

---

FABRÍCIO DE ALMEIDA SOUZA VILAS BOAS

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE GRÂNULOS DE ESTRESSE NA RESPOSTA  
A AGENTES ANTINEOPLÁSICOS EM LINHAGENS CELULARES DE TUMORES  
CEREBRAIS**

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Novembro/2015

---

---

FABRÍCIO DE ALMEIDA SOUZA VILAS BOAS

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE GRÂNULOS DE ESTRESSE NA RESPOSTA A AGENTES ANTINEOPLÁSICOS EM LINHAGENS CELULARES DE TUMORES CEREBRAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Lucíola da Silva Barcelos

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

Novembro/2015



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE  
FABRÍCIO DE ALMEIDA SOUZA VILAS BOAS**

147/2015  
entrada  
1º/2011  
2011667571

Às **nove horas** do dia **27 de novembro de 2015**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE GRÂNULOS DE ESTRESSE NA RESPOSTA A AGENTES ANTINEOPLÁSICOS EM LINHAGENS CELULARES DE TUMORES CEREBRAIS**", requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Luciola da Silva Barcelos**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Luciola da Silva Barcelos	UFMG	APROVADO
Dra. Marilene Hohmuth Lopes	USP	Aprovado
Dr. Sílvio Marques Zanata	UFPR	Aprovado
Dra. Viviane Alves Gouveia	UFMG	Aprovado
Dra. Luciene Bruno Vieira	UFMG	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado: Aprovado  
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 27 de novembro de 2015.**

Dra. Luciola da Silva Barcelos (Orientadora) Luciola da Silva Barcelos  
Dra. Marilene Hohmuth Lopes Marilene Hohmuth Lopes  
Dr. Sílvio Marques Zanata Sílvio Marques Zanata  
Dra. Viviane Alves Gouveia Viviane Alves Gouveia  
Dra. Luciene Bruno Vieira Luciene Bruno Vieira

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Profa. Cristina Guatimosim Fonseca  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular/ICB / UFMG

Cristina Guatimosim Fonseca

---

“Nada é impossível  
para aquele que  
persiste”

Alexandre, o Grande

## DEDICATÓRIA

---

*À minha mãe, que me deu a vida e me ensinou, com sua coragem e força, a ser o homem que sou. Que, de onde ela estiver, continue a olhar por mim e me dar inspiração para trabalhar, continuar sempre em frente e nunca desistir.*

---

*À minha avó, que foi exemplo de vida, sabedoria e força. Não mais presente, porém nunca esquecida e sempre ao meu lado.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me ajudado a ter coragem para seguir em frente mesmo quando tudo parecia impossível.

À minha mãe, que me apoiou para que eu seguisse meus sonhos e sacrificou-se para que eu pudesse ter o que ela não teve. Você sempre estará ao meu lado. Sempre te amarei.

À minha avó, que foi mãe duas vezes. Ensinou-me a ter fé e a acreditar que tudo é possível para aquele que trabalha e persevera. Obrigado por tudo. Te amo, vovó!

À minha noiva Flávia, por acreditar em mim, me apoiar nessa jornada. Pela compreensão, pelo amor, por estar ao meu lado em todos os momentos difíceis e por dizer sempre para nunca desistir. Eu te amo.

À professora Lucíola, minha orientadora, por acreditar em meu potencial e por abrir as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar este trabalho. Pelos conhecimentos compartilhados, discussões, paciência e por me ajudar a me tornar um profissional melhor. Muito obrigado.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Angiogênese (Brígida, Alan, Jousie, Luíza, Barbosa, Ceotto, Peubla, Camila, Lucas, Polly, Celso, Simone, Alejandra, Suzanne e outros) por me acolherem e me ajudarem sempre que precisei. Muito obrigado. À professora Sílvia, por me receber no laboratório para que eu pudesse executar minhas atividades. Obrigado.

Ao professor Aristóbolo, pelos conhecimentos compartilhados e por toda a sua colaboração e inestimável contribuição, sem as quais esse trabalho não seria possível. Agradeço de coração.

À professora Landa, por todo apoio nos experimentos de *western blot*, pelos conhecimentos compartilhados, pelas discussões e por disponibilizar o seu laboratório e seus alunos para me auxiliar. Meu mais sincero agradecimento.

À Juliana, pelo apoio nos experimentos, pelas conversas, paciência e amizade. Valeu, Ju!

À Kátia e Grazi, por todo o apoio nos experimentos, mesmo na correria e com tanto trabalho para fazerem, puderam dispor de tempo para me ajudar quando mais precisei. Obrigado mesmo!

À professora Milene e ao professor Anílton, por cederem infraestrutura de seu laboratório para que eu realizasse meus experimentos, este apoio foi inestimável. Agradeço também aos membros do Laboratório de Apoptose por todo o suporte. Muito obrigado a todos.

À professora Fabíola e às suas alunas, pelo auxílio com o equipamento “Floid”, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho. Obrigado.

À Carol, por toda a ajuda com os experimentos de qPCR, pelos ensinamentos e por dispor de seu tempo. Muito obrigado!

Ao professor Dawidson, por ceder seu tempo e de seus alunos para me auxiliar em meus experimentos. Muito obrigado.

Aos professores Mauro e Flávio, por cederem toda infraestrutura de seu laboratório para que eu realizasse meus experimentos. Aos membros do Laboratório Imunofar, também agradeço o apoio. Muito obrigado.

À professora Daniele, por permitir que eu usasse a infraestrutura de seu laboratório para realizar meus experimentos. Obrigado

À Ilma e à Gil, pelo apoio técnico, pela paciência e por toda a ajuda. Muito obrigado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, pelo apoio e pela oportunidade de me aperfeiçoar e me tornar um profissional melhor.

