

Universidade de São Paulo – USP
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Mariana Medeiros

**Avaliação comparativa dos efeitos antitumorais dos inibidores de NF- κ B DHMEQ,
DTCM-g e SEMBL em sarcoma de Ewing**

Ribeirão Preto

2022

Mariana Medeiros

[Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)]

Avaliação comparativa dos efeitos antitumorais dos inibidores de NF- κ B DHMEQ, DTCM-g e SEMBL em sarcoma de Ewing

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Biológicas e da Saúde

Orientador: Prof. Dr. María Sol Brassesco Annichini

Ribeirão Preto

2022

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

Ficha catalográfica

MEDEIROS, M.

Avaliação comparativa dos efeitos antitumorais dos inibidores de NF- κ B DHMEQ, DTCM-g e SEMBL em sarcoma de Ewing.

Ribeirão Preto, 2022

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) – Área de concentração: Ciências Biológicas e da Saúde

Orientador: Prof. Dr. María Sol Brassesco Annichini

1. Sarcoma de Ewing; 2. Câncer infantil; 3. NF- κ B; 4. Inibidores químicos.

Apoio financeiro:

Este trabalho teve apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- a) Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos N° 2016/19226-7 e N° 2019/17020-0);
- b) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- c) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- d) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP;
- e) Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP;
- f) Hemocentro de Ribeirão Preto.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Mariana Medeiros

Título: Avaliação comparativa dos efeitos antitumorais dos inibidores de NF- κ B DHMEQ, DTCM-g e SEMBL em sarcoma de Ewing.

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Biológicas e da Saúde

Orientador: Prof. Dr. María Sol Brassesco Annichini

Parecer: Aprovado, 24/08/2022

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____



Universidade de São Paulo

ATA DE DEFESA

Aluno: 17136 - 11538852 - 1 / Página 1 de 1

Ata de defesa de Dissertação do(a) Senhor(a) Mariana Medeiros no Programa: Biologia Celular e Molecular, do(a) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos 24 dias do mês de agosto de 2022, no(a) FMRP/USP realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Mariana Medeiros, apresentada para a obtenção do título de Mestra intitulada:

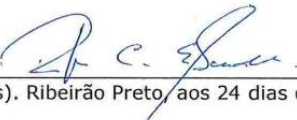
"Avaliação comparativa dos efeitos antitumorais dos inibidores de NF-κB DHMEQ, DTCM-g e SEMBL em sarcoma de Ewing."


Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:


Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Maria Sol Brassesco Annichini	Presidente	FFCLRP - USP	<u>aprovado</u>
Andréia Machado Leopoldino	Titular	FCFRP - USP	<u>aprovado</u>
Tiago Góss dos Santos	Titular	FAP - Externo	<u>aprovado</u>


Resultado Final: aprovado

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Robson de Castro Escudeiro , lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Ribeirão Preto, aos 24 dias do mês de agosto de 2022.


Andréia Machado Leopoldino


Tiago Góss dos Santos


Maria Sol Brassesco Annichini
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 06/09/2022 e, portanto, o(a) aluno(a) Ray jus ao título de Mestra em Ciências obtido no Programa Biologia Celular e Molecular.


Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Profª Drª Cristina Marta Del Ben
Presidente da Comissão de Pós-Graduação
FMRP-USP

Devido à pandemia do COVID-19 e às diretrizes da Universidade de São Paulo e a Circ. CoPGr 12/2020 todos membros da banca participaram da defesa por webconferência" e aprovaram a defesa do(a) aluno(a).



Profa. Dra. Maria Sol Brassesco Annichni
Presidente da Banca

Dedico à as mulheres (mãe, irmã e tantas outras...) sem as quais não teria a força, a inspiração e a coragem para seguir até aqui.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dra María Sol Brassesco Annichini, responsável pelo meu amadurecimento como cientista durante o mestrado. Obrigada pelas oportunidades de crescimento tanto profissional como pessoal.

À Fundação de Apoio do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado e apoio financeiro, sem os quais a pesquisa no Brasil não se sustenta.

Ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), cede do Laboratório de Biologia Celular e Oncogenética que me acolheu para o desenvolvimento do mestrado.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) pela estrutura, pelo incentivo à pesquisa e por toda as oportunidades de aprendizagem.

Ao Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e os Prof. Dr Luiz Gonzaga Tone e Prof. Dr Carlos Scridelli pelo apoio prestado ao Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, onde parte dos experimentos foram realizados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela oportunidade de desenvolver pesquisas e em especial às secretárias do programa, Gabriela Bunhotto Zamoner e Débora Cristina Gameiro pela ajuda com todas as dúvidas.

À bióloga Rosane de Paula Gomes Queiroz, e as técnicas Veridiana Kill Suazo e Beth Perna, por toda ajuda e disposição durante os experimentos no Departamento de Puericultura e Pediatria do HC.

À Prof. Dra Lorena Lobô de Figueiredo Pontes da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e às técnicas Priscila Santos Scheucher e Josiane Schiavinato, pela colaboração e ajuda em parte dos experimentos realizados.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e pela contribuição científica.

Às minhas antigas orientadoras Prof. Dra Selma Maria Michelin Matheus e Prof. Dra Flávia Karina Delella, que me abriram as portas para a ciência dentro da universidade e me inspiraram a ser a mulher cientista que sou hoje.

Aos meus parceiros de laboratório (atuais e egressos) que se tornaram amigos: Gabriel Baldissera, Larwsk Hayann, Rodrigo Hakimi, Ana Laura Bellini, David Bastos, Cecília Fagundes, Vitor Piotto, e em especial à Marina Candido que me recebeu com muito carinho, me auxiliou na pesquisa e foi uma parceira nos momentos bons e nos mais difíceis dos anos que compartilhamos tanto na vida profissional como na pessoal. Aos amigos que fiz no Departamento de Puericultura e Pediatria do HC: Alcides Xavier, Graziella Souza, Jonas Silva, Luciana Veronez, Luiz Gabriel Santos, Luis Nagano, Manuela França, Milena Ramos, Verena Silva e em especial à Jessica Santis, que tornou os dias mais difíceis e desanimadores mais leves e com mais esperança. Aos amigos que Ribeirão Preto me deu: Jéferson Pedrosa, Levi Barros, Fernanda Dalarme, Matheus Santos, Cristina Costa e Macário Arosti. Agradeço a todos pelo companheirismo, pelas risadas, pelas trocas de experiências e por todos os momentos que me ajudaram a seguir em frente sem desistir do sonho de me tornar uma cientista.

Aos meus pais, Renata e Vagner, e à minha irmã, Ana Carolina, que sempre me apoiaram na escolha de seguir a difícil carreira de bióloga e acadêmica, sendo o meu suporte emocional, financeiro e os conselheiros a cada nova decisão a ser tomada.

À todos os meus familiares e pessoas que de alguma forma me ajudaram e me incentivaram nessa jornada, mesmo que sem a consciência de estar ajudando.

“A decisão e o trabalho duro baseados em uma paixão duradoura nunca vão decepcionar você.” (WILSON, 2013)

RESUMO

MEDEIROS, Medeiros. **Avaliação comparativa dos efeitos antitumorais dos inibidores de NF- κ B DHMEQ, DTCM-g e SEMBL em sarcoma de Ewing.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O sarcoma de Ewing (SE) é um tipo de neoplasia óssea infanto-juvenil (0 a 19 anos), que corresponde a cerca de 2% de todos os cânceres infantis. O tratamento se baseia principalmente em poliquimioterapia, porém em muitos casos ocorre recidiva e no caso de doença metastática há resistência ao tratamento. Desta forma, a busca por novos alvos terapêuticos é necessária. O fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B) é um bom candidato por regular diversos processos celulares. Diante disso, o presente estudo objetivou avaliar de forma comparativa o potencial terapêutico da inibição de NF- κ B em SE por meio dos inibidores DHMEQ, DTCM-g e SEMBL. Para isso, foram realizadas análises *in silico* e testes *in vitro* após inibição de NF- κ B na linhagem TC-32. Os resultados mostraram que amostras de SE possuem elevada expressão de *RELA*, *REL* e *NFKB2* e baixa expressão de *NFKB1*; além de linhagens celulares derivadas de SE apresentarem dependência gênica da via NF- κ B. Nos testes *in vitro* todos os inibidores de NF- κ B foram capazes de reduzir a viabilidade celular de forma dose-dependente, sendo o SEMBL e o DHMEQ os mais eficazes. Em contrapartida, os mesmos apresentaram baixo ou nenhum efeito sinérgico e aditivo quando combinados com Doxorubicina (DXR). Com relação à migração, os três compostos foram capazes de reduzi-la, sendo o SEMBL o mais potente. Em modelo 3D, os inibidores de NF- κ B aumentaram o diâmetro dos esferoides em decorrência da perda de integridade (esfericidade). A inibição de NF- κ B também induziu a mudança na expressão gênica de algumas das subunidades de NF- κ B (*RELA*, *RELB* e *NFKB1*) e de alguns alvos moleculares (*BAX*, *PLAU* e *MMP9*). Desta forma, a via do NF- κ B de um modo geral se apresenta como um bom alvo terapêutico em SE e a sua inibição leva à redução de processos celulares que promovem (viabilidade, migração, integridade da estrutura 3D) e aumento de processos que inibem (morte celular) a progressão tumoral.

Palavras-chave: Sarcoma de Ewing; Câncer infantil; NF- κ B; Inibidores químicos.

ABSTRACT

MEDEIROS, Medeiros. **Comparative evaluation of the antitumor effects of NF- κ B inhibitors DHMEQ, DTCM-g and SEMBL in Ewing's sarcoma.** Dissertation (Master of Science) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Ewing's sarcoma (EWS) is a type of childhood bone neoplasm (0 to 19 years old), that accounts for about 2% of all childhood cancers. Treatment is mainly based on multidrug therapy, but in many cases, there is relapse and metastatic disease due to resistance. Thus, the search for new therapeutic targets is necessary. The nuclear transcription factor *kappa* B (NF- κ B) is a good candidate as a regulator of several cellular processes. Therefore, the present study aimed to comparatively evaluate the therapeutic potential of NF- κ B inhibition in SE by the inhibitors DHMEQ, DTCM-g, and SEMBL. For this, *in silico* analyzes and *in vitro* tests were performed after NF- κ B inhibition in the TC-32 cell line. The results showed that SE samples present high expression of RELA, REL, and NFKB2 and low expression of NFKB1; in addition to SE-derived cell lines showing gene dependence on the NF- κ B pathway. In *in vitro* tests, all NF- κ B inhibitors were able to reduce cell viability in a dose-dependent manner, with SEMBL and DHMEQ being the most effective. In contrast, they showed little or no synergistic and additive effects when combined with Doxorubicin (DXR). Regarding migration, the three compounds were able to reduce it, with SEMBL being the most potent. In a 3D model, the NF- κ B inhibitors increased the diameter of the spheroids as a result of the loss of integrity (sphericity). Inhibition of NF- κ B also induced changes in gene expression of some NF- κ B subunits (RELA, RELB, and NFKB1) and some of its molecular targets (BAX, PLAU, and MMP9). In this way, the NF- κ B pathway, in general, presents itself as a good therapeutic target in SE and its inhibition leads to the reduction of cellular processes that promote it (viability, migration, integrity of the 3D structure) and increase of processes that inhibit (cell death) tumor progression.

Key words: Ewing's sarcoma; childhood cancer; NF- κ B; chemical inhibitors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alterações cromossômicas e tumorigênese em Sarcoma de Ewing.....	28
Figura 2. Membros da família REL.....	29
Figura 3. Vias de ativação de NF-κB.....	31
Figura 4. Alterações na via do NF-κB no câncer.....	33
Figura 5. Genes regulados por NF-κB.....	34
Figura 6. Estrutura molecular dos inibidores de NF-κB DHMEQ, DTCM-g e SEMBL.....	37
Figura 7. Expressão e dependência gênica dos membros da família REL em amostras de pacientes e linhagens celulares derivadas de SE.....	60
Figura 8. Correlação entre expressão gênica dos membros da família REL com características clínicas.....	62
Figura 9. Expressão proteica de p65 após exposição às drogas de estudo por 24 h.	63
Figura 10. Viabilidade celular da linhagem TC-32 após exposição à DHMEQ, DTCM-g e SEMBL.....	65
Figura 11. Análise de morte celular após a exposição aos inibidores de NF-κB (10 µg/ml de DHMEQ e DTCM-g; 3,5 µg/ml de SEMBL) por 24 h.	66
Figura 12. Viabilidade celular da linhagem TC-32 após tratamento com DXR.	67
Figura 13. Efeito da inibição de NF-κB no ciclo celular da linhagem celular TC-32.....	69
Figura 14. Migração celular por wound healing.....	70
Figura 15. Efeito da inibição de NF-κB em modelo 3D.	72
Figura 16. Expressão gênica de membros da Família Rel e alvos validados de NF-κB após inibição.....	75
Figura Suplementar 1. Formação de esferoides em meio com metilcelulose.	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos da inibição de NF- κ B por DHMEQ, DTCM-g e SEMBL (CDDP = Cisplatina; DXR = Doxorubicina; MTX = Metrotexato; GCB = Gemcitabina).....	39
Tabela 2. Características da linhagem celular TC-32.	49
Tabela 3. Perfil STR da linhagem celular TC-32.	49
Tabela 4. Classificação do efeito da combinação de drogas de acordo com os valores de Índice de Combinação (CI).....	52
Tabela 5. Lista de genes avaliados e seus respectivos primers (F: Forwad; R: Reverse).	55
Tabela 6. Linhagens celulares derivadas de Sarcoma de Ewing encontradas na plataforma DepMap. (Em destaque, a linhagem utilizada no estudo).....	61
Tabela 7. Fração afetada (Fa), Índice de Combinação (CI) e Índice de Redução de Dose (DRI) da linhagem TC-32 após tratamento simultâneo com um inibidor de NF- κ B e DXR por 24 h, 48 h e 72 h. (azul = sinérgico; verde = aditivo; amarelo = antagônico; cinza = DRI favorável).	68
Tabela 8. Resumo dos resultados obtidos após inibição de NF- κ B por DHMEQ, DTCM-g e SEMBL na linhagem TC-32.	80

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

cm²	Centímetro quadrado
°C	Graus Celsius
h	Horas
L	Litro
®	Marca registrada
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
M	Molar
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem
kDa	Quilodalton
rpm	Rotações por minuto
α	Alfa (letra do alfabeto grego)
β	Beta (letra do alfabeto grego)
γ	Gama (letra do alfabeto grego)
ε	Épsilon (letra do alfabeto grego)
°C	graus Celsius
µl	microlitro
mL	mililitro
kg/m²	Quilograma por metro quadrado
β-TrCP	Hidrolase carboxil-terminal de ubiquitina recombinante
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ACTB	Beta-actina

Akt	Proteína quinase B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B27	Suplemento neuronal
BAX	<i>BCL2 associated X, apoptosis regulator</i>
BCL2 (Bcl2)	<i>BCL2 apoptosis regulator</i>
BCL2L (Bcl-Xl)	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BIRC3 (Ciap2)	<i>Baculoviral IAP repeat containing 3</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CCL5	<i>C-C motif chemokine ligand 5</i>
CD30	<i>TNF receptor superfamily member 8</i>
CD31	<i>Platelet and endothelial cell adhesion molecule 1</i>
CD40	<i>TNF-receptor</i>
CD95	<i>Fas cell surface death receptor</i>
CDDP	Cisplatina
CDH1	<i>Cadherin 1, E-caderina</i>
CDH2	<i>Cadherin 2, N-caderina</i>
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
CCND2	<i>Cyclin D2</i>
cDNA	DNA complementar
CFLAR (c-FLIP)	<i>CASP8 and FADD like apoptosis regulator</i>
CHOP	<i>DNA damage inducible transcript 3</i>
CI	<i>Combination Index, Índice de Combinação</i>
CLL17	<i>C-C motif chemokine ligand 17</i>
CO2	Dióxido de Carbono
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas
CTGF	<i>Cellular communication network factor 2</i>
DHMEQ	Dehidroximetilepoxiquinomicina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRI	<i>Dose-Reduction Index, Índice de Redução de Dose</i>

DTCM-g	3-[(dodecylthiocarbonyl)methyl] glutarimide
DXR	Doxorubicina
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFRvIII	<i>Epidermal growth factor receptor variant III</i>
EMT	<i>Epithelial–mesenchymal transition</i> , Transição epitélio-mesênquimal
ETS	<i>Erythroblast Transformation-Specific</i>
EUA	<i>Estados Unidos da América</i>
EW-7	Linhagem celular derivada de Sarcoma de Ewing
Fa	<i>Fraction affected</i> , Fração afetada
FET	Família de proteínas também chamada de TET
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
G1	Fase do ciclo celular G1
G2/M	Fase do ciclo celular G2/M
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GBM	Glioblastoma
GCB	Gemcitabina
GF-1R	<i>Insulin like growth factor 1 receptor</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IC₃₀	Concentração inibitória de 30%
IC₄₀	Concentração inibitória de 40%
IC₅₀	Concentração inibitória de 50%
ICAM1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IgG	Imunoglobulina G
IKK	Complexo inibidor de IκB
IKKα	Complexo inibidor de IκB alfa
IKKβ	Complexo inibidor de IκB beta
IKKγ/NEMO	Complexo inibidor de IκB gama
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IRF4	<i>Interferon regulatory factor 4</i>
IκB	<i>NF-kappaB Inhibitor</i>

IκBα	<i>NF-kappaB Inhibitor alpha</i>
IκBβ	<i>NF-kappaB Inhibitor beta</i>
IκBγ	<i>NF-kappaB Inhibitor gama</i>
IκBε	<i>NF-kappaB Inhibitor épsilon</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
Mcl-1	<i>MCL1 apoptosis regulator, Membro da família BCL2</i>
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MMP2	Metaloproteinase 2
MMP9	Metaloproteinase 9
MMP11	Metaloproteinase 11
MnSOD	Manganês superóxido dismutase
MRD1/ABCB1	<i>Multi Drug Resistance</i>
mRNA	RNA mensageiro
mTORC2	Complexo 2 da via mTOR
NaCl	Cloreto de Sódio
NFKB1	<i>Nuclear factor kappa B subunit 1</i>
NFKB2	<i>Nuclear factor kappa B subunit 2</i>
NF-κB	Fator nuclear <i>kappa B</i>
NIK	Quinase indutora de NF-κB
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
OS	Osteossarcoma
p-Akt	Proteína quinase B fosforilada
PARP	<i>poly(ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , Tampão fosfato-salino
PDPN	<i>Podoplanin</i>
PI	<i>Propidium Iodide</i> , Iodeto de Propídeo
PID	Domínio inibidor de processamento C-terminal
REL	<i>REL proto-oncogene, NF-kB subunit</i>
RELA	<i>RELA proto-oncogene, NF-kB subunit</i>
RELB	<i>RELB proto-oncogene, NF-kB subunit</i>
RHD	<i>Rel Homology Domain</i>

RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	<i>RNA de interferência</i>
RPMI 1640	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-qPCR	<i>Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SE	Sarcoma de Ewing
SEMBL	(S)-b-saliciloilamino-a-exo-metileno-γ-butirolactona
SFB	Soro fetal bovino
SLUG	<i>Snail family transcriptional repressor 2</i>
STR	<i>Short Tandem Repeats</i>
TBST	<i>Tris Buffered Saline with Tween 20</i>
TC-32	<i>Linhagem celular derivada de Sarcoma de Ewing</i>
TIMP1	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 1</i>
TIMP2	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 2</i>
TMZ	<i>Temozolomida</i>
TNFR	TNF receptor superfamily
TNFα	Fator de necrose tumoral α
TRAF2	<i>TNF receptor associated factor 2</i>
TRB3	<i>Tribbles pseudokinase 3</i>
Tris-HCl	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride</i>
TWIST	<i>Twist family bHLH transcription factor 1</i>
PLAU /uPA	<i>Plasminogen activator, urokinase</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>
ZEB2	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 2</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
2. OBJETIVOS	45
2.1 Objetivo Geral	45
2.2 Objetivos específicos	45
3. MATERIAL e MÉTODOS	48
3.1 Análise <i>in silico</i>	48
3.2 Modelo celular.....	48
3.3 Exposição aos inibidores de NF- κ B.....	49
3.4 Validação da inibição do NF- κ B.....	50
3.5 Viabilidade celular	51
3.5 Morte celular	51
3.6 Teste de combinação de drogas.....	52
3.7 Ciclo celular	53
3.8 Migração celular	53
3.9 Cultura 3D.....	53
3.13 Extração de RNA, confecção de cDNA e RT-qPCR.....	54
3.14 Análise estatística	55
4. RESULTADOS	59
4.1 Avaliação da expressão e da dependência gênica <i>in silico</i>	59
4.2 Validação da inibição de NF- κ B.....	63
4.3 Influência da inibição de NF- κ B na viabilidade e morte celular.....	63
4.5 Influência da inibição de NF- κ B no ciclo celular	68
4.6 Efeito da inibição de NF- κ B na migração celular	69
4.7 Efeito da inibição de NF- κ B no crescimento e integridade de esferoides.....	70
4.8 Inibição de NF- κ B leva à modulação da expressão gênica	74
5. DISCUSSÃO	78
6. CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	93
APÊNDICE	116
Padronização de ensaios funcionais não incluídos no corpo da dissertação.....	116
Ensaio de clonogenicidade	116
Análise de ciclo celular com PI.....	116
Ensaio de morte celular por ativação de caspase-3	117
Padronização de modelo 3D com metilcelulose	117

Teste de migração e invasão 3D	118
---	------------

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer infanto-juvenil é definido como o conjunto de todos os tipos de neoplasias que acometem crianças e adolescentes entre 0 e 19 anos, correspondendo a cerca de 1-4% de todos os tumores malignos no mundo. No Brasil, os casos vêm aumentando com os anos. Enquanto o risco estimado em 2017 de câncer nesta faixa etária era de 44,46/milhão e 34,30/milhão para o sexo masculino e feminino, respectivamente, para o triênio 2020-2022 estimam-se para cada ano 4.310 no sexo masculino (risco estimado de casos novos de 137,87/milhão) e 4.150 para o sexo feminino (risco estimado de casos novos de 139,04/milhão) (INCA, 2017, 2019).

Segundo BIRCH e MARSDEN (1987) o câncer infanto-juvenil pode ser classificado em 12 subtipos: I) leucemias, II) linfomas e outras neoplasias reticuloendoteliais, III) neoplasias do sistema nervoso central e diversas neoplasias intracranianas e intraespinhais, IV) tumores do sistema nervoso simpático, V) retinoblastoma, VI) tumores renais, VII) tumores hepáticos, VIII) tumores malignos de osso, IX) sarcomas de tecido mole, X) neoplasias de células germinativas, trofoblásticas e gonadais, XI) carcinoma e outras neoplasias epiteliais malignas, e XII) outras neoplasias malignas inespecíficas. O grupo VIII inclui osteossarcoma (OS), condrossarcoma e sarcoma de Ewing (SE), os quais juntos representam cerca de 7% dentre todos os tipos anteriores (DAMRON; WARD; STEWART, 2007).

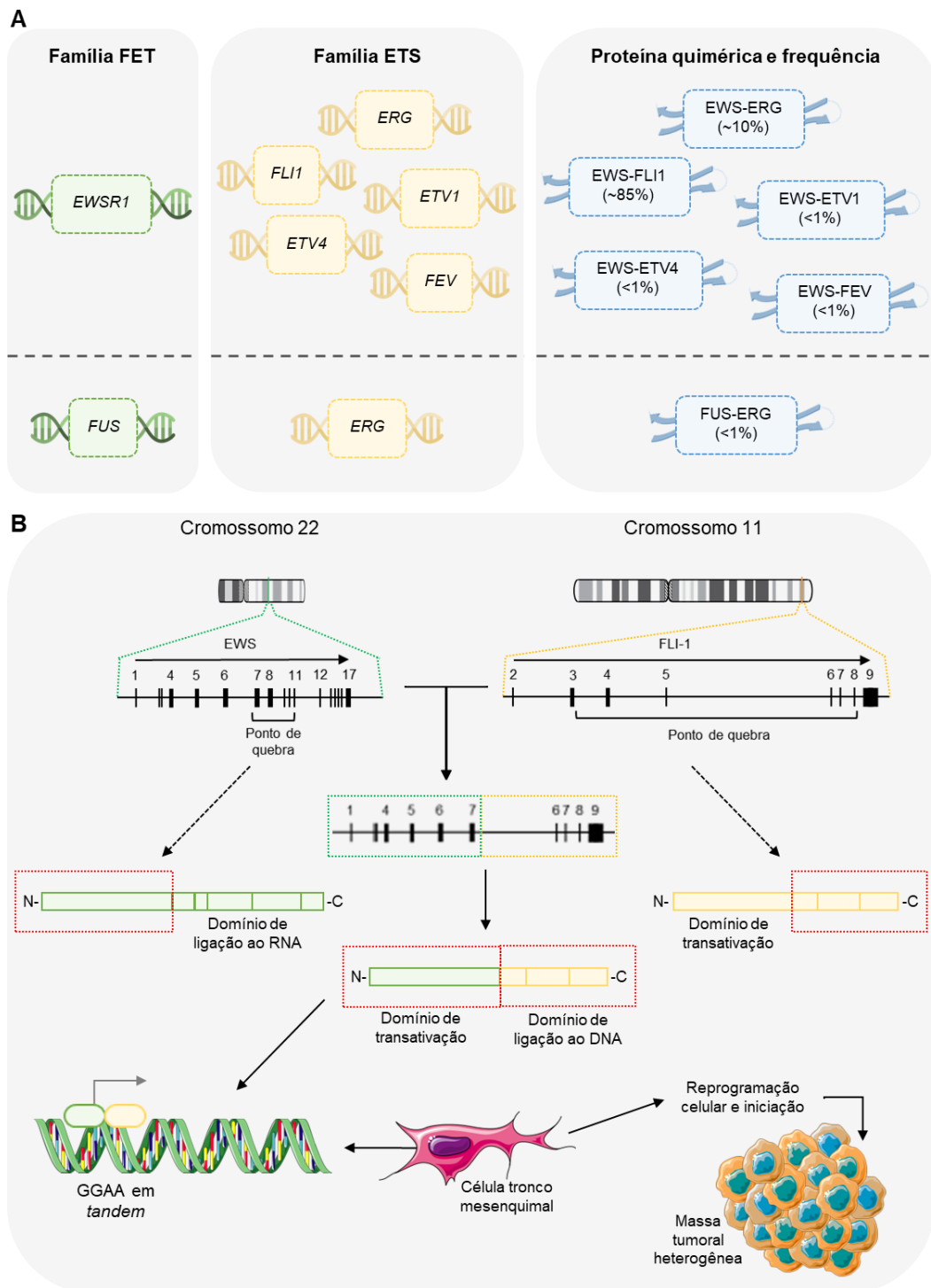
1.1. Sarcoma de Ewing (SE) e sua relação com NF-κB

O SE acomete entre 1 e 2 crianças e adolescentes por milhão todos os anos com um pico de incidência na segunda década de vida. Os casos de SE correspondem a cerca de 2% de todos os cânceres infantis, sendo este tipo tumoral o segundo tumor ósseo mais frequentes em crianças e adolescentes (HOWLADER *et al.*, 2021). De modo geral, ele ocorre primariamente no osso - cerca de 80% dos tumores ocorrem em diáfises de ossos longos, como a do fêmur, além da pélvis, úmero, e costelas -, porém também pode acometer tecidos moles (menos de 20%) (RIGGI; SUVÀ; STAMENKOVIC, 2021; SKUBITZ; D'ADAMO, 2007). Na maioria dos casos o SE se manifesta na forma de doença metastática (80% dos pacientes) (PAPPO, 2006), o que caracteriza um pior prognóstico esobrevida de 5 anos é inferior a 30% . Pacientes com doença localizada, em

contrapartida, possuem sobrevida livre de eventos superior a 70% (GRÜNEWALD *et al.*, 2018; RIGGI; SUVÀ; STAMENKOVIC, 2021).

