilizando as células cancerígenas ao estímulo para apoptose (ver Stewart et al., 2001; Ivanchuk et al., 2001; Mainprize et al., 2001 para mais detalhes). No entanto, o E2F pode indiretamente aumentar a proliferação através da ativação de moléculas anti-apoptóticas (rever esquema 2). Um importante trabalho demonstrou que a transferência de E2F-1 em gliomas humanos é capaz de causar um aumento da expressão de Bcl-2 (Gomez-manzano et al., 2001). Em contrapartida, outro trabalho usando células mielóides e células imortalizadas

dependentes de Interleucina-3, mostrou uma síntese aumentada de E2F-1 e c-myc podem inibir a transcrição de Bcl-2 diminuindo tanto os níveis da proteína quanto do seu RNAm (Eischen et al., 2001), mostrando que o tipo celular é uma importante variável quando se estuda a ação de um tratamento antitumoral.

Esquema 3. Representação esquemática das interações de diversas proteínas que atuam no controle do ciclo celular. As várias fases do ciclo celular e os complexos ciclina-CDK que possuem um papel na progressão através das fases indicadas. Os inibidores Ink4a são específicos para as cinases dependentes de ciclina D (CDK4/6) enquanto que membros da família Cip/Kip (p21 e p27) podem inibir todas as cinases dependentes de ciclina. Interessantemente, a inibição do complexo Ciclina D/CDK4/6 depende dos níveis dos inibidores Cip/Kip. A expressão de p21 pode ser regulada positivamente por um mecanismo dependente de p53 como o de danos ao DNA ou mecanismos independentes de p53 como a estimulação por fatores de crescimento, E2F1 e MAPK. Modificado de: Mainprize et al., 2001.

Os gliomas podem ativar receptores de diferentes maneiras, através do aumento tanto do receptor quanto do seu ligante, levando a uma resposta autócrina (por exemplo: fator de crescimento derivado de plaquetas e o seu receptor - PDGF/PDGFR), amplificação genômica, e/ou mutação do receptor, levando a uma atividade constitutiva na ausência do ligante (por exemplo: receptor do fator de crescimento epidermal - EGFR), ou ativação da transdução de sinal intracelular (por exemplo: inativação da fosfatase e tensina homólogas do cromossomo 10 silenciado - PTEN).

Em gliomas, Ras é raramente mutado, mas a via Ras/Proteína cinase ativada por mitógenos (Ras/MAPK) é freqüentemente ativada por fatores de crescimento. A ativação de Fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) é também freqüente em glioblastomas, resultando numa alta expressão de EGFR ou inativação de PTEN (Sanson et al., 2004) (rever esquema 1). Ainda podemos incluir na tumorigênese as alterações epigenéticas, tais como metilação das ilhotas CpG (Citosina - fosfato - Guanina) localizadas na região promotora 5' dos genes (Hong et al., 2003). O silenciamento por aberrante metilação é um freqüente evento e ocorre em estágios iniciais. Isso foi demonstrado por vários genes, incluindo metil guanil metil tranferase (MGMT), P16/CDKN2A, e P14/ARF, P15/CDKN2B, P73 (Dong et al., 2001; Esteller e Herman, 2004). Uma extensa procura genômica mostrou que a aberrante metilação das ilhotas CpG é uma alteração extremamente prevalente em tumores astrocíticos e oligodendrogiais (Hong et al., 2003).

Em glioblastomas (GBMs) vários mecanismos são perdidos devido à primária e/ou secundária inativação mutacional. Uma mudança oncogênica em uma célula normal induz uma parada do ciclo celular, reparo do DNA (se possível) ou apoptose. Células tumorais perdem esse controle através de mutação desses reguladores do ciclo celular e apoptose. Além disso, um endógeno fenótipo mutante leva ao acúmulo de incontáveis alterações genéticas e epigenéticas as quais oferecem um risco único para cada célula, tornando assim um fenótipo cada vez mais maligno. Uma contínua sinalização por Raf/MEK/ERK representa uma mudança oncogênica que induz uma parada do crescimento e senescência mediada pelo p16 e p14 em astrócitos normais (Fanton et al., 2001). Em células de GBM deficientes em INK4A/ARF, uma via dependente de p21 foi postulada e pode operar como um mecanismo protetor contra mudanças oncogênicas (Merlo, 2003). Todavia, ainda precisa ser molecularmente definida.

De acordo com um recente estudo usando a técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR), importante para passar pela dificuldade de acessar deleções

homozigóticas em tumores primários, 50% dos gliomas humanos malignos foram encontrados com deleção da região INK4A/ARF, indicando deleções homozigóticas que estendem o quadro de leitura de ambos os genes (Labuhn et al., 2001). Essa alteração é, todavia, uma das alterações genéticas mais frequentes encontradas em GBMs durante a progressão dos mesmos e pode ser ligada a um pior prognóstico em pacientes acima de 50 anos de idade (Labuhn et al., 2001). Observações similares foram feitas em um modelo de oligodendroglioma e oligoastrocitoma que expressa altos níveis do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas do tipo B (PDGFR-B) sob os promotores nestina e a proteína ácida fibrilar das células da glia (GFAP). O INK4A/ARF $-/-$ não foi tumorigênico, mas aumentou impressionantemente a malignidade de um tumor de baixo grau para alto grau (Dai et al., 2001). A maioria dos gliomas malignos que retém o INK4A/ARF expõe mutações em outros genes das vias de p53 e de pRb, os quais ambos são desregulados na grande maioria dos tumores, levando a um ciclo celular descontrolado e resistência contra o estímulo apoptótico (Merlo, 2003). Um recente estudo demonstrou que a expressão de p16 citoplasmática e não a nuclear pode sinalizar um pobre prognóstico em astrocitomas de alto grau (Arifin et al., 2006).

A inibição do crescimento mediada por PTEN é devido ao bloqueio da fase G1 além de induzir a apoptose (Furnari et al., 1998). Como vimos, a carcinogênese envolve erros substanciais na replicação do DNA, déficit no reparo do mesmo e alterações na segregação dos cromossomos. Uma simples quebra da fita dupla do DNA pode ser suficiente para matar uma célula se isso inativar um gene essencial ou levar à apoptose. Além disso, um reparo mal feito da fita do DNA pode ocorrer, levando à perda ou amplificação do material cromossômico dando razão para a tumorigênese, ainda mais se um gene supressor tumoral ou oncogene está envolvido. Proteínas envolvidas no reparo da fita dupla do DNA são, entre outras, a proteína associada ao domínio de transformação e transativação (TRRAP9) e a MRE11. Esta última se associa com membros da família E2F suprimindo a quebra da fita dupla de DNA (Costanzo et al., 2001). TRRAP é um cofator de c-Myc, responsável pela transformação oncogênica mediada pelo E2F. Ele é essencial para a progressão do ciclo celular (Herceg et al., 2001).

Analisando de forma comparativa a expressão de ciclinas e de CDKs nas diferentes graduações dos gliomas, vemos que a ciclina D1 e A se encontram em baixos níveis nos tumores Grau-II e em altos níveis nos tumores Grau-III, sendo que os níveis das ciclinas E e B1 e da CDK2 somente apareceram altos em tumores Grau-III. Enquanto que CDK4 e cdc2 aparecem em tumores Grau-III e às vezes aparecem difusos na célula (Fiano et al., 2003). As

ciclina D1 e D3 são diferencialmente expressas na fase G1. Em particular a ciclina D3 não é detectada no início da fase G1, mas sua expressão aumenta gradativamente durante esta fase até que as células entrem na fase S. Já a expressão de ciclina D1 é mais persistente durante a fase G1 (Bacon et al., 2002). Análises mostraram a expressão de ciclina D1 mais intensa em oligodendrogliomas anaplásicos que nos clássicos (Bosone et al., 2001). Uma significativa correlação entre a sobrevida dos pacientes e a proteína inibidora de CDK, p27, mostrou que a expressão dessa molécula melhora a evolução do prognóstico em pacientes com astrocitomas malignos (Kirla et al., 2003). Estudos em pacientes com baixa expressão de ciclina E e alta de p27 revelaram, interessantemente, uma sobrevida maior (103,2 meses) do que os pacientes que apresentavam uma alta expressão de ciclina E e baixa de p27 (13,1 meses) (Tamiya et al., 2001). Contudo, a baixa expressão de p16, Rb, E2F-1 e p53 não mostrou uma correlação com a sobrevida de pacientes com gliomas. Em contrapartida, a alta expressão do EGFR, ciclina E e CDK4 foram associadas com a agressividade desses tumores, sendo que a alta expressão de ciclina D1 só apareceu em um paciente dos 94 gliomas analisados (Chakravarti et al., 2001).

1.2.1.1 O complexo heterodimérico Ku e sua relação com a neoplasia

Uma proteína cinase com alta afinidade pelo final da cauda do DNA é estimulada durante a proliferação celular e recebe o nome de Ku (Rathmell e Chu, 1994). Essa intrigante molécula existe como um heterodímero ligante de DNA nos eucariontes, consistindo de duas subunidades de proteínas com 70 e 80 kDa, conhecidas então como Ku70 e Ku80 (em *S. cerevisiae*) ou Ku86 (em eucariontes maiores) (Gullo et al., 2006). Elas fosforilam várias proteínas incluindo fatores de transcrição assim como c-Jun, c-Fos, c-Myc, e outras mais. Elas parecem ser proteínas multifuncionais que estão envolvidas em processos celulares, como replicação de DNA, regulação da transcrição e controle das fases G2 e M do ciclo celular. Todavia, Ku é mais conhecida pelo seu papel crucial no reparo do DNA. Além disso, numerosos outros estudos têm implicado Ku em diversos outros processos celulares, incluindo manutenção do telômero e apoptose (Tuteja e Tuteja, 2000).

Tem sido mostrado que proteínas Ku estão presentes em estruturas subcelulares à exceção do núcleo. Por exemplo, Ku70 é capaz de se ligar à proteína pró-apoptótica Bax e inibir o processo de apoptose mediado pela mesma *in vitro* através da sua entrada para a mitocôndria (Sawada et al., 2003). Essa função anti-apoptótica é mediada por um domínio carboxi-terminal do Ku70 e não requer o efeito cooperativo do Ku80. No entanto, é possível que Ku70 possa requerer heterodimerização com Ku80 *in vivo* para exercer tal atividade

(Gullo et al., 2006). Foi demonstrado que a hiper-proliferação de células de câncer gástrico pode estar associada com a alta expressão e os altos níveis de Ku70 e Ku80 em um mecanismo dependente da enzima ciclooxygenase-2 (COX-2), a qual é mediada pela ativação do fator nuclear kB (NF-kB) em células de câncer gástrico (Lim et al., 2002). A COX-2 é um de seus produtos, a Prostaglandina E2 (PGE2) reduz a morte celular e pode regular positivamente a proliferação de células tumorais (Lim et al., 2001; Raz, 2002). Foi também reportado que há uma correlação entre os níveis de Bcl-2 anti-apoptótico e Ku80 em células B de leucemia linfocítica crônica (Klein et al., 2000). Além disso, altos níveis de Ku70 e Ku80 em câncer de mama agressivo são encontrados em comparação com o tecido normal (Pucci et al., 2001). Todos esses estudos dão razão à hipótese de que há uma possível relação entre PGE2 produzida pela COX-2 e os níveis elevados de Bcl-2, Ku e da proliferação celular tumoral. Assim como a proteína cinase do DNA (DNA-PK) promove um papel crucial no reparo da fita dupla do DNA, é possível que uma alta atividade dessa DNA-PK sirva como um marcador para a presença de células resistentes a drogas anticancerígenas dentro da população de células tumorais. Além disso, a atividade cinase da DNA-PK é regulada através da atividade de ligante de DNA da sua subunidade regulatória Ku. Assim a regulação da expressão e função de Ku representa um papel vital na resistência de células tumorais à terapia anticancerígena (Esquema 4).

A associação de DNA-PK-Ku70-Ku80 variante (Ku80v) com proteínas regulatórias do ciclo celular assim como p53, CDK4 e E2F-4, sugere um papel crucial do Ku80v na regulação do ciclo celular e na transformação maligna em células de mieloma múltiplo (Gullo et al., 2006). Recentemente verificou-se que usando um antisense para Ku70 mediado por um adenovírus, foi possível tornar células de glioma radiosensíveis (Li et al., 2003). Um estudo interessante revelou ainda que o complexo heterodimérico Ku70/80 pode regular a adesão célula-célula e célula-matriz extracelular participando de processos de adesão, migração e invasão celular funcionando como receptor para a fibronectina (Monferran et al., 2004a), além de possuir uma função proteolítica através da interação com a metaloprotease-9 (MMP-9) (Monferran et al., 2004b) sendo assim um importante alvo para terapias antimigratórias e anti-invasivas.

Esquema 4. Ku como uma oncoproteína ou uma proteína supressora de tumor. Um esquema da holoenzima DNA-PK é mostrado. A DNA-PK é composta pelo heterodímero Ku70/Ku80 e DNA-PKcs. Em câncer o ganho da função da DNA-PK está associado com o ganho da função oncogênica; enquanto que a perda da função da DNA-PK (flecha laranja) está associada com a perda da função de vigilante ou supressora de tumor. As consequências dessas mudanças estão mostradas no esquema (caixas azuis). Modificado de: Gullo et al., 2006.

1.2.1.2 O fator nuclear kB e sua relação com a neoplasia

O fator de transcrição nuclear kB (NF-kB) é capaz de regular uma variedade de genes envolvidos em diversos eventos celulares, tais como inflamação, resposta imune, proliferação celular e apoptose. São cinco os membros da família NF-kB/proteínas Rel nos mamíferos (c-Rel), RelA (p65), RelB, NF-kB1 (p50 e seu precursor p105), e NF-kB2 (p52 e seu precursor p100) (Karin et al., 2002). A forma ativa mais abundante é um heterodímero composto das subunidades p50 e p65, que funciona predominantemente como um ativador transcricional. O

NF- κ B é constitutivamente ativado na maioria das linhagens de células tumorais, sendo derivadas de tumores hematopoiéticos e tumores sólidos, resultando na prevenção da apoptose, aumento da proliferação e aumento do potencial metastático (Greten e Karin, 2004).

A maior parte dos carcinógenos e promotores tumorais ativam NF- κ B, enquanto agentes quimiopreventivos o suprimem, sugerindo uma importante ligação com o câncer (Bharti e Aggarwal, 2002). Paradoxalmente, a maioria dos agentes incluindo citocinas, agentes quimioterapêuticos e radiação, que induzem apoptose também ativam NF- κ B (Beg e Baltimore, 1996), indicando que essa molécula faz parte do mecanismo de auto-defesa das células podendo mediar uma dessensibilização, quimioresistência e radioresistência (Wang et al., 1999).

O NF- κ B está presente na maioria das células, onde permanece no seu estado inativo no citoplasma, ligado em seu inibidor endógeno, o I κ B (Lim et al., 2001). Sobre estímulo de vários sinais ativadores de NF- κ B, I κ B é fosforilado e degradado através de um processo dependente da ligação de ubiquitina (Esquema 5). Esse processo libera o complexo NF- κ B, o qual, então, é translocado para o núcleo para ativar a transcrição de diversos genes como ciclina D1, VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) e ciclooxigenase-2 (COX-2), enzima essa relacionada com a produção de prostaglandinas (PGs), mostrando assim um importante envolvimento do NF- κ B na transcrição desses genes (Guttridge et al., 1999). Interessantemente, fatores transcricionais ligantes de NF- κ B se mostram significativamente reduzidos em clones mutados para ERK-1, até mesmo em presença de PMA (forbol 12-miristato 13 acetato), um indutor da cascata Raf/MEK/ERK, mostrando assim, um envolvimento dessa via na ativação do complexo p65/p50 (NF- κ B) (Lakka et al., 2002) (Esquema 5). Vários estudos recentes indicam que o NF- κ B é ativado por vários carcinógenos e promotores tumorais. Isso inclui o benzopireno, 4-(metilnitrosamino)-1-(3piridil)-1-butanona, a radiação UV, radiação ionizante e ésteres de forbol (Greten e Karin, 2004).

Esquema 5. Esquema da via do fator nuclear-kB ativado por drogas anticâncer e radiação ultravioleta (UV). A ativação do NF-κB leva à sua translocação para o núcleo e consequente ativação de genes alvos. P65/p50=heterodímero NF-κB; TNF=fator de necrose tumoral; TNFR=receptor do TNF; PI3K=fosfatidilinositol-3 cinase; AKT=serina treonina cinase/proteína cinase B; ULS=sistema ubiquitina ligase; MEKK=MAPKKK ou Cinase que ativa a cinase das MAPK; ROS=espécies reativas de oxigênio. Modificado de: Nakanishi e Masakazu, 2007.

A inibição da ativação do NF-κB causa uma forte supressão da proliferação celular em células de câncer gástrico, possivelmente pelo fato de induzir uma baixa expressão do gene da COX-2. A adição de prostaglandina E2 (PGE2) a essas células estimula a proliferação, visto que as mesmas se encontravam com baixos níveis de NF-κB no núcleo (Lim et al., 2001). Altos níveis das subunidades p50/p65 do NF-κB nas células U-87MG de glioblastoma multiforme são encontrados, e como esperado, os níveis da cinase dependente de ciclina CDK2 e ciclina E também se encontram aumentados quando as células saem da fase G1 e partem para a fase S. As subunidades do NF-κB parecem estar totalmente associadas com ciclina E através da sua interação com CDKs, sugerindo que o aumento destes complexos

permita um aumento da fosforilação do inibidor I κ B favorecendo o aparecimento do p50/p65 NF- κ B nessas células (Ansari et al., 2001). Além disso, as CDKs podem diretamente ou indiretamente ativar o NF- κ B (Ansari et al., 2001). Um estudo recente mostrou que a diminuição da expressão de proteínas que induzem a parada do crescimento diante de uma lesão no DNA (GADD45 α e γ) presumivelmente através da indução de c-Myc, consiste num passo essencial do escape da apoptose pelas células tumorais dependente de NF- κ B. Assim, o bloqueio do NF- κ B implica numa regulação positiva de GADD45 α e γ , levando a apoptose (Zerbini et al., 2004). A máxima atividade de NF- κ B ocorre a partir da metade da fase G1 e na metade da fase S. Isso sugere que a ligação diferencial do NF- κ B no DNA pode não ser devido a transcrição diferencial dos seus genes alvos e portanto um evento pós-transcricional estaria envolvido na regulação da ligação do NF- κ B durante o ciclo celular (Ansari et al., 2001). Assim sendo, a inibição de NF- κ B causa uma parada do ciclo celular em gliomas (Otsuka et al., 1999) e um retardo na transição G1-S em células HeLa (Kaltschmidt et al., 1999). Estudos recentes mostram que a perda de p65 não afeta completamente a atividade de p53 e sim somente a sua habilidade em induzir a apoptose. Contudo a perda dessa resposta sozinha, não é suficiente para levar à progressão tumoral. Assim, é possível que a falha das células sem p65 em formar tumor reflita na retenção de p53 funcionantes, os quais não são afetados pela perda de p65. Isso mostra que a atividade protetora de NF- κ B parece estar balanceada contribuindo assim em outros caminhos de morte celular, como aqueles dirigidos pelo p53 (Ryan et al., 2004).

1.2.2 Processos ligados à angiogênese, invasão e migração

Nos glioblastomas, zonas com hiper celularidade e com áreas de necrose são encontradas. Elas são criadas pela população de células migrando ativamente para fora da região central onde há hipóxia, por causa da trombose intravascular. A hipóxia induz a expressão de um fator chamado de fator induzido por hipóxia (HIF), além de aumentar a atividade de gelatinases que degradam a matriz extracelular (MEC), aumentando a migração em pseudopaliçadas (Brat et al., 2004). Tanto a permeabilidade vascular induzida pelo fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) quanto os fatores de coagulação e a expressão neoplásica aumentada de fatores teciduais contribuem para um estado pró-trombótico favorecendo a trombose intravascular. Além disso, mecanismos pró-trombóticos e vaso-oclusivos poderiam também resultar da apoptose de células endoteliais mediada pela angiopoietina-2 e da regressão vascular (Brat et al., 2004). Outras proteínas são encontradas

altamente expressas nas áreas invasivas do glioblastoma, assim como a angiopoietina-2, a qual é também envolvida na angiogênese e tem um papel importante na indução da infiltração celular através da ativação da metaloprotease-2 (MMP-2) (Hu et al., 2003). Isso possibilita uma alta taxa de reincidência desse tumor.

A invasão das células tumorais no tecido normal é certamente um processo multifatorial, consistindo na interação da célula com a MEC e com células adjacentes, acompanhadas, é claro, de processos bioquímicos que suportam o movimento celular ativo. Sabe-se, no entanto que a mobilidade celular não é um processo exclusivo da progressão do tumor. Vários tipos celulares exibem diversos movimentos ativos durante vários estágios do desenvolvimento embrionário, ou até mesmo as células do sistema imune, por exemplo. Assim sendo, para migrar é necessário que haja uma modificação da forma e da rigidez do corpo da célula, a fim de que ocorra uma interação com a MEC, a qual pode atuar como uma barreira mecânica para as células ou como um substrato durante a migração (Demuth e Berens, 2004).

Para que haja um processo de invasão ou migração celular, são necessárias uma variedade de proteínas regulatórias e sinalizadoras capazes de ordenar estes processos. No entanto, durante a progressão tumoral essas células adquirem um fenótipo altamente invasivo e migratório ocorrido devido uma desregulação ou um desbalanço dessas proteínas. Diversos estudos reportam o impacto de componentes da MEC na migração celular de gliomas, sendo que a Fibronectina, o Colágeno IV, a Tenascina-C e a Vitronectina parecem estimular a migração dessas células *in vitro* (Ohnishi et al., 1997) e a Laminina estimula a migração radial de esferóides de glioma, potencialmente através do aumento da expressão do seu receptor, a integrina $\alpha 3 \beta 1$ (Berens et al., 1994; Tysnes et al., 1996).

Atualmente a Tenascina-C (TN-C) está sendo extensivamente estudada por diversos pesquisadores. Sua expressão está ligada à malignidade dos gliomas (Leins et al., 2003; Mariani et al., 2001) e altas concentrações dessa molécula são encontradas ao redor de vasos hiperplásicos, correlacionando com a angiogênese desses tumores (Zagzag et al., 1995). Mariani et al. (2001), mostraram que a TN-C pode ser produzida pelo tumor, antes mesmo do cérebro normal. Além disso, Kim et al., (2000) demonstraram que a expressão de TN-C é encontrada de forma heterogênea de tumor para tumor em diversos graus, porém a expressão mais pronunciada é detectada em glioblastomas. Sobretudo, a expressão de TN-C nos vasos tumorais, rede tumoral e células tumorais foi mais alta em GBMs do que em astrocitomas de baixo grau. Kim et al. (2000) ainda mostraram que o índice de proliferação se correlaciona com a malignidade histológica e com a expressão de TN-C nos vasos tumorais, sugerindo que

a TN-C pode estar envolvida não só na invasão, migração e angiogênese, mas também na proliferação de tumores astrocíticos (Kim et al., 2000). Um estudo analisando o envolvimento da TN-C na sinalização celular de gliomas revelou que os níveis do receptor de endotelina do tipo A, um receptor acoplado à proteína G com uma potencial função em células de glioma (Ambar e Sokolovsky, 1993), se encontram duas vezes mais elevados nas células T98G de glioblastoma em presença de Fibronectina+TN-C do que em presença de Fibronectina apenas (Ruiz et al., 2004). Além disso, este mesmo estudo revelou uma elevada fosforilação de ERK-1/2 em células cultivadas após 12 e 18 horas em presença da TN-C+Fibronectina em comparação com as células crescendo apenas com Fibronectina sozinha, sugerindo que a ativação de ERK1/2 mediada pela TN-C é um evento que ocorre logo após a adesão celular ao substrato de TN-C+Fibronectina (Ruiz et al., 2004). Adicionalmente, a transcrição de c-Fos apareceu aumentada em aproximadamente 2,5 vezes nas células T98G crescendo em TN-C+Fibronectina por 12 horas em comparação com as células controle contendo apenas Fibronectina (Ruiz et al., 2004). Dessa forma, a transcrição de c-Fos aumentada em presença da TN-C pode ser devido um aumento na sinalização através do receptor de endotelina do tipo A associado a ativação de ERK-MAPK (Ruiz et al., 2004). A TN-C é então capaz de regular positivamente a proliferação celular usando distintos receptores celulares e vias de transdução de sinais. Uma importante observação que se sucede a esses estudos é que anticorpos anti-TN-C são capazes de induzir a regressão de gliomas humanos de baixo e de alto grau, que expressam altos níveis de TN-C estromal (Bigner et al., 1998; Paganelli et al., 1999; Riva et al., 1999).

Até agora, embora a TN-C e a TN-R são ambas expressas pelas células da glia do sistema nervoso central, a TN-C aparece mais cedo no desenvolvimento da glia radial durante a migração neuronal, enquanto que a TN-R é expressa mais tarde durante o desenvolvimento dos oligodendrócitos durante o processo de mielinização (Hagihara et al., 1999). Além disso, a TN-C, a TN-R e o Brevican, uma proteoglicana envolvida na adesão celular ricamente expressa no sistema nervoso central, são coexpressos durante a formação da rede perineuronal (Hagihara et al., 1999). A deposição de TN-C coincide com a expressão de MMPs (Cowan et al., 2000). Isso leva a crer em uma possibilidade de a TN-C ser capaz de induzir a expressão e a atividade de MMPs, que por sua vez é capaz de editar a matriz extracelular preexistente, a fim de providenciar um microambiente modificado do tecido que serve de condução para a motilidade celular, crescimento e sobrevivência e/ ou diferenciação. Além disso, altos níveis de TN-C estão associados a uma elevada fosforilação de proteínas, incluindo a ativação de cinases reguladas por sinalização extracelular 1 e 2 (ERK1 e ERK2) (Merlo, 2003). Baseado

na identificação da TN-C como um potencial antígeno específico de gliomas, anticorpos monoclonais específicos para esta molécula foram preparados com I¹³¹ (Bigner et al., 1995; Kurpad et al., 1995) a fim de direcionar a radiação para o tumor. No entanto, estudos fase II usando este complexo radioativo em pacientes com gliomas resultaram somente em um leve aumento do tempo de sobrevida destes pacientes (Reardon et al., 2002), mostrando novamente a problemática da terapia dos gliomas e a importância de mais estudos ligados a substâncias seletivamente tóxicas para o tumor.

A alta capacidade invasiva das células de glioma é, em parte, determinada pela capacidade proteolítica e especialmente reflete a atividade de duas metaloproteases (MMPs) que degradam a gelatina: MMP-2 e MMP-9 (Kubiatowski et al., 2001). Interessantemente uma alta expressão de nm23 *in vitro* pode modular negativamente a transcrição do gene da MMP-2 de rato e de humano (Cheng et al., 2002), enzima essa altamente expressa no modelo C6 de glioma de rato *in vivo* (Fig. 9). Outros agentes envolvidos no processo de invasão do SNC são proteoglicanos ligantes de Ácido Hialurônico (HA). Os principais são: Agrecan (localizado na substância cinzenta), Versican, Neurocan e o Brevican. Este último é expresso apenas em tumores gliais *in vivo*. Ou seja, mesmo em oligodendrogliomas, meningiomas, e carcinomas de pulmão, colo, mama e metástases do cérebro, não foi detectado sua presença (Goldbrunner et al., 1998).

Sabe-se atualmente que existem duas isoformas da molécula de Brevican, uma delas é secretada pela célula e permanece na matriz extra-celular, recebendo o nome de Brevican secretado. A outra é ancorada na membrana plasmática através de uma ligação com uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e recebe o nome de Brevican GPI (Seidenbecher et al., 1995). Trabalhos demonstram que a molécula de brevican serve como substrato para diversas proteases incluindo a MMP-2 (Zhang et al., 1998; Okada, 2000). Recentemente foi demonstrado que gliomas humanos expressam altas quantidades de ADAMTS-5, uma outra protease que degrada o brevican (Nakada et al., 2005). Assim a alta expressão de brevican e sua clivagem em gliomas estão diretamente relacionado com a invasibilidade do tumor (Nutt et al., 2001). Interessantemente, a expressão do Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) está correlacionada com as metaloproteases MT1-MMP, MMP-2 e MMP-9 (Munaut et al., 2003). Evidências mostram que o crescimento de gliomas é criticamente dependente de angiogênese por causa da necessidade da célula de obter oxigênio e suporte nutricional, ajudando na proliferação, na invasão e na migração das células de glioma. Sobre tudo, a angiogenese consiste na formação de novos vasos a partir dos vasos pré-existentes e sua regulação depende de indutores e inibidores liberados por ambas as células tumorais e

endoteliais (Esquema 7). Em GBMs, o melhor fator pró-angiogênico caracterizado é o VEGF, e sua alta expressão está correlacionada com o fenótipo maligno deste tipo de tumor (Kaur et al, 2004). O VEGF e seus receptores Flt-1/FLT-1 (VEGFR-1) e Flk-1/KDR (VEGFR-2) são então as proteínas mais diretamente envolvidas na resposta angiogênica e representam alvos especiais em numerosos tumores, incluindo gliomas (Ferrara, 2004; Chan et al., 1998). O VEGF é encontrado estreitamente correlacionado com a alta expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX2) em tumores malignos (Perdiki et al., 2007). Para a condução de um processo angiogênico efetivo na tumorigênese, uma estreita regulação da expressão e ativação da metaloprotease de matriz (MMP) também é necessária. E como se sabe, a MMP-2 é a isoforma mais requerida para a invasão e conseqüente angiogênese da maioria dos gliomas (Binder e Berger, 2002; Takahashi et al, 2002). Adicionalmente, a regulação transcricional do VEGF, COX-2 e MMP-2 é sabidamente controlada pelo fator nuclear de transcrição p65/p50 (Nf-kB) (Kaltschmidt et al., 2005; Philip et al., 2004). A produção de VEGF pelas células tumorais e fibroblastos do estroma é estimulada por hipóxia (Hlatky et al., 1994; Shweiki et al., 1992), tendo múltiplos efeitos biológicos incluindo estimulação da proliferação e migração de células endoteliais (Connolly et al., 1989). Já a expressão de Flk-1 é requerida para a mitogenicidade do VEGF (Keyt et al., 1996; Millauer et al., 1994), enquanto que o Flt-1 pode atuar como um regulador negativo da função de VEGF controlando sua disponibilidade (Hiratsuka et al., 1998; Lamszus et al., 2003). As células C6 de glioma de rato formam um tumor com características moleculares e histológicas semelhantes ao GBM humano. Áreas de necrose e células em paliçadas são vistas ao microscópio em ambos os tumores. Assim, o VEGF e seus receptores foram identificados tanto em GBMs como em C6 (Stefanik et al., 2001). Quatro isoformas de VEGF foram encontradas, incluindo o VEGF-A, o qual foi encontrado em níveis 30 vezes maior em GBMs do que em astrocitomas difusos (Lamszus et al., 2003).

Esquema 6. Esquema básico do processo de angiogênese em resposta ao crescimento tumoral. Ver texto para mais detalhes e referências. HIF=Fator induzido por hipóxia; VEGFA-D=Fator de crescimento do endotélio vascular-isoformas A, B, C e D; MEC=matriz extracelular; MMP=metaloprotease de matriz; PDGF=Fator de crescimento derivado de plaquetas.

1.2.2.1 A proteína nm23 e sua relação com a neoplasia

Uma proteína difosfato cinase nucleosídica (NDPK) atualmente conhecida pelo nome nm23 também possui um importante papel no controle das funções celulares em questão, especialmente na regulação de GTP-ases e Proteínas G, visto que sua principal função é de fosforilação do GDP em GTP ou vice-versa. Estudos sobre a interação de moléculas com a nm23 mostram que ela possui uma direta ação sobre receptores de integrinas, interferindo significativamente na adesão celular à matriz extracelular (Fournier et al., 2003). Outro jeito pelo qual nm23 pode modular a migração e adesão celular é através da dinâmica do citoesqueleto. Biggs et al. (1990) e Lombardi et al. (1995) demonstraram que as duas isoformas nm23-H1 e nm23-H2 podem se associar aos microtúbulos, além de favorecer a polimerização da tubulina (Lombardi et al. 1995). Evidências mostram ainda que nm23 pode atuar em processos de transcrição, reparação e recombinação, sendo que nm23-H2 é recrutado para a ativação transcricional de c-myc, um proto-oncogene, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Berberich e Postel, 1995; Ji et al., 1995; Postel et al., 1993). Além disso, nm23 está envolvido na repressão do gene do fator de crescimento derivado de plaquetas A (PDGFA),

que implica no controle da metástase (Ma et al., 2002). NDP cinase α (homóloga à nm23-H2 de humano), a maior isoforma do rato, é altamente expressa nos rins, coração, e músculo esquelético, enquanto que NDP cinase β (homóloga à nm23-H1 de humano) é abundante no cérebro e testículos (Kimura et al., 2000; Shimada et al., 1998). Discretas diferenças funcionais entre as isoformas H1 e H2 de nm23 têm sido descritas, por exemplo, o fato de a isoforma H1 ser a responsável pela inibição de metástase em melanoma de rato, sendo que a H2 não demonstrou essa inibição (Chae et al., 1998). Essa molécula está entre os sete genes supressores de metástases que foram confirmados até hoje (Yoshida et al., 2000).

Níveis reduzidos de nm23 estão ligados com um alto potencial metastático (Ouatas et al., 2003). Células de melanomas de camundongo e carcinoma mamário humano transfectadas com NDP cinase/nm23 levou à uma diminuição da sensibilidade à fatores de crescimento (Leone et al., 1991, 1993) e redução da motilidade celular (Kantor et al., 1993). Alta expressão de nm23, além de inibir metástase *in vivo* e motilidade *in vitro*, resulta numa diminuição da ativação da MAP cinase (Ouatas et al., 2003). Nm23/NDP cinase, independentemente da sua atividade enzimática, pode modular a diferenciação de células PC12 de feocromocitoma, através de seu efeito sobre transcrição de Rb2/p130, uma proteína da família Retinoblastoma (Rb) a qual possui um importante papel em manter o estado diferenciado da célula (Lombardi et al., 2001). Além disso, seu efeito antitumoral e antimetastático têm sido associados com a sua capacidade de inibir a transcrição da enzima COX-2 (Esquema 6). Um estudo mais recente visando entender o mecanismo de ação do Taxol na inibição de metástase em melanomas mostra que a droga causa um aumento da expressão de nm23 e de E-caderina, acompanhado de uma diminuição da expressão do VEGF (Wang et al., 2003) mostrando um envolvimento do nm23 não só na supressão de metástase como na diminuição da angiogênese. O nm23 possui uma habilidade em converter Rac-GDP em Rac-GTP *in vitro*. Essa formação é extremamente baixa quando há uma alta expressão de nm23-H1, demonstrando que essa molécula pode atuar através da inibição de Tiam1, um fator de troca de nucleotídeo específico para Rac1. Ratos deficientes de Tiam1 mostraram um tumor menor e com menos massa que o dos ratos normais (Malliri et al., 2002). Quando nm23 está altamente expresso em células Rat1 de fibroblastos, o número de projeções formadas contendo F-actina para a adesão ao componente da matriz extracelular se encontra reduzido. Sendo assim nm-23-H1 parece regular negativamente Tiam1 e Rac *in vitro* (Kimura et al., 2003). Enquanto isso uma proteína associada ao domínio citoplasmático da integrina (ICAP-1) vem sendo estudada e relacionada com a migração celular. Ela funcionaria como um regulador negativo da adesão celular mediada pela integrina, sob o controle da fosforilação

protéica (Bouvard e Block, 1998). Sendo assim o complexo nm23-H2/ICAP-1 pode participar na polimerização da actina no lamelipódio, e podendo diminuir a atividade de Rac1 (Fournier et al., 2003). Frente à inativação de Rac1, nm23 parece favorecer a construção da adesão focal dependente de RhoA e estabilizar a progressão das células (Fournier et al., 2003). GTPases da família Rho, em geral são associadas à capacidade de induzir a expressão de ciclina D1, mais do que os rearranjos do citoesqueleto (Westwick et al., 1998; Bar-Sagi e Hall, 2000). A adesão à fibronectina leva a ativação de Ras e Rho, e como consequência um aumento nos níveis de ciclina D1 e diminuição dos níveis de p21, promovendo a proliferação celular (Danen et al., 2000; Mettouchi et al., 2001). Altos níveis de Ras ativado (ligado ao GTP) são encontrados em GBMs em comparação com o cérebro normal (Feldkamp et al., 1999; Guha et al., 1997), da mesma forma que grandes quantidades de Ras ativo são encontradas em células da linhagem de astrocitoma (Guha et al., 1997). Vale lembrar que enquanto a célula está migrando, os eventos responsáveis pela proliferação celular se encontram silenciados. Da mesma forma que enquanto a célula está proliferando, os eventos relacionados à migração e invasão é que se encontram silenciados.

Esquema 7. Modelo esquemático da regulação da transcrição da ciclooxigenase-2 (COX2) pelo Nm23β. Nm23β inibe a transcrição de COX-2 através de NF-κB e elementos promotores CRE, que possuem um papel no aumento da carcinogênese e metástase através de vários fatores. Modificado de: Kaul et al., 2006.

1.3 Ácido γ -Linolênico (GLA) e Câncer

Ácidos graxos essenciais (EFAs) são ácidos graxos que não são sintetizados pelo organismo e por isso precisam ser obtidos da dieta. O papel dos EFAs no câncer tem sido extensivamente explorado nas duas últimas décadas e descobriu-se que são seletivamente tóxicos para as células tumorais, efeito esse que é particularmente devido à produção de superóxidos. Existem quatro famílias de ácidos graxos poliinsaturados (ω -9, ω -7, ω -6 e ω -3), nomeados de acordo com a posição da dupla ligação com relação ao grupo metil na porção final das moléculas. Rigorosamente falando, os EFAs incluem somente o ácido linoléico (LA) (ω -6) e o ácido α -linolênico (ALA) (ω -3), pois devem ser obtidos da dieta (Esquema 8). Todos EFAs contém mais que duas duplas ligações (C=C) e são poliinsaturados, o que nos permite chamá-los também de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs).

Esquema 8. Metabolismo dos EFAs. Modificado de: Das, 2004.

Atualmente a ação citotóxica do GLA sobre diversos tipos de células tumorais, em especial sobre as células de glioma já é bem estabelecida, porém o mecanismo molecular pelo qual o GLA age ainda não é bem conhecido. Vale lembrar que a ação de alguns PUFA's depende do tipo de tumor, assim como o estágio em que ele se encontra, atuando assim na modulação de moléculas envolvidas na adesão célula-célula, migração, invasão, proliferação celular e apoptose (Jiang et al., 1998). Sendo que o grau de inibição do crescimento ou perda da viabilidade celular depende do ácido graxo dado, de sua concentração, da densidade celular, e do tipo de célula (Bégin et al., 1986). Posteriormente, Bégin et al. (1988) publicaram um trabalho dizendo que o número de insaturações é de grande importância para o efeito antiproliferativo desses ácidos graxos. E vale acrescentar que o GLA foi o PUFA com maior efeito citotóxico sobre as células tumorais *in vitro* (Bégin et al., 1988). Lembremos,

todavia, que em 1986 Fujiwara et al. (1986) já revelavam que o GLA era capaz de suprimir a proliferação de quatro linhagens de células de neuroblastomas: NCG, GOTO, SK-NDZ, e NKP *in vitro*, sendo que as células GOTO foram as mais sensíveis.

Estudos prévios mostram que a citotoxicidade do GLA é inibida pelo ácido acetil salicílico (AAS) e indometacina, que são inibidores da ciclooxygenase, e ácido caféico (AC), um inibidor da lipoxigenase, sugerindo uma correlação entre o GLA e essas enzimas. Além disso, antioxidantes como a vitamina E (α -tocopherol) e o BHT reduziram a citotoxicidade do GLA, sugerindo um papel dos radicais livres e peróxidos lipídicos no seu mecanismo de ação (Fujiwara et al., 1986).

Células de neuroblastoma e outras células tumorais, quando incubadas com GLA, mostram uma intrigante modificação da membrana na forma de um marcado aumento do GLA, DGLA (ácido dihomogamma-linolênico) e AA (ácido araquidônico), além de uma diminuição de OA (ácido oléico, 18:1) (Fujiwara et al., 1986), em paralelo com uma inibição do crescimento celular, sugerindo que o efeito antitumoral do GLA seria devido à incorporação desse ácido graxo. Bell et al. (1999) estudaram o efeito do GLA sobre a capacidade invasiva das células de glioma crescendo em esferóides do tumor usando gel de colágeno (Bell et al., 1999). Nesse estudo o GLA aumentou a apoptose, diminuiu a proliferação e a invasão do tumor e impediu o crescimento celular no esferóide. Além disso, o GLA aumentou a geração de radicais livres nas células de glioma indicando que esse aumento poderia ser o responsável pela apoptose gerada nessas células tumorais (Bell et al., 1999; Mainou-Fowler et al., 2001). Contudo, Spector et al. (1987), sendo confirmados por outros pesquisadores em trabalhos mais atuais, notaram que mudanças na composição lipídica da membrana podem afetar a estrutura da membrana e a sua fluidez assim como a transdução de sinais mediados pelos lipídios, e o grau de peroxidação lipídica nas membranas celulares (Spector et al., 1987; Clandinin et al., 1991; Hulbert, 2005). Conseqüentemente, essas alterações podem resultar em mudanças funcionais na ligação de proteínas específicas na membrana, já que sua mobilidade lateral, conformação e interação com outros componentes podem ser alteradas.

Proteínas com papel na sinalização, presentes nas membranas celulares são comumente reguladas por certo tropismo. Essas proteínas, como as pequenas GTPases como Ras, família de proteínas tirosina cinase Src, fator de mudança do nucleotídeo guanina relacionado ao Ras, CTP (fosfocolina citidililtransferase), Proteína cinase C (PKC), fosfolipase C (PLC), várias proteínas relacionadas à matriz extracelular e o citoesqueleto, podem ser reguladas por lipídeos específicos (Dowhan et al., 2004). Fosfolipídeos de

membrana, especialmente ácidos graxos insaturados, podem regular a atividade *in vitro* de algumas proteínas ligantes de DNA com o qual elas interagem regulando a replicação do DNA, transcrição e recombinação de proteínas (Sekimizu et al., 1994). Um aumento de ácidos graxos insaturados na membrana nuclear, resultando em mudanças na sua fluidez, pode afetar a fosforilação, e conseqüentemente a atividade e função de enzimas associadas à membrana nuclear envolvidas no transporte de RNA (Tomassoni et al., 1999). Sekimizu et al. (1994) viram que os lipídeos podem influenciar na carcinogênese em nível de membrana através da modulação da junção que medeia a comunicação intercelular (GJIC). A reduzida GJIC no tumor está associada à excessiva proliferação, aumento da motilidade celular, invasão e metástase (Sekimizu et al., 1994). Ácidos graxos poliinsaturados ω -6 têm sido descritos na inibição de certas comunicações celulares em modelos de câncer de mama experimental (Sekimizu et al., 1994), onde GLA tem se mostrado um inibidor da adesão *in vitro* de células de câncer de mama e de colo humano ao endotélio parcialmente através do aumento da GJIC (Jiang et al., 1997). Assim, mudanças nas propriedades físicoquímicas da membrana podem afetar a produção e a composição de moléculas bioativas geradas pelos lipídios de membrana, assim como trifosfato de inositol, diacilglicerol, ácidos graxos livres e ácido fosfatídico, pela ação das fosfolipases A2, C e D. Essas moléculas têm um importante papel como segundos mensageiros ou como moduladores na sinalização intracelular e, conseqüentemente, essas mudanças irão afetar a expressão gênica e a função celular (Sumida et al., 1993; Jump, 2004).

A inibição da produção de prostaglandina E2 (PGE2), juntamente com a inativação da cascata de ERK, também têm sido propostos para o efeito supressivo de altas quantidades do ácido oléico sobre a tumorigênese de pulmão induzida quimicamente em camundongo (Yamaki et al., 2002). Recentemente, já se têm indícios de que os ácidos graxos podem também influenciar receptores de membrana envolvidos na sinalização mitogênica (Escrich et al., 2007). No entanto, esses efeitos nessas proteínas, independente daquelas derivadas das mudanças na estrutura das membranas celulares mencionadas anteriormente, não são bem conhecidas.

O efeito dos ácidos graxos ou seus metabólitos podem estar diretamente relacionados com a ligação de vários receptores nucleares (PPAR, LXR, RXR, HNF-4a) ativando sua ação de fator de transcrição, ou indiretamente mediados como resultados de mudanças na abundância de fatores de transcrição regulatórios (SREBP-1c, NF-kB, c/EBP β , HIF-1 α) (Escrich et al., 2007). Como exemplo disso, um estudo importante revelou que o GLA exerce seu efeito através do PPAR- γ , ou seja, inibindo esse receptor o GLA perde sua ação antitumoral sobre células de câncer de mama (Jiang et al., 2000). Através da ativação do

PPAR γ verificou-se a inibição do crescimento celular e indução da expressão de proteínas pró-apoptóticas como Bax e Bad, levando à morte de células de glioma humano (U87 e A172), sendo que as células primárias de astrócitos tratadas com o agonista desse PPAR não sofreram indução à morte celular (Zander et al., 2002). Esse pode ser um possível mecanismo pelo qual o GLA é altamente seletivo para as células de glioma e não para os astrócitos normais (Vartak et al., 1998).

Encontra-se na literatura que altas quantidades de óleo de oliva, o qual possui alta concentração de ácido oléico, na dieta tem uma tendência em diminuir os níveis de RNA mensageiro de c-erbB2/neu e os níveis de proteína de p185ErbB2/Neu, enquanto que uma alta quantidade de óleo de milho não modifica a expressão desse receptor (Escrich et al., 2006; Moral et al., 2003). Menendez et al. (2005) viram que o GLA também é capaz de afetar a atividade transcricional de Her-2/neu (erbB-2) (Menendez et al., 2005), possivelmente através de um mecanismo dependente de prostaglandina E2, uma vez que a mesma é capaz de regular o oncogene HER-2 (Benoit et al., 2004). Interessantemente, Jiang et al. (1998) analisaram a expressão gênica de nm23/NDPK após tratamento com o GLA resultando num aumento da expressão de nm23 em células HT115 e MDA MB231, de câncer de cólon e de mama humanos respectivamente, o que levou a uma inibição da invasão dessas células *in vitro* (Jiang et al., 1998). Dessa forma, que dose seria necessária para se usar como tratamento? Obviamente que para cada tipo de tumor deverá ser feito um estudo separadamente para sanarmos esta dúvida. Todavia, em relação aos gliomas encontra-se na literatura que baixas concentrações do GLA (<100 μ M) aumentam a proliferação celular nos gliomas, porém à medida que a concentração deste PUFA é aumentada (>100 μ M), o número de células em apoptose também aumenta e a proliferação começa a diminuir (Leaver et al., 2002a; Bell et al., 1999). Isso posto, pode-se concluir que seu efeito citotóxico se deve a altas concentrações desse ácido graxo. Posteriormente, Leaver et al. (2002) em uma análise *in vivo*, verificaram uma diminuição da proliferação celular e um aumento de células C6 em apoptose quando tratadas com 2mM de GLA infundido a 1 μ l/h por sete dias (Leaver et al., 2002b).

Um trabalho recente elaborado em nosso laboratório mostrou que tratamentos em longo prazo *in vitro* com GLA nas células C6 de glioma de rato em cultivo, apresentaram uma forte inibição da migração, da ordem de 30% (Ramos e Colquhoun, 2003). Estudos prévios revelaram ainda que a injeção intratumoral de 1mg de GLA em pacientes que tiveram uma recorrência do glioma causou uma regressão do tumor (Naidu et al., 1992). Encorajados por este resultado, Das et al., administraram injeções diárias de GLA em pacientes com gliomas (Das et al., 1995). O tratamento foi capaz de induzir a necrose e a degeneração do tumor sem

oferecer nenhum tipo de toxicidade aos pacientes. Sendo que 12 dos 15 pacientes com tumor grau III e IV não necessitaram de neurocirurgia, pois não houve recorrência do tumor na época (Das et al., 1995). É importante mencionar que estudos prévios verificaram que as células normais incorporam menos PUFA's que as células tumorais promovendo uma ação seletiva desses ácidos graxos (Das et al., 1987; Bégin et al., 1986). Contudo, estudos *in vivo* já demonstraram que o tratamento com GLA não afeta as células normais (Das et al., 1995). Comparando a massa tumoral de glioma através de tomografia computadorizada, verificou-se que após o tratamento com GLA o contraste diminui significativamente (Bakshi et al., 2003).

Enquanto isso, para tentar elucidar melhor o mecanismo pelo qual este ácido graxo atua, alguns outros estudos envolvendo o metabolismo de células tumorais foram realizados. A exposição de células Walker 256 ao GLA *in vivo* causou uma diminuição da atividade da hexocinase, uma enzima que se liga na membrana externa da mitocôndria, podendo diminuir a eficiência na síntese de ATP e geração de glicose 6-fosfato, reduzindo potencialmente a taxa de glicólise, alterando o balanço energético e a rapidez com que as células tumorais se dividem (Colquhoun, 2002). Eventos característicos de apoptose também são vistos quando as células W256 são expostas ao GLA e ao ácido eicosapentaenóico (EPA), ocorrendo liberação de citocromo *c* pela mitocôndria, produção aumentada de espécies reativas de oxigênio e um aumento da peroxidação lipídica (Colquhoun e Schumacher, 2001), assim como uma inibição do metabolismo de acil CoA e a modificação da composição, potencial e ultraestrutura da membrana mitocondrial quando essas células são tratadas com GLA *in vivo* (Colquhoun e Schumacher, 2001). Da mesma forma, a formação de espécies reativas de oxigênio encontrou-se aumentada em células de glioma humano, em resposta ao tratamento de ambos os PUFA's: ácido araquidônico (AA) e GLA (Leaver et al., 1999). O efeito do ácido α -linolênico (ALA), ác. Linoléico (LA), EPA e AA na proliferação celular de Caco-2 e HT-29 de carcinoma de cólon também foram estudados, sendo que ALA e LA inibiram a proliferação, enquanto que o EPA e o AA inibiram o crescimento dessas células (Dommels et al., 2003). Um estudo mais recente, que comparou a ação de diversos PUFA's (LA, ALA, GLA, DGLA, AA, EPA e DHA) sobre células normais [de rim de macaco (CV-1), fibroblastos de pele humana (CCD-41-SK), de simianos normais (CV-1 e BSC-1) e de rim canino (MDCK)] e células transformadas [de leucemia (BALB), de câncer de mama humano (ZR-75-1), de leucemia promielocítica (HL-60), de câncer de pulmão humano (A-549), de adenocarcinoma prostático humano (PC-3)] em cultura, constatou que o GLA foi o único que seletivamente matou as células tumorais sem nenhuma ação citotóxica sobre as células normais (Das, 2007). Além disso, o GLA protegeu as células da medula óssea de camundongo dos danos ao DNA

causados pela radiação gama e mais outros compostos químicos também causadores de danos genéticos (Das e Rao, 2006).

Em resumo (Esquema 9), o efeito antitumoral do GLA pode ser em parte devido à produção de peróxidos lipídicos e espécies reativas de oxigênio, mudanças na composição lipídica da mitocôndria, diminuição do potencial da membrana mitocondrial e mudanças no ciclo celular (Dommels et al., 2003; Colquhoun et al., 2001). Além disso, seus produtos de peroxidação e metabólitos podem se ligar à molécula de DNA alterando a expressão gênica de várias oncoproteínas (Jiang et al., 1997; 1998a, b; 2000; Menendez et al., 2004; 2005a; 2005b; Watkins et al., 2005; Pham et al., 2004; Xi et al., 2000).

Esquema 9. Suposto mecanismo de ação dos PUFAs. Esquema mostrando os possíveis mecanismos pelos quais os PUFAs especialmente o ácido γ -linolênico (GLA) podem atuar sobre os diversos tipos de células tumorais já estudados até o momento (ver texto para mais detalhes). Modificado de: Das, 2004.

1.4 Antiinflamatórios Não Esteroidais (AINEs) e o Câncer

Estudos relacionando as enzimas ciclooxigenases e a progressão tumoral mostram que a COX-2 é a isoforma mais expressa na maioria dos tipos de câncer em humanos sendo um dos principais alvos moleculares para o tratamento dos gliomas (Lim et al., 2001; Lim et al., 2002; Shono et al., 2001). Dessa forma, excessiva síntese de prostaglandina E2 (PGE2), mediada pela alta expressão e atividade das ciclooxigenases, especialmente da COX-2, também pode estar relacionada com a neoplasia (Esquema 10). Além disso, agentes quimioterápicos e radioterapia aumentam a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) assim como a da prostaglandina E2 (PGE2) em células de cânceres humanos, aumentando a resistência às terapias convencionais (Telliez et al., 2006). Dessa forma, o uso de antiinflamatórios na terapia adjuvante de diversos tipos de câncer tem sido extensivamente estudado. Inibidores seletivos de COX-2 aumentam a eficácia dos compostos antimetabólitos como 5-fluoruracil ou gencitabina (Mizutani et al., 2002; Chen et al., 2004; Ferrari et al., 2005) e também aumenta a atividade antitumoral do inibidor de topoisomerase 1, CPT-11 (irinotecan) (Trifan et al., 2002). Além disso, inibidores de COX-2 também foram associados a complexos de platina e manifestam efeitos antitumorais aumentados (Altorki et al., 2003; Lin et al., 2005). Todavia, os mecanismos de ação de cada um desses antiinflamatórios sobre os diferentes tipos de tumores ainda são pouco conhecidos.

Esquema 10. Formação da PGE2 e seu papel funcional. Verifica-se no esquema o papel fisiológico e patológico da Prostaglandina E2 (PG-E2), principal metabólito da enzima ciclooxigenase. Modificado de: New, 2004.

Inicialmente, Farrel et al. (1988) em um dos primeiros trabalhos com antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) em gliomas já havia demonstrado o efeito antitumoral que um AINE, no caso o ibuprofeno, é capaz de exercer sobre as células C6 de glioma de rato *in vivo*. E foi constatado que essa droga é capaz de reduzir o peso do tumor alterando o padrão angiogênico do mesmo (Farrel et al., 1988). Posteriormente constatou-se que o uso de AINEs aumentava o efeito citotóxico de agentes quimioterápicos como doxorubicina e vincristina apenas em células T98G de gliomas as quais eram as únicas que expressavam COX-1 (Roller et al., 1999). Todavia, concluiu-se neste trabalho que não havia relação da expressão dessa enzima com o efeito potencializador dos AINEs e sim pela inibição da proteína associada à resistência à múltiplas drogas (Roller et al., 1999). Análises do padrão da vascularização do tumor formado pelas células C6 de glioma *in vivo* revelaram que o ibuprofeno foi capaz de suprimir a formação de vasos peritumorais, além de levar a uma diminuição de VEGF (Altinoz et al., 2001), um efeito já esperado, tendo em vista o trabalho de Farrel et al. (1988). Além disso, outros estudos demonstraram uma superior eficácia do ibuprofeno em relação a outros AINEs, sobretudo usado em células de câncer de próstata humanas (Andrews et al., 2002). Outro AINE, o acetaminofeno, foi capaz de reduzir seletivamente o crescimento de células de glioma e aumentar a sensibilidade das mesmas à radiação *in vitro* (Casper et al.,

2000). Estudos mostram que a PGE₂ é capaz de aumentar a produção do fator de crescimento vascular do endotélio (VEGF) em células de câncer pancreático (PaCa) (Eibl et al., 2003), contribuindo para a angiogênese desse tumor. Essa atuação da PGE₂ nas funções celulares é atribuída à sua ligação com quatro subtipos diferentes de receptores EP (EP1-4) que por sua vez regulam sinais através da alteração dos níveis de cálcio intracelular ou do monofosfato de adenosina cíclico (cAMP). Isso resulta na ativação de uma variedade de cinases que modulam diversas funções celulares (Esquema 11).

Esquema 11. Vias de sinalização PGE₂-receptores EP. A PGE₂ induz o aumento de cálcio intracelular ou o de cAMP quando ela se une com os receptores EP1 ou EP2/4 respectivamente. No entanto, o cAMP intracelular é reduzido quando ela se une com o receptor EP3. O EP4, mas não o EP2, induz a ativação de ERK via sinalização de PI3K. Já o EP2 induz uma forte ativação da adenilato ciclase e conseqüente formação de cAMP aumentando a ativação de PKA. A PGE₂, dessa forma, promove a proliferação de células cancerígenas, angiogênese, inibe a apoptose e induz a transcrição gênica da ciclina D1, c-myc e COX2. Modificado de: Dey et al., 2006 e Telliez et al., 2006.

Dessa forma, estudos analisando a atividade desta prostaglandina mostraram um possível caminho intracelular da mesma na indução da síntese de interleucina 6 (IL-6), um importante fator de crescimento celular, além de sugerirem o envolvimento de EP2 e EP4 em células de astrocitoma U373 (Fiebich et al., 2001). No entanto, a estimulação de PGE2 na liberação de IL-6 é independente da interação de PGE2 com EP2 ou da formação de AMP cíclico (Fiebich et al., 2001). Sabe-se também que há um envolvimento das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) na proliferação das células e o envolvimento da proteína cinase C na liberação de IL-6 após estimulação exógena de PGE2. Como visto no esquema 11, a interação da PGE2 a diferentes subtipos de receptores, tais como EP1 e EP4, pode modular a progressão do ciclo celular através da regulação dos níveis de Ca^{2+} intracelular e do cAMP respectivamente. Tanto é que quando a interação da PGE2 com o EP1 é bloqueada, os níveis de ciclina D e E diminuem e as células 3T6 de fibroblastos são estabilizadas em G0/G1, enquanto que, bloqueando a interação com EP4, ocorre uma redução dos níveis de ciclina A e uma estabilização precoce dessas células na fase S (Sanchez e Moreno, 2002). Uma explicação para os baixos níveis de ciclina E seria a redução dos níveis de ciclina D, visto que a transcrição da ciclina E é ativada quando a proteína retinoblastoma (pRb) está hiperfosforilada por complexos ciclina D-CDK4/6 (Sanchez e Moreno, 2002).

Usando-se novamente um antagonista do receptor EP1 em outro trabalho, verificou-se que o mesmo exerce um efeito inibitório no crescimento do glioma, sugerindo que a inibição deste receptor é capaz de gerar uma parada na proliferação celular, enquanto que a ativação de um ou mais dos outros tipos de receptores é que inibe o crescimento do tumor (Matsuo et al., 2004). Embora um agonista de EP4, o misoprostol, não reverteu a inibição do crescimento causada pelo antiinflamatório NS398, ainda é possível que o EP4 tenha um papel no crescimento tumoral de gliomas (Matsuo et al., 2004).

A suplementação de PGE2 nas células de câncer de cólon em cultura causa um aumento da proliferação das células HCA-7, mas não de HCT-166. Mais tarde, Sheng et al. (1998) viram que um inibidor de COX-2 diminuiu a formação de colônias em HCA-7. No entanto essa diminuição é revertida com a suplementação de PGE-2 e analisando esse fato verificou-se que essa suplementação nessas células causa um aumento da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Sheng et al., 1998). Em contrapartida, estudos mostram que a adição exógena de PGE2 nas células de câncer de cólon HT-29, Caco-2, LIM1215 e HCA-7 não estimulam a proliferação das mesmas (Colquhoun et al., 1998; Dommels et al., 2003), suportando a idéia de que a PGE2 não participa sozinha da proliferação celular em adenocarcinoma de cólon.

Estudos com o ácido acetil salicílico (AAS) mostram que o mesmo é capaz de inibir a expressão de bcl-2 em células de câncer de cólon, sem alterar a expressão de Bax, podendo ser uma via pela qual este antiinflamatório é capaz de promover a apoptose nessas células. Além disso, neste mesmo trabalho, viu-se que o AAS foi capaz de elevar a expressão de nm23 nessas células, as quais apresentavam uma expressão fraca ou negativa dessa proteína antes do tratamento, mostrando pela primeira vez que o AAS é capaz de modular a invasão dessas células (Yu et al., 2002). O mesmo ocorre quando células de câncer de mama são expostas à indometacina, ou seja, ocorre um aumento da expressão de nm23 (Natarajan et al., 2002). Outro trabalho também ligando AINEs e invasão, demonstrou que a utilização de um inibidor específico de COX-2, o NS398, leva a uma supressão da invasão das células de carcinoma oral através da diminuição de MMP-2 e CD44 (Kinugasa et al., 2004).

Usando-se o piroxicam, outro inibidor seletivo de COX-2, em células epiteliais malignas e pré-malignas, Ding et al. (2003) demonstraram uma inibição do crescimento através da redução dos níveis de ciclinas e da proteína ativadora AP-1, ocasionando uma limitação da progressão das células para a fase S do ciclo celular. Vale ressaltar que a adição de PGE2 não reverteu a ação antitumoral do piroxicam (Ding et al., 2003). Foi constatado que o uso do inibidor seletivo para COX-2 (Celecoxib) causa uma inibição da angiogênese com uma extensa necrose tumoral em gliomas, além de aumentar a resposta à radioterapia (Kang et al., 2007).

Estudos em relação ao mecanismo de ação dessa droga já foram previamente descritos por Grosch et al. (2006), demonstrando que existem mecanismos dependentes e independentes da inibição da COX-2 (Esquema 12), mostrando atuações do celecoxib no bloqueio do ciclo celular, indução à apoptose, inibindo bcl-2 e aumentando os níveis de bax e a inibição da angiogênese, através da inibição de VEGF (Grosch et al., 2006). A utilização de dois inibidores de COX, um específico para COX-2 e outro inespecífico mostrou que os dois causaram uma inibição da proliferação celular sendo o específico bem mais eficiente (Lim et al., 2001). Assim, o uso do inibidor específico da COX-2 (Celecoxib) é capaz de suprimir a ativação de NF- κ B, inibindo a fosforilação de I κ B α e conseqüentemente degradação do mesmo. Outrossim, Celecoxib é capaz de suprimir tanto os fatores nucleares κ B induzíveis como os constitutivos, sem nenhuma especificidade por tipo celular. Os produtos dos genes regulados pelo NF- κ B, tais como COX-2, MMP-9 e ciclina D1 também foram suprimidos pelo Celecoxib (Shishodia e Aggarwal, 2004). Porém, outro estudo concluiu que o efeito antiproliferativo do celecoxib sobre as diferentes células de glioma estudadas é totalmente independente da inibição da COX-2: células que não expressavam COX-2 foram

eficientemente inibidas pela droga, assim como todas as outras que expressavam a enzima; a adição de PGE2 às células tratadas com celecoxib não inibiu o efeito antiproliferativo da droga; e o forte declínio nos níveis de PGE2 em resposta ao tratamento com valdecoxib ou rofecoxib o qual é similar em magnitude com o tratamento com celecoxib, não resultou em uma inibição significativa do crescimento (Kardosh et al., 2004). Neste mesmo trabalho foi mostrado que o celecoxib pode atuar nas células de glioma através da inibição da ciclina A e ciclina B, o que leva a uma diminuição da atividade das CDK (cinases dependentes de ciclina) e subsequente bloqueio do crescimento e proliferação celular (Kardosh et al., 2004).

É interessante mencionar que apesar de o celecoxib causar um aumento de p21 e p27 em algumas células tumorais (Grosch et al., 2001), Kardosh et al. (2004) não encontraram uma correlação dessas proteínas com a ação desse antiinflamatório nas células de glioma analisadas. Isso comprova a hipótese de que nem todos os inibidores de COX possuem um efeito antitumoral significativo e que nem todos atuam pelo mesmo mecanismo nas diferentes células tumorais. Takada et al. (2004), por exemplo, mostraram que os AINEs podem diferir entre si na sua habilidade em suprimir a ativação de NF- κ B, na inibição da COX-2, ciclina D1 e conseqüentemente na inibição da proliferação celular do tumor. Mais adiante Grosch et al. (2006) viram que a PKB, capaz de regular a progressão do ciclo celular através da fosforilação e conseqüente inibição de p21 e p27 também é inibida pelo celecoxib, mostrando mais um mecanismo importante de atuação dessa droga.

A expressão da metaloprotease-2 (MMP-2) depende da ativação da PKB em células de glioblastoma e a inibição da PKB leva a uma inibição da invasão dessas células (Lee et al., 2005). Os níveis de ceramida, uma importante molécula sinalizadora, foram encontrados aumentados após o tratamento com celecoxib em células tumorais de mama, o que provou estar associado com uma parada dessas células na fase G1 do ciclo celular (Kundu et al., 2002). Vale ressaltar que nem sempre os níveis de COX-2 se encontram baixos após o tratamento com Celecoxib. Segundo Kang et al. (2007), os níveis dessa enzima se mostraram elevados após o tratamento em células U87MG de glioma, mas os níveis de PGE2 estavam mais baixos. Isso por causa de uma suposta retro-alimentação negativa, segundo os autores. Em contrapartida, o efeito do rofecoxib sobre a regulação do ciclo celular é de certa forma controversa, pois ele parece atuar apenas em alguns tipos celulares, ao contrário do celecoxib (Grosch et al., 2006). Esses resultados mostram que o mecanismo de ação dessas drogas pode variar, assim como as mudanças morfológicas causadas por estes compostos; respostas em relação à toxicidade dessas drogas; e alteração das respectivas taxas de proliferação celular, síntese de DNA, e índice mitótico (Casper et al., 2000). Todavia, é possível através do

esquema 12 visualizar alguns dos possíveis mecanismos pelos quais esses AINEs são capazes de atuar, dependente ou independentemente da inibição da COX-2.

Esquema 12. Possíveis mecanismos de ação dos AINEs e COXIBs. Verificam-se alguns dos mecanismos já descritos na literatura sobre a ação dos AINEs e COXIBs, especialmente do Celecoxib, dependente e independentemente da inibição da COX-2. Essas drogas podem atuar em diferentes alvos moleculares impedindo a progressão de diversos tipos de tumor, incluindo gliomas. Ver texto para mais detalhes. AA=ácido araquidônico; PKB=proteína cinase B; VEGF= fator de crescimento do endotélio vascular; AKT=proteína cinase B; EGFR= receptor do fator de crescimento epidermal; NF-κB= fator nuclear-κB. COXIBs=inibidores seletivos de COX-2. Modificado de: Grosch et al., 2006 e Mann et al., 2005.

1.5 Compostos de Rutênio e o Câncer

Compostos contendo Rutênio são atualmente conhecidos pelo seu efeito anti-câncer e vêm sofrendo alterações químicas para a síntese de novos complexos baseando-se no átomo

principal que é o Rutênio. Esta vem sendo então complexada com outras moléculas visando obter efeitos antitumorais dos mais diversos, desde lesão no DNA (Bergamo et al., 2003) até a regulação de proteínas envolvidas na migração, invasão, metástase (Bergamo et al., 2002; Sava et al., 1998, 1999) e proliferação celular (Zorzet et al., 2000).

Complexos como trans-imidazoldimetilsulfoxidotetraclororutenato (NAMI-A) têm sido particularmente efetivos em inibir a formação de metástases de pulmão, assim como o crescimento de tumores metastáticos em modelos animais (Sava et al., 1998, 1999). NAMI-A é atualmente uma droga que acabou de completar com sucesso a fase 1 de estudos clínicos no Instituto de Câncer de Amsterdã na Holanda.

O efeito anti-metastático *in vivo* desse complexo está diretamente ligado com a inibição *in vitro* da invasão através da inativação das Metaloproteases (MMPs) 2 e 9 (Bergamo et al., 2002), além de possuir a capacidade de estabilizar as células na fase G2-M do ciclo celular (Zorzet et al., 2000), dificultando os eventos migratórios e invasivos. Outro complexo contendo Rutênio (II) foi analisado, entre outros, sendo reportado que este possui um efeito inibitório do crescimento de células de câncer ovariano (Morris et al., 2001). Enquanto que em outro estudo, oito complexos diferentes (D1-D8) contendo Rutênio foram analisados, observando-se sua ação no ciclo celular e proliferação, sendo que após 72h de incubação todos os compostos reduziram significativamente a viabilidade celular. E os componentes D3 e D7 causaram uma estabilização do ciclo celular (Bergamo et al., 2003).

O NAMI-A também é capaz de atuar sobre a proliferação celular mostrando uma ação inibitória da ativação de ERK1/2 e da expressão gênica de c-myc, uma proteína reguladora da transcrição de moléculas importantes envolvidas no ciclo celular (Pintus et al., 2002). Estudos pré-clínicos com outros compostos como o indazolio bis-indazoltetraclororutenato (KP1019) mostraram atividades promissoras diante de tumores colorretais (Hartinger et al., 2006). O RM175 pertence a uma outra família de compostos contendo rutênio sintetizado com o princípio de se obter interações no DNA mais fortes devido ao seu efeito bifuncional pelo fato de se intercalar convencionalmente ao nitrogênio do DNA, ocorrendo uma distorção dessa molécula e resultando na formação de aductos de DNA, o que leva a uma desestabilização termodinâmica com conseqüentes efeitos biológicos (Novakova et al., 2005). Um estudo interessante sobre o mecanismo de ação do RM175 sobre células tumorais HCT116 de câncer colorretal, mostrou que ele é capaz de aumentar os níveis de p53, p21 e bax dessas células, levando assim a uma parada do ciclo celular e conseqüente apoptose (Hayward et al., 2005).

O efeito antiinvasivo do NAMI-A sobre as células tumorais pode ser descrito através de sua interação com integrinas e particularmente com sua capacidade de ativar integrinas

beta-1, que são importantes no fenômeno invasivo (Frausin et al., 2005). Além disso, como já dito NAMI-A pode não só inibir a ativação de MMP-2 e 9 como também é capaz de se ligar ao colágeno IV, molécula relacionada à invasão de células tumorais (Sava et al., 2003). Um outro mecanismo recentemente proposto seria de que NAMI-A é capaz de inibir a proteína cinase C (PKC), uma importante enzima ligada à ativação da transcrição mediada por c-myc, c-jun e c-fos, além de ativar o remodelamento do citoesqueleto (Dyson e Sava, 2006). Outro composto de rutênio (1-OH) mostrou uma atividade inibitória da enzima GSK-3 cinase, que está intimamente ligada à proliferação e sobrevivência celular de alguns tumores como o de pâncreas através da sua influência sobre a transcrição gênica mediada pelo NF-kB (Williams et al., 2005; Ougolkov et al., 2005).

Como vimos até agora, compostos contendo rutênio têm sido bastante empregados na pesquisa experimental atual, o que levou certos pesquisadores a revisarem a síntese, propriedades físicas e aplicações do rutênio dimérico tetracarboxilado (Aquino, 1998, 2004). Embora o potencial antitumoral de compostos como $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4\text{Cl}]$ ($\text{R} = \text{CH}_3$ ou CH_3CH_2) tenha sido reportado por Keppler et al. (1990) e Berger et al. (1989), alguns anos atrás, estudos visando aplicações potenciais para o dirutênio tetracarboxilado (Fig. 1) receberam pouca atenção (Van Rensburg et al., 2002; Andrade et al., 2000). Uma série de complexos $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4\text{L}_2]\text{PF}_6$, com $\text{L} =$ imidazol, 1-metilimidazol e água quando $\text{R} = \text{CH}_3$; $\text{L} =$ etanol quando $\text{R} = \text{Fc}$ (ferrocenil) ou $\text{Fc}-\text{CH}=\text{CH}-$; e compostos $\text{M}_3[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$, com $\text{M} = \text{Na}^+$ quando $\text{R} = m\text{-C}_6\text{H}_4\text{SO}_3^-$ e $\text{M} = \text{K}^+$ quando $\text{R} = p\text{-C}_6\text{H}_4\text{SO}_3^-$, tem sido testados para citotoxicidade para células HeLa e para as células de câncer humano resistente à múltiplas drogas CoLo 320DM (Van Rensburg et al., 2002). Em particular nós estamos interessados no estudo de complexos com ligação metal-metal dos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) (Andrade et al., 2000; Cotton e de Oliveria Silva, 1996). Como já visto, a classe popular amplamente utilizada dos AINEs é bem conhecida devida suas propriedades antiinflamatórias, mas recentemente tem atraído bastante atenção principalmente por causa do seu efeito quimiopreventivo em uma variedade de tumores (Thun et al., 2002). Relata-se neste trabalho estudos utilizando os complexos dirutênicos contendo AINEs (Fig. 2), investigando suas propriedades antitumorais sobre a linhagem de células C6 de glioma de rato (usada como modelo de GBM).

Figura 1. Estrutura geral dos compostos dirutênicos. Onde R = AINE. Extraído de: Ribeiro et al., 2008.

Figura 2. Estruturas moleculares dos AINEs. Ibuprofeno - Hibp (ácido α -metil-4-(isobutil) fenilacético), Aspirina – Hasp (2-(ácido acetiloxi) benzóico), Naproxeno - Hnpx (ácido 2-(6-metóxi-2-naftil) propanóico), e Indometacina - Hind (ácido [1-(4-clorobenzoil)-5-metóxi-2-metil-1H-indol-3-il] acético). Extraído de: Ribeiro et al., 2008.

2 OBJETIVOS

Os gliomas são caracterizados pela sua resistência à radioterapia e quimioterapia convencionais, além de serem caracterizados pelo seu rápido crescimento associado à mortalidade e pela diversidade de células malignas, que requerem agentes terapêuticos com múltiplos mecanismos de ação e se possível favorável interação com os modos de terapia atuais. Essas características são exibidas por certos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) de cadeia longa, incluindo o ácido γ -linolênico (GLA). Assim, a principal proposta deste projeto foi entender melhor o mecanismo de ação desse ácido graxo. Contudo, a ação de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) complexados com Rutênio também foi estudada sobre as células C6 de glioma de rato, a fim de verificar se este último potencializaria a ação dos AINEs. Dessa forma, sendo constatado que o Ru-Ibp foi uma das substâncias que apresentou uma significativa inibição da proliferação celular, decidiu-se também estudar o seu mecanismo de ação. Assim sendo, para as análises, tanto do GLA quanto do Ru-Ibp, a expressão de importantes proteínas envolvidas nos diversos processos celulares como o controle do ciclo celular, apoptose, invasão, migração e angiogênese, foi observada. Proteínas, essas que foram criteriosamente selecionadas e que fazem parte da progressão dos gliomas (ver introdução).

Sabendo-se que o GLA inibe a proliferação celular *in vitro* e *in vivo*, migração celular *in vitro*, invasão e migração celular *in vivo*, pretendeu-se analisar a expressão de proteínas envolvidas nestes processos após o tratamento com esse ácido graxo, a fim de conhecer o mecanismo de ação desse PUFA.

Sabendo-se também que os AINEs inibem a ciclooxigenase-2 (COX-2), enzima essa responsável pelo metabolismo das prostaglandinas (PGs), pretendeu-se saber se essas drogas possuíam algum efeito sobre a proliferação das células C6 *in vitro*. Além disso, resolveu-se estudar a ação dessas mesmas drogas, todavia complexadas quimicamente com um composto dirutênico (rever Figura 1), a fim de saber se haveria uma suposta potencialização do provável efeito antiproliferativo dos AINEs *in vitro*.

Em resumo, o foco do presente trabalho foi o de conhecer melhor o mecanismo de ação do GLA, além de verificar se os AINEs e seus respectivos complexos dirutênicos mostravam alguma ação sobre as células C6 de glioma de rato.

Sendo assim, a expressão das seguintes proteínas foi analisada:

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo de Células

As células da linhagem C6 de glioma de rato foram cultivadas em DMEM (meio de cultivo) suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 50 U/ml, estreptomicina 50 µg/ml). Os frascos de cultura foram mantidos em estufas de incubação contendo atmosfera úmida (5% de CO₂ e 95% de ar), a 37° C, até atingirem a fase exponencial de crescimento. Quando tratadas, as células recebiam o ácido γ-linolênico (150 µM) complexado com 10% de albumina; os AINEs Ibuprofeno, Aspirina, Naproxeno, Indometacina e seus respectivos complexos Rutênio-Ibuprofeno, Rutênio-Aspirina, Rutênio-Indometacina, Rutênio-Naproxeno, além do Rutênio sozinho (sem estar complexado com outra droga), todos na dose de 100 µM. O veículo usado foi etanol ou DMSO. Assim, as células controle do GLA recebiam somente 10% de albumina e as células controle das demais drogas recebiam somente o etanol ou DMSO.

3.2 Ensaio Colorimétrico de MTT

A metodologia básica foi: crescimento das células por 24 horas em 96 poços (cada um contendo 200 µL de meio e $1-2 \times 10^4$ cél.). Colocou-se então o tratamento, permanecendo de 24-72 horas. Adicionou-se 10 µL de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio brometo] permanecendo por 2-4 horas. Tirou-se o meio e então, colocou-se 100 µL de solução 0,04M HCl diluída em isopropanol que permaneceu por 5 minutos em temperatura ambiente. Por fim, levou-se ao espectrofotômetro e realizou-se a leitura em 595 nm.

3.3 Contagem de Células e Viabilidade Celular

Crescimento de células por 24h em 24 poços (cada um contendo 1ml de meio e $1-2 \times 10^5$ cél.). Colocou-se então o tratamento, permanecendo de 24-72 horas. Retirou-se o meio e adicionou-se solução de PBS (solução tampão de fosfato) contendo Tripsina 0,025%/EDTA 0,02% para soltar as células da placa. Adicionou-se solução de Trypan Blue e colocou-se na

Câmara de Neubauer para a contagem de células viáveis (brancas) e não viáveis (roxas - com Trypan Blue incorporado).

3.4 FACS

Depois da exposição ao tratamento, as células foram expostas às sondas rodamina 123 (10 µg/ml in PBS, pH 7.2) e dihidroetídio (1 µg/ml) na estufa por 30 minutos a 37° C. Usando-se tripsina, as células foram então coletadas, centrifugadas, lavadas (x4) e ressuspensas em PBS, pH 7.2. As células foram então mantidas no gelo e no escuro até serem levadas para medir os níveis de fluorescência em um Beckton Dickinson FACSTAR^{PLUS}.

3.5 Implantação das Células C6 em Ratos

Foram implantadas 5×10^5 células da linhagem C6 no encéfalo do rato macho adulto, Wistar. As coordenadas estereotáxicas utilizadas foram baseadas em estudos prévios disponíveis na literatura e foram as seguintes: antero-posterior +0,48 mm (Bregma); médio-lateral 3mm e, dorso-ventral 5,4 mm. Os animais foram anestesiados utilizando-se uma mistura de 1:1 de quetamina (1g/10 ml) e 2-(2,6 xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (2%). O procedimento já teve aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (processo nº 190/2002) e foi realizado pela nossa orientadora Profa. Dra. Alison Colquhoun. Após duas semanas para estabelecer o tumor e para o animal se recuperar da cirurgia, a bomba osmótica foi implantada subcutaneamente na região dorsal do animal, com a cânula colocada no local do tumor, seguindo a metodologia da empresa fornecedora da bomba, Alzet. Os animais foram então mantidos por mais duas semanas, sob tratamento contínuo (GLA 5 mM – taxa de infusão de 0,5 µL/h) dado o funcionamento da bomba, até a hora da morte, 28 dias pós-implante do tumor.

3.6 Coleta do Tumor e do Contra-Lateral

Através de um microscópio cirúrgico foram resseccionados o tumor (células C6 que foram injetadas no striatum e cresceram durante 28 dias) e o contra-lateral (região do cérebro

localizada no hemisfério oposto ao tumor). Ambos os fragmentos de tecido foram imediatamente colocados em um tubo especial para extração do RNA total e em seguida mergulhados no nitrogênio líquido para melhor conservação do material.

3.7 RT-PCR

A metodologia básica de RT-PCR foi a extração total do RNA com Trizol, clorofórmio e álcool isopropílico, com a pureza do RNA sendo confirmada pela razão de absorbância no espectrofotômetro $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, entre 1,8 - 2,0. A transcrição reversa (RT) foi feita com MMLV-transcriptase reversa usando aproximadamente 1 µg de RNA de interesse. Um protocolo adequado para amplificar bem o cDNA foi previamente determinado, sendo 21° C por 10', 42° C por 50' e, 99° C por 10', que funcionou bem para os experimentos realizados. A amplificação foi confirmada pela eletroforese em gel de 1% de agarose contendo brometo de etídio sendo o produto visualizado com um sistema de captura UV. O método de PCR foi feito com Platinum *Taq* DNA polimerase e oligonucleotídeos sense e antisense de interesse (Anexo C), além de um gene controle que não modifica sua expressão nas condições do experimento, por exemplo, a Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH), que produz um fragmento de 306 pares de bases (pb). Obviamente o protocolo de PCR foi padronizado para cada gene de interesse, sendo que utilizamos 94° C por 1' (para liberação da enzima *Taq* do seu anticorpo) para posterior entrada no ciclo: 94° C por 1', 1' na temperatura de anelamento calculado para os oligos usados e 72° C por 1'. Foram feitos 44 ciclos para determinar a faixa linear de produção do produto de amplificação confirmada pelo gel de agarose com amostras retiradas a cada dois ciclos. A análise semiquantitativa do produto foi feita usando o sistema de imagem Molecular Dynamics Typhoon 8600 Variable Mode Imager, disponível em nossa sala de multi-usuários. Todos os dados obtidos estão apresentados como média ± erro padrão (SE). Os resultados foram submetidos a análises de variância seguida de t-teste não pareado para comparar a expressão gênica entre células tratadas e não tratadas. As diferenças foram consideradas significantes com $p < 0,05$.

3.8 Western Blotting

Estudos com Western Blotting foram feitos segundo a metodologia já existente em nosso laboratório, onde amostras de proteínas são submetidas a SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) – gel de separação – contendo 7,5-12% acrilamida. O sistema tampão foi Tris/Glicina contendo 1% SDS (Dodecil Sulfato de Sódio). As proteínas separadas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose no tampão Tris/Glicina contendo 20% de metanol 60 Vol. por 2 horas em um refrigerador. A membrana é bloqueada em água destilada contendo 1% de albumina por 1h para saturar os lugares inespecíficos da membrana. A membrana permanece então incubada a noite toda em temperatura ambiente com um anticorpo policlonal específico primário (de coelho). As membranas são, então, lavadas com TBST (10mM Tris-Cl (pH 8.0), 150 mM NaCl, e 0,05% Tween 20) (3x/5 min.) e então incubadas por 2 horas com anticorpo secundário anti-coelho IgG conjugado com Alexa 488 ou HRP (Horse Radish Peroxidase) (diluição 1:1000) em TBST. Depois de lavar, a ligação com o anticorpo pode ser vista por um sistema de imagem (Molecular Dynamics Typhoon 8600 Variable Mode Imager) ou DAB (3,3 diaminobenzidina). Um processo não agressivo de retirada dos sinais (bandas) da membrana foi realizado, a fim de se obter os sinais da proteína GAPDH usada como controle interno. Para tal procedimento foi usado um tampão com pH 2,2 (glicina 0,2 M, SDS 3,5 mM e 1% de tween). As membranas foram então lavadas três vezes com essa solução por 10 minutos cada. Em seguida, mais três lavagens usando uma solução de PBS 1x (NaCl 0,14 M, Na₂HPO₄ 10 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM) foram realizadas por mais 10 minutos cada e finalmente mais três lavagens com TBST por 5 minutos cada foram realizadas. Depois disso, a membrana é então, bloqueada, reincubada com os anticorpos primário e secundário e em seguida revelada como descrito anteriormente. O processo de retirada dos sinais, citado a cima, também foi realizado para algumas membranas que já haviam sido reincubadas com o GAPDH, pois ainda havia mais proteínas a serem analisadas.

3.9 Análise dos Dados

Todos os dados obtidos estão apresentados como média $\pm$ erro padrão (SE). Os resultados foram submetidos a análises de variância seguida de t-teste não pareado ou one-Way ANOVA. As diferenças foram consideradas significantes com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Ensaios de MTT *in vitro*

O efeito dos quatro AINEs e seus correspondentes complexos Ru-AINEs foram investigados sobre as células C6 de glioma de rato. Experimentos iniciais usando 1 ou 10 μM não demonstraram nenhum efeito de nenhuma droga nessas células, enquanto que em 100 μM as drogas começaram a mostrar algum efeito inibitório (Anexo B). Experimentos com 1 mM foram descartados, uma vez que a alta concentração do veículo (DMSO ou etanol) foi citotóxico para as células (resultados não mostrados). Experimentos adicionais foram então realizados com 100 μM , mostrando que várias drogas são capazes de inibir a proliferação das células C6 após 24 horas de tratamento (Tabela 1). As porcentagens em relação ao controle do MTT foram: $85,9 \pm 6,2$ para a Indometacina, $82,7 \pm 3,4$ para o Naproxeno, $95,6 \pm 4,6$ para a Aspirina, $77,4 \pm 5,9$ para o Ru-Ibp, $72,1 \pm 5,5$ para o Ru-Npx, $96,3 \pm 7,8$ para o Ru-Asp e $93,1 \pm 6,2$ para o Ru-Ind.

Tabela 1. Dados do Ensaio de MTT *in vitro*

Composto	C6
Ru-Ibp	$77,4 \pm 5,9^a$
Ibuprofeno	$94,2 \pm 5,3$
Ru-Asp	$96,3 \pm 7,8$
Aspirina	$95,6 \pm 4,6$
Ru-Npx	$72,1 \pm 5,5^a$
Naproxeno	$82,7 \pm 3,4^b$
Ru-Ind	$93,1 \pm 6,2$
Indometacina	$85,9 \pm 6,2^b$

NOTA: Os dados estão expressos como porcentagem da densidade óptica das células controle $\pm$ SEM (erro padrão). Dados representativos de dois experimentos separados com $n=9-12$. Os antiinflamatórios não esteróides e seus respectivos complexos de rutênio (Ru) foram colocadas na concentração final de 100 μM . A análise estatística usada foi Tukey - 1-way ANOVA. ^a $p<0,001$; ^b $p<0,01$.

4.2 Ensaios de proliferação celular *in vitro* usando compostos dirutênicos contendo antiinflamatórios não-esteróides (AINEs)

A fim de melhorar a confiabilidade dos dados de MTT, experimentos adicionais para o Hibp, Hnpx e seus correspondentes complexos dirutênicos foram realizados usando métodos de contagem direta de células e de viabilidade celular analisado pelo método de exclusão com azul de tripan. Esses experimentos envolveram a cultura das células C6 na presença de rutênio sozinho, ibuprofeno, naproxeno e seus respectivos complexos por 24, 48 ou 72 horas (Tabela 2). Um ligeiro efeito inibitório foi encontrado com os complexos Ru-Ibp e Ru-Npx após 24 horas de tratamento, porém não foi significativo quando comparado aos obtidos pelo, menos exato, ensaio de MTT. Interessantemente, a inibição é perdida em 48 horas, mas retorna fortemente significativa em 72 horas de tratamento. Em contraste, o composto que chamamos de rutênio sozinho não exibiu efeito inibitório após as 72 horas de tratamento. Esses dados sugerem que os efeitos do Ru-Ibp e do Ru-Npx são dependentes do tempo e envolvem exposição cumulativa das células ao complexo para se tornar mais antiproliferativo. Além disso, os resultados também mostram que tanto o Ibuprofeno como o Naproxeno, quando complexados ao Rutênio, parecem exercer um efeito maior sobre a proliferação dessas células, mostrando que o Rutênio potencializa a ação antiproliferativa desses AINEs. É importante notar que nenhum desses efeitos envolveu citotoxicidade direta como demonstrado pela larga porcentagem de células que mantiveram sua capacidade de excluir o azul de tripan. Como exemplo, viu-se que a viabilidade celular em 72 horas foi: $98,5 \pm 0,7\%$ para Ru-Ibp; $100 \pm 0,1\%$ para Ru-Npx; e $99,1 \pm 0,5\%$ para o controle (Tabela 3). Também digno de nota foi o efeito inibitório ocorrido após 72 horas de exposição ao Ibuprofeno sozinho. Considerando que essas células não expressam a enzima ciclooxygenase-2 (COX2) em condições normais de cultivo (Fig. 7), esses efeitos devem ser através de um mecanismo independente de COX2.

Tabela 2. Contagem do Número de Células *in vitro*

Composto	24h	48h	72h
Rutênio	89,4 ± 4,8	96,2 ± 2,8	93,7 ± 2,4
Ru-Ibp	85,5 ± 4,4	99,1 ± 5,7	50,6 ± 1,6 ^{a,b,c}
Ibuprofeno	100 ± 3,2	89,8 ± 2,2	74,6 ± 1,7 ^a
Ru-Npx	88,6 ± 2,0	80,7 ± 6,4	53,2 ± 3,5 ^{a,b,c}
Naproxeno	95,6 ± 6,6	81,7 ± 9,5	82,9 ± 2,7 ^a

NOTA: Os dados estão expressos como porcentagem do número células controle ± SEM (erro padrão). Dados representativos de três experimentos separados com n=4. As drogas foram colocadas na concentração final de 100µM. A análise estatística usada foi Tukey - 1-way ANOVA, p<0,05; ^aversus controle; ^bversus ibuprofeno; ^cversus naproxeno.

Tabela 3. Viabilidade celular *in vitro*

Compostos	24h	48h	72h
Controle	99,5 ± 0,25	99,4 ± 0,39	99,1 ± 0,52
Rutênio	99,9 ± 0,33	98,5 ± 0,72	98,0 ± 0,41
Ru-Ibp	99,8 ± 0,13	98,2 ± 1,10	98,5 ± 0,73
Ibuprofeno	99,8 ± 0,11	98,6 ± 0,86	98,4 ± 1,00
Ru-Npx	99,8 ± 0,23	98,2 ± 0,84	100 ± 0,10
Naproxeno	99,5 ± 0,26	98,3 ± 0,83	99,1 ± 0,45

NOTA: Os dados estão expressos como porcentagem da população total de células ± SEM (erro padrão). Dados representativos de três experimentos separados com n=4. As drogas foram colocadas na concentração final de 100µM. As células foram incubadas com azul de tripan para serem contadas na câmara de Neubauer.

4.3 Análises de FACS após tratamento *in vitro* com GLA e Ru-Ibp

A figura 3 apresenta gráficos representativos da ação do GLA sobre o ciclo celular de C6 implicando numa demonstração de que o efeito da exposição ao GLA na concentração de 150 μM é independente de apoptose. Além disso, o GLA demonstrou uma diminuição da população de células na fase S do ciclo celular com um leve aumento nas fases sub-G1 e G1. Já o tratamento com RuIbp (Fig. 4-B) causa uma leve diminuição do pico em M4, que representa a fase G2/M do ciclo celular em relação às células controle (Fig. 4-A). Na análise da granulosidade citoplasmática em SSC, observa-se um ligeiro aumento após o tratamento de 72h com RuIbp ($496,8 \pm 5,8$) em comparação com o controle ($479,9 \pm 5,6$). Alterações no potencial de membrana mitocondrial (PMM) foram analisadas através do marcador rodamina 123. Se o PMM estivesse alterado esse marcador não conseguiria permanecer na mitocôndria, ou ele nem entraria na mesma. Dessa forma as mitocôndrias que estivessem com seu PMM alterado não iriam fluorescer. A partir daí, viu-se que após o tratamento com RuIbp o pico em M2 no canal FL1-H tem uma queda (Fig. 6) em relação ao controle (Fig. 5), ou seja, tem menos mitocôndria fluorescente após o tratamento, demonstrando uma alteração considerável do PMM. Além disso, usou-se o dihidroetídio para mostrar a liberação de superóxido ou outras espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria. O dihidroetídio é assim então oxidado em etídio, que se liga ao DNA. Dessa forma é possível visualizar o DNA marcado com essa molécula. Todavia, nas células tratadas com RuIbp não se notou nenhuma diferença significativa em relação ao grupo controle (Figuras 6 e 5 respectivamente).

Figura 3. Análise do ciclo celular após tratamento com GLA *in vitro*. Gráficos representativos que comprovam o não surgimento significativo de apoptose após o tratamento com 150 μ M do GLA *in vitro*. **A** = grupo controle; **B** = grupo tratado.

Figura 4. Análise do ciclo celular após tratamento com Ru-Ibp *in vitro*. São mostrados gráficos representativos das análises de FACS após tratamento com Ru-Ibp *in vitro*. **A** = grupo controle; **B** = grupo tratado.

Quad	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	0.00	***	***	***	***
UR	8.30	1304.37	1181.63	31.85	29.84
LL	0.30	6.70	5.60	2.05	1.80
LR	91.40	378.68	296.84	9.74	8.66

Marker	% Total	Mean	Geo Mean
All	100.00	454.40	328.97
M1	11.28	60.76	51.96
M2	88.75	504.31	415.78

Marker	% Total	Mean	Geo Mean
All	100.00	11.55	9.55

Figura 5. Análises de FSC-H *in vitro* (Células controle). Gráficos representativos são demonstrados, onde o gráfico FSC-H mostra a granulosidade citoplasmática, enquanto que o FL1-H e o FL3-H mostram a dupla marcação feita para a mitocôndria e para a liberação de superóxidos respectivamente.

Quad	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	0.00	***	***	***	***
UR	3.64	958.44	838.59	28.42	27.73
LL	1.28	6.50	5.90	1.65	1.49
LR	95.08	312.04	233.73	8.33	7.25

Marker	% Total	Mean	Geo Mean
All	100.00	331.66	233.59
M1	16.11	51.20	40.89
M2	84.09	384.84	325.54

Marker	% Total	Mean	Geo Mean
All	100.00	8.98	7.46

Figura 6. Análises de FSC-H após tratamento com Ru-Ibp *in vitro*. Gráficos representativos são demonstrados, onde o FSC-H mostra a granulosidade citoplasmática, enquanto que o FL1-H e o FL3-H mostram a dupla marcação feita para a mitocôndria e para a liberação de superóxidos respectivamente.

4.4 Panorama da expressão gênica das células C6 nas condições *in vitro* e *in vivo*

4.4.1 Comparação in vitro versus in vivo

Antes de começar a tratar as células a fim de conhecer melhor o mecanismo de ação das drogas estudadas realizou-se um experimento para verificar a regulação da expressão gênica nas diferentes condições: em cultivo ou injetadas no cérebro do rato, tendo em mente que nesta última condição podem ser encontrados RNAm de outras células além das células C6. Dessa forma, a partir desse experimento (Fig. 7), foi possível notar diferenças na expressão do RNAm de diversas proteínas. Dentre as proteínas que foram analisadas, destacam-se o Flk-1, a MMP-2, a COX-2, o PPAR- γ e o Brevican Secretado (Brev. Sec.), que se mostraram preferencialmente ou apenas expressas nas condições *in vivo*. Além dessas, a proteína p16 apareceu expressa somente nas condições *in vivo*, reafirmando apenas o que já foi descrito sobre o p16 estar deletado nessas células (Strauss et al., 2002). Em contraste, as proteínas E2F-1, Bax, Bcl-2, nm23- β , c-myc e p53, se mostraram preferencialmente expressas nas células C6 *in vitro*.

Figura 7. Análise comparativa de C6 *in vitro* e *in vivo*. Verifica-se a análise da expressão gênica de proteínas relacionadas ao controle do ciclo celular, angiogênese, invasão e migração nas situações *in vitro* e *in vivo* das células C6 de glioma de rato. Para análise estatística foi usado teste-T de Student. * $p < 0,05$.

Figura 7. Análise comparativa de C6 *in vitro* e *in vivo*. Verifica-se a análise da expressão gênica de proteínas relacionadas ao controle do ciclo celular, angiogênese, invasão e migração nas situações *in vitro* e *in vivo* nas células C6 de glioma de rato. Para análise estatística foi usado teste-T de Student. * $p < 0,05$ (**continuação**).

Figura 7. Análise comparativa de C6 *in vitro* e *in vivo*. Verifica-se a análise da expressão gênica de proteínas relacionadas ao controle do ciclo celular, angiogênese, invasão e migração nas situações *in vitro* e *in vivo* nas células C6 de glioma de rato. Para análise estatística foi usado teste-T de Student. *p<0,05 (**continuação**).

4.4.2 Comparação tecido tumoral versus tecido normal

Quando se resolveu comparar a expressão gênica do tumor em relação ao tecido normal (também chamado de contralateral) constatou-se que diversas proteínas apareceram com seu RNAm superexpressos no tumor, das quais E2F-1, MMP-2, nm23 β , EP1, EP2, EP3, TN-C, PPAR γ , ERK-1, p65, Ku70, Ku80, Flt-1 e Brevican-GPI foram estatisticamente significativas, enquanto que o RNAm do p53 (p=0,07), da COX-2 (p=0,06) e do VEGFA (p=0,06) tiveram apenas uma tendência a serem elevados no tecido tumoral. Interessantemente, o RNAm do p16 só foi detectado no tecido tumoral (Fig. 8).

Figura 8. Comparação Tecido Tumoral versus Tecido Normal. Análise da expressão de E2F-1, pRb, p16, Cyclin D1, Bcl-2, Bax, p53 e p21 no tumor em comparação com o tecido normal. Todas as moléculas foram semiquantificadas usando o controle interno GAPDH (Gliceraldeído 3-Fosfato-Desidrogenase). CL = Contra-lateral ou hemisfério cerebral oposto ao tumor, ou seja, tecido normal; T = Tumor de C6 in vivo; CSF = Fluido Cérebro-espinhal; N=5 para cada grupo. Para análise estatística foi usado teste-T de Student. *p<0,05.

Figura 8. Comparação Tecido Tumoral versus Tecido Normal. Análise da expressão de p27, Metaloprotease-2 (MMP-2) nm23alpha e beta, receptores de prostaglandina E2: EP1, EP2, EP3 e EP4 no tumor em comparação com o tecido normal. Todas as moléculas foram semiquantificadas usando o controle interno GAPDH (Gliceraldeído 3-Fosfato-Desidrogenase). CL = Contra-lateral ou hemisfério cerebral oposto ao tumor, ou seja, tecido normal; T = Tumor de C6 *in vivo*; CSF = Fluido Cérebro-espinal; N=5 para cada grupo. Para análise estatística foi usado teste-T de Student. *p<0,05 (**continuação**).

Figura 8. Comparação Tecido Tumoral versus Tecido Normal. Análise da expressão de Cyclooxygenase-2 (COX-2), Tenascina-C, receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR) – γ , c-myc, ERK-1, p65 (NF- κ B), Ku80 e 70 no tumor em comparação com o tecido normal. Todas as moléculas foram semiquantificadas usando o controle interno GAPDH (Gliceraldeído 3-Fosfato-Desidrogenase). CL = Contralateral ou hemisfério cerebral oposto ao tumor, ou seja, tecido normal; T = Tumor de C6 *in vivo*; CSF = Fluido Cérebro-espinal; N=5 para cada grupo. Para análise estatística foi usado teste-T de Student. *p<0,05 (**continuação**).

Figura 8. Comparação Tecido Tumoral versus Tecido Normal. Análise da expressão do fator de crescimento do endotélio vascular-A (VEGF-A) e seus receptores flt-1 and flk-1, Brevican GPI (Glicosilfosfatidilinositol), Brevican Secretado e Tenascina-R no tumor em comparação com o tecido normal. Todas as moléculas foram semiquantificadas usando o controle interno GAPDH (Gliceraldeído 3-Fosfato-Desidrogenase). CL = Contra-lateral ou hemisfério cerebral oposto ao tumor, ou seja, tecido normal; T = Tumor de C6 *in vivo*; CSF = Fluido Cérebro-espinhal; N=5 para cada grupo. Para análise estatística foi usado teste-T de Student. *p<0,05 (**continuação**).

4.5 Tratamento *in vitro* com GLA

4.5.1 Análise da Expressão do RNAm

Sabendo-se que a ação antiproliferativa do GLA ocorre em 24h de tratamento, cogitou-se então na hipótese de que genes importantes de resposta rápida poderiam responder ao tratamento em horários anteriores aos de 24h, sendo um dos possíveis motivos pelos quais não foram encontradas alterações em algumas proteínas em dois experimentos anteriores, realizados apenas após as 24h de tratamento (resultados não mostrados). Assim sendo, para evitar a perda dessa resposta o experimento a seguir foi realizado de modo que as células foram tiradas do tratamento nos horários de 1, 2, 3, 6, 12 e 24h (Fig. 9).

Dentre as proteínas analisadas, destacam-se: a ciclina D1, a qual sofreu um aumento significativo da expressão do seu RNAm após o tratamento com GLA desde as 3h persistindo até o final (24h) condizendo com os experimentos anteriores; a proteína E2F-1, a qual sofreu uma diminuição significativa dos níveis do seu RNAm apenas em 2h de tratamento, apesar de todos os horários demonstrarem uma notável diminuição (porém não estatisticamente significativa); a molécula de Tenascina-C, que sofreu uma diminuição significativa dos níveis do seu RNAm após 24h de tratamento, apesar de todos os horários demonstrarem também uma notável diminuição (porém não estatisticamente significativa); a molécula nm23- α , que sofreu um aumento dos níveis do seu RNAm em todas as horas de tratamento, porém não foi estatisticamente significativo. Por outro lado, o nm23 β apareceu significativamente aumentado pelo GLA em todos os horários no experimento de curva da expressão gênica (Fig. 9). A presença de 150 μ M do GLA causou também um aumento dos níveis do RNAm do p65 embora tenha sido apenas estatisticamente significativo no período de 3h de tratamento. A expressão do RNAm do p53 foi aumentada desde 2h até 24h de exposição ao GLA.

Vale mencionar que foram analisadas as proteínas p16, PPAR- γ e flk-1 neste experimento, mesmo sabendo através de resultados anteriores que as mesmas não eram expressas *in vitro*, sobretudo para se certificar que o tratamento não influenciaria na expressão do RNAm delas. Assim sendo, verificou-se que realmente essas proteínas não sofrem alteração com o tratamento *in vitro* (resultados não mostrados). Todavia é importante mencionar que a expressão do RNAm do PPAR γ neste experimento dos diferentes horários de tratamento encontrou-se

extremamente variável nas 65 amostras analisadas, não sendo assim possível realizar sua quantificação.

A expressão do RNAm de Rb, p21, p27, Ku70, Ku80, c-myc, ERK1, ERK2 e bcl-2 não sofreu alteração após o tratamento com GLA em nenhum intervalo de tempo estudado. Todavia, a expressão de Bax, interessante, permaneceu elevada e não aumentada no período de 12 e de 24h em relação ao controle, o que nos intrigou pelo fato de sabermos que o GLA não causa apoptose significativa nessa concentração (ver discussão para mais detalhes do seu mecanismo de ação). O GLA não demonstrou nenhum efeito significativo sobre o RNAm da MMP-2 e do Brevican-GPI. As células não expressaram o RNAm de MMP-9, PPAR δ , ou do Brevican-secretado *in vitro* e a exposição ao GLA não alterou o mesmo (resultados não mostrados). O GLA não alterou também a expressão do RNAm de proteínas relacionadas à angiogênese como o VEGF-A e seus receptores Flt-1 e Flk-1. Sendo que este último, como já dito, não é expresso nas condições *in vitro*. Em relação ao RNAm dos receptores da prostaglandina E2 (PGE2), o EP2 não sofreu alteração do seu RNAm após o tratamento. A COX-2 e o receptor EP3 não foram expressos *in vitro* e o GLA não induziu sua expressão. Todavia é importante mencionar que a expressão do RNAm do EP-3 se portou extremamente variável nas 65 amostras analisadas, igualmente ao PPAR γ , não sendo assim possível realizar sua quantificação. Por fim, a exposição das células ao GLA causou um aumento do RNAm dos receptores EP1 e EP4 após 24h de tratamento.

Figura 9. Curva da expressão gênica após tratamento *in vitro* com GLA. Verifica-se a análise da expressão de c-myc, E2F-1, pRb, ciclina D1, p27, p21, p53 e p65 após 1, 2, 3, 6, 12, 24h de tratamento com o ácido γ -linolênico (GLA) *in vitro* na concentração de 150 μ M. Barra lilaz = controle que recebeu albumina a 10%; barra vermelha (bordô) = tratado com GLA. Para análise estatística foi usado teste-T de Student. * $p < 0,05$. Número de amostras (n) = 5, tanto para controle quanto para tratadas.

Figura 9. Curva da expressão gênica após tratamento *in vitro* com GLA. Verifica-se a análise da expressão de Bcl-2, Bax, Ku70, Ku80, ERK1, ERK2, Nm23α e Nm23β após 1, 2, 3, 6, 12, 24h de tratamento com o ácido γ -linolênico (GLA) *in vitro* na concentração de 150 μ M. Barra lilaz = controle que recebeu albumina a 10%; barra vermelha (bordô) = tratado com GLA. Para análise estatística foi usado teste-T de Student. *p<0,05. Número de amostras (n) = 5, tanto para controle quanto para tratadas (**continuação**).

Figura 9. Curva da expressão gênica após tratamento *in vitro* com GLA. Verifica-se a análise da expressão de EP1, EP2, EP4, Brevican GPI, Tenascina-C, MMP2, VEGF-A e Flt-1 após 1, 2, 3, 6, 12, 24h de tratamento com o ácido γ -linolênico (GLA) *in vitro* na concentração de 150 μ M. Barra lilaz = controle que recebeu albumina a 10%; barra vermelha (bordô) = tratado com GLA. Para análise estatística foi usado teste-T de Student. * $p < 0,05$. Número de amostras (n) = 5, tanto para controle quanto para tratadas (continuação).

4.5.2 Análise da Expressão da Proteína

A fim de confirmar os achados em relação à ação do GLA sobre a expressão gênica das diversas proteínas mencionadas acima, prosseguiu-se então com as análises da expressão protéica das mesmas através da técnica de Western Blot (Fig. 10). E o que se constatou é que de todas as proteínas analisadas, apenas a expressão de três delas se mostrou alterada após o tratamento com o GLA. A expressão da proteína E2F1 apareceu significativamente diminuída, condizendo com a análise prévia do RNAm da mesma. Em contraste aos resultados do RNAm, a expressão protéica de Ku80 apareceu intrigantemente diminuída após as 24h de tratamento com GLA.

Por último, ao analisarmos as proteínas Bax 21 e 50kDa, viu-se que ocorre um aumento da expressão dessas proteínas após o tratamento, condizendo com a expressão do RNAm do Bax nas células tratadas, a qual foi mantida elevada nos horários de 12 e 24h (Fig. 9). Foi também verificada a razão Bax/Bcl-2, que também apareceu aumentada nas células tratadas, exceto para o Bax 44kDa (Fig. 11).

Ao contrário da expressão altamente variável do RNAm apresentada pelo PPAR γ no experimento anterior, a expressão protéica do mesmo apareceu em todas as nove amostras analisadas neste experimento. Todavia, não foi demonstrada nenhuma diferença significativa entre as células tratadas e as células controle. Além disso, de forma similar ao PPAR γ , observou-se que a expressão do receptor EP3 se mostrou forte em todas as nove amostras analisadas, mas nenhuma diferença foi observada entre as células controles e as células tratadas (Fig. 10). É importante mencionar também que a análise da expressão protéica de Flt1 e EP1 não mostrou níveis detectáveis dessas moléculas.

Figura 10. Análise da proteína após tratamento *in vitro* com GLA. Verifica-se a análise da expressão de Ku70/80 e Bax após 24h de tratamento com o ácido γ -linolênico (GLA 150 μ M) *in vitro*. N=4 para grupo controle (CTL - 4 primeiras bandas da esquerda) e N=5 para grupo tratado (5 últimas bandas da direita). Para análise estatística foi usado teste-T de Student. *p<0,05. Os valores arbitrários referentes à semi-quantificação das densidades das bandas foram calculados através da respectiva razão proteína/GAPDH.

Figura 10. Análise da proteína após tratamento *in vitro* com GLA. Verifica-se a análise da expressão de Bcl-2, p65, pRb, E2F-1, Ciclina D1, p53, p27 e p21 após 24h de tratamento com o ácido γ -linolênico (GLA 150 μ M) *in vitro*. N=4 para grupo controle (CTL - 4 primeiras bandas da esquerda) e N=5 para grupo tratado (5 últimas bandas da direita). Para análise estatística foi usado teste-T de Student. * $p < 0,05$. Os valores arbitrários referentes à semi-quantificação das densidades das bandas foram calculados através da respectiva razão proteína/GAPDH (**continuação**).

Figura 10. Análise da proteína após tratamento *in vitro* com GLA. Verifica-se a análise da expressão de ERK1/2, c-myc, nm23- α , nm23- β e PPAR γ após 24h de tratamento com o ácido γ -linolênico (GLA 150 μ M) *in vitro*. N=4 para grupo controle (CTL - 4 primeiras bandas da esquerda) e N=5 para grupo tratado (5 últimas bandas da direita). Para análise estatística foi usado teste-T de Student. *p<0,05. Os valores arbitrários referentes à semi-quantificação das densidades das bandas foram calculados através da respectiva razão proteína/GAPDH (**continuação**).

Figura 10. Análise da proteína após tratamento *in vitro* com GLA. Análise da expressão de EP2, EP3, EP4, VEGFA e Tenascina C após 24h de tratamento com o ácido γ -linolênico (GLA 150 μ M) *in vitro*. N=4 para grupo controle (CTL - 4 primeiras bandas da esquerda) e N=5 para grupo tratado (5 últimas bandas da direita). Para análise estatística foi usado teste-T de Student. * $p < 0,05$. Os valores arbitrários referentes à semi-quantificação das densidades das bandas foram calculados através da respectiva razão proteína/GAPDH (**continuação**).

Figura 11. Razão da expressão protéica Bax/Bcl2 após tratamento *in vitro* com GLA.
GLA = ácido gama linolênico; CTL = controle.

4.6 Tratamento *in vivo* com GLA

4.6.1 Análise da Expressão do RNAm

Neste experimento, de um modo geral, foi encontrada uma diminuição da expressão do RNAm de proteínas como o E2F-1, p16, p53, p65, ERK1, PPAR γ , Ku70, Ku80, Bax, nm23 β , MMP-2, VEGF-A, Flt-1, COX-2, EP1, EP2 e o EP3 no grupo tratado (Tumor- Ácido γ -linolênico ou T-GLA). Por outro lado, os níveis do RNAm do Brevican-secretado, da Tenascina R e do Flk-1 apareceram aumentados após o tratamento com GLA (Fig. 12). Interessantemente, todas as proteínas que tiveram os níveis de seu RNAm diminuídos pelo tratamento com o GLA foram as que significativamente tinham seus níveis de RNAm mais elevados no tecido tumoral controle, o qual recebeu líquido céfalo-raquidiano (Tumor-Fluido Cerebrospinal ou T-CSF) em comparação com o tecido normal do hemisfério contra-lateral ao tumor (Contralateral-Fluido Cerebrospinal ou CL-CSF) com exceção da proteína Bax. A Tenascina C (TN-C) e o Brevican-GPI apareceram mais expressos nas amostras tumorais T-CSF em comparação com as amostras de tecido normal CL-CSF, mas o tratamento com GLA não alterou a expressão do seu RNAm. Nenhuma diferença foi encontrada entre T-CSF versus CL-CSF e T-CSF versus T-GLA para o RNAm das proteínas p21, p27, ciclina D1, Rb, c-myc, bcl-2, nm23 α e EP4. É importante notar que nenhuma diferença entre os tecidos normais (CL-CSF versus CL-GLA) foi observada em nenhuma das proteínas analisadas, exceto para o nm23 β e o PPAR γ , cujos níveis de RNAm se mostraram diminuídos no grupo Contralateral-Ácido γ -linolênico ou CL-GLA. Um intrigante resultado mostrou que o RNAm de p16 foi somente expresso pelo tecido tumoral (T-CSF e T-GLA). Isso sugere que outras células presentes nesse microambiente podem estar expressando esta proteína. Além disso, o GLA diminuiu drasticamente a sua expressão. O RNAm da MMP-9 e do PPAR δ não foi expresso por essas células em nenhuma das condições *in vitro* ou *in vivo*.

Figura 12. Análise do RNAm após tratamento *in vivo* com GLA. Análise da expressão de E2F-1, Ciclina D1, p21, p16, pRb, p27, p53 e Bcl-2 após 14 dias de tratamento com o ácido γ -linolênico (GLA 5mM – taxa de infusão de 0,5 μ L/h). Todas as moléculas foram semiquantificadas usando o controle interno GAPDH (Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase). T = Tumor ou C6 *in vivo*; CSF = Líquido Cérebro-espinhal; n=5 para cada grupo. Para análise estatística foi usado teste-T de Student. *p<0,05.

Figura 12. Análise do RNAm após tratamento *in vivo* com GLA. Análise da expressão de Bax, ERK-1, receptor ativado pela proliferação de peroxissomo (PPAR) - γ , C-Myc, p65 (NF- κ B), Ku70, Ku80 e nm23 α após 14 dias de tratamento com o ácido γ -linolênico (GLA 5mM – taxa de infusão de 0,5 μ L/h). Todas as moléculas foram semiquantificadas usando o controle interno GAPDH (Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase). T = Tumor ou C6 *in vivo*; CSF = Líquido Cérebro-espal; n=5 para cada grupo. Para análise estatística foi usado teste-T de Student. *p<0,05 (continuação).

Figura 12. Análise do RNAm após tratamento *in vivo* com GLA. Análise da expressão de nm23 β , Metaloprotease 2 (MMP-2), Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF-A) e seus receptores Flt-1 e Flk-1, Tenascina C, Tenascina R e Brevican Secretado após 14 dias de tratamento com o ácido γ -linolênico (GLA 5mM – taxa de infusão de 0,5 μ L/h). Todas as moléculas foram semiquantificadas usando o controle interno GAPDH (Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase). T = Tumor ou C6 *in vivo*; CSF = Líquido Cérebro-espinhal; n=5 para cada grupo. Para análise estatística foi usado teste-T de Student. *p<0,05 (**continuação**).

Figura 12. Análise do RNAm após tratamento *in vivo* com GLA. Análise da expressão de Brevican GPI (glicosilfosfatidilinositol) Ciclooxigenase 2 (COX-2) e receptores de prostaglandina E2: EP1, EP2, EP3 e EP4 após 14 dias de tratamento com o ácido γ -linolênico (GLA 5mM – taxa de infusão de 0,5 μ L/h). Todas as moléculas foram semiquantificadas usando o controle interno GAPDH (Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase). T = Tumor ou C6 *in vivo*; CSF = Líquido Cérebro-espinal; n=5 para cada grupo. Para análise estatística foi usado teste-T de Student. *p<0,05 (continuação).

4.6.2 Análise da Expressão da Proteína

Em função de problemas técnicos ligados ao scanner revelador das membranas de Western Blotting, não foi possível analisar todas as proteínas de interesse neste experimento (Fig. 13). Todavia, foi possível verificar que a expressão de ERK1, ERK2 e p65 se encontra reduzida após o tratamento com GLA, condizendo com os estudos do RNAm dessas proteínas. Todavia, diferentemente dos dados encontrados sobre a expressão do RNAm de p53, ciclina D1 e Ku80, foi possível observar um aumento da expressão dessas proteínas. Ku70 e E2F1 não demonstraram nenhuma alteração da sua expressão, contrariando os resultados de seus RNAs cujos níveis apareciam diminuídos após o tratamento. Já o p21, p27 e o pRb, assim como nas análises de seus RNAs, não demonstraram nenhuma alteração da sua expressão protéica.

Figura 13. Análise da proteína após tratamento *in vivo* com GLA. Análise da expressão de ERK-1/2, Ku70/80, E2F-1, Cyclina D1, p53, p27, p21 e p65 após 14 dias de tratamento com o ácido γ -linolênico (GLA 5mM – taxa de infusão de 0,5 μ L/h). CL = Contralateral ou hemisfério cerebral oposto ao tumor, ou seja, tecido normal; T = Tumor ou C6 *in vivo*; CSF = Líquido Cérebro-espinal; n=5 para o grupo controle (T-CSF) e n=6 para o grupo tratado (T-GLA). Para análise estatística foi usado teste-T de Student. *p<0,05.

4.7 Tratamento *in vitro* com Ru-Ibp

4.7.1 Análise da Expressão do RNAm

Os efeitos de 100 μ M do complexo Rutênio-Ibuprofeno (Ru-Ibp) sobre a expressão do RNA mensageiro (RNAm) de proteínas importantes para a proliferação, invasão e angiogênese de gliomas foram analisadas durante 72h de tratamento, em intervalos de 0, 3, 6, 12, 24, 48 e 72h (Fig. 14). Inicialmente, a expressão do RNAm da ciclina D1 apareceu diminuída após 48h de tratamento. Em contraste, o RNAm do E2F-1 aumentou após 6h de tratamento. Já os níveis do RNAm de c-myc, p27 e p53 se mostraram aumentados após 3, 6 e 24h de tratamento. Como já se sabe, o RNAm de p16, PPAR δ e COX-2 não foi expresso em condições *in vitro* e o Ru-Ibp não induziu sua expressão. Além disso, os níveis do RNAm do p65, ERK2, p21 e EP4 se mostraram elevados após 6 horas de tratamento. Em contrapartida, a expressão de EP4 foi aumentada após 48h de exposição ao Ru-Ibp, mostrando uma regulação da expressão desse receptor no tratamento em longo prazo. A expressão do RNAm de Ku70, Ku80, ERK1, EP1, 2 e 3 não foi alterada pelo Ru-Ibp. Todavia, a do Bax, Bcl-2 e COX-1 se mostraram aumentadas, sendo que a de Bax e COX-1 ocorre em 6 e 24h enquanto que a do bcl-2 só ocorre em 24h de tratamento apenas. Em relação ao PPAR γ , os níveis do seu RNAm tiveram uma queda após 48h de tratamento, enquanto que a expressão de Rb permaneceu reduzida desde 48 até 72h em presença da droga. Em relação às moléculas envolvidas na migração e invasão celular, Ru-Ibp não demonstrou nenhum efeito significativo sobre a MMP-2. Além disso, por sua expressão ser muito baixa e variável em condições *in vitro* (rever Figura 7), não foi possível realizar a quantificação do RNAm dessa proteína. Enquanto isso, ambos RNAm de nm23 α e nm23 β apareceram aumentados pelo Ru-Ibp em 6h de tratamento. A presença de Ru-Ibp não alterou a expressão gênica da Tenascina C. Com relação às proteínas ligadas a angiogênese como o VEGF-A e seus receptores Flt-1 e Flk-1, obteve-se um aumento dos níveis do RNAm do VEGF-A e do Flt-1 em 6h de tratamento, enquanto que o Flk-1 não foi expresso em condições *in vitro* e o mesmo não foi alterado pelo Ru-Ibp.

Figura 14. Curva da expressão gênica após tratamento *in vitro* com Ru-Ibp. Análise da expressão de p53, ciclina D1, pRb, E2F-1, c-myc, p21, p27 e p65 após 3, 6, 12, 24, 48 e 72h de tratamento com o complexo Ru-Ibp *in vitro* na concentração de 100µM. Barra lilaz = controle que recebeu etanol; barra vermelha (bordô) = tratado com Ru-Ibp. Para análise estatística foi usado teste-T de Student. *p<0,05. n=5.

Figura 14. Curva da expressão gênica após tratamento *in vitro* com Ru-Ibp. Análise da expressão de bcl-2, bax, Ku70, Ku80, ERK1, ERK2, Nm23- α e Nm23- β após 3, 6, 12, 24, 48 e 72h de tratamento com o complexo Ru-Ibp *in vitro* na concentração de 100 μ M. Barra lilaz = controle que recebeu etanol; barra vermelha (bordô) = tratado com Ru-Ibp. Para análise estatística foi usado teste-T de Student. * $p < 0,05$. n=5 (continuação).

Figura 14. Curva da expressão genica após tratamento *in vitro* com Ru-Ibp. Análise da expressão de EP1, EP2, EP4, Tenascina C, PPAR-gamma, VEGF-A e Flt-1 após 3, 6, 12, 24, 48 e 72h de tratamento com o complexo Ru-Ibp *in vitro* na concentração de 100µM. Barra lilaz = controle que recebeu etanol; barra vermelha (bordô) = tratado com Ru-Ibp. Para análise estatística foi usado teste-T de Student. *p<0,05. n=5

4.7.2 Análise da Expressão da Proteína

Também neste experimento, em função da indisponibilidade da máquina reveladora das membranas de Western Blotting não foi possível analisar todas as proteínas de interesse (Fig. 15). Todavia, foi possível verificar que a expressão de C-myc e Bax se encontram aumentadas após o tratamento com Ru-Ibp nos horários de 6 e 24h, condizendo com os estudos do RNAm dessas proteínas. Todavia, diferentemente dos dados encontrados sobre a expressão do RNAm de Bcl-2, foi possível observar uma queda de aproximadamente 85% da expressão dessa proteína após 48h de tratamento. Ku70 e 80 não demonstraram nenhuma alteração da sua expressão, condizendo com os resultados de seus RNAs.

Figura 15. Curva da expressão protéica após tratamento *in vitro* com Ru-Ibp. Análise da expressão de Bax, Bcl-2, Ku70, Ku80 e C-myc após 3, 6, 24 e 48h de tratamento com o complexo Ru-Ibp *in vitro* na concentração de 100 μ M. Barra **bordô** = controle que recebeu etanol; barra **amarela** = tratado com Ru-Ibp. Para análise estatística foi usado teste-T de Student. *p<0,05. n=5 (continuação).

5 DISCUSSÃO

5.1 Perfil da Expressão Gênica de C6 *in vitro* e *in vivo*

Como já mencionado, o GLA causa uma diminuição da proliferação das células C6 de glioma de rato *in vitro* (Ramos & Colquhoun, 2003). Partindo disso, resolveu-se conhecer melhor o mecanismo de ação desse ácido graxo estudando proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, apoptose, angiogênese, invasão e migração. Todavia, para iniciarmos nossos estudos em relação à expressão gênica dessas proteínas, foi necessário saber como se portava a expressão delas nas situações *in vitro* e *in vivo*, sabendo-se que nessa última condição há o fator do microambiente que é muito relevante para a progressão do tumor (Hoelzinger et al., 2007). Dentro disso, foi possível verificar que as células C6 *in vitro* se adaptam de tal forma a garantir sua sobrevivência e um alto índice proliferativo, evitando a apoptose, visto que foram detectadas quantidades significativas do RNAm de E2F-1 e de c-myc.

Comparando-se o tumor de C6 *in vivo* com o tecido cerebral normal, viu-se que os RNAs do E2F-1, ERK-1, PPAR γ , p65 (NF-kB), Ku70 e Ku80 se mostraram hiperexpressos no tumor, sugerindo uma intensa proliferação do mesmo e garantindo a transcrição de diversas outras proteínas ligadas à invasão migração e angiogênese através do heterodímero p65/p50 (NF-kB) e do PPAR γ (rever introdução para mais detalhes). Em adição, o ERK-1 pode ativar a transcrição de outras proteínas, de fatores de crescimento e de seus receptores (p/ ex: EGF e o seu receptor EGFR), além de facilitar a transcrição mediada pelo próprio NF-kB suportando assim um eficiente crescimento tumoral (rever esquema 5 e 11). As concentrações de bcl-2 e de Bax, todavia, se contrapõem tanto na comparação *in vitro* versus *in vivo* como na comparação do tumor de C6 *in vivo* versus tecido cerebral normal. Um trabalho importante em tumores extraídos de pacientes, mostra que a eliminação de células tumorais por bax pode ser neutralizada por um paralelo aumento de bcl-2, ou vice versa (Martin et al., 2001) demonstrando assim uma imbricada regulação entre os níveis dessas duas proteínas. Dessa forma, para garantir uma eficácia em um suposto tratamento antitumoral, deve-se pensar em aumentar os níveis de bax ou mantê-los elevados em relação ao bcl-2. É interessante ressaltar que no sistema nervoso central (SNC) normal, o bcl-2 não é expresso, e que no tumor ocorre uma alta expressão dessa molécula (Merry & Korsmeyer, 1997; Vyas et al., 1997; Martin et al., 2001). Como se sabe, células de glioma

humano expressam uma variedade de proteínas pro-apoptóticas e antiapoptóticas da família bcl-2 (Weller et al., 1998), sugerindo que moléculas pro-apoptóticas como o bax podem começar a ser expressas em função da desregulação ocorrida com as moléculas antiapoptóticas incluindo o bcl-2.

O crescimento do glioma *in vivo* requer a presença de enzimas proteolíticas como a MMP-2 para manter a angioarquitetura, suportando assim a angiogênese (Takahashi et al., 2002). Além disso, a expressão de MMP-2 nas células de glioma tem uma inversa correlação com a proliferação (Thier, et al., 2000). Segundo Zhang et al. (1998), a clivagem proteolítica do brevicane é necessária para a invasão e isso requer a associação da atividade de proteases, sendo o brevicane um possível substrato, controlando a motilidade celular. Okada, (2000) não só confirma esta hipótese, como mostra que o brevicane é degradado pela MMP-2 em gliomas, condizendo com os resultados encontrados neste trabalho. Ou seja, o tumor de C6 *in vivo* preferencialmente expressa a MMP-2 e o brevicane secretado em comparação com as células C6 *in vitro*, confirmando a necessidade de um microambiente *in vivo* para essas moléculas atuarem. Além disso, a expressão aumentada do RNAm do Ku70 e do Ku80 no tumor de C6 *in vivo* em comparação com o tecido normal também pode contribuir para uma eficiente migração e invasão desse tumor, uma vez que esse heterodímero (Ku70/80) é capaz de interagir com elementos da matriz extracelular e enzimas proteolíticas (Monferran et al., 2004a,b). É importante ressaltar que o RNAm da Tenascina-C (TN-C) também se mostrou superexpresso no tumor de C6 *in vivo* em comparação com o tecido normal, o que corrobora com o fenótipo proliferativo, invasivo e migratório desse tumor (Ramos & Colquhoun, 2003). Interessantemente, viu-se que o RNAm do VEGF-A e de um dos seus receptores, o Flt-1, é expresso tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sem nenhuma diferença significativa entre as duas situações. No entanto, altos níveis do RNAm dessas proteínas foram encontrados quando se comparou o tumor de C6 *in vivo* com o tecido normal, condizendo com o fenótipo angiogênico desse tumor. Em relação ao receptor Flk-1, o mesmo se mostrou expresso em apenas 26% das amostras analisadas de células C6 *in vitro*, enquanto que em amostras do tumor de C6 *in vivo* seu RNAm foi encontrado em 100% das amostras analisadas. Todavia não houve diferença quando comparado entre o tumor versus tecido normal. Especula-se que o motivo para a diferença na expressão do Flk-1 entre as situações *in vitro* e *in vivo* ocorra pelo fato de que as células cultivadas *in vitro* se encontram em uma atmosfera contendo oxigênio e gás carbônico em concentrações ideais, e isso não estimularia as

células C6 a expressarem o Flk-1, visto que o mesmo é ativado pelo VEGF, o qual é hiperexpresso em condições de hipóxia, a fim de mediar uma cascata de sinalização responsável pela proliferação, migração sobrevivência e angiogênese (Ferrara, 2004). Todavia deve-se levar em consideração que com a retirada do tumor do cérebro do rato, estamos retirando junto, células endoteliais, que sabidamente expressam Flk-1 em grandes quantidades (Ferrara, 2004). Esses resultados fazem do modelo de C6 *in vivo* um importante modelo para se estudar a angiogênese, visto que diversos trabalhos enfatizam sobre a expressão dessas proteínas pelas células de glioma (Kaur et al., 2004; Guha & Mukherjee, 2004; Heidenreich et al., 2004) apesar de outros estudos demonstrarem que apenas o VEGF-A é expresso pelas células de glioma, sendo que os receptores Flk-1 e Flt-1 são pouco ou nada expressos pelas mesmas (Mentlein et al., 2004). Vale ressaltar que a expressão de VEGF-A está diretamente relacionada com a expressão e ativação de metaloproteases MMP-2 e MMP-9 em gliomas humanos (Munaut et al., 2003). E, como já dito, é maior a expressão da MMP-2 neste modelo de glioma *in vivo* em relação ao tecido normal (Fig. 8). Todavia, esse modelo não apresenta expressão de MMP-9 em nenhuma das situações estudadas (resultados não mostrados). A MMP-2 possui uma estreita correlação com a expressão de nm23, que está diretamente envolvida na supressão de metástase, invasão, migração e angiogênese (Cheng et al., 2002; Ouatas et al., 2003; Biggs et al., 1990; Lombardi et al., 1995; Wang et al., 2003). Assim, não é de se surpreender que a expressão do RNAm do nm23, mais precisamente da isoforma β , esteja reduzida no tecido tumoral em relação às células *in vitro* (Fig. 7). Todavia, sua expressão se encontra elevada no tumor de C6 *in vivo* quando comparada ao tecido cerebral normal, possivelmente em resposta aos níveis de MMP-2 encontrados nesse tumor. Interessantemente, a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) não é expressa pelas células C6 *in vitro*. Em contrapartida, níveis elevados do RNAm dessa enzima são encontrados no tumor de C6 *in vivo* em relação ao tecido normal, mostrando uma provável participação dessa enzima na sinalização intercelular e conseqüente progressão tumoral. Um estudo relevante mostrou que as células da micróglia infiltradas no tumor de C6 *in vivo* são as maiores responsáveis pela produção de Prostaglandina E2 através da enzima COX-2 (Badie et al., 2003), o que suporta a idéia de que o microambiente *in vivo* é uma importante variável a favor da progressão tumoral (Esquema 13).

Esquema 13. Representação esquemática do tumor de C6 *in vivo*. A possível interação entre as células C6 com as células que habitam o cérebro normal são observadas, compondo assim um microambiente muito peculiar. O que certamente resulta numa estreita comunicação intercelular onde fatores de crescimento, quimiocinas, fatores neurotróficos e outras substâncias podem atuar de forma parácrina e/ou autócrina contribuindo para a progressão tumoral. No quadro laranja encontram-se as proteínas que mostraram níveis elevados de RNAm no tumor de C6 *in vivo* em comparação com o tecido normal. Adaptado de: Hoelzinger et al., 2007.

5.2 Mecanismo de Ação do GLA sobre o Controle do Ciclo Celular e Apoptose das Células C6 *in vitro*

Os resultados demonstraram que as células C6 expressam altos níveis do RNAm de E2F1 *in vivo* em comparação com o tecido cerebral normal (Fig. 8), indicando alta capacidade proliferativa desse tumor. Adicionalmente, viu-se neste trabalho que o tratamento com o ácido γ -linolênico (GLA) *in vitro* causou uma diminuição dos níveis do RNAm e da proteína referente ao E2F1. Devido à importância do E2F1 no controle da entrada na fase S do ciclo celular, a diminuição significativa de sua expressão pode diretamente influenciar a proliferação celular, provavelmente através de uma suposta ativação do PPAR γ pelo GLA, uma vez que o mesmo é um ligante desse receptor nuclear (Escrich et al., 2007) e este último é capaz de reduzir a

atividade transcricional do heterodímero E2F-DP (Sharma et al., 2004). Recentes estudos com Minerval (2-hydroxy-9-cis-octadecenoic acid), um derivado do ácido oléico (AO), mostrou que essa droga induziu a parada do ciclo celular antes de entrar na fase S do ciclo celular, causando uma parada das células de adenocarcinoma de pulmão humano (A549) na fase G0/G1. Essa parada do ciclo celular está diretamente associada com uma marcada diminuição na expressão de E2F1 (Martinez et al., 2005), de uma forma similar aos nossos resultados. Análises prévias demonstraram um aumento de 80,5% na expressão do RNAm da ciclina D1 após 24 horas seguidas de tratamento com GLA (resultados não mostrados). Em resultados posteriores, viu-se que o aumento dos níveis do RNAm dessa proteína começa após 1 hora e permanece até o final das 24 horas de tratamento com GLA. Talvez seja possível que o GLA e seus metabólitos possam modular a transcrição de ciclina D1 através do fator de transcrição PPAR γ (Sharma et al., 2004). Poderia-se pensar também na hipótese de que o GLA estaria induzindo a uma parada das células na fase G1, condizendo com as análises de FACS que mostraram um leve aumento da população celular nas fases sub-G1 e G1 do ciclo celular. Por essa razão encontraríamos quantidades aumentadas do RNAm da ciclina D1 nessas células após o tratamento, visto que essa proteína é produzida em maiores quantidades na fase G1 do ciclo celular (King & Cidlowski, 1998). Todavia, uma regulação pós-transcricional ou um aumento da degradação de proteína (equilíbrio síntese/degradação) deve ocorrer posteriormente, uma vez que nenhuma diferença na expressão protéica da ciclina D1 foi observada. É possível também que seja essa a resposta pelo fato de ter-se encontrado quantidades aumentadas do RNAm e não da proteína do p53 e p65 após o tratamento com GLA. Também importante para esse estudo é a ativação de p21 e p27 pelo E2F1 (Wang et al., 2005). O GLA não alterou a expressão de p21 ou p27 durante as 24 horas de tratamento, sugerindo que a diminuição dos níveis de E2F1 induzida pelo GLA não cause nenhuma alteração na expressão dessas proteínas e, portanto, elas não estão necessariamente implicadas no mecanismo de ação do GLA nessas células. Além disso, a ativação de p21 e p27 não depende somente da atividade transcricional do E2F1 (Coqueret, 2003). Um único artigo mostrou que as proteínas Ku (Ku70/80) reparadoras de DNA podem se ligar à região codificadora do E2F e então regular a sua transcrição (Pedley et al., 1998). Especula-se dessa forma, que a diminuição dos níveis de E2F1 após o tratamento com GLA tenha sido mediada pela diminuição da formação do heterodímero Ku70/80 (Esquema 14), uma vez que o GLA causou uma queda nos níveis de Ku80. É importante lembrar que altos níveis do complexo

heterodimérico Ku70/80 estão diretamente relacionados com uma hiper-proliferação, carcinogênese e reparação do DNA em células tumorais resistentes (Gullo et al., 2006). O heterodímero Ku70/Ku80 representa a subunidade regulatória da proteína cinase dependente de DNA (DNA-PKc), a qual tem um importante papel durante a reparação na quebra da dupla fita de DNA e na fosforilação de C-myc (An et al., 2005). Uma diminuição dos níveis de DNA-PKc ocasiona uma queda dos níveis e da atividade transcricional de C-myc (An et al., 2005). Como já dito, no presente estudo o GLA diminuiu a expressão da proteína Ku80 podendo assim desordenar a transcrição ou replicação do DNA assim como a sua reparação dependente de C-myc (Koch et al., 2007). Além disso, podemos especular que diminuindo os níveis de Ku80, mais Ku70 estaria disponível para interagir com C-myc (Koch et al., 2007) e então desabilitar sua atividade transcricional e reparadora de DNA. Outro possível mecanismo do GLA pode estar relacionado com sua capacidade em inibir a formação do complexo Myc-Max-DNA e a conseqüente inibição da transcrição através da sua ligação com o fator de transcrição Myc-Max (Chung et al., 2002). Esses resultados suportam a idéia de que o GLA poderia atuar em proteínas que são alvo de Myc, mas não diretamente sobre a expressão de c-myc, uma vez que o GLA não alterou a sua expressão *in vitro* sobre as células C6.

Sabe-se que o complexo heterodimérico Ku70/80 pode regular a adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, participando de processos de adesão, migração e invasão celular funcionando como receptor para a fibronectina (Monferran et al., 2004a), além de possuir uma função proteolítica através da interação com a MMP-9 (Monferran et al., 2004b). Dessa forma, com a diminuição dos níveis de Ku80 causada pelo GLA e a conseqüente diminuição da formação do heterodímero Ku70/80, é possível especular uma resposta pela qual o GLA exerça a sua ação antimigratória demonstrada em estudos anteriores *in vitro* (Ramos & Colquhoun, 2003).

Como mostrado nos resultados, o GLA aumentou a expressão de Bax 21 e 50kDa além de influenciar na razão Bax/Bcl-2 mostrando altos níveis da mesma nas células tratadas (Fig. 11). Embora esses resultados apontem para a hipótese de que o Bax estaria então livre para desencadear uma resposta apoptótica, temos que lembrar que outras moléculas também são capazes de formar heterodímeros com Bax e dessa forma modular ou inibir a apoptose. Assim como o Bcl-2, o Bcl-xL também é uma proteína anti-apoptótica que pode interagir com Bax e então inibir essa cascata (Sattler et al., 1997). Estudos recentes mostraram que em células de neuroblastoma, Bax se associa ao Ku70 citoplasmático, levando a um bloqueio da apoptose em

resposta a certos agentes quimioterápicos (Subramanian et al., 2005). Como mencionado anteriormente, o GLA induziu uma diminuição dos níveis da proteína Ku80. Dessa forma, isso poderia levar a uma maior quantidade de Ku70 disponível para se associar com Bax e assim bloquear a resposta apoptótica (Esquema 14). Juntando esses resultados, é possível especular que esse mecanismo pode ser o responsável pelo qual o GLA na concentração de 150 μ M não cause significativa apoptose nessas células. Além disso, o estresse oxidativo causado pelo GLA pode ser o responsável pela inibição da expressão proteica de Ku80 *in vitro*, uma vez que o estresse oxidativo é capaz de induzir uma perda nuclear de Ku70 e Ku80 em células pancreáticas acinares (AR42J) (Song et al., 2003). Em conclusão, a diminuição da expressão de Ku80 e E2F1 causada por concentrações subtóxicas do GLA pode ser uma das respostas para o seu efeito antiproliferativo e ao mesmo tempo antimigratório sobre as células C6 *in vitro*.

Como já dito, a proteína p65 é uma subunidade do complexo heterodimérico p65/p50 da família NF- κ B que regula a transcrição de vários genes incluindo p53 (Li et al., 2006). Interessantemente, I κ B α , um inibidor endógeno do NF- κ B, pode interagir com p53 e o heterodímero p65/p50 no citosol, inibindo assim a transcrição gênica mediada pelo p53 e NF- κ B (Li et al., 2006). Visto que a proteína p53 está envolvida na transcrição de Bax e de p21 (Fueyo et al., 2001), e que não está mutada nas células C6, podemos propor três hipóteses para o aumento dos níveis de Bax causado pelo GLA (esquema 14). A primeira seria o fato de que o GLA poderia causar uma diminuição dos níveis de I κ B α , possibilitando a translocação de p65 e de p53 livres para o núcleo, ocorrendo assim a ativação da transcrição de Bax, uma vez que a expressão das proteínas p65 e p53 não sofreu nenhum aumento após o tratamento com GLA. A segunda hipótese seria de que o GLA ou seus metabólitos poderiam atuar como ligantes de PPAR γ e dessa forma causar um aumento da expressão de Bax através da ativação desse receptor uma vez que a presença do GLA não alterou sua expressão. E por fim poderíamos pensar em uma terceira hipótese onde o GLA seria capaz de atuar através das duas hipóteses descritas acima simultaneamente.

Esquema 14. Mecanismo de ação do GLA *in vitro*. O esquema mostra o possível mecanismo de ação do ácido γ -linolênico (GLA) sobre as células C6 *in vitro*. Ver texto para mais detalhes e referências.

5.3 Efeito do GLA sobre a Expressão de Proteínas Relacionadas à Invasão, Migração e Angiogênese nas Células C6 *in vitro*

Tem sido demonstrado que a transfecção de nm23-H1 (nm23- β no rato) resulta em uma redução de aproximadamente 45% da capacidade migratória das células de glioma e suprimiu a invasão das mesmas sugerindo que o nm23-H1 pode ter um importante papel na supressão da invasão e migração em gliomas (Jung et al., 2006). Sabe-se também que o GLA aumenta a expressão dessa proteína em células de cólon e de mama (Jiang et al., 1998). Nos resultados foi possível observar que o GLA aumenta a expressão do RNAm de nm23- α e β nas células C6 *in*

vitro, apesar da significância estatística ter sido somente obtida com a análise da expressão do RNAm do nm23- β . Em contraste, a análise dos níveis da proteína não demonstrou nenhuma alteração após o tratamento. Esses resultados sugerem que a inibição da migração em C6 *in vitro* induzida pelo GLA previamente demonstrada por Ramos & Colquhoun (2003) é possivelmente mediada por outras proteínas, tais como a inibição do Ku80, previamente comentada.

A transcrição do RNAm da Metaloprotease-2 (MMP-2) é negativamente regulada pela alta expressão de nm23 (Cheng et al., 2002), enquanto que a associação dos fatores de transcrição Sp1 e GATA com o Nm23-H1 é requerido para a modulação da atividade da integrina alfa V, regulando assim a adesão e migração das células tumorais (Choudhuri et al., 2006). Um recente estudo demonstrou que o GLA aumenta a regulação de uma proteína acídica secretada e rica em cisteína (SPARC), também conhecida como osteonectina. Isso contribui para uma redução da adesão das células cancerígenas à matriz extracelular além de reduzir a migração de células de câncer de mama humano MCF-7 e MDA-MB-231 e de células de câncer de cólon humano HT115 e HRT-18 (Watkins et al., 2005).

Em se tratando da Tenascina-C (TN-C), sabe-se que altos níveis dessa proteína são encontrados em gliomas altamente malignos e com baixa prognose (Zamecnick, 2005). Os resultados demonstraram que a expressão do RNAm da TN-C é negativamente regulada pelo GLA nas células C6 *in vitro* de forma dependente do tempo começando em 2 horas de tratamento e permanecendo até o final das 24 horas. De maneira similar, outros compostos orgânicos relacionados ao metabolismo dos ácidos graxos, incluindo o ácido retinóico e a 1,25-diidroxitamina D3 também foram capazes de inibir a expressão da TN-C nas células C6 (Alvarez-Dolado et al., 1999). Em contraste, as análises de western blotting não mostraram nenhuma alteração da expressão protéica da TN-C após o tratamento com GLA. Esses resultados suportam a idéia de que a TN-C poderia estar sofrendo uma regulação pós transcricional que pode ser dependente do microambiente em que as células estão expostas.

Em relação à expressão do fator angiogênico VEGF-A e do seu receptor Flt-1 viu-se que ela ocorre tanto *in vitro* como *in vivo* nas células C6, enquanto que a do receptor Flk-1 aparece somente em condições *in vivo*. A análise da expressão do RNAm do VEGF-A e seus receptores após o tratamento com GLA *in vitro* demonstrada neste trabalho não mostrou nenhuma alteração. A expressão protéica de Flt-1 se mostrou abaixo dos níveis de detecção, não sendo assim possível

a sua quantificação. Já a proteína VEGF-A se mostrou pouco expressa, e nenhuma diferença entre as células tratadas e controles foi observada.

5.4 Ação do GLA sobre o tumor de C6 *in vivo*

A injeção intratumoral do ácido γ -linolênico (GLA) tem sido empregada em pacientes portadores de tumores cerebrais malignos causando regressão do tumor sem causar efeitos colaterais significativos (Naidu et al., 1992; Das et al., 1995; Bakshi et al., 2003). A concentração do GLA com efeito antitumoral *in vivo* difere da atividade observada em culturas, sendo necessária uma maior concentração no modelo C6 de glioma de rato (2mM – GLA, infundido a uma taxa lenta de 1 μ l/h) (Leaver et al., 2002a). Em todo tumor transplantado *in vivo* do mesmo estudo, a regressão do tumor em glioma tratado com GLA foi detectado. E no presente trabalho relata-se não só a confirmação disso, mas também as alterações na expressão gênica de diversas proteínas nas duas situações de tratamento com GLA: 150 μ M de GLA *in vitro* e 5mM de GLA *in vivo*, infundido a uma taxa lenta de 0,5 μ l/h. É importante mencionar que os estudos em nosso laboratório mostraram que a concentração de 5mM do GLA é mais eficiente em impedir o crescimento do tumor e consequentemente na alteração da expressão gênica em comparação com a concentração de 2mM de GLA no modelo de C6 de glioma de rato. Nos estudos de Leaver et al. (2002b) a massa tumoral no grupo infundido com 2mM de GLA foi 50% menor que os controles. Foram evidenciados necrose e apoptose com preservação histológica dos neurônios e perda da inflamação aguda nos arredores do tecido (Leaver et al., 2002b). Todavia, apesar da ação do GLA ainda não estar totalmente elucidada, é possível que as células de glioma incorporem preferencialmente os ácidos graxos poliinsaturados em suas membranas, além de possuírem uma inabilidade em aumentar a regulação e atividade da enzima catalase (Preuss et al., 2000).

5.4.1 Mecanismo de Ação do GLA sobre o Controle do Ciclo Celular e Apoptose das células C6 in vivo

Como se sabe, a ativação transcricional das subunidades p65/p50 (NF- κ B) é responsável pela promoção tumoral induzindo vários eventos na malignidade do tumor incluindo o programa anti-apoptótico, angiogênese, migração e invasão celular (Greten & Karin, 2004; Pikarsky et al.,

2004). São vários os genes alvos do NF- κ B, os quais incluem o VEGF, ciclina D1, c-myc, bcl-2 e COX-2 (Greten e Karin, 2004). Interessantemente, o GLA não somente diminuiu a expressão do RNAm da COX-2 nas células C6 *in vivo*, como também a de p65 e VEGF-A, a qual se encontrava aumentada no tecido tumoral em relação ao tecido normal. Tendo em vista a ação do GLA em diminuir os níveis tanto do RNAm quanto da proteína de p65 *in vivo*, é possível se pensar na utilização do mesmo como um agente capaz de sensibilizar as células tumorais à outros agentes anticâncer em quimioterapias combinadas (Nakanishi & Masakazu, 2005). A diminuição dos níveis de p65, todavia não influenciaram na expressão da proteína ciclina D1, que se mostrou aumentada após o tratamento com GLA. Altos níveis de ciclina D1 tem sido relacionados com a indução da morte celular ou à parada do ciclo celular na fase G2 (Pratt & Niu, 2003). É importante ressaltar que o ácido oléico modificado (Minerval) também induziu um aumento dos níveis de ciclina D1 em células A549 (Martinez et al., 2005). Além disso, a expressão aumentada de ciclina D1 pode levar a um aumento da expressão de p53 (Pratt & Niu, 2003), o que foi confirmado em nossos estudos (Fig. 13). Assim o aumento dos níveis de p53 pelo GLA suportam o uso do mesmo como um adjuvante quimio/radioterapêutico (Baronzio et al., 1995; Vartak et al., 1997). Juntando os dados *in vitro* e *in vivo* é interessante notar a atuação do GLA em relação aos dois diferentes microambientes, porém com o mesmo resultado final: diminuição da proliferação celular e do crescimento do tumor.

Assim como a COX-2, o PPAR- γ também é altamente expresso em tecidos inflamatórios e tumorais (Nwankwo & Robbins 2001; Konturek et al., 2004). Um interessante trabalho mostrou que o ácido docosahexaenóico (DHA), um ácido graxo poliinsaturado da família ômega-3 (ω -3), pode modular a expressão de p65, COX-2 e PPAR- γ causando uma inibição do crescimento do tumor (Narayanan et al., 2005). Interessantemente, o GLA causou uma significativa diminuição da expressão do RNAm de PPAR- γ , o qual se mostrou aumentado em relação ao tecido normal. Esses resultados sugerem que o GLA pode estar atuando na regulação transcricional via PPAR- γ *in vivo*, uma vez que o RNAm do nm23 β , o qual é regulado transcionalmente pelo PPAR- γ (Jiang et al., 2000), também se mostrou diminuído após o tratamento. Além disso, o PPAR- γ é capaz de interferir no fator nuclear de células T ativadas (NFAT) (Chung et al., 2003), o que pode levar a uma diminuição da expressão de COX-2. Todavia, os AINEs (inibidores da COX-2), podem regular positivamente o PPAR- γ (Konturek et al., 2003) e o uso de um ligante dessa molécula pode causar uma regressão do tumor pela diminuição da expressão da mesma

(Narayanan et al., 2005). Um estudo recente reportou sobre o aumento da expressão de PPAR- γ em células de gliomas humanos (U87-MG e T-98G) vs cérebro normal. Da mesma forma, Nwankwo & Robbins, (2001) também viram que a exposição das células C6 ao GLA *in vitro* não causa nenhuma alteração da expressão de PPAR- γ . Outros estudos especularam o uso de ambos ligantes de PPAR- γ e AINEs como tratamento sinérgico (Kohn et al., 2005; Telliez et al., 2006). Dessa forma, o estudo do GLA no tratamento de tumores, especialmente de gliomas, se torna cada vez mais promissor, uma vez que no presente estudo o mesmo interferiu na expressão tanto do PPAR- γ quanto na da COX-2 *in vivo*. É interessante mencionar que um ligante de PPAR- γ , ciglitazona, inibiu o crescimento de células de glioma humano (U87MG, T98G, A172 e U118MG) através da diminuição da expressão de Rb e ciclina D1 e do aumento da expressão de p27 (Strakova et al., 2004). No presente trabalho as células C6 não expressaram ou expressaram de forma variada o PPAR- γ *in vitro* e a presença de GLA não interferiu na sua expressão. Assim, é possível que essa baixa expressão dessa proteína nessa situação previna o GLA de exercer sua ação através do mesmo.

A proteína c-myc tem sido o alvo de extensiva investigação e muitos alvos transcricionais dessa molécula têm sido atualmente reportados, incluindo a fosfatase cdc25a a qual possui como alvo o complexo cdk4/ciclina D (Galaktionov et al., 1996) e a proteína p53 (Reisman et al., 1993). Um estudo recente reportou que o ácido linoléico tem fortes efeitos inibitórios na ligação do heterodímero Myc-Max à uma região específica do DNA. A interação de um ácido graxo com um dímero de proteína, não com o DNA, é capaz de bloquear a formação do complexo Myc-Max-DNA. Os ácidos graxos insaturados também mostraram citotoxicidade diante de células SNU16 de câncer de estômago e o ácido linoléico conjugado suprimiu a expressão do RNAm de vários genes alvos de myc (Chung et al., 2002). Todavia, o GLA não mostrou nenhuma ação sobre c-myc, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. É importante notar também que o tumor de C6 *in vivo* tratado com GLA não mostrou nenhuma alteração da expressão tanto do RNAm quanto protéica de p21, p27 ou de pRb durante todo o tratamento *in vitro* ou *in vivo*, sugerindo o não envolvimento dessas proteínas no mecanismo antiproliferativo do GLA. Todavia, não deixa de ser um resultado importante do ponto de vista terapêutico, uma vez que outras drogas que atuem nesses alvos possam ser usadas em conjunto com o GLA no intuito de tornar a terapia mais eficaz.

O tumor de C6 *in vivo* expressou altos níveis do RNAm de E2F-1 em comparação com o tecido cerebral normal, indicando uma alta atividade proliferativa deste tumor. Além disso, o GLA diminuiu sua expressão *in vivo*. Todavia, análises posteriores revelaram que a expressão da proteína E2F-1 não é alterada pelo tratamento com GLA, sugerindo uma regulação pós-transcricional do RNAm dessa proteína. Vale lembrar que o tratamento com GLA *in vitro*, no entanto, causou uma diminuição tanto do RNAm quanto da proteína relativa ao E2F-1, o que corrobora com os resultados das análises de FACS *in vitro*, onde viu-se que o GLA diminui em 49% a população de células na fase S. Com isso, é possível sugerir que o mecanismo do GLA *in vivo* difere do mecanismo do mesmo *in vitro* em relação à essa proteína.

Recentemente foi observado que a alta expressão das proteínas reparadoras de DNA Ku70 e Ku80 possuem relação com a carcinogênese, hiperproliferação, migração e invasão celular nos tumores (Gullo et al., 2006; Muller et al., 2005). Além disso, a alta expressão de Ku80 principalmente após tratamentos quimioradioterapêuticos está diretamente associada à resistência das células tumorais (Chang et al., 2005), uma vez que a mesma é importante para reparar os possíveis danos causados ao DNA. Se o reparo não for bem sucedido, as células entram em apoptose por um mecanismo dependente de p53 (Chang et al., 2005). Sendo assim, o GLA foi capaz de induzir um aumento dos níveis protéicos de Ku80, mostrando uma resposta celular aos possíveis danos que o GLA possa estar causando nas mesmas. Ao mesmo tempo, porém, como já mencionado, os níveis protéicos de p53 se mostraram aumentados após tratamento, mostrando que algumas células devem estar entrando em apoptose, possivelmente por não conseguirem reparar os danos. Esses resultados suportam a idéia do uso do GLA em conjunto com outros compostos capazes, então, de inibir a proteína Ku80, impedindo assim o surgimento de células resistentes ao tratamento.

5.4.2 Mecanismo de Ação do GLA sobre o Controle da Migração, Invasão e Angiogênese *in vivo*

Ao contrário do que se observou no cenário *in vitro*, a expressão do RNAm do VEGF-A e do Flt-1 se mostrou diminuída após o tratamento com GLA *in vivo*, enquanto que a expressão do RNAm do Flk-1 se mostrou aumentada após o tratamento. Análises posteriores de imunohistoquímica foram realizadas, confirmando que os níveis protéicos do VEGF-A e do Flt-1 realmente se encontram diminuídos. Todavia os níveis do Flk-1 não se alteraram (resultados não

mostrados). Além disso, outras análises realizadas em nosso laboratório demonstraram que o GLA causa uma significativa diminuição da formação de microvasos (dados não mostrados). Esses resultados suportam a idéia de que o GLA realmente atua interferindo na regulação da angiogênese *in vivo*. Um importante estudo mostrou que o GLA inibe não só o VEGF como também a motilidade das células vasculares endoteliais (Cai et al., 1999a). Molecularmente, o GLA é capaz de inibir a angiogênese induzida pelo tumor em células endoteliais vasculares humanas (HUVEC) em parte pela diminuição de VE-caderina e β -catenina, cujo complexo é essencial para a formação e manutenção de novos capilares (Cai et al., 1999b). Um estudo recente demonstrou que o GLA pode aumentar a expressão do RNAm da ocludina, aumentando a resistência elétrica transepitelial (Yamagata et al., 2003), mostrando que esse ácido graxo é importante para regular o crescimento, permeabilidade e diferenciação das células endoteliais. Contudo, o presente trabalho apresenta resultados mostrando não só que o GLA é um potencial inibidor do VEGF-A, o qual se encontra em níveis aumentados no tumor, mas também de seu receptor Flt-1, que está envolvido na indução do ativador de plasminogênio urokinase e tecido específico (uPA e tPA), e da MMP-9 (Ferrara, 2004), resultando assim numa resposta não somente inibitória da angiogênese como da invasão e migração das células tumorais.

As células C6 não expressam COX-2 *in vitro* e Kurz et al. (2002) também viram que a COX-2 não é expressa em todas as linhagens de células de gliomas analisadas. De dez linhagens, apenas seis expressaram COX-2. Todavia, o tratamento com GLA não alterou a expressão dessa enzima. Como já dito, a PGE₂ é conhecida por fazer parte na invasão e migração de células tumorais. Foi reportado que a ativação de seus receptores, especialmente do EP₄, pode levar a um aumento da expressão da MMP-2 e CD44 (Dohadwala et al., 2002). Antagonistas dos receptores dessa prostaglandina bloqueiam a resposta quimiotática de células de tumor de mama impedindo sua migração *in vitro* (Ma et al., 2006). Da mesma forma, antagonistas de EP₄ ou EP₁/EP₂ também inibem diretamente a proliferação de células tumorais (Ma et al., 2006). Já no tumor de C6 *in vivo* os receptores EP₁, 2 e 3 foram os que se mostraram hiperexpressos no tecido tumoral em relação ao tecido normal e interessantemente o GLA causou uma diminuição da expressão desses receptores, mas não de EP₄. Sobretudo, não podemos descartar a hipótese de que a PGE₁ também esteja atuante sobre esses receptores, uma vez que alguns trabalhos mostraram dados que indicam que a PGE₁ se liga aos receptores de PGE₂, especialmente EP₂ e EP₄ (Fan et al., 1998). Além disso, a PGE₁ difere da PGE₂ na habilidade de estimular a produção de AMPc, sendo a

PGE1 mais efetiva que a PGE2 (Salvatori et al., 1992; Horrobin, 1980), e assim, manifestar um aumento da sinalização mediada pelo AMPc (rever esquema 11). Em adição, a PGE1, mas não a PGE2 ou PGF2 α , foi capaz de os níveis de RNAm da enzima colagenase (Salvatori et al., 1992). Em contraste, foi visto num trabalho que a síntese de PGE1 é substancialmente baixa em relação à de PGE2 em células de carcinoma de pulmão de camundongo, ao menos em células e tecidos onde predominam COX-1 ao invés de COX-2 (Levin et al., 2002). Foi proposto que o GLA pode atuar como um agonista do PPARbeta/delta contribuindo para um aumento do RNAm de EP4, como foi visto nas células não pequenas de câncer de pulmão tratadas com um agonista de PPARbeta/delta GW501516 (Han et al., 2005). No entanto, não achou-se expressão de PPARbeta/delta em C6 *in vitro* ou *in vivo*, e a presença de GLA não alterou a expressão dessa molécula. É importante ressaltar que ainda existem controvérsias sobre o mecanismo dos receptores de PGE2 em diferentes tipos de células tumorais. Trabalhos mostram que a ativação de EP2 e EP4, por exemplo, a qual leva a um aumento da concentração de AMP cíclico intracelular, induz uma inibição do crescimento em células de carcinoma gástrico humano (Okuyama et al., 2002). Todavia, antagonistas de EP1, SC1089 e AH6809, inibiram o crescimento de células de glioma *in vitro*, e um inibidor específico de COX-2, NS398 ou SC51089 diminui o crescimento do tumor *in vivo* (Matsuo et al., 2004).

Como já dito, as células C6 não expressam MMP-9 *in vivo* mas expressam altas quantidades de MMP-2 e esse resultado foi confirmado por imunohistoquímica (dados não mostrados). O GLA foi capaz de diminuir os níveis do RNAm da MMP-2 *in vivo*, o qual se mostrou aumentado neste tumor. Ao contrário do ocorrido com a expressão do RNAm das proteínas nm23 após o tratamento com GLA *in vitro*, foi possível observar uma diminuição da expressão do RNAm apenas do nm23 β após o tratamento *in vivo*. Uma vez que as células C6 somente expressam COX-2 *in vivo* e sua regulação transcricional é regulada pela interação do elemento responsivo de AMP cíclico (CRE), NF-kB e nm23 β (Kaul et al., 2006), podemos concluir inicialmente que a diminuição de COX-2 pode estar atribuída pela diminuição de p65 (NF-kB) e do próprio nm23 β . É importante mencionar também que ainda existem controvérsias sobre a expressão do nm23 β e o prognóstico de tumores. Enquanto alguns estudos mostram um importante papel dessa proteína na supressão da invasão e migração de gliomas (Jung et al., 2006), outros estudos mostram que o aumento dos níveis da mesma em neuroblastomas está correlacionada com a agressividade da doença e tumores altamente proliferativos (Hailat et al.,

1991; Keim et al., 1992). Em relação ao Nm23 α , tem sido identificado como uma proteína ligante de DNA com afinidade pelo promotor do gene c-myc (Postel et al., 2000). A habilidade de nm23 α de ativar a transcrição de c-myc *in vitro* e *in vivo* demonstra a significância biológica dessa interação (Postel et al., 2000). Um recente estudo mostrou que as proteínas nm23 podem aumentar a sobrevivência celular por mecanismos como reparo de DNA e regulação transcricional de genes envolvidos na resposta do dano causado ao DNA (Arnaud-Dabernat et al., 2004). Além disso, o nm23 α foi capaz de regular positivamente a expressão de c-myc aumentando a sobrevivência celular (Arnaud-Dabernat et al., 2004). O tratamento com GLA não exerceu nenhum efeito sobre a expressão do RNAm de nm23 α e provavelmente, por essa razão também não alterou a expressão de c-myc nas células C6 *in vivo*. Não foi observada também nenhuma diferença da expressão dessas proteínas entre o tecido tumoral e o tecido cerebral normal.

A inibição seletiva da enzima COX-2 pelo celecoxib pode inibir a produção de PGE₂, causando uma diminuição do estímulo dos receptores ativados por essa prostaglandina (EP1-4). Isso pode resultar na desativação da cascata de proteínas envolvidas na ativação de cinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1/2), e subsequentemente na não ativação de PPAR γ no núcleo, resultando assim numa diminuição da transcrição de genes como VEGF, MMPs e bcl-2 (Grösch et al., 2006). No presente estudo, o GLA além de diminuir a expressão do RNAm da COX-2, EP1-3, PPAR γ , VEGF-A e MMP-2, diminuiu a expressão protéica de ERK1 e ERK2 (Fig. 13). Interessantemente, Lakka et al., (2002) viram que a inibição de ERK1 em células de glioma causa uma diminuição da regulação da MMP-9 através de NF-kB inibindo a invasão dessas células. Um estudo recente mostrou que o tratamento das células C6 com U0126, um inibidor específico de ERK1/2, tem efeitos dramáticos sobre a proliferação e migração, assim como na indução da expressão de GFAP. Além disso, U0126 não induziu GFAP em células de astrócitos normais sugerindo que a indução dessa proteína pela inibição da via MEK/ERK é uma característica das células de glioma, a qual se contrapõe com os eventos de sinalização dos astrócitos normais (Lind et al., 2006). Dessa forma, isso sugere um novo mecanismo pelo qual o GLA pode estar exercendo o seu efeito altamente seletivo, previamente demonstrado por Vartak et al. (1998).

A tenascina C (TN-C), como já dito, é uma proteína da matriz extracelular com atividades que promovem a angiogênese, invasão e proliferação. Gliomas altamente malignos com baixa

prognose exibem altos níveis dessa proteína (Orend, 2005). Da mesma forma, foi encontrado altos níveis do RNAm dessa proteína nas células C6 *in vivo*. No entanto, o GLA não exerceu nenhum efeito sobre sua expressão nessas condições. Todavia, outros compostos orgânicos relacionados com o metabolismo de ácidos graxos como o ácido retinóico e a 1,25-dihidróxivitamina D3 foram capazes de inibir a expressão de TN-C nas células C6 *in vitro* (Alvarez-Dolado et al., 1999).

A tenascina R (TN-R) é uma outra isoforma da família das tenascinas e coopera com o brevican, uma proteoglicana abundantemente encontrada no tecido nervoso, na regulação da adesão celular (Zacharias & Rauch, 2006). Interessantemente, o tratamento com o GLA *in vivo* causou um aumento da expressão do RNAm da TN-R e da isoforma secretada do brevican, mas não da isoforma ancorada ao glicosilfosfatidil inositol (Brevican-GPI). Esses resultados sugerem que o GLA pode estar de alguma forma interferindo na adesão de C6, o que acaba por interferir no crescimento do tumor, uma vez que o mesmo é significativamente menor que o tumor controle, mostrando uma redução de 75% da área do tumor (resultados não mostrados). Além disso, o brevican serve como um substrato para a MMP-2, a qual se mostrou diminuída após o tratamento com GLA, inibindo assim a degradação da matriz extracelular adjacente e consequente invasão e migração. Outras análises também mostraram que o GLA afeta a adesão de células tumorais. Usando RT-PCR, níveis elevados do RNAm da proteína ácida, rica em cisteína (SPARC) foram encontrados após o tratamento com GLA e isso reduziu a secreção da mesma nos arredores do microambiente, o que pode contribuir para uma redução da motilidade de células de câncer de mama (Watkins et al., 2005). Sabendo-se que a função biológica da TN-R é atribuída na promoção da formação da mielina em oligodendrócitos (Jones & Jones, 2000), um estudo recente mostrou que a suplementação com GLA é capaz de induzir um significativo aumento no número de fibras mielínicas, estimulando assim a diferenciação dos oligodendrócitos (van Meeteren et al., 2006). No presente estudo o GLA ocasionou um aumento dos níveis da TN-R. Embora não se conheça muito sobre o papel dessa proteína nos gliomas, outros estudos mostram que a expressão da TN-X, um outro membro da família da tenascina, é mais expressa em tumores astrocíticos de baixo-grau do que nos de alto grau (Hasegawa et al., 1997). Além disso, foi demonstrado que uma alta expressão de TN-X em melanoma e células de fibroblastos reduzem a atividade e a expressão de MMP-2 (Matsumoto et al., 2001, 2004). Dessa forma é possível especular que a TN-R também esteja envolvida na regulação da MMP-2, todavia em

conjunto com a COX-2 ou através da transcrição mediada por ERK/Sp1 (Pan & Hang, 2002). De qualquer forma, mais estudos são necessários para concluir o preciso mecanismo pelo qual o GLA estaria interferindo na regulação da transcrição desses genes.

Esquema 15. Mecanismo de ação do GLA *in vivo*. O GLA foi capaz de interferir na expressão de diversas proteínas *in vivo*. Todavia, a alteração de algumas ainda necessitam ser confirmadas através da análise dos níveis protéicos das mesmas. ? = proteínas que tiveram seu RNAm alterado pelo GLA e que não tiveram a confirmação através das análises de Western Blotting. Essas proteínas foram encaixadas no esquema para melhor entendimento do possível mecanismo de ação do GLA nessas condições (ver texto para mais detalhes).

5.3 Mecanismo de Ação do Ru-Ibp sobre as células C6 *in vitro*

Além do estudo com o ácido γ -linolênico, também foi proposto neste trabalho verificar a ação de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) complexados com Rutênio sobre as células C6 de glioma de rato. Como já mencionado na introdução, diversos estudos relatam sobre a utilização dos AINEs em diversas células tumorais, porém seu mecanismo de ação ainda não está bem elucidado. Estudos demonstram que a ação dos AINEs é dependente da inibição da COX-2 (Kurzel et al., 2002; Jantke et al., 2004). Em contrapartida, outros estudos demonstram que pode ser um efeito independente da inibição da COX-2 (Yu et al., 2002, Ding et al., 2003). De

qualquer forma estudos *in vivo* demonstram que há grandes quantidades de Prostaglandina E2 (PGE2), produto do metabolismo da COX-2, tanto em gliomas como em meningiomas (Kokoglu et al., 1998). Todavia, nossos achados indicam que a ação destes AINEs é independente da expressão de COX-2, uma vez que a mesma não é expressa em condições *in vitro* pelas células C6 (Fig. 7). Da mesma forma, Kurzel et al. (2002) também viram que a expressão do RNAm da COX-2 não ocorre em todas as linhagens de células de glioma humanas, ou seja, de dez linhagens apenas seis expressaram a enzima. Além disso, encontramos uma maior, porém não significativa expressão de COX-2 no tumor em relação ao tecido normal de cérebro *in vivo* (Fig. 8). Da mesma forma, Deininger et al. (1999) demonstraram através de estudos de imunolocalização, que a proteína COX-2 não foi expressa por astrócitos e oligodendrócitos do tecido normal, sendo apenas encontrada nas células tumorais de glioma *in vivo* (Deininger et al., 1999) sugerindo um papel importante dessa enzima durante a progressão tumoral nessas condições.

Em relação aos AINEs estudados neste trabalho (Aspirina, Indometacina, Ibuprofeno e Naproxeno), constatou-se de imediato que o naproxeno e o ibuprofeno exerciam um efeito antiproliferativo significativo sobre as células C6. Todavia, quando complexadas quimicamente ao Rutênio apenas o naproxeno (Ru-Npx) e o ibuprofeno (Ru-Ibp) se mostraram mais eficazes (Tabela 1), sendo este resultado comprovado quando se faz a contagem de células (Tabela 2). Estes resultados também mostram que o Rutênio complexado a essas moléculas atua de maneira sinérgica na inibição do crescimento das células C6. Com estes resultados, seria interessante então descobrir o mecanismo de ação dessas drogas. Estudos recentes com esse objetivo mostram um potencial efeito inibitório da indometacina na invasão de células de glioma através da inibição de MMP-2 e MMP-9 (Wang et al., 2005) e através de um aumento da expressão de nm23 em células de câncer de mama (Natarajan et al., 2002). Um trabalho importante demonstrou que células normais de astrócitos e fibroblastos não sofrem a ação citotóxica dos antiinflamatórios (Jantke et al., 2004) sendo assim menos agressivo que a quimioterapia atual. Além disso, DjinoVIC et al. (2004) revelaram a existência de um novo complexo de Rutênio o qual é seletivamente tóxico para as células C6 de glioma e não para as células normais (DjinoVIC et al., 2004).

As vantagens de se utilizar o rutênio no desenvolvimento de novas drogas antitumorais têm sido consideradas em um número considerável de excelentes revisões (Clarke, 2003; Reisner et al., 2007). Basicamente, os benefícios de se explorar o rutênio incluem: I – uma bem

desenvolvida coordenação química desse metal de transição, provando confiáveis rotas para novos compostos; II – uma taxa de mudança de ligante freqüentemente comparável com aqueles contendo platina ou os quais podem ser ajustados pela coordenação de ligantes subordinados apropriados; III – coordenação geométrica octaédrica, em contraste com a geometria planar e quadrada dos compostos de platina(II), implicando numa reatividade e modo de ação diferentes da cisplatina; IV – acessibilidade de estados de oxidação 2+, 3+ e 4+ sobre condições fisiológicas e a habilidade de ajustar a taxa de transferência de elétrons e o potencial redox; V – a habilidade do rutênio de imitar o ferro, ligando-se a biomoléculas como a transferrina humana e outras proteínas, o que faz dos agentes contendo rutênio marcadamente menos tóxicos que as drogas de platina; e VI - aumento do conhecimento sobre os efeitos biológicos dos complexos de rutênio. Essa diferença entre a molécula de platina(II) e a de rutênio(III), por exemplo, faz com que o encaminhamento de drogas contendo platina(II) para as células via endocitose mediada pelo receptor de transferrina seja menos provável. O mecanismo de ativação pela redução poderia ser responsável pela baixa toxicidade de alguns complexos contendo rutênio. (Jakupek et al., 2005; Schluga et al., 2006). Esse mecanismo é suposto ser operativo em tumores sólidos com baixos níveis de oxigênio comparado com o tecido normal, possibilitando a redução do rutênio(III) para espécies mais reativas de rutênio(II). O microambiente tumoral gerado leva a um rápido crescimento do tumor por causa da formação insuficiente de novos vasos e do pobre suprimento de sangue. A situação de hipóxia no tumor é o fator contribuinte para a falha da radioterapia ou quimioterapia. Dessa maneira um aumento das espécies reativas de oxigênio por esses compostos seriam importantes para o aumento dos efeitos dessas terapias. De uma maneira análoga aos compostos de platina, o DNA tem sido considerado o alvo principal de compostos contendo rutênio. A indução de apoptose em células tumorais pela via mitocondrial intrínseca (Kapitza et al., 2005) não exclui a possibilidade de que a ligação com o DNA leva a ocorrência do processo apoptótico, mas o comparativo início da despolarização da membrana mitocondrial sugere o envolvimento de uma direta interação com a mitocôndria no mecanismo de ação de compostos contendo rutênio. Levando em conta as similaridades entre o rutênio e o ferro, é uma tentação afirmar que alguma interferência com o processo metabólico dependente do ferro poderia estar acontecendo. Nesse contexto, a capacidade de se ligar ao citocromo c é notável. Fazendo uma comparação entre os compostos de rutênio atualmente conhecidos que foram mencionados na introdução deste trabalho e os compostos estudados em nossas pesquisas, foi possível observar

que as drogas utilizadas possuem importantes efeitos antitumorais sobre as células C6 de glioma de rato, especialmente o complexo dirutênico contendo ibuprofeno (Ru-Ibp), apresentando assim características semelhantes entre si. Todavia, estes compostos exibem estruturas em forma de roda de pás com valências misturadas de Ru2(II, III) contendo ligações metal-metal estabilizadas por quatro pontes carboxiladas as quais se ligam às drogas mencionadas acima (Fig. 1).

Como vimos nos resultados deste trabalho o Ru-Ibp foi capaz de interferir na expressão de muitas moléculas envolvidas em diferentes processos celulares, tais como o controle do ciclo celular, apoptose, invasão e angiogênese. Todavia não sabíamos ao certo o que estava acontecendo com as células C6 após o tratamento com essa droga. Nós apenas tínhamos uma noção a partir do que era possível encher ao microscópio. Dessa forma a análise de FACS nos permitiu entender melhor como ela está agindo sobre essas células. Começando pela análise do ciclo celular viu-se que o tratamento com esse composto foi capaz de causar uma parada na fase subG1 e G1 com uma consequente diminuição do número de células na fase S do ciclo celular de C6 (Fig. 4). Notou-se também uma variação da quantidade de DNA após o tratamento. Ou seja, encontram-se células poliplóides (2n, 4n, 8n, etc). Isso significa que a célula está só sintetizando DNA, mas não se divide. Por essa razão o pico em G2/M (M4) se encontra menor nas células tratadas (Fig. 4). Além disso, a análise da granulosidade citoplasmática em SSC se mostrou mais aumentada que no controle. Como se sabe, outros complexos organometálicos contendo rutênio também são capazes de comprometerem o controle normal do ciclo celular, uma vez que são capazes de se ligar à molécula de DNA, podendo levar a uma parada do ciclo celular principalmente nas fases G2 e M (Zorz et al., 2000; Bergamo et al., 2001) onde sabidamente o DNA está mais vulnerável a qualquer droga capaz de interagir com essa molécula. Notavelmente, usando-se um marcador para mitocôndria viu-se que após o tratamento com RuIbp o pico em M2 no canal FL1-H apresenta uma queda em relação ao controle, ou seja, a função mitocondrial foi razoavelmente prejudicada. Além disso, usou-se um marcador para mostrar a liberação de superóxido pela mitocôndria, o qual apareceu levemente aumentado após o tratamento. Vale lembrar que a oxidação mitocondrial incompleta resulta na produção de moléculas de ânion superóxido, entre outras, as quais podem provocar danos às proteínas, ao DNA e RNA, aos lipídios, especialmente fosfolipídios de membranas celulares e também as frações lipídicas de lipoproteínas plasmáticas (peroxidação lipídica), além de danificarem os carboidratos. Dessa forma, é possível especular que esse excesso de radicais livres e espécies reativas de oxigênio que

estão sendo liberados contribua para uma falência mitocondrial nessas células. Além disso, tal estresse oxidativo também causa abertura dos canais iônicos na membrana da mitocôndria e liberação da proteína citocromo *c*, que provoca a ativação de diversas enzimas executoras da morte celular programada, as caspases, culminando assim, no processo de apoptose.

Em termos dos avanços moleculares na oncologia, um interesse tem sido centrado na modulação da atividade e expressão da enzima ciclooxigenase (COX), usando inibidores específicos dessa enzima, cuja expressão é aumentada em vários tipos de tumor, incluindo gliomas (Kokoglu et al., 1998; Lim et al., 2001; Lim et al., 2002; Shono et al., 2001) e nas células C6 *in vivo*. O potencial dos inibidores de COX-2 em induzir apoptose e inibir angiogênese e o crescimento do tumor em uma variedade de tumores é descrito por muitos trabalhos (Patti et al., 2002; Kardosh et al., 2004; Patel et al., 2005), todavia, as células C6 *in vitro* expressam apenas COX-1 e não COX-2, (último gráfico da Fig. 14). Dessa forma, poderíamos concluir de imediato neste trabalho que a ação antiproliferativa previamente constatada do Ibuprofeno e do complexo Rutênio-Ibuprofeno sobre as células C6 *in vitro* é independente da COX-2, podendo alterar a expressão gênica de diversas outras moléculas (Figuras 14 e 15). Dessa forma, viu-se que o complexo Ru-Ibp foi capaz de aumentar a expressão gênica e protéica de C-myc, que segundo Vita & Henriksson (2006) e Mo et al. (2006), o aumento da expressão dessa proteína pode levar a uma morte celular programada (apoptose) via mecanismo dependente de p53. O RNA mensageiro (RNAm) de nm23 α e β também se mostraram aumentados após o tratamento com Ru-Ibp, e segundo Postel et al. (2000) o aumento de nm23 α pode causar uma ativação da transcrição de c-myc. Igualmente envolvida no aumento da expressão gênica de c-myc seria a proteína p65 (NF-kB) (Greten & Karin, 2004) que também teve sua expressão gênica aumentada pelo Ru-Ibp. Vale ressaltar que o nm23 β pode levar a uma diminuição da expressão e ativação da metaloprotease-2 (MMP-2) (Cheng et al., 2002), a qual, como mencionamos anteriormente, pode ser inibida por outros compostos contendo rutênio, como o NAMI-A (Sava et al., 2003), podendo então ser por essa via que ocorre a inibição da ativação dessa metaloprotease. Vale ressaltar que análises prévias já demonstraram que a MMP-2 é altamente expressa pelas células C6 *in vivo* quando comparado ao tecido cerebral normal (Fig. 8), lembrando que a mesma é muito pouco e variavelmente expressa pelas células *in vitro* (Fig. 7), não sendo possível, portanto, a análise comparativa do tratamento com Ru-Ibp sobre a expressão dessa molécula nessa condição. Outro mecanismo pelo qual o aumento do nm23 poderia repercutir sobre a progressão e sobrevivência

das células C6 *in vitro* seria através da inativação da ciclina B e conseqüente estabilização das células na fase G2 do ciclo celular (Suhardja et al., 1999).

O tratamento com Ru-Ibp também causou um aumento nos níveis de E2F-1, sugerindo que ocorra, com isso, uma conseqüente ativação de genes pro-apoptóticos como PUMA e Bax (Hao et al., 2007) de forma dependente da via do p53, uma vez que o E2F-1 é capaz de ativar o p14/p19 e o próprio p53 (Ivanchuk et al., 2001), além de regular a expressão de proteínas como o C-myc (Hiebert et al., 1989; Thalmeier et al., 1989; Mudryj et al., 1990; Oswald et al., 1994). Análises posteriores demonstraram que o Ru-Ibp também foi capaz de aumentar a expressão gênica de p53. Comprovando assim um envolvimento dessa via de sinalização mediada por essa molécula, da qual também pudemos constatar índices elevados tanto do RNAm quanto da proteína relativa ao Bax. Além disso, os níveis do RNAm de p21 e p27 após o tratamento com Ru-Ibp também se mostraram elevados, contribuindo então, não somente para um mecanismo pro-apoptótico, mas também para uma parada do ciclo celular. Esses resultados apontam para uma atuação semelhante do Ru-Ibp em relação ao Ibuprofeno sozinho, já que a via do p53 também demonstrou ser importante para a ação antiproliferativa dessa droga (Janssen et al., 2008). Comparativamente, em um estudo recente sobre o mecanismo de ação de outro complexo de rutênio (RM175) sobre células tumorais HCT116 de câncer colorretal, essa droga mostrou ser capaz de aumentar os níveis de p53, p21 e bax nessas células, levando assim a uma parada do ciclo celular e conseqüente apoptose (Hayward et al., 2005). Mais adiante, ao analisarmos a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 após o tratamento, a fim de comparar com a de Bax, previamente comentada, verificamos que houve uma queda em torno de 85% dos níveis dessa proteína em relação às células controle. É importante mencionar que a queda nos níveis de Bcl-2 após o tratamento com Ru-Ibp pode estar diretamente ligada com o aumento de E2F-1 e C-myc (Eischen et al., 2001). Como já dito, complexos organometálicos contendo rutênio são capazes de se ligar à molécula de DNA, podendo levar a uma parada do ciclo celular principalmente nas fases G2 e M (Zorz et al., 2000; Bergamo et al., 2001) onde sabidamente o DNA está mais vulnerável a qualquer droga capaz de interagir com essa molécula. Dessa forma, danos constitutivos causados à molécula de DNA podem ocasionar uma diminuição da proteína retinoblastoma (Rb) (Tort et al., 2006). Não longe, o tratamento com Ru-Ibp foi capaz de diminuir a expressão dessa molécula, mostrando assim mais um alvo molecular dessa nova droga. Estudos mostram ainda que a perda da expressão de pRb e a ativação de C-myc resultam numa

repressão ou supressão de Ciclina D1 (Philipp et al., 1994; Marhin et al., 1996). Mais adiante, ao analisar a expressão gênica dessa proteína após o tratamento com Ru-Ibp, constatou-se que realmente ocorre uma diminuição da expressão de Ciclina D1. Outro possível mecanismo para a explicação desse fato seria através da diminuição da ativação de EP4 que pode levar a inibição da síntese de COX-2 e PGE2, o que significa uma menor fosforilação e ativação de ERK1 e 2, impedindo a transcrição de diversos genes incluindo a ciclina D1 (Telliez et al., 2006). Assim, ao analisar a expressão gênica dos receptores de PGE2 constatou-se que os níveis do RNAm do EP4 realmente se mostram diminuídos após o tratamento. O Ru-Ibp também foi capaz de diminuir a expressão gênica de EP1, mostrando assim mais uma possível via pela qual essa droga pode exercer o seu mecanismo inibitório do crescimento celular tumoral. Além disso, análises da expressão gênica de ERK1 e ERK2 também foram realizadas, sendo que apenas a da última se mostrou alterada. Todavia, são necessárias análises da expressão protéica, fosforilação e ativação dessas proteínas para comprovar o envolvimento das mesmas no mecanismo de ação do Ru-Ibp.

Um aumento da expressão do VEGFA também foi obtido após o tratamento com Ru-Ibp. Todavia, estudos com antiinflamatórios não esteróides (AINEs) apontam para um efeito antiangiogênico dessas moléculas, através da inibição de ERK2 e conseqüentemente do seu transcrito, o VEGFA (Tarnavski et al., 2003). Através desse estudo é possível especular que o Ru-Ibp poderia estar levando a um hipóxia nessas células aumentando assim a produção dessas proteínas. Mesmo assim, ao analisar os receptores do VEGFA, viu-se que apenas o Flt-1 se mostrou alterado, ou seja, sua expressão foi aumentada após o tratamento. É importante mencionar que segundo Lamszus et al. (2003), o Flt-1 atua como um antagonista do VEGFA. Assim, seriam necessários mais estudos para saber se a quantidade da proteína VEGFA que estaria sendo traduzida é relativamente mais alta, mais baixa, ou equivalente à quantidade do seu receptor Flt-1, e só assim nos assegurar de que há realmente um efeito do tratamento sobre esses fatores angiogênicos. De qualquer forma, análises *in vivo* são necessárias para melhor avaliar os supostos efeitos dessa droga sobre a angiogênese.

Segundo Taniura et al. (2002), o uso de inibidores da enzima histona desacetilase (HDACI) em células de glioma causa um aumento da expressão e da atividade da enzima COX-1. Estudos adicionais, mostram ainda, que os HDACIs podem levar a uma parada do ciclo celular e apoptose de células tumorais (Wetzel et al., 2005) e por essa razão estão sendo extensivamente estudados e já utilizados em terapias anti-gliomas (Entin-Meer et al., 2007). Em relação à ação do

Ru-Ibp sobre a expressão do RNAm da enzima COX-1 no presente trabalho, foi possível constatar um aumento do mesmo após o tratamento, levantando a hipótese de que esse seja o mecanismo pelo qual ocorra a diminuição em 50% da formação de úlcera gástrica previamente demonstrada por Andrade et al., 2000.

De um modo geral, esses resultados comprovam que o Ru-Ibp é uma nova droga com uma potencial capacidade indutora de apoptose e parada do ciclo celular e que envolve importantes proteínas ligadas às vias de p53 e pRb (Esquema 16) e supostamente dos receptores de PGE2 em seu mecanismo de ação. Todavia, mais estudos são necessários para se confirmar a atuação de Ru-Ibp sobre a via dos receptores de PGE2.

Esquema 16. Suposto envolvimento das vias do p53 e do pRb no mecanismo de ação do Ru-Ibp. O E2F-1 pode ativar tanto o p53 diretamente quanto indiretamente através da proteína p14, a qual se complexa com MDM2 e p53 para estabilizar o próprio p53 e prevenir sua degradação. O E2F-1 também pode ativar a transcrição de C-myc, assim como o nm23α e o p65 (NF-κB) também o fazem. Ambos C-myc e E2F-1 podem inibir a expressão de Bcl-2. A ativação de C-myc pode diretamente inibir a expressão de Ciclina D1. A diminuição da expressão de pRb em conjunto com o aumento da expressão de C-myc também pode contribuir para a diminuição dos níveis de Ciclina D1 (ver texto para mais detalhes e referências).

6 CONCLUSÕES

Tendo em vista a proposta inicial de elucidar melhor o mecanismo de ação do ácido γ -linolênico (GLA) em gliomas, vimos que o mesmo foi capaz de causar mudanças na expressão gênica e protéica de importantes proteínas ligadas ao controle do ciclo celular, apoptose, migração, invasão e angiogênese *in vitro* e *in vivo*, tais como:

- aumento dos níveis da proteína indutora de apoptose Bax *in vitro*;
- diminuição dos níveis da proteína envolvida no controle do ciclo celular E2F-1 *in vitro*;
- aumento dos níveis da proteína reguladora do ciclo celular e apoptose p53 *in vivo*;
- diminuição dos níveis das proteínas ligadas ao controle da transcrição de genes importantes para a progressão do ciclo celular e apoptose ERK1 e ERK2 *in vivo*;

Em segundo lugar, de acordo com a proposta deste trabalho, concluímos que a ação antiproliferativa de antiinflamatórios não esteróides (AINEs) como o Ibuprofeno e o Naproxeno é potencializada quando complexados quimicamente com o Rutênio. Partindo disso, resolveu-se então elucidar o mecanismo de ação pelo qual essas novas drogas atuam. Todavia, escolheu-se o complexo Rutênio-Ibuprofeno (Ru-Ibp) em função dos aspectos clínicos da droga Ibuprofeno em comparação com o Naproxeno. Assim, observamos que o Ru-Ibp foi capaz de causar uma modificação tempo-dependente da expressão gênica e protéica de importantes proteínas ligadas aos mecanismos celulares mencionados acima, tais como:

- aumento dos níveis da proteína indutora de apoptose Bax *in vitro*;
- diminuição dos níveis da proteína inibidora de apoptose Bcl-2 *in vitro*;

Com esses resultados, vemos que novos alvos para o mecanismo de ação do GLA foram encontrados. Além disso, vimos que alguns AINEs contendo Rutênio são mais antiproliferativos que esses AINEs sozinhos e que o composto Ru-Ibp se mostrou uma nova droga com um mecanismo de ação independente da inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2) sobre as células C6, uma vez que as mesmas não expressam essa proteína *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Altinoz MA, Ozar E, Taskin M, Bozcali E, Bilir A, Altug T, Aydiner A, Sav A. Vascularization pattern of C6 glioma is modified with medroxyprogesterone acetate and ibuprofen in Wistar rat brain. *Pathol Oncol Res.* 2001; 7:185-9.

Altorki NK, Keresztes RS, Port JL, Libby DM, Korst RJ, Flieder DB, Ferrara CA, Yankelevitz DF, Subbaramaiah K, Pasmantier MW, Dannenberg AJ. Celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, enhances the response to preoperative paclitaxel and carboplatin in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2003; 21:2645-50.

Alvarez-Dolado M, Gonzalez-Sancho JM, Navarro-Yubero C, Garcia-Fernandez LF, Munoz A. Retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibit tenascin-C expression in rat glioma C6 cells. *J Neurosci Res.* 1999; 58:293-300.

Ambar I, Sokolovsky M. Endothelin receptors stimulate both phospholipase C and phospholipase D activities in different cell lines. *Eur J Pharmacol.* 1993 Mar 15;245(1):31-41.

An J, Xu QZ, Sui JL, Bai B, Zhou PK. Downregulation of c-myc protein by siRNA-mediated silencing of DNA-PKcs in HeLa cells. *Int J Cancer.* 2005; 117:531 – 537.

Andrade A, Namora SF, Woisky RG, Wiesel G, Najjar R, Sertié JA, de Oliveira Silva D. Synthesis and characterization of a diruthenium-ibuprofenato complex comparing its anti-inflammatory activity with that of a copper(II)-ibuprofenato complex. *J Inorg Biochem.* 2000; 81:23-7.

Andrews J, Djakiew D, Krygier S, Andrews P. Superior effectiveness of ibuprofen compared with other NSAIDs for reducing the survival of human prostate cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002; 50:277-84.

Ansari SA, Safak M, Del Valle L, Enam S, Amini S, Khalili K. Cell cycle regulation of NF-kappa b-binding activity in cells from human glioblastomas. *Exp Cell Res.* 2001; 265:221-233.

Arifin MT, Hama S, Kajiwarra Y, Sugiyama K, Saito T, Matsuura S, Yamasaki F, Arita K, Kurisu K. Cytoplasmic, but not nuclear, p16 expression may signal poor prognosis in high-grade astrocytomas. *J Neurooncol.* 2006; 77:273-277.

Arnaud-Dabernat S, Masse K, Smani M, Peuchant E, Landry M, Bourbon PM, Le Floch R, Daniel JY, Larou M. Nm23-M2/NDP kinase B induces endogenous c-myc and nm23-M1/NDP

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

kinase A overexpression in BAF3 cells. Both NDP kinases protect the cells from oxidative stress-induced death. *Exp Cell Res*. 2004 Dec 10;301(2):293-304.

Bacon CL, Gallagher HC, Haughey JC, Regan CM. Antiproliferative action of valproate is associated with aberrant expression and nuclear translocation of cyclin D3 during the C6 glioma G1 phase. *J Neurochem*. 2002; 83:12-19.

Badie B, Schartner JM, Hagar AR, Prabakaran S, Peebles TR, Bartley B, Lapsiwala S, Resnick DK, Vorpahl J. Microglia cyclooxygenase-2 activity in experimental gliomas: possible role in cerebral edema formation. *Clin Cancer Res*. 2003 Feb;9(2):872-7.

Bakshi A, Mukherjee D, Bakshi A, Banerji AK, Das UN. Gamma-linolenic acid therapy of human gliomas. *Nutrition*. 2003; 19:305-309.

Baronzio GF, Solbiati L, Ierace T, Barzaghi F, Suter F, Airolidi M, Belloni G, et al. Adjuvant therapy with essential fatty acids (EFAs) for primary liver tumors: some hypotheses. *Med Hypotheses*. 1995 Mar;44(3):149-54.

Bar-Sagi D, Hall A. Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell*. 2000 Oct 13;103(2):227-38.

Bartolomei M, Mazzetta C, Handkiewicz-Junak D, Bodei L, Rocca P, Grana C, Maira G, Sturiale C, Villa G, Paganelli G. Combined treatment of glioblastoma patients with locoregional pre-targeted 90Y-biotin radioimmunotherapy and temozolomide. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2004; 48:220-228.

Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*. 1996; 274:782-784.

Bégin ME, Ells G, Das UN. Selected fatty acids as possible intermediates for selective cytotoxic activity of anticancer agents involving oxygen radicals. *Anticancer Res*. 1986 Mar-Apr;6(2):291-5.

Bégin ME, Ells G, Horrobin DF. Polyunsaturated fatty acid-induced cytotoxicity against tumor cells and its relationship to lipid peroxidation. *J Natl Cancer Inst*. 1988; 80:188-94.

Bell HS, Wharton SB, Leaver HA, Whittle IR. Effects of N-6 essential fatty acids on glioma invasion and growth: experimental studies with glioma spheroids in collagen gels. *J Neurosurg* 1999; 91:989-996.

Benoit V, Relic B, Leval Xd X, Chariot A, Merville MP, Bours V. Regulation of HER-2 oncogene expression by cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2. *Oncogene*. 2004 Feb 26;23(8):1631-5.

Berberich SJ, Postel EH. PuF/NM23-H2/NDPK-B transactivates a human c-myc promoter-CAT gene via a functional nuclease hypersensitive element. *Oncogene*. 1995 Jun 15;10(12):2343-7.

- Berens ME, Rief MD, Loo MA, Giese A. The role of extracellular matrix in human astrocytoma migration and proliferation studied in a microliter scale assay. *Clin Exp Metastasis*. 1994; 12:405-415.
- Bergamo A, Gava B, Alessio E, Mestroni G, Serli B, Cocchietto M, Zorzet S, Sava G. Ruthenium-based NAMI-A type complexes with in vivo selective metastasis reduction and in vitro invasion inhibition unrelated to cell cytotoxicity. *Int J Oncol*. 2002; 21:1331-8.
- Bergamo A, Messori L, Piccioli F, Cocchietto M, Sava G. Biological role of adduct formation of the ruthenium(III) complex NAMI-A with serum albumin and serum transferrin. *Invest New Drugs*. 2003; 21:401-11.
- Bergamo A, Zorzet S, Cocchietto M, Carotenuto ME, Magnarin M, Sava G. Tumour cell uptake G2-M accumulation and cytotoxicity of NAMI-A on TS/A adenocarcinoma cells. *Anticancer Res*. 2001; 21:1893-8.
- Berger MR, Garzon FT, Keppler BK, Schmähl D. Efficacy of new ruthenium complexes against chemically induced autochthonous colorectal carcinoma in rats. *Anticancer Res*. 1989 May-Jun;9(3):761-5.
- Bharti AC, Aggarwal BB. Chemopreventive agents induce suppression of nuclear factor-kappaB leading to chemosensitization. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 973:392-95.
- Biggs J, Hersperger E, Steeg PS, Liotta LA, Shearn A. A Drosophila gene that is homologous to a mammalian gene associated with tumor metastasis codes for a nucleoside diphosphate kinase. *Cell*. 1990; 63:933-940.
- Bigner DD, Brown M, Coleman RE, Friedman AH, Friedman HS, McLendon RE, Bigner SH, Zhao XG, Wikstrand CJ, Pegram CN, et al. Phase I studies of treatment of malignant gliomas and neoplastic meningitis with ¹³¹I-radiolabeled monoclonal antibodies anti-tenascin 81C6 and anti-chondroitin proteoglycan sulfate Me1-14 F (ab')₂--a preliminary report. *J Neurooncol*. 1995; 24:109-122.
- Bigner DD, Brown MT, Friedman AH, Coleman RE, Akabani G, Friedman HS, Thorstad WL, McLendon RE, Bigner SH, Zhao XG, Pegram CN, Wikstrand CJ, Herndon JE 2nd, Vick NA, Paleologos N, Cokgor I, Provenzale JM, Zalutsky MR. Iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 treatment of patients with recurrent malignant gliomas: phase I trial results. *J Clin Oncol*. 1998; 16:2202-2212.
- Binder DK, Berger MS. Proteases and the biology of glioma invasion. *J Neurooncol*. 2002; 56:149-158.
- Boiardi A, Silvani A, Ciusani E, Watson A, Margison G, Berger E, Lucas C, Giroux B. Fotemustine combined with procarbazine in recurrent malignant gliomas: a phase I study with evaluation of lymphocyte O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity. *J Neurooncol*. 2001; 52:149-156.

- Bosone I, Cavalla P, Chiadò-Piat L, Vito ND, Schiffer D. Cyclin D1 expression in normal oligodendroglia and microglia cells: its use in the differential diagnosis of oligodendrogliomas. *Neuropathology*. 2001; 21:155-161.
- Bouvard D, Block MR. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II controls integrin $\alpha 5 \beta 1$ -mediated cell adhesion through the integrin cytoplasmic domain associated protein-1 α . *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Nov 9;252(1):46-50.
- Brat DJ, Van Meir EG. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab Invest*. 2004; 84:397-405.
- Cai J, Jiang WG, Mansel RE. Inhibition of angiogenic factor- and tumour-induced angiogenesis by gamma linolenic acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1999a Jan;60(1):21-9.
- Cai J, Jiang WG, Mansel RE. Inhibition of the expression of VE-cadherin/catenin complex by gamma linolenic acid in human vascular endothelial cells, and its impact on angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999b Apr 29;258(1):113-8.
- Casper D, Lekhraj R, Yaparpalvi US, Pidel A, Jaggernauth WA, Werner P, Tribius S, Rowe JD, LaSala PA. Acetaminophen selectively reduces glioma cell growth and increases radiosensitivity in culture. *J Neurooncol*. 2000;46(3):215-29.
- Chae SK, Lee NS, Lee KJ, Kim E. Transactivation potential of the C-terminus of human Nm23-H1. *FEBS Lett*. 1998 Feb 20;423(2):235-8.
- Chakravarti A, Delaney MA, Noll E, Black PM, Loeffler JS, Muzikansky A, Dyson NJ. Prognostic and pathologic significance of quantitative protein expression profiling in human gliomas. *Clin Cancer Res*. 2001; 7:2387-95.
- Chan AS, Leung SY, Wong MP, Yuen ST, Cheung N, Fan YW, Chung LP. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the anaplastic progression of astrocytoma, oligodendroglioma, and ependymoma. *Am J Surg Pathol*. 1998; 22:816-26.
- Chang HW, Kim SY, Yi SL, Son SH, Song do Y, Moon SY, Kim JH, Choi EK, Ahn SD, Shin SS, Lee KK, Lee SW. Expression of Ku80 correlates with sensitivities to radiation in cancer cell lines of the head and neck. *Oral Oncol*. 2006 Nov;42(10):979-86.
- Chen WS, Liu JH, Liu JM, Lin JK. Sequence-dependent effect of a cyclooxygenase-2 inhibitor on topoisomerase I inhibitor and 5-fluorouracil-induced cytotoxicity of colon cancer cells. *Anticancer Drugs*. 2004; 15:287-94.
- Cheng S, Alfonso-Jaume MA, Mertens PR, Lovett DH. Tumour metastasis suppressor, nm23-beta, inhibits gelatinase A transcription by interference with transactivator Y-box protein-1 (YB-1). *Biochem J*. 2002; 366:807-816.

- Choudhuri T, Verma SC, Lan K, Robertson ES. Expression of alpha V integrin is modulated by Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and the metastasis suppressor nm23-H1 through interaction with the GATA-1 and Sp1 transcription factors. *Virology*. 2006; 351:58-72.
- Chung S, Park S, Yang CH. Unsaturated fatty acids bind Myc-Max transcription factor and inhibit Myc-Max-DNA complex formation. *Cancer Lett*. 2002; 188:153-62.
- Chung SW, Kang BY, Kim TS. Inhibition of interleukin-4 production in CD4+ T cells by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands: involvement of physical association between PPAR-gamma and the nuclear factor of activated T cells transcription factor. *Mol Pharmacol*. 2003 Nov;64(5):1169-79.
- Clandinin MT, Cheema S, Field CJ, Garg ML, Venkatraman J, Clandinin TR. Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function. *FASEB J*. 1991; 5:2761-2769.
- Clarke MJ. Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coord Chem Rev*. 2003; 236:209-33.
- Colquhoun A, de Mello FE, Curi R. Regulation of tumour cell fatty acid oxidation by n-6 polyunsaturated fatty acids. *Biochem Mol Biol Int*. 1998 Jan;44(1):143-50.
- Colquhoun A, Schumacher RI. gamma-Linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation, lipid peroxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Oct 31;1533(3):207-19.
- Colquhoun A. Gamma-linolenic acid alters the composition of mitochondrial membrane subfractions, decreases outer mitochondrial membrane binding of hexokinase and alters carnitine palmitoyltransferase I properties in the Walker 256 rat tumour. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Jun 13;1583(1):74-84.
- Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest*. 1989; 84:1470-78.
- Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene*. 2002; 299:35-55. Review.
- Costanzo V, Robertson K, Bibikova M, Kim E, Grieco D, Gottesman M, Carroll D, Gautier J. Mre11 protein complex prevents double-strand break accumulation during chromosomal DNA replication. *Mol Cell*. 2001; 8:137-147.
- Cowan KN, Jones PL, Rabinovitch M. Elastase and matrix metalloproteinase inhibitors induce regression, and tenascin-C antisense prevents progression, of vascular disease. *J Clin Invest*. 2000; 105:21-34.

- Cressey R, Pimpa S, Tontrong W, Watananupong O, Lertprasertsuke N. Expression of cyclooxygenase-2 in colorectal adenocarcinoma is associated with p53 accumulation and hdm2 overexpression. *Cancer Lett.* 2006 Feb 28;233(2):232-9.
- Dai H, Marbach P, Lemaire M, Hayes M, Elmquist WF. Distribution of STI-571 to the brain is limited by P-glycoprotein-mediated efflux. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 304:1085-92.
- Danen EH, Sonneveld P, Sonnenberg A, Yamada KM. Dual stimulation of Ras/mitogen-activated protein kinase and RhoA by cell adhesion to fibronectin supports growth factor-stimulated cell cycle progression. *J Cell Biol.* 2000 Dec 25;151(7):1413-22.
- Das UN. From bench to the clinic: gamma-linolenic acid therapy of human gliomas. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2004; 70:23-32.
- Das UN, Prasad VV, Reddy DR. Local application of gamma-linolenic acid in the treatment of human gliomas. *Cancer Lett.* 1995; 94:147-155.
- Das UN, Rao KP. Effect of gamma-linolenic acid and prostaglandins E1 on gamma-radiation and chemical-induced genetic damage to the bone marrow cells of mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2006 Mar;74(3):165-73.
- Das UN. A radical approach to cancer. *Med Sci Monit.* 2002 Apr;8(4):79-92.
- Das UN. Gamma-linolenic acid therapy of human glioma-a review of in vitro, in vivo, and clinical studies. *Med Sci Monit.* 2007; 13:119-31.
- Davis JN, McCabe MT, Hayward SW, Park JM, Day ML. Disruption of Rb/E2F pathway results in increased cyclooxygenase-2 expression and activity in prostate epithelial cells. *Cancer Res.* 2005 May 1;65(9):3633-42.
- Deininger MH, Weller M, Streffer J, Mittelbronn M, Meyermann R. Patterns of cyclooxygenase-1 and -2 expression in human gliomas in vivo. *Acta Neuropathol.* 1999 Sep;98(3):240-4.
- Demuth T, Berens ME. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol.* 2004; 70:217-228.
- Ding H, Han C, Gibson-D'Ambrosio R, Steele VE, D'Ambrosio SM. Piroxicam selectively inhibits the growth of premalignant and malignant human oral cell lines by limiting their progression through the S phase and reducing the levels of cyclins and AP-1. *Int J Cancer.* 2003 Dec 10;107(5):830-6.
- Ding H, Han C, Gibson-D'Ambrosio R, Steele VE, D'Ambrosio SM. Piroxicam selectively inhibits the growth of premalignant and malignant human oral cell lines by limiting their progression through the S phase and reducing the levels of cyclins and AP-1. *Int J Cancer.* 2003 Dec 10;107(5):830-6.

- Djinović V, Momčilović M, Grgurić-Sipka S, Trajković V, Mostarica Stojković M, Miljković D, Sabo T. Novel ruthenium complex K₂[Ru(dmgl)₂Cl₄].2H₂O is toxic to C6 astrocytoma cell line, but not to primary rat astrocytes. *J Inorg Biochem.* 2004 Dec;98(12):2168-73.
- Dohadwala M, Batra RK, Luo J, Lin Y, Krysan K, Pold M, Sharma S, Dubinett SM. Autocrine/paracrine prostaglandin E₂ production by non-small cell lung cancer cells regulates matrix metalloproteinase-2 and CD44 in cyclooxygenase-2-dependent invasion. *J Biol Chem.* 2002 Dec 27;277(52):50828-33.
- Dommels YE, Haring MM, Keestra NG, Alink GM, van Bladeren PJ, van Ommen B. The role of cyclooxygenase in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid mediated effects on cell proliferation, PGE(2) synthesis and cytotoxicity in human colorectal carcinoma cell lines. *Carcinogenesis.* 2003 Mar;24(3):385-92.
- Dong SM, Pang JC, Poon WS, Hu J, To KF, Chang AR, Ng HK. Concurrent hypermethylation of multiple genes is associated with grade of oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001; 60:808-16.
- Dowhan W, Mileyskoykaya E, Bogdanov M. Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1666:19-39.
- Dyson PJ, Sava G. Metal-based antitumour drugs in the post genomic era. *Dalton Trans.* 2006; 16:1929-33.
- Eibl G, Bruemmer D, Okada Y, Duffy JP, Law RE, Reber HA, Hines OJ. PGE(2) is generated by specific COX-2 activity and increases VEGF production in COX-2-expressing human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jul 11;306(4):887-97.
- Entin-Meer M, Yang X, VandenBerg SR, Lamborn KR, Nudelman A, Rephaeli A, Haas-Kogan DA. In vivo efficacy of a novel histone deacetylase inhibitor in combination with radiation for the treatment of gliomas. *Neuro Oncol.* 2007 Apr;9(2):82-8.
- Escrich E, Solanas M, Moral R, Costa I, Grau L. Are the olive oil and other dietary lipids related to cancer? Experimental evidence. *Clin Transl Oncol.* 2006; 8:868-883.
- Evans RJ, Wyllie FS, Wynford-Thomas D, Kipling D, Jones CJ. A P53-dependent, telomere-independent proliferative life span barrier in human astrocytes consistent with the molecular genetics of glioma development. *Cancer Res.* 2003; 63:4854-61.
- Fan YY, Chapkin RS. Importance of dietary gamma-linolenic acid in human health and nutrition. *J Nutr.* 1998 Sep;128(9):1411-4.
- Fanton CP, McMahon M, Pieper RO. Dual growth arrest pathways in astrocytes and astrocytic tumors in response to Raf-1 activation. *J Biol Chem.* 2001; 276:18871-77.

- Farrell CL, Megyesi J, Del Maestro RF. Effect of ibuprofen on tumor growth in the C6 spheroid implantation glioma model. *J Neurosurg.* 1988; 68:925-30.
- Feldkamp MM, Lala P, Lau N, Roncari L, Guha A. Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens. *Neurosurgery.* 1999 Dec;45(6):1442-53.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004; 25:581-611.
- Ferrari V, Valcamonico F, Amoroso V, Simoncini E, Vassalli L, Marpicati P, Rangoni G, Grisanti S, Tibério GA, Nodari F, Strina C, Marini G. Gemcitabine plus celecoxib (GECO) in advanced pancreatic cancer: a phase II trial. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006; 57:185-90.
- Fiano V, Ghimenti C, Schiffer D. Expression of cyclins, cyclin-dependent kinases and cyclin-dependent kinase inhibitors in oligodendrogliomas in humans. *Neurosc. Lett.* 2003;347:111-15.
- Fiebich BL, Schleicher S, Spleiss O, Czygan M, Hüll M. Mechanisms of prostaglandin E2-induced interleukin-6 release in astrocytes: possible involvement of EP4-like receptors, p38 mitogen-activated protein kinase and protein kinase C. *J Neurochem.* 2001 Dec;79(5):950-8.
- Fournier HN, Albigès-Rizo C, Block MR. New insights into Nm23 control of cell adhesion and migration. *J Bioenerg Biomembr.* 2003; 35:81-87.
- Frausin F, Scarcia V, Cocchietto M, Furlani A, Serli B, Alessio E, Sava G. Free exchange across cells, and echistatin-sensitive membrane target for the metastasis inhibitor NAMI-A (imidazolium trans-imidazole dimethyl sulfoxide tetrachlororuthenate) on KB tumor cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 313:227-33.
- Fueyo J, Gomez-Manzano C, Liu TJ, Yung WK. Delivery of cell cycle genes to block astrocytoma growth. *J Neurooncol.* 2001; 51:277-287.
- Fujiwara F, Todo S, Imashuku S. Antitumor effect of gamma-linolenic acid on cultured human neuroblastoma cells. *Prostaglandins Leukot Med.* 1986; 23:311-20.
- Furnari FB, Huang HJ, Cavenee WK. The phosphoinositol phosphatase activity of PTEN mediates a serum-sensitive G1 growth arrest in glioma cells. *Cancer Res.* 1998; 58:5002-8.
- Galaktionov K, Chen X, Beach D. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature.* 1996 Aug 8;382(6591):511-7.
- Goldbrunner RH, Bernstein JJ, Tonn JC. ECM-mediated glioma cell invasion. *Microsc Res Tech.* 1998; 43:250-7.

- Gomez-Manzano C, Mitlianga P, Fueyo J, Lee HY, Hu M, Spurgers KB, Glass TL, Koul D, Liu TJ, McDonnell TJ, Yung WK. Transfer of E2F-1 to human glioma cells results in transcriptional up-regulation of Bcl-2. *Cancer Res.* 2001; 61:6693-7.
- Greten FR, Karin M. The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett.* 2004; 206:193-9.
- Grobben B, De Deyn PP, Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res.* 2002; 310:257-70.
- Grosch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Jun 7;98(11):736-47.
- Grosch S, Tegeder I, Niederberger E, Bräutigam L, Geisslinger G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J.* 2001 Dec;15(14):2742-4. Epub 2001 Oct 15.
- Grosu AL, Weber WA, Franz M, Stärk S, Piert M, Thamm R, Gumprecht H, Schwaiger M, Molls M, Nieder C. Reirradiation of recurrent high-grade gliomas using amino acid PET (SPECT)/CT/MRI image fusion to determine gross tumor volume for stereotactic fractionated radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005; 63:511-19.
- Guha A, Feldkamp MM, Lau N, Boss G, Pawson A. Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation. *Oncogene.* 1997 Dec 4;15(23):2755.
- Guha A, Mukherjee J. Advances in the biology of astrocytomas. *Curr Opin Neurol.* 2004; 17:655-62.
- Gullo C, Au M, Feng G, Teoh G. The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Apr;1765(2):223-34.
- Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS Jr. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol.* 1999; 19:5785-99.
- Hagihara K, Miura R, Kosaki R, Berglund E, Ranscht B, Yamaguchi Y. Immunohistochemical evidence for the brevican-tenascin-R interaction: colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain. *J Comp Neurol.* 1999; 410:256-64.
- Hailat N, Keim DR, Melhem RF, Zhu XX, Eckerskorn C, Brodeur GM, et al. High levels of p19/nm23 protein in neuroblastoma are associated with advanced stage disease and with N-myc gene amplification. *J Clin Invest.* 1991 Jul;88(1):341-5.
- Han S, Ritzenthaler JD, Wingerd B, Roman J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) increases the expression of prostaglandin E2 receptor

subtype EP4. The roles of phosphatidylinositol 3-kinase and CCAAT/enhancer-binding protein beta. *J Biol Chem*. 2005 Sep 30;280(39):33240-9.

Hao H, Dong Y, Bowling MT, Gomez-Gutierrez JG, Zhou HS, McMasters KM. E2F-1 induces melanoma cell apoptosis via PUMA up-regulation and Bax translocation. *BMC Cancer*. 2007 Jan 30;7:24.

Hartinger CG, Zorbas-Seifried S, Jakupec MA, Kynast B, Zorbas H, Keppler BK. From bench to bedside--preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). *J Inorg Biochem*. 2006; 100:891-904.

Hasegawa K, Yoshida T, Matsumoto K, Katsuta K, Waga S, Sakakura T. Differential expression of tenascin-C and tenascin-X in human astrocytomas. *Acta Neuropathol*. 1997 May;93(5):431-7.

Hayward RL, Schornagel QC, Tente R, Macpherson JS, Aird RE, Guichard S, Habtemariam A, Sadler P, Jodrell DI. Investigation of the role of Bax, p21/Waf1 and p53 as determinants of cellular responses in HCT116 colorectal cancer cells exposed to the novel cytotoxic ruthenium(II) organometallic agent, RM175. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005 Jun;55(6):577-83. Epub 2005 Feb 22.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005; 352:997-1003.

Heidenreich R, Machein M, Nicolaus A, Hilbig A, Wild C, Clauss M, Plate KH, Breier G. Inhibition of solid tumor growth by gene transfer of VEGF receptor-1 mutants. *Int J Cancer*. 2004 Sep 1;111(3):348-57.

Herceg Z, Hulla W, Gell D, Cuenin C, Leonart M, Jackson S, Wang ZQ. Disruption of Trp53 causes early embryonic lethality and defects in cell cycle progression. *Nat Genet*. 2001; 29:206-11.

Hiebert SW, Lipp M, Nevins JR. E1A-dependent trans-activation of the human MYC promoter is mediated by the E2F factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 May;86(10):3594-8.

Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:9349-9354.

Hlatky L, Tsionou C, Hahnfeldt P, Coleman CN. Mammary fibroblasts may influence breast tumor angiogenesis via hypoxia-induced vascular endothelial growth factor up-regulation and protein expression. *Cancer Res*. 1994; 54:6083-6086.

- Hoelzinger DB, Demuth T, Berens ME. Autocrine Factors That Sustain Glioma Invasion and Paracrine Biology in the Brain Microenvironment. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99:1583-93
- Hong C, Bollen AW, Costello JF. The contribution of genetic and epigenetic mechanisms to gene silencing in oligodendrogliomas. *Cancer Res.* 2003; 63:7600-05.
- Horrobin DF. The reversibility of cancer: the relevance of cyclic AMP, calcium, essential fatty acids and prostaglandin E1. *Med Hypotheses.* 1980 May;6(5):469-86.
- Hu B, Guo P, Fang Q, Tao HQ, Wang D, Nagane M, Huang HJ, Gunji Y, Nishikawa R, Alitalo K, Cavenee WK, Cheng SY.. Angiopoietin-2 induces human glioma invasion through the activation of matrix metalloproteinase-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:8904-09.
- Hulbert AJ, Turner N, Storlien LH, Else PL. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2005; 80:155-69.
- Illi B, Puri P, Morgante L, Capogrossi MC, Gaetano C. Nuclear factor-kappaB and cAMP response element binding protein mediate opposite transcriptional effects on the Flk-1/KDR gene promoter. *Circ Res.* 2000 Jun 23;86(12):E110-7.
- Ivanchuk SM, Mondal S, Dirks PB, Rutka JT. The INK4A/ARF locus: role in cell cycle control and apoptosis and implications for glioma growth. *J Neurooncol.* 2001; 51:219-29.
- Jantke J, Ladehoff M, Kürzel F, Zapf S, Kim E, Giese A. Inhibition of the arachidonic acid metabolism blocks endothelial cell migration and induces apoptosis. *Acta Neurochir (Wien).* 2004 May;146(5):483-94.
- Ji L, Arcinas M, Boxer LM. The transcription factor, Nm23H2, binds to and activates the translocated c-myc allele in Burkitt's lymphoma. *J Biol Chem.* 1995 Jun 2;270(22):13392-8.
- Jiang WG, Bryce RP, Horrobin DF, Mansel RE. Regulation of tight junction permeability and occludin expression by polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998a Mar 17;244(2):414-20.
- Jiang WG, Hiscox S, Bryce RP, Horrobin DF, Mansel RE. The effects of n-6 polyunsaturated fatty acids on the expression of nm-23 in human cancer cells. *Br J Cancer.* 1998b; 77:731-38.
- Jiang WG, Hiscox S, Horrobin DF, Bryce RP, Mansel RE. Gamma linolenic acid regulates expression of maspin and the motility of cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 237:639-44.
- Jiang WG, Redfern A, Bryce RP, Mansel RE. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR-gamma) mediates the action of gamma linolenic acid in breast cancer cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2000; 62:119-27.

- Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn*. 2000 Jun;218(2):235-59.
- Jump DB. Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2004; 41:41-78.
- Jung H, Seong Hyun-A, Ha H. NM23-H1 tumor suppressor and its interacting partner STRAP activate p53 function. *J Biol Chem*. 2007; 282:35293-307.
- Jung S, Paek YW, Moon KS, Wee SC, Ryu HH, Jeong YI, Sun HS, Jin YH, Kim KK, Ahn KY, Expression of Nm23 in gliomas and its effect on migration and invasion in vitro. *Anticancer Res*. 2006; 26:249-58.
- Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hehner SP, Droge W, Schmitz ML. Repression of NF-kappaB impairs HeLa cell proliferation by functional interference with cell cycle checkpoint regulators. *Oncogene*. 1999; 18:3213-25.
- Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C. Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1745:287-99.
- Kang KB, Wang TT, Woon CT, Cheah ES, Moore XL, Zhu C, Wong MC. Enhancement of glioblastoma radioresponse by a selective COX-2 inhibitor celecoxib: inhibition of tumor angiogenesis with extensive tumor necrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007 Mar 1;67(3):888-96.
- Kantor JD, McCormick B, Steeg PS, Zetter BR. Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human and murine tumor cells. *Cancer Res*. 1993 May 1;53(9):1971-3.
- Kapitza S, Pongratz M, Jakupiec MA, Heffeter P, Berger W, Lackinger L, Keppler BK, Marian B. Heterocyclic complexes of ruthenium(III) induce apoptosis in colorectal carcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005; 131:101-10.
- Kardosh A, Blumenthal M, Wang WJ, Chen TC, Schönthal AH. Differential effects of selective COX-2 inhibitors on cell cycle regulation and proliferation of glioblastoma cell lines. *Cancer Biol Ther*. 2004 Jan;3(1):55-62. Epub 2004 Jan 22.
- Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:301-10.
- Kaul R, Verma SC, Murakami M, Lan K, Choudhuri T, Robertson ES. Epstein-barr virus protein can upregulate cyclo-oxygenase-2 expression through association with the suppressor of metastasis nm23-H1. *J Virol*. 2006; 80:1321-31.
- Kaur B, Tan C, Brat DJ, Post DE, Van Meir EG. Genetic and hypoxic regulation of angiogenesis in gliomas. *J Neurooncol*. 2004 Nov;70(2):229-43.

- Keim D, Hailat N, Melhem R, Zhu XX, Lascu I, Veron M, Strahler J, Hanash SM. Proliferation-related expression of p19/nm23 nucleoside diphosphate kinase. *J Clin Invest.* 1992 Mar;89(3):919-24.
- Keppler BK, Berger MR, Heim ME. New tumor-inhibiting metal complexes. *Cancer Treat Rev.* 1990 Sep;17(2-3):261-77.
- Keyt BA, Nguyen HV, Berleau LT, Duarte CM, Park J, Chen H, Ferrara N. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 1996; 271:5638-5646.
- Kim CH, Bak KH, Kim YS, Kim JM, Ko Y, Oh SJ, Kim KM, Hong EK. Expression of tenascin-C in astrocytic tumors: its relevance to proliferation and angiogenesis. *Surg Neurol.* 2000; 54:235-40.
- Kimura N, Shimada N, Fukuda M, Ishijima Y, Miyazaki H, Ishii A, Takagi Y, Ishikawa N. Regulation of cellular functions by nucleoside diphosphate kinases in mammals. *J Bioenerg Biomembr.* 2000 Jun;32(3):309-15.
- Kimura N, Shimada N, Ishijima Y, Fukuda M, Takagi Y, Ishikawa N. Nucleoside diphosphate kinases in mammalian signal transduction systems: recent development and perspective. *J Bioenerg Biomembr.* 2003 Feb;35(1):41-7. Review.
- King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol.* 1998;60:601-17.
- Kinugasa Y, Hatori M, Ito H, Kurihara Y, Ito D, Nagumo M. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via down-regulation of matrix metalloproteinase-2 and CD44. *Clin Exp Metastasis.* 2004;21(8):737-45.
- Kirla RM, Haapasalo HK, Kalimo H, Salminen EK. Low expression of p27 indicates a poor prognosis in patients with high-grade astrocytomas. *Cancer.* 2003; 97(3):644-48.
- Klein A, Miera O, Bauer O, Golfier S, Schriever F. Chemosensitivity of B cell chronic lymphocytic leukemia and correlated expression of proteins regulating apoptosis, cell cycle and DNA repair. *Leukemia.* 2000; 14:40-46.
- Koch HB, Zhang R, Verdoodt B, Bailey A, Zhang CD, Yates JR 3rd, Menssen A, Hermeking H. Large-scale identification of c-MYC-associated proteins using a combined TAP/MudPIT approach. *Cell Cycle.* 2007; 6:205-17.
- Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Tanaka T. Suppression of colitis-related mouse colon carcinogenesis by a COX-2 inhibitor and PPAR ligands. *BMC Cancer.* 2005 May 16;5(1):46.

Kokoglu E, Tüter Y, Sandikçi KS, Yazici Z, Ulakoğlu EZ, Sönmez H, Ozyurt E. Prostaglandin E2 levels in human brain tumor tissues and arachidonic acid levels in the plasma membrane of human brain tumors. *Cancer Lett.* 1998 Oct 23;132(1-2):17-21.

Konturek PC, Nikiforuk A, Kania J, Raithel M, Hahn EG, Mühldorfer S. Activation of NFkappaB represents the central event in the neoplastic progression associated with Barrett's esophagus: a possible link to the inflammation and overexpression of COX-2, PPARgamma and growth factors. *Dig Dis Sci.* 2004 Aug;49(7-8):1075-83.

Kubiatowski T, Jang T, Lachyankar MB, Salmonsens R, Nabi RR, Quesenberry PJ, Litofsky NS, Ross AH, Recht LD. Association of increased phosphatidylinositol 3-kinase signaling with increased invasiveness and gelatinase activity in malignant gliomas. *J Neurosurg.* 2001; 95:480-8.

Kundu N, Smyth MJ, Samsel L, Fulton AM. Cyclooxygenase inhibitors block cell growth, increase ceramide and inhibit cell cycle. *Breast Cancer Res Treat.* 2002 Nov;76(1):57-64.

Kurpad SN, Zhao XG, Wikstrand CJ, Batra SK, McLendon RE, Bigner DD. Tumor antigens in astrocytic gliomas. *Glia.* 1995; 15:244-56.

Kurzel F, Hagel Ch, Zapf S, Meissner H, Westphal M, Giese A. Cyclo-oxygenase inhibitors and thromboxane synthase inhibitors differentially regulate migration arrest, growth inhibition and apoptosis in human glioma cells. *Acta Neurochir (Wien).* 2002 Jan;144(1):71-87.

Labuhn M, Jones G, Speel EJ, Maier D, Zweifel C, Gratzl O, Van Meir EG, Hegi ME, Merlo A. Quantitative real-time PCR does not show selective targeting of p14(ARF) but concomitant inactivation of both p16(INK4A) and p14(ARF) in 105 human primary gliomas. *Oncogene.* 2001; 20:1103-09.

Lakka SS, Jasti SL, Gondi C, Boyd D, Chandrasekar N, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS. Downregulation of MMP-9 in ERK-mutated stable transfectants inhibits glioma invasion in vitro. *Oncogene.* 2002; 21:5601-08.

Lamszus K, Ulbricht U, Matschke J, Brockmann MA, Fillbrandt R, Westphal M. Levels of soluble vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 1 in astrocytic tumors and its relation to malignancy, vascularity, and VEGF-A. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:1399-405.

Leaver HA, Bell HS, Rizzo MT, Ironside JW, Gregor A, Wharton SB, Whittle IR. Antitumour and pro-apoptotic actions of highly unsaturated fatty acids in glioma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002a; 66:19-29.

Leaver HA, Rizzo MT, Whittle IR. Antitumour actions of highly unsaturated fatty acids: cell signalling and apoptosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002c; 66:1-3.

Leaver HA, Wharton SB, Bell HS, Leaver-Yap IM, Whittle IR. Highly unsaturated fatty acid induced tumour regression in glioma pharmacodynamics and bioavailability of gamma linolenic

acid in an implantation glioma model: effects on tumour biomass, apoptosis and neuronal tissue histology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002b; 67:283-292.

Leaver HA, Williams JR, Ironside JW, Miller EP, Gregor A, Su BH, Prescott RJ, Whittle IR. Dynamics of reactive oxygen intermediate production in human glioma: n-6 essential fatty acid effects. *Eur J Clin Invest*. 1999 Mar;29(3):220-31.

Lee HC, Park IC, Park MJ, An S, Woo SH, Jin HO, Chung HY, Lee SJ, Gwak HS, Hong YJ, Yoo DH, Rhee CH, Hong SI. Sulindac and its metabolites inhibit invasion of glioblastoma cells via down-regulation of Akt/PKB and MMP-2. *J Cell Biochem*. 2005 Feb 15;94(3):597-610.

Lee JY, Bielawska AE, Obeid LM. Regulation of cyclin-dependent kinase 2 activity by ceramide. *Exp Cell Res*. 2000; 261:303-11.

Leins A, Riva P, Lindstedt R, Davidoff MS, Mehraein P, Weis S. Expression of tenascin-C in various human brain tumors and its relevance for survival in patients with astrocytoma. *Cancer*. 2003; 98:2430-39.

Leone A, Flatow U, VanHoutte K, Steeg PS. Transfection of human nm23-H1 into the human MDA-MB-435 breast carcinoma cell line: effects on tumor metastatic potential, colonization and enzymatic activity. *Oncogene*. 1993 Sep;8(9):2325-33.

Levin G, Duffin KL, Obukowicz MG, Hummert SL, Fujiwara H, Needleman P, Raz A. Differential metabolism of dihomo-gamma-linolenic acid and arachidonic acid by cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2: implications for cellular synthesis of prostaglandin E1 and prostaglandin E2. *Biochem J*. 2002 Jul 15;365(Pt 2):489-96.

Li GC, He F, Shao X, Urano M, Shen L, Kim D, Borrelli M, Leibel SA, Gutin PH, Ling CC. Adenovirus-mediated heat-activated antisense Ku70 expression radiosensitizes tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2003; 63:3268-74.

Li X, Xing D, Wang J, Zhu DB, Zhang L, Chen XJ, Sun FY, Hong A. Effects of IkappaBalpha and its mutants on NF-kappaB and p53 signaling pathways. *World J Gastroenterol*. 2006; 12:6658-64.

Lim JW, Kim H, Kim KH. The Ku antigen-recombination signal-binding protein Ikappa complex binds to the nuclear factor-kappaB p50 promoter and acts as a positive regulator of p50 expression in human gastric cancer cells. *J Biol Chem*. 2004 Jan 2;279(1):231-7.

Lim JW, Kim H, Kim KH. Expression of Ku70 and Ku80 mediated by NF-kappa B and cyclooxygenase-2 is related to proliferation of human gastric cancer cells. *J Biol Chem*. 2002; 277:46093-100.

Lim JW, Kim H, Kim KH. Nuclear factor-kappaB regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells. *Lab Invest*. 2001; 81:349-360.

- Lin J, Hsiao PW, Chiu TH, Chao JI. Combination of cyclooxygenase-2 inhibitors and oxaliplatin increases the growth inhibition and death in human colon cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2005 Sep 1;70(5):658-67.
- Lind CR, Gray CW, Pearson AG, Cameron RE, O'Carroll SJ, Narayan PJ, Lim J, Dragunow M. The mitogen-activated/extracellular signal-regulated kinase kinase 1/2 inhibitor U0126 induces glial fibrillary acidic protein expression and reduces the proliferation and migration of C6 glioma cells. *Neuroscience*. 2006 Sep 15;141(4):1925-33.
- Lombardi D, Palescandolo E, Giordano A, Paggi MG. Interplay between the antimetastatic nm23 and the retinoblastoma-related Rb2/p130 genes in promoting neuronal differentiation of PC12 cells. *Cell Death Differ*. 2001 May;8(5):470-6.
- Lombardi D, Sacchi A, D'Agostino G, Tibursi G. The association of the Nm23-M1 protein and beta-tubulin correlates with cell differentiation. *Exp Cell Res*. 1995; 217:267-71.
- Louis DN, Pomeroy SL, Cairncross JG. Focus on central nervous system neoplasia. *Cancer Cell* 2002; 1:125-8.
- Ma D, Xing Z, Liu B, Pedigo NG, Zimmer SG, Bai Z, Postel EH, Kaetzel DM. NM23-H1 and NM23-H2 repress transcriptional activities of nuclease-hypersensitive elements in the platelet-derived growth factor-A promoter. *J Biol Chem*. 2002 Jan 11;277(2):1560-7.
- Ma X, Kundu N, Rifat S, Walser T, Fulton AM. Prostaglandin E receptor EP4 antagonism inhibits breast cancer metastasis. *Cancer Res*. 2006 Mar 15;66(6):2923-7.
- Mainou-Fowler T, Proctor SJ, Dickinson AM. Gamma-linolenic acid induces apoptosis in B-chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Leuk Lymphoma*. 2001; 40:393-403.
- Mainprize TG, Taylor MD, Rutka JT, Dirks PB. Cip/Kip cell-cycle inhibitors: a neuro-oncological perspective. *J Neurooncol*. 2001; 51:205-18.
- Malliri A, van der Kammen RA, Clark K, van der Valk M, Michiels F, Collard JG. Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature*. 2002 Jun 20;417(6891):867-71.
- Marhin WW, Hei YJ, Chen S, Jiang Z, Gallie BL, Phillips RA, Penn LZ. Loss of Rb and Myc activation co-operate to suppress cyclin D1 and contribute to transformation. *Oncogene*. 1996 Jan 4;12(1):43-52.
- Mariani L, Beaudry C, McDonough WS, Hoelzinger DB, Demuth T, Ross KR, Berens T, Coons SW, Watts G, Trent JM, Wei JS, Giese A, Berens ME. Glioma cell motility is associated with reduced transcription of proapoptotic and proliferation genes: a cDNA microarray analysis. *J Neurooncol*. 2001; 53:161-176.

- Martin S, Toquet C, Oliver L, Cartron PF, Perrin P, Meflah K, Cuillère P, Vallette FM. Expression of bcl-2, bax and bcl-xl in human gliomas: a re-appraisal. *J Neurooncol.* 2001 Apr;52(2):129-39.
- Martinez J, Gutierrez A, Casas J, Llado V, Lopez-Bellan A, Besalduch J, Dopazo A, Escriba PV. The repression of E2F-1 is critical for the activity of Minerval against cancer. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 315:466-74.
- Matsuo M, Yoshida N, Zaitzu M, Ishii K, Hamasaki Y. Inhibition of human glioma cell growth by a PHS-2 inhibitor, NS398, and a prostaglandin E receptor subtype EP1-selective antagonist, SC51089. *J Neurooncol.* 2004 Feb;66(3):285-92.
- Menendez JA, Colomer R, Lupu R. Inhibition of fatty acid synthase-dependent neoplastic lipogenesis as the mechanism of gamma-linolenic acid-induced toxicity to tumor cells: an extension to Nwankwo's hypothesis. *Med Hypotheses.* 2005a;64(2):337-41.
- Menendez JA, Ropero S, Mehmi I, Atlas E, Colomer R, Lupu R. Overexpression and hyperactivity of breast cancer-associated fatty acid synthase (oncogenic antigen-519) is insensitive to normal arachidonic fatty acid-induced suppression in lipogenic tissues but it is selectively inhibited by tumoricidal alpha-linolenic and gamma-linolenic fatty acids: a novel mechanism by which dietary fat can alter mammary tumorigenesis. *Int J Oncol.* 2004 Jun;24(6):1369-83.
- Menendez JA, Vellon L, Colomer R, Lupu R. Effect of gamma-linolenic acid on the transcriptional activity of the Her-2/neu (erbB-2) oncogene. *J Natl Cancer Inst.* 2005b;97:1611-5.
- Mentlein R, Forstreuter F, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Functional significance of vascular endothelial growth factor receptor expression on human glioma cells. *J Neurooncol.* 2004 Mar-Apr;67(1-2):9-18.
- Merlo A. Genes and pathways driving glioblastomas in humans and murine disease models. *Neurosurg Rev.* 2003; 26:145-158.
- Merry DE, Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 1997;20:245-67.
- Mettouchi A, Klein S, Guo W, Lopez-Lago M, Lemichez E, Westwick JK, Giancotti FG. Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Mol Cell.* 2001 Jul;8(1):115-27.
- Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature.* 1994; 367:576-9.
- Mizutani Y, Kamoi K, Ukimura O, Kawauchi A, Miki T. Synergistic cytotoxicity and apoptosis of JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, and 5-fluorouracil against bladder cancer. *J Urol.* 2002; 168:2650-4.

- Mo H, Vita M, Crespin M, Henriksson M. Myc overexpression enhances apoptosis induced by small molecules. *Cell Cycle*. 2006 Oct;5(19):2191-4.
- Monferran S, Muller C, Mourey L, Frit P, Salles B. The Membrane-associated form of the DNA repair protein Ku is involved in cell adhesion to fibronectin. *J Mol Biol*. 2004a; 337:503-11.
- Monferran S, Paupert J, Dauvillier S, Salles B, Muller C. The membrane form of the DNA repair protein Ku interacts at the cell surface with metalloproteinase 9. *EMBO J*. 2004b; 23:3758-68.
- Moral R, Solanas M, García G, Colomer R, Escrich E. Modulation of EGFR and neu expression by n-6 and n-9 high-fat diets in experimental mammary adenocarcinomas. *Oncol Rep*. 2003; 10:1417-24.
- Morris RE, Aird RE, Murdoch P del S, Chen H, Cummings J, Hughes ND, Parson S, Parkin A, Boyd G, Jodrell DI, and Sadler PJ. Inhibition of cancer cell growth by ruthenium(II) arene complexes. *J. Med. Chem*. 2001; 44:3616-21.
- Mudryj M, Hiebert SW, Nevins JR. A role for the adenovirus inducible E2F transcription factor in a proliferation dependent signal transduction pathway. *EMBO J*. 1990 Jul;9(7):2179-84.
- Muller C, Paupert J, Monferran S, Salles B. The double life of the Ku protein: facing the DNA breaks and the extracellular environment. *Cell Cycle*. 2005 Mar;4(3):438-41. Epub 2005 Mar 31.
- Munaut C, Noël A, Hougrand O, Foidart JM, Boniver J, Deprez M. Vascular endothelial growth factor expression correlates with matrix metalloproteinases MT1-MMP, MMP-2 and MMP-9 in human glioblastomas. *Int J Cancer*. 2003; 106:848-55.
- Naidu MR, Das UN, Kishan A. Intratumoral gamma-linoleic acid therapy of human gliomas. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1992; 45:181-4.
- Nakada M, Miyamori H, Kita D, Takahashi T, Yamashita J, Sato H, Miura R, Yamaguchi Y, Okada Y. Human glioblastomas overexpress ADAMTS-5 that degrades brevican. *Acta Neuropathol*. 2005; 110:239-46.
- Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*. 2005 Apr;5(4):297-309.
- Narayanan NK, Narayanan BA, Reddy BS. A combination of docosahexaenoic acid and celecoxib prevents prostate cancer cell growth in vitro and is associated with modulation of nuclear factor-kappaB, and steroid hormone receptors. *Int J Oncol*. 2005 Mar;26(3):785-92.
- Natarajan K, Mori N, Artemov D, Bhujwalla ZM. Exposure of human breast cancer cells to the anti-inflammatory agent indomethacin alters choline phospholipid metabolites and Nm23 expression. *Neoplasia*. 2002 Sep-Oct;4(5):409-16.

- New P. Cyclooxygenase in the treatment of glioma: its complex role in signal transduction. *Cancer Control*. 2004 May-Jun;11(3):152-64. Review.
- Nieder C, Grosu AL, Molls M. A comparison of treatment results for recurrent malignant gliomas. *Cancer Treat Rev*. 2001; 26:397-409.
- Novakova O, Kasparkova J, Bursova V, Hofr C, Vojtiskova M, Chen H, Sadler PJ, Brabec V. Conformation of DNA modified by monofunctional Ru(II) arene complexes: recognition by DNA binding proteins and repair. Relationship to cytotoxicity. *Chem Biol*. 2005; 12:121-9.
- Nutt CL, Matthews RT, Hockfield S. Glial tumor invasion: a role for the upregulation and cleavage of BEHAB/brevican. *Neuroscientist*. 2001; 7:113-22.
- Nwankwo JO, Robbins ME. Peroxisome proliferator-activated receptor- gamma expression in human malignant and normal brain, breast and prostate-derived cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2001 Apr-May;64(4-5):241-5.
- Ohnishi T, Arita N, Hiraga S, Taki T, Izumoto S, Fukushima Y, Hayakawa T. Fibronectin-mediated cell migration promotes glioma cell invasion through chemokinetic activity. *Clin Exp Metastasis*. 1997;15:538-46.
- Okada Y. Tumor cell-matrix interaction: pericellular matrix degradation and metastasis. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 2000; 84:33-42.
- Okuyama T, Ishihara S, Sato H, Rumi MA, Kawashima K, Miyaoka Y, Suetsugu H, Kazumori H, Cava CF, Kadowaki Y, Fukuda R, Kinoshita Y. Activation of prostaglandin E2-receptor EP2 and EP4 pathways induces growth inhibition in human gastric carcinoma cell lines. *J Lab Clin Med*. 2002 Aug;140(2):92-102.
- Oswald F, Lovec H, Möröy T, Lipp M. E2F-dependent regulation of human MYC: trans-activation by cyclins D1 and A overrides tumour suppressor protein functions. *Oncogene*. 1994 Jul;9(7):2029-36.
- Otsuka G, Nagaya T, Saito K, Mizuno M, Yoshida J, Seo H. Inhibition of nuclear factor-kappaB activation confers sensitivity to tumor necrosis factor-alpha by impairment of cell cycle progression in human glioma cells. *Cancer Res*. 1999; 59: 4446-4452.
- Ouatas T, Salerno M, Palmieri D, Steeg PS. Basic and translational advances in cancer metastasis: Nm23. *J Bioenerg Biomembr*. 2003 Feb;35(1):73-9.
- Ougolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Savoy DN, Urrutia RA, Billadeau DD. Glycogen synthase kinase-3beta participates in nuclear factor kappaB-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 2005; 65:2076-81.

- Paganelli G, Grana C, Chinol M, Cremonesi M, De Cicco C, De Braud F, Robertson C, Zurrida S, Casadio C, Zoboli S, Siccaldi AG, Veronesi U. Antibody-guided three-step therapy for high grade glioma with yttrium-90 biotin. *Eur J Nucl Med*. 1999; 26:348-57.
- Pan MR, Hung WC. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 via suppression of the ERK/Sp1-mediated transcription. *J Biol Chem*. 2002 Sep 6;277(36):32775-80.
- Pedley J, Pettit A, Parsons PG. Inhibition of Ku autoantigen binding activity to the E2F motif after ultraviolet B irradiation of melanocytic cells. *Melanoma Res*. 1998; 8:471-81.
- Perdiki M, Korkolopoulou P, Thymara I, Agrogiannis G, Piperi C, Boviatsis E, Kotsiakakis X, Angelidakis D, Diamantopoulou K, Thomas-Tsagli E, Patsouris E. Cyclooxygenase-2 expression in astrocytomas. Relationship with microvascular parameters, angiogenic factors expression and survival. *Mol Cell Biochem*. 2007; 295:75-83.
- Pham H, Banerjee T, Ziboh VA. Suppression of cyclooxygenase-2 overexpression by 15S-hydroxyeicosatrienoic acid in androgen-dependent prostatic adenocarcinoma cells. *Int J Cancer*. 2004 Aug 20;111(2):192-7.
- Philip S, Bulbule A, Kundu GC. Matrix metalloproteinase-2: mechanism and regulation of NF-kappaB-mediated activation and its role in cell motility and ECM-invasion. *Glycoconj J*. 2004; 21:429-41.
- Philipp A, Schneider A, Väsrik I, Finke K, Xiong Y, Beach D, Alitalo K, Eilers M. Repression of cyclin D1: a novel function of MYC. *Mol Cell Biol*. 1994 Jun;14(6):4032-43.
- Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*. 2004 Sep 23;431(7007):461-6.
- Pintus G, Tadolini B, Posadino AM, Sanna B, Debidda M, Bennardini F, Sava G, and Ventura C. Inhibition of the MEK/ERK signaling pathway by the novel antimetastatic agent NAMI-A down regulates c-myc gene expression and endothelial cell proliferation. *Eur J Biochem*. 2002; 269:5861-70.
- Postel EH, Berberich SJ, Flint SJ, Ferrone CA. Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. *Science*. 1993 Jul 23;261(5120):478-80.
- Postel EH, Berberich SJ, Rooney JW, Kaetzel DM. Human NM23/nucleoside diphosphate kinase regulates gene expression through DNA binding to nuclease-hypersensitive transcriptional elements. *J Bioenerg Biomembr*. 2000 Jun;32(3):277-84.
- Pratt MA, Niu MY. Bcl-2 controls caspase activation following a p53-dependent cyclin D1-induced death signal. *J Biol Chem*. 2003 Apr 18;278(16):14219-29.

- Preuss M, Girnun GD, Darby CJ, Khoo N, Spector AA, Robbins ME. Role of antioxidant enzyme expression in the selective cytotoxic response of glioma cells to gamma-linolenic acid supplementation. *Free Radic Biol Med*. 2000 Apr 1;28(7):1143-56.
- Pucci S, Mazzearelli P, Rabitti C, Giai M, Gallucci M, Flammia G, Alcini A, Altomare V, Fazio VM. Tumor specific modulation of KU70/80 DNA binding activity in breast and bladder human tumor biopsies. *Oncogene*. 2001; 20:739-47.
- Ramos KL, Colquhoun A. Protective role of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the metabolic response of C6 rat glioma cells to polyunsaturated fatty acid exposure. *Glia*. 2003; 43:149-66.
- Rathmell WK, Chu G. Involvement of the Ku autoantigen in the cellular response to DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91:7623-27.
- Raz A. Is inhibition of cyclooxygenase required for the anti-tumorigenic effects of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs (NSAIDs)? In vitro versus in vivo results and the relevance for the prevention and treatment of cancer. *Biochem Pharmacol*. 2002; 63:343-7.
- Reardon DA, Akabani G, Coleman RE, Friedman AH, Friedman HS, Herndon JE 2nd, Cokgor I, McLendon RE, Pegram CN, Provenzale JM, Quinn JA, Rich JN, Regalado LV, Sampson JH, Shafman TD, Wikstrand CJ, Wong TZ, Zhao XG, Zalutsky MR, Bigner DD. Phase II trial of murine (131)I-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 administered into surgically created resection cavities of patients with newly diagnosed malignant gliomas. *J Clin Oncol*. 2002; 20:1389-97.
- Reardon DA, Rich JN, Friedman HS, Bigner DD. Recent Advances in the Treatment of Malignant Astrocytoma. *J Clin Oncol*. 2008; 24:1253-65
- Reifenberger J, Janssen G, Weber RG, Boström J, Engelbrecht V, Lichter P, Borchard F, Göbel U, Lenard HG, Reifenberger G. Primitive neuroectodermal tumors of the cerebral hemispheres in two siblings with TP53 germline mutation. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998; 57:179-87.
- Reisman D, Elkind NB, Roy B, Beamon J, Rotter V. c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif. *Cell Growth Differ*. 1993 Feb;4(2):57-65.
- Reisner E, Arion VB, Eichinger A, Kandler N, Giester G, Pombeiro AJ, Keppler BK. Tuning of redox properties for the design of ruthenium anticancer drugs: part 2. Syntheses, crystal structures, and electrochemistry of potentially antitumor [Ru III/II Cl₆-n(Azole)_n]_z(n = 3, 4, 6) complexes. *Inorg Chem*. 2005; 44:6704-16.
- Ribeiro G, Benadiba M, Colquhoun A, Silva DO. Diruthenium(II, III) complexes of ibuprofen, aspirin, naproxen and indomethacin non-steroidal anti-inflammatory drugs: Synthesis, characterization and their effects on tumor-cell proliferation. *Polyhedron*. 2008; 27:1131-7.

- Riva P, Franceschi G, Frattarelli M, Riva N, Guiducci G, Cremonini AM, Giuliani G, Casi M, Gentile R, Jekunen AA, Kairemo KJ. 131I radioconjugated antibodies for the locoregional radioimmunotherapy of high-grade malignant glioma-phase I and II study. *Acta Oncol.* 1999; 38:351-9.
- Roller A, Bähr OR, Streffer J, Winter S, Heneka M, Deininger M, Meyermann R, Naumann U, Gulbins E, Weller M. Selective potentiation of drug cytotoxicity by NSAID in human glioma cells: the role of COX-1 and MRP. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 259:600-5.
- Ruiz C, Huang W, Hegi ME, Lange K, Hamou MF, Fluri E, Oakeley EJ, Chiquet-Ehrismann R, Orend G. Growth promoting signaling by tenascin-C. *Cancer Res.* 2004; 64:7377-85.
- Ryan KM, O'Prey J, Vousden KH. Loss of nuclear factor-kappaB is tumor promoting but does not substitute for loss of p53. *Cancer Res.* 2004; 64:4415-18.
- Salvatori R, Guidon PT Jr, Rapuano BE, Bockman RS. Prostaglandin E1 inhibits collagenase gene expression in rabbit synoviocytes and human fibroblasts. *Endocrinology.* 1992 Jul;131(1):21-8.
- Sanchez T, Moreno JJ. Role of EP(1) and EP(4) PGE(2) subtype receptors in serum-induced 3T6 fibroblast cycle progression and proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 282:C280-8.
- Sanson M, Thillet J, Hoang-Xuan K. Molecular changes in gliomas. *Curr Opin Oncol.* 2004; 16:607-13.
- Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker S.B., Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science.* 1997; 275:983-6.
- Sava G, Capozzi I, Clerici K, Gagliardi R, Alessio E, Mestroni G. Pharmacological control of lung metastases of solid tumours by a novel ruthenium complex. *Clin Exp Metastasis.* 1998; 16:371-9.
- Sava G, Clerici K, Capozzi I, Cocchietto M, Gagliardi R, Alessio E, Mestroni G, Perbellini A. Reduction of lung metastasis by ImH[trans-RuCl4(DMSO)Im]: mechanism of the selective action investigated on mouse tumors. *Anticancer Drugs.* 1999; 10:129-38.
- Sava G, Zorzet S, Turrin C, Vita F, Soranzo M, Zabucchi G, Cocchietto M, Bergamo A, DiGiovine S, Pezzoni G, Sartor L, Garbisa S. Dual Action of NAMI-A in inhibition of solid tumor metastasis: selective targeting of metastatic cells and binding to collagen. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:1898-905.
- Sawada M, Hayes P, Matsuyama S. Cytoprotective membrane-permeable peptides designed from the Bax-binding domain of Ku70. *Nat Cell Biol.* 2003; 5:352-7.

- Schlegel J, Piontek G, Kersting M, Schuermann M, Kappler R, Scherthan H, Weghorst C, Buzard G, Mennel H. The p16/Cdkn2a/Ink4a gene is frequently deleted in nitrosourea-induced rat glial tumors. *Pathobiology*. 1999; 67:202-6.
- Schluga P, Hartinger CG, Egger A, Reisner E, Galanski M, Jakupec MA, Keppler BK. Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP. *Dalton Trans*. 2006; 14:1796-802.
- Seidenbecher CI, Richter K, Rauch U, Fässler R, Garner CC, Gundelfinger ED. Brevican, a chondroitin sulfate proteoglycan of rat brain, occurs as secreted and cell surface glycosylphosphatidylinositol-anchored isoforms. *J Biol Chem*. 1995; 270:27206-12.
- Sekimizu K. Interactions between DNA replication-related proteins and phospholipid vesicles in vitro. *Chem Phys Lipids*. 1994; 73:223-30.
- Sharma C, Pradeep A, Wong L, Rana A, Rana B. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation can regulate beta-catenin levels via a proteasome-mediated and adenomatous polyposis coli-independent pathway. *J Biol Chem*. 2004; 279:35583-94.
- Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res*. 1998 Jan 15;58(2):362-6.
- Shih HH, Tevosian SG, Yee AS. Regulation of differentiation by HBP1, a target of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*. 1998; 18:4732-43.
- Shimada M, Taguchi K, Hasegawa H, Gion T, Shirabe K, Tsuneyoshi M, Sugimachi K. Nm23-H1 expression in intrahepatic or extrahepatic metastases of hepatocellular carcinoma. *Liver*. 1998 Oct;18(5):337-42.
- Shishodia S, Aggarwal BB. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates activation of cigarette smoke-induced nuclear factor (NF)-kappaB by suppressing activation of IkappaBalpha kinase in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of cyclin D1, COX-2, and matrix metalloproteinase-9. *Cancer Res*. 2004 Jul 15;64(14):5004-12.
- Shono T, Tofilon PJ, Bruner JM, Owolabi O, Lang FF. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res*. 2001 Jun 1; 61(11):4375-81.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992; 359:843-5.
- Leone A, McBride OW, Weston A, Wang MG, Anglard P, Cropp CS, et al. Somatic allelic deletion of nm23 in human cancer. *Cancer Res*. 1991 May 1;51(9):2490-3.

- Song JY, Lim JW, Kim H, Kim KH. Role of NF-kappaB and DNA repair protein Ku on apoptosis in pancreatic acinar cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 1010:259-263.
- Sonoda Y, Kanamori M, Deen DF, Cheng SY, Berger MS, Pieper RO. Overexpression of vascular endothelial growth factor isoforms drives oxygenation and growth but not progression to glioblastoma multiforme in a human model of gliomagenesis. *Cancer Res.* 2003; 63:1962-68.
- Spector AA, Burns CP. Biological and therapeutic potential of membrane lipid modification in tumors. *Cancer Res.* 1987; 47:4529-37.
- Stefanik DF, Fellows WK, Rizkalla LR, Rizkalla WM, Stefanik PP, Deleo AB, Welch WC. Monoclonal antibodies to vascular endothelial growth factor (VEGF) and the VEGF receptor, FLT-1, inhibit the growth of C6 glioma in a mouse xenograft. *J Neurooncol.* 2001; 55:91-100.
- Stewart CL, Soria AM, Hamel PA. Integration of the pRB and p53 cell cycle control pathways. *J Neurooncol.* 2001; 51:183-204.
- Strakova N, Ehrmann J, Dzubak P, Bouchal J, Kolar Z. The synthetic ligand of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ciglitazone affects human glioblastoma cell lines. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Jun;309(3):1239-47.
- Strauss BE, Fontes RB, Lotfi CF, Skorupa A, Bartol I, Cipolla-Neto J, Costanzi-Strauss E. Retroviral transfer of the p16INK4a cDNA inhibits C6 glioma formation in Wistar rats. *Cancer Cell Int.* 2002; 2:1-9.
- Stylli SS, Kaye AH, MacGregor L, Howes M, Rajendra P. Photodynamic therapy of high grade glioma - long term survival. *J Clin Neurosci.* 2005; 12:389-98.
- Subramanian C, Opipari AW Jr, Bian X, Castle VP, Kwok RP. Ku70 acetylation mediates neuroblastoma cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Mar 29;102(13):4842-7.
- Suhardja AS, Kovacs KT, Rutka JT. Molecular pathogenesis of pituitary adenomas: a review. *Acta Neurochir (Wien).* 1999;141(7):729-36.
- Sumida C, Graber R, Nunez E. Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1993; 48:117-22.
- Takada Y, Bhardwaj A, Potdar P, Aggarwal BB. Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF-kappaB activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. *Oncogene.* 2004 Dec 9;23(57):9247-58.
- Takahashi M, Fukami S, Iwata N, Inoue K, Itohara S, Itoh H, Haraoka J, Saido T. In vivo glioma growth requires host-derived matrix metalloproteinase 2 for maintenance of angioarchitecture. *Pharmacol Res.* 2002; 46:155-63.

- Tamiya T, Mizumatsu S, Ono Y, Abe T, Matsumoto K, Furuta T, Ohmoto T. High cyclin E/low p27Kip1 expression is associated with poor prognosis in astrocytomas. *Acta Neuropathol.* 2001; 101:334-40.
- Taniura S, Kamitani H, Watanabe T, Eling TE. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-1 by histone deacetylase inhibitors in normal human astrocyte cells. *J Biol Chem.* 2002 May 10;277(19):16823-30.
- Tarnawski AS, Jones MK. Inhibition of angiogenesis by NSAIDs: molecular mechanisms and clinical implications. *J Mol Med.* 2003 Oct;81(10):627-36.
- Telliez A, Furman C, Pommery N, Hénichart JP. Mechanisms leading to COX-2 expression and COX-2 induced tumorigenesis: topical therapeutic strategies targeting COX-2 expression and activity. *Anticancer Agents Med Chem.* 2006 May;6(3):187-208. Review.
- Thalmeier K, Synovzik H, Mertz R, Winnacker EL, Lipp M. Nuclear factor E2F mediates basic transcription and trans-activation by E1a of the human MYC promoter. *Genes Dev.* 1989 Apr;3(4):527-36.
- Thier M, Roeb E, Breuer B, Bayer TA, Halfter H, Weis J. Expression of matrix metalloproteinase-2 in glial and neuronal tumor cell lines: inverse correlation with proliferation rate. *Cancer Lett.* 2000 Feb 28;149(1-2):163-70.
- Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Feb 20;94(4):252-66.
- Tomassoni ML, Amori D, Magni MV. Changes of nuclear membrane lipid composition affect RNA nucleocytoplasmic transport. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 258:476-81.
- Tort F, Bartkova J, Sehested M, Orntoft T, Lukas J, Bartek J. Retinoblastoma pathway defects show differential ability to activate the constitutive DNA damage response in human tumorigenesis. *Cancer Res.* 2006 Nov 1;66(21):10258-63.
- Trifan OC, Durham WF, Salazar VS, Horton J, Levine BD, Zweifel BS, Davis TW, Masferrer JL. Cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib enhances antitumor efficacy and reduces diarrhea side effect of CPT-11. *Cancer Res.* 2002; 62:5778-84.
- Tuteja R, Tuteja N. Ku autoantigen: a multifunctional DNA-binding protein. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2000; 35:1-33.
- Tysnes BB, Larsen LF, Ness GO, Mahesparan R, Edvardsen K, Garcia-Cabrera I, Bjerkvig R. Stimulation of glioma-cell migration by laminin and inhibition by anti-alpha3 and anti-beta1 integrin antibodies. *Int J Cancer.* 1996; 67:777-84.

- van Meeteren ME, Baron W, Beermann C, Dijkstra CD, van Tol EA. Polyunsaturated fatty acid supplementation stimulates differentiation of oligodendroglia cells. *Dev Neurosci*. 2006;28(3):196-208.
- Van Rensburg CE, Kreft E, Swarts JC, Dalrymple SR, MacDonald DM, Cooke MW, Aquino MA. Cytotoxicity of a series of water-soluble mixed valent diruthenium tetracarboxylates. *Anticancer Res*. 2002 Mar-Apr;22(2A):889-92.
- Vartak S, McCaw R, Davis CS, Robbins ME, Spector AA. Gamma-linolenic acid (GLA) is cytotoxic to 36B10 malignant rat astrocytoma cells but not to 'normal' rat astrocytes. *Br J Cancer*. 1998; 77:1612-20.
- Vartak S, Robbins ME, Spector AA. Polyunsaturated fatty acids increase the sensitivity of 36B10 rat astrocytoma cells to radiation-induced cell kill. *Lipids*. 1997 Mar;32(3):283-92.
- Vita M, Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol*. 2006 Aug;16(4):318-30.
- Vordermark D, Kölbl O, Ruprecht K, Vince GH, Bratengeier K, Flentje M. Hypofractionated stereotactic re-irradiation: treatment option in recurrent malignant glioma. *BMC Cancer*. 2005; 5:55-62.
- Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Strada O, Boissiere F, Hibner U, Agid Y. Expression of Bcl-2 in adult human brain regions with special reference to neurodegenerative disorders. *J Neurochem*. 1997 Jul;69(1):223-31.
- Wang C, Hou X, Mohapatra S, Ma Y, Cress WD, Pledger WJ, Chen J. Activation of p27Kip1 Expression by E2F1. A negative feedback mechanism. *J Biol Chem*. 2005; 280:12339-12343.
- Wang F, Cao Y, Zhao W, Liu H, Fu Z, Han R. Taxol inhibits melanoma metastases through apoptosis induction, angiogenesis inhibition, and restoration of E-cadherin and nm23 expression. *J Pharmacol Sci*. 2003 Oct;93(2):197-203.
- Watkins G, Martin TA, Bryce R, Mansel RE, Jiang WG. Gamma-Linolenic acid regulates the expression and secretion of SPARC in human cancer cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005; 72:273-78.
- Weller M, Rieger J, Grimm C, Van Meir EG, De Tribolet N, Krajewski S, Reed JC, von Deimling A, Dichgans J. Predicting chemoresistance in human malignant glioma cells: the role of molecular genetic analyses. *Int J Cancer*. 1998 Dec 18;79(6):640-4.
- Westwick JK, Lee RJ, Lambert QT, Symons M, Pestell RG, Der CJ, Whitehead IP. Transforming potential of Dbl family proteins correlates with transcription from the cyclin D1 promoter but not with activation of Jun NH2-terminal kinase, p38/Mpk2, serum response factor, or c-Jun. *J Biol Chem*. 1998 Jul 3;273(27):16739-47.

- Wetzel M, Premkumar DR, Arnold B, Pollack IF. Effect of trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, on glioma proliferation in vitro by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *J Neurosurg.* 2005; 103:549-56.
- Williams DS, Atila GE, Bregman H, Arzoumanian A, Klein PS, Meggers E. Switching on a signaling pathway with an organoruthenium complex. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2005; 44:1984-7.
- Wong ML, Kaye AH, Hovens CM. Targeting malignant glioma survival signalling to improve clinical outcomes. *J Clin Neurosci.* 2007; 14:301-8.
- Xi S, Pham H, Ziboh WA. 15-hydroxyeicosatrienoic acid (15-HETrE) suppresses epidermal hyperproliferation via the modulation of nuclear transcription factor (AP-1) and apoptosis. *Arch Dermatol Res.* 2000 Aug;292(8):397-403.
- Xu L, Li YM, Yu CH, Li L, Liu YS, Zhang BF, Fang J, Zhou Q, Hu Y, Gao HJ. Expression of p53, p16 and COX-2 in pancreatic cancer with tissue microarray. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2006 Feb;5(1):138-42.
- Yamagata K, Tagami M, Takenaga F, Yamori Y, Nara Y, Itoh S. Polyunsaturated fatty acids induce tight junctions to form in brain capillary endothelial cells. *Neuroscience.* 2003;116(3):649-56.
- Yamaki T, Yano T, Satoh H, Endo T, Matsuyama C, Kumagai H, Miyahara M, Sakurai H, Pokorny J, Shin SJ, Hagiwara K. High oleic acid oil suppresses lung tumorigenesis in mice through the modulation of extracellular signal-regulated kinase cascade. *Lipids.* 2002; 37:783-88.
- Yoshida T, Sugai T, Habano W, Nakamura S, Uesugi N, Funato O, Saito K. Microsatellite instability in gallbladder carcinoma: two independent genetic pathways of gallbladder carcinogenesis. *J Gastroenterol.* 2000;35(10):768-74.
- Yu HG, Huang JA, Yang YN, Huang H, Luo HS, Yu JP, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmidt WE, Schmitz F. The effects of acetylsalicylic acid on proliferation, apoptosis, and invasion of cyclooxygenase-2 negative colon cancer cells. *Eur J Clin Invest.* 2002 Nov;32(11):838-46.
- Yu J, Prado GN, Schreiber B, Polgar P, Polgar P, Taylor L. Role of prostaglandin E(2) EP receptors and cAMP in the expression of connective tissue growth factor. *Arch Biochem Biophys.* 2002 Aug 15;404(2):302-8.
- Zacharias U, Rauch U. Competition and cooperation between tenascin-R, lecticans and contactin 1 regulate neurite growth and morphology. *J Cell Sci.* 2006 Aug 15;119(Pt 16):3456-66.
- Zagzag D, Friedlander DR, Miller DC, Dosik J, Cangiarella J, Kostianovsky M, Cohen H, Grumet M, Greco MA. Tenascin expression in astrocytomas correlates with angiogenesis. *Cancer Res.* 1995; 55:907-914.

- Zamecnick J. The extracellular space and matrix of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2005; 110:435-42.
- Zander T, Kraus JA, Grommes C, Schlegel U, Feinstein D, Klockgether T, Landreth G, Koenigsknecht J, Heneka MT. Induction of apoptosis in human and rat glioma by agonists of the nuclear receptor PPARgamma. *J Neurochem.* 2002; 81:1052-60.
- Zarkowska T, Harlow E, Mittnacht S. Monoclonal antibodies specific for underphosphorylated retinoblastoma protein identify a cell cycle regulated phosphorylation site targeted by CDKs. *Oncogene.* 1997; 14:249-54.
- Zerbini LF, Wang Y, Czibere A, Correa RG, Cho JY, Ijiri K, Wei W, Joseph M, Gu X, Grall F, Goldring MB, Zhou JR, Libermann TA. NF-kappa B-mediated repression of growth arrest- and DNA-damage-inducible proteins 45alpha and gamma is essential for cancer cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:13618-23.
- Zhang H, Kelly G, Zerillo C, Jaworski DM, Hockfield S. Expression of a cleaved brain-specific extracellular matrix protein mediates glioma cell invasion In vivo. *J Neurosci.* 1998; 18:2370-6.
- Zorzet S, Bergamo A, Cocckietto M, Sorc A, Gava B, Alessio E, Iengo E, Sava G. Lack of In vitro cytotoxicity, associated to increased G(2)-M cell fraction and inhibition of matrigel invasion, may predict In vivo-selective antimetastasis activity of ruthenium complexes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 295:927-33.

Diruthenium(II, III) complexes of ibuprofen, aspirin, naproxen and indomethacin non-steroidal anti-inflammatory drugs: Synthesis, characterization and their effects on tumor-cell proliferation

Geise Ribeiro^a, Marcel Benadiba^b, Alison Colquhoun^b, Denise de Oliveira Silva^{a,*}

^a Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brazil

^b Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

Received 25 June 2007; accepted 19 December 2007

Abstract

[Ru₂(dNSAID)₄Cl] and novel [Ru₂(dNSAID)₄(H₂O)₂]PF₆ complexes, where dNSAID = deprotonated carboxylate from the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), respectively: ibuprofen, Hibp (**1**) and aspirin, Hasp (**2**); naproxen, Hnpx (**3**) and indomethacin, Hind (**4**), have been prepared and characterized by optical spectroscopic methods. All of the compounds exhibit mixed valent Ru₂(II, III) cores where metal–metal bonds are stabilized by four drug-carboxylate bridging ligands in paddlewheel type structures. The diruthenium complexes and their parent NSAIDs showed no significant effects for Hep2 human larynx or T24/83 human bladder tumor. In contrast, the coordination of Ru₂(II, III) core led to synergistic effects that increased significantly the inhibition of C6 rat glioma proliferation in relation to the organic NSAIDs naproxen and ibuprofen. The possibility that the complexes Ru₂-ibp and Ru₂-npx may exert effects (anti-angiogenic and anti-matrix metalloprotease) that are similar to those exhibited by NAMI-A opens new horizons for *in vivo* C6 glioma model studies.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Diruthenium tetracarboxylates; Non-steroidal anti-inflammatory drugs; Antitumor metallodrugs; Glioblastoma multiforme; Tumor-cell proliferation

1. Introduction

The current interest in metallotherapeutic drugs has motivated the design of anticancer ruthenium compounds. Several reports on this subject have been published and many of them are cited in recent articles and reviews [1–7]. Some ruthenium complexes exhibit antitumor activity which may involve the protein and DNA binding capacity of the metal [4,8–10]. One particular compound, NAMI-A, the first ruthenium compound to enter clinical trials, exhibits antimetastatic properties interfering with angiogenesis and with metalloprotease activity [11,12].

Metal–metal bonded dimeric ruthenium compounds have been focus of interest in theoretical and experimental research [13] since the pioneering works of Wilkinson and Cotton. Syntheses, physical properties and applications of dimeric ruthenium tetracarboxylates have been reviewed [14,15]. Although the antitumor potential of [Ru₂(O₂CR)₄Cl] compounds (R = CH₃ or CH₃CH₂) had been reported by Keppler et al. [16,17] some years ago, studies aimed at potential drug applications of diruthenium tetracarboxylates received little attention [18,19]. A series of [Ru₂(O₂CR)₄L₂]PF₆ complexes, with L = imidazole, 1-methylimidazole and water when R = CH₃; L = ethanol when R = Fc (ferrocenyl) or Fc–CH=CH–; and M₃[Ru₂(O₂CR)₄(H₂O)₂] compounds, with M = Na⁺ when R = *m*-C₆H₄SO₃[–] and M = K⁺ when R = *p*-C₆H₄SO₃[–],

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3091 2151; fax: +55 11 3815 5579.
E-mail address: deosilva@iq.usp.br (D. de Oliveira Silva).

has been tested for cytotoxicity against HeLa and multi-drug resistant CoLo 320DM human cancer cells [18].

In particular, we are interested in the study of metal–metal bonded complexes of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) [19,20]. The widely used popular class of NSAID medications is well known due to inflammatory properties but more recently it has attracted great attention mainly because of the chemopreventive effect in a variety of tumors [21].

The mechanism of action for antitumor effects of NSAIDs has not yet been clearly determined [22,23]. The pharmacological properties of individual NSAIDs vary depending on their inhibitory effects in relation to the COX1 and COX2 isoforms [24]. Cyclooxygenase (COX) is the rate-limiting enzyme in the pathway of arachidonic acid metabolism to prostaglandins and thromboxanes [25,26]. The COX1 isoform (chromosome 9) is constitutively expressed while the COX2 isoform (chromosome 1) is induced particularly in inflammatory processes. COX2 expression is up regulated in gliomas and is correlated with increasing histological grade and poor patient prognosis [27–31]. Clinical trials are currently under way to study the COX2 inhibitor effects on tumor progression in patients with glioblastoma multiforme GBM [32,33]. GBM is a malignant brain glioma (WHO grade IV) that has shown little improvement in patient prognosis in recent years despite improvements in surgical techniques and treatment protocols. This is due in part to their highly invasive nature and to the large percentage exhibiting resistance to conventional chemotherapy and radiotherapy [34].

Since epidemiological studies have showed up a 50% reduction in the mortality rate from certain cancers in patient consuming NSAIDs, a great interest in the role of cyclooxygenase in neoplasia has been emerged [35,36]. Several studies have demonstrated that certain NSAIDs cause antiproliferative effects independent of cyclooxygenase activity. The effect of some NSAIDs in the proliferation of glioma cell lines have been investigated showing results that may be clinically important for pharmacological intervention in gliomas [36,37].

The present work reports studies on interactions between diruthenium core and NSAIDs and the investigation of antitumor properties of diruthenium–dNSAID complexes (dNSAID = deprotonated NSAID derived from: ibuprofen (Hibp), aspirin (Hasp), naproxen (Hnpx) and indomethacin (Hind) (Fig. 1)). The antitumor effects of the metal compounds were investigated for C6 rat glioma cell line (used as a model for GBM). Two human tumor cell lines (Hep2 larynx and T24/83 bladder) were also tested.

2. Experimental

2.1. Materials

All the chemicals used, unless specifically stated, were reagent grade supplied by Aldrich or Merck and were used

Fig. 1. Structures of Hibp (α-methyl-4-(isobutyl)phenylacetic acid), Hasp (2-(acetyloxy)benzoic acid), Hnpx (2-(6-methoxy-2-naphthyl)propanoic acid), and Hind ([1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl] acetic acid).

as purchased. Aspirin was purchased from Aldrich. The other drugs were purchased from manipulation pharmacies (São Paulo, Brazil): ibuprofen, from Natural Pharma; naproxen, from Purifarma; and indomethacin, from Henrifarma. Elemental analyses and spectroscopic analyses were carried out to confirm their purity. The diruthenium(II,III) precursor compounds, [Ru₂(O₂CCH₃)₄Cl] [38] and [Ru₂(O₂CCH₃)₄(H₂O)₂]PF₆ [39], were synthesized starting from RuCl₃ · *n*H₂O (Aldrich) according to the literature methods.

2.2. Physical measurements

Elemental analyses were performed on a Perkin–Elmer CHN 2004 Elemental Analyzer, at Instituto de Química (USP). Electronic absorption spectra of ruthenium compounds in solutions, at 200–700 nm (UV–Vis), were recorded on a Shimadzu UV-1650 PC spectrophotometer. The solid reflectance spectra at 350–1400 nm (UV–Vis/NIR), were measured on a Guided Wave model 260 spectrophotometer equipped with optical fiber. Fourier-Transform Infrared (FTIR) spectra of solid samples dispersed in KBr, at 4000–400 cm^{−1}, were recorded on a Bomen MB-102 spectrophotometer coupled to diffuse reflectance accessory (Pike Technologies Inc.). FTIR transmittance spectra of samples in Nujol mulls between CsI pellets, at 400–200 cm^{−1}, were also recorded on the Bomen MB-102 spectrophotometer. Raman spectra of solid samples were carried out on a Micro-Raman RENISHAW System 3000 (laser line = 632.8 nm). The molar magnetic susceptibilities were measured on powdered samples at room temperature by the Faraday method using an electrobalance Cahn DTL 7500; the diamagnetic corrections were made by Pascal's constants and Hg[Co(SCN)₄] was used for calibration. Molar conductance measurements for ~1 × 10^{−3} mol L^{−1} acetonitrile solutions of the compounds were carried out

with a Digimed DM-31 equipment, at 25.0 ± 0.5 °C; KCl aqueous solution, $146.9 \mu\text{S cm}^{-1}$ at 25 °C, cell constant = 0.1 cm^{-1} , was used for calibration.