Aos professores, pelos conhecimentos adquiridos.

A todos que de algum modo colaboraram pra que esse trabalho fosse possível.

À CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

<b>RESUMO</b> .....	VII
<b>ABSTRACT</b> .....	VIII
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XII
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	XIII
<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 – CÂNCER .....	16
1.1.1 – Aspectos gerais e epidemiologia .....	16
1.1.2 – Aspectos moleculares .....	18
1.2 – TUMORES CEREBRAIS .....	22
1.2.1 – Aspectos gerais dos tumores cerebrais .....	22
1.2.2. – Aspectos moleculares dos gliomas malignos .....	25
1.3 – ABORDAGENS TERAPÊUTICAS .....	29
1.3.1 – Ressecção cirúrgica .....	29
1.3.2 – Químio e radioterapia .....	29
1.3.3 – Outras terapias .....	33
1.4 – INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO, RESPOSTA INTEGRADA AO ESTRESSE E OS GRÂNULOS DE ESTRESSE .....	34
1.4.1 – Iniciação da Tradução.....	34
1.4.2 – A Resposta Integrada ao Estresse .....	36
1.4.3 – Componentes e formação de Grânulos de Estresse .....	38
1.4.4 – Sinalização celular e SGs .....	41
1.4.5 – Envolvimento de SGs na resistência a agentes atitumorais .....	43
<b>2 – JUSTIFICATIVA</b> .....	46
<b>3 – OBJETIVOS</b> .....	48
3.1 – OBJETIVO GERAL .....	48
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	48

<b>4 – MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	49
4.1 – CULTIVO CELULAR .....	49
4.2 – AGENTES ANTINEOPLÁSICOS .....	50
4.3 – AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	50
4.4. – <i>WESTERN BLOT</i> .....	51
4.5 – DETECÇÃO DE GRÂNULOS DE ESTRESSE .....	52
<b>4.5.1 – Inibição da formação de Grânulos de Estresse</b> .....	53
4.5.1.1 – Plasmídeo .....	53
4.5.1.2 – Silenciamento de RNA .....	54
4.6 – PCR EM TEMPO REAL (qPCR) .....	55
4.7. – AVALIAÇÃO DA APOPTOSE .....	56
4.8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	57
<b>5 - RESULTADOS</b> .....	58
5.1 – AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	58
5.2 – AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR .....	61
5.3 – AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE GRÂNULOS DE ESTRESSE .....	65
5.4 – AVALIAÇÃO DO PAPEL DE EIF2A NA FORMAÇÃO DE GRÂNULOS DE ESTRESSE.....	74
<b>5.4.1 – Avaliação do efeito da transfecção com eIF2<math>\alpha</math><sup>DN</sup> na fosforilação de eIF2<math>\alpha</math></b> -	78
<b>5.4.2 – Avaliação do efeito da transfecção com eIF2<math>\alpha</math><sup>DN</sup> na formação dos Grânulos de Estresse</b> .....	81
<b>5.4.3 – Avaliação do efeito da transfecção com eIF2<math>\alpha</math><sup>DN</sup> na viabilidade e morte celular</b> .....	88
5.5 – UTILIZAÇÃO DE RNA DE INTERFERÊNCIA COMO FERRAMENTA PARA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE GRÂNULOS DE ESTRESSE .....	92
<b>5.5.1 – Seleção do siRNA</b> .....	93
<b>5.5.2 – Efeito da inibição da expressão de G3BP1 na formação de SGs</b> .....	94

*Sumário*

---

<b>5.5.3 – Avaliação do efeito da transfecção com siRNAs na viabilidade celular da linhagem U87MG</b> -----	100
<b>6 – DISCUSSÃO</b> -----	101
<b>7 – CONCLUSÕES</b> -----	108
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----	109

## RESUMO

Os gliomas malignos são um dos mais letais tumores cerebrais. Possuem alta recorrência, são refratários à maior parte dos tratamentos-padrão e, mesmo com cuidados intensivos, o paciente geralmente evolui a óbito em 15 meses. O tratamento-padrão atual consiste em cirurgia, seguida de radioterapia e administração de agentes antineoplásicos. Devido à frequente quimiorresistência, entretanto, é imprescindível a busca por novos alvos terapêuticos, com o objetivo de maximizar os efeitos dos tratamentos sem, contudo, prejudicar o paciente. Quando a célula é exposta a condições hostis (como, por exemplo, hipóxia, escassez de nutrientes, e drogas), ocorre o bloqueio da síntese proteica geral. Alguns dos mRNAs não traduzidos, então, ligam-se a proteínas específicas para formar Grânulos de Estresse (SGs), os quais estão envolvidos na regulação da tradução de mRNAs específicos. Interferir no processo de formação de SGs, portanto, pode ser uma estratégia efetiva de se sensibilizar células de gliomas. Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi avaliar a participação de SGs na resistência de células de glioma [linhagens C6 (glioma de rato) e U87MG (glioblastoma humano)] a agentes antineoplásicos. Para isso, utilizamos duas abordagens. A primeira foi o uso de um plasmídeo contendo o dominante negativo para a subunidade alfa do fator de iniciação eucariótico 2 (eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ ) como forma de reduzir a fosforilação de eIF2 $\alpha$ , que é um dos principais sinalizadores de estresse celular e ativador da formação dos SGs. A segunda abordagem foi o silenciamento, por RNA de interferência, do gene da proteína G3BP1, um dos principais componentes nucleadores dos SGs. Demonstramos que as drogas Bortezomibe, Cisplatina e Etoposídeo estimulam a fosforilação de eIF2 $\alpha$  e induzem a formação de SGs em ambas as linhagens celulares de gliomas. