

LAÍS MENDES DOS SANTOS GOES

ANÁLISE DO PAPEL DAS CICLO-OXIGENASES E PROSTAGLANDINA E
SINTASE-1 MICROSSOMAL NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE MATRIZ
EXTRACELULAR, INTEGRINAS E MIGRAÇÃO CELULAR EM GLIOBLASTOMA

Dissertação apresentada ao Departamento de
Biologia Celular e do Desenvolvimento do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2020

LAÍS MENDES DOS SANTOS GOES

ANÁLISE DO PAPEL DAS CICLO-OXIGENASES E PROSTAGLANDINA E
SINTASE-1 MICROSSOMAL NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE MATRIZ
EXTRACELULAR, INTEGRINAS E MIGRAÇÃO CELULAR EM GLIOBLASTOMA

Dissertação apresentada ao Departamento de
Biologia Celular e do Desenvolvimento do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e
Tecidual

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alison Colquhoun

Versão original.

São Paulo

2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Goes Mendes dos Santos, Laís
Análise do papel das ciclo-oxigenases e
prostaglandina E sintase-1 microssomal na expressão
de proteínas de matriz extracelular, integrinas e
migração celular em glioblastoma / Laís Goes Mendes
dos Santos; orientador Alison Colquhoun. -- São
Paulo, 2020.
145 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Glioblastoma. 2. Migração celular. 3. Matriz
Extracelular. 4. Integrinas. 5. Ciclooxigenases. I.
Colquhoun, Alison, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Laís Mendes dos Santos Goes

Titulo da Dissertação/Tese: Análise do papel das ciclo-oxigenases e prostaglandina E sintase-1 microsossomal na expressão de proteínas de matriz extracelular, integrinas e migração celular em glioblastoma

Orientador: Alison Colquhoun

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

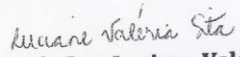


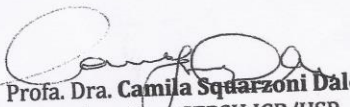
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº 908/2017 referente ao projeto intitulado: ***"Modulação da via ciclooxygenase e o papel da PGE2 na migração e invasão celular, na expressão de moléculas da matriz extracelular e de adesão, em linhagens de glioblastoma humano"*** sob a responsabilidade de ***Laís Mendes dos Santos Goes*** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) ***Alison Colquhoun***, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, foi analisado pela CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo CEPESH - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 27 de setembro de 2017.


Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP


Prof. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPESH ICB/USP

À minha família pelo apoio em todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha orientadora Dr^a. Alison Colquhoun pela oportunidade de executar este trabalho. Obrigada pela orientação, confiança e toda a paciência que teve comigo durante todo período do mestrado. Orientadores como você são raros!

Sou grata a minha família que me deu todo o apoio necessário para buscar meus sonhos e objetivos profissionais, especialmente aos meus pais Eduardo Goes e Cristina Mendes que deram todo o suporte emocional e financeiro de que precisei. Ao meu irmão Eduardo Jr. que confiou em mim quando nem eu mesma confiava, jamais esquecerei todas as palavras de incentivo que recebi de você. Ao meu irmão Everton pelo carinho, apoio e por sempre me fazer rir. A minha tia Luordes por todo carinho e apoio. A Enzo Lima pelo apoio incondicional.

Aos meus colegas de laboratório Janaína Silva, Gustavo Lopes e Matthew Ferreira pelo companherismo, muitas conversas e apoio em todas as horas. A Lucas Rossetti pela companhia em todos momentos, pelas muitas conversas, pelas dicas em experimentos, discussões de artigos, por me ouvir quando falo das hipóteses que levantei ou artigos que li, enfim...obrigada por tudo e por ser quem você é. Quando dei por mim, o colega virou amigo!

Agradeço a Marley, a mãe que a pós-graduação me deu. Eu não tenho palavras para descrever sua importância na minha vida durante todo o mestrado. Obrigada pelos conselhos, pelo carinho, pelos puxões de orelha, pelo cuidado, pelos abraços, por me ouvir, por ser luz na minha vida. Você é uma amiga muito especial para mim.

Ao Felipe Souza pela paciência, por sempre me ouvir, pelas dicas nos experimentos, pelo carinho, presepadas, risos e trocas de confidencialidades.

A Dona Marlene, por todo carinho e cuidado, por me tratar como filha e por me incentivar sempre a buscar meus sonhos e objetivos profissionais.

A amiga Tábata por ser essa pessoa incrível e sensível que sempre se importou comigo e tentou me ajudar da maneira que pôde. Eu tenho muito carinho por você!

Ao professor Fábio e sua esposa, que ajudaram a mim e a minha família de várias maneiras para que eu pudesse vir para São Paulo.

As professoras Marinilce e Gláucia por toda a atenção e aconselhamento. As dicas de vocês trouxeram mais brilho a esse trabalho!

As professoras Carolina, Dânia e Vanessa que sempre foram muito queridas comigo.

As colegas de pós-graduação Ana Carolina, Raquel, Carina, Juliana e Cinthia. Meninas, obrigada pelas conversas, conselhos, companhia e momentos de lazer.

Jeniffer pelas risadas e palavras de incentivo.

A Nice por me fazer enxergar na vida real a relevância da minha pesquisa. Muito obrigada por compartilhar sua história de vida.

A todos os professores do programa por compartilharem seus conhecimentos e colaborarem diretamente para meu desenvolvimento profissional.

Aos alunos e funcionários do departamento pela companhia diária.

Ao departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento pelo apoio financeiro para participação em eventos.

À agência de fomento CAPES pela bolsa concedida.

“Sonhos determinam o que você quer. Ação determina o que você conquista”.

Aldo Novak

RESUMO

GOES, L.M.S. Análise do papel das ciclo-oxigenases e prostaglandina E sintase-1 microsossomal na expressão de proteínas de matriz extracelular, integrinas e migração celular em glioblastoma. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2020.

O glioblastoma (GBM) é a neoplasia maligna mais frequente e letal do sistema nervoso central (SNC). Este tumor é caracterizado por uma elevada taxa proliferativa e rápida infiltração difusa no tecido cerebral adjacente. A terapia indicada para GBM consiste na ressecção cirúrgica, seguida de radioterapia e quimioterapia. Apesar dos tratamentos disponíveis a sobrevida média dos pacientes é de aproximadamente 14 meses após o diagnóstico. Parte da dificuldade do tratamento deve-se à elevada taxa de migração e invasão das células de GBM. Componentes da matriz extracelular (MEC) e receptores do tipo integrina (ITG) desempenham papel crucial na disseminação de GBM. Os níveis das ciclo-oxigenases (COXs) e seu principal produto a prostaglandina E₂ (PGE₂) estão diretamente relacionados à migração e invasão tumoral, assim como, maior grau de agressividade e pior prognóstico. A prostaglandina E sintase-1 microsossomal (mPGES-1) é a principal sintase de PGE₂. Este estudo teve por objetivo avaliar o papel das COX-1 e COX-2, mPGES-1 e PGE₂ na migração celular e na expressão de ITGs e proteínas da MEC em linhagens de GBM humano (U87MG e T98G). Os resultados demonstraram que a inibição das COX-1 e 2, assim como, da mPGES-1 reduziu o número de células e a migração de celular de GBM *in vitro*. PGE₂ aumentou o número de células viárias de ambas as linhagens e a migração das células T98G. Inibidores seletivos de COX-1, COX-2 e mPGES-1 promoveram alterações no citoesqueleto de actina e, conseqüentemente, redução da motilidade celular. A inibição de mPGES-1 diminuiu significativamente a expressão de proteínas da MEC nas duas linhagens estudadas. O tratamento com PGE₂ ou inibidores de COX-1 e/ou COX-2 influenciaram de maneira diversa a expressão de proteínas da MEC e ITGs nas linhagens estudadas. Em conjunto, esses dados demonstram que as COXs e mPGES-1 desempenham um papel no crescimento celular, reorganização do citoesqueleto, expressão de proteínas da MEC e ITGs, assim como, migração celular em linhagens de GBM.

Palavras-chave: Glioblastoma. Migração celular. Matriz Extracelular. Integrinas.

ABSTRACT

GOES, L.M.S. Analysis of the role of cyclooxygenases and microsomal prostaglandin E synthase-1 in the expression of extracellular matrix proteins, integrins and cell migration in glioblastoma. [Masters thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2020.

Glioblastoma (GBM) is the most frequent and lethal malignant neoplasm of the central nervous system (CNS). This tumor is characterized by a high proliferative rate and rapid diffuse infiltration in the adjacent brain tissue. The therapy indicated for GBM consists of surgical resection, followed by radiotherapy and chemotherapy. Despite the treatments available, the median survival of patients is approximately 14 months after diagnosis. Part of the difficulty in treatment is due to the high rate of migration and invasion of GBM cells. Components of the extracellular matrix (MEC) and integrin-type receptors (ITG) play a crucial role in the spread of GBM. The levels of cyclooxygenases (COXs) and their main product, prostaglandin E₂ (PGE₂), are directly related to tumor migration and invasion, as well as a greater degree of aggressiveness and a worse prognosis. Microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) is the main synthase of PGE₂. This study aimed to evaluate the role of COX-1 and COX-2, mPGES-1 and PGE₂ in cell migration and in the expression of ITGs and MEC proteins in human GBM cell lines (U87MG and T98G). The results showed that inhibition of COX-1 and 2, as well as mPGES-1, reduced the number of cells and migration of GBM cells *in vitro*. PGE₂ increased the number of road cells of both strains and the migration of T98G cells. Selective COX-1, COX-2 and mPGES-1 inhibitors promoted changes in the actin cytoskeleton and, consequently, reduced cellular motility. The inhibition of mPGES-1 significantly decreased the expression of MEC proteins in the two cell lines studied. The treatment with PGE₂ or COX-1 and/or COX-2 inhibitors influenced in a different way the expression of MEC proteins and ITGs in the studied cells. Taken together, these data demonstrate that COXs and mPGES-1 play a role in cell growth, cytoskeletal reorganization, expression of MEC proteins and ITGs, as well as cell migration in GBM cells.

Keywords: Glioblastoma. Cell migration. Extracellular Matrix. Integrins

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 no Brasil.....	20
Figura 2 - Classificação histopatológica dos gliomas.....	21
Figura 3 - Alterações moleculares na progressão de glioblastoma pela via <i>de novo</i> (primária) e via progressiva (secundária).....	23
Figura 4 - Representação das principais vias de migração dos gliomas.....	25
Figura 5 - Representação esquemática da estrutura de laminina.....	28
Figura 6 - Formação das redes de colágeno tipo IV.....	31
Figura 7 - Representação esquemática de fibronectina.....	32
Figura 8 - Representação esquemática de integrina inativa e ativa.....	35
Figura 9 - Via das ciclo-oxigenases e mecanismos de transdução de sinal ativados pelos receptores de prostaglandinas.....	41
Figura 10 - Representação esquemática das diferenças estruturais entre os canais de ligação ao substrato da COX-1 e COX-2 que permitiram o desenho de inibidores seletivos.....	44
Figura 11 - Padronização de primers para RT-qPCR.....	55
Figura 12 - Curva de crescimento celular de linhagens de glioblastoma humano...60	60
Figura 13 - Curva de dose-resposta de células U87MG tratadas com ibuprofeno (IBP), CAY10256 e PGE ₂	61
Figura 14 - Curva de dose-resposta de células T98G tratadas com ibuprofeno (IBP), CAY10256 e PGE ₂	63
Figura 15 - Expressão gênica de proteínas de matriz extracelular em células U87MG tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE ₂	65
Figura 16 - Expressão gênica de proteínas de matriz extracelular em células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE ₂	66
Figura 17 - Expressão gênica de subunidades de integrinas em células U87MG tratadas com IBP, CAY10526 e PGE ₂	67
Figura 18 - Expressão gênica de subunidades de integrinas em células T98G tratadas com IBP, CAY10526 e PGE ₂	68
Figura 19 - Expressão de laminina em células U87MG tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE ₂	70

Figura 20 - Expressão de fibronectina em células U87MG tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE ₂	71
Figura 21 - Expressão de laminina em células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE ₂	72
Figura 22 - Expressão de fibronectina em células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE ₂	73
Figura 23 - Expressão de colágeno tipo IV em células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE ₂	74
Figura 24 - Expressão de Integrina α3 em células U87MG tratadas com IBP, SC560, NS398 e PGE ₂	76
Figura 25 - Expressão de Integrina α5 em células U87MG tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE ₂	77
Figura 26 - Expressão de Integrina αv em células U87MG tratadas com IBP, SC560, NS398 e PGE ₂	78
Figura 27 - Expressão de Integrina β1 em células U87MG tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE ₂	79
Figura 28 - Expressão de Integrina β3 em células U87MG tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE ₂	80
Figura 29 - Expressão de Integrina α3 em células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE ₂	81
Figura 30 - Expressão de Integrina α5 em células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE ₂	82
Figura 31 - Expressão de Integrina αv em células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE ₂	83
Figura 32 - Expressão de Integrina β1 em células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE ₂	84
Figura 33 - Expressão de Integrina β3 em células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE ₂	85
Figura 34 - Ensaio de fechamento de ferida de células U87MG tratadas com ibuprofeno (IBP), SC560, NS398, CAY10526 e PGE ₂	87
Figura 35 - Ensaio de fechamento de ferida de células T98G tratadas com ibuprofeno (IBP), SC560, NS398, CAY10526 e PGE ₂	88
Figura 36 - Morfologia de células U87MG tratadas com ibuprofeno (IBP), SC560, NS398, CAY10526 ou PGE ₂ por 24h.....	90

Figura 37 - Morfologia de células T98G tratadas com ibuprofeno (IBP), SC560, NS398, CAY10526 ou PGE₂ por 24h.....	91
Figura 38-A - Morfologia de células U87MG tratadas com ibuprofeno (IBP), SC560, NS398, CAY10526 ou PGE₂ por 24h.....	92
Figura 38-B - Morfologia de células U87MG tratadas com ibuprofeno (IBP), SC560, NS398, CAY10526 ou PGE₂ por 24h.....	93
Figura 39-A - Morfologia de células T98G tratadas com ibuprofeno (IBP), SC560, NS398, CAY10526 ou PGE₂ por 24h.....	94
Figura 39-B - Morfologia de células T98G tratadas com ibuprofeno (IBP), SC560, NS398, CAY10526 ou PGE₂ por 24h.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isoformas de laminina e suas nomenclaturas.....	29
Tabela 2 - Integrinas em GBM.....	36
Tabela 3 - Primers utilizados na reações de RT-qPCR.....	56
Tabela 4 - Anticorpos utilizados nas reações de Western blot.....	58
Tabela 5 - Tratamentos utilizados nas curvas de dose-resposta e concentrações selecionadas.....	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA - ácido araquidônico
AC - adenilato ciclase
AINES - anti-inflamatórios não esteroidais
AMPC - Monofosfato cíclico de adenosina
ASA - aspirina
cDNA - DNA complementar
COL4 - colágeno tipo IV
COX - ciclo-oxigenase
cPGES - prostaglandina E sintase citosólica
cPLA_{2α} - fosfolipase citosólica 2α
CT - Cycle Threshold
DEPC - dimetil pirocarbonato
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO - dimetilsufóxido
dNTP – desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT – ditioneitol
ECL - Enhanced Chemiluminescence
EGF - fator de crescimento epidermal
EGFR - receptores de fator de crescimento epidermal
EtOH - etanol
FACs - fibloblastos associados ao câncer
FGF-2 - fator de crescimento de fibroblastos 2
FGF-2 - fator de crescimento fibroblástico tipo 2
FN - fibronectina
GAGs - glicosaminoglicanas
GBM - glioblastoma
GDP - guanosina difosfato
GEFs - fator de troca de nucleotídeo guanina

Gi - proteína G inibitória
Gs - proteína G estimulatória
GTP - guanosina trifosfato
IBP - ibuprofeno
IDH - isocitrato desidrogenase
IL-1 β - interleucina beta 1
ITG – integrina
LAM - laminina
LOX - lipoxigenases
LTC4S - leucotrieno C4 sintase
MAG - glicoproteínas associadas a mielina
MAPEG - proteínas associadas a membrana no metabolismo de eicosanoides e glutathione
MEC - matriz extracelular
mPGES-1 - prostaglandina E sintase-1 microssomal
mPGES-2 - prostaglandina E sintase-2 microssomal
mRNA – RNA mensageiro
OMS - Organização Mundial da Saúde
PBS - tampão fosfato salino
PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas
PG – prostaglandina
PGE₂ - prostaglandina E₂
PGF_{2 α} - prostaglandina F_{2 α}
PGG₂ - prostaglandina G₂
PGHS - prostaglandina endoperóxido sintases
PGI₂ - prostaglandina I₂
PKA – proteína quinase A
PKC – proteína quinase C
PPARs - receptores ativados por proliferadores de peroxissomo
PTEN - homólogo de fosfatase e tensina
RE - retículo endoplasmático
RT-qPCR - reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
SD - desvio padrão

SFB - soro fetal bovino

siRNA – pequeno RNA de interferência

SNC - Sistema Nervoso Central

sPLA_{2s} - fosfolipases secretadas 2s

TA - temperatura ambiente

TBP - TATA binding protein

TBS - tampão Tris salino

TCGA – Atlas do Genoma do Câncer

TMZ - temozolomida

TXA₂ - tromboxano A₂

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

VTN - vitronectina

15-HETE - ácido 15-hidroperóxido eicosatetraenoico

15-HPGD - 15-hidroxiprostaglandinas desidrogenases

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Gliomas: classificação e caracterização.....	20
1.2 Migração celular de gliomas.....	24
1.2.1 <i>Principais vias de migração de gliomas.....</i>	<i>24</i>
1.2.2 <i>Matriz extracelular na migração de gliomas.....</i>	<i>26</i>
1.2.3 <i>Integrinas em gliomas.....</i>	<i>34</i>
1.3 Ciclo-oxigenases.....	37
1.4 Via das ciclo-oxigenases.....	39
1.5 Prostaglandina E₂ (PGE₂).....	42
1.6 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINES).....	44
1.7 Justificativa.....	46
2 OBJETIVOS.....	47
2.1 Objetivo geral.....	47
2.2 Objetivos específicos.....	47
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1 Cultura Celular.....	48
3.2 Curvas de crescimento celular.....	48
3.3 Curvas de dose-resposta.....	49
3.4 Tratamentos das linhagens celulares.....	50
3.5 Análise de expressão gênica por RT-qPCR.....	50
3.5.1 <i>Extração de RNA total.....</i>	<i>50</i>
3.5.2 <i>Síntese de DNA complementar.....</i>	<i>51</i>
3.5.3 <i>Desenho de primers.....</i>	<i>52</i>
3.5.4 <i>Teste de temperatura dos primers.....</i>	<i>52</i>
3.5.5 <i>Teste de concentração dos primers.....</i>	<i>53</i>
3.5.6 <i>Teste de eficiência dos primers.....</i>	<i>54</i>
3.5.7 <i>Reação de PCR em tempo real.....</i>	<i>55</i>
3.6 Western blot.....	57
3.7 Ensaio de fechamento de ferida.....	58

3.8 Análise de morfologia celular.....	59
3.9 Análise estatística.....	60
4 RESULTADOS.....	60
4.1 Curvas de crescimento celular.....	60
4.2 Curvas de dose resposta.....	60
4.3 PCR em tempo real.....	61
4.3.1 <i>Proteínas de matriz extracelular.....</i>	64
4.3.2 <i>Integrinas.....</i>	66
4.4 Western blot.....	69
4.4.1 <i>Proteínas de matriz extracelular.....</i>	69
4.4.2 <i>Integrinas.....</i>	75
4.5 Ensaio de fechamento de ferida das linhagens U87MG e T98G.....	86
4.6 Morfologia celular.....	89
4.6.1 <i>Morfologia celular das linhagens U87MG e T98G em microscopia de contraste de fase.....</i>	89
4.6.2 <i>Morfologia celular das linhagens U87MG e T98G em microscopia de fluorescência.....</i>	91
5 DISCUSSÃO.....	96
6 CONCLUSÃO.....	128
REFERÊNCIAS.....	130

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gliomas: classificação e caracterização

Tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) são tumores benignos ou malignos que ocorrem nas seguintes localizações: meninges, cérebro, medula espinhal, nervos cranianos e outras partes do SNC, hipófise, ducto craniofaríngeo e glândula pineal (McCarthy *et al.*, 2005).

As neoplasias malignas do SNC foram responsáveis por 4,2% das mortes por câncer no Brasil em 2017. Excluindo-se o câncer de pele não melanoma, os tumores do SNC representam um dos 10 tipos de câncer mais incidentes no país para ambos os sexos (Figura 1). Para o ano de 2018, foram estimados 5,62 novos casos a cada 100 mil homens e 5,17 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2019).


Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		Homens Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Figura 1. Dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 no Brasil, segundo o INCA (exceto tumores de pele não melanoma).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os tumores de SNC de acordo com suas características histopatológicas, células de origem e grau de diferenciação em: tumores astrocíticos e oligodendroglias difusos; outros tumores astrocíticos; tumores ependimais; outros gliomas; tumores do plexo coroide; tumores neurais e neurogliais mistos; tumores da região pineal; tumores embrionários; tumores dos nervos craniais e paraespinhais; meningiomas; tumores mesenquimais não meningoteliais; tumores melanocíticos; linfomas; tumores histiocíticos; tumores de células germinativas; tumores da região selar e tumores metastáticos. Esses grupos de tumores podem ser subclassificados quanto ao grau de malignidade do grau I ao grau IV, e quanto à suas características moleculares (Louis *et. al.*, 2016; Louis *et al.*, 2007).

Os gliomas são os tumores do SNC mais comuns e representam cerca de 30% dos casos, e 80% de todos os tumores cerebrais malignos (YI *et al.*, 2016). Consistem em tumores originados das células da glia ou células precursoras menos diferenciadas, as quais são responsáveis pelo fornecimento de um microambiente adequado para a sobrevivência dos neurônios (Pencheva *et al.*, 2017). Os gliomas são classificados histologicamente de acordo com a célula de origem em astrocitomas (astrócitos), oligodendrogliomas (oligodendrócitos) e ependimomas (ependimócitos). Os astrocitomas são os mais frequentes e são classificados histopatologicamente quanto à malignidade do grau I ao IV, respectivamente em: astrocitomas pilocíticos, astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico e glioblastoma (GBM) (Wen, Huse, 2016).

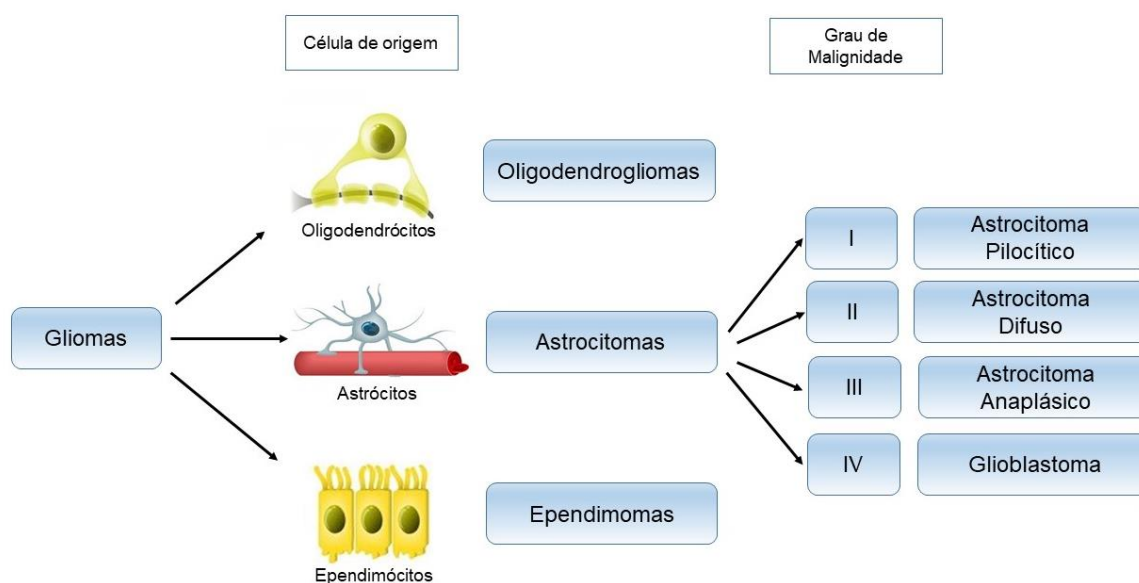


Figura 2. Classificação histopatológica dos gliomas.

Os astrocitomas pilocíticos são tumores de baixo grau de malignidade (grau I), que apresentam crescimento lento e geralmente não são infiltrativos. São os tumores cerebrais pediátricos mais comuns, com pico de incidência na primeira década de vida. Embora apresente grandes chances de cura após sua ressecção total, a recorrência do tumor é observada em aproximadamente 19% dos casos. A progressão para graus de malignidade mais elevados é extremamente rara (Jones *et al.*, 2008; Wen, Huse, 2016). Os astrocitomas pilocíticos são caracterizados molecularmente, segundo a OMS (2016), como tumores que não possuem alterações nos genes da família da isocitrato desidrogenase (IDH) e frequentemente possuem alterações do gene *BRAF* (Louis *et al.*, 2016).

Astrocitomas difusos são tumores de grau II que apresentam crescimento lento, atipia celular e capacidade infiltrativa. Se desenvolvem mais frequentemente em jovens adultos e possuem a tendência a progredir para tumores de maior grau de malignidade como o astrocitoma anaplásico (grau III) ou glioblastoma (grau IV). Geralmente esses tumores não apresentam deleção dos braços dos cromossomos 1p e 19q. Cerca de dois terços apresentam mutação de perda de função do gene *TP53*. A maioria dos casos de astrocitomas difusos possuem mutação em *IDH* o que caracteriza um melhor prognóstico (Watanabe *et al.*, 2002; Wen, Huse, 2016).

Os astrocitomas anaplásicos são tumores infiltrativos caracterizados por anaplasia celular e grande atividade mitótica. São tumores pouco frequentes cuja incidência é de cerca de 0,3 casos a cada 100 mil pessoas, sendo mais frequente em adultos acima dos 45 anos. Assim como os astrocitomas difusos (grau II), a maioria dos astrocitomas anaplásicos apresentam mutação em *IDH* e em *TP53*. Além disso, é comum a perda de heterozigose do cromossomo 19. O prognóstico é ruim uma vez que a ressecção total do tumor geralmente não é possível devido a sua infiltração difusa. Além disso, seu ressurgimento após o uso de todas as terapias disponíveis é frequente. Apenas 16% dos pacientes sobrevivem por até cinco anos (Louis *et al.*, 2007; Stupp *et al.*, 2007; Wen, Huse, 2016).

O glioblastoma (GBM) é o mais incidente, agressivo e infiltrativo dos astrocitomas, com taxa de incidência de aproximadamente 3,6 – 4,2 casos entre 100.000 pessoas, representando cerca de 81 % de todos os tumores malignos do SNC e 60% de todos os gliomas (Mehta *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2017; Yi *et al.*, 2016). Suas principais características são: hiper celularidade, células pouco diferenciadas do tipo fusiforme ou pleomórfica, núcleos atípicos, grande atividade mitótica, focos de necrose, hiperplasia microvascular, altíssima invasibilidade nas estruturas cerebrais e uma baixa capacidade de realizar metástases fora do SNC (Roos *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2012).

De acordo com sua origem, características clínicas e moleculares o GBM pode ser subclassificado em primário ou secundário. O GBM primário, ou *de novo*, geralmente se origina diretamente das células astrocíticas e na maioria das vezes é caracterizado molecularmente como sendo *TP53* e *IDH* tipo selvagem, além de apresentar mutação no gene *PTEN* (homólogo de fosfatase e tensina), amplificação e aumento da expressão do gene de receptores de fator de crescimento epidermal (*EGFR*) e perda do braço curto e/ou longo do cromossomo 10 (deleção 10p e/ou

10q). Trata-se do tipo mais agressivo e invasivo, apresentando um pior prognóstico e representa 90% dos casos de glioblastoma, ocorrendo principalmente em indivíduos com idade igual ou superior a 55 anos. O GBM secundário é originado dos astrocitomas de graus inferiores e possui maior incidência entre pacientes com idade aproximada de 45 anos, representando cerca de 5% dos casos de GBM. Geralmente, são molecularmente caracterizados por mutação em *IDH* e *TP53*, além de apresentarem perda de heterozigidade em 19q e 22q (Delgado-López e Corrales-García, 2016; Louis *et al.*, 2016; Ohgaki, Kleihues, 2013).

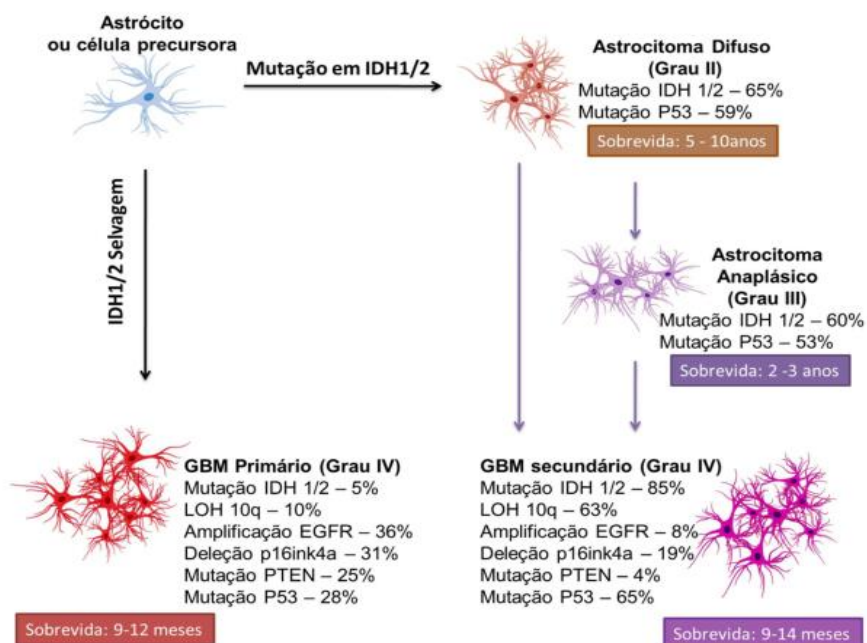


Figura 3. Alterações moleculares na progressão de glioblastoma pela via *de novo* (primária) e via progressiva (secundária), Souza, 2017.

Os principais tratamentos de glioblastoma consistem em retirada cirúrgica do tumor, seguida de radioterapia e quimioterapia. Embora a retirada completa do tumor através de intervenção cirúrgica seja o tratamento inicial mais indicado, a ampla infiltração de células tumorais no tecido cerebral saudável adjacente torna a ressecção total do tumor impossível, o que colabora para a recorrência tumoral poucos meses após a cirurgia. Além do mais, o glioblastoma é geralmente muito resistente à terapia convencional, muito provavelmente por apresentar elevado grau de heterogeneidade celular (Coniglio, Segall, 2013; Roos *et al.*, 2017; Yi *et al.*, 2016). A realização de radioterapia localizada é dificultada pela ampla difusão de células neoplásicas no tecido nervoso normal, sendo comum a ocorrência de vários focos do tumor no cérebro.

Os pacientes com glioblastoma tem uma sobrevida aproximada de 6 a 12 meses após a cirurgia, apenas cerca de 28% dos pacientes apresentam sobrevida aproximada de 2 anos após o diagnóstico e 5% vivem por 5 anos. Provavelmente devido ao curto período de sobrevida, seja difícil a verificação de metástase por glioblastoma em sítios extracranianos, sendo este fenômeno observado em cerca de 0,5% dos casos de GBM e geralmente observado em pacientes jovens ($38,2 \pm 16,1$ anos) e do sexo masculino (Cunha, Maldaun, 2019). Apesar dos avanços terapêuticos e do desenvolvimento de novos fármacos, ainda não existe cura para esse tipo de glioma, sendo o tratamento utilizado apenas para o aumento do tempo de sobrevida dos pacientes (Roos *et al.*, 2017; Taghipour *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2012).

1.2 Migração celular de gliomas

1.2.1 Principais vias de migração de gliomas

A migração celular desempenha um papel central em uma ampla variedade de processos biológicos como desenvolvimento embrionário, resposta imune inflamatória, reparo de feridas, desenvolvimento de tumores e formação de metástases. A migração celular é conduzida por uma organização bioquímica e biomecânica intracelular em resposta a sinais extracelulares (Horwitz, Parsons, 1999).

Após a exposição a um estímulo externo, o processo de migração celular se inicia com a reorganização do citoesqueleto de actina e desmontagem de adesões focais, o que leva a formação de protusões da membrana plasmática na porção frontal da célula, chamadas de lamelipódios. Posteriormente, ocorre a estabilização das protusões por meio da formação de complexos adesivos. Estes complexos adesivos são regiões da membrana plasmática onde receptores do tipo integrina, filamentos de actina e proteínas associadas se organizam formando adesões focais que servem de pontos de tração entre o corpo celular e a matriz extracelular (MEC). Ocorre então, a contração do corpo celular e liberação de adesões na porção traseira da célula promovendo o seu deslocamento (Horwitz, Parsons, 1999; Mak *et al.*, 2016; Raftopoulou, Hall, 2004).

Em câncer, a migração celular é um fenômeno crucial, visto que a capacidade das células de tumores malignos de migrar e invadir tecidos saudáveis em áreas próximas ou distantes do tumor consiste em uma das suas principais características (Hanahan, Weinberg, 2011). Diferente de diversos outros tipos de tumores sólidos, os gliomas dificilmente realizam metástases intravasculares ou linfáticas, em vez disso, as células de glioma migram ativamente através dos espaços extracelulares do cérebro, o que leva à formação de tumores satélites distantes (Cuddapah *et al.*, 2014). Análise histológica de amostras de pacientes mostrou uma zona de infiltração difusa de 2 a 3 cm ao redor do tumor, embora outros estudos demonstraram que células de gliomas malignos podem se infiltrar no tecido cerebral sadio a uma distância superior a 4 cm da massa tumoral (Goldbrunner *et al.*, 1998).

A migração celular de gliomas pode ocorrer pelo parênquima cerebral (substância cinza e substância branca) ou por estruturas anatômicas distintas como feixes de fibras mielinizadas, espaço perivascular, espaço subaracnoide e glia limitante externa (Giese, Westphal, 1996; Cuddapah *et al.*, 2014). O comportamento migratório e invasivo das células de gliomas é, em parte, uma consequência da reação destas células a componentes da MEC. Desse modo, dentre os fatores microambientais que influenciam a motilidade celular em tumores pode-se destacar as proteínas da MEC (Goldbrunner *et al.*, 1988; Guillamo *et al.*, 2001).

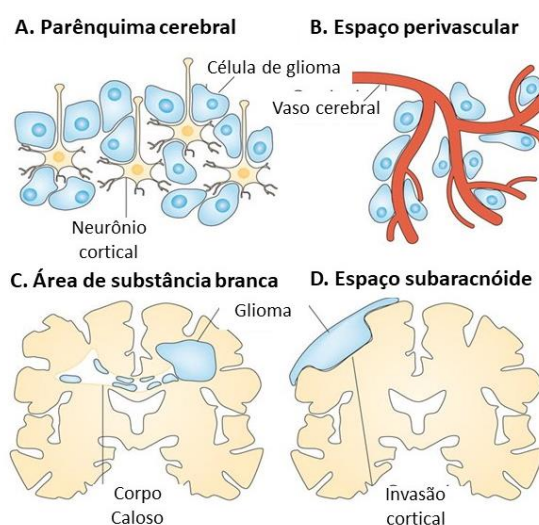


Figura 4. Representação das principais vias de migração dos gliomas. Adaptado de Cuddapah *et al.*, 2014.

Cada uma das principais vias de migração dos gliomas apresenta composição de MEC bastante distinta: a) o parênquima cerebral, principalmente a

área de substância cinzenta, contém ácido hialurônico, proteoglicanos de sulfato de condroitina, agrecan, brevican, proteína de ligação ao hialuronato glial e tenascina R; b) a membrana basal dos vasos sanguíneos (espaço perivascular) contém laminina, fibronectina, colágeno tipos IV e V, vitronectina, entactina e heparan sulfato; c) a área ao redor dos feixes de fibras mielinizadas possui basicamente os mesmos componentes presentes na substância cinzenta e glicoproteínas associadas a mielina (MAG); d) a glia limitante externa possui colágenos tipo I, III e IV, fibronectina, laminina e heparan sulfato (Giese, Westphal, 1996; Guillamo *et al.*, 2001).

Dentre as estruturas supracitadas, os feixes de fibras mielinizadas e as membranas basais vasculares são as vias de migração mais comumente utilizadas pelas células de tumores gliais. Devido ao GBM ser amplamente vascularizado e com grande capacidade angiogênica, o brotamento de capilares vasculares perpendiculares à superfície do tumor pode fornecer uma estrutura principal adicional para a disseminação tumoral (Giese, Westphal, 1996; Guillamo *et al.*, 2001).

1.2.2 Matriz extracelular na migração de gliomas

A MEC consiste em uma complexa rede de macromoléculas que atua como uma interface dinâmica entre as células e seu ambiente extracelular, e desempenha importante papel não apenas no preenchimento dos espaços entre as células, mas também na regulação do equilíbrio homeostático dos tecidos e manutenção das condições adequadas para homeostase celular, controlando a morfologia e fisiologia das células. Além do mais, participa da regulação da motilidade, diferenciação, proliferação, sinalização e sobrevivência celular. A MEC é composta por diversas proteínas, carboidratos e glicoproteínas imersas em um gel constituído de glicosaminoglicanas (GAGs) e proteoglicanas (Huber, O'Day, 2017).

Diferente da matriz de outros tecidos, a MEC do cérebro adulto é escassa e possui uma quantidade insignificante de proteínas fibrilares, como os colágenos. Entretanto, apresenta altas concentrações de GAGs, o que explica sua consistência gelatinosa. Além das GAGs a MEC do cérebro é rica em componentes não-fibrilares como proteoglicanos, glicoproteínas, pequenas proteínas ligantes e proteínas matricelulares (Cuddapah *et al.*, 2014; Krishnaswamy *et al.*, 2019). É composta

majoritariamente por ácido hialurônico, com a presença de proteoglicanos, como os da família do sulfato de condroitina (agrecan, versican, neurocan e brevican), todos importantes durante a fase de desenvolvimento cerebral; e os da família de proteoglicanos ricos em leucina (decorin, biglican, fosfacan, testican, perlecan, distroglican, agrin, claustrin, glipican, etc) (De Luca, Papa, 2016; Jiang *et al.*, 2017).

A presença de proteínas fibrilares no SNC é restrita a áreas como espaço perivascular e glia limitante externa. A membrana basal ao redor dos vasos sanguíneos, em especial, é um excelente substrato para a migração e invasão de gliomas por apresentar pouca resistência e ser enriquecido com colágeno, e glicoproteínas adesivas como laminina, vitronectina e fibronectina (Cuddapah *et al.*, 2014).

Estudos mostram que a MEC ao redor do tumor é relevante para os processos de migração e invasão tumoral. É descrito na literatura que as células de glioblastoma *in vivo* e *in vitro* expressam e secretam proteínas da MEC no microambiente a sua volta, de modo a compensar a carência de substratos que favorecem o processo de migração das células tumorais no parênquima cerebral. Essa matriz é rica em proteínas que aumentam a motilidade celular como laminina, vitronectina, fibronectina e colágeno tipo IV (Vehlow, Cordes, 2013).

A laminina (LAM) é a glicoproteína adesiva mais abundante na membrana basal. As lamininas constituem uma grande família de proteínas que apresentam diferentes isoformas. Cada isoforma é composta de três longas cadeias polipeptídicas, as cadeias α , β e γ , que são unidas por pontes de dissulfeto e contorcidas entre si de modo a formar uma estrutura semelhante a uma cruz, como pode ser observado na Figura 5 (Yao, 2016; Yap *et al.*, 2019).

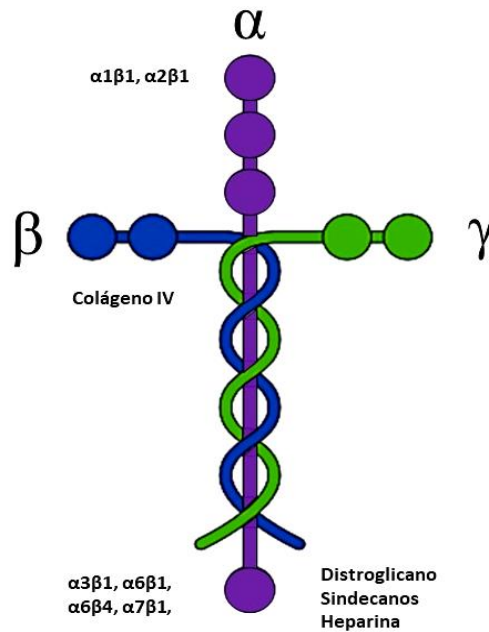


Figura 5. Representação esquemática da estrutura de laminina.

Nos vertebrados foram identificadas cinco cadeias α , três cadeias β e três cadeias γ produtos de diferentes genes, sendo que 16 isoformas de LAM já foram identificadas em mamíferos e outras 4 isoformas foram sugeridas baseado em estudos *in vitro* e *in vivo*, conforme Tabela 1. As lamininas podem se ligar entre si e a diferentes proteínas da MEC como o colágeno tipo IV e o heparan, formando, assim, uma complexa rede proteica. Além de organizar a rede de proteínas presente nas membranas basais, a LAM pode se ligar a receptores celulares (integrinas, distroglicanos ou sindecanos), servindo de ponte entre as células e membrana basal vascular (Durbeej, 2009; Yao, 2016).

Tabela 1. Isoformas de laminina e suas nomenclaturas, baseado em Yao, 2016.

Nomenclatura antiga	Nova nomenclatura	
	Padrão	Abreviada
Laminina-1	Laminina- $\alpha 1\beta 1\gamma 1$	Laminina-111
Laminina-2	Laminina- $\alpha 2\beta 1\gamma 1$	Laminina-211
Laminina-3	Laminina- $\alpha 1\beta 2\gamma 1$	Laminina-121
Laminina-4	Laminina- $\alpha 2\beta 2\gamma 1$	Laminina-221
Laminina-5	Laminina- $\alpha 3\beta 3\gamma 2$	Laminina-332
Laminina-5B	Laminina- $\alpha 3\beta 3\gamma 2$	Laminina-3B32
Laminina-6	Laminina- $\alpha 3\beta 1\gamma 1$	Laminina-311
Laminina-7	Laminina- $\alpha 3\beta 2\gamma 1$	Laminina-321
Laminina-8	Laminina- $\alpha 4\beta 1\gamma 1$	Laminina-411
Laminina-9	Laminina- $\alpha 4\beta 2\gamma 1$	Laminina-421
Laminina-10	Laminina- $\alpha 5\beta 1\gamma 1$	Laminina-511
Laminina-11	Laminina- $\alpha 5\beta 2\gamma 1$	Laminina-521
Laminina-12	Laminina- $\alpha 2\beta 1\gamma 3$	Laminina-213
Laminina-13	Laminina- $\alpha 3\beta 2\gamma 3$	Laminina-323
Laminina-14	Laminina- $\alpha 4\beta 2\gamma 3$	Laminina-423
Laminina-15	Laminina- $\alpha 5\beta 2\gamma 3$	Laminina-523
	Laminina- $\alpha 2\beta 1\gamma 2$	Laminina-212
	Laminina- $\alpha 2\beta 2\gamma 2$	Laminina-222
	Laminina- $\alpha 3\beta 3\gamma 3$	Laminina-333
	Laminina- $\alpha 5\beta 2\gamma 2$	Laminina-522

A LAM participa de vários processos biológicos, como a regulação do ciclo celular, proliferação, adesão celular, espraiamento, polarização, migração, manutenção do fenótipo, resistência a apoptose, metástase tumoral e secreção de proteases. Para desempenhar essas funções, as lamininas interagem com receptores celulares que ativam diversas cascatas de sinalização intracelular. O principal grupo de receptores ligantes de LAM são as integrinas, especialmente as integrinas $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$ (Maltseva, Rodin, 2018; Pereira *et al.*, 2005). Embora as integrinas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$ também possam se ligar a LAM (Durbeej, 2009).

Diversos estudos têm demonstrado o envolvimento de diferentes isoformas de LAM no processo de transformação maligna de células tumorais. Em uma ampla variedade de cânceres os níveis e padrões de distribuição de lamininas são potenciais indicadores prognósticos. Em tumores, as lamininas promovem a adesão

e migração celular, a descontinuidade da membrana basal facilitando o processo de invasão tumoral e formação de metástases intravasculares, a inibição do processo de apoptose estimulado pela perda de contato entre as células e a MEC (*anoikis*), entre outros processos que colaboram para a progressão tumoral (Qin *et al.*, 2017).

A LAM pode ser encontrada na MEC de GBM e sua ação sobre as células tumorais deve-se a preservação de características de células-tronco e aumento da motilidade celular, além de colaborar para o elevado grau de invasividade tumoral (Coniglio, Segall, 2013; Wu *et al.*, 2016). Células de GBM produzem e secretam lamininas no parênquima tumoral de modo independente dos vasos sanguíneos (Tysnes *et al.*, 1999). Kawataki e colaboradores (2007) identificou a produção das lamininas: LAM1, LAM2, LAM5, LAM8 e LAM10 por linhagens de GBM e demonstrou a relação entre o aumento da migração e invasividade associado a expressão de algumas dessas isoformas.

O nível de expressão de lamininas está diretamente relacionado com o grau de malignidade tumoral em gliomas. Além disso, a isoforma de LAM presente no tumor também pode indicar o grau de agressividade, por exemplo, a LAM8 é mais expressa em gliomas de maior grau de malignidade enquanto a LAM9 é mais presente em gliomas menos agressivos (Ljubimova *et al.*, 2001). O aumento da expressão de LAM8 está relacionada a maior disseminação tumoral, menor tempo de ressurgimento do tumor após a cirurgia e, conseqüentemente, menor sobrevivência dos pacientes (Ljubimova *et al.*, 2006). Mahersparan e colaboradores (1997) observou que, entre as proteínas de MEC analisadas, a laminina foi o mais potente estimulador da migração em linhagens de glioma humano.

Além da LAM, os gliomas produzem e secretam colágenos. Os colágenos compõem uma família heterogênea de proteínas composta por diversos tipos como: os colágenos fibrilares, os colágenos de ancoragem e os associados a fibrilas. No SNC, os colágenos são encontrados principalmente nas membranas basais, sendo o mais abundante o colágeno tipo IV (COL4). O COL4 é o segundo componente essencial da lâmina basal madura.

A molécula de COL4 consiste em três longas cadeias proteicas do tipo α sintetizadas individualmente que se unem formando uma estrutura semelhante a uma corda. Há seis isoformas de cadeias α de colágeno tipo IV, o que possibilitaria a formação de mais de 56 isoformas desta proteína. No entanto apenas 3 isoformas foram identificadas até o momento. As moléculas de colágeno interagem entre si

através de seus domínios terminais formando uma rede que proporciona resistência à tração.

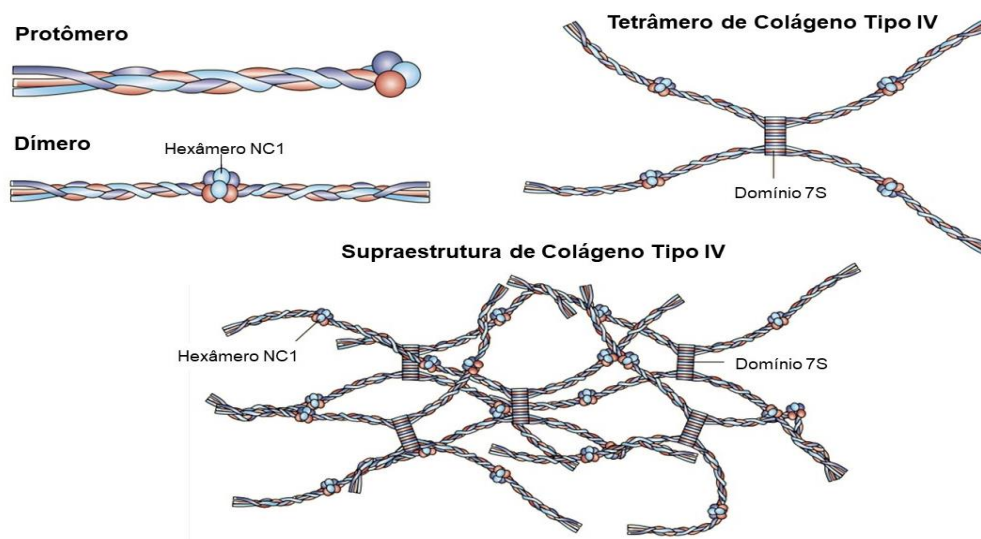


Figura 6. Formação das redes de colágeno tipo IV, Adaptado de Kalluri 2003.