2.3. Syntheses of diruthenium compounds with NSAIDs

2.3.1. Synthesis of $[\text{Ru}_2(\text{ibp})_4\text{Cl}]$ (1)

The complex was synthesized by modified procedure in relation to that previously reported [19]. $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4\text{Cl}]$ (300 mg, 0.63 mmol) was dissolved in 200 mL of water. After rotary evaporation of the solvent to 40 mL, ibuprofen (660 mg, 3.20 mmol) in 40 mL of ethanol and LiCl (370 mg) in 5 mL of water were, separately, added to this solution. The mixture was stirred under nitrogen for 3 h, at 60 °C. The solid product formed on the bottom of the flask was washed with water and then dissolved in ethanol. After filtration, the resulting solution was allowed to evaporate under nitrogen stream and the dark-brown product was dried in a vacuum desiccator over phosphorus pentoxide. Yield = 74%. *Anal.* Calc. for $\text{C}_{52}\text{H}_{68}\text{O}_8\text{ClRu}_2 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$: C, 58.71; H, 6.16. Found: C, 58.39; H, 6.24%. Electronic absorptions at λ_{max} (nm): 483 and 1125 nm (solid phase); 428 nm (in methanol); $\mu_{\text{eff}} = 3.9$ B.M.; FTIR major bands, ν (cm^{-1}): 3053sh ($\nu(\text{CH})_{\text{aromatic}}$); 2955ms, 2923sh, 2867m ($\nu(\text{CH})_{\text{aliphatic}}$); 1513m ($\nu(\text{CC})_{\text{ring}}$); 1465s ($\nu_{\text{a}}(\text{COO}^-)$); 1409s ($\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$); 1372m ($\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$); 1286m, 1071m, 1019w (region of $\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, $\delta_{\text{ring in plane}}$, $\rho(\text{CH}_3)$); 849m ($\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, $\delta_{\text{ring out plane}}$); 740 m ($\delta(\text{OCO})$); 555m, 492m ($\nu(\text{Ru-O})$); molar conductance = $2.6 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ in acetonitrile.

2.3.2. Synthesis of $[\text{Ru}_2(\text{asp})_4\text{Cl}]$ (2)

$[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4\text{Cl}]$ (300 mg, 0.63 mmol) was dissolved in 200 mL of water. After reducing the volume of this solution to 65 mL by rotary evaporation, 35 mL of ethanol and solutions of aspirin (640 mg, 3.56 mmol) in 50 mL of ethanol and LiCl (270 mg) in 5 mL of water were separately added to it. The mixture was stirred under nitrogen for 2 h, at 60 °C. Then, it was filtered and, after being washed with water and ethanol, the solid product was dried in a vacuum desiccator over phosphorus pentoxide. Yield = 65%. *Anal.* Calc. for $\text{C}_{36}\text{H}_{28}\text{O}_{16}\text{ClRu}_2$: C, 45.31; H, 2.96. Found: C, 45.03; H, 2.96%.

2.3.3. Synthesis of $[\text{Ru}_2(\text{npx})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$ (3)

$[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$ (76 mg, 0.12 mmol) was dissolved in 10 mL of water and, then, ethanol (15 mL) followed by naproxen (140 mg, 0.61 mmol) in 10 mL of ethanol and NH_4PF_6 (230 mg) in 3 mL of water were added. The mixture was stirred under nitrogen for 3 h, at 60 °C, and then kept under stirring and nitrogen atmosphere for 18 h, at room temperature. The solid formed was washed with water and dissolved in ethanol. After filtration, the resulting solution was allowed to evaporate under nitrogen stream and the dark-brown product was dried in a vacuum desiccator over phosphorus pentoxide. Yield = 62%. *Anal.* Calc. for $\text{C}_{56}\text{H}_{56}\text{F}_6\text{O}_{14}\text{PRu}_2$: C, 51.73; H, 4.34; Found: C, 52.10; H, 4.41%.

2.3.4. Synthesis of $[\text{Ru}_2(\text{ind})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$ (4)

$[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$ (80 mg, 0.13 mmol) was dissolved in 10 mL of water and, then, ethanol (15 mL) followed by indomethacin (240 mg, 0.67 mmol) in 20 mL of ethanol and NH_4PF_6 (240 mg) in 3 mL of water were added. The mixture was stirred under nitrogen for 4 h, at 60 °C, in absence of light. The resulting solution was kept under stirring and nitrogen atmosphere for 18 h, at room temperature. The mixture was centrifuged; the solid product was washed with water and small amounts of ethanol and, then, dried in a vacuum desiccator over phosphorus pentoxide. Yield = 26%. *Anal.* Calc. for $\text{C}_{76}\text{H}_{64}\text{F}_6\text{N}_4\text{O}_{18}\text{PCl}_4\text{Ru}_2$: C, 50.41; H, 3.57; N, 3.10. Found: C, 50.54; H, 3.87; N, 2.91%.

2.4. Bioassays in vitro

2.4.1. Cell culture

C6 rat glioma cells were obtained from the ATCC, Hep2 cells and T24/83 cells from the ECACC. Stocks were maintained frozen (liquid nitrogen) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum and 20% glycerol. Stock cells were grown in DMEM containing 10% foetal calf serum and antibiotics (penicillin 50 U mL^{-1} , streptomycin $50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cells in the exponential phase of growth were used, growing in 75 cm^2 flasks in a humidified atmosphere of 5% CO_2 ; 95% air at 37 °C.

2.4.2. MTT colorimetric assays

Cells were seeded into 96-well plates at a density of $1-2 \times 10^4$ cells/well. After overnight incubation the cells were exposed to Ru_2 -dNSAID at varying concentrations (1, 10, 100 and $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$) for 24–72 h, with a change of medium and drug every 24 h. After this growth period, $25 \mu\text{g}$ of MTT was added to each well and the cells incubated for a further 2–4 h. The medium was removed by aspiration, the cells were re-suspended in $100 \mu\text{L}$ of 0.04 mol L^{-1} HCl in isopropanol and the reaction product was followed by spectrophotometry at the wavelength of 595 nm. The organic NSAIDs were submitted to the same procedure.

2.4.3. Cell proliferation and viability assay

Cells were seeded into 24-well plates at a density of $1-2 \times 10^5$ cells/well. After 24, 48 or 72 h cells were harvested by trypsinization (trypsin 0.025%/EDTA 0.02%) before incubating with 0.2% trypan blue solution in PBS for 2 min. Cells were counted using an improved Neubauer counting chamber with cells that did not incorporate the dye considered intact.

2.4.4. mRNA expression analysis of COX-2 by RT-PCR

C6 cells grown *in vitro* and *in vivo* were used for total RNA extraction with Trizol (Life Technologies, USA). The first strand of complementary DNA (cDNA) was generated from $1 \mu\text{g}$ of RNA, using $2 \mu\text{L}$ of random

hexamer primer ($3 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), $1 \mu\text{L}$ of RNase inhibitor (10 U), $2 \mu\text{L}$ of deoxynucleoside triphosphate mix (dNTP mix) 10 mmol L^{-1} , and $2 \mu\text{L}$ moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase ($200 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$), in a total volume of $20 \mu\text{L}$. The reaction was incubated at 21°C for 10 min, at 42°C for 50 min and at 99°C for 10 min in a GeneAmp®PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, USA). For amplification of the COX-2 sequence, cDNA was amplified in a $50 \mu\text{L}$ volume using $0.5 \mu\text{L}$ ($5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) platinum Taq DNA polymerase, $1 \mu\text{L}$ DNTF mix 10 mmol L^{-1} , $1.5 \mu\text{L}$ MgCl_2 50 mmol L^{-1} , $5 \mu\text{L}$ PCR buffer $10\times$ and $6 \mu\text{L}$ of specific primers ($3 \mu\text{L}$ sense + $3 \mu\text{L}$ antisense). Rat ribosomal L19 (RPL19) gene was amplified as an internal control. The oligonucleotide sequences used for COX-2 and RPL19 were: COX2 sense: 5'-TCAAGACAGATCAGAAG CGA-3' antisense: 5'-TACCTGAGT GTCTTTGATTG-3' and RPL19 sense: 5'-TCTCATG GAACACATCCAC AA-3' antisense: 5'-TGGTCAGCCA GGAGCTTCTT-3'. All reagents used in the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) were purchased from Life Technologies, Brazil. Each cycle of PCR amplification involved denaturing for 1 min at 94°C , annealing for 1 min at 58°C and extension for 1 min at 72°C . To ensure the exponential phase of amplification, the number of PCR cycles was determined and optimized for COX-2 as 38 cycles and RPL19 as 36 cycles. Aliquots of amplified PCR products were fractionated on a 1% agarose gel containing 0.05% ethidium bromide and the image was captured by Foto-Analyst/Archiver™ (Foto-Dyne-Incorporated, USA). Semi-quantitative mRNA expression data was calculated by the ratio of respective mRNA/RPL19 density.

3. Results and discussion

3.1. Diruthenium compounds characterization

Compounds **1** and **2** were prepared by direct reaction between $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4\text{Cl}]$ and the correspondent acidic drug ligands under similar conditions. The $[\text{Ru}_2(\text{ibp})_4\text{Cl}]$ complex has been obtained by a different method but the characterization data (Section 2) are consistent with those previously reported [19]. Although $[\text{Ru}_2(\text{asp})_4\text{Cl}]$ has been prepared before [40] no complete characterization of it was found in the literature. Here, the complex was synthesized by a new experimental procedure and its spectroscopic data are presented. The novel compounds, **3** and **4**, were prepared by reactions of $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$ with the correspondent acidic drug ligands. Elemental analyses are consistent with complete carboxylate exchange reactions for all the products. The four acetate anions from the precursors chloro-acetate and aqua-acetate are substituted by the deprotonated NSAID (dNSAID) ligands giving the derivatives $[\text{Ru}_2(\text{dNSAID})_4\text{Cl}]$, with ibp and asp, and $[\text{Ru}_2(\text{dNSAID})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$, for npx and ind, respectively.

Physicochemical data for compounds **2**, **3** and **4** are shown in Table 1 and they are further discussed along with the data obtained for compound **1** (see Section 2).

Electronic spectra of all diruthenium compounds (in methanol) exhibit absorption bands at about 430 nm which can be ascribed to $\pi(\text{Ru}-\text{O}, \text{Ru}_2) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$ electronic transitions. Solid-state λ_{max} shifts to lower energy (470–500 nm) for compounds **1** and **2**, according to observed for analogous diruthenium-tetracarboxylates [41–43]. Broad and low intensity near-IR bands ($\lambda_{\text{max}} \sim 1100 \text{ nm}$) that are characteristics of $\delta(\text{Ru}_2) \rightarrow \delta^*(\text{Ru}_2)$ electronic transition involving dimetal core δ orbitals were also observed for all solid-state diruthenium compounds. The presence of these UV–Vis and NIR bands is consistent with previously reported spectra for analogous mixed valent diruthenium carboxylates and, consequently, agrees with the existence of metal–metal multiple bonds for the $\text{Ru}_2(\text{II}, \text{III})$ cores [13,14].

The high effective magnetic moments ($\mu_{\text{eff}} = 3.7\text{--}4.1 \text{ B.M. per Ru}_2 \text{ unit}$) (Table 1) correspond to three unpaired electrons per dinuclear unit according to reported data for analogous complexes and indicate $(\sigma)^2(\pi)^2(\delta)^2(\pi^*\delta^*)^3$ ground state configurations for $\text{Ru}_2\text{-dNSAIDs}$ complexes [13,14].

Compounds **1** and **2** exhibited low molar conductance values ($3.7 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$). The non-electrolyte [44] behavior is consistent with the presence of neutral species in acetonitrile solutions. In contrast, the high values (84 and $65 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, for **3** and **4**, respectively) agree with 1:1 electrolytes according to expected for the presence of $[\text{Ru}_2(\text{dNSAID})_4]^+$ cations and PF_6^- anions in solutions of compounds **3** and **4**.

Tentative attributions of most representative FTIR bands for compounds **2**, **3** and **4** are shown in Table 1. No significant spectral changes were observed for the NSAIDs after their coordination to the diruthenium cores, except for the frequencies related to the carboxylic ($-\text{COOH}$) groups [45,46]. The carbonyl stretching, $\nu(\text{C}=\text{O})$, of the parent acids (1720 cm^{-1} , for Hibp; 1691 cm^{-1} , for Hasp; 1728 cm^{-1} , for Hnpx; 1718 cm^{-1} , for Hind) disappeared in the correspondent metal complexes spectra. Instead, carboxylate ($-\text{COO}^-$) typical bands were found at the region of $1480\text{--}1400 \text{ cm}^{-1}$. The values for $\Delta\nu [\nu_a(\text{COO})-\nu_s(\text{COO})]$ are in the range of $40\text{--}70 \text{ cm}^{-1}$, corroborating the bridging coordination mode of the carboxylate ligands to the diruthenium cores [14].

The presence of PF_6^- counter-ions in compounds **3** and **4** are confirmed by the bands at $\sim 850 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu(\text{PF})$ stretching, ν_3) and 559 cm^{-1} ($\delta(\text{FPP})$, ν_4) [46]. Two relatively intense bands (556 cm^{-1} and $450\text{--}490 \text{ cm}^{-1}$), observed for all complexes, might be assigned to $\nu(\text{Ru}-\text{O})$ stretching modes involving the ruthenium–O(carboxylate) metal–ligand bonds [47].

The Raman bands at $336\text{--}357 \text{ cm}^{-1}$ can be assigned to $\nu(\text{Ru}-\text{Ru})$ stretching modes for the two chloro-complexes [47]. The frequencies for compounds **1** (336 cm^{-1}) and **2** (342 cm^{-1}) are shifted to higher energy indicating that

Table 1
Physicochemical data for diruthenium(II,III) compounds **2**, **3** and **4**

Compound	[Ru ₂ (asp) ₄ Cl]	[Ru ₂ (npx) ₄ (H ₂ O) ₂ PF ₆]	[Ru ₂ (ind) ₄ (H ₂ O) ₂ PF ₆]
<i>Electronic absorption transitions; λ (nm); ε (mol⁻¹ L cm⁻¹)</i>			
π(Ru–O, Ru ₂) → π* (Ru ₂) (solvent)	439; 976 (in methanol)	429; 770 (in methanol)	430; sh (in methanol)
δ(Ru ₂) → δ* (Ru ₂)	1140 (solid)	1112 (solid)	1110 (solid)
<i>Effective magnetic moment per Ru₂; μ_{eff} (B.M.)</i>			
	3.9	4.1	3.7
<i>FTIR major bands; ν (cm⁻¹)</i>			
ν(CH) _{aromatic}	3070w	3055vw	3092w
ν(CH) _{aliphatic}	2990w, 2928w, 2882w	2975w, 2939w, 2904sh, 2845w	2993sh, 2962w, 2936w, 2834w
ν(C=O) _{ester}	1761ms		
ν(C=O) _{amide}			1683s
ν(CC) _{ring}	1606m, 1583sh	1637m, 1604m	1593m
ν _a (COO ⁻) ^a	1476ms	1459ms	1473s
ν _s (COO ⁻) ^a	1409s	1410s	1410s, br
δ _s (CH ₃)	1374sh	1372m	1360s, br
ν(C _{ring} OC)		1270ms	1227s
ν _a (OCC); ν(CC(O)O)	1191ms		
Region of δ _s (CH ₃); δ _{ring} in plane; ρ(CH ₃)	1161sh	1230m, 1214m, 1175m, 1160m, 1069m	1177m, 1147m, 1087m, 1067m, 1033m, z1013m
ν _s (COC)		1029m	
δ(CH ₃); δ _{ring} out plane	817mw	*	*
ν(PF ₆ ⁻)		849vs, br	848vs, br
δ(FPF)		559s	559s
δ(OCO)	712m	711w	718m
ν(Ru–O)	560m, 458m	557m, 474m	557m, 481mw
<i>Raman major bands at low frequency; ν (cm⁻¹)</i>			
ν(Ru–Ru)	342s	360m	347s
ν(Ru–O)	367w		
ν(PF ₆ ⁻)		760s	749s

Tentative attributions for major bands observed at the correspondent vibrational FTIR and Raman spectra.

^a δ(CH₃) is overlapped with these bands; * not identified, overlapped with ν_s(PF₆); s = strong; m = medium; mw = medium-weak; ms = medium-strong; w = weak; br = broad; sh = shoulder.

the Ru–Ru bond in Ru₂-dNSAID derivatives are slightly shorter than that observed for Ru₂-acetate precursor (327 cm⁻¹). The ν(Ru–O) band was tentatively ascribed for **1** at 374 cm⁻¹ and for **2** at 367 cm⁻¹. The aqua-complexes exhibit broad and overlapped bands, mainly due to the presence of axial water molecules, making difficult the attribution at this region of the spectra. The ν(PF) stretching mode, or ν₁ frequency [46], could be observed around 750 cm⁻¹ for both [Ru₂(dNSAID)₄(H₂O)₂]PF₆ compounds.

Experimental results corroborate the proposition that [Ru₂(dNSAID)₄Cl] and [Ru₂(dNSAID)₄(H₂O)₂]PF₆ exhibit mixed valent Ru₂(II,III) cores with Ru–Ru bonds stabilized by four bridging drug ligands in like-paddle-wheel structures (Fig. 2). The coordination of the large dNSAID anions do not show significant influence on the electronic structure of the novel compounds when compared to the correspondent diruthenium-acetate precursors. Compounds **1** and **2** probably exhibit solid-state polymeric structures like other analogous chloro-complexes. In contrast, compounds **3** and **4** have two axially coordinated water molecules, giving positively charged dimeric units that are charge-balanced by the PF₆⁻ counter-ions.

Fig. 2. General structure of the Ru₂-dNSAID compounds.

3.2. In vitro assays

3.2.1. MTT assays

The effects of the four Ru₂-dNSAID complexes and the parent NSAIDs were investigated *in vitro* in the human larynx tumor Hep2, the human bladder tumor T24/83 and the rat glioma C6. Initial experiments found no effects of any drug on the three cell lines at either 1 or 10 μmol L⁻¹, while at 100 μmol L⁻¹ the drugs showed some inhibitory effects.

Experiments with 1 mmol L^{-1} complex were discarded as the high concentrations of vehicle (DMSO or ethanol) were cytotoxic to all three cell lines (results not shown). Further experiments were performed at $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, with no significant effects being found for any of the complexes in the Hep2 human larynx tumor or the T24/83 human bladder tumor (Table 2) after a 24 h incubation period. However, in the C6 rat glioma several drugs were found to inhibit cell proliferation by the MTT assay. The percentages of the control MTT value were: 85.9 ± 6.2 for Hind, 82.7 ± 3.4 for Hnpx, 77.4 ± 5.9 for compound **1** and 72.1 ± 5.5 for compound **3**. Hasp (95.6 ± 4.6) and compound **2** (96.3 ± 7.8) did not exhibit significant values. The high value found for compound **4** (93.1 ± 6.2) could not be explained based on the experiments conducted until the present moment.

3.2.2. Cell proliferation assay

In order to improve the reliability of the MTT data, further experiments for Hibp, Hnpx and their correspondent diruthenium complexes were performed using direct cell counting methods and cell viability analyzed by the trypan blue exclusion method. These experiments were performed on the C6 glioma cell line and involved cell culture in the presence of $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4\text{Cl}]$, Hibp, compound **1**, Hnpx or compound **3** for 24, 48 or 72 h (Table 3). Slight inhibitory effects were found with the Ru_2 -dNSAID at 24 h

Table 2
MTT assay data

Compound	Hep2	T24/83	C6
$[\text{Ru}_2(\text{ibp})_4\text{Cl}]$	84.0 ± 7.6	103 ± 9.3	77.4 ± 5.9^a
Hibp	82.1 ± 5.4	94.3 ± 5.9	94.2 ± 5.3
$[\text{Ru}_2(\text{asp})_4\text{Cl}]$	83.1 ± 3.9	n.d.	96.3 ± 7.8
Hasp	106 ± 4.3	n.d.	95.6 ± 4.6
$[\text{Ru}_2(\text{npx})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$	86.7 ± 3.3	138 ± 11.5	72.1 ± 5.5^a
Hnpx	82.7 ± 8.1	112 ± 9.0	82.7 ± 3.4^b
$[\text{Ru}_2(\text{ind})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$	115 ± 6.3	93.8 ± 6.5	93.1 ± 6.2
Hind	85.8 ± 1.6	94.1 ± 6.5	85.9 ± 6.2^b

Data are expressed as percentage of optical density of control cells $\pm$ SEM, n.d., not determined. Representative data from two separate experiments with $n = 9$ –12. Drugs were present at a final concentration of $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Statistical analysis used 1-way ANOVA with Tukey's post test, $^a p < 0.001$; $^b p < 0.01$.

Table 3
Cell number

Compound	24 h	48 h	72 h
$[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4\text{Cl}]$	89.4 ± 4.8	96.2 ± 2.8	93.7 ± 2.4
$[\text{Ru}_2(\text{ibp})_4\text{Cl}]$	85.5 ± 4.4	99.1 ± 5.7	$50.6 \pm 1.6^{a,b,c}$
Hibp	100 ± 3.2	89.8 ± 2.2	74.6 ± 1.7^a
$[\text{Ru}_2(\text{npx})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$	88.6 ± 2.0	80.7 ± 6.4	$53.2 \pm 3.5^{a,b,c}$
Hnpx	95.6 ± 6.6	81.7 ± 9.5	82.9 ± 2.7^a

Data are expressed as percentage of control cell number $\pm$ SEM. Representative data from three separate experiments with $n = 4$. Drugs were present at a final concentration of $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Statistical analysis used 1-way ANOVA with Tukey's post test, $p < 0.05$; a versus control; b versus ibuprofen; c versus naproxen.

but these were not significant when compared with those obtained by the less accurate MTT assay. Interestingly, inhibition was lost at 48 h but became highly significant at 72 h. In contrast, compound $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4\text{Cl}]$ does not exhibit inhibitory effect at 72 h. These data would suggest that the effects of compounds **1** and **3** are time dependent involving cumulative exposure to the complex to become more anti-proliferative. It is important to note that none of these effects involved direct cytotoxicity as shown by the large percentage of cells which retained their capacity to exclude trypan blue, for example cell viability at 72 h was: $98.5 \pm 0.7\%$ for compound **1**; $100 \pm 0.1\%$ for compound **3**; and $99.1 \pm 0.5\%$ for control (Table 4). Also of note was the inhibitory effect seen after 72 h exposure to the Hibp NSAID alone. Considering that this cell line does not express COX2 under normal culture conditions (Fig. 3) or produce PGE_2 [48] these effects must be through a COX2-independent mechanism.

Compounds **1** and **3** were found to inhibit the proliferation of C6 glioma cells *in vitro* with increasing efficacy correlated to increased time of exposure to the complexes. It is known that the C6 cell line does not express COX2 *in vitro* and therefore any effects of the NSAID component of these complexes must be via either COX1 or non-COX related mechanisms. Coordination of ruthenium to naproxen or ibuprofen, which exhibit antitumor properties alone in C6 cells, had synergistic effects improving their inhibitory properties. Of particular interest is the possibility that these drugs may be even more effective *in vivo* in gliomas where COX2 is expressed by tumor cells, endothelial cells and infiltrating microglial cells. Previous studies with NAMI-A have reported anti-angiogenic and anti-matrix metalloprotease effects [11,12]. The possibility that the complexes

Table 4
Cell viability by trypan blue exclusion

	24 h	48 h	72 h
Control	99.5 ± 0.25	99.4 ± 0.39	99.1 ± 0.52
$[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4\text{Cl}]$	99.9 ± 0.33	98.5 ± 0.72	98.0 ± 0.41
$[\text{Ru}_2(\text{ibp})_4\text{Cl}]$	99.8 ± 0.13	98.2 ± 1.10	98.5 ± 0.73
Hibp	99.8 ± 0.11	98.6 ± 0.86	98.4 ± 1.00
$[\text{Ru}_2(\text{npx})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$	99.8 ± 0.23	98.2 ± 0.84	100 ± 0.10
Hnpx	99.5 ± 0.26	98.3 ± 0.83	99.1 ± 0.45

Viable cell data are expressed as percentage of total cell population $\pm$ SEM. Drugs were present at a final concentration of $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Cells were incubated with trypan blue prior to counting in a Neubauer chamber. Representative data from three separate experiments with $n = 4$.

Fig. 3. COX2 mRNA expression in C6 cells *in vitro* lanes 1–3; C6 cells *in vivo* lanes 4–6.

1 and 3 may exert similar effects opens new horizons for studies in the *in vivo* C6 glioma model.

4. Conclusions

Diruthenium compounds of Hipb, Hasp, Hnpx and Hind NSAID drugs exhibited paddlewheel structures with mixed valent Ru₂(II,III) cores containing metal–metal bonds stabilized by four drug-carboxylate bridging ligands. No significant effects were found for the complexes and their parent NSAIDs in the Hep2 human larynx or the T24/83 human bladder tumor. However, the coordination of the Ru₂(II,III) core led to a synergistic effect that increased significantly the C6 rat glioma cell antiproliferative activity of naproxen and ibuprofen drugs. The development of novel drugs with marked effect on glioma cell proliferation, which are also potent inhibitors of COX2, is an important new avenue for future research related to the use of chemotherapy for glioma treatment. The possibility that the diruthenium complexes of ibuprofen and naproxen may exert effects (anti-angiogenic and anti-matrix metalloprotease) that are similar to those exhibited by NAMI-A opens new horizons for *in vivo* C6 glioma model studies.

Investigation about chemical and biological behavior to elucidate the antitumor properties of this kind of compounds is part of our forthcoming work.

Acknowledgements

The authors thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Brazilian agencies for financial support and fellowships; Instituto do Milênio de Materiais Complexos (IM²C); Dr. D.L.A. Faria and R. Ando (Laboratório de Espectroscopia Molecular, Instituto de Química, USP) for Raman spectra.

References

- [1] M.J. Clarke, *Coord. Chem. Rev.* 236 (2003) 209.
- [2] P.J. Dyson, G. Sava, *Dalton Trans.* (2006) 1929.
- [3] I. Kostova, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 1085.
- [4] C.X. Zhang, S.J. Lippard, *Curr. Opi. Chem. Biol.* 7 (2003) 481.
- [5] A. Habtemariam, M. Melchart, R. Fernandez, S. Parsons, I.D.H. Oswald, A. Parkin, F.P.A. Fabbiani, J.E. Davidson, A. Dawson, R.E. Aird, D.I. Jodrell, P.J. Sadler, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 6858.
- [6] W.H. Ang, P.J. Dyson, *Eur. J. Inorg. Chem.* 20 (2006) 4003.
- [7] C.G. Hartinger, S.Z. Seifred, M.A. Jakupc, B. Kynast, H. Zorbas, B. Keppler, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 891.
- [8] S.R. Grguric-Sipka, R.A. Vilaplana, J.M. Pérez, M.A. Fuertes, C. Alonso, Y. Alvarez, T.J. Sabo, F. Vilchez-González, *J. Inorg. Biochem.* 97 (2003) 215.
- [9] A. Bergamo, G. Stocco, B. Gava, M. Cocchiello, E. Alessio, B. Serli, E. Iengo, G. Sava, *J. Pharmacol. Expl. Ther.* 305 (2003) 725.
- [10] V. Djinović, M. Momčilović, S. Grguric-Sipka, V. Trajković, M.M. Stojković, D. Miljković, T. Sabo, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 2168.
- [11] S. Zorzet, A. Bergamo, M. Cocchiello, A. Sorc, B. Gava, E. Alessio, E. Iengo, G. Sava, *J. Pharmacol. Expl. Ther.* 295 (2000) 927.
- [12] G. Sava, S. Zorzet, C. Turrin, F. Vita, M.R. Soranzo, G. Zabucchi, M. Cocchiello, A. Bergamo, S. DiGiovine, G. Pezzoni, L. Sartor, S. Garbisa, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 1898.
- [13] F.A. Cotton, C.A. Murillo, R.A. Walton (Eds.), *Multiple Bonds Between Metal Atoms*, 3rd ed., Springer Science and Business Media Inc., New York, 2005.
- [14] M.A.S. Aquino, *Coord. Chem. Rev.* 170 (1998) 141.
- [15] M.A.S. Aquino, *Coord. Chem. Rev.* 248 (2004) 1025.
- [16] B.K. Keppler, M. Henn, U.M. Juhl, M.R. Berger, R. Niebl, F.E. Wagner, *Prog. Clin. Biochem. Med.* 10 (1989) 41.
- [17] B.K. Keppler, K. Lipponer, B. Stenzel, F. Kratz, in: B.K. Keppler (Ed.), *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, VCH, New York, 1993.
- [18] C.E.J. Van Rensburg, E. Kreft, J.C. Swarts, S.R. Dalrymple, D.M. Macdonald, M.W. Cooke, M.A.S. Aquino, *Anticancer Res.* 22 (2002) 889.
- [19] A. Andrade, S.F. Namora, R.G. Woisky, G. Wiesel, R. Najjar, J.A.A. Sertié, D. de Oliveira Silva, *J. Inorg. Biochem.* 81 (2000) 23.
- [20] F.A. Cotton, D. de Oliveira Silva, *Inorg. Chim. Acta* 249 (1996) 57.
- [21] M.J. Thun, S.J. Henley, C. Patrono, *J. Nat. Cancer Inst.* 94 (2002) 252.
- [22] S.J. Shiff, M.I. Koutsos, L. Qiao, B. Rigas, *Exptl. Cell Res.* 222 (1996) 179.
- [23] M.L. Smith, G. Hawcroft, M.A. Hull, *Eur. J. Cancer* 36 (2000) 664.
- [24] G.A. Fitzgerald, *Nature Rev. Drug Discovery* 2 (2003) 879.
- [25] M. Romano, J. Clària, *FASEB J.* 17 (2003) 1986.
- [26] S. Zha, V. Yegnasubramanian, W.G. Nelson, W.B. Isaacs, A.M. De Marzo, *Cancer Lett.* 213 (2004) 1.
- [27] T. Shono, P.J. Tofilon, J.M. Bruner, O. Owolabi, F.F. Lang, *Cancer Res.* 61 (2001) 4375.
- [28] F. Kürzel, C. Hagel, S. Zapf, H. Meissner, M. Westphal, A. Geise, *Acta Neurochir. (Wien)* 144 (2002) 71.
- [29] N. Nathoo, G.H. Barnett, M. Golubic, *J. Clin. Pathol.* 57 (2004) 6.
- [30] P. New, *Cancer Control* 11 (2004) 152.
- [31] M. Wang, D. Yoshida, S. Liu, A. Teramoto, *J. Neuro-Oncol.* 72 (2005) 1.
- [32] J. Drappatz, P. Wen, *Curr. Opi. Neur.* 17 (2004) 663.
- [33] J. Tuettenberg, R. Grobholz, T. Korn, F. Wenz, R. Rever, P. Vajkoczy, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 131 (2005) 31.
- [34] F. Lefranc, J. Brothi, R. Kiss, *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 2411.
- [35] N.R. Sivas-Sears, J.A. Schwartzbaum, R. Miike, M. Moghadassi, M. Wrensch, *Am. J. Epidemiol.* 159 (2004) 1131.
- [36] M. Ishibashi, F.G. Bottone Jr., S. Taniura, H. Kamitani, T. Watanabe, T.E. Eling, *Exp. Cell Res.* 302 (2005) 244.
- [37] A. Bernardi, M.C. Jaques-Silva, A. Delgado-Cañedo, G. Lenz, A.M.O. Battastini, *Eur. J. Pharm.* 532 (2006) 214.
- [38] R.W. Mitchell, A. Spencer, G. Wilkinson, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1973) 846.
- [39] K.D. Drysdale, E.J. Beck, T.S. Cameron, K.N. Robertson, M.A.S. Aquino, *Inorg. Chim. Acta* 256 (1997) 243.
- [40] A. Carvill, P. Higgins, G.M. McCann, H. Ryan, A. Shiels, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1989) 2435.
- [41] J.G. Norman Jr., G.E. Renzoni, D.A. Case, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 5256.
- [42] V.M. Miskowski, H.B. Gray, *Inorg. Chem.* 27 (1988) 2501.
- [43] G. Estiú, F.D. Cukiernik, P. Maldivi, O. Poizat, *Inorg. Chem.* 38 (1999) 3030.
- [44] W.J. Geary, *Coord. Chem. Rev.* 7 (1971) 81.
- [45] R.A. Nyquist, C.L. Putzig, M.A. Leugers, *Infrared and Raman Spectral Atlas of Inorganic Compounds and Organic Salts: Text and Explanations*, Vol. 1, Academic Press, San Diego, 1996.
- [46] K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Parts A and B*, 5th ed., John Wiley & Sons Inc., New York, 1997.
- [47] V.M. Miskowski, T.M. Loehr, H.B. Gray, *Inorg. Chem.* 26 (1987) 1098.
- [48] K.L. Ramos, A. Colquhoun, *Glia* 43 (2003) 149.

ANEXO C

Oligonucleotídeos usados nas análises de PCR.

Genes	Oligonucleotídeos (sense/antisense)	ciclos
Ciclina D1 (435pb)	5'-TGTTTCGTGGCCTCTAAGATGA-3' 5'-GCTTGACTCCAGAAGGGCTT-3'	43
p21 (200pb)	5'-TCCGATCCTGGTGATGTCC-3' 5'-CGAACACGCTCCCAGACGT-3'	42
p27 (325pb)	5'-GCAGCTTGCCCGAGTTCTAC-3' 5'-TTCTTGGGCGTCTGCTCCAC-3'	41
p16 (180pb)	5'-TCTGCAGATAGACTAGCCA-3' 5'-CTCGCAGTTCGAATCTGCA-3'	42
p53 (271pb)	5'-GTGGCCTCTGTCATCTTCCG-3' 5'-CCGTCACCATCAGAGCAACG-3'	42
p65 (163pb)	5'-AACACTGCCGAGCTCAAGAT-3' 5'-CATCGGCTTGAGAAAAGGAG-3'	38
pRb (549pb)	5'-TCTACCTCCCTTTCCTGTTC-3' 5'-AGTCATTTTTGTGGGTGTTGG-3'	42
E2F-1 (143pb)	5'-ACGCTATGAAACCTCACTAAA-3' 5'-AGGACATTGGTGATGTCATA-3'	42
C-myc (593pb)	5'-CACCAGCAGCGACTCTGAAGAAG-3' 5'-ACTTCCGGTCAGTTTATGCACCA-3'	49
ERK-1 (188pb)	5'-CCTGCTGGACCGGATGTTA-3' 5'-GTCTCTTGAAGATCAGCTC-3'	40
Bax (352pb)	5'-GCAGGGAGGATGGCTGGGGAGA-3' 5'-TCCAGACAAGCAGCCGCTCACG-3'	43
Bcl-2 (780pb)	5'-GCGAAGTGCTATTGGTACCTG-3' 5'-ATATTTGTTTGGGGCAGGTCT-3'	43
PPAR- γ (257pb)	5'-GAGCTGACCCAATGGTTGCTG-3' 5'-GCTTCAATCGGATGGTTCTTC-3'	49
PPAR- δ (326pb)	5'-GCTATGACCAGGCCTGCAGG-3' 5'-CCCTTGCACCCCTCACACGCGTC-3'	-
nm23 α (439pb)	5'-GGTGGCATGAAGTTCCTTCG-3' 5'-GATGGTCCATCCAGTCAGTGG-3'	42
nm23 β (324pb)	5'-CAGGACCGGTGGTTGCTATG-3' 5'-GATCTAGAGCTGCTGCTCCC-3'	42
MMP-2 (500pb)	5'-TGGCAGTGCAATACCTGAAC-3' 5'-CAAGGTCCATAGCTCATCGTC-3'	38
MMP-9 (531pb)	5'-GAGGAATACCTGTACCGCTATG-3' 5'-CAAACCGAGTTGGAACAC-3'	38
Brevican Secretado (571pb)	5'-CAATGGTGGGACATGCTTGG-3' 5'-CGTCTCGGCACCGATATCG-3'	38
Brevican-GPI (475pb)	5'-CTCCAGCTCTGGGACACCTG-3' 5'-GGCTTGTTTTCCATGAAACAGTC-3'	38

TN-C (442pb)	5'-CAGTGCCATAGCAACAACAGC-3' 5'-TGTATTCCCAGACACTGTGCG-3'	41
COX-2 (204pb)	5'-TCAAGACAGATCAGAAGCGA-3' 5'-TACCTGAGTGTCTTTGATTG-3'	38
VEGF-A (148pb)	5'-CTCTACCTCCACCATGCCAAG-3' 5'-GGTACTCCTGGAGGATGTCCACC-3'	42
Flt-1 (453pb)	5'-TGGAAGGAGGCGAGGATTACAGTGAGA-3' 5'-GGTAGATTTTCAGGTGTGGCATACTCTGGTG-3'	42
Flk-1 (445pb)	5'-GTACTCCAGCGACGAGGCAGGCAGGACTTTTA-3' 5'-TTTTATCCAGTTTCACAGAGGGCTCCATTG-3'	43
EP1 (497pb)	5'-CTGGGCGGCTGCATGGTCTTCTTC-3' 5'-GCGGAGGGCAGCTGTGGTTGA-3'	40
EP2 (476pb)	5'-GGTGTAGCGCCGCGCAGCAGGAC-3' 5'-AGCCGAGCACAGCCACGATGAGC-3'	41
EP3 (489pb)	5'-CCGGCGGGCAACGAGAC-3' 5'-CTGGGCAGGGCAAGGAGGTAG-3'	43
EP4 (493pb)	5'-TCGCGCAAGGAGCAGAAGGAGAC-3' 5'-GCGCCGCACACCAGCACAT-3'	41
GAPDH (306pb)	5'-GTCGGTGTGAACGGATTTG-3' 5'-ACAAACATGGGGGCATCAG-3'	32
Ku70 (414pb)	5'-AAGAGGATCATGCTATTCACCAA-3' 5'-TCCTTGTCTTAGTTTTCACTGG-3'	33
Ku80 (433pb)	5'-GATGAGGCAGCAGCTGTT-3' 5'-CAAAATGTGCTGCTGAAT-3'	35
TN-R (154pb)	5'-CACCTACCAGGGAGTCCGTA-3' 5'-CCACTTCCACTGAGGAGAGC-3'	38