Os principais sintomas observados são não-específicos e incluem na fase inicial dores, principalmente após atividades físicas, e inchaço no local, enquanto que em estágios avançados pode ocorrer febre, suores noturnos, fadiga e perda de peso (RIGGI; SUVÀ; STAMENKOVIC, 2021). Por se tratarem de sintomas semelhantes a outras doenças o diagnóstico precoce é dificultado. Contudo, quando há suspeita da doença o mesmo pode ser realizado de diversas maneiras, incluindo investigação por imagem (ressonância magnética, por exemplo), análises morfológicas e moleculares. Com relação à análise morfológica, o SE é caracterizado pela presença de pequenas células redondas azuis, característica compartilhada com outros tipos tumorais (linfoma, condrossarcoma mesenquimal e meduloblastoma) e marcação para CD99 na membrana, proteína envolvida no processo de diferenciação celular (GRÜNEWALD *et al.*, 2018; SKUBITZ; D'ADAMO, 2007; VENTURA *et al.*, 2016). Já com relação às análises moleculares, o SE é caracterizado pela presença de uma fusão gênica *in frame* entre membros das famílias *ETS* (*Erythroblast Transformation-Specific*) e *FET* (anteriormente chamada de TET por BERTOLOTTI *et al.* (1996)) (GRÜNEWALD *et al.*, 2018; SANDBERG; BRIDGE, 2000) (**Figura 1**). Esta translocação dá origem a uma proteína quimérica oncogênica composta pela região N-terminal de um membro da família FET com a região C-terminal de um membro da família ETS, originalmente uma família de fatores de transcrição. A translocação mais comum (ocorre em mais de 80% dos casos) e mais estudada é a (11;22)(q24;q12), que gera o fator de transcrição aberrante EWS-FLI (*EWSR1-FLI1*). Este possui dois sítios de interação com o DNA: um específico da proteína quimérica, que corresponde à sequência GGAA em *tandem* formando uma sequência de microssatélites, e outro correspondente ao da família de fatores de transcrição ETS *wild-type*. Uma vez que EWSR1-FLI1 se liga aos sítios alvo, promove a transcrição de genes envolvidos na regulação de diversos processos celulares como proliferação, transdução de sinal, ciclo celular, modulação da estrutura de cromatina, migração e invasão (GRÜNEWALD *et al.*, 2018; SIZEMORE *et al.*, 2017).

Figura 1. Alterações cromossômicas e tumorigênese em Sarcoma de Ewing.

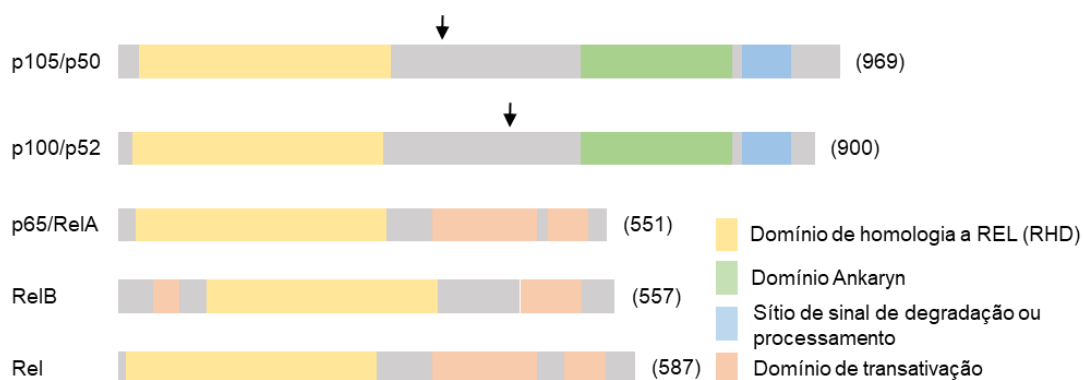


Fonte: A autora. A partir de imagens disponíveis em <https://smart.servier.com/>.

A) O SE é caracterizado por apresentar uma translocação cromossômica recorrente entre membros da família ETS e FET, que dão origem a um gene de fusão *in frame*. **B)** Uma vez que a proteína quimérica é sintetizada em células tronco mesenquimais ela é responsável por ativar a transcrição de genes envolvidos no processo de tumorigênese.

Membros da família ETS também se mostraram importantes para a tumorigênese por interagirem de forma sinérgica com outros fatores de transcrição que regulam processos celulares semelhantes, como por exemplo, o fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) (GÖRANSSON *et al.*, 2009; LI, L. *et al.*, 2015). Este fator foi descrito pela primeira vez em 1986 por Sen e Baltimore como uma proteína presente no citoplasma de todas as células capaz de se ligar ao potenciador da cadeia leve *kappa* da imunoglobulina quando ativado (RANJAN SEN; DAVID BALTIMORE, 1986). Normalmente, o NF- κ B é encontrado na forma de hetero- ou homodímeros de membros da família Rel, a qual compreende Rel-A/p65, Rel-B, c-Rel, p50/NFKB1 e p52/NFKB2 (**Figura 2**). Todas as subunidades têm um domínio N-terminal de 300 aminoácidos conhecido como Domínio de Homologia a Rel (RHD, do inglês *Rel Homology Domain*) responsável pela ligação ao DNA, dimerização e interação com a família de proteínas I κ B (*NF-kappaB Inhibitor*), além de possuir um domínio de localização nuclear, denominado Sinal de Localização Nuclear (NLS, do inglês *Nuclear Localization Signal*). Além das regiões comuns à todas as subunidades, p50 e p52 possuem domínios ankyrin, relacionados à porção inibitória como explicado adiante, enquanto p65, RelB e Rel possuem domínios de transativação, importantes para a interação com outras proteínas como outros fatores de regulação transcricional e remodeladores de cromatina (BOURS *et al.*, 1990; GHOSH *et al.*, 1990; KIERAN *et al.*, 1990; LECOQ *et al.*, 2017; MERCURIO *et al.*, 1992; MEYER *et al.*, 1991; MIYAMOTO; VERMA, 1995; RUBEN *et al.*, 1991; RYSECK *et al.*, 1992; STEWARD, 1987).

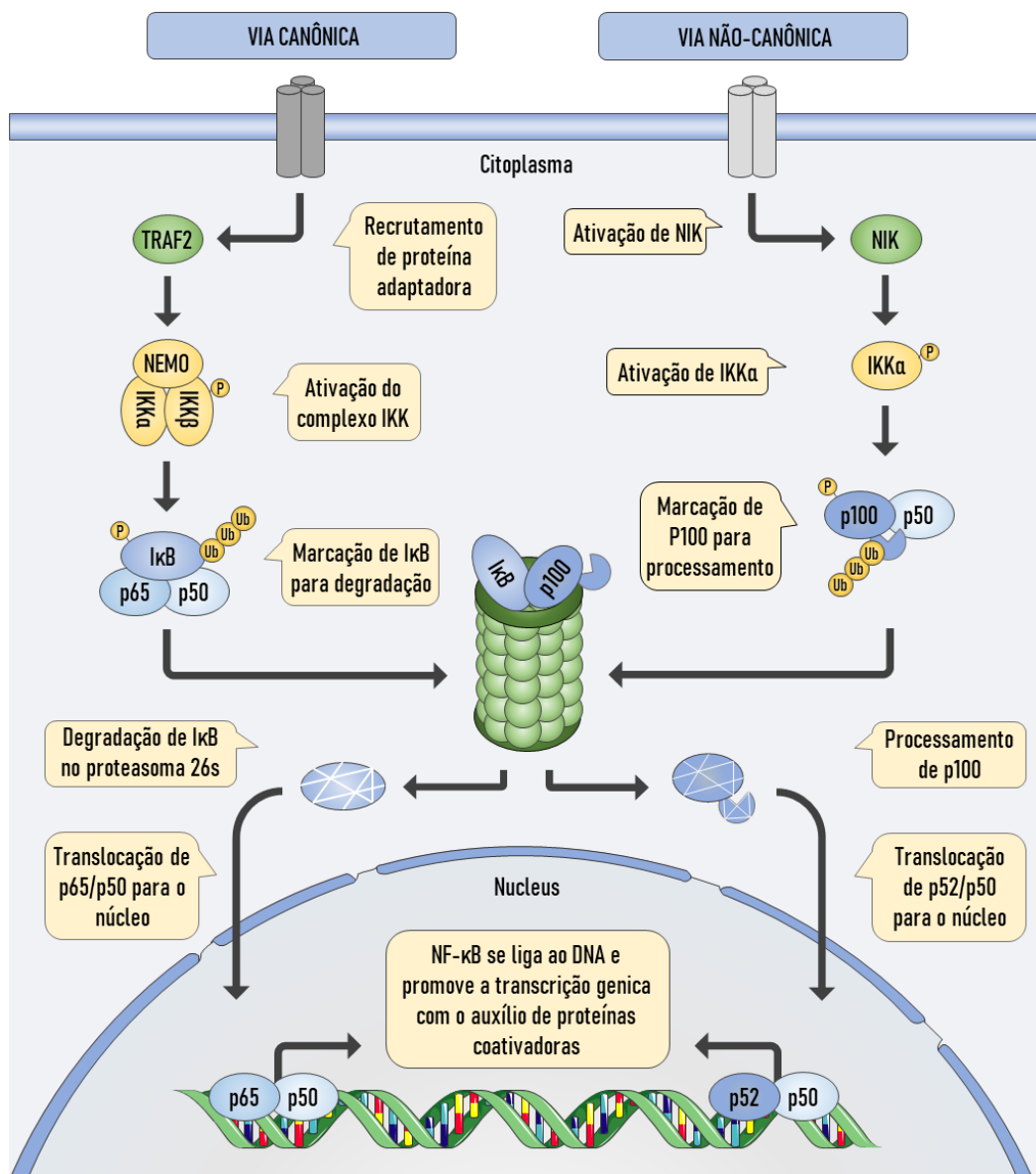
Figura 2. Membros da família REL.



Fonte: A autora.

Na forma inativa, o NF- κ B permanece associado à I κ Bs, que reconhecem o domínio RHD e encobrem o NLS, resultando na localização citoplasmática (GHOSH; HYDEN, 2012). Até o momento, um total de sete proteínas I κ B (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , Bcl-3, p100 e p105) foram descritas, das quais as mais comuns são I κ B α e I κ B β (KARIN, 1999; MERCURIO *et al.*, 1993; NAUMANN; WULCZYN; SCHEIDEREIT, 1993; RICE; MACKICHAN; ISRAËL, 1992; SCHEINMAN; BEG; BALDWIN, 1993; ZABEL; BAEUERLE, 1990). Com relação aos precursores p-100 e p-105, são os domínios ankyrin os responsáveis. A ativação de NF- κ B ocorre apenas quando as proteínas I κ B são degradadas por meio de duas vias, a canônica e não-canônica (**Figura 3**).

A via canônica envolve dímeros formados pelas subunidades Rel-A, c-Rel, Rel-B, p50 e está relacionada com o desenvolvimento do sistema nervoso (GUTIERREZ *et al.*, 2005; MEFFERT *et al.*, 2003). Essa via pode ser ativada por diferentes moléculas, como o fator de necrose tumoral α (TNF α), lipopolissacarídeos e interleucina-1 e -1 β (GHOSH; HYDEN, 2012; ZHANG; LENARDO; BALTIMORE, 2017). A ligação dessas moléculas de sinalização aos seus receptores adequados, recruta proteínas adaptadoras citoplasmáticas, como TRAF2, que ativam o complexo inibidor de I κ B (IKK) por meio da fosforilação de duas serinas em pelo menos uma de suas subunidades: IKK α e IKK β (ambos catalíticos), e a subunidade reguladora IKK γ /NEMO quinase (LI, Z. W. *et al.*, 1999; LING; CAO; GOEDDEL, 1998; MERCURIO *et al.*, 1997). O complexo IKK ativado então fosforila duas serinas N-terminais de I κ B, levando à sua ubiquitinação por uma hidrolase carboxil-terminal de ubiquitina recombinante (β -TrCP) e a consequente degradação pelo proteassoma 26S (ALKALAY *et al.*, 1995; ROFF *et al.*, 1996; SCHERER *et al.*, 1995). Isso resulta na exposição do domínio NLS de NF- κ B permitindo que este seja translocado para o núcleo, onde se liga à sequência consenso 5'- GGGRN W YYCC-3' (R = base de purina, N = qualquer base, W = adenina ou timina e Y = base pirimidina) e com a ajuda de proteínas coativadoras promove a transcrição gênica (BEG *et al.*, 1992; RANJAN SEN; DAVID BALTIMORE, 1986; SEN; BALTIMORE, 1986).

Figura 3. Vias de ativação de NF- κ B.

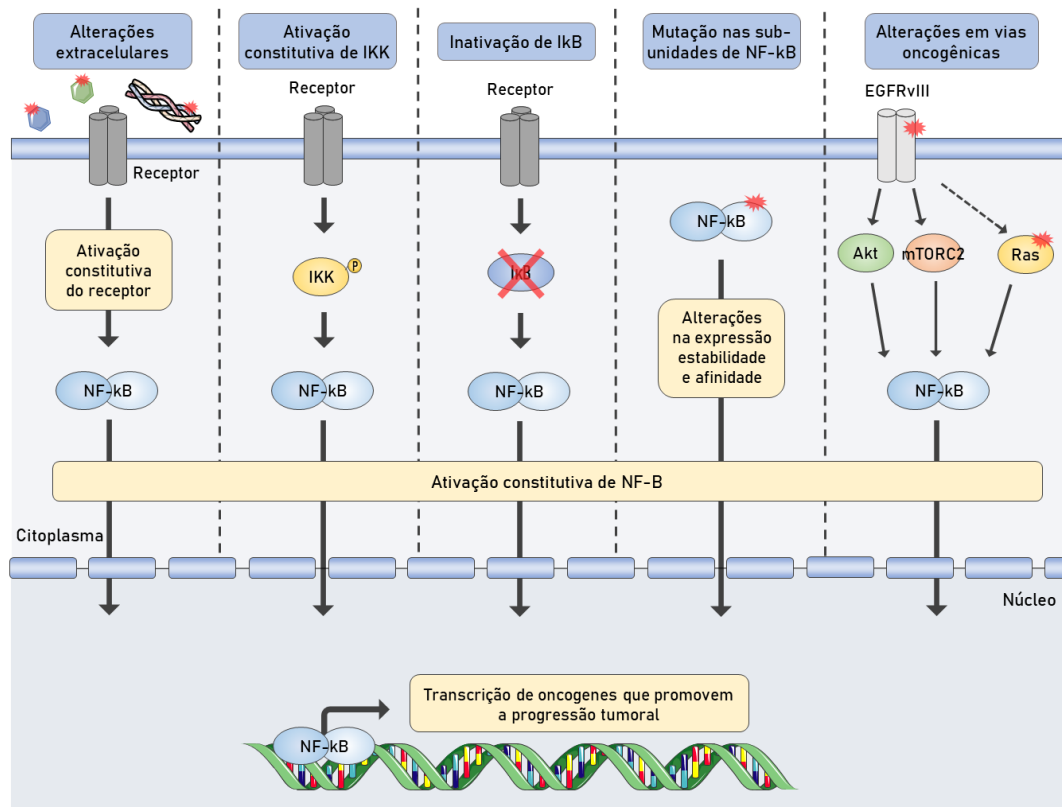
Fonte: Modificado de MEDEIROS *et al.* (2021).

Por outro lado, a via não-canônica, a qual tem papel fundamental no desenvolvimento e regulação do sistema imunológico, envolve o dímero p52/Rel-B e sua via de ativação melhor caracterizada é através da superfamília TNFR (do inglês, *Tumor Necrosis Factor Receptor*) (DEJARDIN, 2006; SUN, S. C., 2017). Esta via foi descoberta por Xiao e colaboradores enquanto estudavam o processamento de p100, o precursor da subunidade p52 (XIAO; HARHAJ; SUN, 2001). Os autores mostraram que o precursor p100 possui um domínio inibidor de processamento C-terminal (PID; composto por um domínio de repetições ankyrin), caracterizando-o como uma região reguladora. Essa inibição só pode ser interrompida por estímulos que levam à ativação da quinase

indutora de NF- κ B (NIK), a qual é responsável pela ativação de IKK α , que por sua vez fosforila p100, desencadeando sua subsequente ubiquitinação e degradação via β -TrCP e proteassoma 26S, respectivamente. Este processamento elimina a região PID dando origem à subunidade p52, que associada à p50, pode ser translocada para o núcleo e iniciar a transcrição ao se ligar em sequências consenso do DNA (FONG; SUN, 2002; LIANG; ZHANG; SUN, 2006; SENFTLEBEN *et al.*, 2001).

Algumas das funções biológicas do NF- κ B incluem a regulação da transcrição de genes relacionados à inflamação, resposta imune, apoptose e proliferação celular. Portanto, a sua ativação inadequada pode promover a tumorigênese (BALDWIN, 2001). A desregulação do NF- κ B pode ocorrer principalmente por mutações nos componentes da via ou por alterações extracelulares e em outras vias moleculares (**Figura 4**). No primeiro caso, podem ocorrer mutações nas subunidades de NF- κ B, que resultam na perda de interação com inibidores citoplasmáticos, ativação constitutiva de IKK ou perda de função de I κ B levando à ativação constitutiva da via (CHERRY *et al.*, 2015; FRIEDMANN-MORVINSKI *et al.*, 2016; IUS *et al.*, 2018; LUO, Y. *et al.*, 2020; PARKER *et al.*, 2014; PIETSCH *et al.*, 2014; SPILLER *et al.*, 2011). Já com relação às alterações extracelulares e em outras vias moleculares, a ativação constitutiva do NF- κ B pode se dar pelo aumento na expressão de interleucinas ou alteração de componentes da matriz extracelular, que ativam a via, ou também por mutações em vias oncogênicas como a do EGFRvIII, que tem ativação constitutiva e mutações em Ras, que ativam NF- κ B via Akt e/ou mTORC2 e via MAPK, respectivamente (SHOSTAK; CHARLOT, 2015a; TANAKA *et al.*, 2011; VRÁBEL; POUR; ŠEVČÍKOVÁ, 2019). Além disso, alguns rearranjos, como amplificação e rearranjos que levam a proteínas de fusão, também foram descritos, como no caso de proteínas de fusão da família ETS (importantes para a tumorigênese de SE) que promovem a ativação de NF- κ B (GÖRANSSON *et al.*, 2009; LI, Y. *et al.*, 2015).

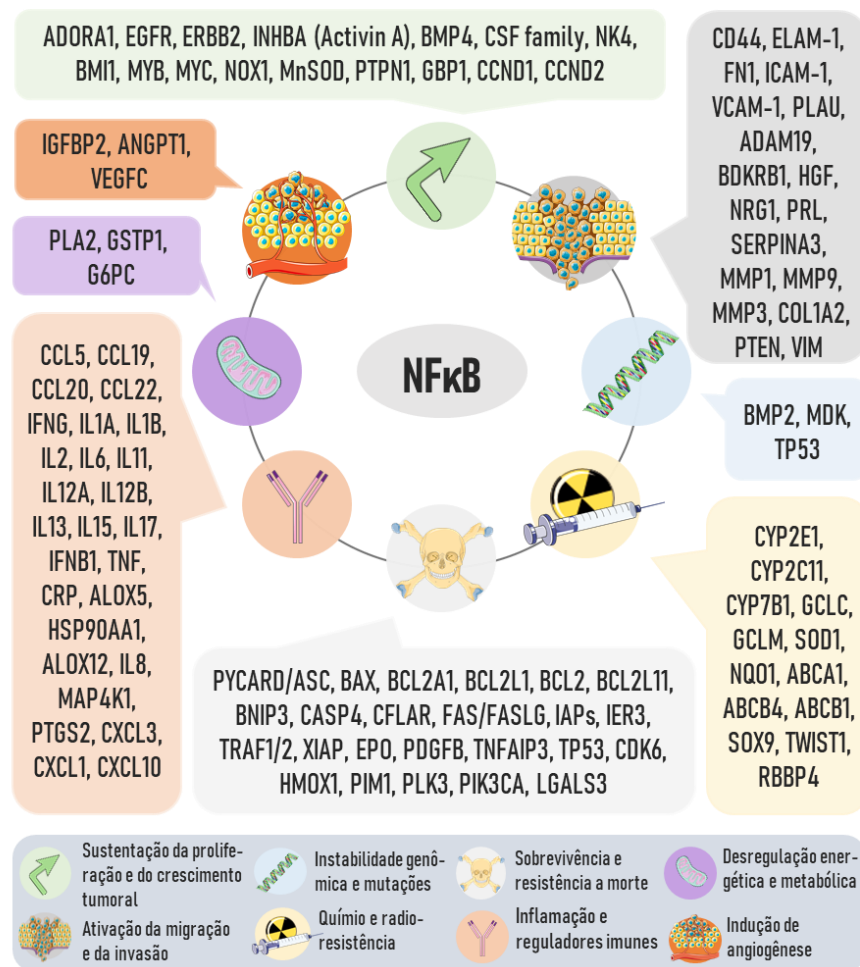
Figura 4. Alterações na via do NF- κ B no câncer.



Fonte: Modificado de MEDEIROS *et al.* (2021).

O NF- κ B se encontra constitutivamente ativo em vários tipos de câncer como mieloma múltiplo (FEINMAN *et al.*, 1999), leucemias mieloides (BARON *et al.*, 2002; GRIFFIN, 2001), linfomas (BARGOU *et al.*, 1997), carcinomas de próstata (PALAYOOR *et al.*, 1999), câncer de mama (NAKSHATRI *et al.*, 1997) e em tumores ósseos como SE (JAVELAUD, Delphine *et al.*, 2000a; JAVELAUD, Delphine; BESANLON, 2001; ZENALI *et al.*, 2009). O papel do NF- κ B na tumorigênese está relacionado principalmente com o aumento da expressão de fatores de sobrevivência, genes antiapoptóticos, de adesão, invasão e metástase, além da mediação de mecanismos de rádio- e quimio-resistência, como mostrado na **Figura 5** (Andela *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2000; Baldwin, 2001; Habib *et al.*, 2001; Aggarwal, 2004; Xia, Shen and Verma, 2014; Shostak and Chariot, 215b; Y. Li *et al.*, 2015; Mortezaee *et al.*, 2019).

Figura 5. Genes regulados por NF-κB.



Fonte: A autora. A partir de imagens disponíveis em <https://smart.servier.com/>.

Genes regulados. A ativação da via do NF-κB leva à regulação da expressão de diversos genes, os quais estão envolvidos nos vários processos celulares, comumente nomeados de *hallmarks* do câncer. Dentre eles estão a sustentação da proliferação e do crescimento tumoral, ativação da migração e da invasão, instabilidade genômica e mutações, químico- e rádio-resistência, sobrevivência e resistência à morte, fatores de inflamação e reguladores imunes, desregulação energética e metabólica, indução de angiogênese.

Especificamente em SE, relatos na literatura mostram que a atividade constitutiva de NF-κB exerce um efeito protetor contra a apoptose uma vez que este fator de transcrição participa de uma via antiapoptótica induzida por TNFα (JAVELAUD, Delphine *et al.*, 2000a; KUMAR *et al.*, 2001). O estímulo por TNFα é responsável por desencadear o aumento na expressão de enzimas como tioredoxina e manganês superóxido

dismutase (MnSOD) via NF- κ B, impedindo a formação de espécies reativas de oxigênio e consequentemente a apoptose (DJAVAHERI-MERGNY *et al.*, 2004).

Além disso, Sancéau e colaboradores (2002) relataram o papel do NF- κ B na invasão (SANCÉAU *et al.*, 2002). Em um estudo *in vitro*, a linhagem celular EW-7, derivada de SE, teve uma diminuição da atividade de MMP-9 após exposição à interferon. Esta diminuição é devido à regulação negativa do NF- κ B, o qual possui um sítio de ligação compatível com a região promotora do gene codificante de MMP-9. O dímero p65/p50 também é responsável pela transcrição da uroquinase uPA, a qual está positivamente correlacionada com metástases (HANSEN *et al.*, 1992). A uPA é responsável por catalisar a conversão da pró-enzima plasminogênio em plasmina, a qual é capaz de degradar direta ou indiretamente (por meio da ativação de metaloproteinases de matriz) a matriz extracelular (MOREAU; MOURAH; DOSQUET, 2011). Além disso, é sabido que a diminuição da sua expressão via inibição de NF- κ B leva à redução de metástases em mais de um tipo de câncer, como OS (ENDO-MUNOZ *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2016), câncer gástrico (LI, H.; CHEN, 2018), câncer de pulmão (HSIEH *et al.*, 2014) e carcinoma hepatocelular (RAJASINGHE; PINDIPROLU; GUPTA, 2018).

Mesmo com evidências de que a via do NF- κ B tem um papel importante na tumorigênese do SE, a sua interação com a mutação guia *EWSR1-FLI1* não é muito bem compreendida. Em outros tipos tumorais que também apresentam alterações na família ETS e FET, já foi reportado que a interação ETS-p52 é importante para a reativação da transcrição de *TERT* e consequente manutenção da telomerase e do estabelecimento e progressão tumoral (LI, Y. *et al.*, 2015), e também a inibição de *FLI1* causa um efeito tóxico por induzir uma diminuição dos níveis proteicos de RelB, p65 e p50 (SARTORI *et al.*, 2021). Em contrapartida, LAGIRAND-CANTALOUBE *et al.* (2010) defendem a ideia de que baixos níveis de NF- κ B devido à sua inibição por EWS-FLI poderiam não melhorar a sobrevivência do tumor, mas pode ser benéfica por impedir a diferenciação mesenquimal e garantir o estabelecimento tumoral.

1.2. Tratamentos e perspectivas futuras para Sarcoma de Ewing

O tratamento atual para o SE varia de acordo com a localização, o tamanho do tumor e a presença ou não de metástases. De modo geral, é recomendado um tratamento inicial com quimioterapia de alta dose baseada em múltiplas drogas seguido

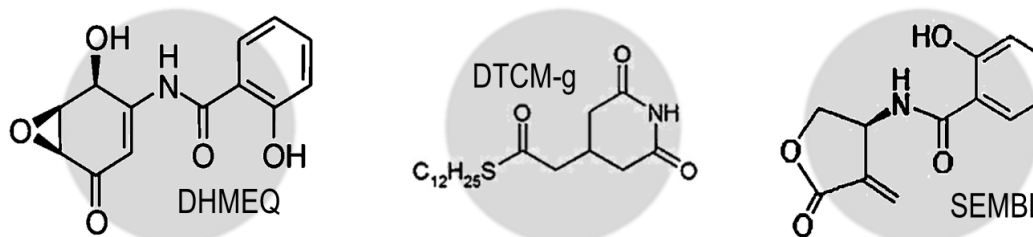
de controles locais como cirurgia para ressecção e radioterapia periférica. Dentre os quimioterápicos mais utilizados estão a vincristina, ifosfamida, doxorubicina (DXR) e etoposídeo, os quais podem ser administrados de formas diferentes dependendo do país durante 6 meses a 1 ano aproximadamente (PDQ® PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD. PDQ EWING SARCOMA TREATMENT. BETHESDA, MD: NATIONAL CANCER INSTITUTE, [s. d.]). Por exemplo, enquanto protocolos nos Estados Unidos alternam ciclos de vincristina, ciclofosfamida e doxorubicina com ciclos de ifosfamida e etoposídeo (GRIER *et al.*, 2003), os protocolos europeus por sua vez, geralmente combinam vincristina, doxorubicina e um agente alquilante com ou sem etoposídeo em um único ciclo de tratamento (JUERGENS *et al.*, 2006). Já no Brasil são usados em dois regimes alterados de quimioterápicos: o primeiro incluindo ifosfamida, etoposídeo, carboplatina e o adjuvante antitóxico MESNA, e o segundo regime contendo vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina e os adjuvantes MESNA e CARDIOXANE® (cloridrato de dexrazoxano) (PAIXÃO *et al.*, 2016).

A resposta inicial ao tratamento na maioria dos casos é positiva. Porém, 30-50% dos pacientes que são diagnosticados com tumores localizados apresentam recidiva em menos de 3 meses, e aqueles que recidivam dentro de 24 meses após o diagnóstico têm sobrevida em 5 anos <10%. Além disso, 20-25% dos pacientes já apresentam metástases ao diagnóstico, o que representa um dos principais fatores de resistência ao tratamento (BACCI *et al.*, 2003; GRÜNEWALD *et al.*, 2018). Também é válido ressaltar que as terapias atuais possuem efeitos colaterais. Estes vão desde os efeitos mais comuns como perda de peso, cabelo e apetite, até efeitos colaterais mais graves como o desenvolvimento de síndrome displásica mieloide associada à quimioterapia ou leucemia e sarcoma associado à radiação (BACCI *et al.*, 2003; GRÜNEWALD *et al.*, 2018; RIGGI; SUVÀ; STAMENKOVIC, 2021).

Por conta da elevada porcentagem de pacientes com recidiva e tumores metastáticos resistentes, a busca por novos alvos terapêuticos se torna tão importante. Muitas pesquisas têm apontado o NF-κB como um alvo promissor, uma vez que este atua em várias vias oncogênicas como mostrado anteriormente (**Figura 5**). Centenas de moléculas já foram descritas como capazes de interferir na via de sinalização do NF-κB, as quais podem ser classificadas como: inibidores de quinases IκB (IKKs), inibidores do proteassoma 26S, inibidores do complexo ubiquitina-ligase e inibidores das subunidades

constituintes do NF- κ B (BARBOSA *et al.*, 2017; GILMORE; HERSCOVITCH, 2006). Dentre eles, estão os inibidores desenvolvidos pelo grupo de pesquisa comandado pelo professor Kazuo Umezawa, do Departamento de Medicina Alvo-Dirigida da Universidade de Aichi (Japão), denominados dehidroximetilepoxiquinomicina (DHMEQ) (UMEZAWA, 2006), 3-[(dodecylthiocarbonyl)methyl] glutarimide (DTCM-g; CN102123986B) (ISHIKAWA *et al.*, 2009) e (S)-b-saliciloilamino-a-exo-metileno-y-butirolactona (SEMBL) (SIDTHIPONG *et al.*, 2017) (Figura 6). A Tabela 1 resume os principais efeitos destes inibidores de NF- κ B em alguns tipos de câncer.

Figura 6. Estrutura molecular dos inibidores de NF- κ B DHMEQ, DTCM-g e SEMBL.



Fonte: A autora. Adaptado de Umezawa (2006), Ishikawa *et al.* (2009) e Sidthipong *et al.* (2017).

O DHMEQ foi o primeiro do grupo a ser sintetizado e caracterizado. Ele é uma molécula de baixo peso molecular derivada do antibiótico epoxiquinomicina C isolado a partir de *Amycolatopsis sp.* (MATSUMOTO *et al.*, 1997; UMEZAWA, 2006). Este composto é capaz de bloquear a translocação nuclear nas vias de ativação de NF- κ B canônica e não-canônica (KATSMAN; UMEZAWA; BONAVIDA, 2007). Isto só é possível porque este composto se liga covalentemente e de forma irreversível à cisteína da sequência CEGRSAGSI que corresponde aos aminoácidos 38-46 de Rel-A, aminoácidos 28-36 de c-Rel e aminoácidos 144-152 de Rel-B (WATANABE *et al.*, 2008; YAMAMOTO *et al.*, 2008). Existem vários relatos na literatura dos efeitos do DHMEQ em células tumorais *in vitro* e *in vivo* sem apresentar toxicidade ou efeitos colaterais em células e tecidos normais. Alguns dos seus principais efeitos *in vitro* incluem indução de apoptose, parada do ciclo celular em G0/G1, inibição da proliferação, migração e invasão celular, além de possuir efeito sinérgico com quimioterápicos e radiação (CASTRO-GAMERO *et al.*, 2012; CELEGATO *et al.*, 2014; FUKUSHIMA *et al.*, 2012; KOZAKAI *et al.*, 2012; LAMPIASI *et al.*, 2012; PIRES *et al.*, 2017; RAMOS *et al.*, 2018; SATO *et al.*, 2014a; SIMON-

GABRIEL *et al.*, 2018; SUZUKI *et al.*, 2013; TSAI *et al.*, 2011; WATANABE *et al.*, 2005a, 2005b; YASUDA *et al.*, 2011). Os dados obtidos *in vivo* também são bem promissores e incluem melhora na sobrevivência dos animais e uma redução na massa celular do tumor, incluindo redução do peso e do volume tumoral, além da diminuição da angiogênese sem efeitos colaterais como perda de peso do animal e queda de pelos (FUKUSHIMA *et al.*, 2012; KAWAGUCHI *et al.*, 2016; KOZAKAI *et al.*, 2012; SATO *et al.*, 2014a; SUZUKI *et al.*, 2013; WATANABE *et al.*, 2005b, 2005a; YASUDA *et al.*, 2011). Do ponto de vista molecular, estes efeitos foram observados porque a inibição do NF- κ B promove a regulação negativa de genes antiapoptóticos como *BCL2*, *BCL2L* (codificante para Bcl-xL), *XIAP* e *BIRC3* (codificante para Ciap2) e envolvidos com migração e invasão, como *MMP2* e *MMP14* (BRASSESCO, M. S. *et al.*, 2013).

O segundo inibidor a ser desenvolvido, o DTCM-g também é uma molécula pequena, porém é sinteticamente derivada da piperidina 9-methylstreptimidone de *Streptomyces sp.* (ISHIKAWA *et al.*, 2009). A sua capacidade de inibir o NF- κ B se dá pela indução da clivagem da subunidade Rel-B na Asp205 (KUBOKI *et al.*, 2015). Da mesma forma que o DHMEQ, este composto não apresenta citotoxicidade para células normais, mas possui efeitos antimetastáticos, pró-apoptóticos, antiproliferativos, incluindo a indução de parada do ciclo celular, redução na capacidade clonogênica, além de efeito sinérgico com outros quimioterápicos e radiação em células tumorais cultivadas *in vitro* (BRASSESCO, Maria S. *et al.*, 2012; BRASSESCO, María Sol *et al.*, 2013; KUBOKI *et al.*, 2015; ROBERTO *et al.*, 2018). Estes efeitos foram desencadeados pela regulação negativa de genes como *PDPN*, *MMP2*, *TIMP1* e *TIMP2*, como mostrado por BRASSESCO, María Sol *et al.* (2013). Já com relação aos efeitos antitumorais *in vivo*, existe apenas um trabalho publicado, no qual o DTCM-g isolado não apresentou efeito, sendo um potente quimioterápico apenas quando associado à outros compostos quimioterápicos (BRASSESCO, María Sol *et al.*, 2013).

Por fim, o SEMBL, o mais recente composto sintetizado pelo grupo do Prof. Umezawa é, é um derivado do DHMEQ que se diferencia deste pela ausência do grupo epóxido (SIDTHIPONG *et al.*, 2017). Existe apenas um único artigo de pesquisa e um de revisão publicado com este composto no qual foi mostrado que o SEMBL é capaz de impedir a ligação da subunidade p65 do NF- κ B ao DNA e desta forma a ativação dos genes alvos do fator de transcrição (SIDTHIPONG *et al.*, 2017; UMEZAWA; LIN, 2020).

Este composto se mostrou 10x mais eficiente que o seu composto de origem em diminuir a proliferação celular após 24h de tratamento com a concentração de 3 µg/mL. Outro efeito observado foi na capacidade de inibir a migração e invasão celular, apresentando novamente uma eficiência maior que o DHMEQ ao inibir estes processos, seja funcionalmente ou inibindo a expressão de genes relacionados como MMP-2 (SIDTHIPONG *et al.*, 2017).

Tabela 1. Efeitos da inibição de NF-κB por DHMEQ, DTCM-g e SEMBL (CDDP = Cisplatina; DXR = Doxorubicina; MTX = Metrotexato; GCB = Gemcitabina).

Dehidroximetilepoxiquinomicina (DHMEQ)		
Tipo de câncer	Efeitos observados	Referência
Meduloblastoma	<p>< proliferação celular</p> <p>> apoptose e migração</p> <p>Inibição da capacidade clonogênica</p> <p>Radio- e quimiossensibilização com TMZ e CDDP</p>	(RAMOS <i>et al.</i> , 2018)
Leucemia Linfocítica Crônica	<p>> apoptose</p> <p>Cocultura com células estromais diminui efeito pró-apoptótico. Porém, a associação do DHMEQ com inibidores de <i>crossstalk</i> celular (ibruinib e R406) diminui a viabilidade das células tumorais.</p>	(SIMON-GABRIEL <i>et al.</i> , 2018)
Câncer de mama	<p>< proliferação, migração e invasão celular</p> <p>< expressão de genes envolvidos na transição epitélio-mesenquimal: <i>SLUG</i>, <i>TWIST</i>, <i>ZEB2</i>, <i>CDH2</i> e <i>MMP11</i></p>	(PIRES <i>et al.</i> , 2017)
Câncer intestinal murino	<p>< formação de tumores e perda de peso</p> <p>Inibição da translocação nuclear do NF-κB</p> <p>Sem efeito em animais saudáveis</p>	(KAWAGUCHI <i>et al.</i> , 2016)
Linfoma de Hodgkin	<p>> apoptose e produção de espécies reativas de oxigênio</p> <p>< secreção de CCL5, CCL17 e IL-6</p> <p>< expressão de IRF4, CD30 e CD40</p> <p>Quimiossensibilização com DXR, CDDP e GCB</p>	(CELEGATO <i>et al.</i> , 2014)

Continuação.

Câncer de pâncreas	<p>Indução de apoptose por anoikis < cIAP-1, cIAP-2, XIAP, caspase -3 e -9 < volume tumoral e sítios metastáticos; sem perda de peso</p>	(SATO <i>et al.</i> , 2014a)
Glioblastoma	<p>< viabilidade celular > apoptose: > caspase-3; < <i>BCL2</i>, <i>BCL2L1</i> e <i>XIAP</i> > necrose Indução de parada do ciclo celular em G2/M < capacidade clonogênica, migração e invasão Rádio- e quimiossensibilização: sinergismo com TMZ</p>	(BRASSESCO, M. S. <i>et al.</i> , 2013)
Adenocarcinoma pancreático	<p>Inibição do crescimento celular e invasão < sítios metastáticos no fígado; < MMP-9 e IL-8 < angiogênese: < CD31 Possível efeito sinérgico com GCB</p>	(SUZUKI <i>et al.</i> , 2013)
Osteossarcoma	<p>< proliferação e índice mitótico > apoptose Inibição da capacidade clonogênica < migração e invasão Efeito sinérgico com CDDP, DXR e MTX</p>	(CASTRO-GAMERO <i>et al.</i> , 2012)
Carcinoma hepatocelular	<p>< crescimento celular > apoptose: < survivina, Bcl-2, Mcl-1, p-Akt; > PARP clivada, <i>CD95</i> Indução de estresse do retículo endoplasmática: > <i>CHOP</i> e <i>TRB3</i>; e produção de espécies reativas de oxigênio Quimiossensibilização: Celecoxibe</p>	(LAMPIASI <i>et al.</i> , 2012)
Câncer de próstata	<p>< crescimento celular Indução de parada do ciclo em G2/M Radiossensibilização: < capacidade clonogênica; indução de parada do ciclo em G2/M; < p53 e p21 < volume tumoral tanto sozinho quanto associado à radioterapia</p>	(KOZAKAI <i>et al.</i> , 2012)

Continuação.

Glioblastoma	<p>> apoptose</p> <p>Indução de parada do ciclo celular em G2/M</p> <p>Tumor subcutâneo: < volume; sem hepatotoxicidade</p> <p>Tumor intracraniano: > necrose; < uPA; melhora na taxa de sobrevida</p>	(FUKUSHIMA <i>et al.</i> , 2012)
Leucemia	<p>> apoptose</p> <p>Co-cultura com células estromais diminui efeito inibitório do NF-κB</p>	(TSAI <i>et al.</i> , 2011)
Carcinoma escamoso oral	<p>< viabilidade celular</p> <p>> apoptose: > PARP clivada; < survivina, cIAP-1 e -2</p> <p>Indução de parada do ciclo celular em G1</p> <p>< volume tumoral</p>	(YASUDA <i>et al.</i> , 2011)
Mieloma múltiplo	<p>< viabilidade celular</p> <p>> apoptose: < <i>BCL2L1</i> e <i>CFLAR</i> (c-FLIP)</p> <p>Indução de parada do ciclo celular em G0/G1: <, <i>CDN1</i> e <i>CDN2</i></p> <p>< massa tumoral, angiogênese e <i>VEGF</i></p> <p>Sem resultados adversos como perda de pelos e peso</p>	(WATANABE <i>et al.</i> , 2005a)
Leucemia de células T adultas	<p>< viabilidade e proliferação celular</p> <p>> apoptose: < Bcl-2, Bcl-xL; > caspases -3, -8 e -9</p> <p>Indução de parada do ciclo celular em G0/G1: < ciclina D1, Rb e p53</p> <p>Aumento da taxa de sobrevida sem efeitos adversos como perda de peso</p>	(WATANABE <i>et al.</i> , 2005b)
3-[(dodecilthiocarbonil)methyl] glutarimide (DTCM-g)		
Glioblastoma	<p>< viabilidade celular sem afetar células normais (astrócitos)</p> <p>Indução parada do ciclo celular em G1</p> <p>< capacidade clonogênica e invasão: < expressão de <i>uPA</i></p> <p>Radiossensibilização: < volume tumoral</p>	(ROBERTO <i>et al.</i> , 2018)

Continuação.

Leucemia	> apoptose: > clivagem de pró-caspase 3; < Bcl-xL e survivina < expressão de Rel-B por conta do > na clivagem	(KUBOKI <i>et al.</i> , 2015)
Osteossarcoma	< viabilidade celular e capacidade clonogênica < migração e invasão: < PDNP, MMP-2, TIMP1 e TIMP2 Radio- e quimiossensibilização com DXR	(BRASSESCO, María Sol <i>et al.</i> , 2013)
Câncer de bexiga	< proliferação celular e capacidade clonogênica Indução de parada do ciclo celular em G1 Inibição de migração Radiossensibilização	(BRASSESCO, Maria S. <i>et al.</i> , 2012)
(S)-b-saliciloilamino-a-exo-metileno-γ-butirolactona (SEMBL)		
Leucemia monocítica (rato)	Inibição da ligação de p65 ao DNA e ativação do NF-κB	(SIDTHIPONG <i>et al.</i> , 2017)
Câncer de Ovário	Inibição da ligação do NF-κB ao DNA, da migração e da invasão (inibição da expressão de MMP-2)	(SIDTHIPONG <i>et al.</i> , 2017)

Fonte: A autora, a partir de dados de artigos científicos citados.

Desta forma, levando em consideração o papel do NF-κB, o efeito antitumoral da sua inibição em vários tipos tumorais e a falta de informações e consenso sobre o seu papel para a tumorigênese do SE, a investigação dos efeitos da inibição da via do NF-κB em SE por DHMEQ, DTCM-g e SEMBL, como proposto no presente trabalho, pode contribuir para o melhor entendimento do seu papel na tumorigênese de SE e avaliar o seu potencial como alvo terapêutico.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar de forma comparativa o potencial terapêutico da inibição de NF- κ B em Sarcoma de Ewing por meio dos inibidores DHMEQ, DTCM-g e SEMBL.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o potencial terapêutico da inibição do NF- κ B em Sarcoma de Ewing por meio de análise *in silico*;
- b) Avaliar os efeitos da inibição de NF- κ B na viabilidade, na morte, na dinâmica do ciclo celular e na motilidade celular em modelo *in vitro* 2D;
- c) Avaliar os efeitos da inibição de NF- κ B em modelo *in vitro* 3D;
- d) Avaliar os efeitos da inibição de NF- κ B do ponto de vista transcricional por meio da avaliação da expressão de genes envolvidos nos processos celulares estudados.

MATERIAL e MÉTODOS

3. MATERIAL e MÉTODOS

Este Trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Oncogenética da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, com a colaboração do Laboratório de Pediatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

3.1 Análise *in silico*

Inicialmente foi realizada uma análise de expressão e de dependência gênica a partir de dados públicos. No primeiro caso, foi utilizada a plataforma *R2: Genomics Analysis and Visualization Platform* (<http://r2.amc.nl>), a qual fornece dados de expressão gênica de tecidos cancerosos e contrapartidas normais. O conjunto de dados selecionado foi o Mixed Ewing Sarcoma - Savola - 117 - MAS5.0 - u133p2 (Sondas: *RELA* 209878_s_at; *RELB* 205205_at; *REL* 235242_at; *NFKB1* 209239_at; *NFKB2* 209636_at), contendo 18 amostras controle e 64 de SE (SAVOLA *et al.*, 2011). Estes dados foram também utilizados para estabelecer correlações de expressão das diferentes subunidades de NF- κ B com dados clínicos fornecidos pela mesma plataforma, incluindo presença de metástase e recidiva.

A análise de dependência foi realizada a partir de dados disponíveis na plataforma *DepMap* (<https://depmap.org/portal/>), a qual fornece informações de dependência gênica baseados em experimentos de *knockout* por CRISPR e RNAi. Os resultados são apresentados como um score gerado pela própria plataforma: maior que zero (>0) indica que a linhagem não é dependente, menor que zero (<0) indica que a linhagem é dependente, e quanto mais próximo de -1 indica que o gene analisado é essencial para a sobrevivência da linhagem celular.

3.2 Modelo celular

Todos os experimentos foram realizados utilizando a linhagem celular TC-32, uma linhagem derivada de SE pediátrico (**Tabela 2**) cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Hugo Armelin, do Laboratório Especial de Ciclo Celular – Instituto Butantan. Esta foi cultivada em RPMI 1640 (Cutilab, Brasil), suplementado com 1% de estreptomicina/penicilina

(Sigma-Aldrich, EUA) e 10% de soro bovino fetal (SFB; Gibco®, EUA; pH 7,2–7,4) em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C.

Prévio ao início dos experimentos, a autenticidade da linhagem foi verificada por análise de microssatélites - *Short Tandem Repeats* (STRs). Para isso, amostras de DNA foram enviadas ao laboratório de Genética Bioquímica do Departamento de Genética da FMRP-USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões e os resultados comparados àqueles referenciais do portal ExpASy (ARTIMO *et al.*, 2012). Os resultados obtidos para as linhagens em questão, foram equivalentes com o relatado (**Tabela 3**).

Tabela 2. Características da linhagem celular TC-32.

Organismo	Tecido	Doença	Idade	Mutações	Genes de Fusão
<i>Homo sapiens</i>	Osso	Tumor neuroectodérmico primitivo (pertencente à Família do Sarcoma de Ewing)	2	STAG2 p.Tyr636fs	EWSR1-FLI1

Fonte: A autora.

Tabela 3. Perfil STR da linhagem celular TC-32.

Linhagem	CSF1PO	TPOX	D7S820	D13S317	THO	D5S818	D16S539	VWA
Ref Expasy*	11/13	9/11	8/11	10/12	6/9.3	12/13	13/14	15/18
TC-32	11/13	9/11	8/11	10/12	6/9.3	12/13	13/14	15/18

Fonte: A autora e Portal ExpASy (ARTIMO *et al.*, 2012).

3.3 Exposição aos inibidores de NF-κB

Os inibidores de NF-κB DHMEQ, DTCM-g e SEMBL foram sintetizados pelo grupo do professor Kazuo Umezawa da Universidade de Aichi, Japão. As soluções-estoque de todos os inibidores foram preparadas em DMSO (Dimetilsulfóxido; Sigma-Aldrich, EUA) (10 µg/µl para DHMEQ e DTCM-g; 5 µg/µl para SEMBL) e estocadas a -20°C. Já as concentrações de uso e tempo de exposição variaram de acordo com o experimento

realizado, no entanto as concentrações iniciais utilizadas foram as de 1,25, 2,5, 3,5, 5, 10 e 20 µg/ml.

Todos os experimentos foram realizados pelo menos duas vezes em duplicata ou triplicata e foi utilizado como controle a concentração máxima de DMSO contida na maior dose dos inibidores utilizados.

3.4 Validação da inibição do NF-κB

A confirmação do efeito inibitório de DHMEQ, DTCM-g e SEMBL sobre NF-κB foi realizada por meio de Western Blot de extrato total, citoplasmático e nuclear de proteínas. Para isso, 1.2×10^6 células foram expostas à 3,5 µg/ml de DHMEQ, 5 µg/ml de DTCM-g e 2,5 µg/ml de SEMBL por 24 h e então coletadas por meio de tripsinização. Na extração da fração nuclear, após centrifugação de 5 min a 1.000 rpm, o *pellet* foi incubado por 15 min no gelo com tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM NaCl e 3 mM MgCl₂ e então foram adicionados 25 µl de NP-40® 10% seguido de centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido, correspondente à fração citoplasmática, foi coletado e estocado a -80°C. O *pellet* restante foi incubado *overnight* em tampão *RIPA Buffer* (Sigma-aldrich, EUA) e após este período, o mesmo foi descongelado em gelo por 30 minutos intercalados com agitação a cada 10 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 min e o sobrenadante obtido correspondente à fração nuclear estocada a -80°C. Na extração total, utilizou-se *RIPA Buffer* (Sigma-aldrich, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. Todas as proteínas foram quantificadas pelo método *Bradford* (BioRad, EUA) segundo as recomendações do fabricante.

Após a quantificação 20 µg de cada amostra foi separada por eletroforese SDS-PAGE 12% de acrilamida, transferidas para membranas de nitrocelulose e então incubadas em TBST 1% contendo 5% de BSA (do inglês, *Bovine Serum Albumin*) por 1 h e 30 min, em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C sob agitação com diferentes anticorpos: p65 (1:1000 em TBST 1% + BSA 5%; ab32536) e como endógenos foram utilizados GAPDH (1:10000 em TBST 1%; ab128915), Vinculina (1:1000 em TBST 1% + BSA 5%; sc-73614) e Histona H3 (1:2000 em TBST 1%; #4499). Em seguida incubou-se com os anticorpos secundários recomendados por 1 hora: *goat anti-rabbit IgG HRP* (1:5000 ou 1:5000 em TBST 1% + BSA 5%) ou *goat*

anti-mouse IgG HRP (1:1000 TBST 1% + BSA 5%). Para a visualização do anticorpo secundário utilizou-se ECL™ Western blotting Analysis System (Amersham GE Healthcare).

3.5 Viabilidade celular

A análise da viabilidade celular foi realizada com o reagente Resazurina (Sigma-Aldrich, EUA) segundo as recomendações do fabricante. Para isso, foram semeadas 5×10^4 células por poço de placa de 96 e, após adesão, as células foram tratadas com 1,25, 2,5, 3,5, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ de DHMEQ, DTCM-g e SEMBL separadamente por 24 h, 48 h e 72 h. Após cada período o meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS 1X e incubadas por 2 horas com meio adequado contendo 5% do volume final de solução de Resazurina em atmosfera úmida contendo 5% CO_2 a 37°C . Decorrido o tempo, a absorbância foi mensurada a 570 nm com o aparelho iMark Microplate Absorbance reader (BioRad, EUA). Para a obtenção exata dos valores de IC_{50} (dose requerida para afetar a viabilidade em 50%) foi utilizado o *software Compusyn* (ComboSyn Inc. Paramus NJ).

3.5 Morte celular

A morte celular foi avaliada por meio da marcação com Annexin V e 7aaD (BD Biosciences, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Para isso, $5,5 \times 10^5$ células foram semeadas em placa de 6 poços e tratadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de DHMEQ, 10 $\mu\text{g/ml}$ de DTCM-g e 3,5 $\mu\text{g/ml}$ de SEMBL e após 24 h de tratamento as células foram tripsinizadas, lavadas com *Binding Buffer* (1X) e incubadas com 5 μl de Annexin V e 7aaD por 15 min cada. A fluorescência emitida foi analisada no citômetro BD FACSCanto™ II do Departamento de Imagens Médicas, Hematologia e Oncologia Clínica da FMRP-USP, sob a responsabilidade da Prof. Dr. Lorena Lobô Figueiredo, e os seguintes parâmetros foram utilizados para classificar as células: 1) células vivas, -Annexin V/-7aaD; 2) células apoptóticas, +Annexin V/-7aaD e +Annexin V/+7aaD; e 3) células necróticas: -Annexin V/+7aaD.