O COL4 participa de vários processos celulares como controle do ciclo celular, proliferação e morte celular (Eyden, Tzaphlidou, 2001; Jiang *et al.*, 2017). A presença de colágenos na MEC de gliomas está intimamente relacionada com o grau do tumor e o nível de invasividade tumoral (Pencheva *et al.*, 2017). COL4 foi identificado em MEC derivada de tecido descelularizado originado de biópsias de pacientes com GBM (Koh *et al.*, 2018). Esferoides de linhagens de GBM humano produziram COL4 *in vitro* quando co-cultivadas com agregados de células cerebrais normais (Knott *et al.*, 1998). Mahesparan e colaboradores (1999) mostraram que COL4 estimulou a migração de células de esferoides originados de 7 das 10 biópsias analisadas de pacientes com GBM.

Entre os substratos de MEC envolvidos no estímulo da migração celular em gliomas destaca-se a fibronectina (FN). A fibronectina é uma glicoproteína adesiva cuja estrutura consiste em um dímero composto por duas subunidades quase idênticas de 250 kDa cada. Essas subunidades são ligadas covalentemente por um par de ligações dissulfeto na região próxima a porção C-terminal. Cada monômero de FN consiste em três tipos de unidades repetitivas denominadas repetições FN, são elas as repetições do tipo I, II e III. Embora as moléculas de FN sejam produtos de um único gene, a proteína resultante pode existir em várias formas que surgem

do *splicing* alternativo de um único pré-mRNA, de modo que pode haver até 20 variantes no FN humano (Pankov, Yamada, 2002).

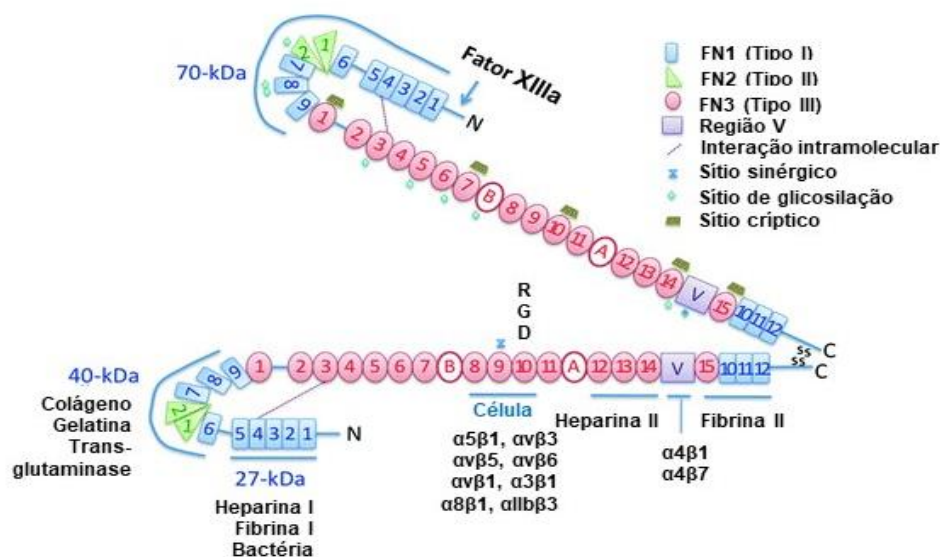


Figura 7. Representação esquemática de fibronectina, adaptado de Xu e Mosher (2017)

A FN possui diversos domínios de ligação em sua estrutura. Estes domínios são responsáveis pela interação da fibronectina com diferentes receptores da superfície celular, assim como, com outros elementos da MEC. A FN pode ser ligante de várias integrinas. Sua longa molécula possui diversos sítios de reconhecimento de integrinas, sendo o mais conhecido a região RGD, que consiste em sequências de aminoácidos arginina (R), glicina (G) e ácido aspártico (D), presente na repetição FN III. Além da região RGD, áreas presentes nas repetições FN I e FN II também podem servir de sítios de ligação de integrinas. A interação de integrinas com esses sítios desencadeiam sinais intracelulares distintos daqueles ativados quando ocorre a ligação de integrinas a região RGD (Pankov e Yamada, 2002).

FN pode se ligar aos colágenos tipo: I, II, III, IV e V. O domínio de ligação ao colágeno inclui as repetições FN I e FN II. A molécula de FN apresenta, também, dois sítios principais de ligação à fibrina (fibrina I e II) presentes na porção N-terminal. Estes sítios são formados pelas repetições do tipo I. Acredita-se que a interação de FN com a fibrina seja importante para a adesão e migração celular (Pankov, Yamada, 2002).

FN medeia uma variedade de interações celulares com a MEC e desempenha papel importante na adesão e migração celular, assim como, no

crescimento e diferenciação de células (Pankov, Yamada, 2002). A FN é expressa no início do desenvolvimento cerebral em um padrão espacial e temporal muito específico. Desempenha importante papel na migração e crescimento neuronal durante o desenvolvimento e na regeneração nervosa após lesão (Venstrom, Reichardt, 1993). Apesar de altamente expressa no cérebro durante o desenvolvimento, a FN é pouco expressa no cérebro normal maduro estando presente apenas nas membranas basais e na glia limitante externa (Giese, Westphal, 1996; Guillamo *et al.*, 2001).

A expressão gênica de FN é maior em amostras de GBM do que no cérebro normal (Lal *et al.*, 1999) e em astrocitomas pilocíticos não invasivos. O que indica que a expressão de FN possui relação direta com o perfil invasivo e grau de malignidade tumoral de astrocitomas (Colin *et al.*, 2006). FN foi encontrada em MEC derivada de tecido descelularizado originado de biópsias de pacientes com GBM (Koh *et al.*, 2018), e foi produzida *in vitro* por linhagens de GBM co-cultivadas com agregados de células cerebrais normais (Knott *et al.*, 1998). Na MEC de GBM a presença de FN é crítica para a manutenção da morfologia, proliferação e diferenciação celular (Gong *et al.*, 2017). Além do mais, FN aumenta a adesão e motilidade celular em gliomas. Sendo, portanto, um potente estimulador da migração celular em GBM tanto de linhagens estabelecidas quanto de culturas primárias (Mahesparan *et al.*, 1997; Mahesparan *et al.*, 1999).

Vitronectina (VTN) é uma glicoproteína adesiva com peso molecular de 75 kDa, predominantemente encontrada no plasma e na membrana basal vascular. A VTN possui uma sequência RGD através da qual medeia a ligação e a propagação de células na MEC através de receptores específicos de integrina. A maior parte da molécula de VTN acomoda seis repetições de hemopexina. Sua estrutura contém duas seqüências consenso para a ligação à heparina. Foi relatado que a VTN se liga ao colágeno por meio de grupos funcionais de duas regiões distintas, uma adjacente à sequência RGD e outra adjacente ao domínio de ligação à heparina. A extremidade C-terminal da VTN acomoda seu local de ligação ao plasminogênio (Schvartz *et al.*, 1999).

Essa glicoproteína desempenha papel importante na inflamação, adesão celular, necrose celular, coagulação sanguínea e regula a angiogênese induzida pelo fator de crescimento endotelial. No SNC, esta molécula é expressa durante o desenvolvimento neural e participa na diferenciação dos neurônios motores da

medula espinhal. A VTN é um dos principais componentes organizadores da MEC e desempenha um importante papel na formação e crescimento tumoral (CHEN *et al.*, 2016).

VTN foi detectada no parênquima tumoral de biópsias de GBM e astrocitoma anaplásico (grau III). Em contrapartida, VTN não foi detectada em biópsias de astrocitomas de baixo grau, cortes de substância branca e cortex cerebral sadio. Dessa forma, pode-se concluir que esta proteína é expressa apenas em astrocitomas mais agressivos e que sua expressão está diretamente relacionada com o grau de malignidade tumoral (Gladson, Cheresch, 1991). Pesquisas indicam que VTN desempenha papéis significativos na progressão de GBM servindo como um importante substrato adesivo (Gladson, Cheresch, 1991; Giese *et al.*, 1994), estimulando a migração celular (Mahesparan *et al.*, 1999) e exercendo efeito anti-apoptótico de maneira dose-dependente (Uhm *et al.*, 1999).

1.2.3 Integrinas em gliomas

Interações entre as células e a MEC são mediadas, principalmente, por uma família de 24 proteínas de adesão transmembranares chamadas integrinas (ITGs). As ITGs são receptores heterodiméricos formados pela combinação de 18 subunidades α e 8 subunidades β conectadas por ligações não covalentes. Cada uma das subunidades das integrinas é composta por um grande domínio extracelular, uma porção intramembranar em forma de hélice de passagem única e um pequeno domínio citoplasmático. As ITGs são responsáveis pela comunicação bidirecional entre o ambiente extracelular e vias intracelulares (Hamidi, Ivaska, 2018; Kechagia *et al.*, 2019).

O estado conformacional determina a afinidade da ITG para proteínas da MEC. A ITG dobrada (fechada) representa a forma inativa, com baixa afinidade por ligantes da MEC, já a ITG estendida (aberta) é a forma ativa e capaz de se ligar a elementos da MEC provocando, assim, sinalização e respostas celulares, vide Figura 9. A interação da ITGs com componentes da MEC pode ocorrer através de sítios de ligação presentes em ambas subunidades da ITG ou por meio de um domínio específico da subunidade α (Hamidi, Ivaska, 2018; Kechagia *et al.*, 2019).

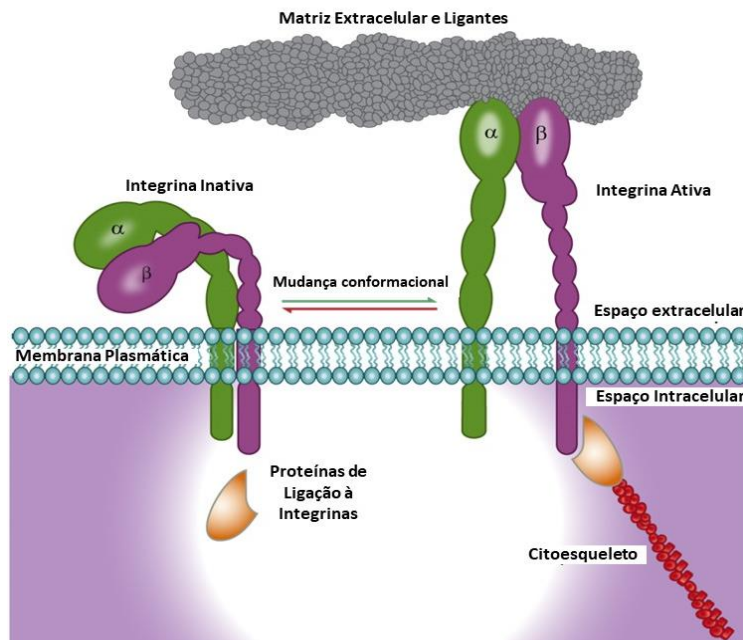


Figura 8. Representação esquemática de integrina inativa e ativa.

Algumas ITGs reconhecem exclusivamente um componente da MEC, por exemplo, a integrina $\alpha 5\beta 1$ reconhece apenas a fibronectina. Enquanto outras ITGs têm a capacidade de se ligar a diferentes proteínas, como a integrina $\alpha v\beta 3$ que pode reconhecer a vitronectina, fibronectina, fibrinogênio e trombospondina. Além disso, um mesmo ligante de MEC pode ser reconhecido por mais de uma ITG, e a ligação de cada ITG ao mesmo ligante pode desencadear vias de sinalização intracelulares distintas. Dessa forma, o padrão de expressão de ITGs na superfície celular é relevante para determinar a resposta celular à estímulos microambientais (Hamidi, Ivaska, 2018).

A ativação da ITG e sua ligação a proteínas da MEC desencadeia o recrutamento de proteínas de sinalização, ancoragem e de citoesqueleto formando um dinâmico complexo proteico nas caudas citoplasmáticas das ITGs que medeiam a adesão celular e regulam aspectos celulares como sobrevivência, migração, polaridade e diferenciação. Alterações na adesão e sinalização desencadeadas pelas ITGs podem promover o surgimento de patologias como doenças cardiovasculares e câncer (Hamidi, Ivaska, 2018).

Em GBM a expressão das subunidades de ITG $\alpha 3$, αv , $\beta 1$ e $\beta 3$ e das ITGs $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ e $\alpha v\beta 8$ estão aumentadas em comparação com o tecido cerebral sadio. Os níveis de expressão das ITGs $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha v\beta 3$,

$\alpha\beta 5$ e $\alpha\beta 8$ estão diretamente relacionados com o grau de malignidade em gliomas. A expressão elevada de $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$, $\alpha\beta 3$ e $\alpha 3\beta 1$ está correlacionada com o pior prognóstico e menor taxa de sobrevivência de pacientes com GBM. As ITGs $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha 6\beta 1$ estão envolvidas com o fenótipo altamente invasivo de células de GBM e a expressão desses receptores aumentou a invasão de células U87MG *in vitro* e *in vivo*. Além disso, $\alpha\beta 3/\alpha\beta 5$, $\beta 1$ estão associadas com a angiogênese em GBM. A ITG $\alpha\beta 3$ está relacionada a resistência a irradiação, enquanto que as ITGs $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ estão superexpressas em células de glioma resistente a múltiplas drogas (Malric *et al.*, 2017; Vehlow, Cordes, 2013). As ITGs relevantes em GBM e que possuem como ligantes as proteínas de MEC laminina, colágeno tipo IV, fibronectina e vitronectina estão listadas na Tabela 3.

Tabela 2. Integrinas em GBM

Integrinas	Ligantes	Papel em GBM
$\alpha 1\beta 1$	Laminina, colágeno IV	Migração Invasão
$\alpha 2\beta 1$	Laminina, colágeno IV	Migração Invasão Resistência a quimioterapia
$\alpha 3\beta 1$	Laminina, Fibronectina e colágeno IV	Migração Invasão Características de células-tronco Resistência a quimioterapia Marcador prognóstico
$\alpha 5\beta 1$	Fibronectina	Migração Invasão Resistência a quimioterapia
$\alpha 6\beta 1$	Laminina	Invasão
$\alpha v\beta 3$	Fibronectina e vitronectina	Migração Invasão Angiogênese Sobrevivência celular Resistência a terapia Marcador prognóstico
$\alpha v\beta 5$	Vitronectina	Marcador prognóstico

1.3 Ciclo-oxigenases

As ciclo-oxigenases (COXs), também chamadas de prostaglandina endoperóxido sintases (PGHS), são enzimas bifuncionais (oxigenase e peroxidase) responsáveis por catalisar a conversão do ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas (PGs) e tromboxano A₂ (TXA₂) (Seo e Oh, 2017). Há três isoformas de COX: ciclooxigenase 1 (COX-1), ciclooxigenase 2 (COX-2) e ciclooxigenase 3 (COX-3) (Wang *et al.*, 2007).

A COX-1 foi purificada a primeira vez em frações de membranas de glândulas vesiculares de bois e ovelhas em meados da década de 1970. É codificada por um gene localizado no cromossomo 9. A proteína madura possui 574 aminoácidos e é expressa constitutivamente em quase todos os tecidos. A COX-1 é uma proteína bastante estável e envolvida na produção de prostanoides necessários para regulação da homeostase vascular, citoproteção gástrica e a respostas a estimulação hormonal (Rouzer, Marnett, 2009; Seo, Oh, 2017; Smith, Murphy, 2016).

A COX-2 foi descoberta em 1991 em células murinas 3T3. Seu gene está localizado no cromossomo 1. Sua expressão ocorre geralmente após estímulos específicos como citocinas, promotores tumorais e fatores de crescimento, sendo a COX-2 considerada a isoforma induzida de COX. Embora a COX-2 esteja geralmente associada a síntese de prostanoides durante processos patológicos como inflamação e tumorigênese, ela é também constitutivamente expressa de modo tecido específica nos rins, trato gastrointestinal, cérebro, aparelho reprodutor feminino, timo e estômago (Rouzer, Marnett, 2009; Seo, Oh, 2017; Smith, Murphy, 2016).

A COX-3 foi identificada em 2002 no córtex cerebral de cachorro e posteriormente no coração e cérebro humanos. É codificada pelo gene da COX-1, sendo que o intron-1 não é removido durante o splicing. A COX-3 é uma proteína de tamanho aproximado de 65 kDa e supostamente ativa no SNC (Chandrasekharan *et al.*, 2002). Porém, a existência de uma terceira isoforma de COX funcional e cataliticamente ativa ainda seja contestada por alguns pesquisadores que acreditam que a COX-3 seja apenas uma variação da COX-1 (Davies *et al.*, 2004; Dinchuk *et al.*, 2003; Kis *et al.*, 2005; Simmons *et al.*, 2004)

A COX-1 e COX-2 de uma mesma espécie têm 60% de homologia. Ambas são proteínas homodímeras de aproximadamente 72kDa. Cada monômero da COX possui três domínios principais:

1. um domínio próximo ao N-terminal semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF);
2. uma região contínua de 70 aminoácidos que serve de domínio de ligação à membrana.
3. um domínio catalítico globular na extremidade C-terminal.

As COXs estão localizadas na superfície luminal do retículo endoplasmático (RE) e ambas superfícies do envoltório nuclear. Elas interagem apenas com uma das superfícies da bicamada lipídica através de quatro hélices curtas de natureza anfipática presentes em seus domínios de ligação à membrana. Embora sejam homodímeros, em solução os monômeros das COXs sofrem mudança conformacional formando heterodímeros conformacionais. Desta forma, em vez de dois sítios catalíticos, um de cada monômero, as COXs possuem um monômero com ação regulatória (monômero alostérico), e outro com atividade catalítica (Smith, Murphy, 2016).

Dentre as diferenças estruturais entre a COX-1 e a COX-2 pode-se citar o que a COX-2 possui uma extensão de 18 aminoácidos na porção C-terminal, que é associada a sua degradação no retículo endoplasmático. Essa característica faz da COX-2 uma proteína menos estável que a COX-1 (Seo, Oh, 2017; Smith, Murphy, 2016). A COX-2 possui também um sítio ativo cerca de 20% maior do que o da COX-1, o que possibilitou o desenvolvimento de inibidores específicos para COX-2 (Smith *et al.*, 2000). A COX-3 possui todas as características catalíticas e os aspectos estruturais mais relevantes das COX-1 e COX-2 (Chandrasekharan *et al.*, 2002).

A COX-1 é expressa e amplamente distribuída no cérebro sadio, sendo prevalente no prosencéfalo onde pode estar envolvida na modulação do sistema nervoso autônomo e processamento sensorial (Vane *et al.*, 1998). Estudos apontam que a expressão de COX-1 é relevante para a progressão de carcinoma de ovário, visto que a inibição seletiva dessa isoforma colaborou para a redução da proliferação celular e aumento da apoptose (Daikoku *et al.*, 2005). Em carcinoma de pulmão de células não pequenas a inibição de COX-1 diminuiu a proliferação celular

(Li *et al.*, 2009). Em gliomas, o aumento da expressão de COX-1 restringiu-se a células do sistema imune como microglia e macrófagos presentes no parênquima tumoral e área de infiltração tumoral, não sendo observada a expressão de COX-1 em células tumorais e nem sua relação com o grau de malignidade tumoral (Deininger *et al.*, 1999).

A COX-2 é encontrada em diversas regiões do cérebro como córtex, hipocampo e hipotálamo, e é produzida por neurônios, astrócitos, células da microglia e células do plexo coroide (Vane *et al.*, 1998). No cérebro o PGH₂ sintetizado a partir da ação da COX-2 é geralmente convertido em PGE₂, de modo que ambas COX-2 e PGE₂ participam da regulação dos processos de aprendizado e memória (Rall *et al.*, 2003; Teather *et al.*, 2002), controle do ciclo sono/vigília (Gerozissis *et al.*, 1995; Hayaishi, Matsumura, 1995) e termorregulação (Ivanov, Romanovsky, 2004).

Em 1999, Deininger e colaboradores identificou pela primeira vez a presença das COXs em gliomas. Foi observado o aumento da expressão de COX-2 em células do sistema imune presentes no tumor, assim como, em células tumorais indicando um possível papel de COX-2 neste tipo tumoral. Desde então, muitos trabalhos tem demonstrado a relação direta da expressão de COX-2 em GBM com a proliferação (Gomes, Colquhoun, 2012; Prayson *et al.*, 2002), fenótipo migratório e invasivo (Gomes, Colquhoun, 2012; Tafani *et al.*, 2011), grau de malignidade tumoral (Joki *et al.*, 2000), recorrência tumoral após radioterapia (Sminia *et al.*, 2005), maior malignidade e pior prognóstico (Panagopoulos *et al.*, 2018; Shono *et al.*, 2001; New, 2004).

1.4 Via das ciclo-oxigenases

Os prostanoides (prostaglandinas e tromboxanos) são formados pela via da COX. Prostanoides são lipídios bioativos semelhantes a hormônios, compostos por uma cadeia de 20 carbonos, que possuem ação autócrina e parácrina. Por isso, diferente dos hormônios liberados na corrente sanguínea, os prostanoides são sintetizados e liberados em praticamente todos os órgãos. Os prostanoides foram descobertos como substâncias com atividades vasoativas no músculo liso do sistema reprodutivo masculino, devido a isso o nome prostanoide (Gomes *et al.*, 2018; Smith, Murphy, 2016).

Os prostanoides coordenam vários processos fisiológicos como relaxamento e contração de músculo liso, regulação da coagulação sanguínea, manutenção da homeostase renal, modulação da resposta imune, inibição ou estimulação de liberação de neurotransmissores, regulação da secreção do trato gastrointestinal, motilidade e proteção da mucosa gastrointestinal. Já em condições patológicas, são envolvidos com inflamação, doenças cardiovasculares e desenvolvimento tumoral (Gomes *et al.*, 2018).

Quando um estímulo externo como bradicinina, angiotensina II, trombina, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), interleucina beta 1 (IL-1 β), citocinas, promotores tumorais ou fatores de crescimento ativam receptores de superfície celular específicos, promovem o aumento da concentração de Ca²⁺ citosólico e consequente ativação de uma ou mais fosfolipases celulares. Embora várias lipases possam participar da mobilização do principal substrato das COXs, o ácido araquidônico (AA), as mais relevantes são a fosfolipase citosólica (cPLA_{2 α}) cálcio dependente e os grupos IIA e V das fosfolipases secretadas (sPLA_{2s}) (Smith, Murphy, 2016).

A isoforma predominante de fosfolipases é a cPLA_{2 α} presente no citosol de células em repouso. O Ca²⁺ presente no citoplasma se liga na região N-terminal de cPLA_{2 α} no domínio CalB, em seguida o complexo Ca²⁺/CalB se liga nas membranas intracelulares, promovendo a translocação de cPLA_{2 α} para as membranas do aparelho de Golgi, RE e envoltório nuclear. A atividade de cPLA_{2 α} é regulada pela fosforilação por uma variedade de quinases. Uma vez ativada a cPLA_{2 α} libera o AA através de hidrólise na posição sn2 dos glicerofosfolipídios localizados na superfície das membranas intracelulares. O AA recém-liberado pode cruzar a bicamada da membrana onde pode entrar no sítio ativo da enzima COX presente na porção luminal das membranas intracelulares. (Gomes *et al.*, 2018; Smith, Murphy, 2016).

As COXs possuem duas atividades enzimáticas diferentes, a de oxigenase e peroxidase. Essas atividades ocorrem em sítios distintos, mas interativos dentro da proteína. Inicialmente, a COX catalisa a formação de um intermediário lipídico instável, a prostaglandina G₂ (PGG₂) a partir do AA e duas moléculas de O₂ numa reação de oxidação. A PGG₂ é rapidamente convertida em PGH₂ pela redução de 2 elétrons do seu grupo 15-hidroperoxil, catalisada pela atividade peroxidase da COX (Gomes *et al.*, 2018; Smith, Murphy, 2016).

A PGH_2 é convertida em prostanoídes biologicamente ativos por sintases específicas. As sínteses das prostaglandinas PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGI_2 a partir de PGH_2 são catalisadas por PGD sintases, PGE sintases, PGF sintases e PGI sintases, respectivamente. Com exceção da $\text{PGF}_{2\alpha}$ as prostaglandinas são formadas a partir de reações de isomerização de PGH_2 . Já o tromboxano A_2 (TXA_2) é sintetizado pela TXA sintase (Gomes *et al.*, 2018; Smith, Murphy, 2016).

Após a síntese os prostanoídes não são armazenados na célula, sendo rapidamente liberados para o meio extracelular por meio de difusão simples através da membrana plasmática ou transportados via transportadores da família ABC. No meio extracelular, os prostanoídes podem se ligar a seus receptores específicos e ativar diversas vias de sinalização intracelulares. Há nove receptores de prostanoídes diferentes, cada um codificado por um gene. A PGD_2 possui dois receptores DP1 e DP2, enquanto que a PGE_2 possui quatro: EP1, EP2, EP3 e EP4. Os receptores de $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 e TXA são, respectivamente, FP, IP e TP. O receptor de TXA_2 pode, também, ser estimulado por PGE_2 , PGI_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Gomes *et al.*, 2018; Smith, Murphy, 2016).

Os prostanoídes também podem se ligar a receptores nucleares, sendo um dos seus principais alvos a família de receptores ativados por proliferadores de peroxissomo (PPARs). Estes receptores estão envolvidos na regulação do metabolismo de lipídios, diferenciação celular e proliferação (Gomes *et al.*, 2018).

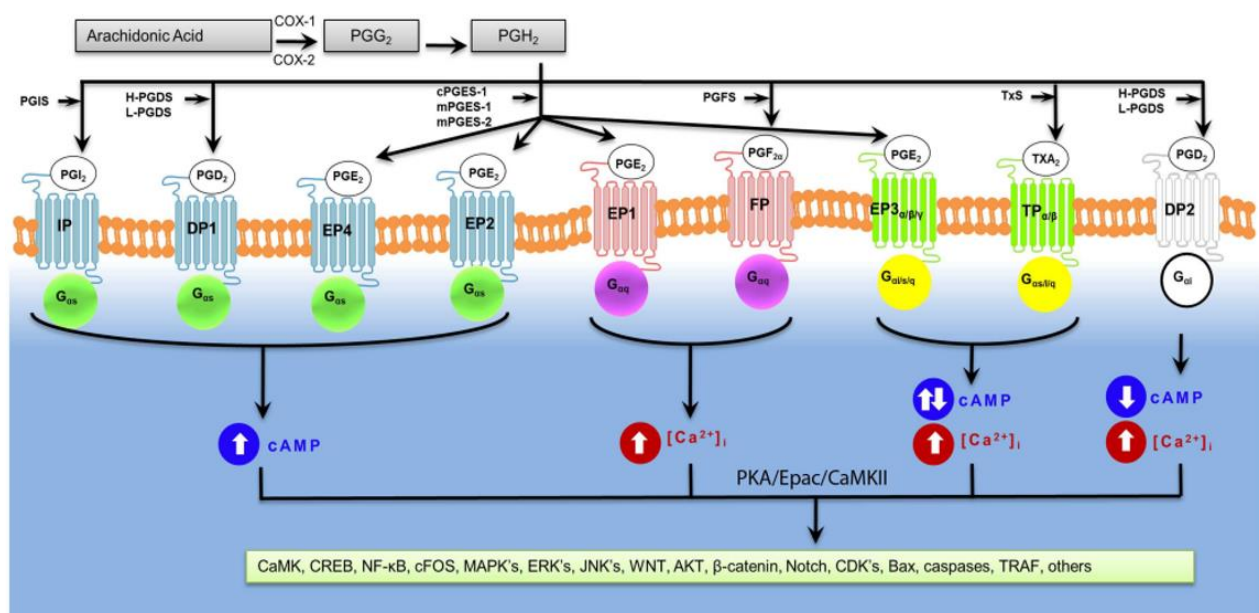


Figura 9. Via das ciclo-oxigenases e mecanismos de transdução de sinal ativados pelos receptores de prostaglandinas, (Mohan *et al.*, 2012).

1.5 Prostaglandina E₂ (PGE₂)

O principal produto da via da COX é a prostaglandina E₂ (PGE₂). PGE₂ é essencial para homeostase e importante mediador imunopatológico em infecções crônicas, regulando vários aspectos no processo inflamatório, incluindo as múltiplas funções de algumas células imunes. Esta prostaglandina apresenta um paradoxo em suas funções, pois por vezes desempenha funções pró-inflamatórias nas fases iniciais da inflamação como a ativação de neutrófilos, macrófagos e mastócitos. Em outros momentos, atua como imunossupressor, suprimindo a imunidade inata e específica a nível molecular e celular (Wang *et al.*, 2017).

A conversão de PGH₂ em PGE₂ ocorre pela ação de uma de suas três sintases específicas a prostaglandina E sintase-1 microsomal (mPGES-1), a prostaglandina E sintase-2 microsomal (mPGES-2) e a prostaglandina E sintase citosólica (cPGES). A mPGES-2 e a cPGES são expressas constitutivamente, enquanto que a mPGES-1 é a principal enzima para a conversão *in vivo* de PGH₂ em PGE₂ em processos fisiopatológicos. A mPGES-1 é geralmente co-regulada com a COX-2, incluindo no cérebro, devido a isso o PGE₂ é o principal prostanóide oriundo da ativação da COX-2 no cérebro e em processos fisiopatológicos como inflamação, febre, dor, reparação tecidual e câncer. Enquanto a mPGES-1 atua, preferencialmente, na conversão de PGH₂ em PGE₂ associada a COX-2, as sintases mPGES-2 e cPGES são associadas, principalmente, a atividade da COX-1 (Seo, Oh, 2017; Smith, Murphy, 2016).

As sintases de PGE₂ microsomais pertencem a família de proteínas associadas a membrana no metabolismo de eicosanóides e glutatona (MAPEG). A mPGES-1 é uma proteína de peso molecular entre 15 e 18 kDa, enquanto a mPGES2 tem mais de 30 kDa. A cPGES é uma proteína citosólica de 26 kDa que requer a glutatona como cofator para sua atividade enzimática. O papel desta enzima na produção de PGE₂ não está bem estabelecido, já que o knockout de cPGES não leva a diminuição significativa da produção total de PGE₂ (Seo, Oh, 2017; Smith, Murphy, 2016).

Após sua síntese PGE₂ é exportado para o meio extracelular, na maioria das vezes, via transportadores da família ABC. Uma vez no ambiente extracelular, a PGE₂ pode se ligar a um dos seus quatro receptores de membrana específicos EP1, EP2, EP3 e EP4 desencadeando diversas vias de sinalização. Esses receptores

podem ser divididos em 3 classes: 1) os receptores acoplados a proteína G estimulatória (Gs), são eles EP2 e EP4; 2) receptor acoplados a proteína Gq, EP1; e o 3) receptor acoplado a proteína G inibitória (Gi), EP3. Quando EP2 ou EP4 são ativados ocorre o estímulo da produção de AMP cíclico (AMPc) pela ação da adenilato ciclase (AC), essa ativação leva a alterações como relaxamento dos vasos sanguíneos. Em contrapartida, quando EP1 é ativado, ocorre o aumento intracelular de Ca^{2+} acarretando em vasoconstrição. Já o receptor EP3 promove a inibição da AC levando a uma redução da concentração de AMPc (Gomes *et al.*, 2018).

Os níveis de PGE_2 são controlados não apenas pela regulação de sua síntese, mas também pela sua degradação. O passo inicial para a inativação de PGE_2 consiste em sua oxidação para formação do componente 15-keto- PGE_2 em uma reação catalisada por uma família de enzimas 15-hidroxi prostaglandinas desidrogenases. O catabolismo envolve a redução da dupla ligação entre o carbono 13 (C-13) e o carbono 14 (C-14), seguida de ω - e β -oxidação. As enzimas 15-hidroxi prostaglandinas desidrogenases são reconhecidas como sendo supressoras tumorais por promoverem a redução dos níveis de PGE_2 (Smith, Murphy, 2016).

Diversos estudos têm demonstrado a participação de PGE_2 em diferentes mecanismos envolvidos na progressão de vários tipos câncer como o de colón (Wang *et al.*, 2005), pulmão (Krysan *et al.*, 2005), mama (Zhou *et al.*, 2005) e cérebro (Gomes, Colquhoun, 2012). Em gliomas, está diretamente relacionado com o grau de malignidade tumoral, estímulo da proliferação e sobrevivência celular (Brocard *et al.*, 2015; Gomes, Colquhoun, 2012), aumento da migração (Gomes e Colquhoun, 2012) e radio-resistência (Huang *et al.*, 2015; Matsuo *et al.*, 2004).

Foi observado o aumento da expressão das sintases de PGE_2 mPGES-1, mPGES-2 e cPGES em amostras de gliomas de pacientes, assim como, a correlação da expressão dessas enzimas com o grau de malignidade tumoral. A síntase mPGES-1 tem maior expressão em gliomas de grau II recorrentes (Mattila *et al.*, 2009). Nosso grupo de pesquisa, constatou que o aumento da expressão gênica de mPGES-1 está diretamente relacionado com o menor tempo de sobrevida dos pacientes com GBM. Da mesma maneira, a diminuição da expressão de 15-HPGD está associada a menor sobrevida destes pacientes (Panagopoulos *et al.*, 2018).

1.6 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINES)

A síntese de prostaglandinas pode ser inibida por anti-inflamatórios esteroides ou anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). Os anti-inflamatórios esteroides inibem apenas a COX-2 bloqueando sua síntese a nível transcricional (Smith e Murphy, 2016). Os AINEs clássicos não seletivos inibem as duas isoformas de COX através de um das três diferentes formas: 1) modificação covalente (ex. a aspirina), 2) ligação rápida e reversível (ex. ibuprofeno) ou 3) ligação rápida e de menor afinidade, seguida de ligação dependente do tempo, alta afinidade e ligação lentamente reversível (ex. flurbiprofeno) (Vecchio, Malkowshi, 2012).

As COX-1 e COX-2 são enzimas que apresentam 61% dos aminoácidos idênticos e homologia de 90% dos aminoácidos presentes no sítio catalítico. Devido a isso, há poucos alvos com potencial para a inibição seletiva de uma das isoformas. Em COX-1 a isoleucina na posição 523 foi substituída por uma valina em COX-2 e essa diferença estrutural consiste no principal alvo dos inibidores seletivos (Figura 10). Outra diferença entre as enzimas que possibilitou o desenvolvimento de fármacos para a inibição específica de COX-2 foi a ausência de um grupo metil no sítio ativo dessa isoforma. Desse modo, o sítio catalítico da COX-2 é cerca de 20% maior do que o da COX-1 o que faz com que drogas volumosas como o rofecoxibe e celecoxibe, que apresentam três anéis cíclicos em suas estruturas, não consigam acessar o sítio de COX-1 (Hawkey, 2001).

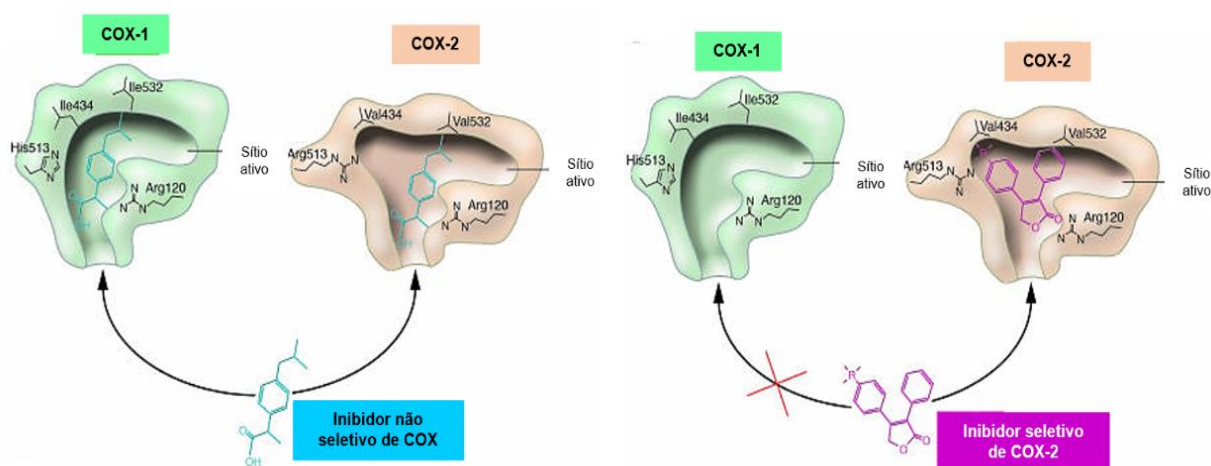


Figura 10. Representação esquemática das diferenças estruturais entre os canais de ligação ao substrato da COX-1 e COX-2 que permitiram o desenho de inibidores seletivos, adaptado de Grosser et al., 2006.

A aspirina é o único AINE que inibe a enzima COX de maneira irreversível, para isso a aspirina se liga ao sítio ativo da COX e acetila a serina 530 (Ser530) e essa acetilação interfere na ligação do AA. No entanto, a COX-2 mantém a capacidade de catalisar a oxidação de AA levando a formação do ácido 15-hidroperóxido eicosatetraenoico (15-HETE) em vez de PGG₂. Esse intermediário lipídico serve de substrato para a via das lipoxigenases (LOX), formando lipídios poli-hidroxilados conhecidos como lipoxinas e resolvinas desencadeadas por aspirina. Esses lipídios tem ação anti-inflamatória que auxiliam nos efeitos clínicos da aspirina (Rouzer, Marnett, 2009).

O Ibuprofeno (IBP) é um AINE que inibe a COX quase que instantaneamente e de maneira reversível. Para que haja inibição da atividade catalítica de COX o IBP deve se ligar a ambos monômeros da enzima. O IBP é rapidamente removido do sítio ativo de COX quando as concentrações da droga diminuem (Varrassi *et al*, 2019).

O uso AINEs inespecíficos ocasionou efeitos colaterais como úlceras gástricas, falência renal aguda, falência renal crônica, hipertensão, nefrite intestinal crônica, retenção de sódio e fluidos (Balley *et al.*, 2018; Hawkey, 2001), infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e risco de mortalidade aumentada. A ocorrência desses efeitos adversos tornou necessário o desenvolvimento de fármacos capazes de inibir apenas uma das duas isoformas de COX (Dubois *et al.*, 1998).

Diferenças estruturais entre as duas isoformas de COX, como o tamanho do sítio catalítico e os resíduos de aminoácidos isoleucina (Ile) em COX-1 e valina (Val) em COX-2, possibilitou o desenvolvimento de fármacos para a inibição de cada isoforma isoladamente (Seo, Oh, 2017). Como exemplo, pode-se citar inibidores como o SC-560 possuem maior afinidade por COX-1 e inibem especificamente essa isoforma quando administrados em baixas concentrações. Uma nova linha de AINEs, chamados de coxibes, foi desenvolvida visando a redução dos efeitos indesejáveis através da inibição específica da COX-2. Exemplos de AINEs inibidores específicos da COX-2 são o celecoxibe e o NS-398.

Na época vários estudos mostraram que há alta expressão de COX-2 em vários tipos de câncer e houve vários estudos clínicos em larga escala explorando os benefícios do uso crônico de celecoxibe ou rofecoxibe para a prevenção da recorrência de vários tipos de tumor, incluindo pólipos de cólon e glioblastoma.

Esses estudos, confirmaram o valor dos coxibs para este propósito, porém revelaram o aumento significativo da toxicidade cardiovascular associada ao uso crônico. Neste período, rofecoxibe e valdecoxibe foram retirados do mercado (Rouzer, Marnett, 2009).

Pesquisas têm sido desenvolvidas, buscando-se uma nova classe de AINE que module a formação de prostaglandinas através da modulação da atividades das sintases específicas. Uma alternativa que tem sido bastante estudada é a inibição da sintase de PGE₂ (principal mediador lipídico em processos patológicos) mPGES-1. Com a inibição de mPGES-1 acredita-se que haverá redução de efeitos colaterais cardiovasculares devido essa enzima não alterar a produção de PGI₂, uma prostaglandina importante para a manutenção da homeostase cardiovascular. Um exemplo de inibidor específico de mPGES-1 amplamente utilizado em pesquisas científicas é a droga CAY10526.

1.7 Justificativa

Neste estudo, hipotetizamos que as enzimas COX-1 e COX-2 regulam, através da ação de PGE₂, a expressão de proteínas da MEC, assim como, de seus respectivos receptores a fim de promover a migração e invasão celular em GBM. Para investigar se a inibição das COXs reduzem a migração celular e se a inibição farmacológica da síntase específica de PGE₂ (prostaglandina E sintase-1 microsossomal) apresenta efeitos similares, tratamos as linhagens de glioblastoma humano U87MG e T98G com o inibidor inespecífico de COX (ibuprofeno), o inibidor seletivo de COX-1 (SC560), o inibidor seletivo de COX-2 (NS298), o inibidor da mPGES-1 (CAY10526) e com PGE₂ exógeno. Posteriormente, observamos os efeitos de cada tratamento sobre a migração celular e expressão das proteínas de MEC: colágeno tipo IV (COL4), fibronectina (FN), expressão de vitronectina (VTN) e laminina (LAM), assim como, seus receptores integrinas α v (ITGAV), α 3 (ITGA3), α 5 (ITGA5), β 1 (ITGB1) e β 3 (ITGB3).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel das COX-1 e COX-2, mPGES-1 e PGE₂ na migração celular e na expressão de integrinas e proteínas da matriz extracelular em linhagens de glioblastoma humano.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a expressão gênica, por RT-qPCR, das proteínas de matriz extracelular colágeno tipo IV, laminina, vitronectina e fibronectina, assim como, das integrinas α_v , α_3 , α_5 , β_1 e β_3 em células U87MG e T98G tratadas com inibidor inespecífico de COX (ibuprofeno), inibidor de COX-1 SC560, inibidor de COX-2 NS398, inibidor de mPGES-1 CAY10526 e PGE₂ exógeno.
- Analisar a expressão proteica, por *Western blot*, das proteínas de matriz extracelular colágeno tipo IV, laminina, vitronectina e fibronectina, assim como, das integrinas α_v , α_3 , α_5 , β_1 e β_3 em células U87MG e T98G tratadas com ibuprofeno, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂.
- Avaliar a migração das células U87MG e T98G tratadas com ibuprofeno, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂, pelo ensaio de fechamento de ferida.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura Celular

Duas linhagens celulares de glioblastoma humano foram utilizadas neste projeto. Células T98G foram gentilmente doadas pela Dr^a Silvy Stuchi Maria-Engler e as células U87MG foram cedidas pelo Dr. Carlos Frederico Martins Menck ambos docentes da Universidade de São Paulo.

As linhagens selecionadas apresentam características distintas entre si. As células U87MG são diploides, selvagens para o gene *TP53*, apresentam mutação para *PTEN* e são capazes de formar tumores altamente invasivos em camundongos (ATCC[®] HTB-14[™]; CLARK et al., 2010). Enquanto que as células T98G apresentam mutação para o gene *TP53*, são selvagens para o gene *PTEN*, além de serem em sua maioria hiperpentaplóide. A linhagem T98G é altamente invasiva quando cultivada em matrigel, porém é incapaz de formar tumores em camundongos atímicos (ATCC[®] CRL-1690[™]). Ademais, essa linhagem celular apresenta alta resistência a drogas como a temozolomida (TMZ) (SOUSA et al., 2015).

Ambas linhagens foram cultivadas em meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Invitrogen, CA - EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (60µg/mL de estreptomicina, 60U/mL de penicilina). As células foram mantidas em estufa à 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. Após atingir de 80 a 90% de confluência as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS), incubadas em solução de tripsina (tripsina 0,05%, EDTA 1mM e NaCl 0,9%), seguido de inativação com DMEM acrescido de 10% de SFB e posteriormente centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em DMEM com 10% de FBS. A suspensão de células foi distribuída em frascos de cultura ou utilizada para plaqueamento de experimentos. O congelamento do estoque de células foi realizado em meio DMEM contendo 20% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

3.2 Curvas de crescimento celular

As linhagens U87MG e T98G foram plaqueadas em placas de 24 poços nas concentrações de 1×10^4 , 3×10^4 , 5×10^4 e 7×10^4 células por poço em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB. As placas foram mantidas em estufa à

37°C e atmosfera com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 24 horas após o plaqueamento. Após os períodos de 24, 48 e 72 horas (h) as células foram lavadas com tampão PBS, tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer. O experimento foi realizado 3 vezes em triplicata para cada linhagem celular.

3.3 Curvas de dose-resposta

A fim de verificar o efeito dos tratamentos sobre o número de células viáveis das linhagens U87MG e T98G foram realizadas curvas de dose-resposta para o inibidor inespecífico de COX-1 e COX-2, Ibuprofeno (IBP) (Cayman Chemicals); inibidor de mPGES-1 CAY10526 (Cayman Chemicals) e PGE₂ exógeno (Cayman Chemicals).

Células foram plaqueadas em triplicata na concentração de 2×10^4 células por poço em placas de 24 poços, em 500 µl de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As placas foram mantidas em cultura por um período de 24h, quando se trocou o meio de cultivo por um meio contendo os tratamentos supramencionados. Para cada tratamento foram testadas quatro concentrações, sendo as concentrações de IBP utilizadas nas células U87MG de 25 µM, 50 µM, 75 µM e 100 µM, e em células T98G de 50 µM, 100 µM, 150 µM e 200 µM. Para PGE₂ foram utilizadas as concentrações de 0,1 µM, 1 µM, 5 µM e 10 µM para ambas linhagens. O inibidor CAY10526 foi testado nas concentrações de 10 µM, 20 µM, 30 µM e 40 µM nas duas linhagens estudadas.

O meio de cultura foi trocado a cada 24h, durante o período de 72h, por outro contendo os tratamentos nas concentrações supracitadas ou o veículo da droga (etanol ou DMSO) no volume correspondente a maior concentração testada. Utilizou-se, também, um controle que foi exposto apenas ao meio de cultura. Após cada período de tratamento, as células foram lavadas com tampão PBS, incubadas em solução de tripsina seguida de inativação com DMEM suplementado com 10% de SFB e coradas com azul de tripan 0,04%. A contagem do número de células viáveis foi realizado em câmara de Neubauer e visualização por microscopia de contraste de fase. Esse experimento foi realizado três vezes.

3.4 Tratamentos das linhagens celulares

Para a realização dos experimentos subsequentes as células U87MG foram tratadas com 100 μM de IBP ou 10 μM de PGE_2 pelo período de 72h ou 20 μM de CAY10526 por 48h. Enquanto que as células T98G foram tratadas com 200 μM de IBP ou 10 μM de PGE_2 por 72h ou 25 μM de CAY10526 por 48h. Ambas linhagens foram tratadas com 50 μM de SC560 ou 50 μM de NS398 pelo período de 48h. Os períodos e concentrações para as drogas SC560 e NS398 foram escolhidos de acordo com experimentos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa. A cada 24h o meio de cultura foi trocado por outro contendo os tratamentos nas mesmas concentrações supracitadas ou o veículo (etanol ou DMSO).

Para a análise da morfologia celular as células foram tratadas nas mesmas concentrações estabelecidas de cada tratamento por um período de 24h.

3.5 Análise de expressão gênica por RT-qPCR

3.5.1 Extração de RNA total

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços na concentração de 8×10^4 células por poço em 2 ml de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e mantidas em cultura por 24h. Após esse período as células foram tratadas conforme descrito na seção 3.4.

Ao fim do período de tratamento as células foram coletadas com solução de tripsina seguida de inativação com DMEM suplementado com 10% de SFB e centrifugadas, o sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas com PBS e submetidas a uma nova centrifugação, o PBS foi descartado, esse procedimento foi realizado duas vezes. Após as lavagens com PBS, as células foram lisadas com 1 ml do reagente TRIzol (Invitrogen) e armazenadas à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até o momento da realização da extração do RNA total.

A extração de RNA total foi realizada através da técnica de fenol-clorofórmio de acordo com o descrito por Chomczynski and Sacchi (1987). As amostras lisadas com TRIzol foram descongeladas em temperatura ambiente (TA) por 5 minutos (min). Após esse tempo, foi adicionado 200 μl de clorofórmio e as amostras foram reservadas por 3 min. em T.A. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm (rotações por minuto) durante 15 min. à $4\text{ }^\circ\text{C}$. A fase aquosa foi coletada

e transferida para tubos de 1,5 ml limpos. Em seguida, foram adicionados 500 µl de isopropanol à fase aquosa e as amostras foram agitadas por inversão e mantidas em T.A. por 10 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 1 ml de etanol 95%. O precipitado foi ressuspenso por inversão e, posteriormente, centrifugado à 7.500 rpm a 4°C por 5 min. Após a centrifugação o etanol foi descartado e o precipitado foi submetido a um novo ciclo de lavagem com etanol 95% seguido de centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA total foi seco ao ar livre em T.A. e, por fim, ressuspenso em 30 µL água DEPC (dimetil pirocarbonato) inativada. O RNA foi quantificado em equipamento Epoch. A pureza do RNA foi confirmada por espectrofotometria utilizando o cálculo da razão entre A260 nm e A280 nm, sendo o RNA considerado adequado para a realização dos experimentos quando o resultado da razão A260/A280 ficou entre 1,8 e 2. O RNA total foi armazenado a -20 °C até o momento da síntese de DNA complementar (cDNA).

3.5.2 Síntese de DNA complementar

A síntese de cDNA foi realizada através da técnica da reação da transcriptase reversa seguida de reação da cadeia da polimerase (RT-PCR), utilizando a enzima MMLV- transcriptase reversa (Invitrogen®). Para isso foram adicionados 2 µL de Random Primer®, 2 µL de solução de dNTP (10 mM), 2 µg do RNA de interesse e o volume de água ultrapura autoclavada necessário para completar 12 µL de solução em cada tubo de reação. A solução foi misturada e então aquecida a 65 °C por 5 min. em um termociclador. Imediatamente após o período de incubação a 65 °C as amostras foram acondicionadas em gelo. Em cada tubo de reação foram adicionados 4 µL de tampão 5X First-Strand, 2 µL de 0,1M de Ditioneitol (DTT) e 1 µl de inibidor de RNase (20U/µl). As amostras foram misturadas e incubadas no termociclador a 37 °C por 2 min. Posteriormente, as amostras foram colocadas no gelo e 1 µL da enzima MMLV-RT foi adicionado em cada tubo. As amostras foram misturadas e submetidas a ciclos com as seguintes temperaturas e tempos: 25 °C por 10 min., 37 °C por 50 min. e 70 °C por 15 min. A amplificação e a integridade dos cDNAs resultantes foi confirmada por eletroforese (100V) em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, o resultado foi

visualizado no sistema de captura de imagens Gene-box. Os cDNAs foram armazenados a -20°C.

3.5.3 Desenho de primers

Os primers utilizados neste trabalho foram desenhados com base nas sequências disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) para os genes das proteínas de matriz extracelular laminina (subunidade $\gamma 1$), fibronectina, vitronectina e colágeno tipo IV, assim como, para os genes dos receptores integrina αv , integrina $\alpha 3$, integrina $\alpha 5$, integrina $\beta 1$ e integrina $\beta 3$.

Para o desenho foi utilizado o programa PerlPrimer V1.1.21 descrito por Marshall, 2004. A especificidade dos oligonucleotídeos desenhados foi testada *in silico* através do programa PerlPrimer e da ferramenta Primer Blast do National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Todos os primers foram obtidos da *Thermo Fisher Scientific* do Brasil.

3.5.4 Teste de temperatura dos primers

O teste para a escolha da temperatura de anelamento ideal para cada par de oligonucleotídeo desenhado foi realizado através da reação de PCR convencional. Para cada primer foram testadas quatro temperaturas: 54,2 °C; 56,5 °C; 59,1 °C e 61,8 °C e primers para o gene *TBP* (*TATA binding protein*) foram utilizados como controle positivo da reação. O controle negativo foi realizado, substituindo-se o volume de cDNA por água ultrapura autoclavada.

A reação de RT-PCR foi realizada utilizando-se os reagentes da Platinum TAQ DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific). A solução de reação foi preparado com 0,5 μ l de solução de dNTP (10 mM), 0,75 μ l de $MgCl_2$ (1,5 mM), 5 μ l de PCR Buffer 10X, 1 μ l de cada primer (10 mM), 0,25 μ l da enzima Platinum TAQ DNA polimerase, 1 μ l de cDNA e água ultrapura no volume suficiente para completar 25 μ l de solução em cada tubo de reação.

As amostras foram colocadas em termociclador e submetidas a 40 ciclos de PCR nas seguintes condições: 95 °C por 1 min (desnaturação), temperatura de anelamento a ser testada por 1 min, 72 °C por 1 min (extensão). Após realização de 40 ciclos de PCR convencional todas as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% a 75 Volts, exceto a amostra do gene de integrina αv cuja

eletroforese foi realizada em gel de agarose 2% a 100V. O resultado da eletroforese foi visualizado no sistema de captura Gene-box.

A escolha da temperatura de anelamento ideal para cada par de primer foi baseada na intensidade das bandas observadas no gel de agarose, como demonstrado na Figura 1. Primers foram considerados adequados para a etapa de padronização por PCR em tempo real se não apresentaram mais que uma banda no gel de agarose (específico) e amplicons de tamanho superior a 300 pb (pares de base).

3.5.5 Teste de concentração dos primers

Para verificar a concentração ideal de primers a ser utilizada nas reações de PCR em tempo real pelo método SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), foram utilizadas três concentrações de primers em reações de RT-qPCR, sendo elas 200 nM, 400 nM e 800 nM. Para isso utilizou-se 6 µl de SYBR Green, 1,5 µl de cada primer diluído e 3 µl de cDNA de interesse (5 ng), sendo o volume final da reação de 12 µl. As reações foram realizadas em duplicata no equipamento 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) nas seguintes condições: 50 °C por 2 min., 95 °C por 10 min (ativação), 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos (seg) (desnaturação) e 56,5 ou 59,1 °C - de acordo com o resultado do teste de temperatura - por 1 min (anelamento e extensão). Os controles negativos das reações foram feitos substituindo o volume de cDNA por água ultrapura autoclavada. Primers para o gene de TBP foram utilizados na concentração de 200 nM, como controle positivo da reação. A escolha da concentração de primers adequada para a realização de PCR em tempo real baseou-se na concentração mínima de primers necessária para a ocorrência de amplificação dos genes de interesse, já que quanto maior a concentração de primers utilizada na reação, maior a chance da ocorrência de dímeros de primer. Para tanto, a curva de amplificação foi analisada observando-se o número de ciclos (CT) necessários para que a fluorescência do reagente SYBR Green, associado ao produto de amplificação (amplicon) atingisse o limiar de detecção do aparelho (Threshold). A menor concentração de primers que apresentou o menor valor de CT foi escolhida.

Além da concentração de primer, a especificidade dos primers nas reações de RT-qPCR também foi avaliada através da análise da curva de dissociação. A presença de um pico único na curva de dissociação é imprescindível nas reações de RT-qPCR já que indica a especificidade do primer. Todos os primers utilizados para a quantificação relativa da expressão dos genes alvo deste projeto apresentaram os parâmetros necessários para a realização de PCR em tempo real.

3.5.6 Teste de eficiência dos primers

A eficiência de amplificação dos primers utilizados nas reações de RT-qPCR deve ser calculada, já que esse valor é utilizado para o cálculo da expressão gênica relativa. Para a realização do teste de eficiência dos oligonucleotídeos foram realizadas diluições seriadas de cDNA nas seguintes concentrações: 5 ng/μl, 2,5 ng/μl, 1,25 ng/μl, 0,625 ng/μl e 0,3125 ng/μl. As reações aconteceram em duplicata para cada concentração de cDNA nas mesmas condições supramencionadas e utilizando-se as temperaturas de anelamento e concentrações de primers estabelecidas nas etapas anteriores.

Utilizando-se os valores médios dos CTs (Cycle Threshold) obtidos para cada concentração de cDNA testada, foi obtida uma curva padrão para cada par de primer. Com essa curva padrão obtivemos a regressão linear de uma reta e um valor de coeficiente angular. O coeficiente angular da reta foi utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação segundo a fórmula:

$$E=10^{-1/\text{slope}}$$

onde: E= eficiência de amplificação e slope = coeficiente angular da reta.

Aceitou-se valores de eficiência entre 1,8 e 2,1 (Rasmussen, 2001).

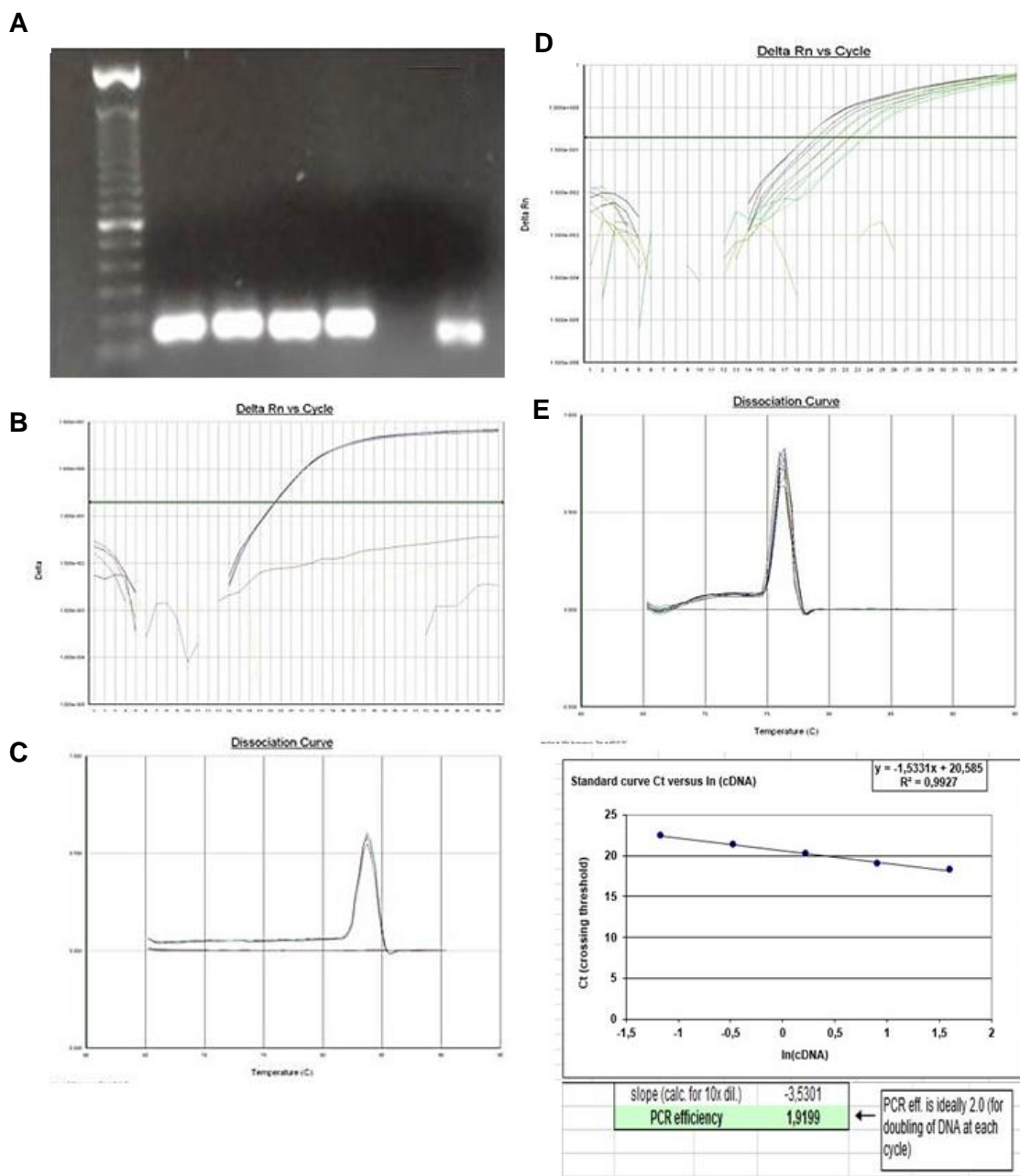


Figura 11. Padronização de primers para RT-qPCR. **A.** Teste de temperatura dos primers para o gene de ITG α 3. Bandas da esquerda para direita representam as amostras submetidas a PCR convencional nas temperaturas 54,2°C, 56,5°C, 59,1 °C e 61,8°C, respectivamente, seguidas do controle negativo e o controle endógeno (TBP) **B.** Curva de amplificação do teste concentração de primers de ITG α 3 por RT-qPCR **C.** Curva de dissociação do teste concentração de primers de ITG α 3 por RT-qPCR **D.** Curva de amplificação do teste eficiência dos primers de ITG β 1 por RT-qPCR. **E.** Curva de dissociação do teste eficiência de primers de ITG β 1 por RT-qPCR. **F.** Curva padrão dos primers de ITG α 3.

Curva de concentração de primers por RT-qPCR

3.5.7 Reação de PCR em tempo real

A quantificação da expressão dos genes alvo deste projeto foi realizada pelo método SYBR Green, conforme descrição anterior. Utilizou-se os cDNAs de

interesse na concentração de 5 ng/μl e os primers específicos nas condições estabelecidas durante a padronização, vide Tabela 1. Em todas as reações, utilizaram-se primers para TBP como controle endógeno para normalização das amostras (Panagopoulos *et al.*, 2018).

Tabela 3. Primers utilizados na reações de RT-qPCR

Gene alvo	Sequências (5'-3')	Temperatura de anelamento	Concentração	Amplicon
Laminina (γ1)	FW: TCCCAAAGTTCTCAAGTCCT RV: GTCCATTACATTTACATCTGCCAC	59,1 °C	400 nM	74 pb
Fibronectina	FW: CAAGTATGAGAAGCCTGGGTCT RV: TGAAGATTGGGGTGTGGAAG	59,1 °C	200 nM	213 pb
Vitronectina	FW: CTCTGGATGGGTTACAGGT RV: GCCGCATCTACATCTCAGG	59,1 °C	200 nM	250 pb
Colágeno IV	FW:ATCACGAAATGACTACTCGTACT G RV: CACAGCACACCTACTAATAAATGG	59,1 °C	200 nM	109 pb
Integrina αv	FW: GAAAAGAATGACACGGTTGC RV: AGTGATGAGATGGTCCCGCT	59,1 °C	200 nM	51 pb
Integrina α3	FW: CCTGCATCTCTGTGAAGCCTC RV: CCAGAATTGGTCCCCTCCTC	59,1 °C	200 nM	155 pb
Integrina α5	FW: TCGGGGGCTTCAACTTAGAC RV: AACTGACCCCGTCTGTTT	59,1 °C	200 nM	112 pb
Integrina β1	FW: GTGGTTGCTGGAATTGTCTTATT RV: TTTCCCTCATACTTCGGATTGAC	59,1 °C	200 nM	189 pb
Integrina β3	FW: TAGAAGAGCCAGAGTGTCCTC RV: GTGATGAGGAGTTTCCAGATGAG	59,1 °C	400 nM	115 pb
TBP	FW: CCACTCCACTGTATCCCTCC RV: GACTGTTCTTCACTCTTGGCT	56,5 °C	200 nM	286 pb

Ao término das reações, os valores referentes aos Cts das amostras tanto para o gene alvo quanto para o controle endógeno foram coletados e o cálculo da expressão gênica diferencial foi realizado de acordo com a fórmula descrita por Livak e Schmittgen (2001).

$$\Delta CT = CT_{\text{alvo}} - CT_{\text{endógeno}} \quad \Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{tratado}} - \Delta CT_{\text{controle}}$$

Expressão diferencial = $E^{-\Delta\Delta CT}$, onde E= valor da eficiência do par de primers do gene alvo. Esse experimento foi realizado três vezes.

3.6 Western blot

Visando analisar a influência dos tratamentos na expressão proteica das moléculas de matriz extracelular e integrinas alvo deste projeto, células U87MG e T98G foram plaqueadas em frascos de cultura de 25 cm² na concentração de 2,5 x 10⁵ células em 3 ml de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Os frascos foram mantidos em estufa à 37°C e atmosfera com 5% de CO₂ por 24h. Após esse período o meio de cultivo foi trocado por outro contendo os tratamentos discriminados na seção 3.4.

Depois do período de tratamento as células foram lavadas três vezes com tampão PBS gelado e lisadas com 40-60 µl de tampão de lise (10 mM TrisBase, 100 mM NaCl, 1 M EDTA, 1% Triton, inibidor de protease, pH 7.6) em gelo por 30 min. Posteriormente, os lisados celulares foram coletados utilizando-se raspador de células e centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados, transferidos para tubos limpos e submetidos a quantificação total de proteínas através do método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Após a quantificação, as amostras foram misturadas com tampão Laemmli 2X (20% glicerol, 1M Tris pH 6.8, 10% SDS, 0.2% azul de bromofenol, 5% β-mercaptoetanol) e incubadas a 95 °C por 5 min. As amostras de proteínas, 30 ng para células U87MG e 25 ng para as células T98G, foram separadas por eletroforese em gel SDS-PAGE na concentração de 8% a 100V. Posteriormente, as proteínas foram eletrotransferidas a membranas de nitrocelulose (Protan BA 85, Life Science) pelo método de transferência úmida a 100V, 0,25A por um período de 3h. Em seguida, para verificar a qualidade do processo de transferência das proteínas, as membranas de nitrocelulose foram coradas com *Ponceau red* 0,1% em 5% de ácido acético por 3 min. Então, as membranas foram lavadas com tampão Tris salino (TBS) e imagens foram coletadas utilizando o equipamento Gene-box.

As membranas foram bloqueadas com 5% leite em pó desnatado ou com 1% de albumina em TBS acrescido de 0,1% de Tween 20 (TBST) por 1h em T.A sob agitação constante. Depois, as membranas foram lavadas com TBST por 5 min e incubadas com solução de anticorpos primários em TBST por 2,5h em T.A sob agitação, a especificação dos anticorpos utilizados, suas respectivas diluições e proteínas alvo está descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Anticorpos utilizados nas reações de Western blot.

Proteína alvo	Origem	Fabricante/Código	Diluição	Peso molecular
Laminina (γ 1)	Coelho	Abcam - ab11575	1:1000	> 200 kDa
Fibronectina	Coelho	Abcam - ab23750	1:1000	220 kDa
Colágeno IV	Coelho	Abcam - ab6586	1:1000	300 kDa
Integrina α v	Coelho	Cell Signaling - 4711	1:1000	140 kDa
Integrina α 3	Coelho	Millipore - ab1920	1:500	130 kDa
Integrina α 5	Coelho	Cell Signaling - 98204	1:1000	140 kDa
Integrina β 1	Coelho	Cell Signaling - 34971	1:1000	115/135 kDa
Integrina β 3	Coelho	Cell Signaling - 13166	1:1000	100 kDa
β -actina	Coelho	Abcam - ab75186	1:3000	42 kDa
IgG de coelho	Burro	Abcam - ab6802-1	1: 2000	***

Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes com 0,1% TBST por 5 min e, em seguida, incubadas com anticorpo secundário (dirigidos contra as imunoglobulinas da espécie animal em que foram produzidos os anticorpos primários) conjugado a enzima peroxidase de rábano (HRP) por 1h em T.A, sob agitação. Após a incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram lavadas três vezes com 0,1% TBST por 5 min e expostas ao reagente ECL (*Enhanced Chemiluminescence*) (Bio-Rad). Os sinais quimioluminescentes foram detectados utilizando-se o equipamento Gene-box e o programa GeneSys (versão 1.4.3.0). As imagens capturadas foram analisadas no programa ImageJ. Esse experimento foi realizado três vezes.

3.7 Ensaio de fechamento de ferida

Células U87MG e T98G foram plaqueadas em duplicata em placas de 24 poços nas concentrações de 5×10^4 e 6×10^4 células por poço, respectivamente, e mantidas à 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂. Após 24 h as células foram tratadas conforme descrito na seção 3.4.

Nas últimas horas de tratamento (6 h para as células U87MG e 12 h para as células T98G) foi realizada uma ferida na monocamada de células utilizando-se uma ponteira de 200 µL estéril. As células foram lavadas 3 vezes com PBS e o meio com os respectivos tratamentos e controles foi adicionado aos poços. Imagens foram coletadas imediatamente após a realização da ferida e após o período de migração de cada linhagem. As imagens foram analisadas utilizando-se o software ImageJ. Esse experimento foi realizado três vezes.

3.8 Análise de morfologia celular

Células U87MG e T98G foram plaqueadas em lamínula estéril na concentração de 2×10^4 células por lamínula. Após o período de 12 h o meio de cultura foi trocado por outro contendo os tratamentos, conforme descrito na seção 3.4. Após 24h, as células foram lavadas com PBS e fixadas com 4% de paraformoldeído em tampão PBS por 30 min. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes com PBS por 5 min e submetidas à permeabilização com 0,1% de Triton X-100 em PBS por 5 min. Em seguida, foram lavadas três vezes com PBS e coradas, ao abrigo da luz, com faloidina diluída em PBS 1X na concentração de 1:1000 por 1h. Após esse período, a solução de faloidina foi retirada, as células lavadas por três vezes de 5 min com PBS e coradas por 10 min com DAPI diluído a 1:1000. A solução de DAPI foi removida e as lamínulas foram lavadas com PBS três vezes de 5 min, seguida de 2 lavagens com água ultrapura. Lâminas foram montadas em meio Vectashield e observadas em microscópio de fluorescência. Imagens de cada lamínula foram coletadas nos aumentos de 400X.

3.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5. As curvas de dose resposta são apresentadas como média \pm desvio padrão (SD). A significância estatística foi determinada por two-way ANOVA seguida do teste Bonferroni. Os resultados do RT-qPCR e ensaios de ferida foram analisados através do teste T-Student, diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Curvas de crescimento celular

O crescimento celular pode ser compreendido como o aumento coordenado de todos os constituintes celulares associado ao aumento do tamanho da célula, ou como um termo referente ao aumento do número de células como resultado da multiplicação celular. Neste trabalho, o termo crescimento celular se refere ao aumento do número de células da população estudada. Para este fim, as células U87MG e T98G foram plaqueadas em quatro diferentes concentrações, em placas de 24 poços e submetidas à contagem em câmara de Neubauer após os períodos de 24, 48 e 72h. Nos períodos analisados não foi possível a observação das fases estacionária e de declínio da curva de crescimento das linhagens U87MG (Figura 12-A) e T98G (Figura 12-B) em nenhuma das concentrações testadas.

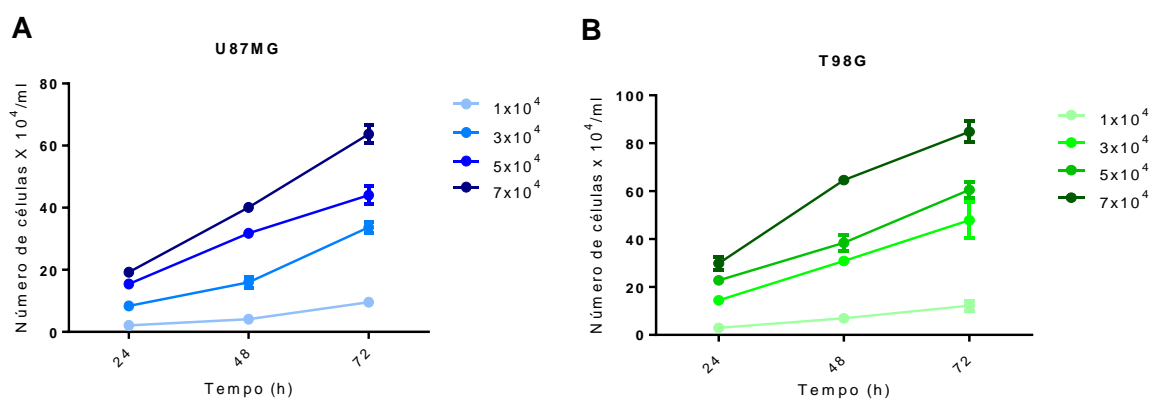


Figura 12. Curva de crescimento celular de linhagens de glioblastoma humano. **A.** U87MG **B.** T98G n=3.

Ambas linhagens apresentaram baixo crescimento na concentração de 1×10^4 em todos os períodos analisados. As concentrações de 5 e 7×10^4 não poderiam ser utilizadas para experimentação, pois em caso de experimentos com duração de 72 horas as células poderiam sofrer estresse devido a alta confluência em cultura, especialmente em caso de exposição a tratamentos que estimulem a proliferação celular. Dessa maneira, a concentração testada que mais se aproximou do ideal para experimentação foi 3×10^4 células por poço. No entanto, durante as experimentações foi identificado que a concentração de 2×10^4 células por poço atendia melhor aos objetivos do projeto sendo, portanto, esta a concentração de escolha para a realização dos experimentos.

4.2 Curvas de dose-resposta

A fim de verificar o efeito dos tratamentos sobre o número de células viáveis das linhagens U87MG e T98G foram realizadas curvas de dose-resposta para Ibuprofeno (IBP), CAY10526 e PGE₂.

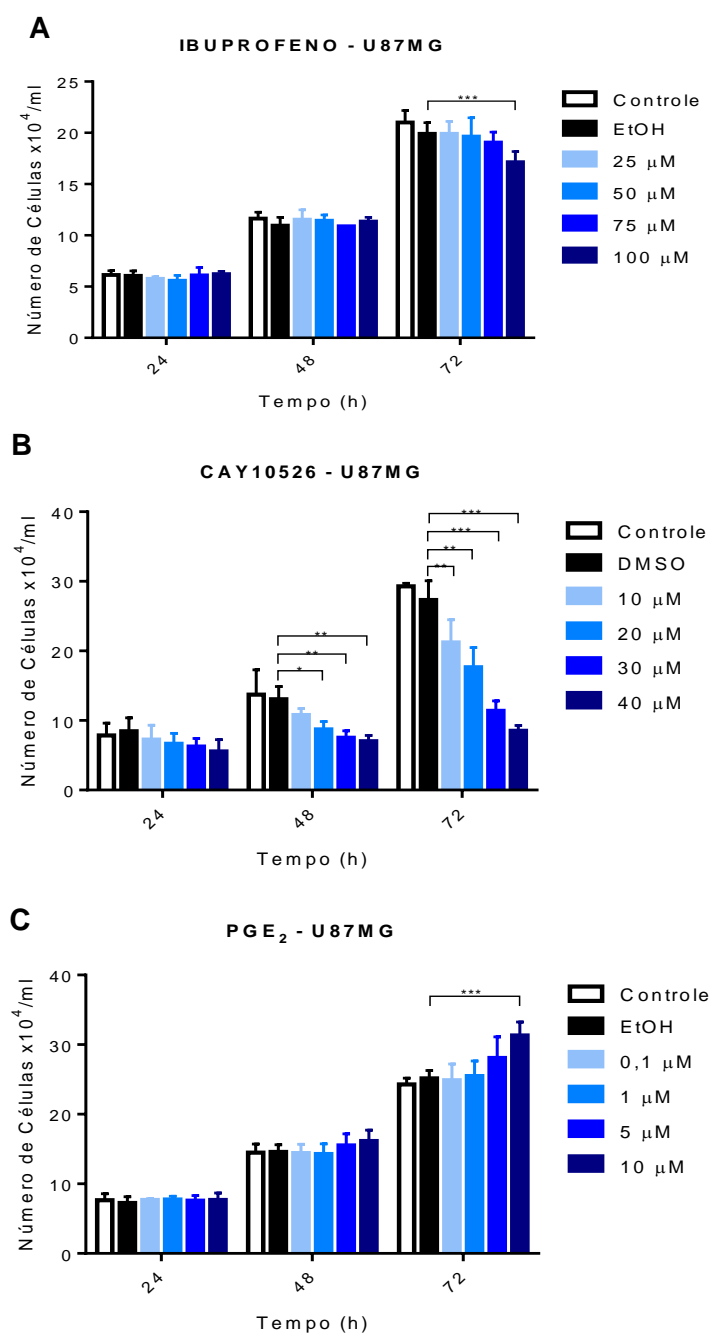


Figura 13. Curva de dose-resposta de células U87MG tratadas com ibuprofeno (IBP), CAY10526 e PGE₂. A. Células com IBP. B. Células tratadas com CAY10526. C. Células tratadas com PGE₂. A significância foi determinada por two-way ANOVA seguida de Bonferroni teste (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.001$), $n = 3$.**

Foi observada a redução significativa (18,44%) do número de células U87MG após o tratamento com 100 μM de IBP por 72h (Figura 13-A). As demais concentrações testadas não apresentaram efeito estatisticamente significado no número de células. Dessa forma, para a realização dos experimentos subsequentes, a concentração e tempo de tratamento com IBP escolhidos para esta linhagem celular foi de 100 μM por 72h. As células U87MG tratadas com CAY10526 por 48h nas concentrações de 20 μM , 30 μM ou 40 μM apresentaram redução do número de células em 33,23%, 42,28% e 46,33%, respectivamente.

Após 72h de tratamento com CAY10526 as células U87MG sofreram redução significativa do número de células em todas as concentrações testadas (22,33%, 35,35%, 58,29% e 68,77%). Como pode ser observado na Figura 13-B, o efeito da droga CAY10526 sobre o número de células U87MG foi diretamente dependente da dose e do tempo. Observe que na concentração de 40 μM CAY10526 manteve o número de células praticamente inalterado durante todos os períodos testados. Para a realização dos experimentos com a linhagem U87MG, foi escolhida a concentração de 20 μM de CAY10526 pelo período 48h. O tratamento com 10 μM de PGE_2 aumentou em 24,39% o número de células U87MG após 72h, sendo, este o tempo e a concentração de tratamento escolhidos, Figura 13-C.

As células T98G geralmente são mais resistentes a drogas utilizadas no tratamento de GBM, então foi decidido testar concentrações de IBP mais altas nessa linhagem, são elas: 50 μM , 100 μM , 150 μM e 200 μM . Como pode ser observado na Figura 14-A, IBP reduziu significativamente (26,56%) o número de células T98G na concentração de 200 μM após tratamento por 72h, sendo estas as condições de tratamento escolhidas.

A droga CAY10526 reduziu em 46,66% e 56,45% o número de células T98G após 48h de tratamento nas concentrações de 30 μM e 40 μM , respectivamente. Em 72h, CAY10526 reduziu o número de células T98G nas concentrações de 20 μM , 30 μM e 40 μM , respectivamente 42,04%, 59,26% e 76,65%, Figura 14-B. Assim como observado na linhagem U87MG, o de CAY10526 sobre o número de células T98G foi diretamente dependente da dose e do tempo, e a concentração de 40 μM manteve o número de células muito similares durante todos os períodos testados. Para o tratamento da linhagem T98G com CAY10526 nos experimentos seguintes foi escolhida a concentração de 25 μM pelo período de 48h.

O tratamento com PGE₂ por 72h estimulou o aumento do número de células nas concentrações de 1 μM, 5 μM e 10 μM em 11,92%, 23,47% e 30,34%, respectivamente, Figura 14-C. Para a realização dos experimentos subsequentes foi escolhida a concentração de 10 μM pelo período de 72h.

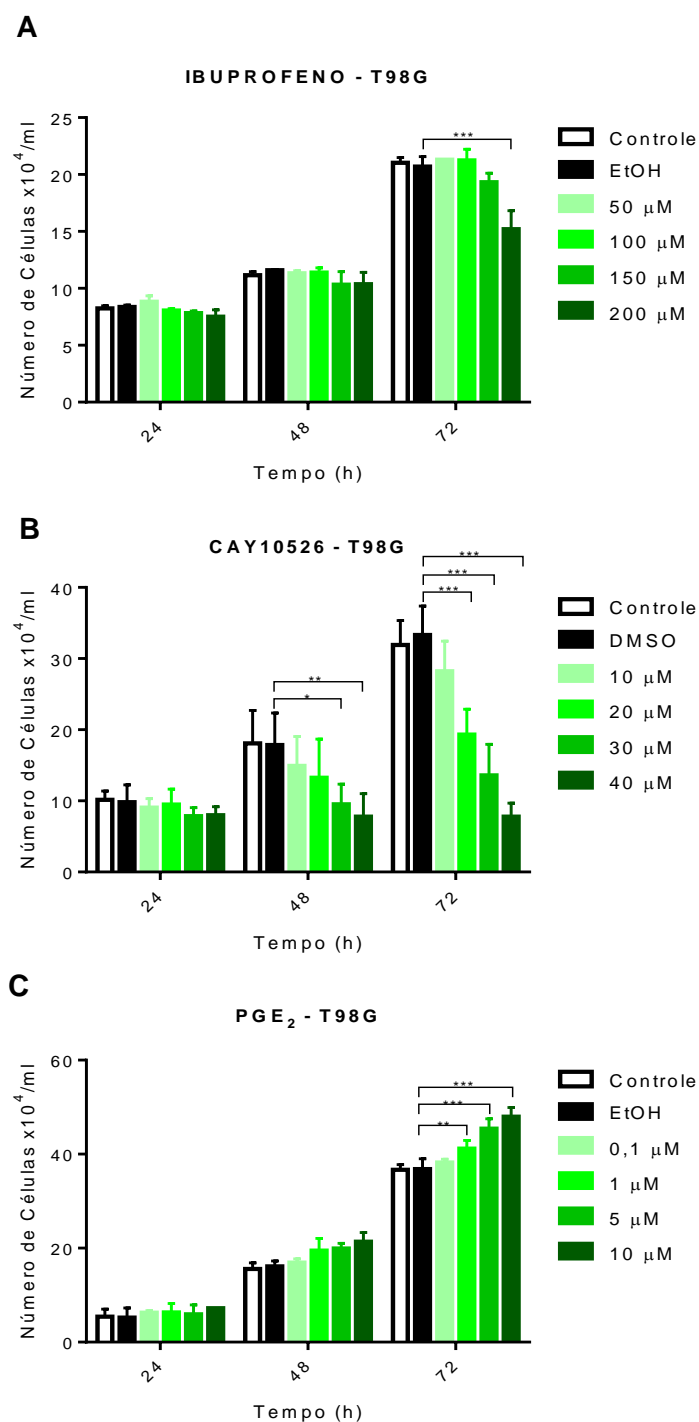


Figura 14. Curva de dose-resposta de células T98G tratadas com ibuprofeno (IBP), CAY10526 e PGE₂. A. Células com IBP. B. Células tratadas com CAY10526. C. Células tratadas com PGE₂. A significância foi determinada por two-way ANOVA seguida de Bonferroni teste (*, p<0.05; **, p<0.01; *, p<0.001), n=3.**

As concentrações e períodos de tratamento escolhidos para cada uma das linhagens estudadas estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Tratamentos utilizados nas curvas de dose-resposta e concentrações selecionadas

Tratamento	Alvo	Concentrações	Concentrações Selecionadas	
			U87MG	T98G
Ibuprofeno (IBP)	COX-1 COX-2	25 µM 50 µM 50 µM 100 µM 75 µM 150 µM 100 µM 200 µM	100 µM	200 µM
PGE ₂	***	0,1 µM 1 µM 5 µM 10 µM	10 µM	10 µM
CAY10526	mPGES-1	10 µM 20 µM 30 µM 40 µM	20 µM	25 µM

4.3 PCR em tempo real

4.3.1 Proteínas de matriz extracelular

A fim de verificar os efeitos dos tratamentos com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂ na expressão de mRNA dos genes de *LAM*, *COL4*, *FN* e *VTN* nas linhagens U87MG e T98G, foi realizada a técnica de PCR em tempo real. Os gráficos representam a expressão relativa de cada gene alvo normalizado pelo controle endógeno *TBP* e a análise estatística se deu comparando o efeito do tratamento com seu respectivo veículo EtOH ou DMSO.

Como pode ser observado na Figura 15-A, houve a diminuição significativa da expressão gênica de LAM em células U87MG tratadas com IBP e CAY10526. A exposição das células a PGE₂ estimulou o aumento da expressão de mRNAs de LAM. A inibição de COX-1 com SC560 na linhagem U87MG aumentou a expressão gênica do gene de COL4, enquanto que a inibição de mPGES-1 com CAY10526 reduziu os níveis de mRNA de COL4, Figura 15-B. Apesar de não ser

estatisticamente significativo, o tratamento das células U87MG com PGE₂ mostrou uma tendência a aumento da expressão gênica de COL4 ($p=0,0517$).

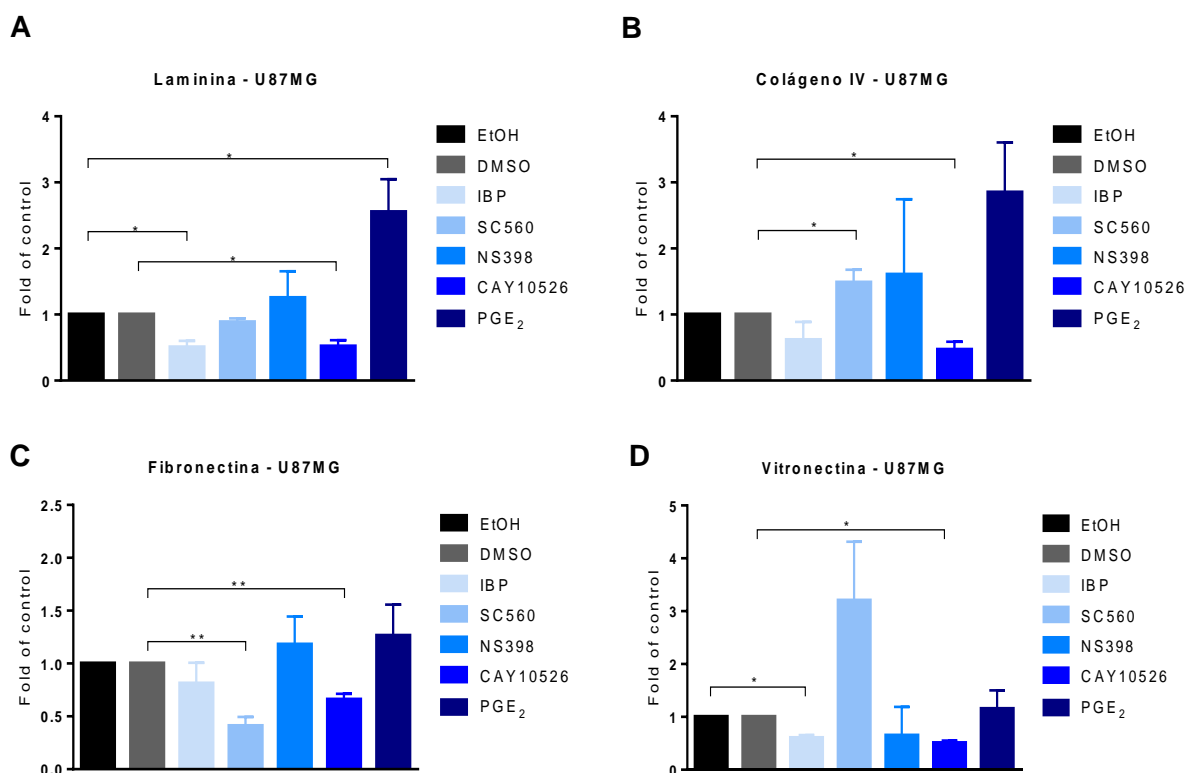


Figura 15. Expressão gênica de proteínas de matriz extracelular em células U87MG tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂ A. Níveis de mRNA de laminina B. Níveis de mRNA de colágeno tipo IV C. Níveis de mRNA de fibronectina D. Níveis de mRNA de vitronectina. A significância foi determinada por teste paramétrico Student's t-test pareado (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$), $n=3$.

Os tratamentos com SC560 e CAY10526 reduziram a expressão do gene de FN nas células U87MG, Figura 15-C. Os demais tratamentos não apresentaram alterações significativas nos níveis de mRNA de FN nesta linhagem. Como pode ser observado na Figura 15-D, IBP e CAY10526 reduziram a expressão gênica do gene de VTN nas células U87MG.

Diferente do observado na linhagem U87MG, a análise dos níveis de mRNA do gene LAM e COL4 na linhagem T98G mostrou redução da expressão gênica após o tratamento com todos os inibidores de COX e mPGES-1 testados, Figura 16-A e 16-B. SC560, NS398 e CAY10526 diminuíram os níveis de mRNA do gene de FN nas células T98G, Figura 16-C. Já o gene de VTN apresentou expressão

reduzida na linhagem estudada quando as enzimas COX foram inibidas com IBP, SC560 ou NS398, Figura 16-D.

As alterações na expressão gênica das proteínas de MEC alvos deste projeto mostraram padrão distinto entre as linhagens estudadas expostas aos diferentes tratamentos.

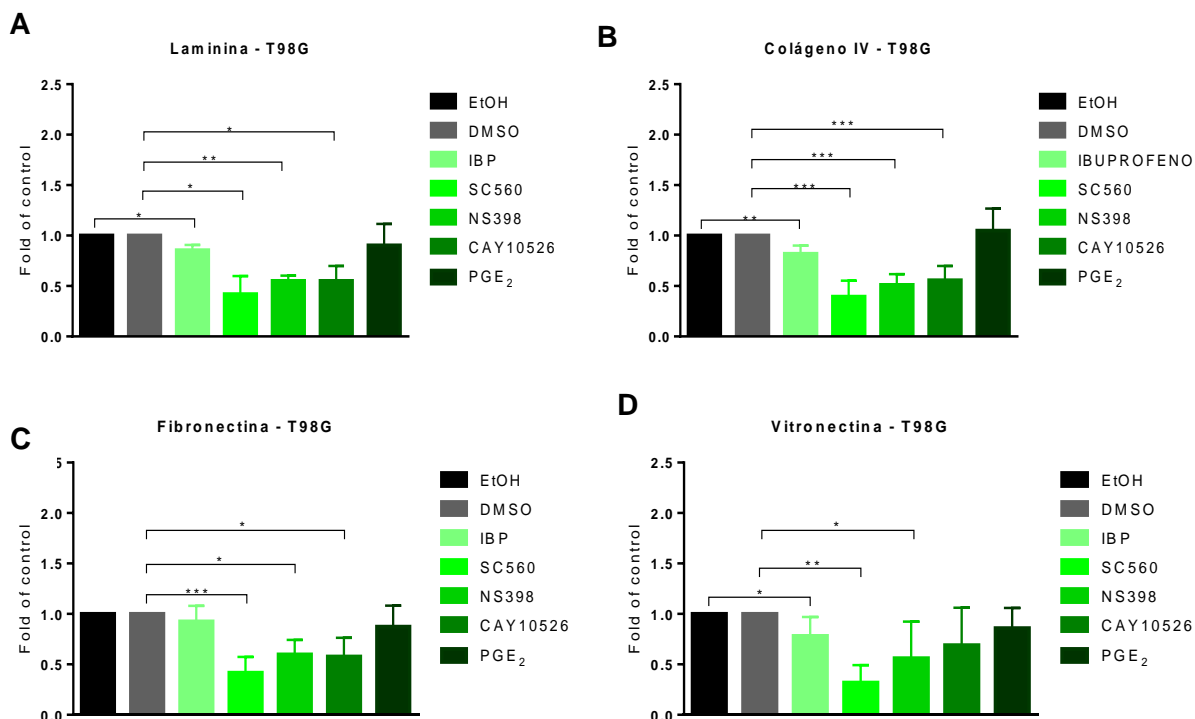


Figura 16. Expressão gênica de proteínas de matriz extracelular em células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂. A. Níveis de mRNA de laminina B. Níveis de mRNA de colágeno tipo IV C. Níveis de mRNA de fibronectina D. Níveis de mRNA de vitronectina. A significância foi determinada por teste paramétrico Student's t-test pareado (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$), $n = 3$.

4.3.2 Integrinas

A interação entre as células e proteínas da MEC, imprescindível para o processo de migração celular, é mediada por uma ampla gama de receptores extracelulares. A principal família desses receptores são as ITGs. Objetivando verificar os efeitos dos tratamentos com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂ na expressão de mRNA dos genes das subunidades de ITGs αv , $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$ e $\beta 3$ nas linhagens U87MG e T98G, foi realizada a técnica de PCR em tempo real. Os gráficos representam a expressão relativa de cada gene alvo normalizado pelo controle endógeno TBP e a análise estatística se deu comparando o efeito do tratamento com seu respectivo veículo EtOH ou DMSO.

Análise de expressão gênica na linhagem U87MG mostrou que o tratamento com IBP reduz a expressão de mRNAs de ITG $\alpha 3$, Figura 17-A. Já o tratamento desta linhagem com CAY10526 levou a redução da expressão gênica da ITG $\alpha 5$, Figura 17-B. Nenhum dos tratamentos testados alterou significativamente a expressão da ITG $\beta 1$, Figura 17-C. A inibição da mPGES-1 com CAY10526 reduziu os níveis de mRNA do gene da ITG $\beta 3$, Figura 17-D. A expressão gênica da ITG αv foi modulada negativamente quando as células foram tratadas com IBP e CAY10526, Figura 17-E. Por outro lado, o tratamento com PGE₂ estimulou o aumento da expressão gênica de ITG αv nesta linhagem, Figura 17-F.

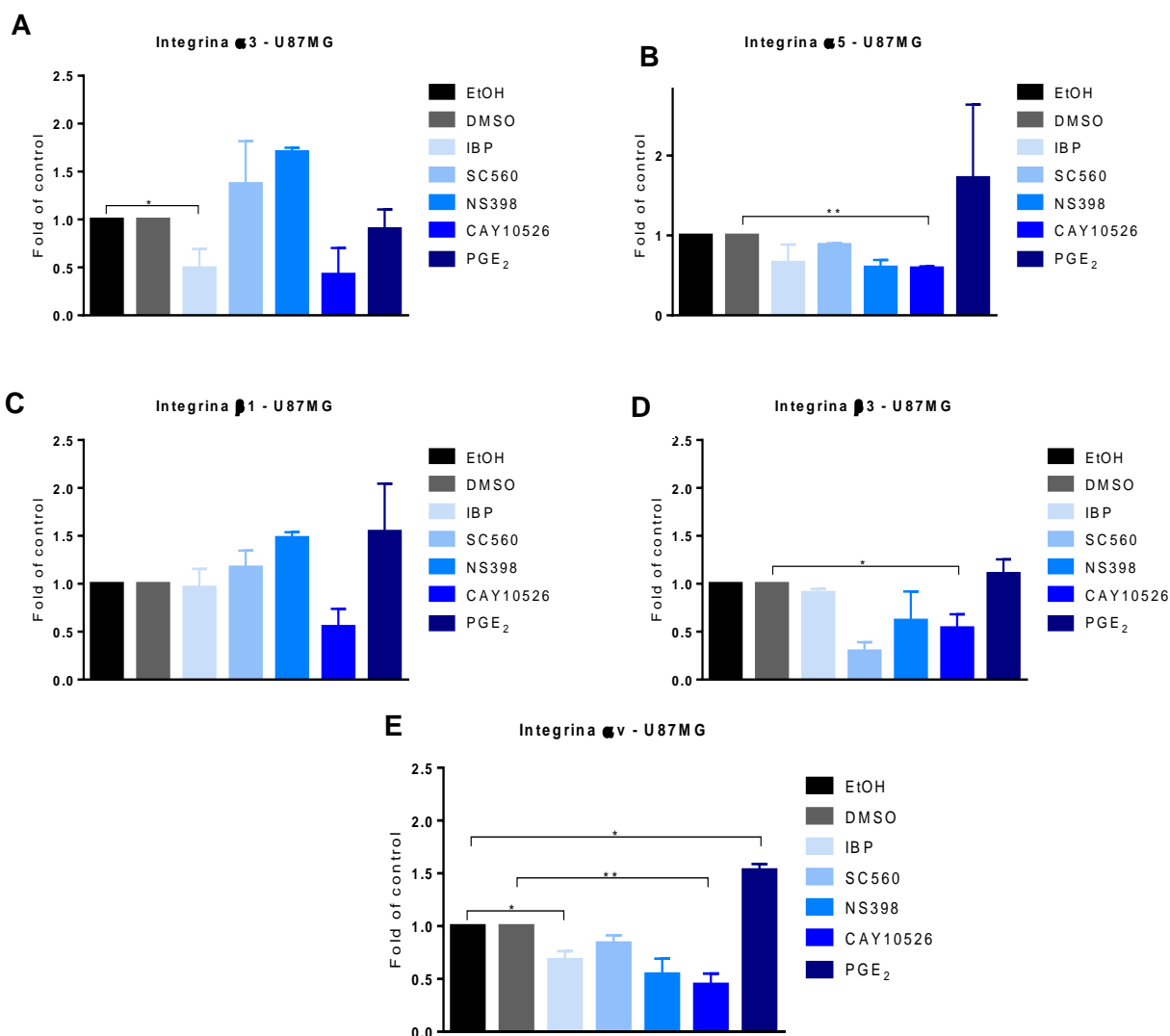


Figura 17. Expressão gênica de subunidades de integrinas em células U87MG tratadas com IBP, CAY10526 e PGE₂. A. Níveis de mRNA de ITG $\alpha 3$ B. Níveis de mRNA de ITG $\alpha 5$ C. Níveis de mRNA de ITG $\beta 1$ D. Níveis de mRNA de ITG $\beta 3$. E. Níveis de mRNA de ITG αv . A significância foi determinada por teste paramétrico Student's t-test pareado (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$), $n = 3$.

Análise de expressão gênica na linhagem T98G mostrou que os tratamentos com SC560, NS398 e CAY10526 reduzem os níveis mRNAs de ITG $\alpha 3$ (Figura 18-A). Os tratamentos com os inibidores específicos de COX-1, SC560 e COX-2, NS398 diminuíram os níveis de mRNA de ITG $\alpha 5$ (Figura 18-B). SC560, NS398 e CAY10526 reduziram significativamente os níveis de mRNA de ITG $\beta 1$ na linhagem T98G (Figura 18-C). Houve redução da expressão do gene da ITG $\beta 3$ em células T98G tratadas com SC560 (Figura 18-D). Os tratamentos com todos os inibidores específicos SC560, NS398 e CAY10526 reduziram os níveis de mRNA do gene da ITG αv nesta linhagem (Figura 18-E). É possível observar que, mais uma vez, a expressão dos genes estudados mostrou respostas distintas para as duas linhagens expostas aos diferentes tratamentos.

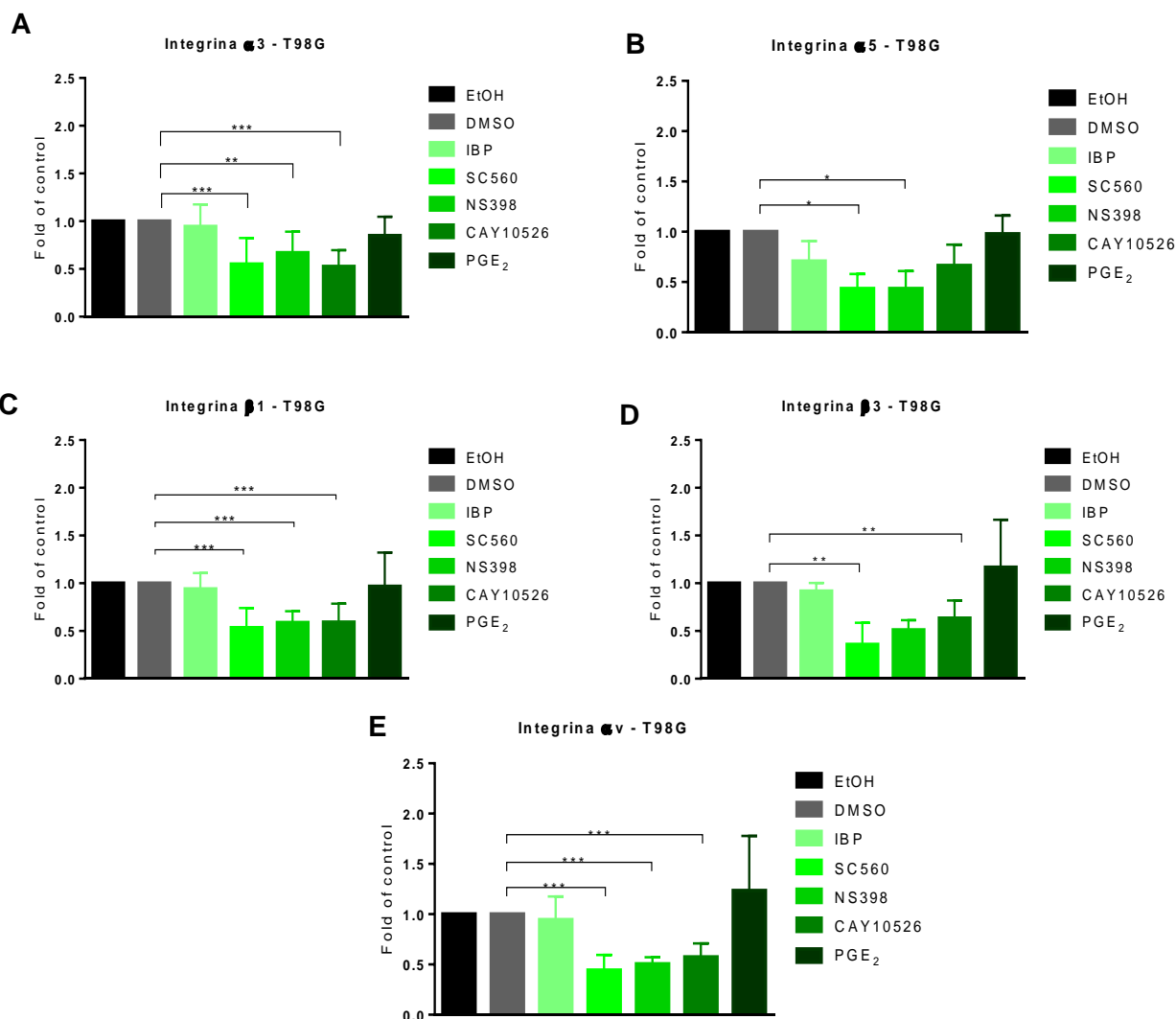


Figura 18. Expressão gênica de subunidades de integrinas em células T98G tratadas com IBP, CAY10526 e PGE₂. A. Níveis de mRNA de ITG $\alpha 3$ B. Níveis de mRNA de ITG $\alpha 5$ C. Níveis de mRNA de ITG $\beta 1$ D. Níveis de mRNA de ITG $\beta 3$. E. Níveis de mRNA de ITG αv . A significância foi determinada por teste paramétrico Student's t-test pareado (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$), $n = 3$.

4.4 Western blot

4.4.1 Proteínas de matriz extracelular

A fim de verificar os efeitos dos tratamentos com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂ na expressão das proteínas LAM, FN e COL4 nas linhagens U87MG e T98G, foi realizada a técnica de western blot. Os gráficos representam a densitometria da proteína alvo normalizada pelo controle endógeno a proteína β -actina. A análise estatística se deu comparando o efeito do tratamento com seu respectivo veículo EtOH ou DMSO.

Os tratamentos com IBP (Figura 19-B) e SC560 (Figura 19-C) e NS398 (Figura 19-D) não alterou a expressão de LAM nas células U87MG. As células U87MG tratadas com CAY10526 diminuíram significativamente a expressão da proteína LAM (Figura 19-E). É possível visualizar esse efeito na Figura 19-A. PGE₂ não alterou significativamente a expressão de LAM.

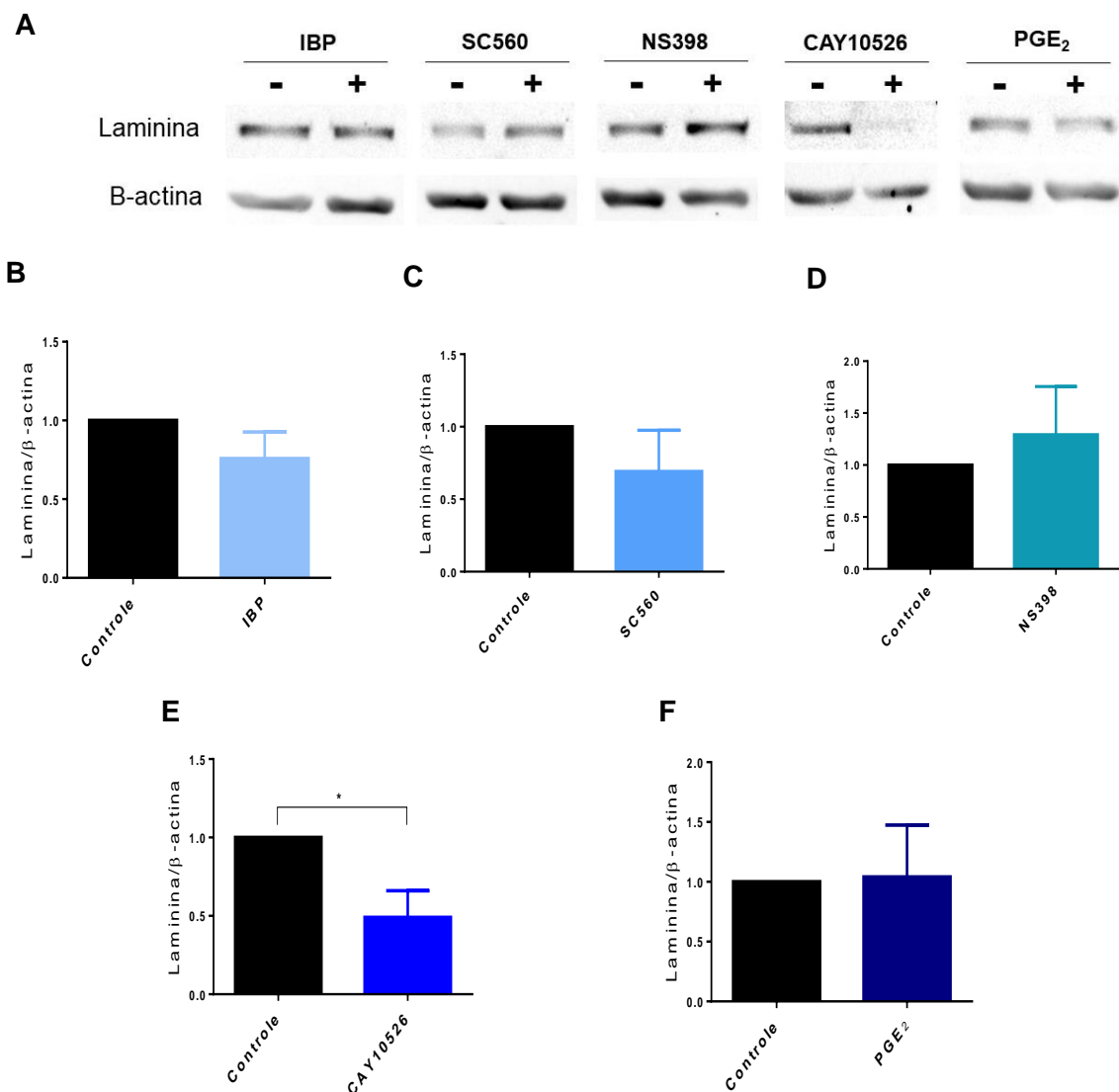


Figura 19. Expressão de laminina em células U87MG tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂. **A.** Imagem representativa de western blot **B.** Gráfico de densitometria de LAM em células tratadas com IBP **C.** Gráfico de densitometria de LAM em células tratadas com SC560 **D.** Gráfico de densitometria de LAM em células tratadas com NS398. **E.** Gráfico de densitometria de LAM em células tratadas com CAY10526. **F.** Gráfico de densitometria de LAM em células tratadas com PGE₂. A significância estatística foi determinada por t-test (*, $p < 0.05$), $n = 3$.

A linhagem U87MG tratada com IBP (Figura 20-B), SC560 (Figura 20-C) e NS398 ($p < 0,0642$, Figura 20-D) não apresentou alterações na expressão da proteína FN. CAY10526 reduziu significativamente a expressão de FN nas células U87MG (Figura 20-E) e PGE₂ não apresentou efeito estatisticamente significativo.

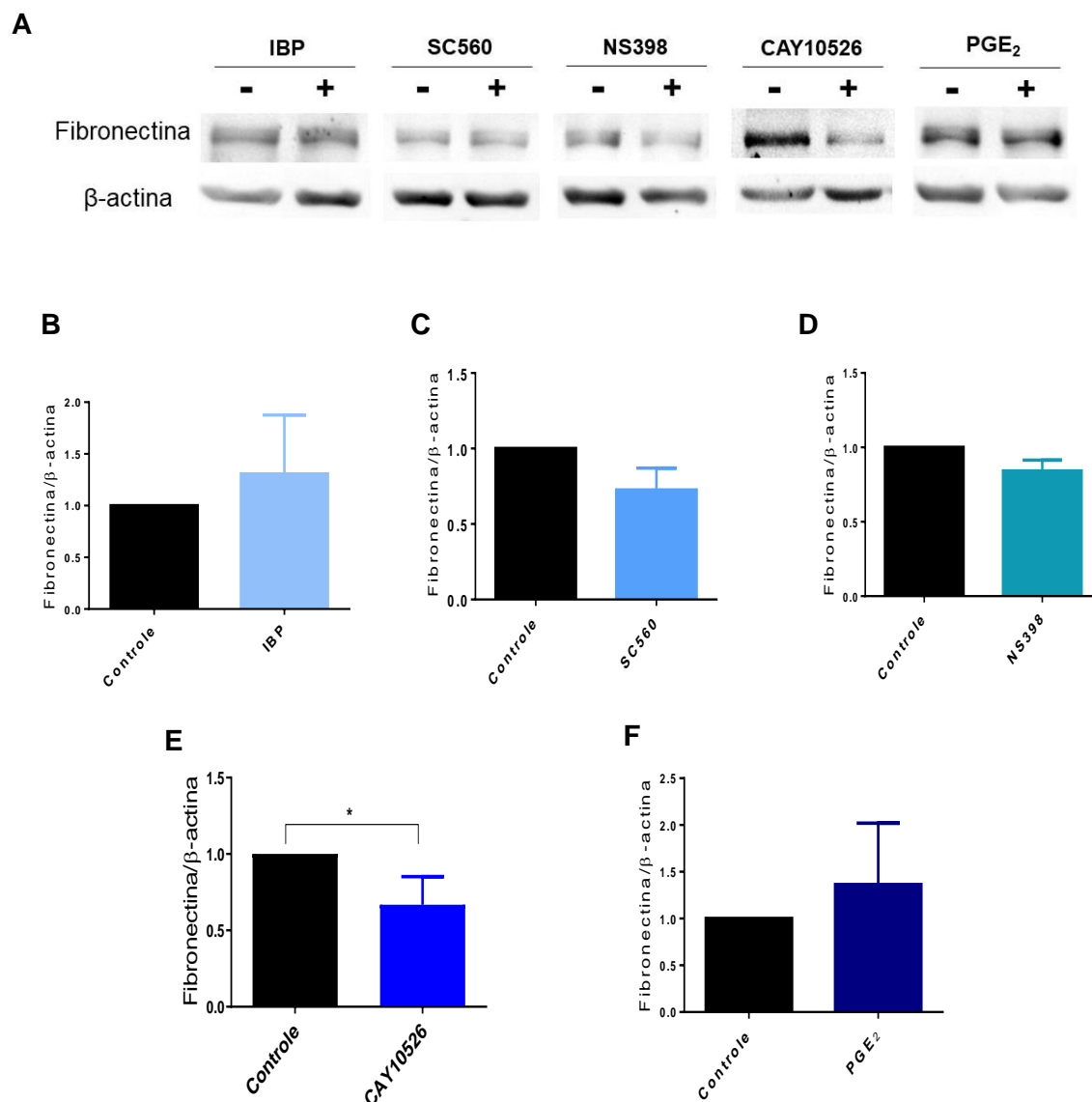


Figura 20. Expressão de fibronectina em células U87MG tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂. **A.** Imagem representativa de western blot **B.** Gráfico de densitometria de FN em células tratadas com IBP **C.** Gráfico de densitometria de FN em células tratadas com SC560 **D.** Gráfico de densitometria de FN em células tratadas com NS398. **E.** Gráfico de densitometria de FN em células tratadas com CAY10526. **F.** Gráfico de densitometria de FN em células tratadas com PGE₂. A significância estatística foi determinada por t-test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$), $n = 3$.

O tratamento das células T98G com IBP (Figura 21-B) ou NS398 (Figura 21-D) não alterou significativamente a expressão de LAM. Células T98G tratadas com SC560 aumentaram significativamente a expressão de LAM (Figura 21-C). O inibidor CAY10526 reduziu significativamente a expressão de LAM nas células T98G (Figura 21-E). Em contrapartida, PGE₂ induziu a produção de LAM nesta linhagem (Figura 21-F).

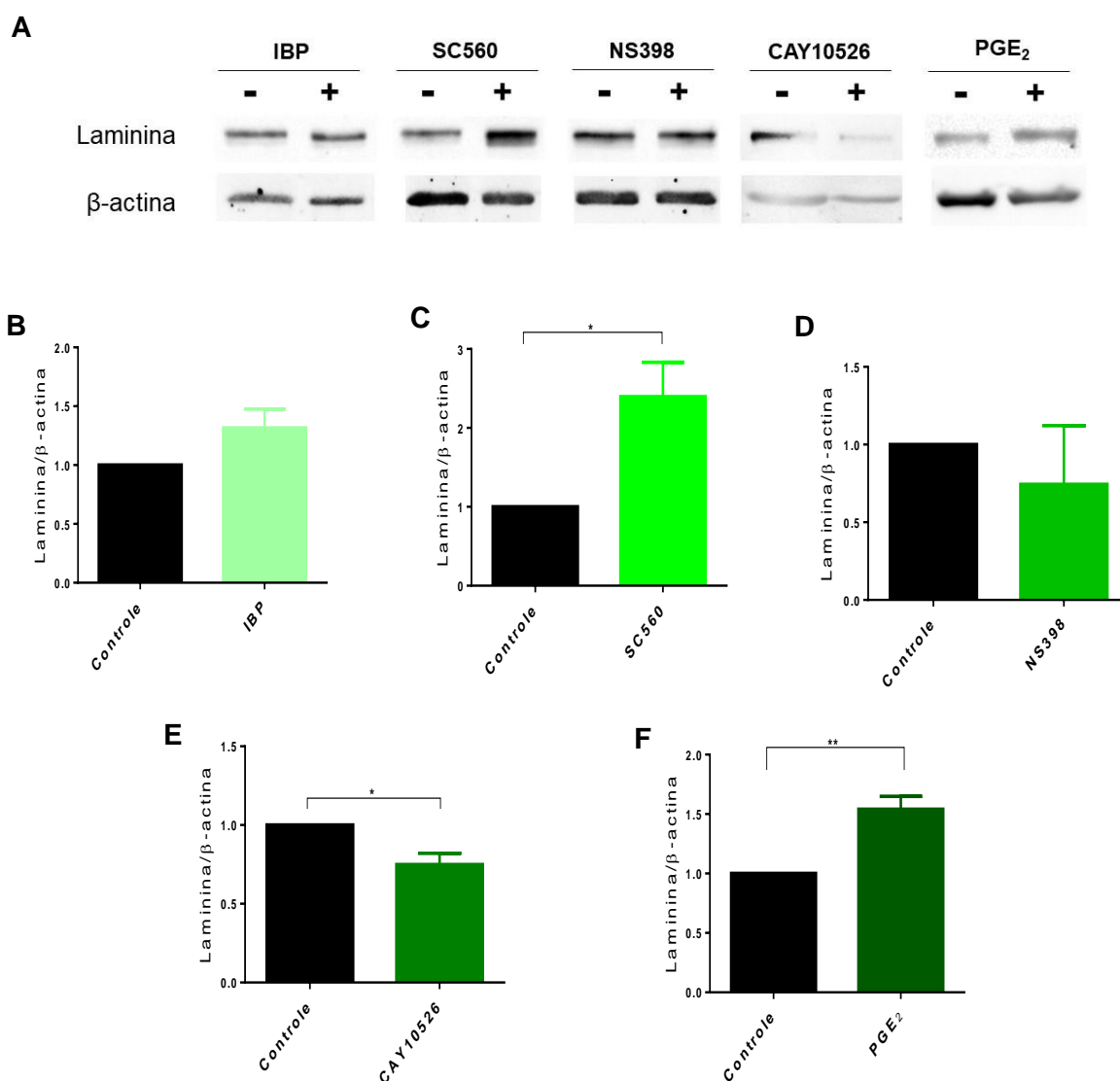


Figura 21. Expressão de laminina em células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂. **A.** Imagem representativa de western blot **B.** Gráfico de densitometria de LAM em células tratadas com IBP **C.** Gráfico de densitometria de LAM em células tratadas com SC560 **D.** Gráfico de densitometria de LAM em células tratadas com NS398. **E.** Gráfico de densitometria de LAM em células tratadas com CAY10526. **F.** Gráfico de densitometria de LAM em células tratadas com PGE₂. A significância estatística foi determinada por t-test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$), $n = 3$.

Os tratamentos com IBP, SC560, NS398 e PGE₂ não alteraram significativamente a expressão da proteína FN nas células T98G. O inibidor CAY10526 reduziu significativamente a expressão de FN na linhagem T98G (Figura 22-E).

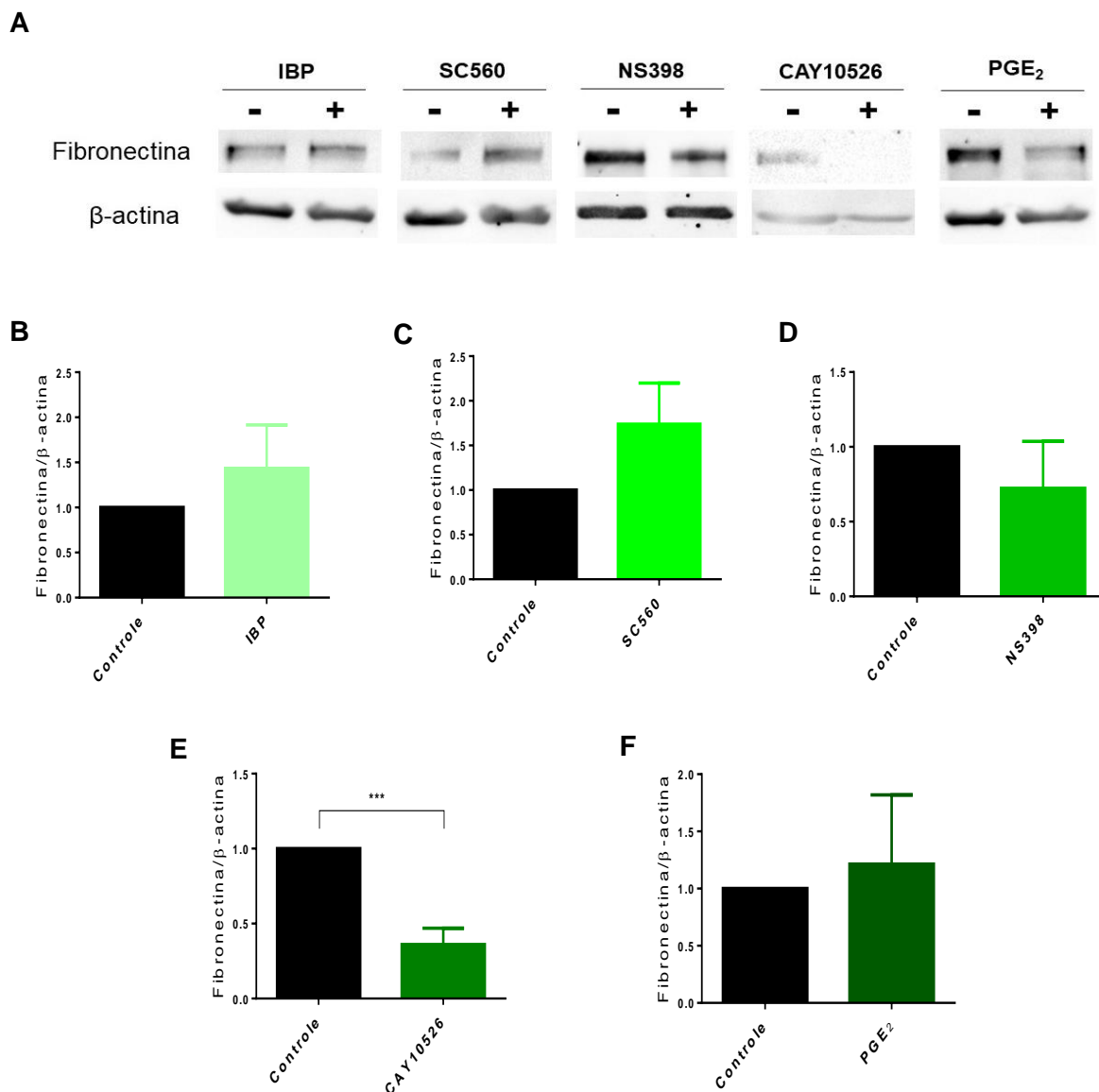


Figura 22. Expressão de fibronectina em células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂. **A.** Imagem representativa de western blot **B.** Gráfico de densitometria de FN em células tratadas com IBP **C.** Gráfico de densitometria de FN em células tratadas com SC560 **D.** Gráfico de densitometria de FN em células tratadas com NS398. **E.** Gráfico de densitometria de FN em células tratadas com CAY10526. **F.** Gráfico de densitometria de FN em células tratadas com PGE₂. A significância estatística foi determinada por t-test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$), $n = 3$.

Os tratamentos com IBP (Figura 23-B) ou PGE₂ (Figura 23-F) não alteraram significativamente a expressão da proteína COL4 nas células T98G. Os inibidores NS398 (Figura 23-D) e CAY10526 (Figura 23-E) reduziram significativamente a expressão de COL4 na linhagem T98G. O tratamento com SC560 aumentou significativamente a expressão de COL4 nas células T98G.

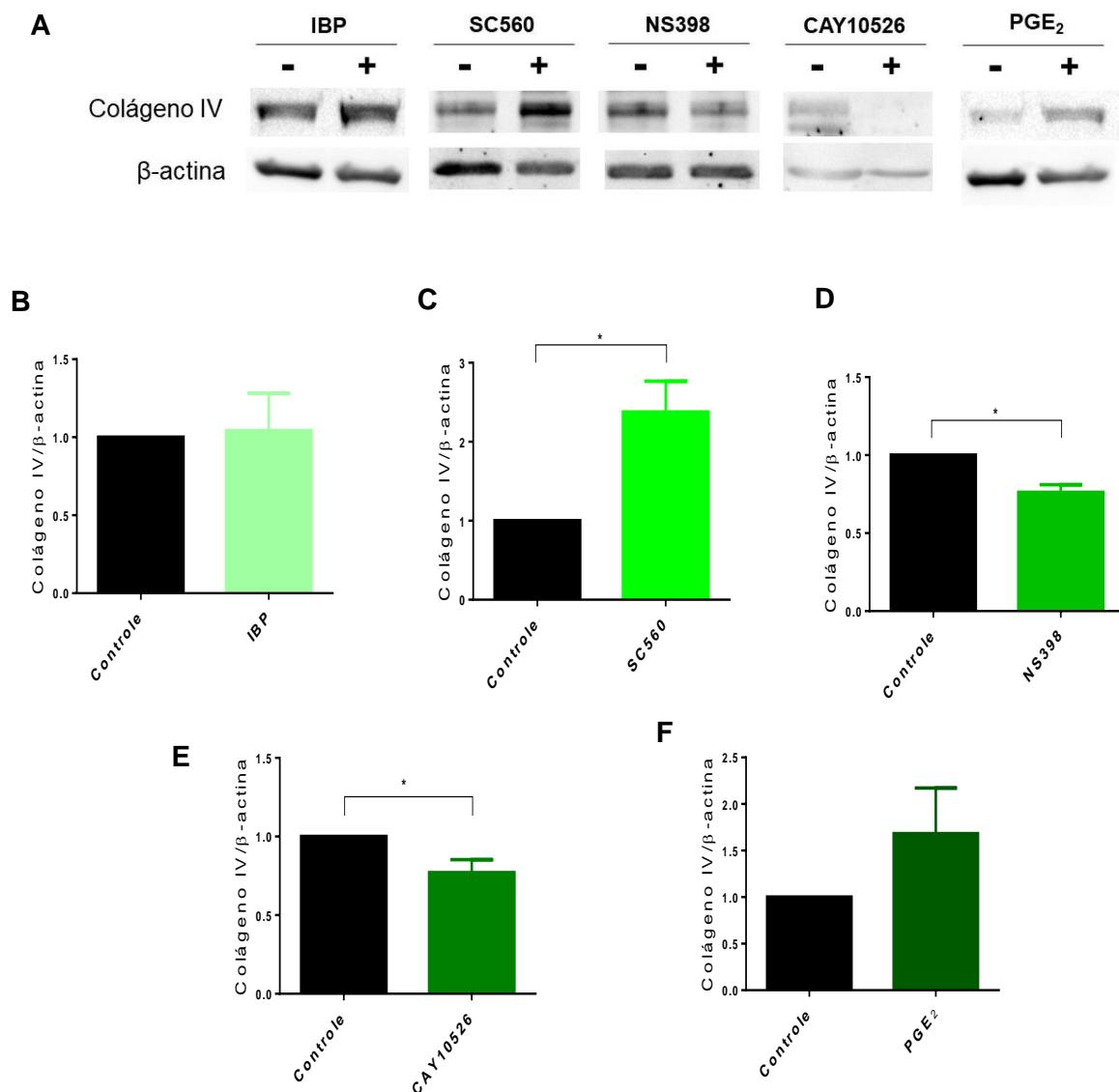


Figura 23. Expressão de colágeno tipo IV em células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂. **A.** Imagem representativa de western blot **B.** Gráfico de densitometria de COL4 em células tratadas com IBP **C.** Gráfico de densitometria de COL4 em células tratadas com SC560 **D.** Gráfico de densitometria de COL4 em células tratadas com NS398. **E.** Gráfico de densitometria de COL4 em células tratadas com CAY10526. **F.** Gráfico de densitometria de COL4 em células tratadas com PGE₂. A significância estatística foi determinada por t-test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$), $n = 3$.

Os resultados demonstram que a inibição de apenas uma das isoformas de COX pode acarretar em respostas celulares opostas. Geralmente, a inibição de COX-1 com o inibidor SC560 induziu ao aumento da expressão das proteínas da MEC na linhagem T98G. Também é possível observar que um mesmo inibidor (SC560) pode induzir respostas celulares diferentes em linhagens distintas.

Diferente do observado com a inibição das COXs, a inibição de mPGES-1 com o inibidor CAY10526 reduziu a expressão de todas as proteínas de MEC

analisadas neste projeto. Esse fenômeno foi observado nas duas linhagens estudadas. Devido a variação experimental, não foi possível observar o efeito de PGE₂ sobre a expressão de proteínas da matriz, com exceção de LAM na linhagem T98G cuja expressão foi significativamente aumentada após o tratamento.

4.4.2 Integrinas

A fim de verificar os efeitos dos tratamentos com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂ na expressão das integrinas $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$ e $\beta 3$ nas linhagens U87MG e T98G, foi realizada a técnica de *western blot*. Os gráficos representam a densitometria da proteína alvo normalizada pelo controle endógeno a proteína β -actina. A análise estatística se deu comparando o efeito do tratamento com seu respectivo veículo EtOH ou DMSO.

A análise da expressão proteica da ITG $\alpha 3$ na linhagem U87MG não pode ser avaliada estatisticamente pelo fato do experimento ter sido realizado apenas duas vezes. No entanto, é possível observar na Figura 24 que o tratamento desta linhagem com IBP, SC560 e PGE₂ não mostrou alteração da expressão deste receptor. Por outro lado, NS398 levou a redução de 37,5% dos níveis de ITG $\alpha 3$ nas células U87MG (Figura 24-D). O efeito de CAY10526 sobre a expressão de ITG $\alpha 3$ em células U87MG não foi avaliado.

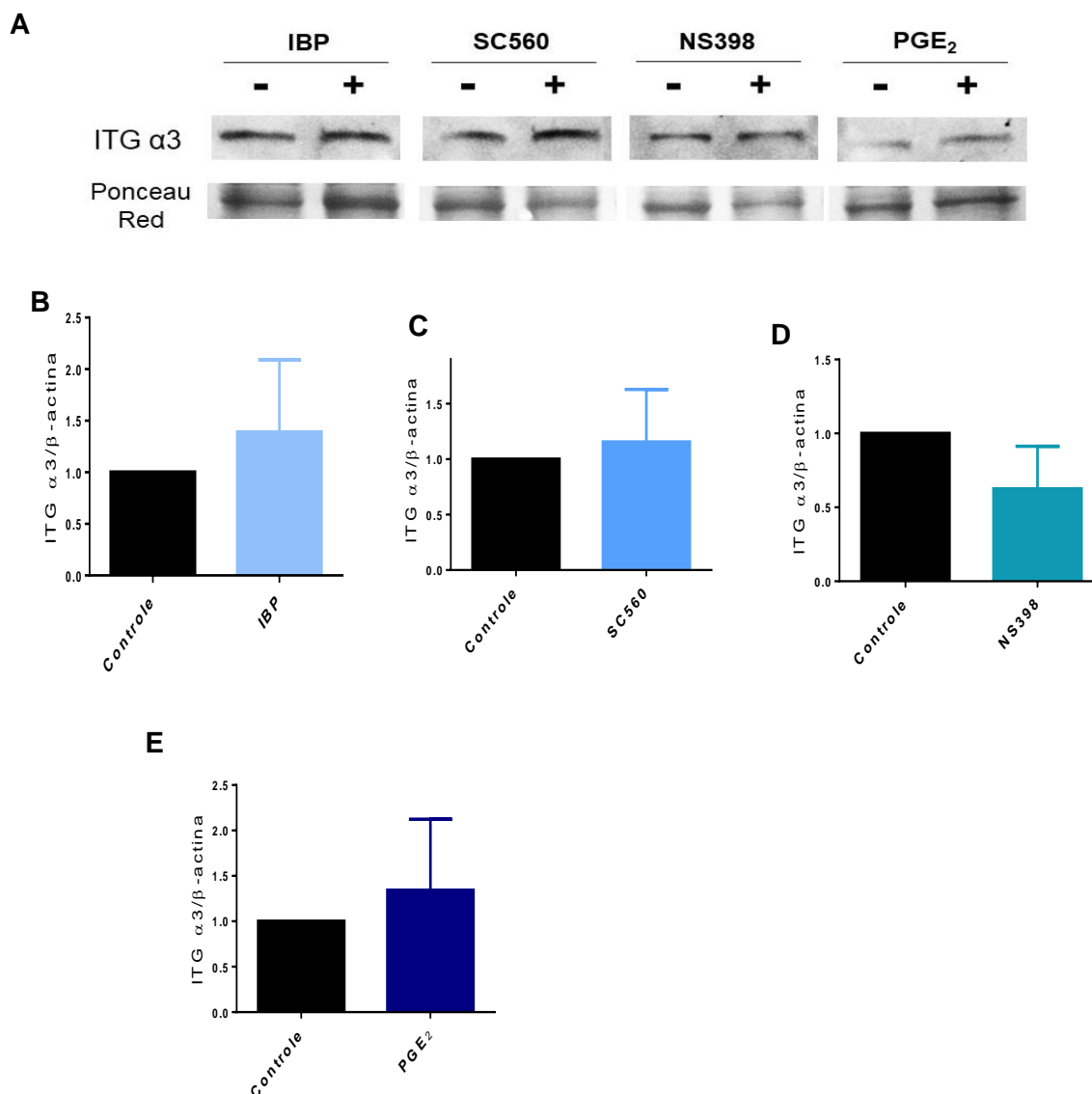


Figura 24. Expressão de Integrina α 3 em células U87MG tratadas com IBP, SC560, NS398 e PGE₂. **A.** Imagem representativa de *western blot* **B.** Gráfico de densitometria de ITG α 3 em células tratadas com IBP **C.** Gráfico de densitometria de ITG α 3 em células tratadas com SC560 **D.** Gráfico de densitometria de ITG α 3 em células tratadas com NS398. **E.** Gráfico de densitometria de ITG α 3 em células tratadas com PGE₂, n=2.

Os níveis proteicos de ITG α 5 foram mensurados em células U87MG tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂. Células tratadas com IBP (Figura 25-B) e PGE₂ (Figura 25-E) não alteraram a expressão desta integrina. Enquanto que SC560 (Figura 25-C) e CAY10526 (Figura 25-E) levaram a redução da produção desta proteína em 16,4% e 41%, respectivamente. No entanto, esses resultados não foram estatisticamente significativos. O tratamento das células U87MG com NS398 levou ao aumento em 29% da expressão de ITG α 5 (Figura 25-D), esse resultado foi estatisticamente significativo.

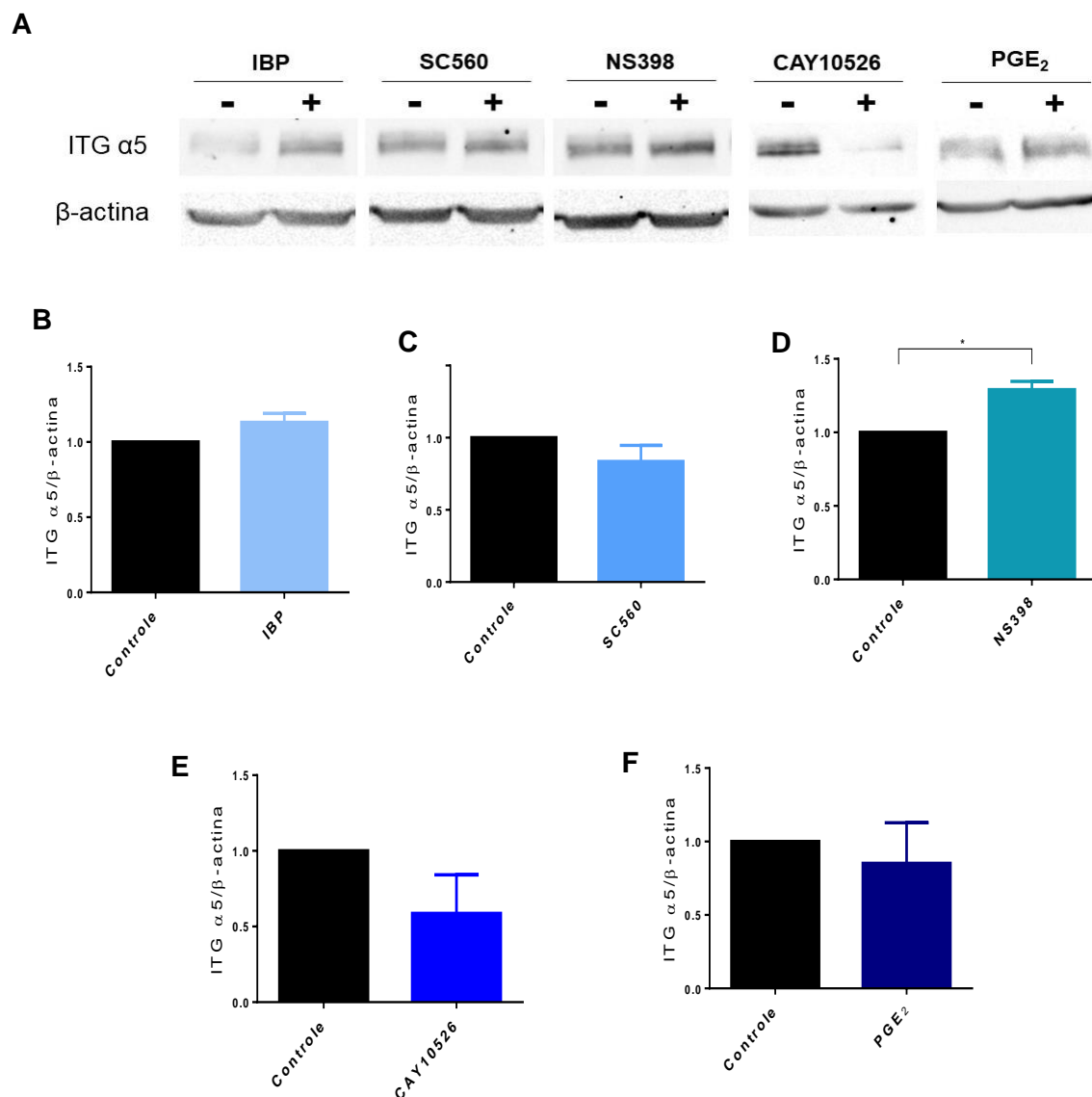


Figura 25. Expressão de Integrina $\alpha 5$ em células U87MG tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂. **A.** Imagem representativa de western blot **B.** Gráfico de densitometria de ITG $\alpha 5$ em células tratadas com IBP **C.** Gráfico de densitometria de ITG $\alpha 5$ em células tratadas com SC560 **D.** Gráfico de densitometria de ITG $\alpha 5$ em células tratadas com NS398. **E.** Gráfico de densitometria de ITG $\alpha 5$ em células tratadas com CAY10526. **F.** Gráfico de densitometria de ITG $\alpha 5$ em células tratadas com PGE₂. A significância estatística foi determinada por t-test (*, $p < 0.05$), $n = 3$.

A inibição de ambas as COXs com IBP (Figura 26-B) e COX-1 com SC560 (Figura 26-C) levou a redução significativa dos níveis proteicos da ITG αv na linhagem U87MG em 17% e 22%, respectivamente. O tratamento com NS398 (Figura 26-D) e PGE₂ (Figura 26-E) não estimulou a alteração dos níveis desta proteína. O efeito de CAY10526 sobre a expressão de ITG αv em células U87MG não foi avaliado.

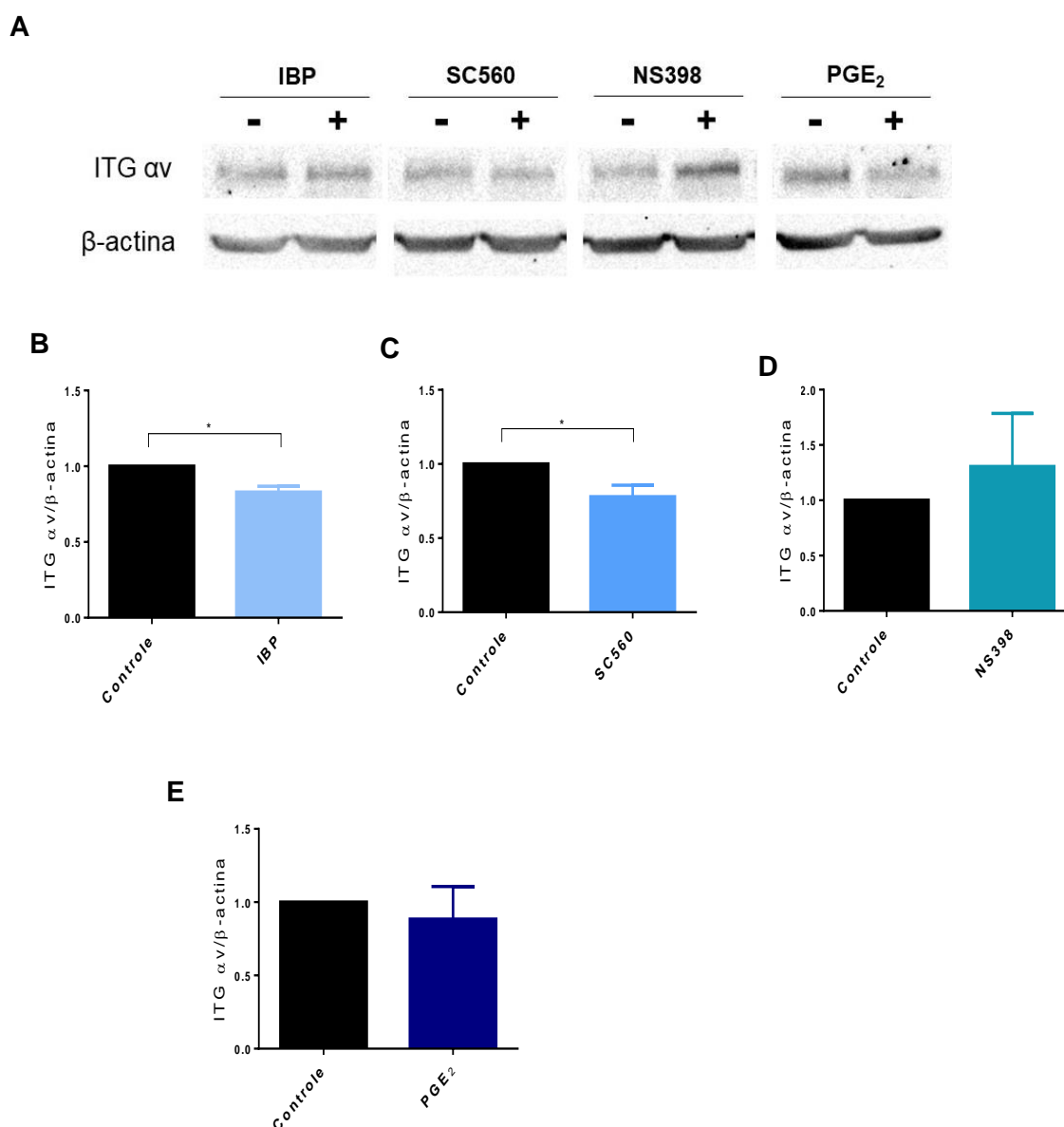


Figura 26. Expressão de Integrina αv em células U87MG tratadas com IBP, SC560, NS398 e PGE₂. **A.** Imagem representativa de western blot **B.** Gráfico de densitometria de ITG $\alpha 3$ em células tratadas com IBP **C.** Gráfico de densitometria de ITG αv em células tratadas com SC560 **D.** Gráfico de densitometria de ITG αv em células tratadas com NS398. **E.** Gráfico de densitometria de ITG αv em células tratadas com PGE₂. A significância estatística foi determinada por t-test (*, $p < 0.05$), $n = 3$.

Em células U87MG os tratamentos com IBP (Figura 27-B), SC560 (Figura 27-C) e PGE₂ (Figura 27-F) não alteraram a expressão de ITG $\beta 1$. NS398 inibiu em 20% a produção de ITG $\beta 1$ nesta linhagem (Figura 27-D), porém o efeito observado não foi estatisticamente significativo. A inibição de mPGES1 com CAY10526 reduziu significativamente a expressão de ITG $\beta 1$ em aproximadamente 22% (Figura 27-E).

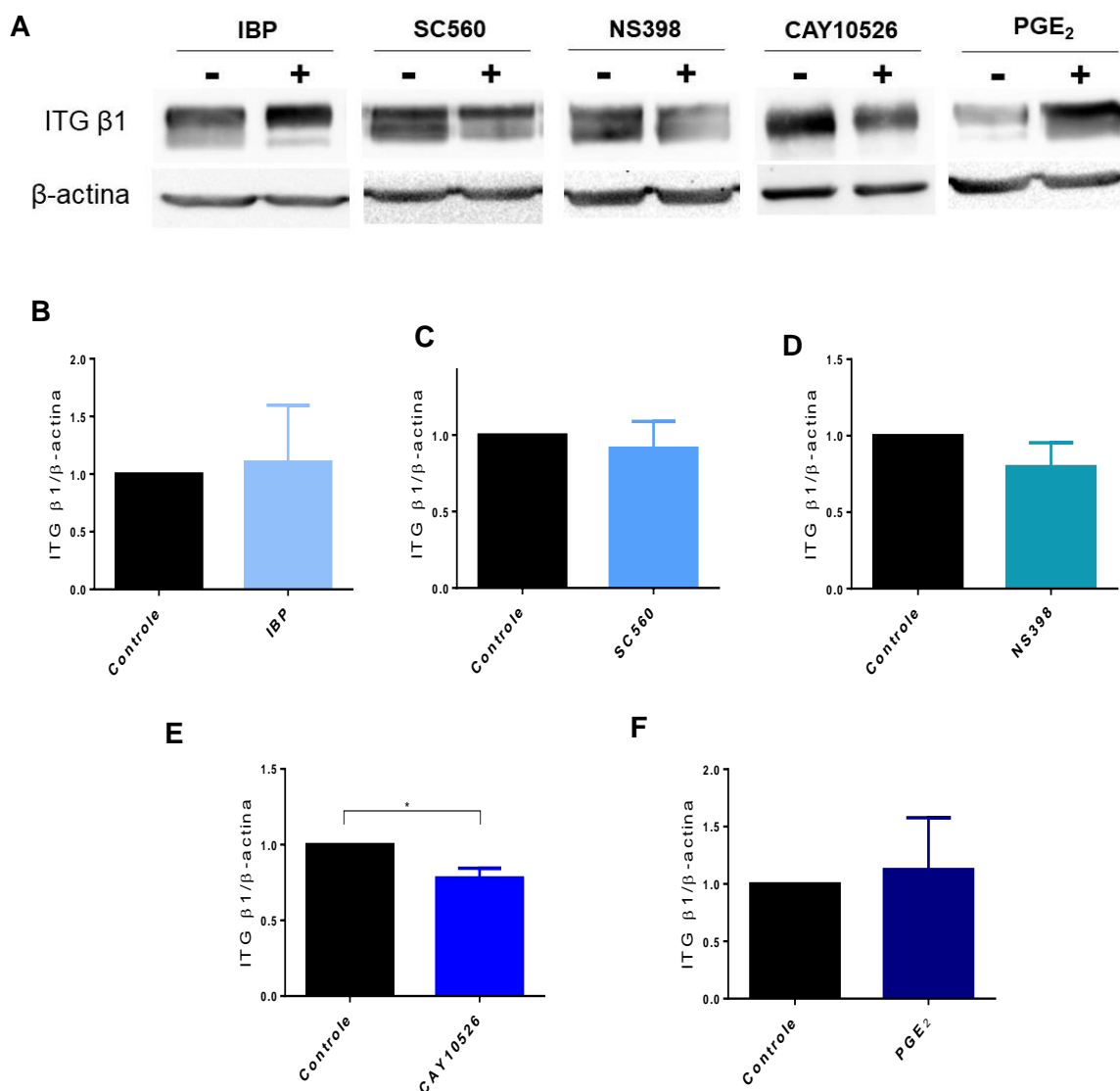


Figura 27. Expressão de Integrina β1 em células U87MG tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂. **A.** Imagem representativa de western blot **B.** Gráfico de densitometria de ITG β1 em células tratadas com IBP **C.** Gráfico de densitometria de ITG β1 em células tratadas com SC560 **D.** Gráfico de densitometria de ITG β1 em células tratadas com NS398. **E.** Gráfico de densitometria de ITG β1 em células tratadas com CAY10526. **F.** Gráfico de densitometria de ITG β1 em células tratadas com PGE₂. A significância estatística foi determinada por t-test (*, $p < 0.05$), $n = 3$.

Nenhum dos tratamentos testados alterou significativamente a expressão da ITG β3 na linhagem U87MG. Embora NS398 tenha reduzido em 42% a produção desta integrina nessas células (Figura 28-D), sua significância estatística não pôde ser calculada pois o experimento foi realizado apenas duas vezes.

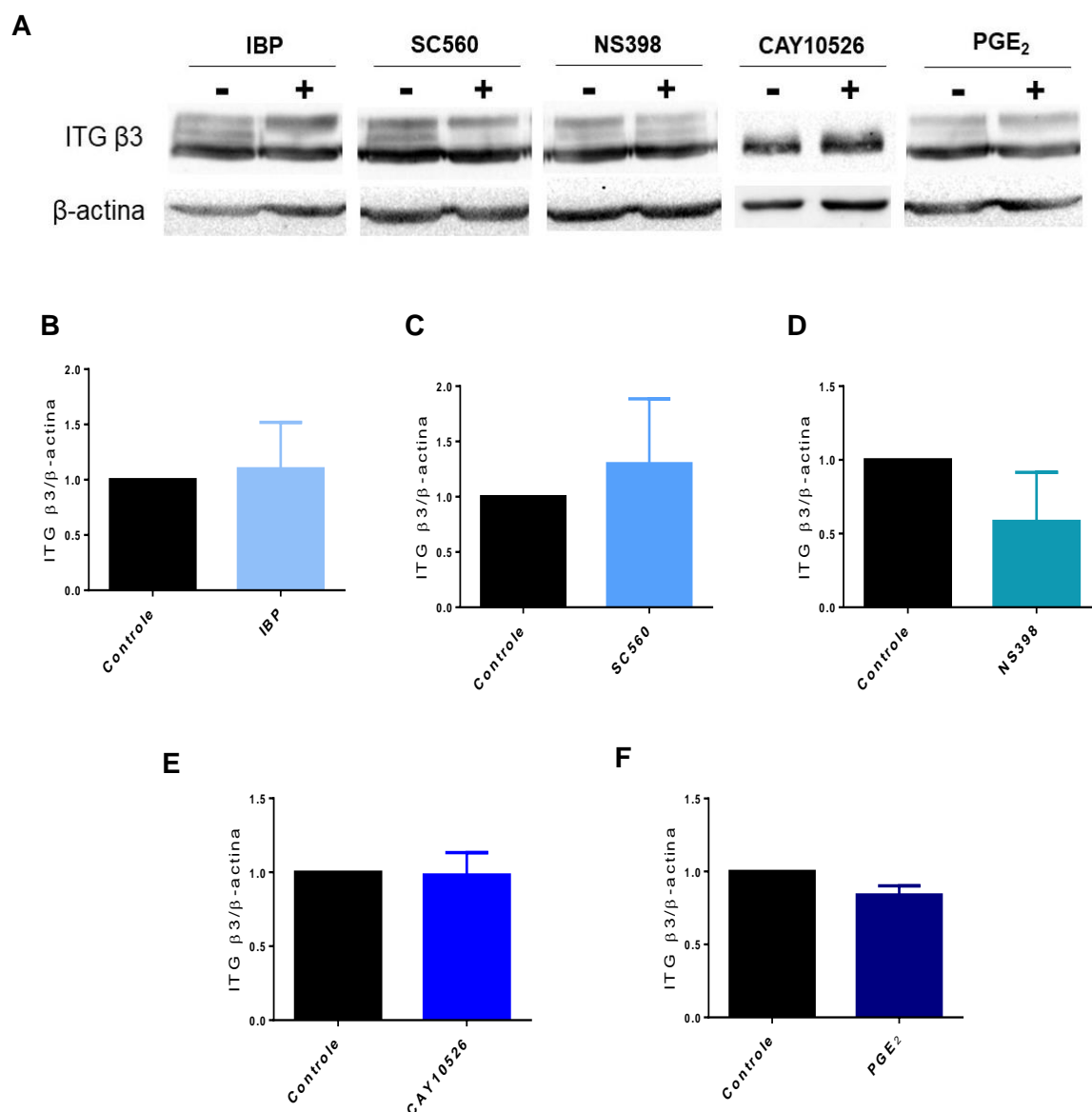


Figura 28. Expressão de Integrina $\beta 3$ em células U87MG tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂. **A.** Imagem representativa de western blot **B.** Gráfico de densitometria de ITG $\beta 3$ em células tratadas com IBP **C.** Gráfico de densitometria de ITG $\beta 3$ em células tratadas com SC560 **D.** Gráfico de densitometria de ITG $\beta 3$ em células tratadas com NS398. **E.** Gráfico de densitometria de ITG $\beta 3$ em células tratadas com CAY10526. **F.** Gráfico de densitometria de ITG $\beta 3$ em células tratadas com PGE₂. A significância estatística foi determinada por t-test, $n=2$, com exceção do tratamento com CAY10526 cujo $n=3$.

Células T98G tratadas com IBP (Figura 29-B), SC560 (Figura 29-C) e PGE₂ (Figura 29-F) não alteraram a expressão de ITG $\alpha 3$. O tratamento da linhagem T98G com NS398 (Figura 29-D) reduziu a expressão de ITG $\alpha 3$ em 33%. CAY10526 reduziu significativamente a expressão de ITG $\alpha 3$ em células T98G (Figura 29-E).

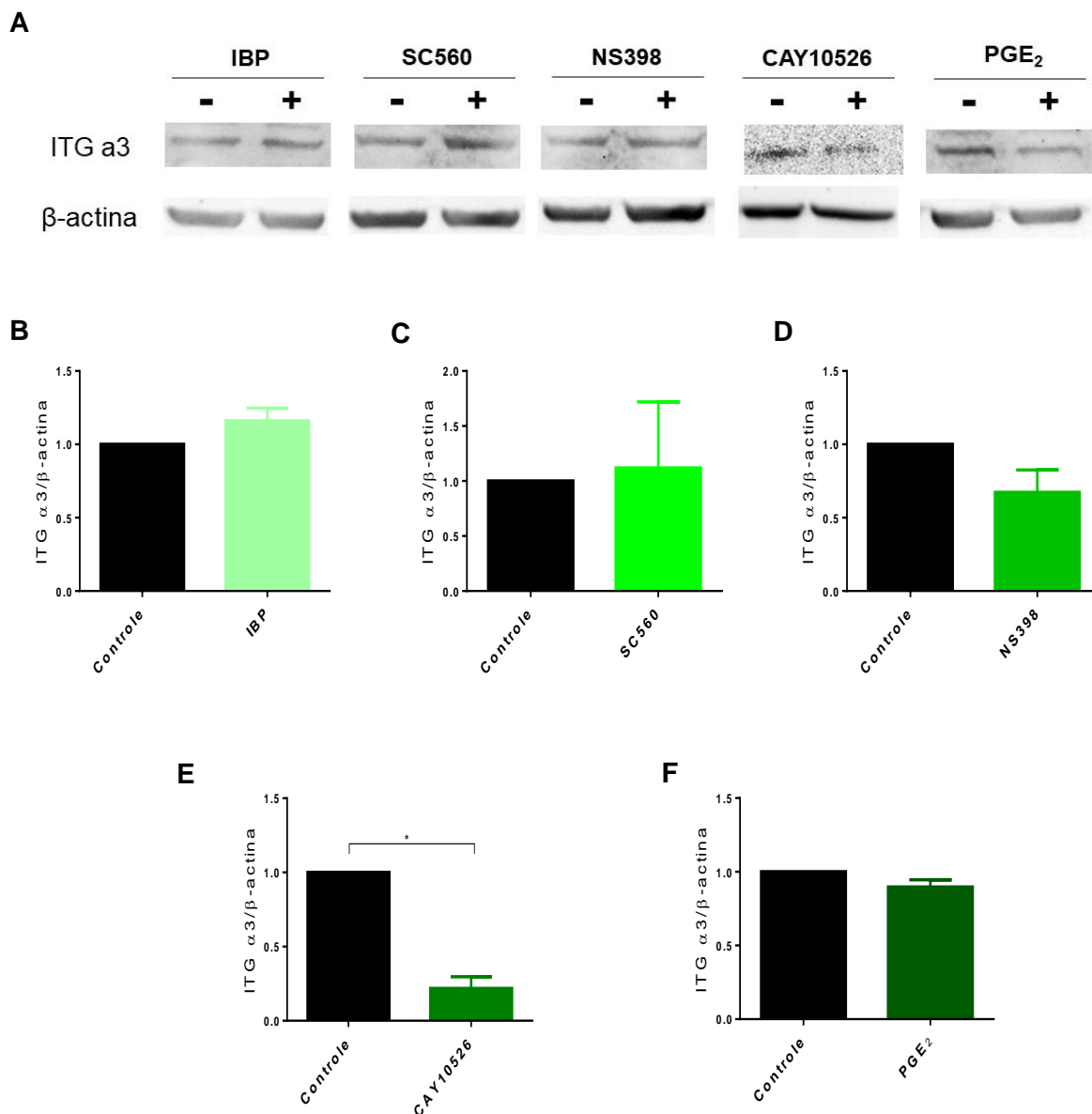


Figura 29. Expressão de Integrina α3 em células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂. **A.** Imagem representativa de western blot **B.** Gráfico de densitometria de ITG α3 em células tratadas com IBP **C.** Gráfico de densitometria de ITG α3 em células tratadas com SC560 **D.** Gráfico de densitometria de ITG α3 em células tratadas com NS398. **E.** Gráfico de densitometria de ITG α3 em células tratadas com CAY10526. **F.** Gráfico de densitometria de ITG α3 em células tratadas com PGE₂. A significância estatística foi determinada por t-test, n=3 (*, p<0.05).

Em células T98G nenhum dos tratamentos estudados levou a alteração da expressão da proteína ITG α5. Esse resultado, porém, não pôde ser analisado estatisticamente pois o experimento foi realizado apenas duas vezes. O tratamento com CAY10526 é uma exceção, já que foi realizado em triplicata experimental, porém essa droga não apresentou efeito estatisticamente significativo (Figura 30-E).

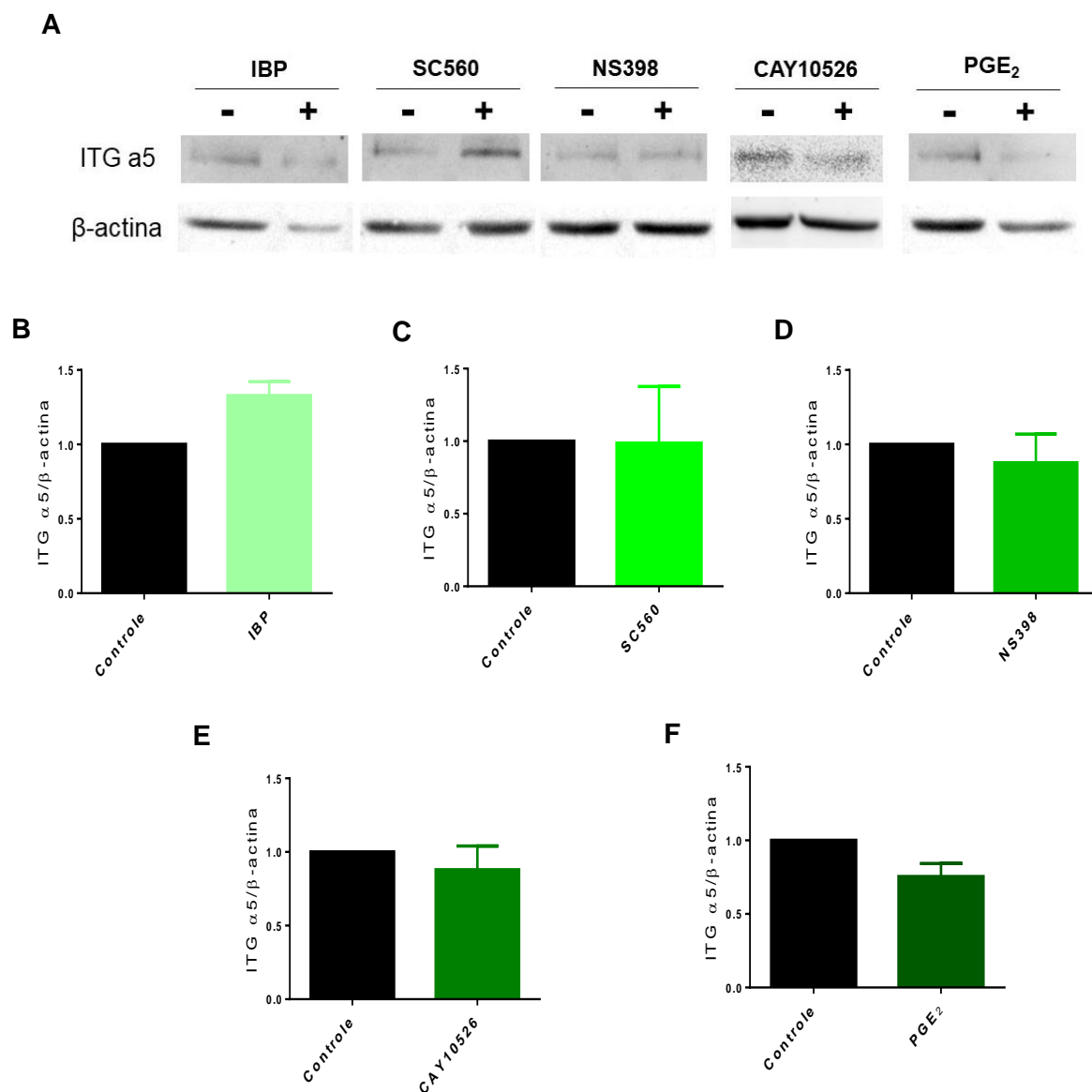


Figura 30. Expressão de Integrina α5 em células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂. **A.** Imagem representativa de western blot **B.** Gráfico de densitometria de ITG α5 em células tratadas com IBP **C.** Gráfico de densitometria de ITG α5 em células tratadas com SC560 **D.** Gráfico de densitometria de ITG α5 em células tratadas com NS398. **E.** Gráfico de densitometria de ITG α5 em células tratadas com CAY10526. **F.** Gráfico de densitometria de ITG α5 em células tratadas com PGE₂. A significância estatística foi determinada por t-test, n=2, com exceção do tratamento com CAY10526 cujo n=3.

As alterações da expressão de ITG αv em células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398 e PGE₂ não foram analisadas estatisticamente por o experimento foi realizado apenas duas vezes. SC560 diminuiu a expressão de ITG αv em células T98G em 29,5% (Figura 31-C), enquanto que NS398 reduziu essa proteína em 25,4% (Figura 31-D). O tratamento CAY10526 foi realizado três vezes e levou a

redução de 42% nos níveis desta proteína (Figura 31-E). No entanto, esse resultado não foi estatisticamente significativo.

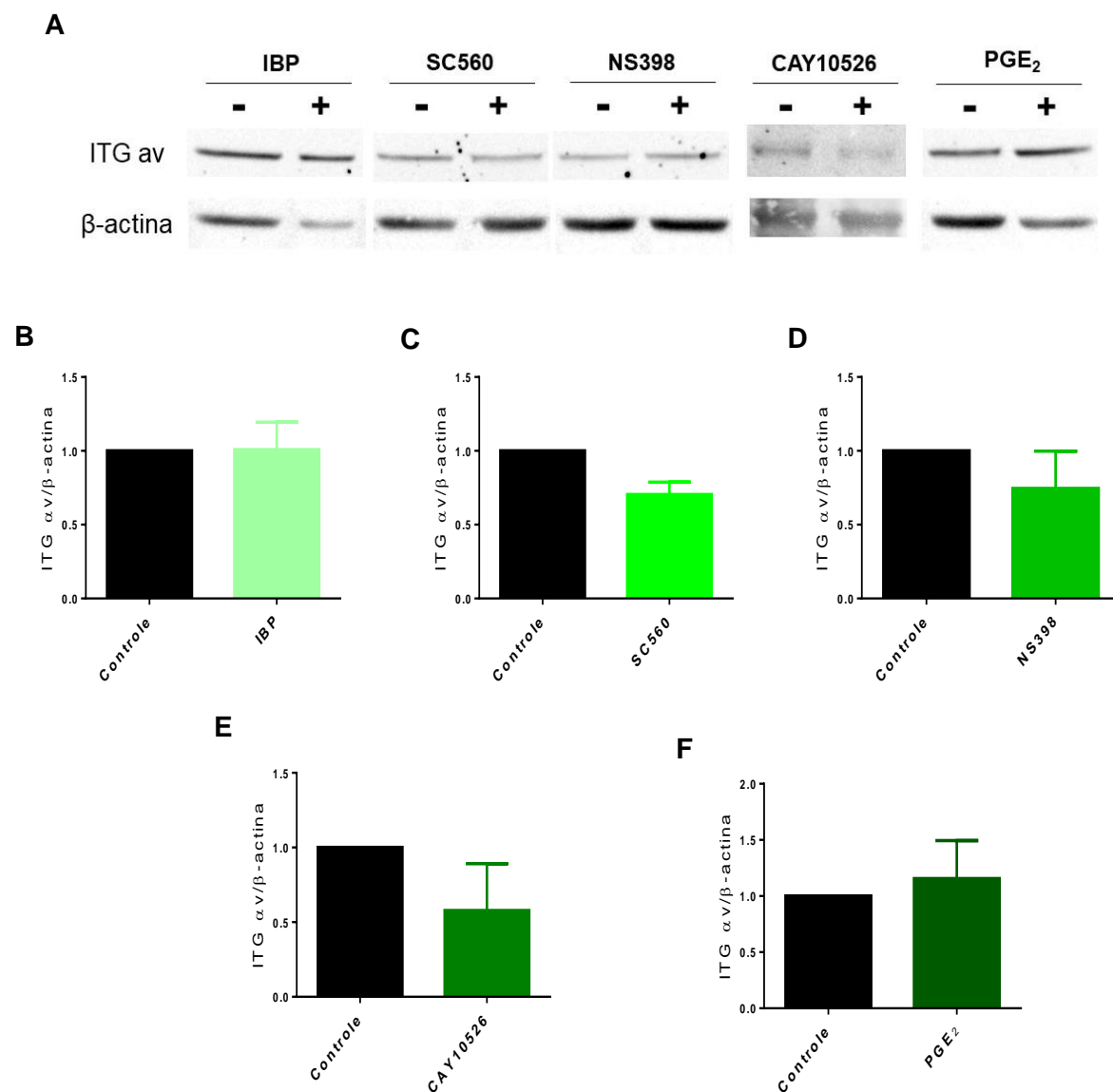


Figura 31. Expressão de Integrina α v em células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂. **A.** Imagem representativa de western blot **B.** Gráfico de densitometria de ITG α v em células tratadas com IBP **C.** Gráfico de densitometria de ITG α v em células tratadas com SC560 **D.** Gráfico de densitometria de ITG α v em células tratadas com NS398. **E.** Gráfico de densitometria de ITG α v em células tratadas com CAY10526. **F.** Gráfico de densitometria de ITG α v em células tratadas com PGE₂. A significância estatística foi determinada por t-test, n=2, com exceção do tratamento com CAY10526 cujo n=3. Proteínas de amostras tratadas com CAY10526 e respectivo controle normalizado por Ponceau Red.

A expressão da ITG β 1 foi avaliada em células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂. NS398 e CAY10526. NS398 (Figura 32-D) reduziu ITG β 1 em 18% e CAY10526 em 23% (Figura 32-E).

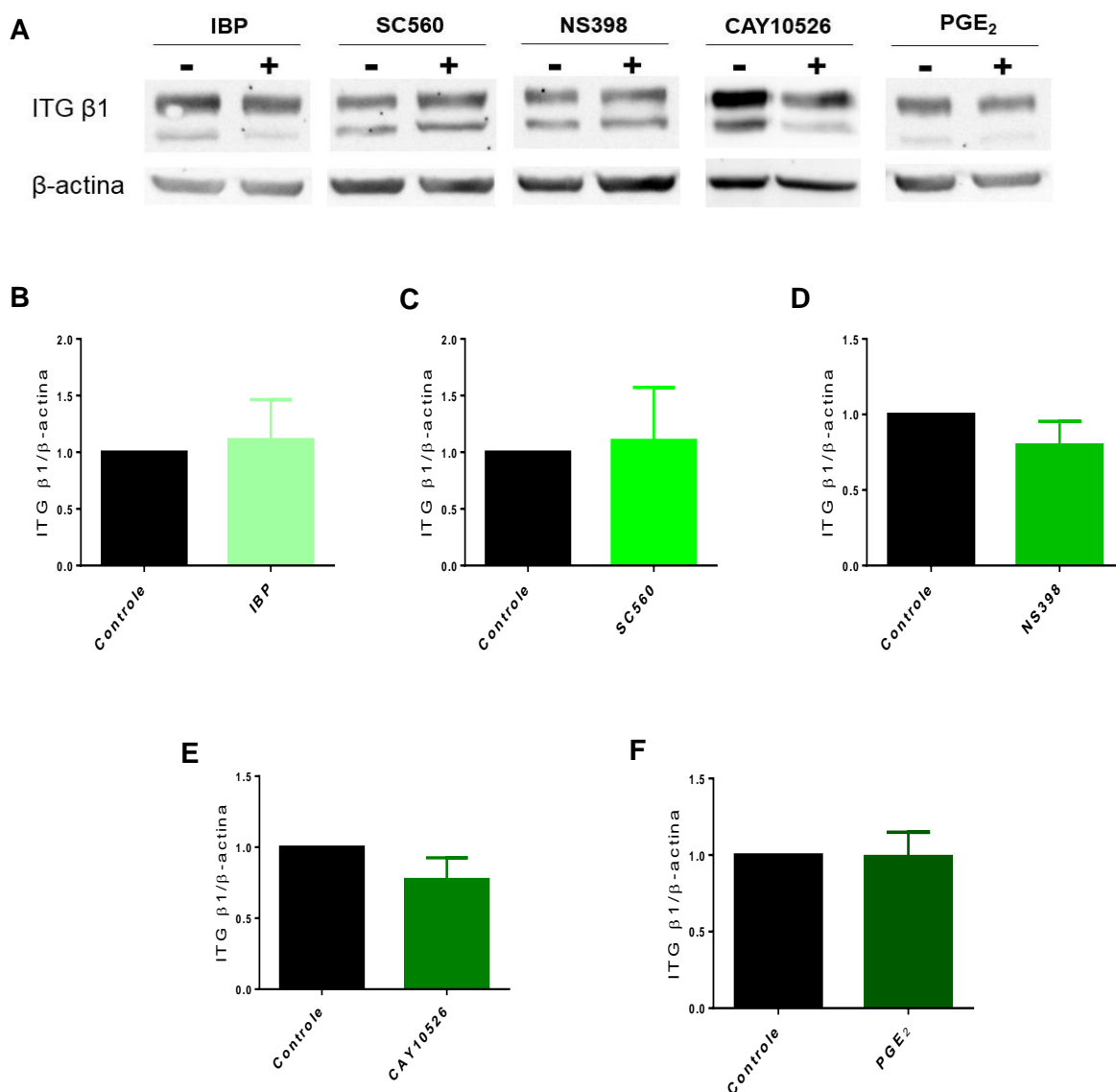


Figura 32. Expressão de Integrina $\beta 1$ em células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂. **A.** Imagem representativa de western blot **B.** Gráfico de densitometria de ITG $\beta 1$ em células tratadas com IBP **C.** Gráfico de densitometria de ITG $\beta 1$ em células tratadas com SC560 **D.** Gráfico de densitometria de ITG $\beta 1$ em células tratadas com NS398. **E.** Gráfico de densitometria de ITG $\beta 1$ em células tratadas com CAY10526. **F.** Gráfico de densitometria de ITG $\beta 1$ em células tratadas com PGE₂. A significância estatística foi determinada por t-test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$), $n = 3$.

Células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂ não alteraram a expressão da ITG $\beta 3$. A análise estatística dos resultados obtidos com os tratamentos com IBP, SC560, NS398 e PGE₂ não pôde ser realizada porque os experimentos foram realizados apenas duas vezes. O tratamento das células T98G com CAY10526, apesar de não apresentar significância estatística, levou a redução da expressão da ITG $\beta 3$ em 39% (Figura 33-E).

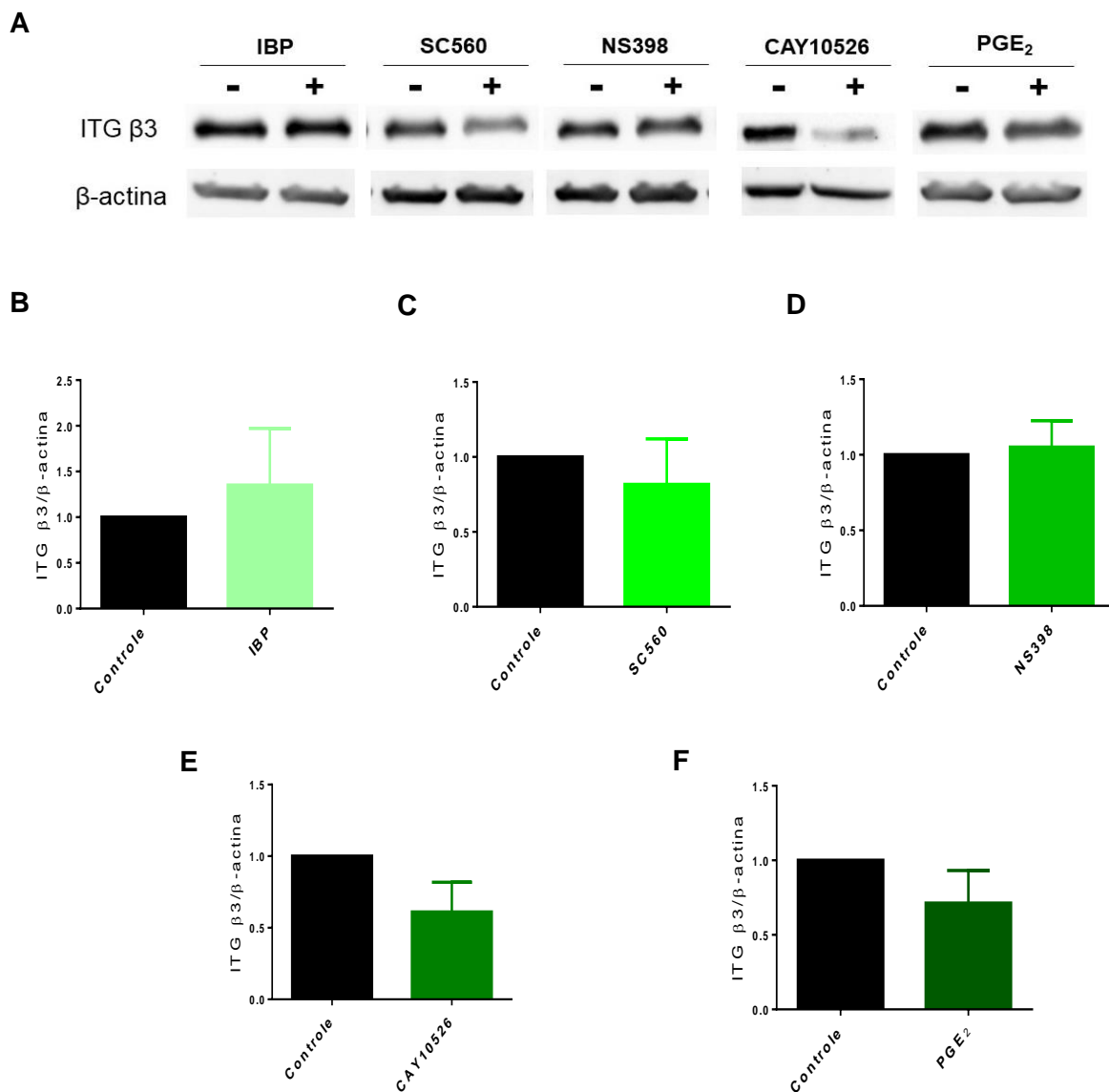


Figura 33. Expressão de Integrina β3 em células T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂. **A.** Imagem representativa de western blot **B.** Gráfico de densitometria de ITG β3 em células tratadas com IBP **C.** Gráfico de densitometria de ITG β3 em células tratadas com SC560 **D.** Gráfico de densitometria de ITG β3 em células tratadas com NS398. **E.** Gráfico de densitometria de ITG β3 em células tratadas com CAY10526. **F.** Gráfico de densitometria de ITG β3 em células tratadas com PGE₂. A significância estatística foi determinada por t-test, n=2, com exceção do tratamento com CAY10526 cujo n=3.

De modo geral, a inibição não seletiva de COX com IBP e o tratamento das duas linhagens estudadas com PGE₂ demonstraram não ter impacto sobre a expressão das ITGs avaliadas neste projeto, com exceção da ITG αv na linhagem U87MG. A inibição de mPGES-1 com CAY10526 induziu a redução das ITGs β1 e α3 nas células U87MG. Esses resultados indicam que CAY10526 pode reduzir a migração dessa linhagem celular através da diminuição da expressão de diferentes

ITGs, interferindo, assim, na interação entre as células e a MEC. A comparação dos resultados obtidos em ambas as linhagens, comprovam que uma mesma droga pode ter efeitos diferentes em linhagens celulares diversas.

4.5 Ensaio de fechamento de ferida das linhagens U87MG e T98G

Visando verificar os efeitos dos tratamentos com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂ na migração celular em monocamada das linhagens U87MG e T98G, foi realizada a técnica de ensaio de fechamento de ferida. Nesse ensaio, as células U87MG tratadas e não tratadas migraram por 6h, enquanto as células T98G migraram por 12h.

O tratamento com IBP reduziu a migração das células U87MG em 8,67%, enquanto que o inibidor SC560 reduziu a migração desta linhagem em 29%. A inibição seletiva de COX-2 com NS398 diminuiu a migração das células U87MG em 14,33%, resultado muito similar ao encontrado com o tratamento com CAY10526 que apresentou uma redução de 14%. Em contrapartida, PGE₂ estimulou a migração das células U87MG 11,33% a mais que o controle. Na Figura 34-F pode observado o gráfico com os resultados de todos os tratamentos normalizados pela área invadida pelos respectivos controles (veículo da droga).

Na linhagem T98G os tratamentos com SC560, NS398 e CAY10526 reduziram significativamente a migração celular em 53%, 26,67% e 64,33%, respectivamente. Apesar de ter diminuído a migração das células em 14%, o IBP não teve efeito estatisticamente significativo nesta linhagem. O tratamento com PGE₂ impactou em menos de 5% a migração das células T98G. Na Figura 35-F pode observado o gráfico com os resultados de todos os tratamentos normalizados pela área invadida pelos respectivos controles (veículo da droga).

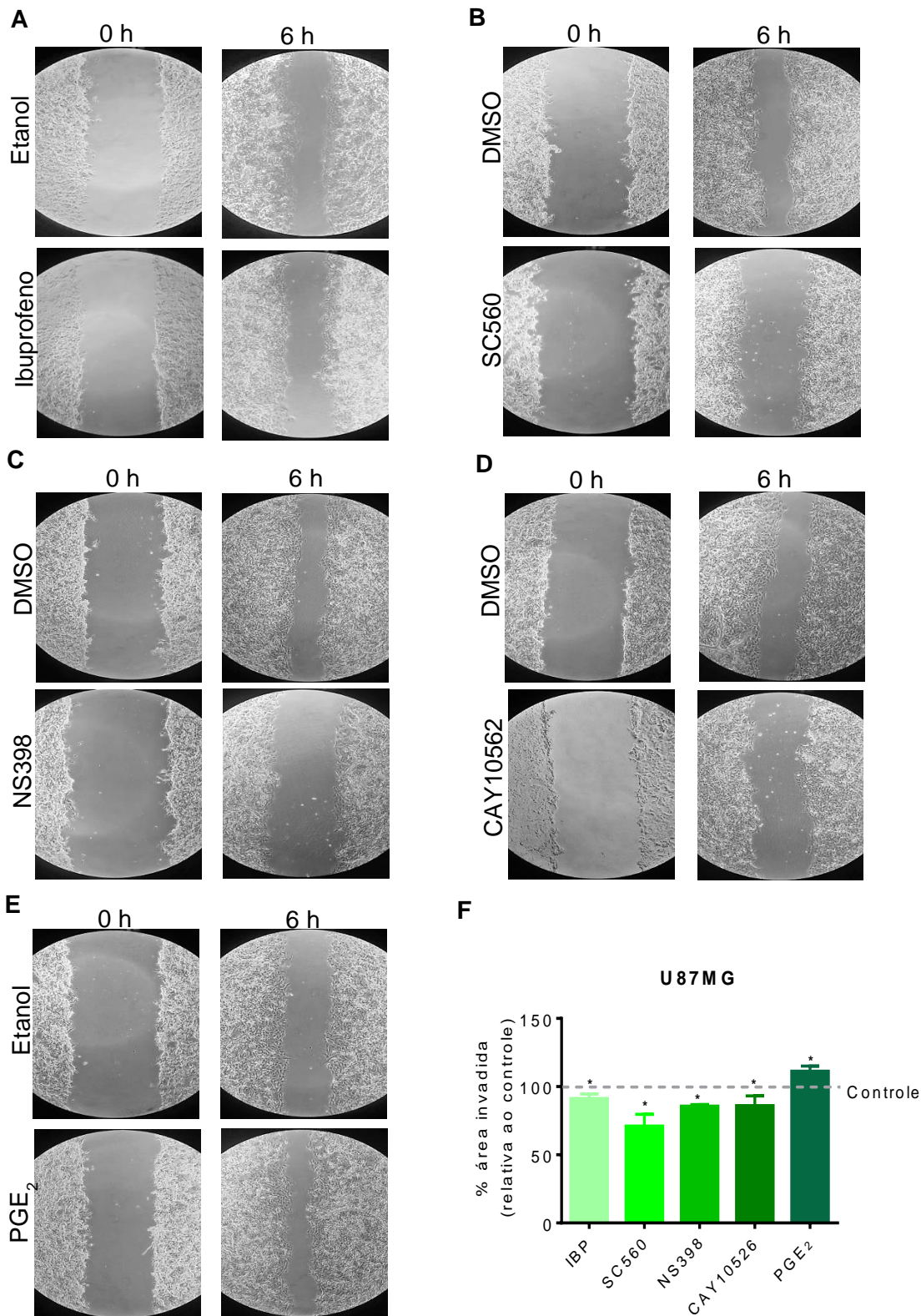


Figura 34. Ensaio de fechamento de ferida de células U87MG tratadas com ibuprofeno (IBP), SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂. A. Células tratadas com 100 μ M de IBP por 72h. B. Células tratadas com 50 μ M de SC560 por 48h. C. Células tratadas com 50 μ M de NS398 por 48h. D. células tratadas com 20 μ M de CAY10526 por 48h. E. Células tratadas com 10 μ M de PGE₂ por 72h. F. Quantificação da área invadida relativa ao controle. As células U87MG migraram por 6h. A significância estatística foi determinada por One sample t-test (*, $p < 0.05$; e **, $p < 0.01$), $n = 3$.

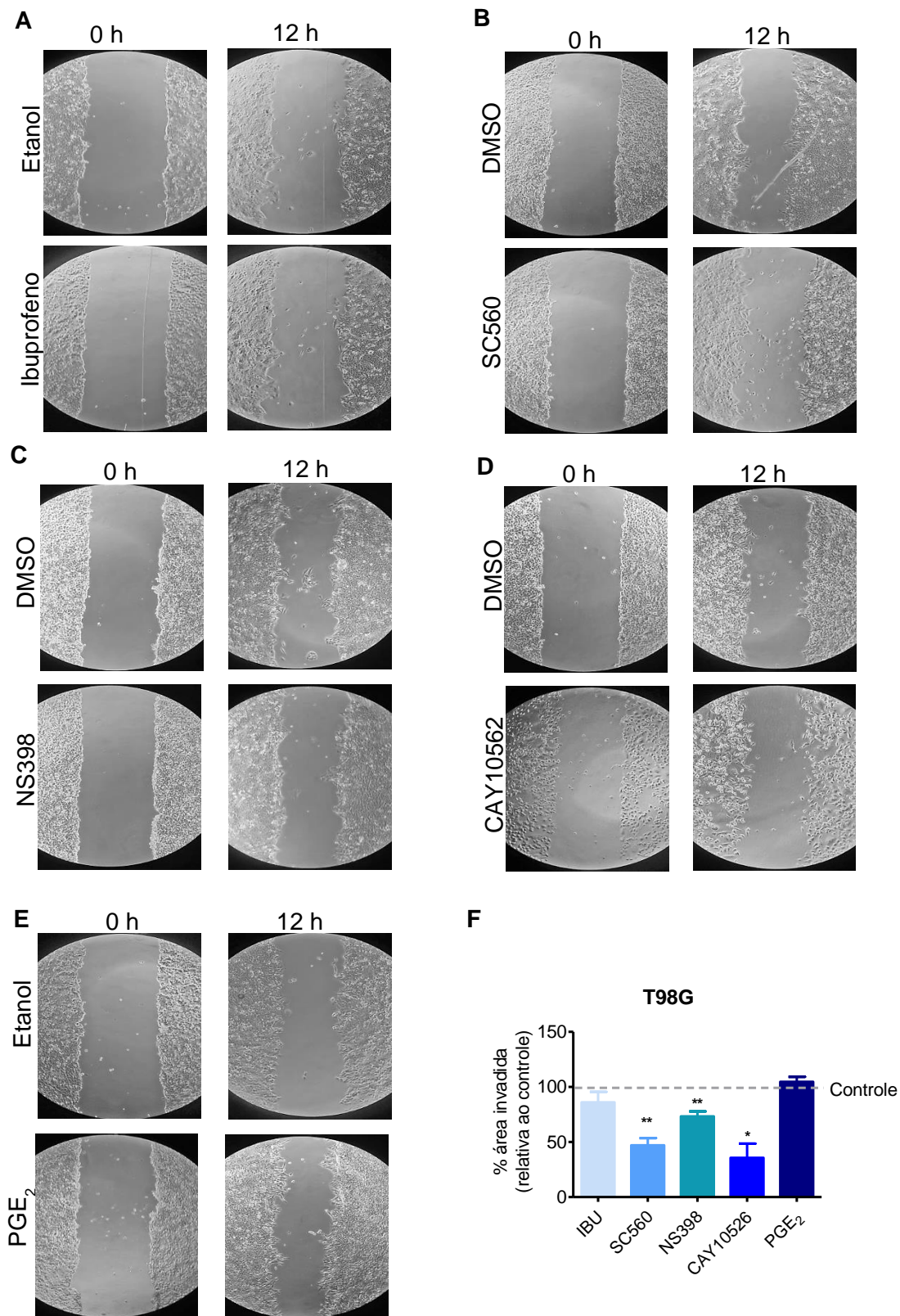


Figura 35. Ensaio de fechamento de ferida de células T98G tratadas com ibuprofeno (IBP), SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂. **A.** Células tratadas com 200 μ M de IBP por 72h. **B.** Células tratadas com 50 μ M de SC560 por 48h. **C.** Células tratadas com 50 μ M de NS398 por 48h. **D.** células tratadas com 25 μ M de CAY10526 por 48h. **E.** Células tratadas com 10 μ M de PGE₂ por 72h. **F.** Quantificação da área invadida relativa ao controle. As células T98G migraram por 12h. A significância estatística foi determinada por One sample t-test (*, $p < 0.05$; e **, $p < 0.01$), $n = 3$.

4.6 Morfologia celular

4.6.1 Morfologia celular das linhagens U87MG e T98G em microscopia de contraste de fase.

Durante a realização dos tratamentos para os experimentos deste projeto, foi observado que alguns dos fármacos testados modificavam a morfologia celular de ambas as linhagens estudadas. Após analisar a influência dessas drogas sobre a migração celular e levando-se em consideração que alteração da morfologia é um aspecto relevante no processo de migração das células, decidiu-se analisar qualitativamente a morfologia celular das células U87MG e T98G submetidas a cada um dos tratamentos por 24h.

Na Figura 36 pode-se observar o efeito do IBP (B), SC560 (C), NS398 (D), CAY10526 (E) e PGE₂ (F) na morfologia de células U87MG tratadas por 24h. Note que em imagens de microscopia de contraste de fase, não é possível observar alterações na aparência das células tratadas com IBP, NS398 e PGE₂ em comparação com o controle (A). Por outro lado, o tratamento com SC560 modificou a morfologia das células U87MG tornando-as mais alongadas e espaçadas. Além disso, é visível o efeito da droga sobre o número de células após 24h de tratamento. O inibidor CAY10526 também apresentou efeito sobre o número e morfologia das células U87MG. Observe que as células expostas a este tratamento apresentam menos prolongamentos celulares.

O efeito do IBP (B), SC560 (C), NS398 (D), CAY10526 (E) e PGE₂ (F) na morfologia de células T98G pode ser observado na Figura 37, as células foram tratadas por 24h. Note que em imagens de microscopia de contraste de fase IBP apresentou um efeito discreto sobre o número de células e nenhuma alteração visível na morfologia em comparação com o controle (A). Do mesmo modo, o tratamento com NS398 e PGE₂ não alterou a morfologia celular de modo a ser visto em microscopia de contraste de fase. Por outro lado, o tratamento com SC560 diminuiu o número de células e modificou a morfologia da linhagem T98G tornando as células mais alongadas e espaçadas em comparação ao controle. O efeito do inibidor CAY10526 foi similar ao observado na linhagem U87MG, apresentando células mais arredondas e esparçadas.

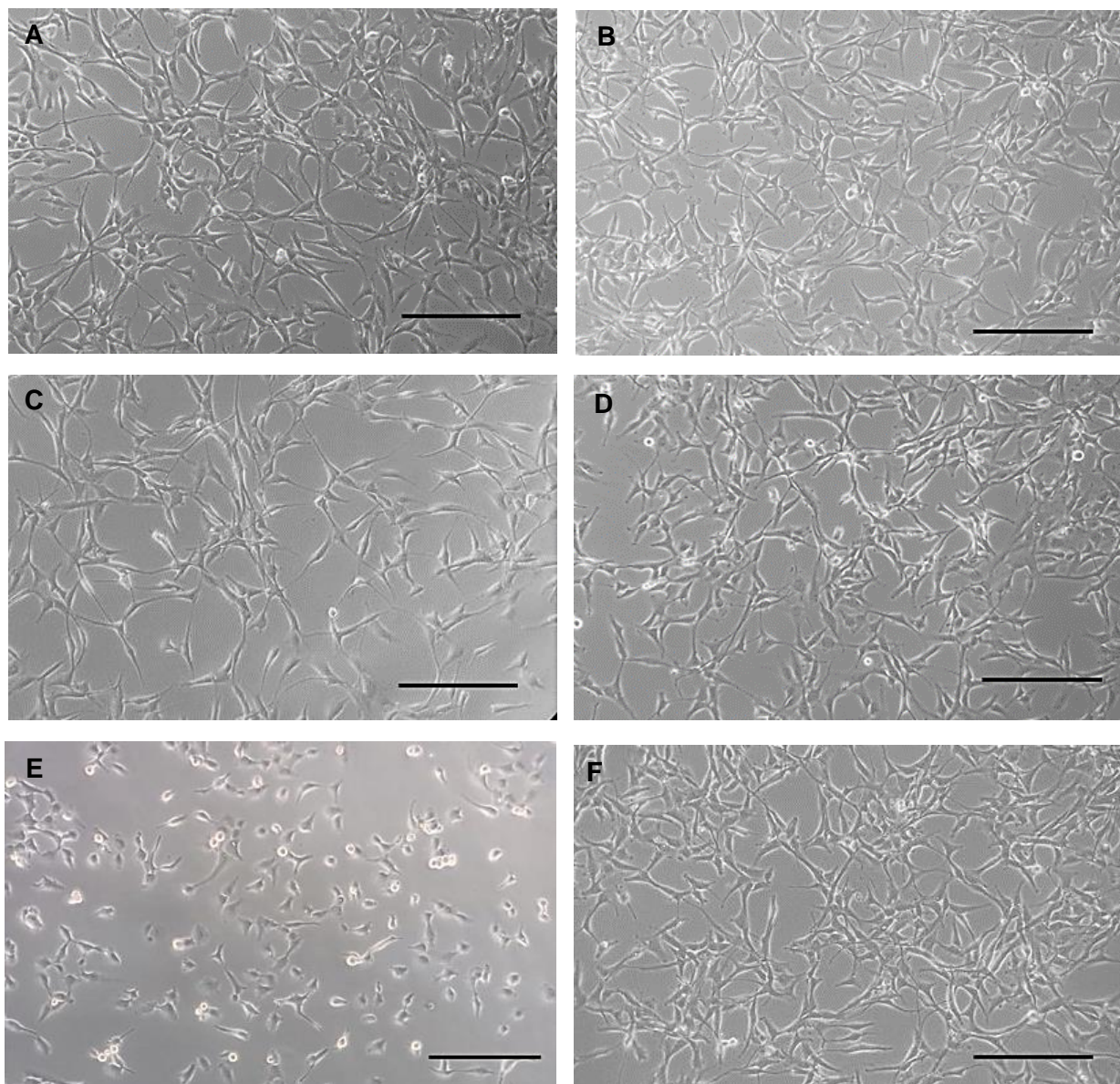


Figura 36. Morfologia de células U87MG tratadas com ibuprofeno (IBP), SC560, NS398, CAY10526 ou PGE₂ por 24h. A. Controle B. Ibuprofeno C. SC560 D. NS398 E. CAY10526 F. PGE₂. Imagem de microscopia de contraste de fase, escala 100 μm.

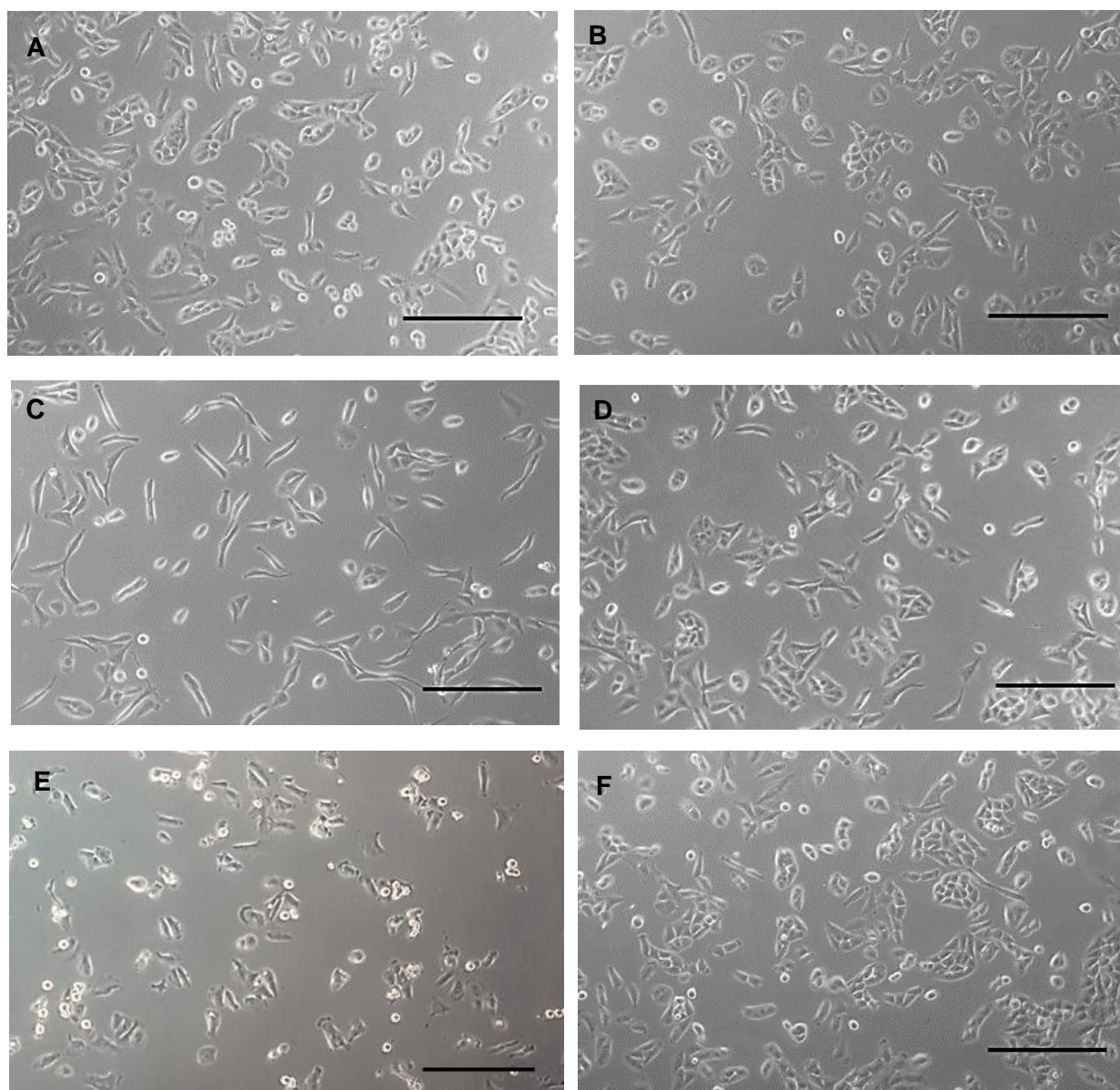


Figura 37. Morfologia de células T98G tratadas com ibuprofeno (IBP), SC560, NS398, CAY10526 ou PGE₂ por 24h. A. Controle B. Ibuprofeno C. SC560 D. NS398 E. CAY10526 F. PGE₂. Imagem de microscopia de contraste de fase, escala 100 μ m.

4.6.2 Morfologia celular das linhagens U87MG e T98G em microscopia de fluorescência

A fim de observar em mais detalhes os efeitos dos tratamentos sobre a morfologia celular das linhagens U87MG e T98G, decidiu-se realizar a marcação dos filamentos de actina com faloidina, e posterior visualização em microscopia de fluorescência.

Nas Figuras 38-A e 38-B pode-se observar o efeito do IBP (B), SC560 (C), NS398 (D), CAY10526 (E) e PGE₂ (F) no citoesqueleto de actina de células U87MG tratadas por 24h. Quando tratadas com IBP, NS398 ou PGE₂ as células U87MG apresentaram características semelhantes ao controle. Em contrapartida, a inibição de COX-1 com SC560 promoveu o alongamento do corpo celular com a presença de fortes fibras de estresse por toda a extensão longitudinal das células. Por vezes este inibidor ocasionou um alongamento tão intenso nas células que não é possível visualizar o citoplasma. Também foi observada a presença de densos feixes de actina no cortéx celular e múltiplos filopódios. CAY10526 provocou a desorganização dos filamentos de actina e desestruturação das fibras de estresse, também foi possível observar a presença de grande quantidade de estruturas pontiformes que se coraram intensamente com faloidina.

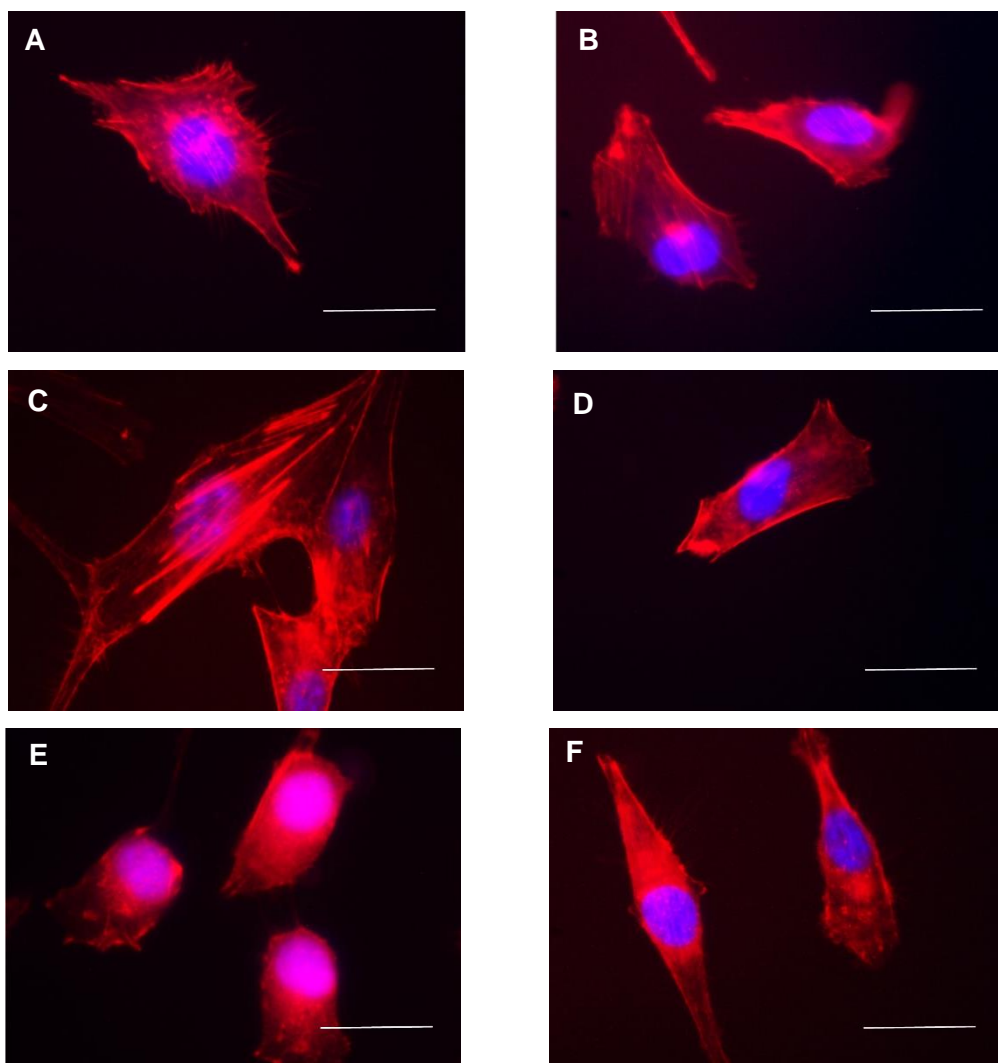


Figura 38-A. Morfologia de células U87MG tratadas com ibuprofeno (IBP), SC560, NS398, CAY10526 ou PGE₂ por 24h. A. Controle B. Ibuprofeno C. SC560 D. NS398 E. CAY10526 F. PGE₂. Coloração de F-actina com faloidina, escala 30 μ m.

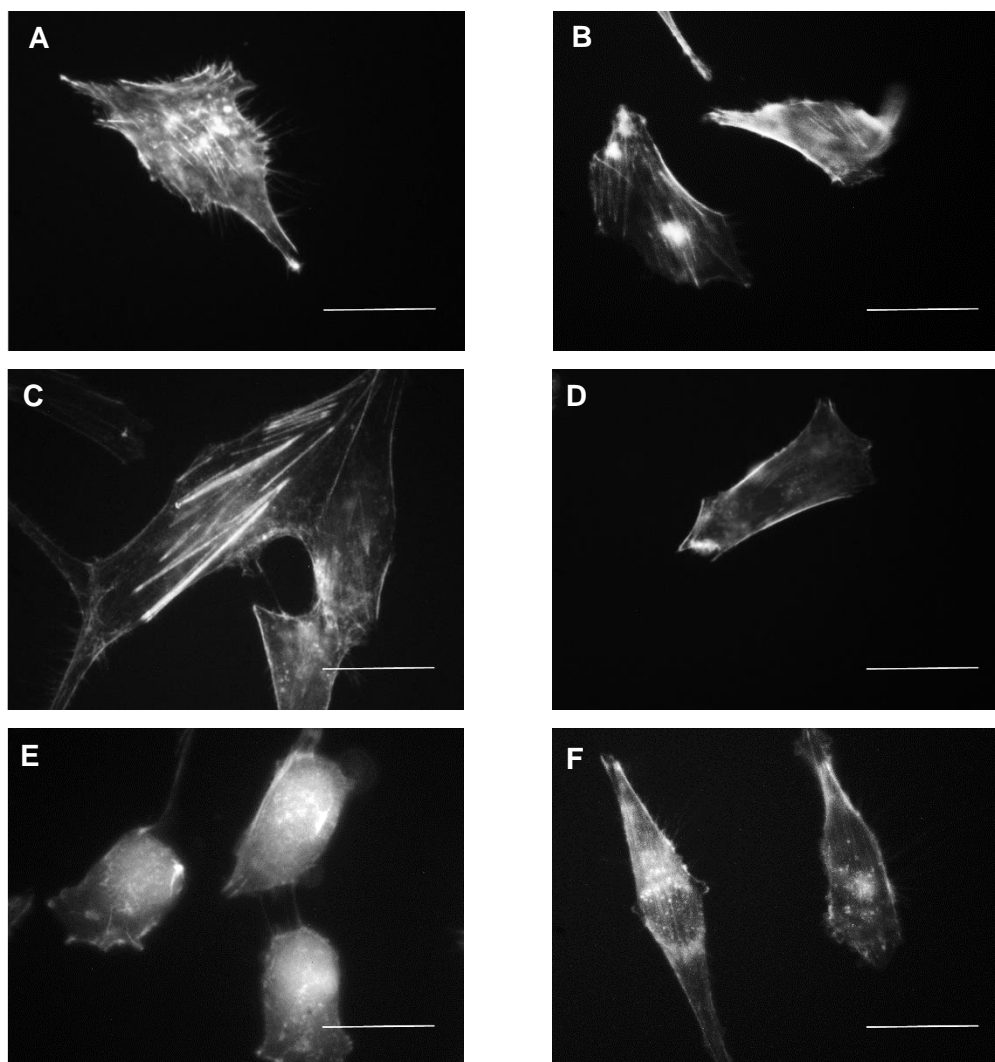


Figura 38-B. Morfologia de células U87MG tratadas com ibuprofeno (IBP), SC560, NS398, CAY10526 ou PGE₂ por 24h. A. Controle B. Ibuprofeno C. SC560 D. NS398 E. CAY10526 F. PGE₂. Coloração de F-actina com faloidina, escala 30 µm.

Nas Figuras 39-A e 39-B pode-se observar o efeito do IBP (B), SC560 (C), NS398 (D), CAY10526 (E) e PGE₂ (F) no citoesqueleto de actina de células T98G tratadas por 24h. Os tratamentos com IBP e PGE₂ não levaram a alterações significativas do citoesqueleto de actina. O tratamento de T98G com NS398 levou a formação de filopódios e acúmulo de actina em áreas próximas ao córtex celular. SC560 estimulou a formação de fortes fibras de estresse o que tornou o corpo celular mais alongado. Células T98G tratadas CAY10526 apresentaram redução das fibras de estresse e desorganização dos feixes de actina ou sua presença no córtex celular.

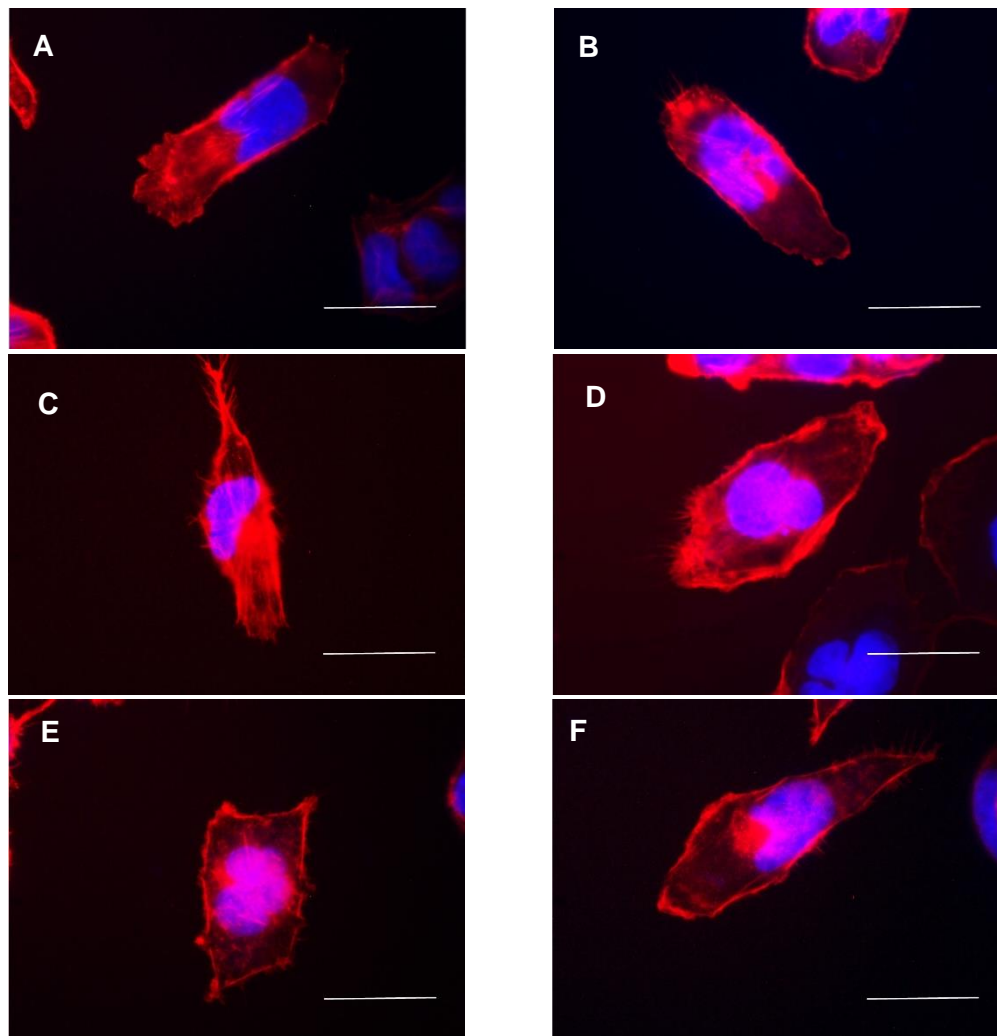


Figura 39-A. Morfologia de células T98G tratadas com ibuprofeno (IBP), SC560, NS398, CAY10526 ou PGE₂ por 24h. A. Controle B. Ibuprofeno C. SC560 D. NS398 E. CAY10526 F. PGE₂. Coloração de F-actina com faloidina, escala 30 μ m.

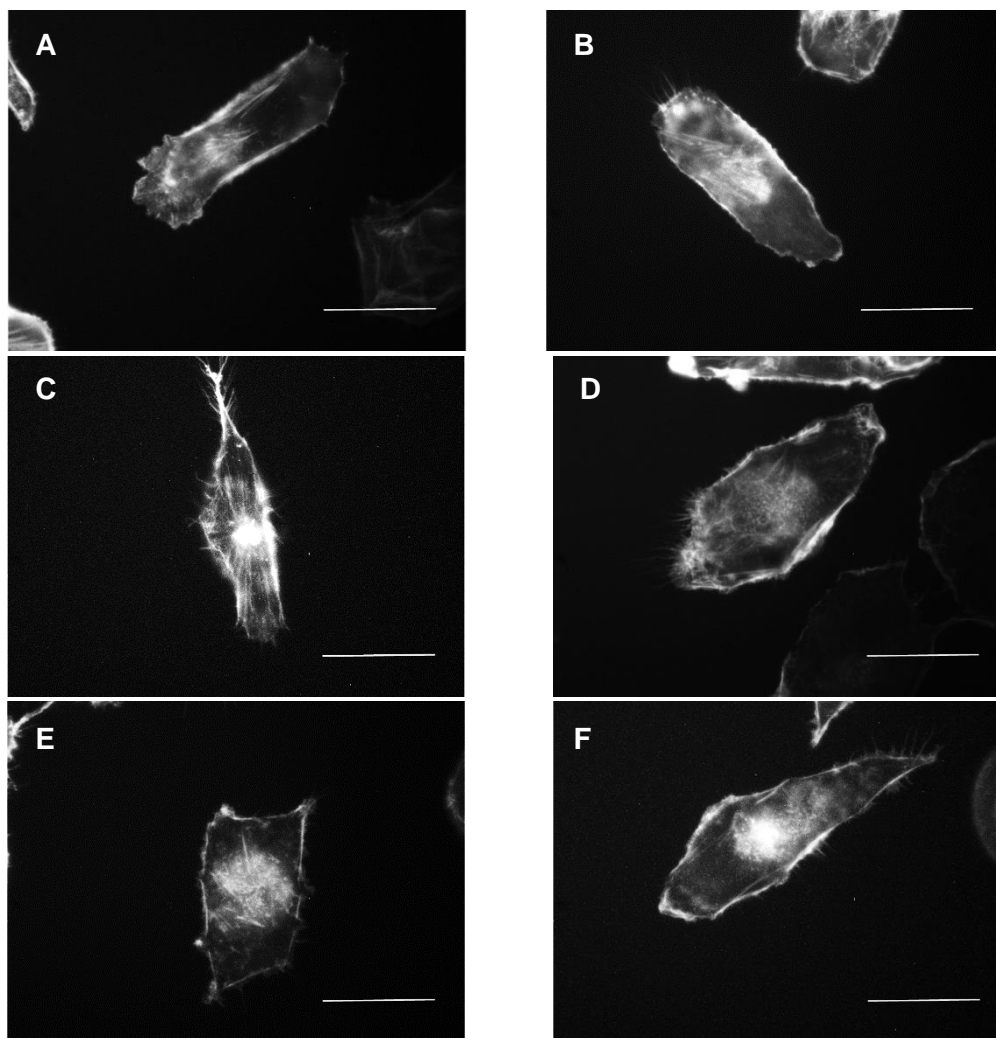


Figura 39-B. Morfologia de células T98G tratadas com ibuprofeno (IBP), SC560, NS398, CAY10526 ou PGE₂ por 24h. A. Controle B. Ibuprofeno C. SC560 D. NS398 E. CAY10526 F. PGE₂. Coloração de F-actina com faloidina, escala 30 μ m.

5 DISCUSSÃO

O GBM é o mais incidente, agressivo e infiltrativo dos astrocitomas (Mehta *et al.*, 2017; Yi *et al.*, 2016). Caracterizado por alta capacidade migrar e invadir o tecido cerebral sadio adjacente ao tumor (Roos *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2012). Os principais tratamentos para glioblastoma consistem em retirada cirúrgica do tumor, seguida de radioterapia e quimioterapia. Apesar das terapias disponíveis os pacientes com GBM tem sobrevida média de aproximadamente 12 meses após a cirurgia (Cunha, Maldaun, 2019). Em parte, devido a ampla infiltração de células tumorais no tecido cerebral saudável adjacente torna a ressecção total do tumor impossível, o que colabora para a recorrência tumoral poucos meses após a cirurgia (Coniglio, Segall, 2013; Roos *et al.*, 2017; Yi *et al.*, 2016).

Estudos mostram que a MEC ao redor do tumor é relevante para os processos de migração e invasão tumoral em gliomas. Essa matriz é rica em proteínas que aumentam a motilidade celular e podem ser produzidas pelas células tumorais de GBM (Vehlow, Cordes, 2013). A interação entre as células e a MEC são mediadas principalmente por receptores extracelulares chamados integrinas. Células de GBM superexpressam vários desses receptores e alguns deles estão diretamente relacionados ao aumento da migração e invasão celular, assim como, grau de agressividade e pior prognóstico em gliomas (Malric *et al.*, 2017; Vehlow, Cordes, 2013).

É sabido que o principal produto da via das COXs, PGE₂, participa de diversos mecanismos envolvidos na progressão de vários tipos câncer (Zhou *et al.*, 2005; Gomes, Colquhoun, 2012). Em gliomas, PGE₂ está diretamente relacionado com o grau de malignidade tumoral, estímulo da proliferação e sobrevivência celular e aumento da migração (Brocard *et al.*, 2015; Gomes, Colquhoun, 2012). Estudos anteriores, realizados em nosso grupo de pesquisa, demonstraram que as enzimas COX e PGE₂ influenciam a migração celular, a expressão de proteínas de matriz extracelular LAM, FN, VTN e COL4, assim como, a expressão de integrinas (Feitoza, 2013). Pautando-se nessas evidências, neste trabalho, foi investigado a influência de PGE₂ e inibição seletiva e não seletiva das COXs, assim como, da sintase de PGE₂ mPGES-1 na migração celular das linhagens de GBM U87MG e T98G; e na expressão de proteínas da MEC e integrinas.

Análises por PCR convencional, realizadas em nosso grupo de pesquisa, demonstraram que as linhagens celulares U87MG e T98G expressam COX-1 e COX-2 (Ferreira *et al.*, 2018; Benadiba *et al.*, 2014; Cunha, 2012). A expressão gênica de COX-1 e COX-2 também foi detectada na linhagem U87MG por PCR em tempo real (Gomes, 2016). Análises de *western blot* mostraram que as células U87MG expressam COX-2 constitutivamente, enquanto astrócitos primários só expressam essa proteína após estímulo inflamatório, como o tratamento do interleucina 1 β (IL-1 β) (Payner *et al.*, 2006). As duas isoformas de COX foram detectadas em células T98G por *western blot* (Cunha, 2012). A expressão proteica de COX-1 e COX-2 também foi observada na linhagem U87MG por imunistoquímica (Feitosa, 2013; Ferreira *et al.*, 2018; Joki *et al.*, 2000) e imunofluorescência (Gomes, 2016).

Payner e colaboradores (2006) constataram que as linhagens U87MG e T98G expressam, constitutivamente, níveis proteicos elevados de mPGES-1, enquanto astrócitos primários não expressam esta enzima. Já a sintase citosólica de PGE₂ (cPGES) é produzida por todas as células, incluindo astrócitos normais. Análises de amostras de pacientes mostraram que mPGES-1 estava presente nos gliomas analisados, porém não foi detectada no cérebro sadio. Esses achados indicam que, provavelmente, mPGES-1 é expressa por células de gliomas, mas é ausente no tecido cerebral sadio. Cunha (2012) confirmou, por PCR convencional, que as células T98G expressam as sintases mPGES-1, mPGES-2 e cPGE. As sintases mPGES-1 e mPGES-2 também foram detectadas nesta linhagem por *western blot*.

Dados de cromatografia líquida associada à espectrometria de massas (HPLC-MS/MS) mostrou que PGE₂ é o prostanoide mais produzido por células U87MG (Ferreira *et al.*, 2018). Estudo da produção de PGE₂ em células U87MG e astrócitos primários, por ensaio de ELISA, revelou que a linhagem U87MG produz níveis de PGE₂ mais elevados do que astrócitos (Payner *et al.*, 2006). A linhagem T98G também produz PGE₂ (Gomes, 2016).

Análise de amostras de GBM, realizadas pelo nosso grupo de pesquisa, mostraram que a expressão gênica de COX-1 e COX-2 não está correlacionada com a sobrevivência dos pacientes. Em contrapartida, pacientes com expressão elevada de mPGES-1 apresentaram sobrevida média de 4 meses, enquanto que pacientes com pouca expressão de mPGES-1 tiveram sobrevida média de 11

meses. Esses resultados indicam que a expressão de mPGES-1 está relacionada com pior prognóstico. Análise de dados do TCGA corroboraram com os resultados obtidos (Panagopoulos *et al.*, 2018).

Análise de amostras de gliomas por HPLC-MS/MS, mostrou que os níveis do produto da atividade da mPGES-1, PGE₂, estavam diretamente relacionados com o grau de malignidade tumoral. Além disso, pacientes cujos tumores produziam quantidades maiores de PGE₂ apresentaram sobrevida média de 3,5 meses, enquanto que pacientes com baixa produção de PGE₂ tiveram sobrevida média de 11 meses. Desta maneira, PGE₂ foi correlacionado com pior prognóstico de pacientes com GBM (Panagopoulos *et al.*, 2018).

Análise da expressão gênica das células U87MG e T98G mostrou que essas linhagens expressam os receptores de PGE₂ EP2 e EP4. A presença desses receptores nestas células foi confirmada por imunofluorescência e *western blot* (Cunha, 2012; Gomes, 2016; Payner *et al.*, 2006). Esses dados indicam que além de produzir PGE₂ as células U87MG e T98G podem sofrer a ação deste prostanóide.

As linhagens U87MG e T98G expressam COX-1, COX-2 e mPGES-1, e são capazes de produzir PGE₂. Há evidências que esses elementos colaboram diretamente para a progressão tumoral de gliomas. Por isso, decidimos verificar o efeito do inibidor não seletivo de COX-1 e COX-2, ibuprofeno; o inibidor específico de mPGES-1, CAY10526 e PGE₂ exógeno no número de células U87MG e T98G.

Ibuprofeno reduziu o número de células viáveis das linhagens estudadas e seu efeito foi dependente da dose e do tempo de tratamento. Foi verificado a redução significativa do número de células U87MG tratadas com 100 µM de IBP por 72h. Enquanto que nas células T98G o número de células viáveis foi reduzido após o tratamento com 200 µM de IBP por 72h.

A redução do número de células com a inibição das COXs, observada neste trabalho, está de acordo com os dados presentes na literatura. Células de glioma humano HTZ-349, U87MG e A172 tratadas com IBP ou diclofenaco (inibidor inespecífico de COX-1 e COX-2) reduziram significativamente a proliferação celular a partir de 72h de tratamento e o efeito observado foi dependente da dose (Leidgens *et al.*, 2015). Feitoza (2013) observou a redução no número de células U87MG e U251 tratadas com IBP de maneira dependente da dose e do tempo.

Também foi observada a redução do número de células T98G tratadas com IBP (Gomes, Colquhoun, 2012).

A diferença de concentração de IBP necessária para ocasionar a redução significativa do número de células das linhagens U87MG e T98G pode estar relacionada ao fato de células *TP53* selvagem, como a U87MG, serem, geralmente, mais sensíveis ao tratamento com IBP do que células *TP53* mutantes, como é o caso das células T98G (Benadiba *et al.*, 2014). Além do mais, a incorporação de IBP varia de acordo com a célula, mesmo em linhagens oriundas do mesmo tipo tumoral, o que faz com que a concentração intracelular de IBP seja muito diferente da concentração presente no meio de cultura (Janssen *et al.*, 2006).

O tratamento das linhagens de glioblastoma humano U87MG, A172, U138MG e U251MG apresentaram redução do número de células viáveis quando tratadas com nanopartículas de rutênio carregadoras de ibuprofeno (Benadiba *et al.*, 2014; Hanif-Ur-Rehman *et al.*, 2016). A inibição de ambas COXs com IBP ocasionou a redução do número de células U251MG, além do aumento de células na fase sub G1 do ciclo celular e concomitante redução de células na fase S, indicando que IBP induziu apoptose nessas células (Stevanatto, 2012).

A inibição de COX-1 com o inibidor SC560 ou COX-2 com o inibidor NS398 reduziu o número de células de glioblastoma humano U251MG e U138MG (Serachi, 2012). A inibição seletiva de COX-1 (SC560) e COX-2 (SC58125) na linhagem de carcinoma colorretal HCT-116 induziu a diminuição da proliferação celular de maneira dose-dependente (Bottone *et al.*, 2004). O tratamento de células de carcinoma escamoso de pulmão SK-MES-1 com NS398 reduziu a proliferação e viabilidade das células (Monjazez *et al.*, 2005). Tratamento de T98G com NS398 reduziu o número de células, aumentou o número de células em sub G1 e diminuiu G1 e G2/M (Cunha, 2012).

A redução do número de células em linhagens tratadas com inibidores de COX envolvem mecanismos relacionados a redução da proliferação celular e indução da apoptose (Gomes e Colquhoun, 2012; Benadiba *et al.*, 2014; Hanif-Ur-Rehman *et al.*, 2016; Bottone *et al.*, 2004; Lampiasei *et al.*, 2006). Joki e colaboradores (2000) demonstraram que NS398 reduziu o crescimento de esferoides de células U87MG e U251 e induziu o aumento de células apoptóticas. De acordo com dados da literatura, diversos processos moleculares estão

envolvidos nesses fenômenos e diferentes AINES podem atuar de maneiras distintas nesses processos celulares.

Leidgens e colaboradores (2015) mostraram que o tratamento das linhagens de glioma humano HTZ-349, U87MG e A172 com IBP ocasionou o acúmulo de células na fase G1/G0 ao mesmo tempo em que levou a diminuição de células na fase S, indicando o comprometimento da proliferação celular. Já o tratamento com diclofenaco teve efeito diferente entre as linhagens estudadas. Nas células A172 e U87MG o tratamento com diclofenaco ocasionou a redução de células na fase S, enquanto houve o acúmulo de células HTZ-349 nas fases S e G2/M. No caso das células HTZ-349, foi verificado a parada do ciclo celular acompanhada de um pico em sub G1 juntamente com a presença de detritos celulares, indicando possíveis efeitos citotóxicos. Células U87MG também acumularam nas fases G2/M e S, enquanto as células A172 pararam o ciclo em G1/G0, semelhante ao observado com IBP.

Células de carcinoma de colon HCA-7 e HCT-15 tratadas com IBP tiveram bloqueio do ciclo celular com o acúmulo das células nas fases G0/G1 e redução de células nas fases S e G2/M. O bloqueio do ciclo celular foi acompanhado da redução da expressão das ciclinas A e B e do aumento da expressão de p27^{kip-1}. Além do bloqueio do ciclo, também foi verificada a indução da apoptose. Apesar das células HCA-7 expressar COX-1, COX-2 e produzir grandes quantidades de PGE₂, essa linhagem foi significativamente menos sensível aos efeitos antiproliferativos de IBP do que as células HCT-15, que não expressam COX-2 e praticamente não produzem PGE₂. Em modelos de tumores xenográficos das duas linhagens, IBP reduziu o crescimento tumoral de modo similar. Esses dados sugerem que o efeito antiproliferativo de IBP não está restrito a inibição das enzimas COXs (Janssen et al., 2006).

O tratamento de células de carcinoma colorretal HCT-116 e HT-29, carcinoma cervical (HeLa), carcinoma epitelial de mama (MDA-231), célula T de leucemia linfoblástica (Molt-4) e carcinoma escamoso de pulmão (SK-MES-1) com inibidor NS398 levou ao acúmulo extracelular de ácido araquidônico (AA) não esterificado, que é o principal substrato da via das COXs. O acúmulo de AA não esterificado induziu a ativação da enzima caspase 3 e consequente desencadeamento da apoptose. Esse efeito foi verificado tanto com a inibição de COX, quanto com o tratamento das linhagens com AA exógeno, indicando que esse

pode ser um dos mecanismos pelos quais a inibição de COX induz a apoptose (Monjazeb *et al.*, 2005). Leaver e colaboradores (2002) observaram que o AA diminuiu a proliferação e aumentou a atividade oxidativa em gliomas de 16 pacientes. A indução da apoptose por AA ocorreu de modo transiente e intermitente.

A inibição farmacológica de mPGES-1 na linhagem U87MG com CAY10526 nas concentrações 20 μ M, 30 μ M e 40 μ M reduziu o número de células viáveis após 48 horas de tratamento. Após 72h, CAY10526 reduziu significativamente o número de células U87MG em todas as concentrações testadas. Na linhagem T98G este inibidor reduziu o número de células viáveis com o tratamento por 48h nas concentrações 30 μ M e 40 μ M. Enquanto que após 72h, CAY10526 reduziu o número de células nas concentrações de 20 μ M, 30 μ M e 40 μ M. Os efeitos do inibidor CAY10526 em ambas linhagens foram dependentes da dose e do tempo de tratamento.

Em trabalho anterior realizado em nosso grupo, foi observada a redução significativa do número de células U87MG, U251MG e A172 tratadas com 40 μ M CAY10526 por 72h. O efeito da droga não foi observado em outros intervalos de tempo. O efeito de CAY10526 sobre o número de células foi dependente da dose e as linhagens U87MG e A172 apresentaram redução significativa do número de células também com 20 μ M da droga. Essas células também foram tratadas com outro inibidor seletivo de mPGES-1, o CAY10678. Os resultados mostraram redução do número de células U251MG após tratamento com CAY10678 por 72h nas concentrações de 50 μ M e 80 μ M e das células A172 com a concentração de 80 μ M. Enquanto que na linhagem U87MG a exposição a este inibidor por 72h induziu a redução significativa do número de células nas concentrações de 20 μ M, 50 μ M e 80 μ M (Souza, 2017).

Os dados obtidos por Souza (2017) corroboram com os resultados observados neste trabalho, tendo em vista que a linhagem U87MG teve seu número significativamente reduzido após 72h de tratamento em concentrações similares as anteriormente analisadas. Cabe ressaltar que no trabalho anterior a concentração de 30 μ M de CAY10526 não foi testada. Em ambos trabalhos a linhagem U87MG foi mais sensível ao efeito de CAY10526 sobre o número de células do que as demais linhagens estudadas. O uso de um segundo inibidor seletivo de mPGES-1 e a obtenção de resultados similares aos obtidos com CAY10526, confirma o impacto da inibição farmacológica de mPGES-1 nas células de GBM.

Neste trabalho, o tratamento das células U87MG e T98G com a concentração mais elevada de CAY10526 (40 μ M) levou a não alteração do número de células viáveis ao longo dos períodos estudados. O que poderia ser uma indicação de parada no ciclo celular. A análise do ciclo celular de células U251MG e A172 tratadas com os inibidores de mPGES-1 CAY10526 e CAY10678 mostrou o acúmulo de células na fase G1 acompanhado da redução de células em G2/M. Ademais, foi verificado o aumento de células apoptóticas (Souza, 2017). Resultados semelhantes foram obtidos com o silenciamento de mPGES-1 nas linhagens de hepatocarcinoma Hep3B e Huh7, enquanto que a superexpressão de mPGES-1 nessas células levou a redução do número de células em G1 e aumento de células nas fases G2/M (Lu *et. al.*, 2012).

O tratamento de células U87MG e T98G com MK886 (mais conhecido como inibidor de FLAP e inibidor não seletivo de mPGES-1) levou a redução da proliferação celular de maneira dose-dependente e a redução da síntese de PGE₂. Células U87MG knockdown para mPGES-1 apresentaram efeitos semelhantes aos observados com a inibição farmacológica desta enzima. A adição de PGE₂ exógeno recuperou o crescimento celular da linhagem U87MG tanto com a inibição farmacológica quanto com a redução da expressão gênica de mPGES-1 (Payner *et al.*, 2006). Em contrapartida, Souza (2017) não viu efeito do tratamento com MK886 no número de células das linhagens U87MG, U251MG e A172.

Apesar de reduzir mPGES-1 em alguns casos, MK886 tem pouco ou nenhum efeito inibitório na síntese de PGE₂ em células intactas. Em fibroblastos de gengiva e células de câncer de cólon, o uso de concentrações maiores de MK886 aumentou a produção de PGE₂ e a expressão proteica de COX-2. A possível explicação para esse efeito é o fato de MK886 ser um inibidor direcionado a via da 5-LOX. Com a inibição da via da 5-LOX o AA disponível é desviado para a via das COXs, o que favorece a síntese das PGs dessa via (Chang, Meuillet, 2011).

A inibição seletiva de mPGES-1 o composto III (CIII) ocasionou a diminuição significativa da proliferação celular em tumores xenográficos de neublastoma. O tratamento de animais com diclofenaco, resultou em diminuição do volume tumoral semelhante ao observado com o tratamento com CIII. Em concentração superior a 50 μ M, CIII inibe também COX-1, COX-2, sintase de prostaciclina e sintase de PGD em 20% (Kock *et al.*, 2018).

Souza (2017) observou a redução do número de células A172 com a inibição de mPGES-1 com dois inibidores farmacológicos diferentes, CAY10526 e CAY10678. Porém, estudos anteriores do nosso grupo mostraram que essa linhagem não produz PGE₂ (Gomes, 2016), o que pode indicar que os efeitos dessas drogas não se restringem a inibição de mPGES-1. Provavelmente, este inibidor esteja interagindo com outras proteínas associadas à membrana envolvidas no metabolismo de eicosanoides e de glutathiona (MAPEGs), como a proteína de ativação de 5-lipoxigenase (LOX) (FLAP) e leucotrieno C4 sintase (LTC4S), devido a homologia dessas enzimas com a mPGES-1 (Chang e Meuillet, 2011). No entanto, estudos que manipularam geneticamente a expressão de mPGES-1 obtiveram efeitos similares aos observados com a inibição farmacológica desta enzima.

Células de câncer de próstata DU145 e de carcinoma de pulmão A549 *knockdown* para mPGES-1 apresentaram redução do número de células *in vitro*, acompanhada de diminuição da produção de PGE₂. O crescimento tumoral de ambas linhagens foi duas vezes mais lento *in vivo* em comparação com tumores formados por células selvagens para mPGES-1 (Hanaka et al., 2009). Células de câncer de mama silenciadas geneticamente para mPGES-1 também apresentaram crescimento celular reduzido, redução dos níveis de PGE₂ e diminuição da expressão de fator pró-angiogênico VEGF-A acompanhado por aumento de áreas de necrose intratumoral (Howe et al., 2013).

O *knockdown* de mPGES-1 em células de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) levou a diminuição da síntese de PGE₂, redução da proliferação celular e expressão gênica e proteica de mPGES-1 e do receptor de PGE₂ EP2, mas não apresentou efeito sobre o receptor EP4. O tratamento dessas células com um análogo de PGE₂ restaurou parcialmente o crescimento celular. O crescimento celular não foi completamente restabelecido, provavelmente, pela diminuição da expressão de EP2, o que tornou as células menos responsivas a PGE₂ exógeno (Kamei et al., 2010).

O tratamento com NS398 reduziu significativamente o número de células LLC selvagem para mPGES-1, enquanto que não foi observado efeito no número de células *knockdown* para mPGES-1, indicando que o efeito de NS398 esteja atrelado a produção de PGE₂ pelas células. O efeito inverso foi observado em células que superexpressavam mPGES-1. Células LLC mPGES-1 selvagens inoculadas em

camundongos que não expressavam mPGES-1 produziram tumores significativamente menores do que as inoculadas em camundongos selvagens. Esses dados indicam a relação direta da expressão de mPGES-1 e a proliferação celular neste tipo tumoral (Kamei *et al.*, 2010).

Células de carcinoma epitelioide tratadas com inibidor seletivo de mPGES-1 AF3485 apresentaram redução da proliferação celular *in vitro* e em modelos de tumores xenográficos. Os efeitos de AF3485 nestas células *in vitro* e *in vivo* foi associado a redução da fosforilação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), assim como a diminuição da expressão do fator de crescimento endotelial vascular e do fator de crescimento fibroblástico tipo 2 (FGF-2) (Finetti *et al.*, 2012).

Células de melanoma tratadas com CAY10526 tiveram a expressão e/ou fosforilação de 69 proteínas alteradas, destas 60 são envolvidas no controle da sobrevivência ou morte celular. Neste estudo, foi verificado que CAY10526 reduz a expressão de ciclina B1 e proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-XL; e aumenta a expressão de p21 e proteínas pró-apoptóticas como BAX e BAK. Além do mais, CAY10526 suprimiu a fosforilação da proteína YB-1 que participa da regulação da proliferação, sobrevivência e migração celular (Kim *et al.*, 2016).

O tratamento das células U87MG e T98G com 10 μ M de PGE₂ induziu o aumento do número de células após 72h. Feitoza (2013) identificou que PGE₂ aumentou o número de células U87MG e U251MG de modo dependente da dose e do tempo de tratamento, efeito similar ao observado por Gomes e Colquhoun (2012) e Cunha (2012) na linhagem T98G. PGE₂ também promove o crescimento celular de células de câncer de próstata, pulmão e colorretal (Ruan, So, 2014).

Neste trabalho, as concentrações de 1 μ M e 5 μ M de PGE₂ também aumentou significativamente o número de células T98G após o período de 72h. Provavelmente, pela linhagem U87MG produzir elevados níveis de PGE₂ (Ferreira *et al.*, 2018), a dose de PGE₂ necessária para estimular estas células deve ser maior. Esse efeito também foi observado por Payner e colaboradores (2006), que constataram que a concentração do tratamento das células U87MG com PGE₂ exógena deve ser superior a da produção endógena para que haja o estímulo da proliferação celular para além dos níveis basais.

A ação de PGE₂ sobre o crescimento celular de células U87MG parece estar relacionado a ativação do receptor EP4 e consequente ativação de PKA. A ligação de PGE₂ ao receptor EP4 induziu ao aumento de AMPc intracelular e maior ativação

da enzima PKA de maneira dose-dependente. Da mesma maneira, quando as células U87MG foram expostas a agonistas dos receptores EP2/EP4 houve o aumento de AMPc intracelular. Já quando as células U87MG foram tratadas com o antagonista de EP4 (L161982) ocorreu a redução do crescimento celular (Payner *et al.*, 2006).

Em células U251MG a inibição de EP4 com L161.982 acarretou na redução do número de células e análise do ciclo celular revelou aumento de células na fase sub G1 e G1, e conseqüente redução de células na fase G2/M. Resultado semelhante foi observado com o tratamento das células com o antagonista de EP2 AH6809 (Stevanatto, 2012). Cunha (2012) mostrou que AH6809 e L161.982 reduziram o número de células T98G. Nesta linhagem, o tratamento com L161.982 aumentou o número de células na fase G1 e AH6809 diminuiu as células nas fases G1 e G2/M.

O tratamento da linhagem U87MG com inibidor da isoforma II de PKA (H89) ocasionou a redução do número de células. Esses dados sugerem que PGE₂ exógeno estimula o crescimento de gliomas através da ativação da via cAMP/PKA tipo II, porém esse não parece ser o único mecanismo envolvido neste processo, visto que concentrações de PGE₂ exógeno próximo as concentrações fisiológicas não ativaram PKA (Payner *et al.*, 2006). Já em linhagens de câncer de próstata, pulmão e colorretal PGE₂ estimulou o crescimento celular através da ativação de EP1 (Ruan, So, 2014).

A migração celular acentuada é uma das características mais marcantes do glioblastoma, o que colabora para a dificuldade de tratamento, pior prognóstico e menor sobrevivência dos pacientes. Por isso, decidimos analisar os efeitos da inibição farmacológica das COXs e mPGES-1, assim como, PGE₂ exógeno na migração celular. Para tanto, tratamos as células U87MG e T98G com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂. As células U87MG migraram por 6h enquanto as células T98G migraram por 12h. Provavelmente o tempo de migração foi diferente entre as duas linhagens pelo fato da linhagem U87MG ser mutante para *PTEN* enquanto T98G é *PTEN* selvagem. Tamura e colaboradores (1999) demonstraram que células U87MG transfectadas para expressar a forma selvagem de *PTEN* apresentaram redução de 45% da migração e invasão em comparação as células U87MG *PTEN* mutantes.

Na linhagem celular U87MG o fármaco que mais reduziu a migração celular foi o inibidor de COX-1 SC560, que diminuiu a migração em 29%. Já o inibidor de COX-2 NS398, foi o segundo tratamento que mais impactou a migração celular nesta linhagem, induzindo a inibição da migração celular em 14,33%. Percentagem essa muito próxima a observada com a inibição de mPGES-1 com CAY10526 (14%). PGE₂ exógeno aumentou a migração das células U87MG em 11,33%.

Na linhagem T98G o tratamento que surtiu maior redução da migração celular foi CAY10526, que reduziu a migração celular em 64,33%; seguido de SC560 que diminuiu a migração em 53% e NS398 com redução de 26,67%. Apesar de IBP diminuir a migração das células T98G em 14%, esse resultado não foi estatisticamente significativo. Provavelmente, isso deve-se a maior variação experimental. O tratamento com PGE₂ estimulou a migração celular em menos de 5%.

Os resultados obtidos estão de acordo com o esperado, visto que é descrito na literatura que a inibição das COXs com diferentes fármacos promove a redução da migração celular de diferentes células tumorais, e PGE₂ possui o efeito inverso estimulando a migração das células. Devido a mPGES-1 ser a principal sintase envolvida na produção de PGE₂, é esperado que sua inibição reduza a migração celular.

Apesar dos resultados obtidos com os tratamentos das duas linhagens serem diferentes, é possível observar que a inibição seletiva de COX induz uma redução da migração celular de forma mais acentuada do que a inibição não seletiva das duas isoformas. Também, foi possível verificar que a inibição de mPGES-1 acarreta em redução da migração de modo semelhante ou mais eficiente que a inibição de COX-2, que é o principal alvo terapêutico em doenças inflamatórias e câncer.

Em nosso grupo foi verificado que IBP reduziu a migração celular das linhagens de GBM U87MG, U251 e T98G (Feitoza, 2013; Gomes, Colquhoun, 2012). Tratamentos com IBP ou diclofenaco reduziram a migração celular de esferoides das linhagens de glioma HTZ349, U87MG, A172. Mecanismos relacionados com a diminuição da migração celular das células HTZ349 estão relacionados com a redução da adesão celular nos primeiros 30 minutos após o plaqueamento (Leidgens *et al.*, 2015). Houve redução da migração celular de células U87MG quando tratadas com nanopartículas de rutênio carreadoras de IBP (Hanif-Ur-Rehman *et al.*, 2016).

NS398 reduziu a migração celular de células U87MG em ensaio de fechamento de ferida e transwell (Chiu *et al.*, 2010). NS398 também diminuiu a migração celular de esferoides de células U87MG e U251MG (Joki *et al.*, 2000). Segundo Stevanatto (2012), NS398 reduziu a migração de células U251. As linhagens de glioma D384, U251MG e U87MG também migraram menos quando tratadas com NS398 (Kuipers *et al.*, 2007). Da mesma forma, a inibição de COX-1 com SC560 levou a redução da migração das células U87MG, A172, T98G, U138MG, U373MG, HS683, SW1088 e U251MG (Ishibashi *et al.*, 2005; Stevanatto, 2012).

A inibição de mPGES-1 nas linhagens U87MG, U251 e A172 com CAY10526 reduziu significativamente a migração de todas as linhagens estudadas. Resultado semelhante foi obtido com o tratamento das células com CAY10678 (Souza, 2017). A inibição de mPGES-1 com CIII reduziu a migração de fibloblastos associados ao câncer (FACs) *in vitro* e resultado similar foi obtido com o uso de antagonistas do receptor de PGE₂ EP4, indicando que a diminuição da migração dessas células está diretamente relacionada a mecanismos referentes a atividade de PGE₂ (Kock *et al.*, 2018).

Células de colangiocarcinoma tratadas com CAY10526 reduziram a produção de PGE₂, a proliferação celular e a migração. O mesmo efeito foi verificado quando as células tiveram a produção de mPGES-1 reduzida por inibição da expressão gênica (Jongthawin *et al.*, 2014). Lu e colaboradores (2011) mostraram que células de colangiocarcinoma cuja expressão de mPGES-1 foi reduzida migraram menos nos ensaios de fechamento de ferida e transwell, enquanto células que superexpressaram essa sintase apresentaram migração significativamente maior nos dois ensaios.

Nas linhagens celulares de glioblastoma U87MG, U251 e T98G PGE₂ estimulou a migração celular (Gomes, 2016; Gomes, Colquhoun, 2012; Feitoza, 2013). O tratamento com PGE₂ aumentou a migração de células HeLa em ensaio de transwell, enquanto que o tratamento com indometacina reduziu a motilidade celular (Glenn, Jacobson, 2003).

Estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, indica que o mecanismo pelo qual PGE₂ estimula a migração celular em gliomas está associado a ativação dos receptores EP2 e EP4. Quando células U87MG e U251MG foram expostas ao antagonista de EP2 (AH6809) houve a redução da migração celular em ambas

linhagens. O mesmo aconteceu com o tratamento das células com o antagonista de EP4 (L161.982). Em células U87MG e U251MG expostas a PGE₂ exógeno e cada um dos inibidores separadamente, não houve alteração da migração celular em comparação com o controle. Dessa forma, a inibição de apenas um dos receptores não foi suficiente para anular o papel de PGE₂ na migração. A fim de confirmar essa hipótese, as células foram tratadas concomitantemente com AH6809, L161.982 e PGE₂, o que acarretou na redução da migração celular nas duas linhagens (Gomes, 2016).

Durante o processo de migração celular ocorrem alterações no citoesqueleto e consequente mudanças na morfologia celular mediadas pela ação de enzimas Rho GTPases pertencentes a família Ras. Esse grupo de GTPases é composto por mais de 20 proteínas, dentre as quais as mais caracterizadas são RhoA, Rac1 e Cdc42. No decorrer da migração celular essas enzimas alternam de maneira cíclica entre a forma ativa e inativa (Svensmark, Brakebusch, 2019).

A ativação das Rho GTPases é mediada por um fator de troca de nucleotídeo guanina (GEFs) que realiza a troca de uma molécula de guanosina difosfato (GDP) por uma de guanosina trifosfato (GTP), essa ativação ocorre a jusante de várias vias de sinalização celular, incluindo aquelas relacionadas a fatores de crescimento. Já a inativação é mediada por proteínas ativadas por GTPases (GAPs), que ativam a hidrólise endógena do GTP a GDP nas Rho GTPases (Svensmark, Brakebusch, 2019).

De modo geral o processo de migração celular envolve o ciclo de 4 processos: 1) protusões da membrana plasmática na porção frontal da célula, os lamelipódios; 2) estabilização das protusões e adesão ao substrato através da formação de complexos adesivos; 3) retração da porção traseira da célula e 4) desadesão (Mak *et al.*, 2016; Raftopoulou, Hall, 2004; Pollard, Borisy, 2003; Horwitz, Parsons, 1999).

A formação dos lamelipódios é mediada pela atividade de Rac1 que promove a montagem de uma malha de actina na periferia da célula e no interior dos lamelipódios. Na migração, além dos lamelipódios, é comum a formação de estruturas filiformes na periferia celular, essas estruturas são chamadas de filopódios e sua formação é mediada por Cdc42. No entanto, Cdc42 e Rac1 podem regular sinergicamente a formação dos filopódios, provavelmente por compartilharem vários ativadores e efetores. Além do mais, essas Rho GTPases em

conjunto estimulam a formação de complexos adesivos. Cdc42 também promove a organização do citoesqueleto de actina e polarização celular. Já a GTPase RhoA estimula a formação de fibras de estresse que são importantes para a contração do corpo celular durante a migração. Além disso, RhoA modula a estruturação de complexos adesivos que são diferentes daqueles formados por Rac1 e Cdc42, essas adesões focais ancoram as fibras de estresse ao substrato extracelular via receptores de membrana (Ahmed, Kim, 2019; Sampson *et al.*, 2012; Ensign *et al.*, 2013; Glenn, Jacobson, 2003; Dong *et al.*, 1998; Nobes, Hall, 1995).

Os efeitos biológicos das Rho GTPases dependem de sua ligação a uma molécula efetora. Dessa forma, as moléculas efetoras são que determinam a resposta celular à ativação das Rho GTPases. Alguns desses efetores são compartilhados por mais de uma Rho GTPase o que pode resultar em efeitos conjuntos de diferentes Rho GTPases (Svensmark, Brakebush, 2019).

Além da influência de PGE₂ na migração de diferentes tipos celulares, é descrito na literatura que PGE₂ pode estimular mudanças na morfologia celular através de mecanismos diversos. Estudos também mostraram que o tratamento com diferentes AINES podem promover alterações na morfologia celular, incluindo células de gliomas. Durante a realização dos tratamentos utilizados neste projeto, foram observadas mudanças da morfologia das células U87MG e T98G. A fim de investigar tais alterações, as células foram tratadas por 24h, fixadas e coradas com faloidina. Imagens do citoesqueleto de actina foram coletadas através de microscopia de fluorescência.

Imagens de microscopia de contraste de fase demonstraram que ambas as linhagens estudadas apresentaram alongamento do corpo celular quando tratadas com inibidor de COX-1 SC560. A marcação do citoesqueleto dessas células mostrou a presença de muitas fibras de estresse. É interessante observar que SC560 foi uma das drogas que mais reduziu a migração celular em ambas as células. Segundo Glenn e Jacobson (2003) apesar de serem relevantes para o processo migratório das células, as fibras de estresse em associação com as adesões focais contribuem para a imobilização celular. Esse fenômeno foi observado em células de sarcoma de rato que tiveram a motilidade reduzida quando apresentaram maior quantidade de fibras de estresse. Essas fibras eram mais longas e espessas, e se conectavam com grandes contatos focais (Pokorná *et al.*, 1994).

Sabendo-se que a formação de fibras de estresse é, principalmente, mediada pela atividade de RhoA, é provável que a inibição de COX-1 com SC560 tenha contribuído para a ativação desta Rho GTPase. Em células cancerígenas RhoA raramente é amplificada, pelo contrário, em diversos tumores RhoA é deletada sugerindo que RhoA tenha um papel como supressor tumoral. Em GBM, menos de 1% das amostras analisadas apresentaram fusão/mutação de RhoA (Svensmark, Brakebusch, 2019). Estudos demonstraram que níveis diminuídos de RhoA estão diretamente relacionados ao aumento da migração em diversas linhagens de GBM incluindo as células T98G (Tran *et al.*, 2006) e U87MG (Malchinkhuu *et al.*, 2008).

É relatado na literatura o antagonismo entre as atividades de RhoA e Rac1, embora essas duas Rho GTPases desempenhem atividades na porção frontal das células migrando. Em gliomas os níveis de expressão das enzimas Rac estão diretamente relacionados com o grau de malignidade tumoral. Além do mais, em GBM Rac é superativada (Ensign *et al.*, 2013).

Rac1, Rac2 e Rac3 estão envolvidas com a progressão de tumores cerebrais. Rac1 está relacionada com a sobrevivência das células de GBM (Senger *et al.*, 2002) e estímulo da invasão e migração em gliomas (Salhia *et al.*, 2008; Tran *et al.*, 2006); Rac2 é mais expressa em GBM do subtipo mesenquimal – o mais agressivo e de pior prognóstico entre os subtipos de GBM (Verhaak *et al.*, 2010; Colman *et al.*, 2010); e Rac3 é expressa predominantemente no cérebro, é mutada e superexpressa em gliomas agressivos e participa como co-ativador pró-migratório do receptor nuclear ER α (Walker *et al.*, 2011; Hwang *et al.*, 2005; Haataja *et al.*, 1997). O aumento da atividade de RhoA leva a redução da atividade dos membros da família Rac que favorecem a progressão dos gliomas.

Hirata e colaboradores (2012) observaram que células de GBM invadindo o parênquima cerebral ou migrando pelo espaço perivascular apresentavam maior atividade de Rac1 e Cdc42 e menor atividade de RhoA. Em invasão 3D de esferoides de GBM as células que lideravam a invasão apresentavam maiores níveis de Rac1 e Cdc42 do que as células que as seguiam.

Salhia e colaboradores (2005) viram que a inibição de ROCK, que é o principal efetor de RhoA, com Y27632 levou a redução das fibras de estresse em células U251 e U87MG. Esse tratamento estimulou a invasão e migração de ambas as linhagens. Células de GBM tratadas com Y27632 ou transfectadas para expressar uma forma mutante de ROCK apresentaram maior ativação de Rac1, sem

que houvesse a elevação da quantidade total de Rac. Quando essas linhagens foram transfectadas para expressar uma forma de ROCK constitutivamente ativa, foi observado a presença de muitas fibras de estresse, redução da migração e invasão, além da menor ativação de Rac1. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, em que a maior ativação de RhoA e consequente aumento da formação de fibras de estresse reduzem a migração de células de GBM.

O efeito de SC560 sobre a ativação de RhoA pode estar relacionado diretamente com a diminuição da produção de PGE₂. Como já mencionado na introdução deste trabalho, a ligação de PGE₂ a seus receptores EP2 ou EP4 eleva os níveis intracelulares de AMPc e consequente maior ativação de PKA (Gomes *et al.*, 2018; Payner *et al.*, 2006). PKA ativada reduz a polimerização de F-actina pelo estímulo da atividade de cofilina-1 (Serezani *et al.*, 2012). Além do mais, PKA fosforila RhoA e desse modo reduz a afinidade de ROCK por esta Rho GTPase (Dong *et al.*, 1998). Dessa maneira, PGE₂ promove a diminuição da atividade de RhoA (Huang *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 1998). Assim, quando a produção de PGE₂ foi reduzida pela inibição de COX-1 por SC560 houve o aumento da atividade de RhoA nas células.

Os efeitos celulares ocasionados pela interação de PGE₂ com seus receptores também podem ser resultado da transativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR). Embora o receptor EP1 possa estimular a transativação de EGFR, o enfoque da discussão deste trabalho será dado aos receptores EP2 e EP4 que são os mais relevantes para as linhagens analisadas nesta pesquisa.

Em células de glioma, a ligação de PGE₂ a EP2 ou EP4 pode levar a formação do complexo β -arrestina 1-Src com subsequente ativação de EGFR. A ativação de EGFR pode desencadear várias cascatas de transdução de sinal envolvendo as vias de sinalização MAPK, PI3K/Akt, STAT e fosfolipase C (PLC) (Oliver *et al.*, 2016). Essas cascatas de sinalização estão relacionadas a proliferação, inibição da apoptose, reorganização do citoesqueleto e motilidade (Wang, 2016). Ramis e colaboradores (2012) demonstraram que a inibição de EGFR levou a ativação de Rho e inibição da atividade de Rac em células U87MG, o que acarretou na formação de fibras de estresse. Além do mais, as imagens de microscopia de contraste de fase das linhagens U87MG e T98G tratadas com inibidor de EGFR erlotinibe, são muito similares as registradas neste trabalho,

quando essas células foram tratadas com SC560. A inibição de EGFR também reduziu a migração de células U87MG e T98G no ensaio de fechamento de ferida. Interessantemente, o tratamento dessas células com inibidores de Rho ou ROCK restabeleceram a migração de células tratadas com erlotinibe. Esses dados confirmam que a redução da migração celular dessas linhagens deveu-se a ativação da via de sinalização Rho/ROCK.

Tratamento de células de glioma humano, incluindo a linhagem U87MG com diclofenaco ou IBP levou a redução da migração celular e alteração da morfologia celular com células maiores e que apresentavam maior concentração de actina cortical (Leidgens *et al.*, 2015). Tratamento com indometacina ou inibidor de adenilil ciclase (SQ22536) também levaram ao aumento de F-actina na periferia da célula. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que indometacina e SQ22536 aumentaram a fosforilação de cofilina-1, tornando-a menos ativa (Serezani *et al.*, 2012). O efeito observado no citoesqueleto de actina com a indometacina ou SQ22536 foi semelhante ao obtido neste projeto com a inibição seletiva de COX-2 com NS398.

Foi observado, neste trabalho, que a inibição seletiva de COX-1 (SC560) teve um efeito mais intenso sobre a morfologia e citoesqueleto de actina das linhagens estudadas do que a inibição de COX-2 (NS398). Provavelmente, isso deve-se ao fato de COX-1 ser mais expressa em astrócitos do que COX-2. Desse modo, o efeito da inibição da isoforma 1 de COX tem um maior efeito sobre essas células. Além da intensidade do efeito, houve também diferenças no rearranjo do citoesqueleto de actina com a inibição seletiva de COX-1 e COX-2 nas células U87MG e T98G. Jain e colaboradores (2004), também demonstraram que a inibição de COX em células de câncer colorretal (HCT-116) com dois inibidores seletivos DFU (COX-2) e SC560 (COX-1) resultou em diferentes rearranjos de F-actina. Enquanto DFU aumentou a actina por todo citoplasma celular, SC560 diminuiu a marcação de actina no citoplasma e intensificou a marcação da actina no córtex celular (Jain *et al.*, 2004).

Neste trabalho, IBP não apresentou efeitos sobre a morfologia celular e citoesqueleto de actina das células U87MG e T98G. Embora, Leidgens e colaboradores tenham observado efeito de IBP sobre a F-actina na linhagem U87MG. Provavelmente, a diferença nos resultados deve-se ao fato deles terem utilizado concentrações mais elevadas de IBP (0,5 mM, 1 mM e 2 mM) do que as utilizadas em nosso grupo (100 µM para U87MG e 200 µM para T98G). Jain e

colaboradores (2004) também observaram alterações no citoesqueleto de células de câncer colorretal muito mais intensos com a inibição seletiva de COX-1 com SC560 (25 μ M) do que com inibidor não seletivo indometacina (100 μ M), mesmo a concentração de indometacina sendo 4 vezes maior do que a de SC560. O que indica que as alterações no citoesqueleto de actina são mais intensas com o uso de inibidores seletivos de COX, esses achados corroboram com os resultados obtidos em nosso grupo.

Nas linhagens U87MG e T98G a inibição farmacológica de mPGES-1 com CAY10526 levou a alteração da morfologia celular, com diminuição dos prolongamentos celulares e conseqüentemente arredondamento do corpo celular. A marcação de F-actina demonstrou a desestruturação dos filamentos de actina e redução das fibras de estresse. CAY10526 foi uma das drogas que mais reduziu a migração celular. De acordo com Pokorná e colaboradores (1994), embora as fibras de estresse possam limitar a migração celular, células com os filamentos de actina completamente desorganizados também diminuem sua capacidade migratória.

Diversas pesquisas demonstraram a relação entre expressão ou ativação de RhoA e expressão de mPGES-1. Choi e colaboradores (2011) observaram que a ativação de RhoA aumenta a atividade do promotor transcricional de mPGES-1, promovendo o aumento da expressão gênica e proteica de mPGES-1. Esse grupo também mostrou que a ativação de RhoA aumenta a transcrição do gene de mPGES-1 por meio de diversos moduladores transcricionais, incluindo NF- κ B e EGR-1 ligado a ERK1/2. Em contrapartida, células HEK293 com superexpressão de mPGES-1 apresentaram aumento da expressão gênica e proteica de RhoA (Kamei et al., 2003). Esses dados sugerem que tanto a atividade de RhoA influencia na expressão de mPGES-1, quando a atividade de mPGES-1 estimula a expressão de RhoA.

Além da influência na expressão de RhoA, mPGES-1 desempenha papel na regulação de EGFR. O estímulo de EGFR leva ao aumento da expressão gênica e proteica de mPGES-1 nas células HT-29, A431 e A549. EGF também aumenta a expressão de COX-2 nas células, mas não altera cPGES ou mPGES-2. Enquanto que, a inibição de mPGES-1 anula a ativação de EGFR e diminui a expressão de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e FGF-2 (fator de crescimento de fibroblastos 2) (Donnini et al., 2012). Tendo em vista que a inibição de EGFR inibe a atividade de Rac em células de glioma, incluindo células U87MG (Ramis et al.,

2012), o impacto da inibição de mPGES-1 na morfologia celular e no rearranjo do citoesqueleto de actina parece envolver tanto a inibição de Rho quanto de Rac. Salhia e colaboradores (2005) demonstraram que a inibição simultânea de ROCK (Y27632) e Rac (siRNA Rac) tornou-se as células de astrocitoma mais espalhadas e sem fibras de estresse. Esse efeito foi muito semelhante ao observado com o tratamento das células U87MG e T98G com CAY10526.

Neste trabalho, não foi observado alterações na morfologia e no citoesqueleto de actina das células U87MG e T98G tratadas com PGE₂. Muito provavelmente, pelo fato dessas linhagens produzirem níveis elevados de PGE₂ em cultura, a adição de PGE₂ exógeno não foi suficiente para promover essas alterações para além do estado basal. Esses dados sugerem que um dos mecanismos pelo qual a inibição das isoformas de COX, assim como, de mPGES-1 reduz a migração de células de GBM envolve alterações do citoesqueleto pela ação de enzimas da família Rho GTPases.

A adesão das células a matriz extracelular é uma etapa imprescindível durante a migração celular. Células de glioblastoma produzem e secretam proteínas da MEC de modo a favorecer a migração das células tumorais. Essa matriz é rica em proteínas que aumentam a motilidade celular como LAM, FN, COL4 e VTN (Vehlow, Cordes, 2013). Em trabalho anterior do nosso grupo, foi demonstrado por análises de *western blot*, imunistoquímica e imunofluorescência que as linhagens de GBM U87MG e U251MG produzem LAM, FN, VTN e COL4 (Feitoza, 2013). Estudo realizado em nosso grupo de pesquisa, mostrou por imunistoquímica que células C6 *in vivo* expressam FN, COL4 e VTN (Ramos, 2007).

Sabe-se que as enzimas COXs modulam a expressão de diversos genes através da ação dos produtos de sua via. A interação de PGE₂ com seus receptores EP2 e EP4, por exemplo, desencadeiam diferentes cascatas de sinalização celular que ativam diversos reguladores e fatores de transcrição, como NF-κB, EGR1 e CREB, que por sua vez regulam a expressão de vários genes relacionados ao ciclo celular, metabolismo, sobrevivência celular, proliferação, inflamação, proteínas de adesão celular, citoesqueleto, dentre outros (Oliver *et al.*, 2016). Também é descrito na literatura a alteração da expressão gênica desencadeada pela ação de inibidores de COX (Wang *et al.*, 2016). Com base nesses dados, decidiu-se investigar, neste trabalho, se os inibidores de COX IBP, SC560 e NS398, assim como, o inibidor de

mPGES-1 CAY10526 e PGE₂ exógeno alteram a expressão dos genes de LAM, FN, COL4 e VTN.

Em células U87MG tratadas com IBP e CAY10526 foi observada a redução significativa da expressão gênica de LAM. Os tratamentos com os inibidores SC560 e NS398 não alteraram os níveis de mRNA dessa proteína. Enquanto que o tratamento com PGE₂ aumentou significativamente os níveis de mRNA de LAM. Na linhagem T98G IBP, NS398 e CAY10526 reduziram a expressão gênica de LAM. O tratamento com SC560 e PGE₂ não alteraram os níveis de mRNA de LAM nesta linhagem.

Dados anteriores do nosso grupo, mostram que o tratamento de células de GBM com IBP reduziu a expressão gênica de LAM apenas na linhagem U87MG, mas não na linhagem U251MG (Feitoza, 2013). Ishibashi e colaboradores (2005) demonstraram que células U87MG tratadas com indometacina apresentaram redução da expressão gênica de LAM γ 1. Neste estudo, as células U87MG foram também tratadas com os inibidores não seletivos de COX sulfeto de sulindac, aspirina e IBP; e os inibidores seletivos SC560 (COX-1) e SC58125 (COX-2). O sulfeto de sulindaco apresentou efeitos similares aos observados com o tratamento com indometacina, enquanto que os demais tratamentos não alteraram a expressão de LAM γ 1.

Indometacina também reduziu a expressão de LAM nas linhagens de GBM A172, T98G, U138 e U373MG. Quando células de câncer colorretal HCT-116 foram tratadas com indometacina ou sulfeto de sulindaco, ambos os tratamentos reduziram a expressão gênica de LAM γ 1, embora essas células não expressem COX-1 ou COX-2. Esse resultado indicou que o efeito desses AINES sobre a expressão de LAM γ 1 independe da inibição de COX (Ishibashi *et al.*, 2005). Provavelmente por isso, os resultados observados com o tratamento das células com outros inibidores de COX não tiveram o mesmo efeito.

Os resultados observados neste trabalho são similares aos observados por Feitoza (2013) para a linhagem U87MG tratada com IBP. É interessante observar que, apesar de os três trabalhos terem utilizado oligonucleotídeos específicos para a subunidade γ 1 de LAM nas análises de PCR, Ishibashi e colaboradores (2005) obtiveram um resultado diferente em células U87MG tratadas com IBP. Por outro lado, os resultados obtidos por eles com o tratamento das células U87MG com SC560 ou inibidor seletivo de COX-2 foram iguais aos observados neste trabalho.

Embora a inibição de mPGES-1 tenha reduzido significativamente a expressão de LAM nas duas linhagens testadas, o tratamento com PGE₂ estimulou a expressão gênica de LAM apenas nas células U87MG, enquanto na linhagem T98G esse efeito não foi observado. Os resultados similares foram obtidos por Feitoza (2013) que mostrou que PGE₂ aumentou significativamente a expressão de LAM em células U87MG, mas não alterou a expressão gênica de LAM em células U251MG. Esses dados sugerem que o efeito de CAY10526 sobre a expressão gênica da LAM pode envolver mecanismos não diretamente relacionados a diminuição da produção de PGE₂ pelas células.

Sabe-se que os efeitos anti-inflamatórios dos AINES devem-se, ao menos em parte, a ação dessas drogas em mecanismos que não envolvem apenas a inibição das COXs. Visto que, a concentração requerida para inibição das COXs e, conseqüentemente, para a redução da produção das PGs é muito inferior a concentração necessária para os efeitos anti-inflamatórios (Wang *et al.*, 2016). Durante o estudo da modulação da expressão dos diversos genes alvos desse projeto, a ação dos diferentes inibidores de COX ou do inibidor de mPGES-1 apresentaram resultados diferentes.

É descrito na literatura que diferentes inibidores de COX alteram a expressão gênica de maneira distinta. Esses inibidores estimulam ou inibem a expressão de diversas proteínas relacionadas a diferentes vias de sinalização celular. Por exemplo, enquanto tanto IBP quanto NS398 estimulam a expressão do citocromo C, apenas NS398 estimula a expressão de 15-LOX-1 e 15-LOX-2. Por outro lado, IBP e não NS398 estimula a expressão de PPAR γ (Wang *et al.*, 2016).

Toscano e colaboradores (2007) viram que camudongos silenciados geneticamente para uma das isoformas de COX (COX-1 ou COX-2) expressaram diferencialmente, no córtex cerebral e hipocampo, 93% dos genes analisados. A maioria dos genes alterados eram relacionados a reguladores de transcrição. Bottone e colaboradores (2004) viram que o inibidor de COX-2 (SC58125) necessitou de uma concentração 5 vezes superior que a concentração utilizada para o inibidor de COX-1 (SC560) para modular, de maneira semelhante, a expressão gênica de 6 dos 8 genes analisados.

Além da análise da expressão gênica de LAM em células U87MG e T98G tratadas com PGE₂ ou os inibidores utilizados neste projeto. Foi realizada a análise da expressão desta proteína através de ensaios de western blot. Em células U87MG

tratadas com IBP, SC560, NS398 e PGE₂ não foi observada alteração significativa nos níveis desta proteína. Por outro lado, a inibição de mPGES-1 reduziu significativamente os níveis de LAM. Na linhagem T98G IBP e NS398 não apresentaram efeito sobre os níveis da proteína LAM. CAY10526 reduziu os níveis de LAM. Enquanto SC560 e PGE₂ aumentaram sua expressão.

Ishibashi e colaboradores (2005) demonstraram que células U87MG tratadas com indometacina ou sulfeto de sulindaco apresentaram redução da expressão proteica de LAM γ 1. A redução dos níveis da proteína LAM γ 1 em células U87MG tratadas com indometacina ou sulfeto de sulindaco foi diretamente proporcional a concentração e tempo de tratamento. O tratamento das células U87MG com IBP, na mesma concentração utilizada neste projeto, não alterou os níveis de LAM, o mesmo foi obtido com o tratamento com ASA. Os inibidores específicos de COX SC560 (COX-1) e SC58125 (COX-2) não alteraram os níveis de LAM, nem mesmo quando as células U87MG foram tratadas com concentrações 2 vezes superiores à utilizada neste trabalho. Esses dados corroboram com os resultados obtidos neste trabalho com o tratamento de ambas linhagens com IBP, assim como, o efeito observado com a inibição seletiva de COX-2.

Embora, o tratamento com CAY10526 tenha reduzido os níveis de LAM em ambas as linhagens. O tratamento com PGE₂ exógeno apresentou resultados diferentes em cada uma das linhagens analisadas. Em células U87MG PGE₂ não aumentou os níveis de LAM, já nas células T98G este prostanoide elevou a expressão dessa proteína. O efeito de PGE₂ sobre a expressão de LAM nas células T98G, foi semelhante ao observado em células endotélias tratadas PGE₂ com exógeno. Esse mesmo grupo viu que o tratamento das células endoteliais com celecoxibe acarretou na redução da expressão de LAM (Ji, Tsirka, 2012). Feitoza (2013) observou o aumento da expressão gênica de LAM em células U87MG tratadas com PGE₂, enquanto esse tratamento não alterou os níveis de mRNA de LAM na linhagem U251MG.

Provavelmente, a redução da expressão de LAM em células U87MG tratadas com CAY10526 não esteja diretamente relacionada com a redução da produção de PGE₂. Uma vez que PGE₂ não estimulou a expressão desta proteína nessa linhagem. Resultados obtidos por Ishibashi e colaboradores (2005) corroboram com essa hipótese. Já que, os inibidores indometacina e sulfeto de sulindaco reduziram a expressão de LAM γ 1 em células que não expressam COX.

A LAM é encontrada na MEC de GBM em diferentes isoformas e sua expressão está diretamente relacionada ao aumento da migração e invasividade tumoral (Coniglio, Segall, 2013; Wu *et al.*, 2016; Kawataki *et al.*, 2007). Desse modo, a redução da expressão gênica e proteica de LAM promovido pela inibição farmacológica de mPGES-1, observada neste trabalho, pode ser um dos mecanismos pelos quais CAY10526 reduz a migração de ambas linhagens estudadas.

Neste trabalho, a expressão gênica de FN em células U87MG e T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂ foi analisada. Os tratamentos com SC560 e CAY10526 reduziram a expressão do gene de FN nas células U87MG. Os demais tratamentos não apresentaram alterações significativas nos níveis de mRNA de FN nesta linhagem. Nas células T98G NS398 e CAY10526 diminuíram os níveis de mRNA do gene de FN. Os demais tratamentos não resultaram em alteração significativa da expressão gênica de FN.

Em trabalho anterior do nosso grupo, o tratamento das células U87MG com IBP reduziu a expressão gênica de FN, enquanto PGE₂ elevou os níveis de mRNA dessa proteína. Em células U251, IBP não alterou a expressão desse gene e PGE₂ aumentou sua expressão (Feitoza, 2013). A inibição de COX com celecoxibe reduziu a expressão de FN em células endoteliais de rato (Tang *et al.*, 2015). Yang e Sorokin (2011) demonstraram que COX-2 altera a expressão gênica de FN aumentando a atividade de seu promotor. É interessante notar, neste trabalho, o inibidor específico de COX-2 (NS398) apenas reduziu a expressão gênica de FN nas células T98G.

Análises de *western blot* mostraram que o único tratamento que alterou a expressão de FN em células U87MG e T98G foi CAY10526. Em células de câncer de próstata tanto o silenciamento genético de mPGES-1 ou sua inibição com a droga MF63 levou a redução da expressão de FN (Finetti *et al.*, 2015). O silenciamento genético de mPGES-1 também acarretou na redução da expressão de FN em células de câncer de pulmão (Terzuoli *et al.*, 2019). Embora os inibidores de COX utilizados neste trabalho não tenham alterado os níveis da proteína FN. Hsu e colaboradores (2015) mostraram que a depleção gênica de COX-2 inibe a expressão de FN induzida por EGF. Esse efeito foi revertido com o tratamento das células com PGE₂. Resposta similar foi observada por Cheng e colaboradores

(2005), que verificaram que o inibidor de COX-2 SC58236 atenua a expressão de FN em camundongos após lesão renal.

Lal e colaboradores (1999) mostraram que a expressão gênica de FN é maior em amostras de GBM do que no cérebro normal. Essa proteína também foi identificada em biópsias de pacientes com GBM (Koh et al., 2018). Na MEC de GBM, FN aumenta a adesão e motilidade celular tanto de linhagens estabelecidas quanto de culturas primárias (Mahesparan *et al.*, 1997; Mahesparan *et al.*, 1999). Trabalho anterior do nosso grupo, mostrou que em modelos de glioma *in vivo* a FN foi identificada tanto ao redor das células tumorais (C6), quanto associada a MEC peritumoral no tecido sadio, o que indica que FN seja um substrato relevante nas áreas de infiltração tumoral no tecido cerebral adjacente (Ramos, 2007). Dessa forma, a redução da expressão de FN ocasionada pela inibição de mPGES-1 pode estar colaborando para redução da migração das células U87MG e T98G.

A expressão gênica de COL4 em células U87MG e T98G expostas aos diferentes tratamentos estudados neste trabalho também foi analisada. A inibição de COX-1 com SC560 na linhagem U87MG aumentou a expressão gênica do gene de COL4. IBP e NS398 não alteraram significativamente os níveis de mRNA desse gene na linhagem U87MG. CAY10526 reduziu os níveis de mRNA de COL4, enquanto PGE₂ aumentou sua expressão (p=0,0517). Em células T98G, SC560 e PGE₂ não alteraram a expressão gênica de COL4, enquanto que os inibidores IBP, NS398 e CAY10526 reduziram significativamente os níveis de mRNA de COL4.

De modo semelhante ao observado neste trabalho, Feitoza (2013) constatou que IBP não altera a expressão gênica de COL4 na linhagem U87MG. Em contrapartida, diferente dos resultados obtidos nesta pesquisa, o tratamento das células U87MG com PGE₂ não alterou os níveis de mRNA de COL4. Na linhagem U251, Feitoza (2013) observou que IBP reduz significativamente a expressão gênica de COL4, enquanto que PGE₂ não alterou a expressão desse gene. Cheng e colaboradores (2005) demonstraram que a inibição de COX-2 reduz os níveis de mRNA de COL4 em camundongos após injúria renal. Os diferentes resultados obtidos com a inibição das COXs nas linhagens estudadas, assim como, com o tratamento com PGE₂ indicam que a modulação da expressão do gene de COL4 nas linhagens de GBM não está diretamente relacionada com a diminuição da produção dessa prostaglandina nas células. Esse dado fica ainda mais evidente ao se observar que a inibição de mPGES-1 reduziu a expressão gênica de COL4 nas

células T98G, mas o tratamento das células com PGE₂ não apresentou o efeito oposto.

A expressão proteica de COL4 foi analisada, por *western blot*, apenas na linhagem T98G devido a dificuldade de marcação desta proteína nos lisados celulares da linhagem U87MG. Os resultados demonstram que o tratamento com IBP ou PGE₂ não altera a quantidade de COL4 produzida por essas células. O inibidor de COX-1 estimulou a produção de COL4, enquanto o inibidor de COX-2 reduziu a expressão dessa proteína. CAY10526 reduziu a expressão de COL4 nas células T98G.

Ramos (2007) verificou que em modelo de glioma *in vivo*, a imunomarcação de COL4 foi homogênea no tumor mas no tecido cerebral sadio, COL4 foi marcada apenas nos vasos sanguíneos, o que sugere que COL4 foi expressa pelas células tumorais. Neste mesmo trabalho, foi observado que as células C6 não foram capazes de depositar COL4. Além do mais, a imunomarcação de COL4 em amostras de pacientes não foi possível. De maneira semelhante, neste trabalho, a marcação de COL4 em lisados de células U87MG não foi possível. No entanto, Feitoza (2013) marcou COL4 em células U87MG em ensaios de imunistoquímica. Dessa forma, é provável que as células U87MG produzam baixas quantidades de COL4.

Semelhante ao observado na linhagem T98G, a inibição específica de COX-2 com inibidor SC58236 reduziu a expressão de COL4 induzida por lesão renal em camundongos (Cheng *et al.*, 2005). Neste trabalho, a ausência de efeitos antagônicos com a inibição de mPGES-1 e tratamento com PGE₂ exógeno indicam que os mecanismos pelos quais CAY10526 reduz a expressão de COL4 em células T98G não é dependente na inibição da produção desta PG. Além do mais, a inibição de COX-1 apresentou um efeito oposto ao observado com a inibição de COX-2 nessas células, o que corrobora com a hipótese levantada.

É interessante ressaltar que o tratamento das células T98G com SC560 estimulou a expressão de LAM e COL4. Talvez o estímulo da produção de proteínas da MEC seja um dos mecanismos envolvidos com a produção de fibras de estresse observadas nas células T98G tratadas com SC560. Visto que, fibras de estresse são formadas quando as células estão aderidas a um substrato inflexível (Glenn, Jacobson, 2003). Contudo, como SC560 não estimulou a produção de proteínas de

MEC na linhagem U87MG, mas provocou a formação de fibras de estresse. É possível que haja outros mecanismos envolvidos neste processo.

Na MEC de gliomas o COL4 está relacionado com o grau do tumor e o nível de invasividade tumoral, além de estimular a migração celular (Mahesparan *et al.*, 1999; Pencheva *et al.*, 2017). Assim sendo, a redução da migração celular promovida pelos inibidores NS398 e CAY10526 pode estar relacionada a inibição da produção de COL4 na linhagem T98G.

A expressão gênica de VTN em células U87MG e T98G tratadas com IBP, SC560, NS398, CAY10526 e PGE₂ foi avaliada por PCR em tempo real. IBP e CAY10526 reduziram a expressão gênica de VTN nas células U87MG. Os demais tratamentos não afetaram os níveis de mRNA desta proteína. Na linhagem T98G, IBP, SC560 e NS398 reduziram a expressão gênica de VTN. Enquanto que, CAY10526 e PGE₂ não alteraram a expressão dessa proteína. Diferente dos resultados observados neste projeto, Feitoza (2013) observou que IBP não alterou os níveis de mRNA de VTN nas linhagens U87MG e T98G. Em contrapartida, em ambos os trabalhos, os resultados obtidos com o tratamento das linhagens de GBM com PGE₂ foram semelhantes.

A análise da expressão de VTN, por *western blot*, não foi possível devido a dificuldade de marcação dessa proteínas em lisados de células U87MG e T98G. Feitoza (2013) também não conseguiu realizar a marcação de VTN nas linhagens U87MG e U251MG em ensaios de *western blot*. Contudo, a imunomarcação de VTN foi possível em análises de imunistoquímica, o que indica que essa proteína é expressa nas células de GBM, porém em quantidades muito baixas para serem detectadas por *western blot*. Ramos (2007) observou que em modelos de glioma *in vivo* VTN é presente apenas em algumas regiões próximas da borda do tumor e geralmente indica o sentido da infiltração das células tumorais. Desse modo, VTN expressa foi expressa em baixas quantidades em comparação com outras proteínas de MEC estudadas.

Ramos (2007) observou que VTN é mais expressa em tumores mais migratórios e invasivos. Células de glioma fortemente marcadas para VTN apresentaram a capacidade de migrar tanto pelo espaço perivascular quanto por outras estruturas cerebrais como fibras mielinizadas. Pesquisas indicam que VTN desempenha papéis significativos na progressão de GBM servindo como um importante substrato adesivo (Gladson, Cheresch, 1991; Giese *et al.*, 1994) e potente

estimulador da migração celular (Mahesparan *et al.*, 1999). Dessa maneira, a redução da expressão gênica desta proteína promovida pela inibição das COXs ou de mPGES-1.

A adesão das células a MEC durante a migração celular é intermediada por uma série de receptores de membrana. Os principais receptores envolvidos neste processo são as ITGs. As ITGs são formadas pela combinação de subunidades α e β . Diversas ITGs são superexpressas em GBM em comparação com o cérebro sadio. Muitas dessas ITGs estão envolvidas com a progressão tumoral em GBM através da ativação de cascatas de vias de sinalização celular que promovem a proliferação celular, inibem a apoptose e estimulam a angiogênese (Caffo *et al.*, 2012). A expressão elevada de $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$, $\alpha v \beta 3$ e $\alpha 3 \beta 1$ está correlacionada com o pior prognóstico e menor taxa de sobrevivência de pacientes com GBM. A expressão das ITGs $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ estão relacionadas o fenótipo mais invasivo em células de GBM, além do mais essas ITGs aumentaram a invasão de células U87MG *in vitro* e *in vivo* (Malric *et al.*, 2017; Vehlow, Cordes, 2013).

Neste trabalho, a influência dos inibidores de COX e mPGES-1 ou PGE₂ na expressão das principais ITGs que interagem com as proteínas de MEC LAM, FN, COL4 e VTN, e que são superexpressas em GBM foi investigada. Para isso, foram realizadas análises de expressão gênica, por PCR em tempo real, e avaliação da expressão proteica, por ensaios de *western blot*, das subunidades dessas ITGs. As subunidades analisadas foram αv , $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$ e $\beta 3$.

Análise da expressão gênica da ITG $\alpha 3$ revelou que IBP reduziu significativamente os níveis de mRNA desta integrina na linhagem U87MG. Os demais tratamentos não alteraram a expressão desta ITG nas células U87MG. Na linhagem T98G SC560, NS398 e CAY10526 reduziram a expressão de ITG $\alpha 3$. Feitoza (2013) demonstrou que o tratamento das linhagens U87MG e U251MG com IBP reduziu a expressão de ITG $\alpha 3$, enquanto PGE₂ aumentou a expressão desta ITG nessas células.

Análise da expressão de ITG $\alpha 3$, por *western blot*, revelou que os tratamentos analisados não ocasionaram alteração da expressão dessa subunidade de ITG nas células U87MG. No entanto, a análise estatística não pode ser realizada pois o experimento só foi realizado duas vezes. Além do mais, os efeitos de CAY10526 sobre a expressão desta ITG não foi avaliada. Na linhagem T98G CAY10526 reduziu significativamente a expressão de ITG $\alpha 3$ e NS398 reduziu em

33% a expressão dessa ITG. A subunidade $\alpha 3$ de ITG pode mediar juntamente com a subunidade $\beta 1$ a interação das células com substratos de MEC como LAM, FN, COL4. A redução de ITG $\alpha 3$ por CAY10526 pode indicar que esse inibidor não está apenas reduzindo a expressão dessas proteínas de MEC mas também de receptores que intermediam a adesão das células a esses substratos.

Aggarwa e colaboradores (2014) mostraram que, embora tenha havia muita variação entre as amostras, há correlação estatisticamente significativa entre a expressão da ITG $\alpha 3\beta 1$ e COX-2 em amostras de pacientes com câncer. Em nossas análises, o inibidor de COX-2 NS398 reduziu a expressão da ITG $\alpha 3$ na linhagem T98G, mas não apresentou o mesmo efeito na linhagem U87MG.

Estudo realizado com células de câncer de pulmão demonstrou que o silenciamento genético de mPGES-1 levou a redução da expressão da ITG $\beta 3$. Da mesma forma, células A549 tratadas com inibidor de mPGES-1 MF3 expressão níveis reduzidos dessa ITG (Terzuoli *et al*, 2019). Esses dados corroboram com o efeito observado em células T98G tratadas com CAY10526.

Análise da expressão gênica de ITG $\alpha 5$ em células U87MG e T98G expostas aos tratamentos utilizados neste projeto, mostrou que CAY10526 reduziu da expressão gênica da ITG $\alpha 5$ em células U87MG. NS398 e SC560 reduziram os níveis mRNA desta subunidade de ITG em células T98G. Feitoza (2013) observou que quando as células U87MG e U251MG foram tratadas com IBP não houve alteração da expressão gênica de ITG $\alpha 5$. Esse resultado corrobora com os efeitos observados neste trabalho. Semelhante ao observado neste projeto, o tratamento da linhagem U251MG com PGE₂ não afetou os níveis de mRNA de ITG $\alpha 5$. No entanto, a exposição das células U87MG a PGE₂ estimulou o aumento da expressão de ITG $\alpha 5$.

Foi verificado, por *western blot*, células U87MG tratadas com NS398 aumentou a expressão da ITG $\alpha 5$ em 29%, enquanto CAY10526 reduziu a expressão dessa ITG em 41%. No entanto, esses resultados não foram estatisticamente significativos. Na linhagem T98G nenhum dos tratamentos alterou a expressão da subunidade $\alpha 5$ de ITG. A subunidade $\alpha 5$ de ITG em conjunto com a subunidade $\beta 1$ consiste em uma das principais integrinas de ligação a FN. A redução da expressão dessa ITG em células U87MG tratadas com NS398 e CAY10526 demonstra que esses tratamentos afetam não apenas a expressão de FN mas também seu principal receptor.

Análise de expressão do gene de ITG αv em células U87MG tratadas com os diferentes inibidores e PGE₂, demonstrou que IBP e CAY10526 reduzem a expressão desse gene, enquanto PGE₂ aumentou os níveis de mRNA de ITG αv . Na linhagem T98G, SC560, NS398 e CAY10526 reduziram significativamente a expressão dessa subunidade de ITG. Os resultados obtidos com o tratamento das células U87MG com IBP e PGE₂ são semelhantes aos observados por Feitoza (2013) em ambas linhagens U87MG e U251MG.

Ensaio de *western blot* mostraram que o tratamento de células U87MG com IBP e SC560 reduziram significativamente a expressão da ITG αv . Em linhagem T98G SC560 diminuiu a expressão da ITG αv em 29,5%, enquanto NS398 reduziu a expressão dessa integrina em 25,4%. Em células T98G, CAY10562 reduziu os níveis de ITG αv em 42%. A influência de CAY10526 sobre a expressão dessa ITG na linhagem U87MG não foi avaliada.

A subunidade αv juntamente com a subunidade $\beta 3$ consiste na principal integrina de ligação a VTN, mas também pode intermediar a interação das células com FN. A subunidade αv junto com a $\beta 1$ pode mediar a ligação das células a FN ou VTN. Os resultados obtidos indicam que, em células T98G, CAY10526 interfere tanto na expressão de FN quanto de seu receptor de ITG contendo a subunidade αv . Embora a quantificação da proteína VTN não tenha sido realizada, a diminuição da expressão gênica e proteica da subunidade αv observada na linhagem T98G tratada SC560 e NS398 pode indicar que esses tratamentos interferem tanto na expressão de VTN quanto de seus receptores. No entanto, esta hipótese necessita ser melhor investigada.

Em modelos de glioma de rato *in vivo*, ITG αv foi fortemente marcada em células infiltrando o parênquima cerebral, algumas dessas células foram localizadas em sítios distantes do tumor. Esses dados sugerem que células de glioma com maior expressão de ITG αv tem maior capacidade migratória. Também foi observado a intensa imunomarcção de ITG αv em células tumorais migrando pelo espaço perivascular e áreas ricas em mielina, como o corpo caloso. O espaço perivascular, em especial, possui grandes quantidades de FN e VTN, e essas proteínas da MEC são os principais ligantes de ITG αv . Como, nos modelos tumorais avaliados, a marcação de ITG $\beta 1$ não foi co-localizada com ITG αv é provável que a adesão das células nessas estruturas estivesse sendo mediada pela ITG $\alpha v\beta 3$ (Ramos, 2007).

Estudo em fase clínica II utilizando um anticorpo específico para as ITG $\alpha\beta 3$ e ITG $\alpha\beta 5$ demonstrou que a inibição dessas ITGs resultou na regressão tumoral em pacientes com GBM e não foi observada recorrência tumoral durante todo o período do estudo (10 meses) (Reardon *et al.*, 2008). Dessa forma, a redução da expressão de ITG $\alpha\gamma$ promovido pelo tratamento das células de GBM com os inibidores de COX e mPGES-1 pode indicar a relevância dessas enzimas como potenciais alvos terapêuticos em GBM.

Análise de PCR em tempo real mostrou que, em células U87MG, nenhum dos tratamentos alterou significativamente a expressão da ITG $\beta 1$, embora CAY10526 tenha reduzido a expressão desta ITG ($p < 0,0533$). Em células T98G, os tratamentos com SC560, NS398 e CAY10526 reduziram significativamente a expressão dessa ITG. Feitoza (2013) observou a redução da expressão da ITG $\beta 1$ em células U87MG e U251MG tratadas com IBP, enquanto que o tratamento com PGE_2 tenha elevado os níveis de mRNA desta ITG apenas na linhagem U251MG.

A quantificação da proteína ITG $\beta 1$ em células U87MG expostas a todos os tratamentos avaliados neste projeto, demonstrou que CAY10526 reduz significativamente a expressão desta ITG. Nas células T98G NS398 reduziu significativamente os níveis proteicos de ITG $\beta 1$ e CAY10526 diminuiu em 42% a expressão dessa proteína. A subunidade $\beta 1$ está presente em uma grande variedade de ITG. A redução da expressão dessa proteína é um forte indicativo da perda da expressão de vários receptores de superfície celular, o que acarreta em menor interação entre as células e elementos da MEC.

Em modelo de glioma *in vivo*, a subunidade $\beta 1$ foi mais expressa na superfície de células localizadas na borda do tumor, o que indica que essa ITG é mais expressa em células infiltrando o parênquima cerebral sadio. Neste mesmo estudo foi observado que os tumores mais infiltrativos expressavam mais ITG $\beta 1$ (Ramos, 2007).

Em estudo com linhagens de câncer de cólon demonstrou que células tratadas com o inibidor de COX-2 JTE-522 reduzem a migração celular, assim como, a adesão em COL1, COL2, COL4 e LAM. Após análise de imunistoquímica e *western blot*, os pesquisadores viram que o tratamento com este inibidor reduziu a expressão da ITG $\beta 1$ nas células (Yazawa *et al.*, 2005). Esses dados corroboram com os resultados obtidos, neste trabalho, com o inibidor de COX-2 em células T98G. Tendo em vista que esse inibidor reduziu a expressão gênica e proteica

desta ITG. Já silenciamento genético de mPGES-1, em células de câncer de próstata, ocasionou a redução da expressão da proteína ITG $\beta 1$. Esse resultado foi similar ao observado em nosso estudo com a inibição farmacológica de ITG $\beta 1$ nas linhagens estudadas.

Massoumi e colaboradores (2003) observaram que células Caco-2 tratadas com NS398 reduziram a adesão ao colágeno, enquanto que células tratadas com PGE₂ aumentaram a adesão celular. O antagonista de receptores de PGE₂ AH6809 reduzem a adesão das células ao colágeno. Foi verificado que o PGE₂ aumenta a expressão da ITG $\alpha 2\beta 1$ nessas células, o bloqueio da ITG $\alpha 2\beta 1$ com anticorpos reduziu a adesão celular em colágeno tipo I. Por outro lado, quando as células foram pré-incubadas com AH6809, PGE₂ não alterou a expressão de $\alpha 2\beta 1$. Esses dados sugerem que PGE₂ estimula a expressão de $\alpha 2\beta 1$ através de mecanismos relacionados a ativação do receptor EP2. Por outro lado, NS398 reduziu a expressão de ITG $\alpha 2\beta 1$ por inibir a produção de PGE₂ nas células. Embora NS398 tenha ocasionado a redução da expressão de ITG $\beta 1$ em células T98G, em nosso estudo, PGE₂ não teve o efeito oposto.