3.6 Teste de combinação de drogas

O teste de combinação de drogas consiste no tratamento simultâneo com doxorubicina (DXR – Sigma-Aldrich®), droga utilizada atualmente no tratamento de SE, e um inibidor de NF-κB. Para isso, células TC-32 foram tratadas com diferentes concentrações de doxorubicina diluída em solução salina (50 mg/ml) a fim de calcular a IC₅₀ e IC₃₀ (0,0025, 0,005, 0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,1 µg/ml) por 24 h, 48 h e 72 h e a viabilidade celular foi mensurada com Resazurina, como descrito anteriormente. Uma vez calculadas as IC₅₀ e IC₃₀ foram selecionadas as concentrações de 0,1 e 0,04 µg/ml de DXR, as quais foram combinadas com as concentrações de 3,5 µg/ml de DHMEQ, 5 µg/ml de DTCM-g e 2,5 µg/ml de SEMBL. A viabilidade após o tratamento simultâneo também foi mensurada por meio da resazurina, como descrita anteriormente. A fim de saber se a combinação possui efeito sinérgico, antagônico ou aditivo foi utilizado o *software Compusyn* (ComboSyn Inc Paramus NJ). Este fornece o valor de CI (*combination index*, em inglês), o que é classificado como sinérgico, aditivo ou antagônico de acordo com a **Tabela 4**, baseado no método de Chou-Talalay (CHOU; TALALAY, 1984).

Tabela 4. Classificação do efeito da combinação de drogas de acordo com os valores de Índice de Combinação (CI).

Valor de CI	Efeito
< 0,1	Sinergismo muito forte
0,1-0,3	Sinergismo forte
0,3-0,7	Sinergismo
0,7-0,85	Sinergismo moderado
0,85-0,9	Sinergismo fraco
0,9-1,1	Aditivo
1,1-1,2	Antagonismo fraco
1,2-1,45	Antagonismo moderado
1,45-3,3	Antagonismo
3,3-10	Antagonismo forte
>10	Antagonismo muito forte

Fonte: A autora.

3.7 Ciclo celular

Para a análise da dinâmica do ciclo celular $5,5 \times 10^5$ células foram semeadas em placa de 12 poços e após período de aderência foram tratadas com os inibidores de NF- κ B por 24 h. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas e o kit BD Cycletest™ Plus DNA Kit (BD Bioscience, EUA) foi utilizado, seguindo as recomendações do fabricante, para avaliar o conteúdo de DNA e determinar a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular. A fluorescência emitida pelo PI que se intercala ao DNA foi quantificada no citômetro BD FACSCanto™ II do Departamento de Imagens Médicas, Hematologia e Oncologia Clínica da FMRP-USP, sob a responsabilidade da Prof. Dr. Lorena Lobô Figueiredo e os dados obtidos analisados no programa FlowJo v10.8.1.

Diferentemente dos demais experimentos, este é o único que não possui repetição, como mostrado no item 8.1.2 do Apêndice.

3.8 Migração celular

A avaliação da migração celular foi realizada por meio do ensaio de *wound healing*. Para tal, as células foram semeadas em placas de 12 poços e após atingirem confluência de aproximadamente 90% foram realizadas “feridas” com o auxílio de uma ponteira de 200 μ l, lavadas com PBS 1X e tratadas com concentrações dos inibidores de NF- κ B inferiores aos IC₅₀. Foram tiradas fotos logo após a realização das “feridas”, sendo este considerado o tempo 0 h. Decorridas 24 h de tratamento, foram tiradas novas fotos e a área das “feridas” foi mensurada com o auxílio do programa *ImageJ*® v1.8.0 (NIH, USA).

3.9 Cultura 3D

Além do modelo de cultivo em monocamada também foi utilizado o modelo de cultura tridimensional baseado no protocolo de DASGUPTA *et al.* (2017). Para tal, $2,5 \times 10^4$ células foram cultivadas por 72 h em poços de placa de 96 revestidas com 1% de agarose em meio apropriado livre de soro bovino fetal contendo 2% de B27 (suplemento para indução de neuro-esferas e células tronco; (Sigma-Aldrich, EUA), 20 ng/ml de EGF (fator de crescimento epidérmico; Peprotech, Brasil) e 20 ng/ml de FGF (fator de crescimento de fibroblastos; (Peprotech, Brasil). Após a formação dos esferoides, estes foram tratados com 3,5 e 5 μ g/ml de DHMEQ, 5 e 10 μ g/ml de DTCM-g, 1,25 e 2,5 μ g/ml de SEMBL por 24 h, 48 h e 72 h.

O crescimento dos esferoides foi avaliado por meio da mensuração do diâmetro e da esfericidade, parâmetro relativo à forma do esferoide e à sua integridade, com o auxílio do *software* AnaSP® (PICCININI, 2015).

3.13 Extração de RNA, confecção de cDNA e RT-qPCR

O RNA de células tratadas por 24 h com a dose referente à IC₄₀ dos inibidores de NF-κB foi extraído por meio do Trizol Reagent (Invitrogen Inc, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, o qual foi quantificado e armazenado em freezer -80°C até a sua utilização. Em seguida, foi sintetizado o cDNA por meio do kit *High capacity* (Applied Biosystems, EUA), seguindo-se as recomendações do fabricante, o qual foi utilizado nas reações de RT-qPCR. Utilizou-se o aparelho *ABI Prism 7500 Sequence Detector* (Applied Biosystems, EUA) e o *kit SYBR Green PCR Master Mix* (ThermoFisher Scientific®, EUA) conforme as instruções dos fabricantes. Foram utilizados como controles endógenos os genes GAPDH e ACTB. A quantificação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Para expressão dos genes selecionados utilizaram-se *primers* adquiridos pela *Exxtend Biotecnologia Ltda.* (Paulínia/SP – Brasil), como mostrado na **Tabela 5**.

Tabela 5. Lista de genes avaliados e seus respectivos primers (F: *Forwad*; R: *Reverse*).

Gene	Primer	Função
RELA	F: AGGCTATCAGTCAGCGCATC R: GCATTCAGGTCGTAGTCCCC	Subunidade de NF-κB
RELB	F: GAAGAAAAAGCCGGCCATCC R: CCGTAGGGTCGTAGGCAAAG	Subunidade de NF-κB
NFKB1	F: AATGGGCTACACCGAAGCAA R: TTGCGGAAGGATGTCTCCAC	Subunidade de NF-κB
BAX	F: CTGACGGCAACTTCAACTGG R: CCCGGAGGAAGTCCAATGTC	Anti-apoptótico
PLAU	F: GTCTACCTGGGTGCTCAAG R: GTGTCAGCGCTGTAGTCCTT	Motilidade celular
MMP9	F: TTTGAGTCCGGTGGACGATG R: GCTCCTCAAAGACCGAGTCC	Motilidade celular
GAPDH	F: CCCACCACACTGAATCTCC R: GTACATGACAAGGTGCGGCT	Endógeno
ACTB	F: ATGATGATATCGCCGCGCTC R: TCGTCGCCCCACATAGGAATC	Endógeno

Fonte: A autora.

3.14 Análise estatística

Todos os dados foram expressos em média \pm erro padrão analisados por meio do *software* GraphPad Prism versão 8 (San Diego, CA, USA). Para análise de dados com mais de uma variável como os de viabilidade, morte, ciclo celular, diâmetro e esfericidade foi utilizado teste Two Away ANOVA seguido de teste *post hoc Tukey's multiple comparison test*. Já para os dados com uma única variável, como os de migração celular e expressão gênica proveniente do banco de dados R2 e de RT-qPCR, utilizou-se o teste Kruskal-

Wallis seguido de teste *post hoc* *Dunn's multiple comparison test*. Em todos os parâmetros avaliados, os valores considerados significativos foram os de $p < 0,05$.

RESULTADOS

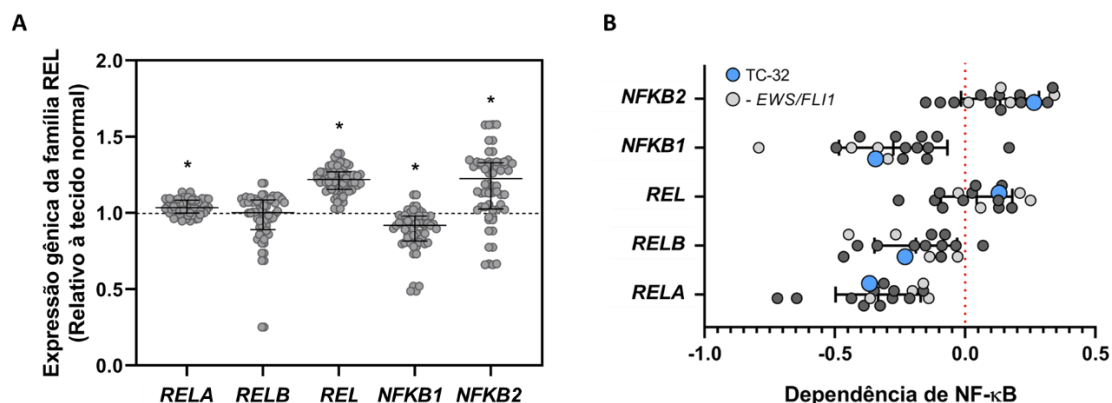
4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da expressão e da dependência gênica *in silico*

Inicialmente, a fim de verificar a importância da via do NF- κ B em SE a expressão gênica de todas as subunidades deste fator de transcrição foi avaliada em amostras de pacientes diagnosticados com SE e comparada com amostras de tecido normal, a partir de dados públicos provenientes da plataforma *R2: Genomics Analysis and Visualization Platform* (<http://r2.amc.nl>). Como observado nas **Figuras 7A e 7B**, três das subunidades foram encontradas diferencialmente expressas: *RELA* ($p = 0,0035$), *REL* ($p < 0,0001$) e *NFKB1* ($p < 0,0001$), sendo as duas primeiras hiperexpressas e a última hipoexpressa quando comparas às amostras controle (representadas em 1 no *box plot*). Adicionalmente, a baixa expressão de *REL* e a alta expressão de *NFKB1* foram correlacionadas com a presença de recidiva, ao passo que a baixa expressão de *NFKB1* foi correlacionada positivamente com a presença de metástase em pacientes diagnosticados com SE como visto na **Figura 8**.

Em paralelo, a análise de dependência genica, mostrou a relevância da via do NF- κ B em SE. Foram encontrados dados de um total de 16 linhagens celulares derivadas de SE (**Tabela 6**), sendo 9 delas com *status* de linhagem pediátrica confirmado, 2 adultas e 5 com idade desconhecida. Além disso, todas possuem a translocação entre um membro da família de proteínas FET e outra da família ETS (EWS-FLI1: 75%; EWS-ERG:12,5%; e EWS-FEV: 6,25%), com exceção da linhagem CHLA57 que não possui essa informação na literatura. De modo geral, todas as linhagens celulares incluídas na plataforma se mostraram dependentes da via do NF- κ B com *scores* < 0 (**Figura 7 B**). Quando analisadas individualmente, 100% das linhagens possuem algum grau de dependência da subunidade *RELA*, 93,75% (15/16) possuem dependência de *RELB* e *NFKB1*, 20% (3/16) possuem dependência de *NFKB2* e 37,5% (6/16) possuem dependência de *REL*. Destaca-se que a linhagem celular TC-32, utilizada no presente trabalho, também se mostrou dependente das subunidades *RELA* (-0,366760969), *RELB* (-0,23070217) e *NFKB1* (-0,343896268), não sendo dependente das subunidades *REL* (0,130198748) e *NFKB2* (0,264594101).

Figura 7. Expressão e dependência gênica dos membros da família REL em amostras de pacientes e linhagens celulares derivadas de SE.



Fonte: A autora.

Análise *in silico*. Foram utilizados dados da plataforma *R2: Genomics Analysis and Visualization Platform* (Mixed Ewing Sarcoma - Savola - 117 - MAS5.0 - u133p2) para análise da expressão gênica (**A**) e da plataforma *DepMap* para análise da dependência (**B**) e *RELA*, *RELB*, *REL*, *NFKB1* e *NFKB2*. Os dados de expressão gênica foram normalizados pelos valores de expressão de amostras de tecido normal (valores iguais à 1, linha tracejada). Os mesmos foram analisados por meio de Kruskal-Wallis test seguido de teste *post hoc* Dunn's multiple comparisons test. Os valores foram considerados relevantes estatisticamente quando $p < 0.05$ (*).

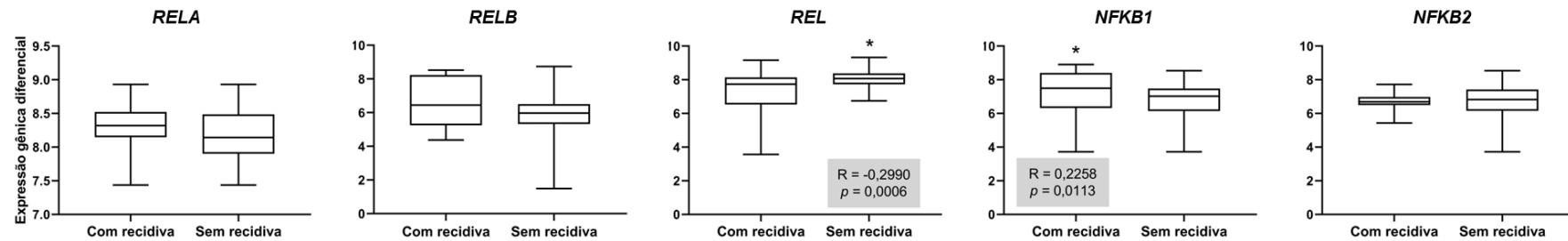
Tabela 6. Linhagens celulares derivadas de Sarcoma de Ewing encontradas na plataforma DepMap. (Em destaque, a linhagem utilizada no estudo).

Linhagem	Tecido	Idade	Translocação
A673	Osso/Músculo	15	<i>EWS-FLI1</i>
CHLA57	Osso	desconhecido	desconhecido
COGE352	Sangue Periférico (metástase)	17	<i>EWS-ERG</i>
EW8	Osso	desconhecido	<i>EWS-FLI1</i>
EWS502	Osso	desconhecido	<i>EWS-FLI1</i>
MHHES1	Osso	12	<i>EWS-FLI1</i>
RDES	Osso	19	<i>EWS-FLI1</i>
SKES1	Osso	18	<i>EWS-FLI1</i>
SKNEP1	Pulmão (metástase)	25	<i>EWS-FLI1</i>
SKNMC	Cérebro (metástase)	12	<i>EWS-FLI1</i>
SKPNDW	Tumor embionário	17	<i>EWS-FLI1</i>
TC106	Osso	19	<i>EWS-ERG</i>
TC138	Osso	desconhecido	<i>EWS-FLI1</i>
TC205	Osso	desconhecido	<i>EWS-FEV</i>
TC32	Osso	2 anos e 7 meses	<i>EWS-FLI1</i>
TC71	Osso	22	<i>EWS-FLI1</i>

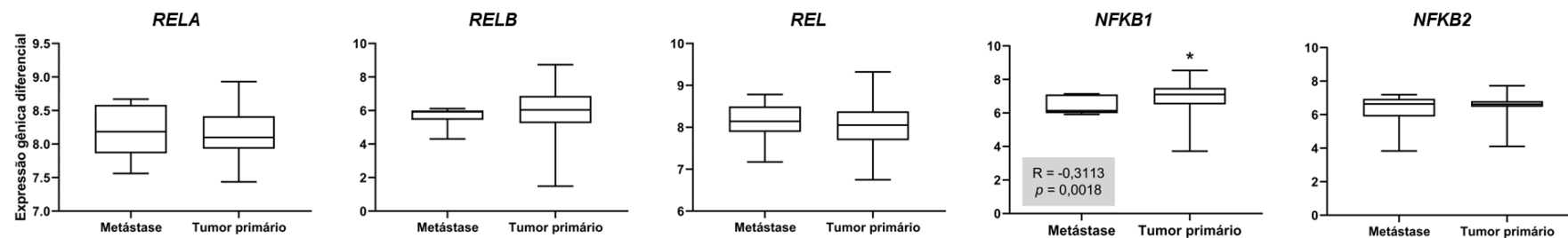
Fonte: A autora.

Figura 8. Correlação entre expressão gênica dos membros da família REL com características clínicas.

A



B



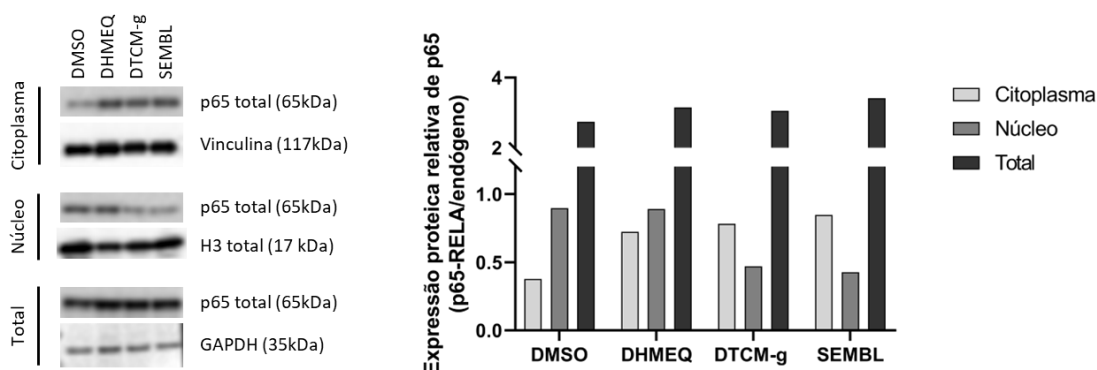
Fonte: A autora.

Análise de correlação. Os dados disponíveis na plataforma R2: *Genomics Analysis and Visualization Platform* foram utilizados para realizar uma análise de correlação entre a expressão gênica de *RELA*, *RELB*, *REL*, *NFKB1* e *NFKB2* com os dados clínicos de presença ou ausência de metástase (A) e ausência ou presença de recidiva (B). Para tal foi utilizado o teste de correlação de Spearman, sendo os valores de $p < 0,05$ considerados relevantes estatisticamente (*).

4.2 Validação da inibição de NF- κ B

A análise da expressão proteica por meio de *Western Blot* após a exposição aos inibidores DHMEQ, DTCM-e e SEMBL por 24 h (**Figura 9**) revelou diminuição na marcação nas frações nucleares quando comparado com o grupo controle DMSO. Desta forma, pode-se dizer que os inibidores utilizados no presente estudo são capazes em diferentes escalas de inibir a translocação nuclear e conseqüentemente a ativação da via do NF- κ B.

Figura 9. Expressão proteica de p65 após exposição às drogas de estudo por 24 h.



Fonte: A autora.

Translocação nuclear. O tratamento com DHMEQ, DTCM-g e SEMBL diminui a translocação nuclear de p65 nas frações nucleares da linhagem TC-32, denotando indiretamente a inibição da via de NF- κ B.

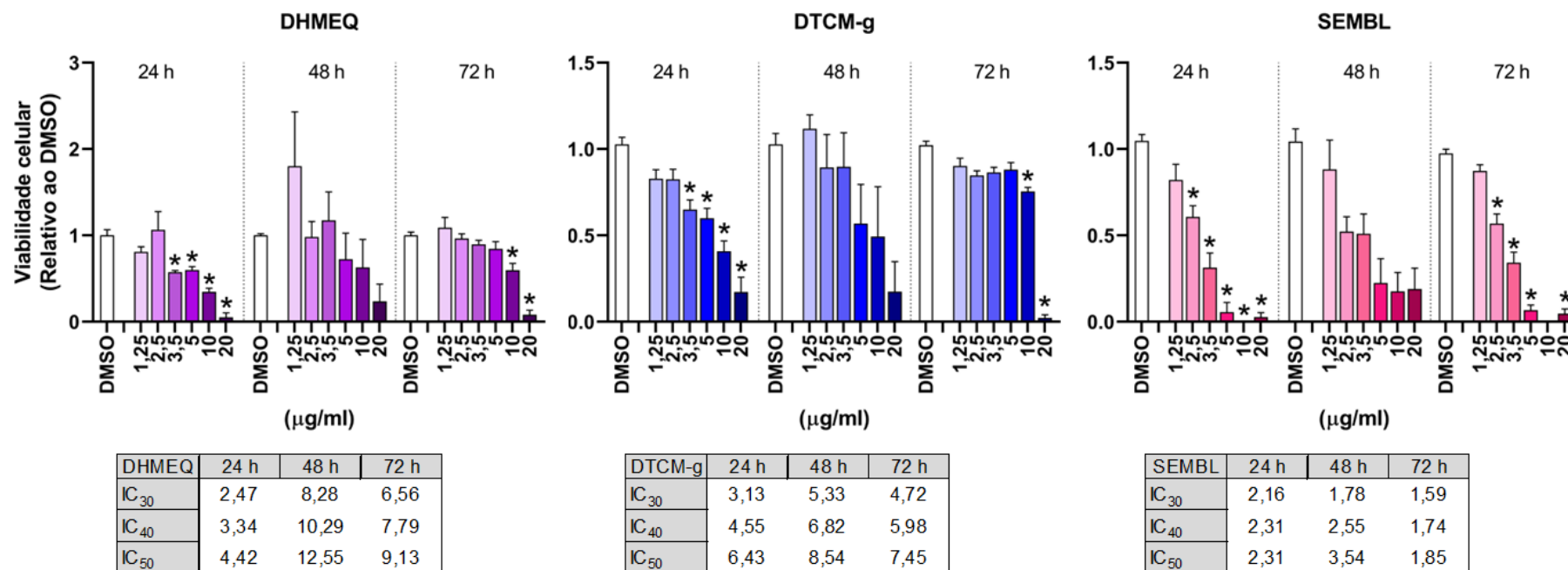
4.3 Influência da inibição de NF- κ B na viabilidade e morte celular

O ensaio de viabilidade celular mostrou que os inibidores de NF- κ B DHMEQ, DTCM-g e SEMBL são capazes de reduzir a viabilidade da linhagem celular TC-32, como mostrado na **Figura 10**. Tanto em 24 h como em 72 h os três inibidores foram capazes de reduzir a viabilidade celular de forma dose-dependente ($p < 0,05$), enquanto que em 48 h nenhum dos inibidores teve efeito com relevância estatística. Destaca-se o fato de que a maior concentração utilizada de todos os inibidores foi capaz de reduzir a quase a zero a viabilidade celular após 24 h e 72 h, enquanto que após 48 h, mesmo sem relevância estatística, todos os inibidores foram capazes de reduzir em pelo menos ou mais de 50% a viabilidade celular.

Entretanto, foi possível comparar melhor a eficácia dos três compostos a partir do cálculo da IC_{50} . Assim, fica claro que o inibidor mais potente em reduzir a viabilidade foi o SEMBL, com os menores valores em todos os tempos testados (IC_{50} 24 h = 2,31; IC_{50} 48 h = 3,54; IC_{50} 72 h = 1,85). O DHMEQ se mostrou o segundo mais eficaz no tratamento de 24 h (IC_{50} = 4,42) seguido do DTCM-g (IC_{50} = 6,43), enquanto que no tempo de 48 h e 72 h o DTCM-g mostrou melhores resultados que o DHMEQ (IC_{50} 48 h = 12,55 e IC_{50} 72 h = 9,13, IC_{50} 24 h = 8,54 e IC_{50} 72 h = 7,45, respectivamente).

Os dados de viabilidade celular vão, em partes, ao encontro da análise de morte celular por apoptose e necrose realizado com Annexin V e 7aaD. Como pode ser observado na **Figura 11**, após a exposição por 24 h a todos os compostos houve uma redução significativa na viabilidade celular, sendo de aproximadamente 10% nos grupos tratados com DHMEQ e DTCM-g e de mais de 20% no grupo SEMBL quando comparado ao controle DMSO. Porém, apenas o SEMBL foi capaz de aumentar de forma significativa a morte celular por apoptose (células marcadas com Annexin v), enquanto nenhum dos grupos tratados teve aumento significativo na morte por necrose. Desta forma, pode-se considerar que o composto mais eficaz em diminuir a viabilidade em partes por consequência do aumento de apoptose foi o SEMBL.

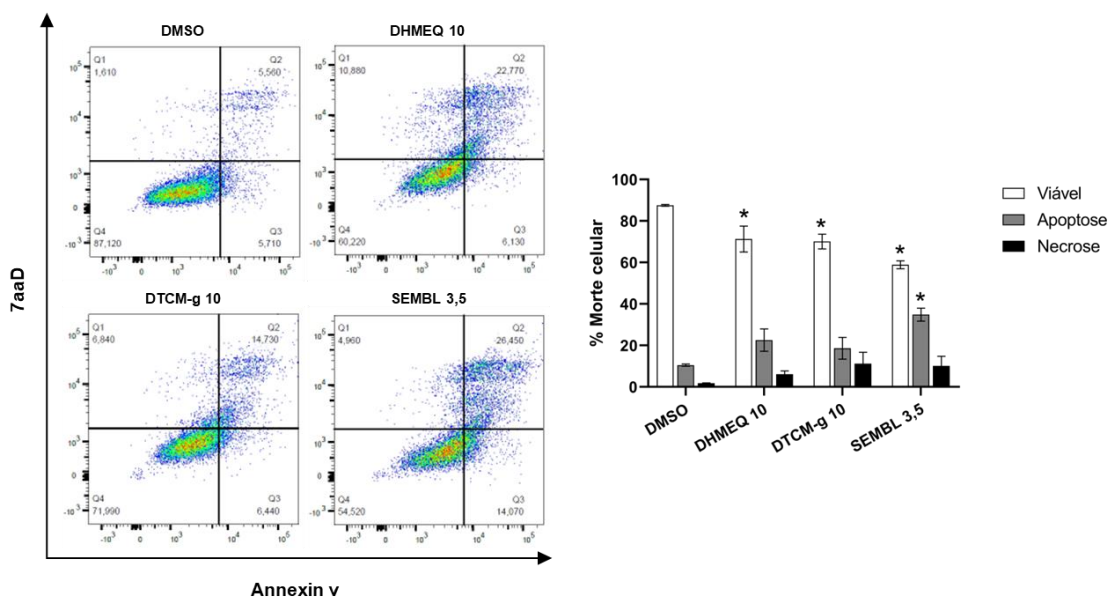
Figura 10. Viabilidade celular da linhagem TC-32 após exposição à DHMEQ, DTCM-g e SEMBL.



Fonte: A autora.

Viabilidade celular. A viabilidade celular foi mensurada por meio da leitura da absorbância da resazurina (570 nm) após a exposição aos inibidores de NF-κB DHMEQ, DTCM-g e SEMBL por 24 h, 48 h e 72 h. Os valores de IC₅₀, IC₄₀ e IC₃₀ foram calculados com o auxílio do software Compusym e equivalem à dose (µg/ml) necessária para reduzir a viabilidade em 50%, 40% e 30%, respectivamente. Todos os dados foram normalizados pelos respectivos controles (DMSO) e expressos em média ± erro padrão. Os mesmos foram analisados por meio de *Two way ANOVA* seguido de teste *post hoc Tukey's multiple comparisons test*. Os valores foram considerados relevantes estatisticamente quando $p < 0,05$ (*).

Figura 11. Análise de morte celular após a exposição aos inibidores de NF- κ B (10 μ g/ml de DHMEQ e DTCM-g; 3,5 μ g/ml de SEMBL) por 24 h.



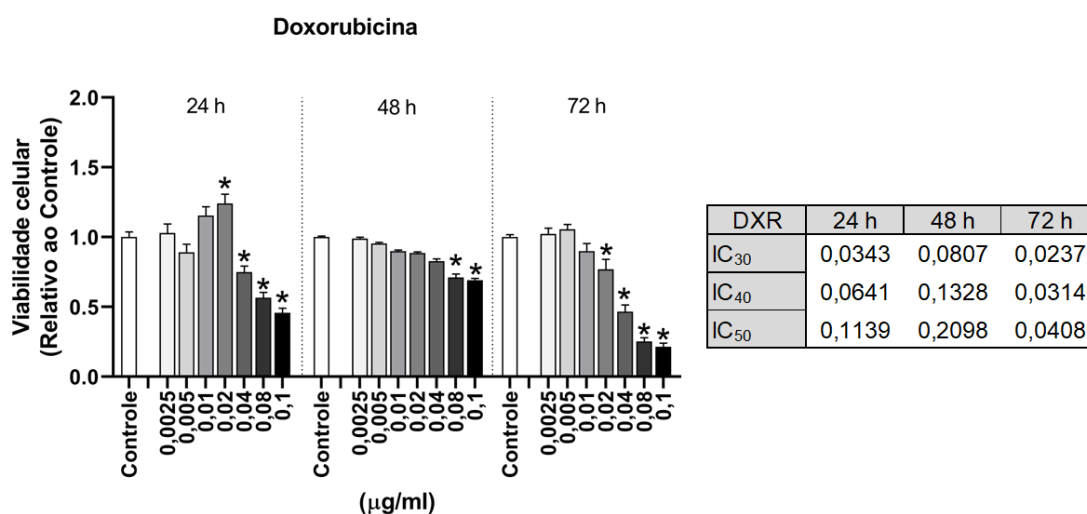
Fonte: A autora.

Morte celular. As células TC-32 foram marcadas com Annexin v e 7aAD a fim de identificar células viáveis (-Annexin v/-7aAD), apoptóticas (+Annexin v/-7aAD e + Annexin v/+7aAD) e necróticas (-Annexin v/+7aAD). Os dados obtidos foram expressos em média \pm erro padrão das porcentagens. Os mesmos foram analisados por meio de Two way ANOVA seguido de teste *post hoc* Tukey's multiple comparisons test. Os valores foram considerados relevantes estatisticamente quando $p < 0,05$ (*).

4.4 Avaliação do potencial sinérgico da inibição de NF- κ B no tratamento com Doxorubicina

De acordo com método desenvolvido por CHOU e TALALAY (1984) pode-se definir a interação entre drogas como sinérgico, aditivo ou antagônico. Para isso, é necessário calcular inicialmente os valores de IC₅₀ dos compostos individuais, como já apresentado na **Figura 10** para os inibidores de NF- κ B, e como mostrado na **Figura 12**, para o quimioterápico DXR, utilizado na prática clínica para o tratamento de SE. Observa-se que o tratamento com DXR leva a uma diminuição da viabilidade celular em todos os tempos testados, porém apenas doses iguais ou acima de 0,02 μ g/ml foram efetivas e relevantes estatisticamente. Este ponto é corroborado ao se analisar os valores de IC₅₀ que foram de aproximadamente 0,1, 0,2 e 0,04 μ g/ml após 24 h, 48 h e 72h de tratamento, respectivamente.

Figura 12. Viabilidade celular da linhagem TC-32 após tratamento com DXR.



Fonte: A autora.

Viabilidade celular. A análise foi realizada por meio da leitura da absorbância da resazurina (570 nm) após a exposição à DXR por 24 h, 48 h e 72 h. Os valores de IC₅₀, IC₄₀ e IC₃₀ foram calculados com o *software* Compusyn. Todos os dados foram normalizados pelos respectivos controles (solução salina) e expressos em média \pm erro padrão. Os mesmos foram analisados por meio de Two way ANOVA seguido de teste *post hoc* Tukey's multiple comparisons test. Os valores foram considerados relevantes estatisticamente quando $p < 0,05$ (*).

A partir do cálculo de IC₅₀ de todos os inibidores de NF- κ B utilizados, testou-se de forma simultânea o tratamento com uma dose próxima a IC₄₀ de 24h de cada composto (3,5 μ g/ml de DHMEQ, 5 μ g/ml de DTCM-g e 2,5 μ g/ml de SEMBL) com duas doses de DXR, valores próximos à IC₅₀ (0.1 μ g/ml) e IC₃₀ (0.04 μ g/ml) após 24 h de tratamento. Os valores de Fa (fração afetada), correspondentes ao efeito observado, de CI, correspondente ao tipo de interação, e de DRI (do inglês, *Dose-Reduction Index*), correspondente ao *fold* de redução na dose de DXR necessária para ter o mesmo efeito do tratamento isolado, são expostos na **Tabela 7**. Das 18 combinações testadas apenas 4 foram sinérgicas, ou seja, possuem valor de CI < 1. A combinação com maior efeito sinérgico e, conseqüentemente, maior DRI foi a combinação de 3,5 μ g/ml de DHMEQ com 0,04 μ g/ml de DXR por 24 h (CI = 0,33771; DRI = 22,2959), seguido de 5 μ g/ml de DTCM-g com 0,1 μ g/ml de DXR por 24 h (CI = 0,50718; DRI 5,17387), 3,5 μ g/ml de DHMEQ com 0,04 μ g/ml de DXR por 72 h (CI = 0,60276, DRI = 2,59653) e, por fim, 3,5 μ g/ml de DHMEQ com 0,04 μ g/ml de DXR por 48 h (CI = 0,83378, DRI = 2,29843). As

demais combinações tiveram efeito aditivo ($0,9 < CI < 1,10$) ou antagônico ($CI > 1,10$). Nota-se que mesmo as combinações que tiveram efeito aditivo ou de baixo a moderado efeito antagônico ($0,9 < CI < 3,3$) apresentaram valores de DRI acima de 1, indicando um efeito positivo na redução da dose de DXR. É importante destacar que combinações com alto efeito antagônico, como 5 µg/ml de DTCM-g com 0,04 µg/ml de DXR por 24 h e 48 h ($CI = 9,8 \times 10^7$; $CI = 1,6 \times 10^9$) apresentaram valores extremamente baixos de DRI, tendo, portanto, um efeito inverso do esperado. Desta forma, o inibidor de NF-κB que se mostrou mais promissor em potencializar o efeito de DXR no tratamento de SE foi o DHMEQ.

Tabela 7. Fração afetada (Fa), Índice de Combinação (CI) e Índice de Redução de Dose (DRI) da linhagem TC-32 após tratamento simultâneo com um inibidor de NF-κB e DXR por 24 h, 48 h e 72 h. (azul = sinérgico; verde = aditivo; amarelo = antagônico; cinza = DRI favorável).

Doses		24h			48h			72h		
DHMEQ (µg/ml)	DXR (µg/ml)	Fa	CI	DRI DXR	Fa	CI	DRI DXR	Fa	CI	DRI DXR
3,5	0,04	0,81009	0,33771	22,2959	0,32478	0,83378	2,29843	0,81079	0,60276	2,59653
	0,1	0,61456	1,02820	2,20836	0,30930	1,59183	0,84820	0,64039	1,99906	0,59073
DTCM-g (µg/ml)	DXR (µg/ml)	Fa	CI	DRI DXR	Fa	CI	DRI DXR	Fa	CI	DRI DXR
5,0	0,04	0,53719	0,96920	3,51912	0	$2,78 \times 10^{19}$	0	0	$8,34 \times 10^{10}$	0
	0,1	0,74398	0,50718	5,17387	0,30930	2,09368	0,84820	0,64039	2,18416	0,59073
SEMBL (µg/ml)	DXR (µg/ml)	Fa	CI	DRI DXR	Fa	CI	DRI DXR	Fa	CI	DRI DXR
2,5	0,04	0,4398	1,07184	12,9347	0,06875	9,38446	0,27795	0,57810	2,03923	1,24794
	0,1	0,78337	1,11941	7,05514	0,20099	4,40786	0,44273	0,64039	2,86707	0,59073

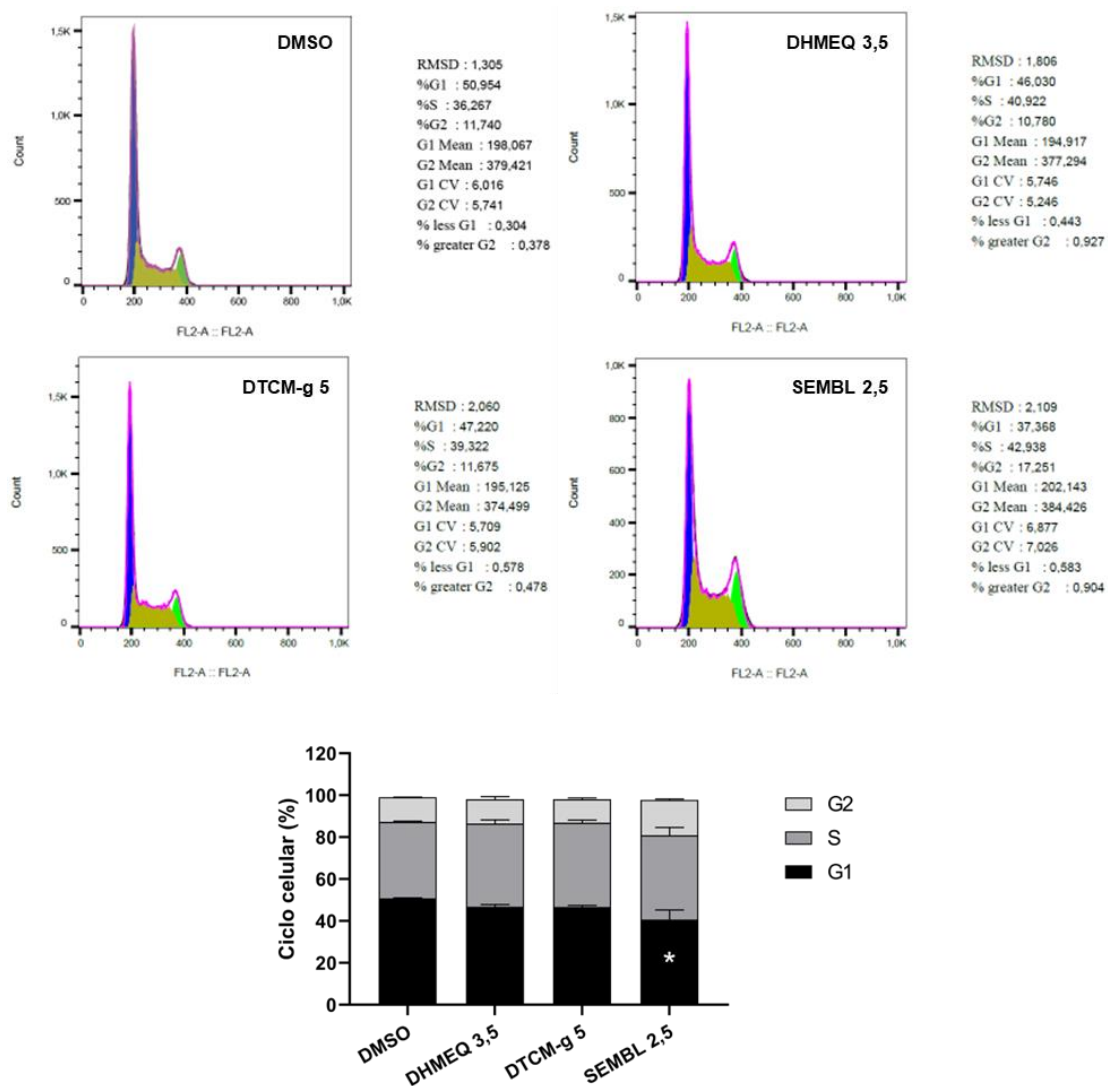
Fonte: A autora.

4.5 Influência da inibição de NF-κB no ciclo celular

Baseados no ensaio de viabilidade celular com resazurina foram selecionadas doses próximas à IC_{40} de 24 h dos inibidores de NF-κB para avaliar o efeito no ciclo celular, ou seja, 3,5 µg/ml de DHMEQ, 5 µg/ml de DTCM-g e 2,5 µg/ml de SEMBL. Como mostrado na **Figura 13** quando comparado com o controle DMSO houve uma diminuição de células em G1 (SEMBL = 40,61%; DMSO = 50,75%) e um aumento de células em G2/M

(SEMBL = 16,89%; DMSO = 11,79%) após o tratamento com SEMBL. Os demais inibidores não foram capazes de alterar o ciclo celular. Assim, o inibidor mais eficiente com relação ao parâmetro ciclo celular foi o SEMBL.

Figura 13. Efeito da inibição de NF-κB no ciclo celular da linhagem celular TC-32.



Fonte: A autora.

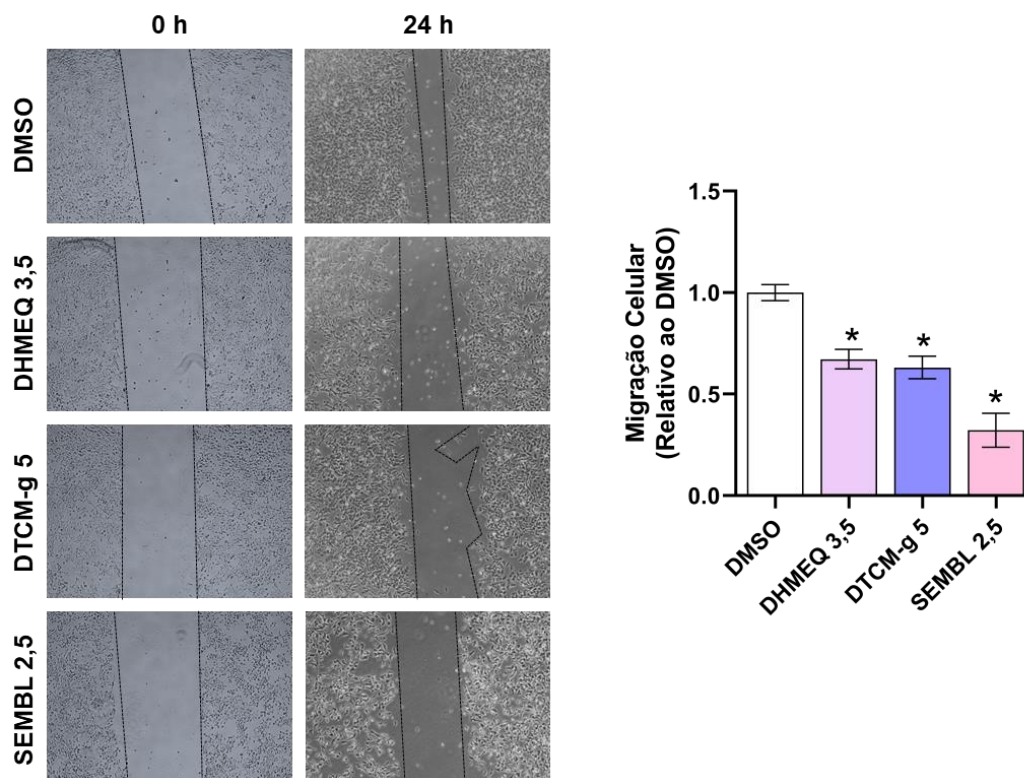
Ciclo celular. A análise foi realizada após 24 h de tratamento por meio do kit BD Cycletest™ Plus DNA Kit e os dados obtidos expressos em média ± erro padrão das porcentagens. Por não haver repetição do experimento, a análise estatística não foi realizada.

4.6 Efeito da inibição de NF-κB na migração celular

A avaliação da migração celular foi realizada por meio do ensaio de *wound healing* com as concentrações de DHMEQ, DTCM-g e SEMBL próximas à IC₄₀, afim de evitar

muita morte celular e possível viés na análise. Os três inibidores de NF- κ B foram capazes de reduzir a migração celular de forma significativa como mostrado na **Figura 14**. O DHMEQ e o DTCM-g se comportaram de forma similar, reduzindo a migração celular em aproximadamente 40%, enquanto o SEMBL se mostrou mais eficaz e foi capaz de reduzir a migração em mais de 50% quando comparado ao controle DMSO.

Figura 14. Migração celular por *wound healing*.



Fonte: A autora.

Migração celular. O efeito dos inibidores de NF- κ B na migração celular da linhagem TC-32 foi avaliado após o tratamento por 24 h com 3,5 μ g/ml de DHMEQ, 5 μ g/ml de DTCM-g e 2,5 μ g/ml de SEMBL. As imagens foram obtidas em microscópio invertido na objetiva de 40x e todos os dados obtidos foram normalizados pelo DMSO e expressos em média \pm erro padrão. Os mesmos foram analisados por meio de Kuskal-Wallis test seguido de teste *post hoc* Dunn's multiple comparisons test. Os valores foram considerados relevantes estatisticamente quando $p < 0,05$ (*).

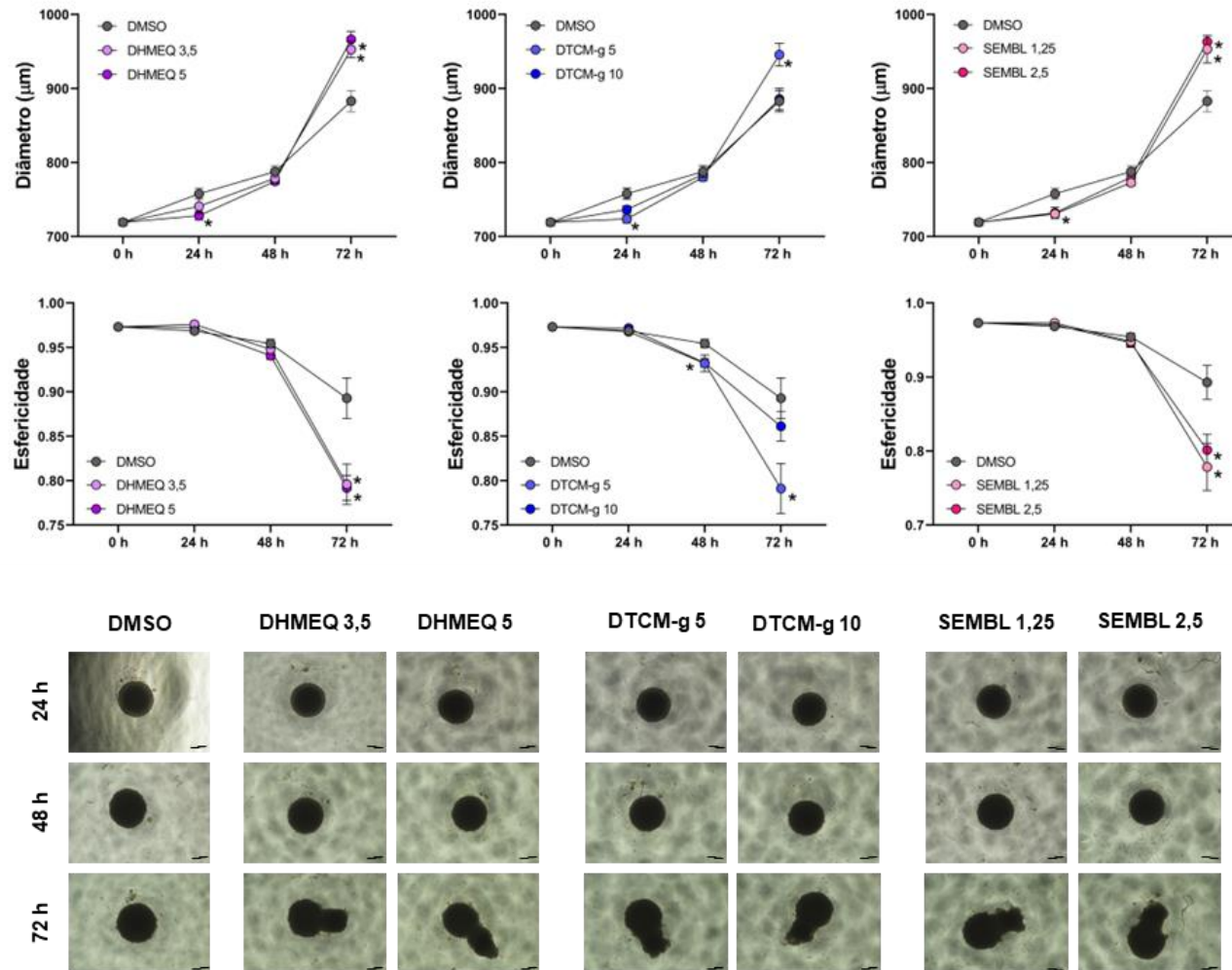
4.7 Efeito da inibição de NF- κ B no crescimento e integridade de esferoides

De acordo com GAEBLER et al., (2017), modelos 3D possuem vantagens quando comparados à modelos 2D tradicionais de cultura celular na triagem de potenciais

quimioterápicos. Por isso, os inibidores de NF- κ B utilizados no presente trabalho também foram testados em esferoides da linhagem TC-32. Duas concentrações de cada inibidor foram selecionadas (próximas à IC₄₀ e IC₅₀) e os parâmetros “diâmetro” e “esfericidade” foram utilizados para inferir o efeito na viabilidade celular, uma vez que o método resazurina não é indicado para avaliação da viabilidade e proliferação em modelos 3D.

Como observado na **Figura 15** os três inibidores foram capazes de alterar o diâmetro e a esfericidade quando comparados ao controle DMSO. Com relação ao diâmetro, após 24 h de tratamento a exposição à 5 μ g/ml de DHMEQ, 5 μ g/ml de DTCM-g, 1,25 e 2,5 μ g/ml de SEMBL levou à sua diminuição, podendo indicar uma redução na proliferação e no crescimento celular. Porém, após 72 h de tratamento, todas concentrações testadas dos inibidores levaram a um efeito inverso, ou seja, a um aumento no diâmetro, o que poderia sugerir um aumento na proliferação e no crescimento celular. Porém, ao se analisar o parâmetro esfericidade e às imagens, observa-se que quanto maior o tempo de tratamento e a concentração dos inibidores, menor é a esfericidade e maior o dano observado nos esferoides tratados, o que não é observado no controle DMSO. Desta forma, pode-se dizer que o aumento no diâmetro é devido à perda de integridade e provável aumento de morte celular. Além disso, se levarmos em consideração o parâmetro “esfericidade”, o inibidor que causou maior perda do mesmo foi o SEMBL, podendo ser classificado como o mais eficaz.

Figura 15. Efeito da inibição de NF-κB em modelo 3D.



Fonte: A autora

Análise em modelo 3D. A linhagem TC-32 foi cultivada em modelo 3D por 72 h e após a formação dos esferoides os mesmos foram tratados com diferentes concentrações de DHMEQ, DTCM-g e SEMBL por 24 h, 48 h e 72 h. Os parâmetros “diâmetro” e “esfericidade” foram mensurados a partir de fotos obtidas em microscópio invertido na objetiva de 10X. Todos os dados foram normalizados pelos respectivos controles (DMSO) e expressos em média \pm erro padrão. Os mesmos foram analisados por meio de Two way ANOVA seguido de teste *post hoc* Tukey’s multiple comparisons test. Os valores foram considerados relevantes estatisticamente quando $p < 0,05$ (*).

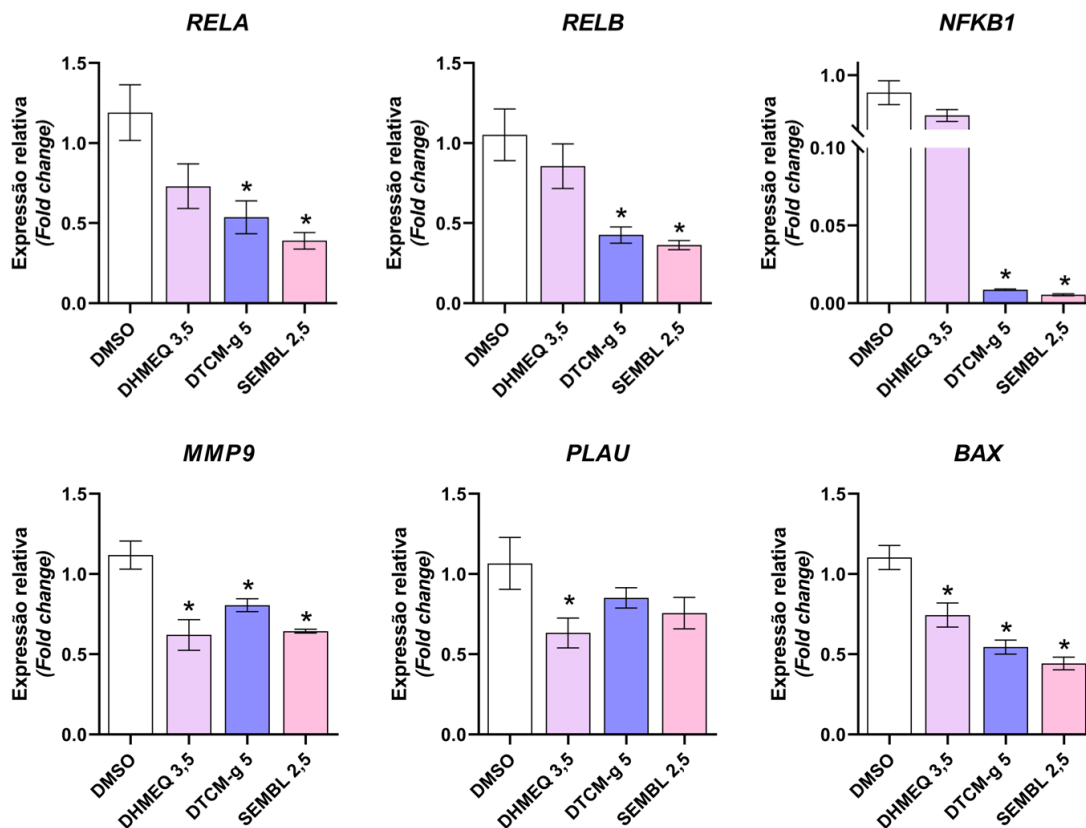
4.8 Inibição de NF-κB leva à modulação da expressão gênica

De forma similar a alguns ensaios funcionais, para a avaliação da influência da inibição de NF-κB na expressão gênica foram selecionadas concentrações próximas à IC_{40} a fim de evitar morte celular e, portanto, células suficientes para a extração de RNA.

Com relação à alteração na expressão na expressão de NF-κB, tanto DTCM-g como SEMBL foram capazes de reduzir a expressão de *RELA*, *RELB* e *NFKB1* de forma significativa, ao passo que o DHMEQ não reduziu nenhuma das subunidades avaliadas (**Figura 16**). Vale ressaltar que DTCM-g e SEMBL reduziram em mais da metade a expressão de *NFKB1*.

Com relação a alvos validados do NF-κB, foi avaliada a expressão de genes envolvidos com a motilidade (*MMP9* e *PLAU*) e com a morte celular (*BAX*) como mostrado na **Figura 15**. Enquanto DHMEQ foi capaz de reduzir a expressão de ambos os genes envolvidos com motilidade de forma significativa quando comparado ao controle DMSO, DTCM-g e SEMBL foram capazes de reduzir a expressão de forma significativa apenas de *MMP9*. O mesmo não ocorreu com a expressão de *BAX*, a qual foi reduzida pelos três inibidores de NF-κB de forma significativa.

Figura 16. Expressão gênica de membros da Família Rel e alvos validados de NF- κ B após inibição.



Fonte: A autora.

Expressão gênica. A linhagem TC-32 foi tratada por 24 h com 3,5 μ g/ml de DHMEQ, 5 μ g/ml de DTCM-g ou 2,5 μ g/ml de SEMBL e expressão de genes alvos e subunidades de NF- κ B foi avaliada por meio de RT-qPCR. Os dados obtidos foram expressos em *fold change* \pm erro padrão. Os mesmos foram analisados por meio de Kuskal-Wallis test seguido de teste *post hoc* *Dunn's multiple comparisons test*. Os valores foram considerados relevantes estatisticamente quando $p < 0,05$ (*).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O tratamento para SE tem avançado muito nas últimas décadas. Contudo, a sobrevida de pacientes com recidiva e com metástase continua sendo um desafio para a medicina (BACCI *et al.*, 2003; GRÜNEWALD *et al.*, 2018; VAN MATER; WAGNER, 2019). Por esse motivo, a busca de novos alvos terapêuticos e novos tratamentos é de suma importância.

O papel da via do NF- κ B na tumorigênese é relatado na literatura há décadas. Desde a sua descoberta em 1986 (RANJAN SEN; DAVID BALTIMORE, 1986) os estudos que correlacionam a alta expressão e a ativação constitutiva de NF- κ B ao desenvolvimento e progressão tumoral têm aumentado (XIA, L. *et al.*, 2018), porém, este padrão não é observado em SE. Um dos primeiros relatos da participação da via do NF- κ B na tumorigênese do SE ocorreu no início do século XXI (JAVELAUD, Delphine *et al.*, 2000b) e desde então pouco mais de 10 trabalhos foram publicados sobre o assunto. Até o momento, só há registro de um estudo que analisou a expressão de NF- κ B/p65 em amostras de pacientes com o objetivo de avaliar a presença da expressão constitutiva da via por meio de imuno-histoquímica (ZENALI *et al.*, 2009). Neste estudo, observou-se uma elevada marcação de p-p65 (p65 fosforilada) no núcleo em amostras de pacientes diagnosticados com SE. Este achado vai ao encontro do observado pelas análises *in silico* do presente estudo, no qual observou-se uma elevada expressão de mRNA tanto de *RELA*, gene codificante para p65, como de *REL*, gene codificante para outra subunidade de NF- κ B, c-Rel. É importante destacar que o estudo de ZENALI *et al.* (2009) analisou apenas 3 amostras, enquanto no presente estudo foram utilizadas mais de 100 amostras, incluindo amostras de tecido normal, sendo desta forma uma análise de maior impacto e abrangência. Assim, ambos os trabalhos corroboram com a hipótese de que a via do NF- κ B possui relevância para a tumorigênese em SE.

Corroborando com os dados de expressão gênica, a análise da dependência gênica mostrou que linhagens celulares derivadas de SE são dependentes de NF- κ B. Este parâmetro calculado a partir de experimentos de perturbação da expressão por meio de RNAi ou CRISPR permite avaliar quais genes são essenciais para a sobrevivência e a proliferação celular, ou seja, quais genes favorecem ou não o crescimento e a progressão tumoral (LIN; SHELTER, 2020). Baseado nesta análise, a linhagem celular TC-32 se mostra como um bom modelo de estudo. A mesma apresenta dependência dos

genes *RELA*, *RELB* e *NFKB1*, sendo que dois deles (*RELA* e *NFKB1*) se mostraram diferencialmente expressos em amostras de pacientes.

A dependência gênica também permite classificar um gene como oncogene ou supressor tumoral dependendo do efeito que a perturbação do mesmo causa na célula (LIN; SHELTER, 2020). Partindo deste ponto de vista, alguns genes da família Rel podem possuir papéis opostos em SE. As análises *in silico* do gene *REL*, por exemplo, mostraram que o mesmo possui elevada expressão, pode ser essencial ou não para a sobrevivência dependendo da linhagem celular analisada e baixos níveis de expressão se correlacionam com recidiva. Assim, segundo esta análise o gene *REL* pode apresentar um papel de supressor tumoral ou oncogene dependendo do estágio de desenvolvimento, podendo não estar relacionado ao processo de estabelecimento tumoral, mas envolvido em processos de progressão e metástase, por exemplo. O papel de c-Rel na tumorigênese inicialmente era considerado exclusivamente pró-tumoral, uma vez que a sua alta expressão foi correlacionada com o desenvolvimento de diversas neoplasias (MUKHERJEE *et al.*, 2015). Porém, a depleção de c-Rel em modelo animal aumenta a susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer gástrico e adenoma associado a colite, indicando que esse fator pode possuir um papel dúbio dependendo do contexto da doença (BURKITT, M. D. *et al.*, 2013; BURKITT, Michael D. *et al.*, 2015). Logo, a correlação negativa de *REL* com recidiva reforça a ideia de papel duplo ou dependente do estágio da doença de c-Rel na tumorigênese.

De forma similar, o gene *NFKB1* pode apresentar um papel ambíguo na tumorigênese de SE visto que é considerado um gene essencial para a sobrevivência da grande maioria das linhagens celulares analisadas, mas se apresenta em níveis baixos nas amostras tumorais o que se correlaciona com metástase. É sabido que dependendo do dímero formado com p50 (proteína derivada do precursor p105 codificado a partir do gene *NFKB1*) pode ocorrer a progressão (ABATE *et al.*, 2015) ou a supressão tumoral (KRAVTSOVA-IVANTSIV *et al.*, 2015). Além disso, geralmente quando a expressão de p65/*RELA* é elevada em tumores a expressão de p50 ou ativação do homodímero p50/p50 é baixa, indo ao encontro com o padrão observado na análise *in silico* de expressão gênica (CONCETTI; WILSON, 2018).

A desregulação da via do NF- κ B em neoplasias é comum pelo fato deste fator de transcrição participar da regulação de diversos processos celulares fundamentais para a

homeostasia tecidual (MEDEIROS *et al.*, 2021; PRESCOTT; MITCHELL; COOK, 2021). É sabido que a ativação de dímeros de NF- κ B leva à transcrição de genes envolvidos com a sobrevivência celular e previne a morte (Javelaud *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2014; Kuboki *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2017; Ahmad and Ahsan, 2020). Em SE já foi mostrado que a ativação de NF- κ B promove a produção de MnSOD sinalizando para a sobrevivência celular (DJAVAHERI-MERGNY *et al.*, 2004). Desta forma, uma vez que ocorre a inibição da via é de se esperar uma redução na viabilidade e um aumento na morte celular.

Partindo deste ponto, testou-se a inibição de NF- κ B *in vitro* na linhagem celular TC-32 por meio de três inibidores específicos DHMEQ, DTCM-g e SEMBL. Observou-se uma redução na viabilidade celular, aumento da morte, redução de células na fase G1 do ciclo, sinergismo ou antagonismo com DXR, redução da migração, perda de integridade de células em modelo 3D e modulação da expressão gênica (como resumido na Tabela 8).

Tabela 8. Resumo dos resultados obtidos após inibição de NF- κ B por DHMEQ, DTCM-g e SEMBL na linhagem TC-32.

	DHMEQ	DTCM-g	SEMBL
Viabilidade	↓	↓	↓
Morte celular	↑	↑	↑
Sinergismo com DXR	+	+	-
Ciclo Celular	-	-	↓ G1
Migração	↓	↓	↓
Crescimento de esferoides	↓	↓	↓
Expressão de <i>RELA</i>	-	↓	↓
Expressão de <i>RELB</i>	-	↓	↓
Expressão de <i>NFKB1</i>	-	↓	↓
Expressão de <i>BAX</i>	↓	↓	↓
Expressão de <i>PLAU</i>	↓	-	-
Expressão de <i>MMP9</i>	↓	↓	↓
Translocação nuclear	-	↓	↓

Fonte: A autora.

A inibição de NF- κ B pode levar à indução tanto de apoptose como de necrose e autofagia (DJAVAHERI-MERGNY *et al.*, 2006; LUO, J. L.; KAMATA; KARIN, 2005). A expressão de uma forma mutante de κ B que impede a ativação de NF- κ B, por exemplo, induz em SE um aumento na taxa apoptótica quando comparado com células com genótipo selvagem (JAVELAUD, D.; BESANÇON, 2001; JAVELAUD, Delphine *et al.*, 2000a) e o mesmo ocorre em células tratadas com trióxido de arsênio, um inibidor não específico de NF- κ B (MATHIEU; BESANÇON, 2006). Além disso, também já foi relatado que a inibição de NF- κ B com DHMEQ, DTCM-g e SEMBL em outros tipos tumorais induz o aumento de morte celular via apoptose e necrose, resultando em queda da viabilidade celular (BRASSESCO, M. S. *et al.*, 2013; BRASSESCO, Maria S. *et al.*, 2012; CANDIDO *et al.*, 2020; SIDTHIPONG *et al.*, 2017).

Uma vez que ocorre o aumento da morte celular por apoptose, como no grupo de células expostas ao SEMBL, é de se esperar observar uma redução na expressão de genes anti-apoptóticos e um aumento na expressão de genes pró-apoptóticos (VERZELLA *et al.*, 2020). Porém, foi observado uma redução na expressão de mRNA de *BAX* após a exposição aos 3 inibidores de NF- κ B. De fato, o papel de p65 na apoptose é ambíguo uma vez que a translocação do mesmo para o núcleo leva ao acúmulo de *BAX* na mitocôndria desencadeando o processo de apoptose (KHANDELWAL *et al.*, 2011), diferente do observado em alguns tipos tumorais, nos quais ao se inibir NF- κ B se observa um aumento em *BAX* e um consequente aumento de morte celular (KATSMAN; UMEZAWA; BONAVIDA, 2007; LIONTAS; YEGER, 2004; SIMON-GABRIEL *et al.*, 2018; SUN, L. *et al.*, 2018). Desta forma, pode-se inferir que a indução de morte celular via inibição de NF- κ B é independente da ativação de *BAX*, como já foi relatado por outros pesquisadores ao se inibir a via do NF- κ B com o inibidor específico BAY-7082 e com DHMEQ (SATO *et al.*, 2014a; WHITE; BURCHILL, 2008).

A alteração no ciclo celular também pode acarretar em aumento de morte celular por apoptose e consequente redução da viabilidade. A desregulação do ciclo celular em câncer é de grande importância para o crescimento e a proliferação celular e, portanto, para a progressão tumoral, se tornando um alvo excelente para terapias (LESSNICK; KOWALEWSKI; RANDALL, 2011; MADDIKA *et al.*, 2007). No presente trabalho, observamos que a inibição do NF- κ B por SEMBL levou à uma alteração no ciclo celular, causando parada em G2/M. É justamente nesta fase do ciclo celular que ocorre a

verificação e possível reparação de erros no DNA ou indução de morte celular por apoptose (RATTANAPORN SOMPONG *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2016). O papel do NF- κ B nesta fase de verificação provavelmente se deve pela sua relação com a proteína GADD45, uma das proteínas responsáveis pelo *checkpoint* da transição S para G2/M. Uma vez que esta proteína é ativa ocorre a inibição de Ciclina B que por sua vez é responsável por iniciar a fase G2/M. Desta forma, quando ocorre a inibição de NF- κ B ocorre o acúmulo de GADD45 e a consequente parada do ciclo celular (CHEN, F.; CASTRANOVA; SHI, 2001; CHEN, Fei *et al.*, 2001). Resultados similares já foram observados em outros tipos tumorais com inibição de NF- κ B, como em gliomas (BRASSESCO, M. S. *et al.*, 2013; FUKUSHIMA *et al.*, 2012; ROBERTO *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2008), câncer de bexiga (PARK, C. *et al.*, 2019), câncer de cólon (UEN *et al.*, 2007) e câncer de próstata (KOZAKAI *et al.*, 2012).

Ao mesmo tempo, uma das formas de se potencializar os efeitos antiproliferativos, anti-sobrevivência e pró-apotóticos de compostos isolados é combiná-los com outras drogas, prática muito comum no tratamento oncológico (poliquimioterapia) (GILAD *et al.*, 2021). Já foi demonstrado que a ativação de NF- κ B está envolvida com a resistência a fármacos uma vez que este regula a expressão do gene *MRD1* (*Multi Drug Resistance*, também conhecido como *ABCB1*), gene que codifica a glicoproteína-g, uma bomba de efluxo responsável por expulsar para o meio extracelular substâncias nocivas para a célula (BENTIRES-ALJ *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2019). Pensando nisso, realizamos o estudo de combinação dos inibidores de NF- κ B com Doxorubicina, uma droga de uso padrão no tratamento de SE, mas que apresenta efeitos colaterais indesejáveis (DOUEDJ; CARSON., 2022). Contudo, nem todas as combinações testadas apresentaram efeito sinérgico como observado na literatura para a combinação de DHMEQ ou DTCM-g com outros quimioterápicos (CELEGATO *et al.*, 2014; LAMPIASI *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2018; SUZUKI *et al.*, 2013), inclusive em um outro tipo de sarcoma ósseo, o OS (CASTRO-GAMERO *et al.*, 2012). Porém, em contraste aos estudos que mostram efeito sinérgico com a inibição de NF- κ B e indo ao encontro de parte dos resultados expostos neste trabalho, em câncer de próstata foi mostrado que a inibição de NF- κ B associada à drogas antimitóticas não leva à morte celular, e tal efeito é observado quando os antimitóticos são associados a ativadores da via do NF- κ B (PARRONDO *et al.*, 2010).

As principais combinações que apresentaram efeito antagônico foram as combinações com DHMEQ e DTCM-g após 72 h de exposição. Uma das possíveis explicações para este efeito antagônico e aumento da viabilidade celular (dados não mostrados) pode ser devido à meia vida das drogas. Com relação aos inibidores de NF- κ B não há estudos sobre a sua farmacocinética, porém é sabido que a meia vida da DXR em animais é de aproximadamente 20 h (RAHMAN *et al.*, 1986). Desta forma nos tratamentos de 48 h e 72 h provavelmente não há mais efeito combinatório das drogas, havendo recuperação da viabilidade das células mais resistentes e conseqüente efeito antagônico. Além disso, quando se trata de ensaios de combinação de drogas, existem duas formas básicas de tratamento: o simultâneo e o sequencial, que podem influenciar no efeito. Dependendo do esquema de combinação, a interação de DHMEQ com outros quimioterápicos pode ter um efeito sinérgico maior que o outro, como mostrado por CASTRO-GAMERO *et al.* (2012) em OS.

Estudos mostram que a inibição da via canônica do NF- κ B por meio da inibição de p65, p52, c-Rel e IKK δ /NEMO induz uma melhora no efeito citotóxico da DXR, efeito não observado quando ocorre a inibição de um dos principais efetores da via não canônica, RelB. De forma similar ao observado no presente estudo, quando DXR foi associada à DTCM-g e SEMBL, capazes de inibir *esta subunidade*, não se observou uma melhora no efeito citotóxico da DXR (BEDNARSKI; BALDWIN; KIM, 2009; TAPIA *et al.*, 2007). Estes dois compostos também se mostraram capazes de inibir a expressão de *NFKB1*. É sabido que um dos possíveis mecanismos de ação da DXR é induzir estresse oxidativo e conseqüente morte celular via ativação de *NFKB1*, portanto, a redução na expressão deste gene causada por DTCM-g e SEMBL pode prejudicar o efeito citotóxico de DXR, levando à um efeito antagônico quando combinados simultaneamente como observado (THORN *et al.*, 2011). Desta forma, a associação de DXR com inibição de NF- κ B pode variar dependendo da subunidade alvo e dependendo do esquema de combinação utilizado. Portanto, são necessários estudos futuros que avaliem o efeito combinatório da inibição do NF- κ B com DXR, podendo ilustrar melhor a relação entre os compostos e potencial uso terapêutico da inibição de NF- κ B em combinação com quimioterápicos já utilizados para o tratamento de SE.

Outro aspecto importante para a tumorigênese e que deve ser levado em consideração no tratamento oncológico é a capacidade dos quimioterápicos inibirem a

motilidade celular (BROWN *et al.*, 2018; HANAHAN; WEINBERG, 2011; REDINI; HEYMANN, 2015). A ativação de NF- κ B em câncer está relacionada com a transição epitélio-mesênquima (EMT), isso porque p65 especificamente se liga à região promotora de genes fundamentais para este processo como *TWIST1*, *SLUG* e *SIP1* e além disso, quando a inativação de p65 é realizada tanto por siRNA como por DHMEQ observa-se uma redução na expressão dos marcadores mesenquimais *SLUG*, *SIP1*, *TWIST1*, *MMP11* e *CDH2* (codificante para N-caderina), e um aumento na expressão do marcador epitelial *CDH1* (codificante para E-caderina), o que leva à inibição da motilidade celular e à redução de focos metastáticos no fígado (PIRES *et al.*, 2017; SUZUKI *et al.*, 2013). Desta forma, ao se inibir tanto a translocação nuclear como a transcrição de *RELA/p65* de células TC-32 é de se esperar uma redução significativa na migração, como foi observado nos nossos resultados.

A ativação de NF- κ B também está correlacionada com a ação de metaloproteinases como MMP-2, MMP-9 e uma das suas proteínas reguladoras uPA (codificada pelo gene *PLAU*) (HSIEH *et al.*, 2014; LI, H.; CHEN, 2018; MOREAU; MOURAH; DOSQUET, 2011). A uPA é responsável por catalisar a conversão da pró-enzima plasminogênio em plasmina, que por sua vez é capaz de degradar direta ou indiretamente a matriz extracelular (MOREAU; MOURAH; DOSQUET, 2011). Portanto, a inibição de NF- κ B leva a uma regulação negativa de *PLAU* e *MMP-9*, como observado no presente estudo.

Achados similares aos nossos também já foram observados em outros tipos tumorais. Em glioblastoma (GBM) e OS o tratamento *in vitro* com DHMEQ levou à uma redução significativa da migração e da invasão além de promover uma diminuição na expressão de uPA (*PLAU*) e de outros genes envolvidos com a motilidade como *MMP2*, *MMP14* e *TIMP2* (BRASSESCO, M. S. *et al.*, 2013; CASTRO-GAMERO *et al.*, 2012). Já o DTCM-g é capaz de inibir a migração e a invasão em GBM e câncer de bexiga, porém sem reduzir a expressão de *PLAU* (BRASSESCO, Maria S. *et al.*, 2012; BRASSESCO, María Sol *et al.*, 2013; ROBERTO *et al.*, 2018). Já o SEMBL se mostrou eficaz ao reduzir a migração de células de câncer de ovário e reduzir da atividade de MMP-2 (SIDTHIPONG *et al.*, 2017), indo ao encontro do observado na linhagem TC-32.

Por outro lado, a inibição de NF- κ B em alguns casos pode também levar à um aumento da migração e da invasão celular. Em câncer cervical, por exemplo, *NFKB1* se

comporta como um supressor tumoral, ou seja, quando este gene sofre *knockdown* observa-se um aumento na proliferação, na migração e na invasão (YANG *et al.*, 2018). Observamos que amostras de pacientes diagnosticados com SE possuem baixa expressão de *NFKB1* e que as linhagens derivadas de SE são dependentes desse gene. Isso associado ao fato de que baixos níveis de *NFKB1* se correlacionam com presença de metástase, podem indicar que este gene não está associado à migração e à invasão em SE. Esta ideia vai ao encontro do observado na expressão de *PLAU* após o tratamento com DTCM-g e SEMBL. Ambos os inibidores foram capazes de reduzir drasticamente os níveis de mRNA de *NFKB1* e conseqüentemente não provocaram alteração na expressão de *PLAU*, gene importante para este processo celular. Por outro lado, o DHMEQ, que não foi capaz de reduzir os níveis de *NFKB1* foi capaz de reduzir a expressão de *PLAU*. Com isso, pode-se inferir que cada subunidade possui um papel diferente durante a tumorigênese do SE.

A maioria dos estudos que avaliam a função do NF- κ B na tumorigênese de um modo geral utiliza modelos de estudos *in vitro* bidimensionais (2D), os quais possuem suas limitações uma vez que não mimetizam o microambiente e nem as interações célula-célula observadas *in vivo* (GAEBLER *et al.*, 2017; REDINI; HEYMANN, 2015). Já foi mostrado que modelos tridimensionais (3D) apresentam maior expressão e localização nuclear de NF- κ B do que modelos em monocamada, por exemplo (KOPP *et al.*, 2018). Em SE, estudos já mostraram que células cultivadas em cultura 3D apresentaram resistência à doxorubicina quando compara à cultura 2D, como ocorre em casos de recidiva e metástase (LI, E. *et al.*, 2013). Além disso, a expressão gênica dos marcadores moleculares CD99, queratina e SMA, além de alta expressão de vias como IGF-1R/mTOR em modelo 3D se assemelham mais ao tecido tumoral (GAEBLER *et al.*, 2017). Portanto, a avaliação de novos quimioterápicos apenas em modelos 2D apresentam suas limitações, sendo necessária a avaliação em outros modelos *in vitro*, como os modelos 3D.

Uma das formas de avaliar o efeito de quimioterápicos em modelos 3D é por meio da quantificação do diâmetro e da esfericidade dos esferoides formados e expostos ao agente químico de interesse (PICCININI, 2015). Ao contrário do esperado, ao se inibir a via do NF- κ B observou-se um aumento no diâmetro, o que poderia indicar um aumento do crescimento tumoral não corroborando com dados da literatura que mostram uma

ausência de efeito na viabilidade celular (UKAJI *et al.*, 2017). Porém, observa-se que ao passo que aumenta o diâmetro, muda a morfologia aumentando a esfericidade, um parâmetro essencial para avaliar a integridade do esferoide. A alta expressão e ativação de NF- κ B em esferoides já foi correlacionada com a manutenção da integridade por meio da regulação da expressão de *ICAM1* e *CTGF*, relacionados com ancoragem, adesão e produção de matriz extracelular (ARNOTT *et al.*, 2011; KOPP *et al.*, 2018). Além disso, NF- κ B é fundamental para a manutenção da viabilidade em condição de baixa adesão (como ocorre em cultivos 3D), prevenindo a morte por *anoikis* (HOUSE *et al.*, 2018). Assim, a inibição da ativação de NF- κ B por DHMEQ, DTCM-g e SEMBL em esferoides de SE deve desencadear uma desagregação e perda de viabilidade celular, causando a perda de integridade observada.

Assim, considerando o exposto acima, pode-se dizer, de um modo geral, que a inibição de NF- κ B por meio de DHMEQ, DTCM-g e SEMBL se mostra promissora no tratamento de SE. Porém, é importante destacar que cada um dos inibidores apresentou efeitos distintos, seja em intensidade ou em tipo de efeito (aumento, redução ou falta de efeito), sendo o mais eficiente dentre eles o SEMBL. De acordo com SIDTHIPONG *et al.* (2017), o principal mecanismo de ação deste inibidor é impedir a ligação de p65 ao DNA, sendo p65 a principal subunidade ativada na via canônica do NF- κ B e uma das responsáveis por atuar em todos os *hallmarks* do câncer (PARK, M. H.; HONG, 2016; SIDTHIPONG *et al.*, 2017; XIA, Y.; SHEN; VERMA, 2014). Também reportamos possíveis novos mecanismos de ação, como inibição da translocação nuclear de p65 e redução da expressão gênica de *RELA*, *RELB* e *NFKB1*. Assim, levando em consideração a ação multivalente deste inibidor, o fato de *RELA* e *NFKB1* apresentarem uma grande relevância na tumorigênese de SE, como relatado nos dados *in silico*, e o fato do SEMBL ser mais estável que o DHMEQ (SIDTHIPONG *et al.*, 2017), não é surpreendente que o SEMBL se mostre o mais eficaz.

O DHMEQ por sua vez, se mostrou o segundo mais eficaz de acordo com os parâmetros analisados. Já foi reportado que este inibidor tem como principal mecanismo de ação inibir a translocação nuclear e a ligação ao DNA das subunidades p65, p50, RelB e Rel (FUKUSHIMA *et al.*, 2012; KATSMAN; UMEZAWA; BONAVIDA, 2007). De forma, similar ao que ocorre com o SEMBL, o DHMEQ possui uma atuação ampla na via do NF- κ B, favorecendo a sua utilização como quimioterápico. Porém, não se

observou uma redução de p65 no núcleo ou uma redução significativa na expressão de *RELA*, *RELB* e *NFKB1*, observou-se apenas um aumento no acúmulo de p65 no citoplasma. Apesar disso, seu efeito sobre a viabilidade, a morte, a migração, a esfericidade em modelo 3D e a expressão gênica das células TC-32 leva a supor que nestas células, o DHMEQ possa estar atuando através da inibição da ligação de p65 ao DNA, como já foi reportado em outros estudos (WATANABE *et al.*, 2005a; YAMAMOTO *et al.*, 2008).

Por fim, o DTCM-g, que se mostrou menos eficaz em comparação aos demais inibidores, tem como mecanismo de ação reportado apenas a capacidade de diminuir a expressão proteica de RelB (KUBOKI *et al.*, 2015), o que poderia explicar a baixa eficácia visto que *RELB* não aparenta ser muito relevante para a tumorigênese do SE segundo as análises *in silico*. Porém, é importante destacar que no presente estudo reportamos possíveis novos mecanismos de ação deste inibidor, como a capacidade de modular a expressão de *NFKB1* e impedir a translocação nuclear de p65.

Esta diferença no mecanismo de ação entre inibidores tem suas vantagens no seu uso como quimioterápico. Nos últimos anos notou-se que dentro de um mesmo tipo tumoral há uma grande heterogeneidade molecular, dificultando a utilização de um mesmo protocolo de tratamento para todos os casos de um determinado tipo tumoral (FISHER; PUSZTAI; SWANTON, 2013). Por outro lado, entender esta heterogeneidade permite estratificar, classificar e promover um tratamento personalizado. Em SE já foi relatado que dependendo do *status* da translocação *EWSR1-FLI1* o tumor pode ser mais ou menos agressivo (FRANZETTI *et al.*, 2017), o que também pode ser extrapolado para o NF-κB. Como mostrado nas análises *in silico*, cada subunidade apresenta uma importância diferente para a tumorigênese do SE. Desta forma, entender melhor o papel da via do NF-κB e o seu potencial como alvo terapêutico, como realizado no presente estudo, tem grande relevância para a comunidade científica e um grande potencial para melhorar a sobrevida e a qualidade de vida de pacientes acometidos por SE.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A via do NF- κ B de um modo geral se apresenta como um bom alvo terapêutico em Sarcoma de Ewing como observado nas análises *in silico*. A inibição de diferentes subunidades da via do NF- κ B por meio DHMEQ, DTCM-g e SEMBL leva à uma redução na viabilidade e da motilidade celular, um aumento na morte celular, é capaz de alterar a dinâmica do ciclo celular e perturbar a integridade de esferoides em modelo 3D, além de ter potencial sinérgico com doxorubicina e alterar a expressão de genes alvos. Porém, houve uma diferença nos efeitos observados após a inibição entre os inibidores. O SEMBL se mostrou o mais eficaz em inibir a via do NF- κ B, levando à resultados melhores nos ensaios funcionais realizados, provavelmente por conta do seu mecanismo de ação e/ou maior afinidade e estabilidade. Desta forma, são necessários mais estudos utilizando outros modelos para compreender melhor o papel da inibição de NF- κ B como uma terapia alternativa ou adjuvante em SE.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABATE, F. *et al.* A novel patient-derived tumorgraft model with TRAF1-ALK anaplastic large-cell lymphoma translocation. **Leukemia**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 1390–1401, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/leu.2014.347>
- AGGARWAL, Bharat B. Nuclear factor- κ B : The enemy within. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 6, p. 203–208, 2004.
- AHMAD, Anas; AHSAN, Haseeb. Ras-Mediated Activation of NF- κ B and DNA Damage Response in Carcinogenesis. **Cancer Investigation**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 185–208, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07357907.2020.1721523>
- ALKALAY, I *et al.* In vivo stimulation of I kappa B phosphorylation is not sufficient to activate NF-kappa B. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 1294–1301, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mcb.15.3.1294>
- ANA CAROLINA FREITAS SILVEIRA SOBRAL PAIXÃO *et al.* **PROTOCOLO ESTADUAL DE Quimioterapia Antineoplásica**. 1ªed. Aracaju - SE: [s. n.], 2016. v. III
- ANDELA, Valentine B. *et al.* Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor κ B. **Cancer Research**, [s. l.], v. 60, n. 23, p. 6557–6562, 2000.
- ARNOTT, John A. *et al.* The Role of Connective Tissue Growth Factor (CTGF/CCN2) in Skeletogenesis. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 43, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1615/CRITREVEUKARGENEEXPR.V21.I1.40>. Acesso em: 9 jun. 2022.
- ARTIMO, Panu *et al.* ExpASy: SIB bioinformatics resource portal. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 40, n. W597–W603, p. 597–603, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gks400>
- BACCI, Gaetano *et al.* Therapy and survival after recurrence of Ewing’s tumors: The Rizzoli experience in 195 patients treated with adjuvant and neoadjuvant chemotherapy from 1979 to 1997. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 14, p. 1654–1659, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdg457>
- BALDWIN, Albert S. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 107, n. 3, p. 241–246, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI11991>

- BARBOSA, Maria Letícia de Castro *et al.* NF- κ B Signaling Pathway Inhibitors as Anticancer Drug Candidates. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 17, p. 483–490, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1871520616666160729112854>
- BARGOU, R C *et al.* Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin ' s disease tumor cells . **The Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 100, n. 12, p. 2961–2969, 1997.
- BARON, Frédéric *et al.* Leukemic target susceptibility to natural killer cytotoxicity : relationship with BCR-ABL expression. **Immunology**, [s. l.], v. 99, n. 6, p. 2107–2114, 2002.
- BEDNARSKI, Brian K.; BALDWIN, Albert S.; KIM, Hong Jin. Addressing Reported Pro-Apoptotic Functions of NF- κ B: Targeted Inhibition of Canonical NF- κ B Enhances the Apoptotic Effects of Doxorubicin. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. e6992, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0006992>. Acesso em: 15 jun. 2022.
- BEG, A. A. *et al.* I κ B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF- κ B: A mechanism for cytoplasmic retention. **Genes and Development**, [s. l.], v. 6, n. 12 B, p. 2664–2665, 1992.
- BENTIRES-ALJ, Mohamed *et al.* NF- κ B transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. **Oncogene 2003 22:1**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 90–97, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206056>. Acesso em: 7 jun. 2022.
- BERTOLOTTI, Anne *et al.* hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 15, n. 18, p. 5022, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00882.x>. Acesso em: 13 jun. 2022.
- BIRCH, J M; MARSDEN, H B. A classification system for childhood cancer. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 40, p. 620–624, 1987.
- BOURS, Vincent *et al.* Cloning of a mitogen-inducible gene encoding a κ B DNA-binding protein with homology to the rel oncogene and to cell-cycle motifs. **Nature**, [s. l.], v. 348, n. 6296, p. 76–80, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/348076a0>
- BRASSESCO, M. S. *et al.* Inhibition of NF- κ B by Dehydroxymethylepoxyquinomicin Suppresses Invasion and Synergistically Potentiates Temozolomide and γ -Radiation

- Cytotoxicity in Glioblastoma Cells. **Chemotherapy Research and Practice**, [s. l.], v. 2013, p. 1–16, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/593020>
- BRASSESCO, Maria S. *et al.* Cytostatic in vitro Effects of DTCM-Glutarimide on Bladder Carcinoma Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 1957–1962, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.5.1957>
- BRASSESCO, María Sol *et al.* Activator Protein-1 Inhibition by 3-[(Dodecylthiocarbonyl)Methyl]-Glutamaride Impairs Invasion and Radiosensitizes Osteosarcoma Cells In Vitro . **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 351–358, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/cbr.2012.1305>
- BROWN, Hannah K *et al.* Biology of Bone Sarcomas and New Therapeutic Developments. **Calcified Tissue International**, [s. l.], v. 102, n. 2, p. 174–195, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0372-2>
- BURKITT, M. D. *et al.* Signaling mediated by the NF- κ B sub-units NF- κ B1, NF- κ B2 and c-Rel differentially regulate *Helicobacter felis*-induced gastric carcinogenesis in C57BL/6 mice. **Oncogene** 2013 32:50, [s. l.], v. 32, n. 50, p. 5563–5573, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2013.334>. Acesso em: 26 maio 2022.
- BURKITT, Michael D. *et al.* NF- κ B1, NF- κ B2 and c-Rel differentially regulate susceptibility to colitis-associated adenoma development in C57BL/6 mice. **The Journal of Pathology**, [s. l.], v. 236, n. 3, p. 326–336, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/PATH.4527>. Acesso em: 26 maio 2022.
- CANDIDO, M. F. *et al.* NF- κ B inhibition by DHMEQ: in vitro antiproliferative effects on pilocytic astrocytoma and concise review of the current literature. **Child's Nervous System**, [s. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00381-020-04625-3>
- CASTRO-GAMERO, Angel Mauricio *et al.* Inhibition of nuclear factor- κ B by dehydroxymethylepoxyquinomicin induces schedule-dependent chemosensitivity to anticancer drugs and enhances chemoinduced apoptosis in osteosarcoma cells. **Anti-Cancer Drugs**, [s. l.], v. 23, p. 638–650, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e328350e835>
- CELEGATO, Marta *et al.* The NF- κ B inhibitor DHMEQ decreases survival factors, overcomes the protective activity of microenvironment and synergizes with chemotherapy agents in classical Hodgkin lymphoma. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 349, p. 26–34, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.03.030>

CHEN, F.; CASTRANOVA, V.; SHI, X. New Insights into the Role of Nuclear Factor- κ B in Cell Growth Regulation. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 159, n. 2, p. 387, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61708-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61708-7). Acesso em: 1 jun. 2022.

CHEN, Fei *et al.* Opposite Effect of NF- κ B and c-Jun N-terminal Kinase on p53-independent GADD45 Induction by Arsenite. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 276, n. 14, p. 11414–11419, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M011682200>

CHERRY, Evan M. *et al.* Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) promotes glioma cell invasion through induction of NF- κ B-inducing kinase (NIK) and noncanonical NF- κ B signaling. **Molecular Cancer**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–13, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12943-014-0273-1>

CHOU, Ting-chao Chao; TALALAY, Paul. Quantitative Analysis of Dose-effect Relationships: The Combined Effects of Multiple Drugs or Enzyme Inhibitors. **Advances in Enzyme Regulation**, [s. l.], v. 22, n. C, p. 27–55, 1984. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0065-2571(84)90007-4)

CONCETTI, Julia; WILSON, Caroline L. NFKB1 and Cancer: Friend or Foe? **Cells**, [s. l.], v. 7, n. 9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/CELLS7090133>. Acesso em: 26 maio 2022.

DAMRON, Timothy A; WARD, William G; STEWART, Andrew. Osteosarcoma , Chondrosarcoma , and Ewing ' s Sarcoma. [s. l.], n. 459, p. 40–47, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/BLO.0b013e318059b8c9>

DASGUPTA, Atreyi *et al.* Metabolic modulation of Ewing sarcoma cells inhibits tumor growth and stem cell properties. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 44, p. 77292–77308, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20467>

DEJARDIN, Emmanuel. The alternative NF- κ B pathway from biochemistry to biology: Pitfalls and promises for future drug development. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 72, p. 1161–1179, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.08.007>

DJAVAHERI-MERGNY, Mojgan *et al.* NF- κ B activation prevents apoptotic oxidative stress via an increase of both thioredoxin and MnSOD levels in TNF α -treated Ewing sarcoma cells. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 578, p. 111–115, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.082>

DJAVAHERI-MERGNY, Mojgan *et al.* NF- κ B Activation Represses Tumor Necrosis Factor- α -induced Autophagy *. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 281, n. 41, p. 30373–30382, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/JBC.M602097200>. Acesso em: 30 maio 2022.

DOUEDI, Steven; CARSON., Michael P. **Anthracycline Medications (Doxorubicin) - StatPearls - NCBI Bookshelf**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551633/>. Acesso em: 7 jun. 2022.

ENDO-MUNOZ, Liliana *et al.* Progression of Osteosarcoma from a Non- Metastatic to a Metastatic Phenotype Is Causally Associated with Activation of an Autocrine and Paracrine uPA Axis. **PLOS ONE**, [s. l.], p. 1–22, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133592>

FEINMAN, By Rena *et al.* Role of NF- κ B in the Rescue of Multiple Myeloma Cells From Glucocorticoid-Induced Apoptosis by Bcl-2. **Blood Journal**, [s. l.], v. 93, n. 9, p. 3044–3052, 1999.

FISHER, R.; PUSZTAI, L.; SWANTON, C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. **British Journal of Cancer** 2013 108:3, [s. l.], v. 108, n. 3, p. 479–485, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.581>. Acesso em: 10 jun. 2022.

FONG, Abraham; SUN, Shao Cong. Genetic evidence for the essential role of β -transducin repeat-containing protein in the inducible processing of NF- κ B2/p100. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 25, p. 22111–22114, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.C200151200>

FRANKEN, Nicolaas A.P. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 1(5), p. 2315–2319, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>

FRANZETTI, G. A. *et al.* Cell-to-cell heterogeneity of EWSR1-FLI1 activity determines proliferation/migration choices in Ewing sarcoma cells. **Oncogene**, [s. l.], v. 36, n. 25, p. 3505–3514, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2016.498>

FRIEDMANN-MORVINSKI, Dinorah *et al.* Targeting NF- κ B in glioblastoma: A therapeutic approach. **Science Advances**, [s. l.], v. 2, n. 1, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501292>

FUKUSHIMA, Tsuyoshi *et al.* Antitumor effect of dehydroxymethylepoxyquinomicin, a small molecule inhibitor of nuclear factor- κ B, on glioblastoma. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 14, p. 19–28, 2012.

GAEBLER, Manuela *et al.* Three-Dimensional Patient-Derived In Vitro Sarcoma Models: Promising Tools for Improving Clinical Tumor Management. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 7, n. September, p. 1–14, 2017. Disponível em:

<https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00203>

GHOSH, Sankar *et al.* Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF- κ B: Homology to rel and dorsal. **Cell**, [s. l.], v. 62, n. 5, p. 1019–1029, 1990. Disponível em:

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90276-K](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90276-K)

GHOSH, Sankar; HYDEN, Matthew S. Celebrating 25 years of ideas. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 49, n. 70, p. 10–11, 2012.

GILAD, Yosi *et al.* Drug Combination in Cancer Treatment—From Cocktails to Conjugated Combinations. **Cancers 2021, Vol. 13, Page 669**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 669, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/CANCERS13040669>. Acesso em: 7 jun. 2022.

GILMORE, T. D.; HERSCOVITCH, M. Inhibitors of NF- κ B signaling: 785 and counting.

Oncogene, [s. l.], v. 25, n. 51, p. 6887–6899, 2006. Disponível em:

<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209982>

GÖRANSSON, M. *et al.* The myxoid liposarcoma FUS-DDIT3 fusion oncoprotein deregulates NF- κ B target genes by interaction with NFKBIZ. **Oncogene**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 270–278, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2008.378>. Acesso em: 20 abr. 2021.

GRIER, Holcombe E. *et al.* Addition of Ifosfamide and Etoposide to Standard Chemotherapy for Ewing's Sarcoma and Primitive Neuroectodermal Tumor of Bone.

New England Journal of Medicine, [s. l.], v. 348, n. 8, p. 694–701, 2003. Disponível em:

<https://doi.org/10.1056/nejmoa020890>. Acesso em: 21 abr. 2021.

GRIFFIN, James D. Leukemia stem cells and constitutive activation of NF- κ B. **Blood**, [s. l.], v. 98, n. 8, p. 2291, 2001. Disponível em:

<https://doi.org/10.1182/blood.V98.8.2291a>

GRÜNEWALD, Thomas G.P. *et al.* Ewing sarcoma. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 4, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0003-x>

GUTIERREZ, Humberto *et al.* NF- κ B signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS. **Development**, [s. l.], v. 132, n. 7, p. 1713–1726, 2005.

Disponível em: <https://doi.org/10.1242/dev.01702>

- HABIB, Aryn A *et al.* The Epidermal Growth Receptor Engages Receptor Interacting Protein and Nuclear Factor- κ B (NF- κ B)-inducing Kinase to Activate NF- κ B. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 276, n. 12, p. 8865–8874, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M008458200>
- HAN, Yuan-ping *et al.* TNF- α stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF- κ B mediated induction of MT1-MMP. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 114, p. 131–139, 2000.
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [s. l.], v. 144, p. 646–674, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>. Acesso em: 7 jun. 2017.
- HANSEN, Stig K *et al.* A novel complex between the p65 subunit of NF- κ B and c-Rel binds to a DNA element involved in the phorbol ester induction of the human urokinase gene. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 205–213, 1992.
- HOUSE, Carrie D. *et al.* IKK ϵ cooperates with either MEK or non-canonical NF- κ B driving growth of triple-negative breast cancer cells in different contexts. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–13, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/S12885-018-4507-2/FIGURES/6>. Acesso em: 9 jun. 2022.
- HOWLADER, N *et al.* **Cancer Statistics Review, 1975-2018 - SEER Statistics**. [S. l.], 2021. Disponível em: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/. Acesso em: 20 abr. 2021.
- HSIEH, Shu-Ching *et al.* Metformin inhibits the invasion of human hepatocellular carcinoma cells and enhances the chemosensitivity to sorafenib through a downregulation of the ERK / JNK - mediated NF - κ B - dependent pathway that reduces uPA and MMP - 9 expression. **Amino Acids**, [s. l.], v. 46, p. 2809–2822, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1838-4>
- HU, Xi Min *et al.* Guidelines for Regulated Cell Death Assays: A Systematic Summary, A Categorical Comparison, A Prospective. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 9, p. 368, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.634690/BIBTEX>
- IKEGAMI, Amanda *et al.* Knockdown of NF- κ B1 by shRNA Inhibits the Growth of Renal Cell Carcinoma In Vitro and In Vivo. **Oncology Research**, [s. l.], v. 26, p. 743–751, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3727/096504017X15120379906339>. Acesso em: 23 maio 2022.

- INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: [s. n.], 2017.
- INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: [s. n.], 2019.
- ISHIKAWA, Yuichi *et al.* Synthesis and biological evaluation on novel analogs of 9-methylstreptimidone, an inhibitor of NF- κ B. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 19, p. 1726–1728, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.01.107>
- IUS, Tamara *et al.* An NF- κ B signature predicts low-grade glioma prognosis: A precision medicine approach based on patient-derived stem cells. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 776–787, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox234>
- JAVELAUD, D.; BESANÇON, F. NF- κ B activation results in rapid inactivation of JNK in TNF α -treated Ewing sarcoma cells: A mechanism for the anti-apoptotic effect of NF- κ B. **Oncogene**, [s. l.], v. 20, n. 32, p. 4365–4372, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204570>. Acesso em: 21 abr. 2021.
- JAVELAUD, Delphine *et al.* Induction of p21 Waf1 / Cip1 by TNF α requires NF- κ B activity and antagonizes apoptosis in Ewing tumor cells. **Oncogene**, [s. l.], v. 19, p. 61–68, 2000a.
- JAVELAUD, Delphine *et al.* Induction of p21(Waf1/Cip1) by TNF α requires NF- κ B activity and antagonizes apoptosis in Ewing tumor cells. **Oncogene**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 61–68, 2000b. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203246>. Acesso em: 21 abr. 2021.
- JAVELAUD, Delphine *et al.* Inhibition of constitutive NF- κ B activity supresses tumorigenicity of Ewing Sarcoma EW7 cells. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 98, p. 193–198, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.10192>
- JAVELAUD, Delphine; BESANLON, François. NF- κ B activation results in rapid inactivation of JNK in TNF α -treated Ewing sarcoma cells : a mechanism for the anti-apoptotic effect of NF- κ B. **Oncogene**, [s. l.], v. 20, p. 4365–4372, 2001.
- JUERGENS, Christine *et al.* Safety assessment of intensive induction with vincristine, ifosfamide, doxorubicin, and etoposide (VIDE) in the treatment of ewing tumors in the

- EURO-E.W.I.N.G. 99 Clinical Trial. **Pediatric Blood and Cancer**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 22–29, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pbc.20820>. Acesso em: 21 abr. 2021.
- KARIN, Michael. How NF- κ B is activated : the role of the I κ B kinase (IKK) complex. **Oncogene**, [s. l.], v. 18, p. 6867–6874, 1999.
- KATSMAN, Alina; UMEZAWA, Kazuo; BONAVIDA, Benjamin. Reversal of resistance to cytotoxic cancer therapies: DHMEQ as a chemo-sensitizing and immuno-sensitizing agent. **Drug Resistance Updates**, [s. l.], v. 10, p. 1–12, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2007.01.002>
- KAWAGUCHI, Makiko *et al.* Inhibition of nuclear factor- κ B signaling suppresses Spint1-deletion-induced tumor susceptibility in the ApcMin/+ model. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, p. 68614–68622, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11863>
- KHANDELWAL, N. *et al.* Nucleolar NF- κ B/RelA mediates apoptosis by causing cytoplasmic relocation of nucleophosmin. **Cell Death & Differentiation 2011 18:12**, [s. l.], v. 18, n. 12, p. 1889–1903, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.79>. Acesso em: 30 maio 2022.
- KIERAN, Mark *et al.* The DNA binding subunit of NF- κ B is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product. **Cell**, [s. l.], v. 62, n. 5, p. 1007–1018, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90275-J](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90275-J)
- KOPP, Sascha *et al.* The role of NF κ B in spheroid formation of human breast cancer cells cultured on the Random Positioning Machine. **Scientific Reports 2018 8:1**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–17, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18556-8>. Acesso em: 9 jun. 2022.
- KOZAKAI, N. *et al.* Enhancement of radiosensitivity by a unique novel NF-B inhibitor, DHMEQ, in prostate cancer. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 107, p. 652–657, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.321>
- KRAVTSOVA-IVANTSIV, Yelena *et al.* KPC1-mediated ubiquitination and proteasomal processing of nf-kb1 p105 to p50 restricts tumor growth. **Cell**, [s. l.], v. 161, n. 2, p. 333–347, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.03.001/ATTACHMENT/82E70E2B-BB9F-42CF-B058-252CA212983E/MMC3.PDF>. Acesso em: 26 maio 2022.
- KUBOKI, Mizuki *et al.* Activation of apoptosis by caspase-3-dependent specific RelB cleavage in anticancer agent-treated cancer cells: Involvement of positive feedback

- mechanism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 456, n. 3, p. 810–814, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.12.024>
- KUMAR, Arvind *et al.* Cytotoxicity of Tumor Necrosis Factor related apoptosis-inducing ligand towards Ewing's sarcoma cell lines. **Oncogene**, [s. l.], v. 20, p. 1010–1014, 2001.
- LAGIRAND-CANTALOUBE, Julie *et al.* EWS-FLI1 inhibits TNF α -induced NF κ B-dependent transcription in Ewing sarcoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 399, n. 4, p. 705–710, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2010.08.004>
- LAMPIASI, Nadia *et al.* The novel NF- κ B inhibitor DHMEQ synergizes with celecoxib to exert antitumor effects on human liver cancer cells by a ROS-dependent mechanism. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 322, p. 35–44, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.02.008>
- LECOQ, Lauriane *et al.* Structural characterization of interactions between transactivation domain 1 of the p65 subunit of NF- κ B and transcription regulatory factors. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 45, n. 9, p. 5564, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/NAR/GKX146>. Acesso em: 13 jun. 2022.
- LESSNICK, Stephen L.; KOWALEWSKI, Ashley A.; RANDALL, R. Lor. Cell Cycle Deregulation in Ewing's Sarcoma Pathogenesis. **Sarcoma**, [s. l.], v. 2011, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2011/598704>. Acesso em: 1 jun. 2022.
- LI, Eliza *et al.* Modeling Ewing sarcoma tumors in vitro with 3D scaffolds. **PNAS**, [s. l.], v. 110, n. 16, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1221403110>
- LI, Hai; CHEN, Chen. Quercetin Has Antimetastatic Effects on Gastric Cancer Cells via the Interruption of uPA / uPAR Function by Modulating NF- κ B. **Investigative Cancer Therapies**, [s. l.], v. 17(2), p. 511–523, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1534735417696702>
- LI, Liren *et al.* Epithelial-specific ETS-1 (ESE1/ELF3) regulates apoptosis of intestinal epithelial cells in ulcerative colitis via accelerating NF- κ B activation. **Immunologic Research**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 198–212, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12026-015-8651-3>. Acesso em: 20 abr. 2021.
- LI, Yinghui *et al.* Non-canonical NF- κ B signalling and ETS1/2 cooperatively drive C250T mutant TERT promoter activation. **Nature Cell Biology** 2015 17:10, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 1327–1338, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncb3240>. Acesso em: 13

jun. 2022.

LI, Zhi Wei *et al.* The IKK β subunit of I κ B kinase (IKK) is essential for nuclear factor κ B activation and prevention of apoptosis. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 189, n. 11, p. 1839–1845, 1999. Disponível em:

<https://doi.org/10.1084/jem.189.11.1839>

LIANG, Chunyang; ZHANG, Minying; SUN, Shao Cong. β -TrCP binding and processing of NF- κ B2/p100 involve its phosphorylation at serines 866 and 870. **Cellular Signalling**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 1309–1317, 2006. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.10.011>

LIN, Ann; SHELTER, Jason M. Discovering and validating cancer genetic dependencies: approaches and pitfalls. **Nature Reviews Genetics** 2020 21:11, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 671–682, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0247-7>. Acesso em: 26 maio 2022.

LING, Lei; CAO, Zhaodan; GOEDDEL, David V. Nf- κ B-inducing kinase activates IKK- α by phosphorylation of Ser-176. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 95, n. 7, p. 3792–3797, 1998. Disponível em:

<https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3792>

LIONTAS, Aristotle; YEGER, Herman. Curcumin and Resveratrol Induce Apoptosis and Nuclear Translocation and Activation of p53 in Human Neuroblastoma. [s. l.], v. 998, p. 987–998, 2004.

LIU, Tao *et al.* Association between NF- κ B expression and drug resistance of liver cancer. **Oncology Letters**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1030–1034, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.3892/OL.2018.9640/HTML>. Acesso em: 7 jun. 2022.

LU, Ko-hsiu *et al.* 3-Hydroxy flavone inhibits human osteosarcoma U2OS and 143B cells metastasis by affecting EMT and repressing u-PA / MMP-2 via FAK-Src to MEK / ERK and RhoA / MLC2 pathways and reduces 143B tumor growth in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 97, p. 177–186, 2016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.09.006>

LUO, Jun Li; KAMATA, Hideaki; KARIN, Michael. IKK/NF- κ B signaling: balancing life and death – a new approach to cancer therapy. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 115, n. 10, p. 2625, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI26322>. Acesso em: 23 maio 2022.

- LUO, Yiliao *et al.* PELP1 signaling contributes to medulloblastoma progression by regulating the NF- κ B pathway. **Molecular Carcinogenesis**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 281–292, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mc.23152>
- MADDIKA, Subbareddy *et al.* Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancer therapy. **Drug Resistance Updates**, [s. l.], v. 10, n. 1–2, p. 13–29, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2007.01.003>
- MATHIEU, Julie; BESANÇON, Françoise. Clinically tolerable concentrations of arsenic trioxide induce p53-independent cell death and repress NF- κ B activation in Ewing sarcoma cells. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 119, n. 7, p. 1723–1727, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/IJC.21970>. Acesso em: 30 maio 2022.
- MATSUMOTO, Naoki *et al.* Epoxyquinomicins A, B, C and D, New Antibiotics from Amycolatopsis I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Antimicrobial Activities. **The Journal of Antibiotics**, [s. l.], v. 50, p. 900–905, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.7164/antibiotics.50.900>
- MEDEIROS, Mariana *et al.* The multifaceted NF- κ B: are there still prospects of its inhibition for clinical intervention in pediatric central nervous system tumors? **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03906-7>
- MEFFERT, Mollie K. *et al.* NF- κ B functions in synaptic signaling and behavior. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 6, n. 10, p. 1072–1078, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nn1110>
- MERCURIO, Frank *et al.* IKK-1 and IKK-2: Cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. **Science**, [s. l.], v. 278, n. 5339, p. 860–866, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.278.5339.860>
- MERCURIO, Frank *et al.* Molecular Cloning and Characterization of a Novel Rel/NF- χ B Family Member Displaying Structural and Functional Homology to NF- χ B p50/p105. **DNA and Cell Biology**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 523–537, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/dna.1992.11.523>
- MERCURIO, Frank *et al.* p105 and p98 precursor protein play an active role in NF- κ B-mediated signal transduction. **Genes and Development**, [s. l.], v. 7, p. 705–718, 1993.
- MEYER, R. *et al.* Cloning of the DNA-binding subunit of human nuclear factor κ B: The level of its mRNA is strongly regulated by phorbol ester or tumor necrosis factor α .

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 966–970, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.88.3.966>
- MIYAMOTO, Shigeki; VERMA, Inder M. REL/NF- κ B/I κ B Story. **Advances in Cancer Research**, [s. l.], v. 66, p. 255–292, 1995.
- MOREAU, Marie; MOURAH, Samia; DOSQUET, Christine. Beta-Catenin and NF- κ B cooperate to regulate the uPA/uPAR system in cancer cells. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 1292, p. 1280–1292, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.25455>
- MORTEZAEI, Keywan *et al.* NF- κ B targeting for overcoming tumor resistance and normal tissues toxicity. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 234, n. 10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.28504>
- MUKHERJEE, Neelam *et al.* To be an ally or an adversary in bladder cancer: the NF- κ B story has not unfolded. **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 299–306, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGU321>. Acesso em: 26 maio 2022.
- NAKSHATRI, Harikrishna *et al.* Constitutive Activation of NF- κ B during Progression of Breast Cancer to Hormone-Independent Growth. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 17, n. 7, p. 3629–3639, 1997.
- NAUMANN, M.; WULCZYN, F.G.; SCHEIDEREIT, C. The NF- κ B precursor p105 and the proto-oncogene product Bcl-3 are I κ B molecules and control nuclear translocation of NF- κ B. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 213–222, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05647.x>
- PALAYOOR, S T *et al.* Constitutive activation of I κ B kinase α and NF- κ B in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. **Oncogene**, [s. l.], v. 18, p. 7389–7394, 1999.
- PAPPO, Alberto (Editor). **Pediatric Bone and Soft Tissue Sarcoma - Pediatric Oncology**. Berlin: [s. n.], 2006.
- PARK, Cheol *et al.* Induction of G2/M cell cycle arrest and apoptosis by genistein in human bladder cancer T24 cells through inhibition of the ROS-dependent PI3k/Akt signal transduction pathway. **Antioxidants**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 1–14, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox8090327>
- PARK, Mi Hee; HONG, Jin Tae. Roles of NF- κ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. **Cells**, [s. l.], v. 5, n. 2, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/CELLS5020015>. Acesso em: 10 jun. 2022.

PARKER, Matthew *et al.* C11orf95-RELA fusions drive oncogenic NF- κ B signalling in ependymoma. **Nature**, [s. l.], v. 506, n. 7489, p. 451–455, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature13109>

PARRONDO, Ricardo *et al.* NF- κ B activation enhances cell death by antimetabolic drugs in human prostate cancer cells. **Molecular Cancer**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–13, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-182/FIGURES/10>. Acesso em: 7 jun. 2022.

PDQ® PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD. PDQ EWING SARCOMA TREATMENT. BETHESDA, MD: NATIONAL CANCER INSTITUTE. [s. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/bone/hp/ewing-treatment-pdq>. Acesso em: 21 abr. 2021.

PICCININI, Filippo. AnaSP: A software suite for automatic image analysis of multicellular spheroids. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, [s. l.], v. 119, n. 1, p. 43–52, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CMPB.2015.02.006>

PIETSCH, Torsten *et al.* Supratentorial ependymomas of childhood carry C11orf95-RELA fusions leading to pathological activation of the NF- κ B signaling pathway. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], v. 127, n. 4, p. 609–611, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1264-4>

PIRES, Bruno R.B. *et al.* NF-kappaB is involved in the regulation of EMT genes in breast cancer cells. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, p. 1–20, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169622>

PRESCOTT, Jack A.; MITCHELL, Jennifer P.; COOK, Simon J. Inhibitory feedback control of NF- κ B signalling in health and disease. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 478, n. 13, p. 2619–2664, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BCJ20210139>. Acesso em: 27 maio 2022.

RAHMAN, A *et al.* **Comparative pharmacokinetics of free doxorubicin and doxorubicin entrapped in cardiolipin liposomes**. [s. l.], 1986. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3697976/>. Acesso em: 7 jun. 2022.

RAJASINGHE, Lichchavi D; PINDIPROLU, Rohini H; GUPTA, Smiti Vaid. Delta-tocotrienol inhibits non-small-cell lung cancer cell invasion via the inhibition of NF- κ B , uPA activator , and MMP-9. **OncoTargets and Therapy**, [s. l.], v. 11, p. 4301–4314, 2018.

RAMOS, Priscila M.M. *et al.* Antineoplastic Effects of NF- κ B Inhibition by DHMEQ

- (Dehydroxymethylepoxyquinomicin) Alone and in Co-treatment with Radio-and Chemotherapy in Medulloblastoma Cell Lines. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 541–549, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1871520617666171113151335>. Acesso em: 22 abr. 2021.
- RANJAN SEN; DAVID BALTIMORE. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell**, [s. l.], v. 46, p. 705–716, 1986.
- RATTANAPORN SOMPONG, Khanti *et al.* Impaired G2/M cell cycle arrest induces apoptosis in pyruvate carboxylase knockdown MDA-MB-231 cells. **Biochemistry and Biophysics Reports**, [s. l.], v. 25, p. 100903, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BBREP.2020.100903>
- REDINI, Françoise; HEYMANN, Dominique. Bone tumor environment as a potential therapeutic target in ewing sarcoma. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 5, n. DEC, p. 1–11, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00279>
- RICE, N. R.; MACKICHAN, M. L.; ISRAËL, A. The precursor of NF- κ B p50 has I κ B-like functions. **Cell**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 243–253, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90353-E](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90353-E)
- RIFFLE, Stephen *et al.* Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–12, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3319-0>
- RIGGI, Nicolò; SUVÀ, Mario L.; STAMENKOVIC, Ivan. Ewing's Sarcoma. **The New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 384;2, p. 154–164, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMra2028910>
- ROBERTO, Gabriela Molinari *et al.* DTCM-glutarimide Delays Growth and Radiosensitizes Glioblastoma. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 1323–1329, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1871520618666180423105740>
- ROFF, Marilyn *et al.* Role of I κ B α ubiquitination in signal-induced activation of NF- κ B in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 271, n. 13, p. 7844–7850, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.13.7844>
- RUBEN, Steven M. *et al.* Isolation of a rel-related human cDNA that potentially encodes the 65-kD subunit of NF- κ B. **Science**, [s. l.], v. 251, n. 5000, p. 1490–1493, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.2006423>

RYSECK, Rolf-Peter *et al.* New Rel Family Transcription Activator That Can Interact with p50-NF- κ B. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 674–684, 1992.

SANCÉAU, Josiane *et al.* Interferons Inhibit Tumor Necrosis Factor- α -mediated Matrix Metalloproteinase-9 Activation via Interferon Regulatory Factor-1 Binding Competition with NF- κ B. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 38, p. 35766–35775, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M202959200>

SANDBERG, Avery A; BRIDGE, Julia A. Updates on cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors : Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, [s. l.], v. 123, p. 1–26, 2000.

SARTORI, Giulio *et al.* ASB2 is a direct target of FLI1 that sustains NF- κ B pathway activation in germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 40, p. 357, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02159-3>. Acesso em: 13 jun. 2022.

SATO, Masanori *et al.* Anoikis Induction and Inhibition of Peritoneal Metastasis of Pancreatic Cancer Cells by a Nuclear Factor- κ B Inhibitor, (-)-DHMEQ. **Oncology Research**, [s. l.], v. 21, p. 333–343, 2014a. Disponível em:

<https://doi.org/10.3727/096504014X14024160459249>. Acesso em: 19 abr. 2021.

SATO, Masanori *et al.* Anoikis Induction and Inhibition of Peritoneal Metastasis of Pancreatic Cancer Cells by a Nuclear Factor- κ B Inhibitor, (-)-DHMEQ. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, [s. l.], v. 21, p. 333–343, 2014b. Disponível em: <https://doi.org/10.3727/096504014x14024160459249>

SAVOLA, Suvi *et al.* High Expression of Complement Component 5 (C5) at Tumor Site Associates with Superior Survival in Ewing’s Sarcoma Family of Tumour Patients . **ISRN Oncology**, [s. l.], v. 2011, p. 1–10, 2011. Disponível em:

<https://doi.org/10.5402/2011/168712>

SCHEINMAN, R I; BEG, A A; BALDWIN, A S. NF- κ B p100 (Lyt-10) is a component of H2TF1 and can function as an I κ B-like molecule. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 6089–6101, 1993. Disponível em:

<https://doi.org/10.1128/mcb.13.10.6089>

SCHERER, D. C. *et al.* Signal-induced degradation of I κ B α requires site-specific ubiquitination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**

- of America**, [s. l.], v. 92, n. 24, p. 11259–11263, 1995. Disponível em:
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.24.11259>
- SEN, Ranjan; BALTIMORE, David. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. **Cell**, [s. l.], v. 47, p. 921–928, 1986. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90807-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90807-X)
- SENFTELEBEN, U. *et al.* Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. **Science**, [s. l.], v. 293, n. 5534, p. 1495–1499, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1062677>
- SHOSTAK, Kateryna; CHARIOT, Alain. EGFR and NF- κ B: partners in cancer. **Trends in Molecular Medicine**, [s. l.], v. 21, p. 385–393, 2015a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.04.001>. Acesso em: 21 abr. 2021.
- SHOSTAK, Kateryna; CHARIOT, Alain. EGFR and NF- κ B: Partners in cancer. **Trends in Molecular Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 385–393, 2015b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.04.001>
- SHOVAL, Hila *et al.* Tumor cells and their crosstalk with endothelial cells in 3D spheroids. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 10428, p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10699-y>
- SIDTHIPONG, Kulrawee *et al.* Rational design, synthesis and in vitro evaluation of novel exo-methylene butyrolactone salicyloylamide as NF- κ B inhibitor. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 27, p. 562–566, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.12.017>
- SIMON-GABRIEL, Carl Philipp *et al.* Microenvironmental stromal cells abrogate NF- κ B inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. **Haematologica**, [s. l.], v. 103, p. 136–147, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.165381>
- SIZEMORE, Gina M. *et al.* The ETS family of oncogenic transcription factors in solid tumours. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 337–351, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.20>
- SKUBITZ, Keith M.; D'ADAMO, David D. Sarcoma. **Mayo Clin Proc.**, [s. l.], v. 82, n. November, p. 1409–1432, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.4065/82.11.1409>
- SPILLER, Susan E. *et al.* Inhibition of nuclear factor kappa-B signaling reduces growth in medulloblastoma in vivo. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 136, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-136>

- STEWART, Ruth. Dorsal, an embryonic polarity gene in drosophila, is homologous to the vertebrate proto-oncogene, c-rel. **Science**, [s. l.], v. 238, n. 4827, p. 692–694, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.3118464>
- SUN, Haibo *et al.* Identification of a novel SYK/c-MYC/MALAT1 signaling pathway and its potential therapeutic value in Ewing sarcoma. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 23, n. 15, p. 4376–4387, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2185>
- SUN, Libo *et al.* Polysaccharide sulphated derivative from Aconitum coreanum induces cell apoptosis in the human brain glioblastoma U87MG cell line via the NF- κ B/BC1-2 cell apoptotic signaling pathway. **Oncology Reports**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 1469–1474, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/or.2017.6165>
- SUN, Shao Cong. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 17, n. 9, p. 545–558, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri.2017.52>
- SUZUKI, Keiichi *et al.* Combined effect of dehydroxymethylepoxyquinomicin and gemcitabine in a mouse model of liver metastasis of pancreatic cancer. **Clinical and Experimental Metastasis**, [s. l.], v. 30, p. 381–392, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10585-012-9544-7>
- TANAKA, Kazuhiro *et al.* Oncogenic EGFR signaling activates an mTORC2-NF- κ B pathway that promotes chemotherapy resistance. **Cancer Discovery**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 524–538, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0124>. Acesso em: 21 abr. 2021.
- TAPIA, Maria A. *et al.* Inhibition of the canonical IKK/NF κ B pathway sensitizes human cancer cells to doxorubicin. **Cell Cycle**, [s. l.], v. 6, n. 18, p. 2284–2292, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/cc.6.18.4721>
- THORN, Caroline F. *et al.* Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenetics and Genomics**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 440, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/FPC.0B013E32833FFB56>. Acesso em: 14 jun. 2022.
- TSAI, Hui Jen *et al.* Bioimaging analysis of nuclear factor- κ B activity in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells reveals its synergistic upregulation by tumor necrosis factor- α -stimulated changes to the microenvironment. **Cancer Science**, [s. l.], v. 102, p. 2014–2021, 2011. Disponível em:

<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02039.x>

UEN, Yih Huei *et al.* NF- κ B pathway is involved in griseofulvin-induced G2/M arrest and apoptosis in HL-60 cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 101, n. 5, p. 1165–1175, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcb.21240>

UKAJI, Tamami *et al.* Inhibition of MMP-2-mediated cellular invasion by NF- κ B inhibitor DHMEQ in 3D culture of breast carcinoma MDA-MB-231 cells: A model for early phase of metastasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 485, n. 1, p. 76–81, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.022>

UMEZAWA, Kazuo. Inhibition of tumor growth by NF- κ B inhibitors. **Cancer Science**, [s. l.], v. 97, p. 990–995, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00285.x>

UMEZAWA, Kazuo; LIN, Yinzhi. **Inhibition of matrix metalloproteinase expression and cellular invasion by NF- κ B inhibitors of microbial origin**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140412>. Acesso em: 27 abr. 2021.

VAN MATER, David; WAGNER, Lars. Management of recurrent Ewing sarcoma: challenges and approaches. **OncoTargets and therapy**, [s. l.], v. 12, p. 2279, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/OTT.S170585>. Acesso em: 23 maio 2022.

VENTURA, S. *et al.* CD99 regulates neural differentiation of Ewing sarcoma cells through MIR-34a-Notch-mediated control of NF- κ B signaling. **Oncogene**, [s. l.], v. 35, n. 30, p. 3944–3954, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2015.463>. Acesso em: 20 abr. 2021.

VERZELLA, Daniela *et al.* Life, death, and autophagy in cancer: NF- κ B turns up everywhere. **Cell Death & Disease** 2020 11:3, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 1–14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2399-y>. Acesso em: 30 maio 2022.

VINCI, Maria *et al.* Tumor Spheroid-Based Migration Assays for Evaluation of Therapeutic Agents Maria. **Target Identification and Validation in Drug Discovery: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, [s. l.], v. 986, p. 253–266, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-311-4>

VRÁBEL, Dávid; POUR, Luděk; ŠEVČÍKOVÁ, Sabina. The impact of NF- κ B signaling on pathogenesis and current treatment strategies in multiple myeloma. **Blood Reviews**, [s. l.], v. 34, p. 56–66, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.11.003>

- WANG, H. *et al.* Erianin induces G2/M-phase arrest, apoptosis, and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo. **Cell Death & Disease** **2016 7:6**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. e2247–e2247, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.138>. Acesso em: 1 jun. 2022.
- WATANABE, Mariko *et al.* A novel NF- κ B inhibitor DHMEQ selectively targets constitutive NF- κ B activity and induces apoptosis of multiple myeloma cells in vitro and in vivo. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 114, p. 32–38, 2005a. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.20688>
- WATANABE, Mariko *et al.* Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF- κ B, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T-cell leukemia. **Blood**, [s. l.], v. 106, n. 7, p. 2462–2471, 2005b. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3646>
- WATANABE, Mariko *et al.* Identification of the RelA domain responsible for action of a new NF- κ B inhibitor DHMEQ. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 376, p. 310–314, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.148>
- WHITE, Danielle E.; BURCHILL, Susan A. BAY 11-7082 induces cell death through NF- κ B-independent mechanisms in the Ewing's sarcoma family of tumours. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 268, n. 2, p. 212–224, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2008.03.045>
- WILSON, Edward O. **CARTAS A UM JOVEM CIENTISTA**. 1. ed. [S. l.]: Companhia das Letras, 2013. *E-book*.
- XIA, Longzheng *et al.* Role of the NF κ B-signaling pathway in cancer. **OncoTargets and therapy**, [s. l.], v. 11, p. 2063, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/OTT.S161109>. Acesso em: 26 maio 2022.
- XIA, Y.; SHEN, S.; VERMA, I. M. NF- B, an Active Player in Human Cancers. **Cancer Immunology Research**, [s. l.], v. 2, p. 823–830, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0112>
- XIAO, Gutian; HARHAJ, Edward W.; SUN, Shao-Cong. NF- κ B-Inducing kinase regulates the processing of NF- κ B2 p100. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 7, p. 759–764, 2001. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-27443-0_95
- YAMAMOTO, Mizuki *et al.* Inactivation of NF- κ B components by covalent binding of (-)-

- dehydroxymethylepoxyquinomicin to specific cysteine residues. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 18, p. 5780–5788, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm8006245>
- YANG, Dong *et al.* Single cell whole genome sequencing reveals that NFKB1 mutation affects radiotherapy sensitivity in cervical cancer. **Oncotarget**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 7332–7340, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23587>
- YASUDA, Arisa *et al.* Anti-tumor activity of dehydroxymethylepoxyquinomicin against human oral squamous cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo. **Oral Oncology**, [s. l.], v. 47, p. 334–339, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.03.001>
- ZABEL, Ulrike; BAEUERLE, Patrick A. Purified human I κ B can rapidly dissociate the complex of the NF- κ B transcription factor with its cognate DNA. **Cell**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 255–265, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90806-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90806-P)
- ZENALI, Maryam J *et al.* Morphoproteomic Confirmation of Constitutively Activated mTOR , ERK , and NF-kappaB Pathways in Ewing Family of Tumors. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 160–166, 2009.
- ZHANG, Qian; LENARDO, Michael J.; BALTIMORE, David. 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. **Cell**, [s. l.], v. 168, n. 1–2, p. 37–57, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.012>
- ZHAO, Shiguang *et al.* Arsenic trioxide induces different gene expression profiles of genes related to growth and apoptosis in glioma cells dependent on the p53 status. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 421–429, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11033-007-9102-6>. Acesso em: 26 abr. 2021.

APÊNDICE

APÊNDICE

Padronização de ensaios funcionais não incluídos no corpo da dissertação

Ensaio de clonogenicidade

O ensaio de capacidade clonogênica avalia a competência de uma célula única para formar uma colônia (FRANKEN *et al.*, 2006). Para isso, as células precisam ser plaqueadas em baixa confluência (geralmente de 300-500 células/poço em placa de 6 poços) e após o tratamento espera-se cerca de 6 ciclos de divisão celular permitindo a formação de colônias. Foram realizados diversos testes com a linhagem TC-32 afim de padronizar o ensaio, porém não se obteve sucesso. A linhagem em questão não forma colônias, comportamento este já observado durante a expansão da linhagem. De acordo com FRANKEN *et al.* (2006), algumas linhagens celulares não são capazes de formar colônias, possuindo um baixo valor de PE (do inglês, *Plating Efficiency*), um parâmetro que define a eficiência da linhagem em formar colônias. Além disso, não existem estudos na literatura que testaram a capacidade da linhagem TC-32 de formar colônias. Desta forma, este resultado, mesmo não sendo o esperado, é de grande contribuição para a comunidade científica.

Análise de ciclo celular com PI

Para a análise do ciclo celular, o primeiro protocolo testado foi o baseado em BRASSESCO, M. S. *et al.* (2013), no qual após a exposição aos inibidores de NF κ B as células são tripsinizadas, fixadas com etanol 70% e então incubadas com solução contendo 5 μ g/ml de Iodeto de Propídio (PI), 50 μ g/ml de RNase e 0,2% de NP-40. A análise da emissão da fluorescência do PI e a consequente quantidade de DNA e a porcentagem de células em Sub-G1, G1, S e G2/M foi mensurada tanto no citômetro Guava Personal Cell Analysis system (Guava Technologies, Hayward, CA, USA) do Laboratório da Prof. Dra. Elza Sakamoto-Hojo como no citômetro BD FACSCanto™ II do Departamento de Imagens Médicas, Hematologia e Oncologia Clínica da FMRP-USP, sob a responsabilidade da Prof. Dr. Lorena Lobô Figueiredo e os dados obtidos analisados no programa FlowJo v10.8.1. Ao se analisar as amostras, notou-se que não era possível identificar de forma precisa as diferentes fases do ciclo celular, não havendo principalmente células na fase S. Por este motivo foi realizado um teste com o kit BD

Cycletest™ Plus DNA Kit para avaliar se o problema encontrado era das amostras ou do protocolo. Assim, só foi apresentado um único experimento sendo necessária repetição para se atingir o n amostral mínimo.

Ensaio de morte celular por ativação de caspase-3

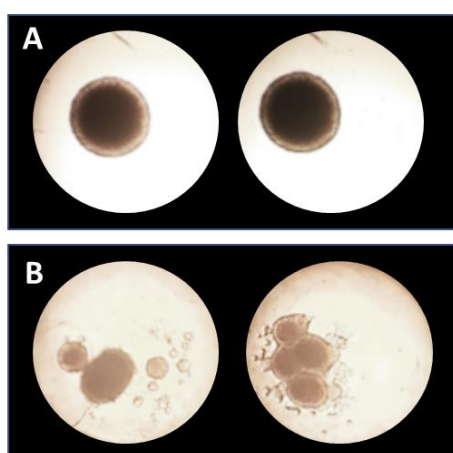
A avaliação de morte celular pode ser realizada de diversas formas uma vez que existem diferentes tipos de morte celular (HU *et al.*, 2021). Um dos tipos de morte celular realizado no presente estudo foi a apoptose, por meio da quantificação da atividade de caspase-3. Para isso, foi utilizado o kit *NucView™ 488 caspase-3 detection in living cells* (Biotium). A linhagem TC-32 foi semeada em placas de 6 poços na concentração de 5×10^4 células/poço, deixadas aderir por 24h, tratadas com os inibidores de NF- κ B por 48h e então as recomendações do fabricante do kit foram seguidas. Resumidamente, as células tratadas foram incubadas em temperatura ambiente com 5 μ L de *NucView™ 488 caspase-3 substrate* por 30 min. Após este período, as mesmas foram incubadas com DAPI (0,15 μ g/mL) (Sigma-Aldrich) e analisadas em microscópio de epifluorescência. Porém, ao se repetir o experimento a análise por microscopia não pode ser realizada por não haver células suficientes por conta do aumento de *debris* celulares, além de não se observar marcação para caspase-3 nem no controle positivo (DXR 0.1 μ g/ml). Duas modificações no protocolo foram testadas afim de resolver este problema. Primeiro, aumentou-se o número de células plaqueadas para 5×10^5 e a forma de análise foi alterada para citometria ao invés de microscopia. Mesmo assim a análise foi prejudicada pelo excesso de possíveis *debris* e baixíssima marcação para caspase-3. Diante deste fato, hipotetizou-se que o elevado número de restos celulares e a baixa marcação para caspase-3 poderia ser uma consequência da indução de necrose pela inibição de NF- κ B (IKEGAMI *et al.*, 2018; LUO, J. L.; KAMATA; KARIN, 2005). Por este motivo a análise de morte celular foi realizada por meio da marcação de células com Annexin V e 7aaD (BD Biosciences), como mostrado nos itens **3.5** e **4.2**, permitindo assim, a distinção entre células apoptóticas e necróticas.

Padronização de modelo 3D com metilcelulose

Inicialmente, foi realizada a padronização de um protocolo de formação de esferoides diferente do apresentado anteriormente. O protocolo se baseava no trabalho de RIFFLE *et al.* (2017), no qual 5×10^4 células foram suspensas em meio apropriado contendo 10% de soro fetal bovino e 0,05% de metilcelulose e semeadas em placa de 96 poços revestidos previamente com agarose a 1%. Após 96h de incubação observava-

se a formação de uma única esfera por poço com bordas bem definidas (**Figura Suplementar 1A**). Com os esferoides formados a partir deste protocolo foi analisada a viabilidade celular, além de migração e invasão, como mostrado a seguir. Porém, após um tempo utilizando este protocolo de formação de esferoides, observou-se uma perda de capacidade da linhagem de formar esferoides únicos (**Figura Suplementar 1B**) e devido a este problema o protocolo de formação de esferoides foi substituído pelo apresentado no item 3.9.

Figura Suplementar 1. Formação de esferoides em meio com metilcelulose.



Fonte: A autora.

Modelo 3D. A) Após 96 h de plaqueamento observou-se a formação de um único esferoide por poço. Porém, após algum tempo, não foi possível reproduzir o modelo, pois formava-se mais de um esferoide por poço (**B**). Imagens obtidas em microscópio invertido na objetiva de 20X.

Teste de migração e invasão 3D

Inicialmente pretendia-se avaliar a motilidade celular em modelo 3D além do modelo 2D (ensaio de *wound healing*) já apresentado. Para isso, foi utilizado o modelo de formação de esferoides formados com metilcelulose e baseou-se nos seguintes protocolos: VINCI et al. (2013) para a migração e SHOVAL et al. (2017) para a invasão.

Com relação à migração, após a obtenção dos esferoides, os mesmos foram transferidos para placa de 96 poços convencionais, as quais permitem a adesão celular, e esperou-se 24h para a adesão dos esferoides para poder adicionar os inibidores de NF- κ B. Este foi um passo crítico para o experimento, pois ao se adicionar mais meio nos poços os esferoides descolam, inviabilizando a análise. Por este motivo e pelo fato de o

protocolo de formação dos esferoides ter sido alterado, a avaliação da migração 3D não foi realizada.

Já com relação ao ensaio de invasão, testou-se o protocolo de invasão com insertos *transwell* revestidos com Matrigel™. Para isso, os esferoides foram transferidos para insertos *transwell* com meio sem SBF e com os inibidores de NF- κ B ou DMSO, como controle. Na parte inferior do inserto foi adicionado meio de cultura com 10% de SBF. Após incubadas a 37°C por 24h e 48h, as células que não invadiram foram removidas da parte superior do inserto com o uso de um *swab*. As células que invadiram foram fixadas com uso de metanol 100% por 15 minutos e coradas com uma solução de Giemsa (3%). Ao se analisar as membranas dos insertos, observou-se que nenhuma célula invadiu, nem mesmo no grupo controle. Por esta razão, o experimento necessita de padronização e, portanto, não foi incluído no trabalho.