Análises da expressão gênica de células U87MG mostrou que CAY10526 reduziu os níveis de mRNA da subunidade $\beta 3$ de ITG. Em células T98G os inibidores SC560 e CAY10526 reduziram a expressão gênica de ITG $\beta 3$. Em ambas as linhagens analisadas, IBP e PGE₂ não alterou a expressão gênica de ITG $\beta 3$. Os resultados observados por Feitoza (2013) corroboram com os demonstrados neste trabalho, visto que o tratamento das células U87MG e U251MG com IBP ou PGE₂ não afetaram a expressão gênica de ITG $\beta 3$.

A quantificação da proteína ITG $\beta 3$ em células U87MG mostrou que NS398 reduziu 42% a expressão dessa ITG. Em células T98G CAY10526 reduziu a expressão de ITG $\beta 3$ em 39%. A subunidade $\beta 3$ geralmente é associada a subunidade αv . A ITG $\alpha v\beta 3$ é a principal integrina de ligação a VTN e a redução de sua expressão pode indicar menor adesão das células a esse substrato. Note que, em células T98G, CAY10526 reduziu tanto a expressão gênica da subunidade αv quanto $\beta 3$. O mesmo foi observado na quantificação dessas proteínas por ensaio de western blot.

A subunidade $\beta 3$ está presente na ITG $\alpha v\beta 3$ alvo do anticorpo cilengitide. Como citado anteriormente, estudo clínico de fase II o cilengitide tem promovida a regressão do GBM em pacientes (Reardon *et al.*, 2008). Em conjunto, os resultados

encontrados em nosso estudo sugerem que CAY10526 diminuiu a expressão da ITG $\alpha\beta3$ nessas células. De modo que, a inibição de mPGES-1 pode ser uma potencial terapia adjuvante em pacientes com GBM.

6 CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste projeto mostram que COXs e mPGES-1 desempenham um papel no crescimento celular, reorganização do citoesqueleto, expressão de proteínas da MEC e ITGs, assim como, migração celular em linhagens de GBM.

- A inibição de mPGES-1 reduziu o número de células das linhagens U87MG e T98G em uma concentração 4 vezes inferior a concentração necessária do inibidor de COX, ibuprofeno. PGE₂ estimulou o crescimento celular.
- Inibidores seletivos de COX-1 e COX-2, assim como, o inibidor de mPGES-1 reduziu a migração das células de GBM *in vitro* de modo mais acentuado que ibuprofeno. PGE₂ aumentou a migração das células U87MG, mas não das células T98G.
- A inibição de mPGES-1 ou inibição seletiva de COX-1 e COX-2 promoveram remodelamento da citoesqueleto das células U87MG e T98G. Esses dados sugerem que a redução da migração celular promovida por SC560 deve-se, em parte, a imobilização dessas células pela produção de fibras de estresse. Enquanto, CAY10526 desestruturou os filamentos de actina de modo a dificultar a migração celular. PGE₂ não causou remodelamento do citoesqueleto.
- A inibição de mPGES-1 promoveu a redução da expressão das proteínas da MEC e seus receptores. Nas linhagens estudadas, o inibidor de mPGES-1 reduziu a expressão de duas subunidades de ITGs muito relevantes para a invasão, migração e agressividade em GBM. Foram elas as ITGs $\beta 1$ e αv . Estudos clínicos têm demonstrado que a inibição da ITG αv acarreta na regressão tumoral em pacientes com GBM. Esses dados sugerem que mPGES-1 é um potencial alvo terapêutico em GBM.

- A inibição de COX modulou de diferentes formas a expressão das proteínas da MEC e seus receptores.
- Na maioria das vezes, o tratamento das células com PGE₂ não alterou a expressão gênica ou proteica das proteína da MEC e seus receptores.

Em conjunto, os resultados sugerem a inibição de mPGES-1 apresenta resultados similares ou superiores aos observados com a inibição seletiva de COX. Dessa maneira, mPGES-1 é um possível alvo para terapia adjuvante em GBM.

REFERÊNCIAS

Aggarwal A, Al-Rohil RN, Batra A, Feustel PJ, Jones DM, DiPersio CM. Expression of integrin $\alpha 3\beta 1$ and cyclooxygenase-2 (COX2) are positively correlated in human breast cancer. *BMC Cancer* 2014 Jun; 14:459. doi: 10.1186/1471-2407-14-459

Ahmed S, Kim Y. PGE₂ mediates cytoskeletal rearrangement of hemocytes via Cdc42, a small G protein, to activate actin-remodeling factors in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Arch Insect Biochem Physiol*. 2019 Dec; 102(4): e21607. doi: 10.1002/arch.21607. Epub 2019 Jul 23.

American Type Culture Collection (ATCC). T98G (ATCC® CRL-1690™). Disponível em: <<https://www.atcc.org/Products/All/CRL-1690.aspx>>. Acessado em: 17.07.2017.

American Type Culture Collection (ATCC). U87MG (ATCC® HTB-14™). Disponível em: <<https://www.atcc.org/Products/All/HTB-14.aspx>>. Acessado em: 17.07.2017.

Barlow M, Edelman M, Glick RD, Steinberg Bettie M, Soffer SZ. Celecoxib inhibits invasion and metastasis via a cyclooxygenase 2-independent mechanism in an in vitro model of Ewing sarcoma. *J Pediatric Surg*. 2012 Jun; 47(6): 1223-1227. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2012.03.031>

Benadiba M, de M Costa I, Santos RL, Serachi FO, de Oliveira Silva D, Colquhoun A. Growth inhibitory effects of the Diruthenium-Ibuprofen compound, [Ru₂Cl(lbp)₄], in human glioma cells in vitro and in the rat C6 orthotopic gliomas in vivo. *J Biol Inorg Chem*. 2014 Aug;19(6):1025-35. doi: 10.1007/s00775-014-1143-4. Epub 2014 May 14.

Bottone FG Jr, Martinez JM, Alston-Mills B, Eling TE. Gene modulation by COX-1 and COX-2 specific inhibitors in human colotectal carcinoma cancer cells. *Carcinogenesis*. 2004 Mar; 25(3): 349-57. doi: 10.1093/carcin/bgh016. Epub 2003 Nov 21.

Brocard E, Oizel K, Lalier L, Pecqueur C, Paris F, Vallette FM, et al. Radiation-induced PGE₂ sustains human glioma cells growth and survival through EGF signaling. *Oncotarget* 2015; 6(9):6840-6849.

Caffo O, Veccia A, Russo L, Galligioni E. Brain metastases from prostate cancer: an emerging clinical problem with implications for the future therapeutic scenario. *Future Oncol*. 2012 Dec; 8(12): 1585-95. doi: 10.2217/fon.12.156

Chang YW, Marlin JW, Chance TW, Jakobi R. RhoA mediates cyclooxygenase-2 signaling to disrupt the formation of adherens junctions and increase cell motility. *Cancer Res*. 2006 Dec; 66(24):11700-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1818

Chang HH, Meuillet EJ. Identification and development of mPGES-1 inhibitors: where we are at? *Future Med Chem.* 2011 Nov; 3(15): 1909-34. doi: 10.4155/fmc.11.136.

Cheng H, Zhang M, Moeckel GW, Zhao Y, Wang S, Qi Z, Breyer MD, Harris RC. Expression of mediators of renal injury in the remnant kidney of ROP mice is attenuated by cyclooxygenase-2 inhibition. *Nephron Exp Nephrol.* 2005; 101 (3): e75-85. doi: 10.1159/000086645. Epub 2005 Jun 30.

Chiu WT, Shen SC, Chow JM, Lin CW, Shia LT, Chen YC. Contribution of reactive oxygen species to migration/invasion of human glioblastoma cells U87 via ERK-dependent COX-2/PGE(2) activation. *Neurobiol Dis.* 2010 Jan; 37(1): 118-29. doi: 10.1016/j.nbd.2009.09.015. Epub 2009 Oct 3.

Choi HJ, Lee DH, Park SH, Kim J, Do KH, An TJ, Ahn YS, Park CB, Moon Y. Induction of human microsomal prostaglandin E synthase 1 by activated oncogene RhoA GTPase in A549 human epithelial cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Sep; 413(3): 448-53. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.116. Epub 2011 Aug 30.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr; 162 (1):156-159.

Clark MJ, Homer N, O'Connor BD, Chen Z, Eskin A, Lee H, Merriman B, Nelson SF. U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS Genetics.* 2010 Jan; 6 (1): e1000832. doi: 10.1371/journal.pgen.1000832.

Colin C, Baeza N, Bartoli C, Fina F, Eudes N, Nanni I, Martin PM, Ouafik L, Figarella-Branger D. Identification of genes differentially expressed in glioblastoma versus pilocytic astrocytoma using suppression subtractive hybridization. *Oncogene.* 2006 May; 25(19): 2818-26. doi: 10.1038/sj.onc.1209305.

Colman H, Zhang L, Sulman EP, McDonald JM, Shooshtari NL, Rivera A, Popoff S, Nutt CL, Louis DN, Cairncross JG, Gilbert MR, Phillips HS, Mehta MP, Chakravarti A, Pelloski CE, Bhat K, Feuerstein BG, Jenkins RB, Aldape K. A multigene predictor of outcome in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2010 Jan; 12(1): 49-57. doi: 10.1093/neuonc/nop007. Epub 2009 Oct 20.

Coniglio SJ, Segall JE. Review: molecular mechanism of microglia stimulated glioblastoma invasion. *Matrix Biol.* 2013 Oct-Nov; 32(7-8): 372-80. doi: 10.1016/j.matbio.2013.07.008. Epub 2013 Aug 7.

Cuddapah VA, Robel S, Watkins S, Sontheimer H. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nature Rev Neurosci.* 2014 Jul; 15(7): 455-65. doi: 10.1038/nrn3765

Cunha, AS. Análise do papel da prostaglandina E2 e seus receptores na proliferação e apoptose em glioma humano, e da expressão das enzimas COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2 e cPGES. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular

e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Cunha MLVD, Maldaun MVC. Metastasis from glioblastoma multiforme: a meta-analysis. *Rev Assoc Med Bras.* 2019 Mar; 65(3): 424-433. doi: 10.1590/1806-9282.65.3.424. Epub 2019 Apr 11.

Daikoku T, Wang D, Tranguch S, Morrow JD, Orsulic S, DuBois RN, Dey SK. Cyclooxygenase-1 is a potential target for prevention and treatment of ovarian epithelial cancer. *Cancer Res.* 2005 May; 65(9): 3735-44. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3814

Davies NM, Good RL, Roupe KA, Yáñez JA. Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error? Not as easy as 1,2,3. *J Pharm Pharm Sci.* 2004 Jul; 7(2): 217-226.

Delgado-López PD, Corrales-García EM. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. *Clin Transl Oncol.* 2016 Nov; 18(11): 1062-1071. Epub 2016 Mar 10.

De Luca C, Papa M. Looking Inside the Matrix: Perineuronal Nets in Plasticity, Maladaptive Plasticity and Neurological Disorders. *Neurochem Res.* 2016 Jul; 41(7): 1507-15. doi: 10.1007/s11064-016-1876-2. Epub 2016 Mar 2.

Deiningner MH, Weller M, Streffer J, Mittelbronn M, Meyermann R. Patterns of cyclooxygenase-1 and -2 expression in human gliomas in vivo. *Acta Neuropathol.* 1999 Sep; 98(3): 240-4. doi:10.1007/s004010051075

Dinchuk JE, Liu RQ, Trzaskos JM. COX-3: in the wrong frame in mind. *Immunol Lett.* 2003 Mar; 86(1): 121. doi: 10.1016/s0165-2478(02)00268-7

Dong JM, Leung T, Manser E, Lim L. cAMP-induced morphological changes are counteracted by the activated RhoA small GTPase and the Rho kinase ROKalpha. *J Biol Chem.* 1988 Aug; 273 (35): 22554-62. doi: 10.1074/jbc.273.35.22554

Donnini S, Finetti F, Terzuoli E, Giachetti A, Iñiguez MA, Hanaka H, Fresno M, Radmark O, Ziche M. EGFR signaling upregulates expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 in cancer cells leading to enhanced tumorigenicity. *Oncogene.* 2012 Jul; 31(29): 3457-66. doi: 10.1038/oncl.2011.503. Epub 2011 Nov 14.

Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1988 Sep; 12(12): 1062-73.

Durbeej, M. Laminis. *Cell Tissue Res.* 2010 Jan; 339(1): 259-68. doi: 10.1007/s00441-009-0838-2. Epub 2009 Aug 20.

Ensign FSP, Mathews IT, Symons MH, Berens ME, Tran NL. Implications of Rho GTPases Signaling in Glioma Cell Invasion and Tumor Progression. *Front Oncol*. 2013 Oct; 3:241. doi: 10.3389/fonc.2013.00241.

Eyden B, Tzaphlidou M. Structural variations of collagen in normal and pathological tissues: role of electron microscopy. *Micron*. 2001 Apr; 32(3): 287-300. doi: 10.1016/S0968-4328(00)00045-7

Feitoza, F. Estudo in vitro do efeito da prostaglandina E2 na migração das células U87MG e U251MG, evidenciando a matriz extracelular e as moléculas de adesão. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Ferreira MT, Gomes RN, Panagopoulos AT, de Almeida FG, Veiga JCE, Colquhoun A. Opposing roles of PGD₂ in GBM. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2018 Jan;134:66-76. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2017.10.002. Epub 2017 Oct 16.

Finetti F, Terzuoli E, Bocci E, Coletta I, Polenzani L, Mangano G, Alisi MA, Cazzolla N, Giachetti A, Ziche M, Donnini S. Pharmacological inhibition of microsomal prostaglandin E synthase-1 suppresses epidermal growth factor receptor-mediated tumor growth and angiogenesis. *PLoS One*. 2012; 7(7):e40576. doi: 10.1371/journal.pone.0040576. Epub 2012 Jul 18.

Gerozissis K, De Saint Hilaire Z, Orosco M, Rouch C, Nicolaidis S. Changes in hypothalamic prostaglandin E2 may predict the occurrence of sleep or wakefulness as assessed by parallel EEG and microdialysis in the rat. *Brain Res*. 1995 Aug; 689(2): 239-44. doi: 10.1016/0006-8993(95)00583-c

Giese A, Rief MD, Loo MA, Berens ME. Determinants of human astrocytoma migration. *Cancer Res*. 1994 Jul; 54(14): 3897-904.

Giese A, Westphal M. Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery*. 1996 Aug; 39(2): 235-50. doi: 10.1097/00006123-199608000-00001

Gladson CL, Cheresh DA. Glioblastoma Expression of Vitronectin and the $\alpha v/\beta 3$ Integrin. Adhesion Mechanism for Transformed Glial Cells. *J Clin Invest*. 1991 Dec; 88(6): 1924-1932. doi: 10.1172/JCI115516

Glenn HL, Jacobson BS. Cyclooxygenase and cAMP-dependent protein kinase reorganize the actin cytoskeleton for motility in HeLa cells. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2003 Aug; 55(4): 265-77. doi: 10.1002/cm.10128

Goldbrunner RH, Bernstein JJ, Tonn JC. ECM-mediated glioma cell invasion. *Microsc Res Tech*. 1998 Nov; 43(3): 250-7. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19981101)43:3<250::AID-JEMT7>3.0.CO;2-C

Gomes, RN. Análise do perfil dos prostanoídes e do seu papel no controle da migração celular em glioblastoma. [Tese (Doutorado em Biologia Celular e

Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Gomes RN, Colquhoun A. E series prostaglandins alter the proliferative, apoptotic and migratory properties of T98G human glioma cells in vitro. *Lipids Health Dis.* 2012;11:171-182. doi:10.1186/1476-511X-11-171.

Gong J, Wang ZX, Liu ZY. miRNA-1271 inhibits cell proliferation in neuroglioma by targeting fibronectin 1. *Mol Med Rep.* 2017 Jul; 16(1): 143-150. doi: 10.3892/mmr.2017.6610. Epub 2017 May 19.

Grosser T, Fries S, FitzGerald GA. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J Clin Invest.* 2006 Jan; 116 (1): 4-15. doi: 10.1172/JCI27291

Guillamo JS, Lisovoski F, Christov C, Le Guérinel C, Defer GL, Peschanski M, Lefrançois T. Migration pathways of human glioblastoma cells xenografted into the immunosuppressed rat brain. *J Neuroonc.* 2001 May; 52(3): 205-15. doi: 10.1023/a:1010620420241

Haataja L, Groffen J, Heisterkamp N. Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J Biol Chem.* 1997 Aug; 272(33): 20384-8. doi: 10.1074/jbc.272.33.20384

Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2018 Sep; 18(9): 533-548. doi: 10.1038/s41568-018-0038-z.

Hanif-Ur-Rehman, Freitas TE, Gomes RN, Colquhoun A, de Oliveira Silva D. Axially-modified paddlewheel diruthenium (II, III) – ibuprofenato metallodrugs and the influence of the structural modification on U87MG and A172 human glioma cell proliferation, apoptosis, mitosis and migration. *J Inorg Biochem.* 2016 Dec;165:181-191. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.10.003. Epub 2016 Oct 14.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4; 144(5): 646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hanaka H, Pawelzik SC, Johnsen JI, Rakonjac M, Terawaki K, Rasmuson A, Sveinbjörnsson B, Schumacher MC, Hamberg M, Samuelsson B, Jakobsson PJ, Kogner P, Rådmark O. Microsomal prostaglandin E synthase 1 determines tumor growth in vivo of prostate and lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Nov; 106(44):18757-62. doi: 10.1073/pnas.0910218106. Epub 2009 Oct 21.

Hawkey CJ. COX-1 and COX-2 inhibitors. *Best Pract Res Clin Gast.* 2001; 15(5): 801-820. doi: <https://doi.org/10.1053/bega.2001.0236>

Hayaishi O, Matsumura H. Prostaglandins and sleep. *Adv Neuroimmunol.* 1995; 5(2): 211-6. doi: 10.1016/0960-5428(95)00010-y

Hirata E, Yukinaga H, Kamioka Y, Arakawa Y, Miyamoto S, Okada T, Sahai E, Matsuda M. In vivo fluorescence resonance energy transfer imaging reveals differential activation of Rho-family GTPases in glioblastoma cell invasion. *J Cell Sci.* 2012 Feb; 125(Pt4): 858-68. doi: 10.1242/jcs.089995. Epub 2012 Mar 7.

Horwitz AR, Parsons JT. Cell Migration – Movin'on. *Science.* 1999 Nov; 286(5442): 1102-3. doi: 10.1126/science.286.5442.1102

Howe LR, Subbaramaiah K, Kent CV, Zhou XK, Chang SH, Hla T, Jakobsson PJ, Hudis CA, Dannenberg AJ. Genetic deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1 suppresses mouse mammary tumor growth and angiogenesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2013 Oct; 106: 99-105. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2013.04.002. Epub 2013 Apr 25.

Huang X, Taeb S, Jahangiri S, Korpela E, Cadonic I, Yu N, Krylov SN, Fokas E, Boutros PC, Liu SK. miR-620 promotes tumor radioresistance by targeting 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (HPGD). *Oncotarget.* 2015 Sep; 6(26): 22439-51

Huber RJ, O'Day DH. Extracellular matrix dynamics and functions in the social amoeba *Dictyostelium*: A critical review. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2017 Jan; 1861(1): 2971-2980. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.09.026. Epub 2016 Sep 28.

Hwang SL, Chang JH, Cheng TS, Sy WD, Lieu AS, Lin CL, Lee KS, Howng SL, Hong YR. Expression of Rac3 in human brain tumors. *J Clin Neurosci.* 2005 Jun; 12(5): 571-4. doi: 10.1016/j.jocn.2004.08.013.

Hsu JY, Chang KY, Chen SH, Lee CT, Chang ST, Cheng HC, Chang WC, Chen BK. Epidermal growth factor-induced cyclooxygenase-2 enhances head and neck squamous cell carcinoma metastasis through fibronectin up-regulation. *Oncotarget.* 2015 Jan; 6(3): 1723-39. doi: 10.18632/oncotarget.2783

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estatísticas de câncer no Brasil. Disponível em <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>

Ishibashi M, Bottone FG Jr, Taniura S, Kamitani H, Watanabe T, Eling TE. The cyclooxygenase inhibitor indomethacin modulates gene expression and represses the extracellular matrix protein lamin gamma1 in human glioblastoma cells. *Exp Cell Res.* 2005 Jan 15;302(2):244-52.

Ivanov AI, Romanovsky AA. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Front Biosci.* 2004 May; 9: 1977-93. doi: 10.2741/1383

Jain AK, Moore SM, Yamaguchi K, Eling TE, Baek SJ. Selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce thymosin beta-4 and alter actin cytoskeletal organization in human colorectal cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Dec; 311(3): 885-91. doi: 10.1124/jpet.104.070664. Epub 2004 Aug 3.

Janssen A, Maier TJ, Schiffmann S, Coste O, Seegel M, Geisslinger G, Grösch S. Evidence of COX-2 independent induction of apoptosis and cell cycle block in human colon carcinoma cells after S- or R-ibuprofen treatment. *Eur J Pharmacol.* 2006 Jul; 540(1-3): 24-33. Epub 2006 May 3. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.04.030

Ji K, Tsirka SE. Inflammation modulates expression of laminin in the central nervous system following ischemic injury. *J Neuroinflammation.* 2012 Jul; 9:159. doi: 10.1186/1742-2094-9-159. doi: 10.1186/1742-2094-9-159

Jiang LW, Wang XF, Wu ZY, Lin PH, Du HP, Wang S, Li LH, Fang N, Zhuo SM, Kang DZ, Chen JX. Label-free detection of fibrillar collagen deposition associated with vascular elements in glioblastoma multiforme by using multiphoton microscopy. *J Microsc.* 2017 Feb; 265(2): 207-213. doi: 10.1111/jmi.12476. Epub 2016 Sep 19.

Joki T, Heese O, Nikas DC, Bello L, Zhang J, Kraeft SK, Seyfried NT, Abe T, Chen LB, Carroll RS, Black PM. Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *Cancer Res.* 2000 Sep; 60(17): 4926-31.

Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Bäcklund LM, Ichimura K, Collins VP. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res.* 2008 Nov; 68(21): 8673-7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2097.

Jongthawin J, Chusorn P, Techasen A, Loilome W, Boonmars T, Thanan R, Puapairoj A, Khuntikeo N, Tassaneeyakul W, Yongvanit P, Namwat N. PGE2 signaling and its biosynthesis-related enzymes in cholangiocarcinoma progression. *Tumour Biol.* 2014 Aug; 35(8):8051-64. doi: 10.1007/s13277-014-2021-y. Epub 2014 May 18.

Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jun; 3(6): 422-33. doi: 10.1038/nrc1094

Kamei D, Murakami M, Sasaki Y, Nakatani Y, Majima M, Ishikawa Y, Ishii T, Uematsu S, Akira S, Hara S, Kudo I. Microsomal prostaglandin E synthase-1 in both cancer cells and hosts contributes to tumor growth, invasion and metastasis. *Biochem J.* 2009 Dec; 425(2): 361-71. doi: 10.1042/BJ20090045.

Kamei D, Murakami M, Nakatani Y, Ishikawa Y, Ishii T, Kudo I. Potential role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in tumorigenesis. *J Biol Chem.* 2003 May; 278 (21): 19396-405. doi: 10.1074/jbc.M213290200. Epub 2003 Mar 7.

Kawataki T, Yamane T, Naganuma H, Rousselle P, Andurén I, Tryggvason K, Patarroyo M. Laminin isoforms and their integrin receptors in glioma cell migration and invasiveness: Evidence for a role of alpha5-laminin(s) and alpha3beta1 integrin. *Exp Cell Res.* 2007 Nov 1; 313(18): 3819-31. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.07.038. Epub 2007 Aug 16.

Kechagia JZ, Ivaska J, Roca-Cusachs P. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Aug; 20(8): 457-473. doi: 10.1038/s41580-019-0134-2.

Kim SH, Hashimoto Y, Cho SN, Roszik J, Milton DR, Dal F, Kim SF, Menter DG, Yang P, Ekmekcioglu S, Grimm EA. Microsomal PGE2 synthase-1 regulates melanoma cell survival and associates with melanoma disease progression. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2016 May; 29(3):297-308. doi: 10.1111/pcmr.12455. Epub 2016 Mar 15.

Kim SR, Bae MK, Kim JY, Wee HJ, Yoo MA, Bae SK. Aspirin induces apoptosis through the blockade of IL-6-STAT3 signaling pathway in human glioblastoma A172 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Sep; 387(2): 342-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.07.022. Epub 2009 Jul 10.

Kis B, Snipes JA, Busija DW. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Oct; 315(1): 1-7. doi: 10.1124/jpet.105.085431. Epub 2005 May 6.

Kock A, Larsson K, Bergqvist F, Eissler N, Elfman LHM, Raouf J, Korotkova M, Johnsen JI, Jakobsson PJ, Kogner P. Inhibition of Microsomal E Synthase-1 in Cancer-Associated Fibroblasts Suppresses Neuroblastoma Tumor Growth. *EBioMedicine.* 2018 Jun; 32: 84-92. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.05.008. Epub 2018 May 24.

Knott JC, Mahesparan R, Garcia-Cabrera I, Bolge Tysnes B, Edvardsen K, Ness Go, Mork S, Lund-Johansen M, Bjerkvig R. Stimulation of extracellular matrix components in the normal brain by invading glioma cells. *Int J Cancer.* 1998 Mar; 75(6): 864-72. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19980316)75:6<864::aid-ijc8>3.0.co;2-t

Krishnaswamy VR, Benbenishty A, Blinder P, Sagi I. Demystifying the extracellular matrix and its proteolytic remodeling in the brain: structural and functional insights. *Cel Mol Life Sci.* 2019 Jun; 76: 3229-48. doi: 10.1007/s00018-019-03182-6.

Krysan K, et al. Prostaglandin E2 activates mitogen-activated protein kinase/Erk pathway signaling and cell proliferation in non-small cell lung cancer cells in an epidermal growth factor receptor independent manner. *Cancer Res* 2005;65:6275–6281

Kuipers GK, Slotman BJ, Wedekind LE, Stoter TR, Berg Jv, Sminia P, Lafleur MV. Radiosensitization of human glioma cells by cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition: independent on COX-2 expression and dependent on the COX-2 inhibitor and sequence of administration. *Int J Radiat Biol.* 2007 Oct;83(10):677-85.

Lampiasi N, Foderà D, D'Alessandro N, Cusimano A, Azzolina A, Tripodo C, Florena AM, Minervini MI, Notarbartolo M, Montalto G, Cervello M. The selective cyclooxygenase-1 inhibitor SC-560 suppresses cell proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Mol Med.* 2006 Feb; 17(2): 245-52.

Larsson K, Kock A, Idborg H, Henriksson MA, Martinsson T, Johnsen JI, Korotkova M, Kogner P, Jakobsson PJ. COX/mPGES-1/PGE₂ pathway depicts an inflammatory-dependent high-risk neuroblastoma subset. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015 Jun; 112(26): 8070-8075. doi: 10.1073/pnas.1424355112

Lal A, Lash AE, Altschul SF, Velculescu V, Zhang L, McLendon RE, Marra MA, Prange C, Morin PJ, Polyak K, Papadopoulos N, Vogelstein B, Zinzler KW, Strausberg RL, Riggins GJ. A public database for gene expression in human cancers. *Cancer Res*. 1999 Nov; 59(21): 5403-7.

Leaver HA, Bell HS, Rizzo MT, Ironside JW, Gregor A, Wharton SB, Whittle IR. Antitumour and pro-apoptotic actions of highly unsaturated fatty acids in glioma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002 Jan; 66(1): 19-29. Doi: <https://doi.org/10.1054/plef.2001.0336>

Leidgens V, Seliger C, Jachnik B, Welz T, Leukel P, Vollmann-Zwerenz A, Bogdahn U, Kreutz M, Grauer OM, Hau P. Ibuprofen and Diclofenac Restrict Migration and Proliferation of Human Glioma Cells by Distinct Molecular Mechanisms. *PLoS One*. 2015 Oct; 10(10):e0140613. doi: 10.1371/journal.pone.0140613. eCollection 2015.

Li F, Liu Y, Chen H, Liao D, Shen Y, Xu F, Wang J. EGFR and COX-2 protein expression in non-small cell lung cancer and the correlation with clinical features. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011 Mar; 30:27. doi: 10.1186/1756-9966-30-27.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec; 25(4):402-8. doi 10.1006/meth.2001.1262.

Ljubimova JY, Fujita M, Khazenzon NM, Ljubimov AV, Black KL. Changes in laminin isoforms associated with brain tumor invasion and angiogenesis. *Front Biosci*. 2006 Jan; 11: 81-8. doi: 10.2741/1781.

Ljubimova JY, Lakhter AJ, Loksh A, Yong WH, Riedinger MS, Miner JH, Sorokin LM, Ljubimov AV, Black KL. Overexpression of alpha4 chain-containing laminins in human glial tumors identified by gene microarray analysis. *Cancer Res*. 2001 Jul; 61(14): 5601-10.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007 Aug; 114(2): 97-120. doi 10.1007/s00401-007-0243-4. Epub 2007 Jul 6.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016 Jun; 131(6): 803-20. doi 10.1007/s00401-016-1545-1. Epub 2016 May 9.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov; 193 (1): 265–75.

Lu D, Han C, Wu T. Microsomal prostaglandin E synthase-1 inhibits PTEN and promotes experimental cholangiocarcinogenesis and tumor progression. *Gastroenterology*. 2011 Jun;140(7): 2084-94. doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.056. Epub 2011 Feb 24.

Mahesparan R, Tysnes BB, Edvardsen K, Haugeland HK, Cabrera IG, Lund-Johansen M, Engebraaten O, Bjerkvig R. Role of high molecular weight extracellular matrix proteins in glioma cell migration. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1997 Apr; 23(2): 102-12.

Mak M, Spill F, Kamm RD, Zaman MH. Single-Cell Migration in Complex Microenvironments: Mechanics and Signaling Dynamics. *J Biomech Eng*. 2016 Feb; 138(2): 021004. doi:10.1115/1.4032188.

Maltseva DV, Rodin SA. Laminins in Metastatic Cancer. *Mol Biol*. 2018 Apr; 52(3): 350-371. doi: 10.1134/s0026893318030093.

Malchinkhuu E, Sato K, Maehama T, Mogi C, Tomura H, Ishiuchi S, Yoshimoto Y, Kurose H, Okajima F. S1P(2) receptors mediate inhibition of glioma cell migration through Rho signaling pathways independent of PTEN. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Feb; 366(4): 963-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.12.054. Epub 2007 Dec 26.

Massoumi R, Nielsen CK, Azemovic D, Sjolander A. Leukotriene D4-induced adhesion of Caco-2 cells is mediated by prostaglandin E2 and upregulation of alpha2beta1-integrin. *Exp Cell Res*. 2003 Oct; 289(2): 342-51.

Malric L, Monferran S, Guilhodes J, Boyrie S, Dahan P, Skuli N, Sesen J, Filleron T, Kowalski-Chauvel A, Moyal ECJ, Toulas C, Lemarié A. Interest of integrins targeting in glioblastoma according to tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: an update. *Oncotarget*. 2017 Oct; 8(49): 86947-86968. doi: 10.18632/oncotarget.20372.

Marshall OJ. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*. 2004 Oct; 20(15): 2471-2. Epub 2004 Apr 8.

Mattila S, Tuominen H, Koivukangas J, Stenbäck F. The terminal prostaglandin synthases mPGES1, mPGES2, and cPGES are all overexpressed in human gliomas. *Neuropathology*. 2009 Apr; 29(2): 156-65. doi: 10.1111/j.1440-1789.2008.00963.x

Matsuo M, Yoshida N, Zaitzu M, Ishii K, Hamasaki Y. Inhibition of human glioma cell growth by a PHS-2 inhibitor NS398, and a prostaglandin E receptor subtype EP1 – selective antagonist, SC51089. *J Neurooncol*. 2004 Feb; 66(3): 285-92.

McCarthy BJ, Kruchko C, Central Brain Tumor Registry of the United States. Consensus Conference on Cancer Registration of Brain and Central Nervous System Tumors. *Neuro Oncol*. 2005 Apr; 7(2): 196-201. doi 10.1215/S115285170400050X

Mohan S, Ahmad AS, Glushakov AV, Chambers C, Doré S. Putative role of prostaglandin receptor in intracerebral hemorrhage. *Front Neurol*. 2012 Oct; 3:145. doi: 10.3389/fneur.2012.00145.eCollection 2012.

Monjazeb AM, High KP, Koumenis C, Chiltron FH. Inhibitors of arachidonic acid metabolism act synergistically to signal apoptosis in neoplastic cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005 Dec; 73(6): 463-74. Epub 2005 Sep 16. doi:10.1016/j.plefa.2005.07.009

New P. Cyclooxygenase in the treatment of glioma: its complex role in signal transduction. *Cancer Control*. 2004 May-Jun; 11(3): 152-64. doi: 10.1177/107327480401100303

Nobes CD, Hall A. Rho, Rac, and Cdc42 regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 1995 Apr; 81(1): 53-62. doi: 10.1016/0092-8674(95)90370-4

Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2013 Feb; 19(4): 764-72. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002. Epub 2012 Dec 3.

Oliver L, Olivier C, François MV. Prostaglandin E2 plays a major role in glioma resistance and progression. *Translational Cancer Research*. 2016 Nov; 5(6). doi: 10.21037/tcr.2016.11.20

Panagopoulos AT, Gomes RN, Almeida FG, Souza FC, Veiga JCE, Nicolaou A, Colquhoun A. The prostanoid pathway contains potential prognostic markers for glioblastoma. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. 2018 Jul; 137: 52-62. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2018.06.003. Epub 2018 Jun 30.

Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Science*. 2002 Oct; 115: 3861-3863. doi: 10.1242/jcs.00059

Payner T, Leaver HA, Knapp B, Whittle IR, Trifan OC, Miller S, Rizzo MT. Microsomal prostaglandin E synthase-1 regulates human glioma cell growth via prostaglandin E(2)-dependent activation of type II protein kinase A. *Mol Cancer Ther*. 2006 Jul; 5(7):1817-26.

Pencheva N, de Gooijer MC, Vis DJ, Wessels LFA, Würdinger T, van Tellingen O, Bernards R. Identification of a Druggable Pathway Controlling Glioblastoma Invasiveness. *Cell Rep*. 2017 Jul; 20(1): 48-60. doi 10.1016/j.celrep.2017.06.036.

Peppelenbosch MP, Tertoolen LG, Hage WJ, de Laat SW. Epidermal growth factor-induced actin remodeling is regulated by 5-lipoxygenase and cyclooxygenase products. *Cell*. 1993 Aug; 74(3): 565-75.

Pereira ALA, Veras SSL, Silveira EJD, Seabra FRG, Pinto LP, Souza LB, Freitas RA. O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteínas em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. *Rev. Bras.*

Otorrinolaringol. 2005 Jan/Feb; 71(1): 81-6. doi: 10.1590/S0034-72992005000100014

Pokorná E, Jordan PW, O'Neill CH, Zicha D, Gilbert CS, Veselý P. Actin cytoskeleton and motility in rat sarcoma cell populations with different metastatic potential. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1994; 28(1): 25-33. doi: 10.1002/cm.970280103

Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003 Feb; 112 (4): 453-65. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00120-x

Prayson RA, Castilla EA, Vogelbaum MA, Barnett GH. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by immunohistochemistry in glioblastoma multiforme. *Ann Diagn Pathol*. 2002 Jun; 6(3): 148-53. doi: 10.1053/adpa.2002.33900

Qin Y, Rodin S, Simonson OE, Hollande F. Laminis and cancer stem cells: Partners in crime? *Semin Cancer Biol*. 2017 Aug; 45: 3-12. doi: 10.1016/j.semcancer.2016.07.004. Epub 2016 Aug 1.

Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol*. 2004 Jan; 265(1): 23-32. doi: 10.1016/j.ydbio.2003.06.003

Rall JM, Mach SA, Dash PK. Intrahippocampal infusion of a cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates memory acquisition in rats. *Brain Res*. 2003 Apr; 968(2): 273-6. doi: 10.1016/s0006-8993(03)02248-0

Ramis G, Thomàs-Moyà E, Fernández SM, Rodríguez J, Villalonga P. EGFR inhibition in glioma cells modulates Rho signaling to inhibit cell motility and invasion and cooperates with temozolomide to reduce cell growth. *PLoS One*. 2012; 7(6): e38770. doi: 10.1371/journal.pone.0038770. Epub 2012 Jun 6.

Ramos, KL. Comparative analysis of the spatial distribution of molecules related to migration and invasion in a rat brain tumor *in vivo*. [Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2007.

Rasmussen R. Quantification on the LightCycler. Rapid cycle real-time PCR, methods and applications. Springer Press 2011. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-59524-0_3

Reardon DA, Fink KL, Mikkelsen T, Cloughesy TF, O'Neill A, Plotkin S, Glantz M, Ravin P, Raizer JJ, Rich KM, Schiff D, Shapiro WR, Burdette-Radoux S, Dropcho EJ, Wittemer SM, Nippgen J, Picard M, Nabors LB. Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*. 2008 Dec; 26(34): 5610-7. doi: 10.1200/JCO.2008.16.7510. Epub 2008 Nov 3.

Roos A, Ding Z, Loftus JC, Tran NL. Molecular and Microenvironmental Determinants of Glioma Stem-Like Cell Survival and Invasion. *Front Oncol*. 2017 Jun; 7:120. doi: 10.3389/fonc.2017.00120. eCollection 2017.

Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res.* 2009 Apr; 50 Suppl: S29-34. doi: 10.1194/jlr.R800042-JLR200.

Ruan D, So SP. Prostaglandin E2 produced by inducible COX-2 and mPGES-1 promoting cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Life Sci.* 2014 Oct; 116(1):43-50. doi: 10.1016/j.lfs.2014.07.042. Epub 2014 Aug 17.

Salhia B, Tran NL, Chan A, Wolf A, Nakada M, Rutka F, Ennis M, McDonough WS, Berens ME, Symons M, Rutka JT. The guanine nucleotide exchange factors trio, Ect2, and Vav3 mediate the invasive behavior of glioblastoma. *Am J Pathol.* 2008 Dec; 173(6): 1828-38. doi: 10.2353/ajpath.2008.080043. Epub 2008 Nov 13.

Sampson CJ, Valanne S, Fauvarque MO, Hulmark D, Ramet M, Williams MJ. The RhoGEF Zizimin-related acts in the Drosophila cellular immune response via the Rho GTPases Rac2 and Cdc42. *Dev Comp Immunol.* 2012 Sep; 38 (1): 160-8. doi: 10.1016/j.dci.2012.05.004. Epub 2012 May 23.

Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 2004 Sep; 56(3): 387-437. doi: 10.1124/pr.56.3.3

Schavartz I, Seger D, Shaltiel S. Vitronectin. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999 May; 31(5): 539-44. doi:10.1016/s1357-2725(99)00005-9

Seo MJ, Oh DK. Prostaglandin synthases: Molecular characterization and involvement in prostaglandin biosynthesis. *Prog Lipid Res.* 2017 Apr; 66: 50-68. doi: 10.1016/j.plipres.2017.04.003. Epub 2017 Apr 7.

Senger DL, Tudan C, Guiot MC, Mazzoni IE, Mazzoni IE, Molenkamp G, LeBlanc R, Antel J, Olivier A, Snipes GJ, Kaplan DR. Suppression of Rac activity induces apoptosis of human glioma cells but not normal human astrocytes. *Cancer Res.* 2002 Apr; 62(7): 2131-40.

Serachi, FO. Análise do efeito das ciclooxygenases na expressão e atividade de proteínas de resistência a múltiplas drogas (MDR e MRPs) em glioma humano. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Serezani CH, Kane S, Medeiros AI, Cornett AM, Kim SH, Marques MM, Lee SP, Lewis C, Bourdonnay E, Ballinger MN, White ES, Peters-Golden M. PTEN directly activates the actin depolymerization factor cofilin-1 during PGE2-mediated inhibition of phagocytosis of fungi. *Sci Signal.* 2012 Feb; 5(210): ra12. doi: 10.1126/scisignal.2002448.

Shono T, Tofilon PJ, Bruner JM, Owolabi O, Lang FF. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res.* 2001 Jun; 61(11): 4375-81.

Sminia P, Stoter TR, van der Valk P, Elkhuizen PH, Tadema TM, Kuipers GK, Vandertop WP, Lafleur MV, Slotman BJ. Expression of cyclooxygenase-2 and

epidermal growth factor receptor in primary and recurrent glioblastoma multiforme. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005 Oct; 131 (10): 653-61. doi:10.1007/s00432-005-0020-5. Epub 2005 Oct 20.

Sousa JF, Di Cristofaro LF, Serafim RB, Netto RP, Souza FO, Soares, CP, Valente V. A resistência das células T98G e U87MG à temozolamida está correlacionada com a expressão de genes de reparo de DNA. *Revista de Ciências Farmacêuticas Aplicadas*. 2015; 36 (2): 213–18.

Souza, FC. Eicosanoides como novos alvos terapeuticos no tratamento de glioblastoma humano. [Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Stevanatto, PB. Análise do papel das ciclooxigenases 1 e 2 na migração da linhagem celular de glioma humano U251-MG. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Stupp R, Reni M, Gatta G, Mazza E, Vecht C. Anaplastic astrocytoma in adults. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 2007; 63(1): 72-80. doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.03.003

Svensmark JH, Brakebusch C. Rho GTPases in cancer: friend or foe? *Oncogene*. 2019 Dec; 38(50): 7447-7456. doi: 10.1038/s41388-019-0963-7. Epub 2019 Aug 19.

Tafari M, Di Vito M, Frati A, Pellegrini L, De Santis E, Sette G, Eramo A, Sale P, Mari E, Santoro A, Raco A, Salvati M, De Maria R, Russo MA. Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma. *J Neuroinflammation*. 2011 Apr; 8:32. doi: 10.1186/1742-2094-8-32.

Tamura M, Gu J, Takino T, Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas. *Cancer Res*. 1999 Jan; 59(2): 442-9.

Tang J, Xiao W, Li Q, Deng Q, Chu X, Chen Y, Pan D, Fu J. A cyclooxygenase-2 inhibitor reduces vascular wall thickness and ameliorates cognitive impairment in a cerebral small vessel diseases rat model. *Curr Alzheimer Res*. 2015; 12(7): 704-10. doi: 10.2174/1567205012666150710104924

Teather LA, Packard MG, Bazan NG. Post-training cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition impairs memory consolidation. *Learn Mem*. 2002 Jan-Feb; 9(): 41-7. doi: 10.1101/lm.43602

Terzuoli E, Costanza F, Ciccone V, Ziche M, Morbidelli L, Donnini S. mPGES-1 as a new target to overcome acquired resistance to gefitinib in non-small cell lung cancer cell lines. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2019 Aug; 143: 106344. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2019.106344. Epub 2019 Jun 15.

Tran NL, McDonough WS, Savitch BA, Fortin SP, Winkles JA, Symons M, Nakada M, Cunliffe HE, Hostetter G, Hoelzinger DB, Rennert JL, Michaelson JS, Burkly LC,

Lipinski CA, Loftus JC, Mariani L, Berens ME. Increased fibroblast growth factor-inducible 14 expression levels promote glioma cell invasion via Rac1 and nuclear factor-kappaB and correlate with poor patient outcome. *Cancer Res.* 2006 Oct; 66(19): 9535-42. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0418

Toscano CD, Prabhu VV, Langenbach R, Becker KG, Bosetti F. Differential gene expression patterns in cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 deficient mouse brain. *Genome Biol.* 2007; 8(1): R14. doi: 10.1186/gb-2007-8-1-r14.

Tysnes BB, Mahesparan R, Thorsen F, Haugland HK, Porwol T, Enger PO, Lund-Johansen M, Bjerkvig R. Laminin expression by glial fibrillary acidic protein positive cells in human gliomas. *Int J Dev Neurosci.* 1999 Aug-Oct; 17(5-6): 531-9. doi: 10.1016/s0736-5748(99)00055-6

Uhm JH, Dooley NP, Kyritsis AP, Rao JS, Gladson CL. Vitronectin, a glioma-derived extracellular matrix protein, protects tumor cells from apoptotic death. *Clin Cancer Res.* 1999 Jun; 5(6): 1587-94.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998; 38: 97-120. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97

Vehlow A, Cordes N. Invasion as target for therapy of glioblastoma multiforme. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Dec; 1836(2): 236-44. doi: 10.1016/j.bbcan.2013.07.001. Epub 2013 Jul 25.

Venstrom KA, Reichardt LF. Extracellular matrix. 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. *FASEB J.* 1993 Aug; 7(11): 996-1003. doi 10.1096/fasebj.7.11.8370483

Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahan A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 2010 Jan; 17(1): 98-110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020.

Walker MP, Zhang M, Le TP, Wu P, Lainé M, Greene GL. Rac3 is a pro-migratory co-activator of ER α . *Oncogene.* 2011 Apr; 30(17): 1984-94. doi: 10.1038/onc.2010.583. Epub 2011 Jan 10.

Wang D, Buchanan FG, Wang H, Dey SK, DuBois RN. Prostaglandin E2 enhances intestinal adenoma growth via activation of the Ras-mitogen-activated protein kinase cascade. *Cancer Res* 2005; 65:1822–1829

Wang MT, Honn KV, Nie D. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Dec; 26(3-4): 525-34.

Wang SD, Rath P, Lal B, Richard JP, Li Y, Goodwin CR, Laterra J, Xia S. EphB2 receptor controls proliferation/migration dichotomy of glioblastoma by interacting with focal adhesion kinase. *Oncogene*. 2012 Dec; 31(50): 5132-43. doi: 10.1038/onc.2012.16. Epub 2012 Feb 6.

Wang X, Baek SJ, Eling T. COX inhibitors directly alter gene expression: role in cancer prevention? *Cancer Metastasis Rev*. 2011 Dec; 30(3-4): 641-57. doi: 10.1007/s10555-011-9301-4.

Wang Z. Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor by G protein-coupled receptors: recent progress, challenges and future research. *Int J Mol Sci*. 2016 Jan; 17(1). doi: 10.3390/ijms17010095.

Watanabe T, Nakamura M, Kros JM, Burkhard C, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Phenotype versus genotype correlation in oligodendrogliomas and low-grade diffuse astrocytomas. *Acta Neuropathol*. 2002 Mar; 103(3): 267-75. Epub 2001 Nov 22. doi: 10.1007/s004010100464.

Wen PY, Huse JT. 2016 World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2017 Dec; 23 (6, Neuro-oncology):1531-1547. doi: 10.1212/CON.0000000000000536.

Wu H, Li J, Xu D, Jv D, Meng X, Qiao P, Cui T, Shi B. The 37-kDa laminin receptor precursor regulates the malignancy of human glioma cells. *Cell Biochem Funct*. 2016 Oct; 34 (7): 516-521. doi: 10.1002/cbf.3225.

Xu J, Mosher DF (2017). Chapter 2 Fibronectin and Other Adhesive Glycoproteins.

Yap L, Tay HG, Nguyen MTX, Tjin MS, Tryggvason K. Laminins in Cellular Differentiation. *Trends Cell Biol*. 2019 Dec; 29(12): 987-1000. doi: 10.1016/j.tcb.2019.10.001. Epub 2019 Nov 5.

Yang C, Sorokin A. Upregulation of fibronectin expression by COX-2 is mediated by interaction with ELMO1. *Cell Signal*. 2011 Jan; 23(1):99-104. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.08.008. Epub 2010 Aug 21.

Yi Y, Hsieh IY, Huang X, Li J, Zhao W. Glioblastoma Stem-Like Cells: characteristics, microenvironment, and therapy. *Front Pharmacol*. 2016 Dec; 7: 477. doi: 10.3389/fphar.2016.00477. Epub 2016 Dec 7.

Zhou J, et al. Interactions between prostaglandin E2, liver receptor homologue-1, and aromatase in breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65:657–663.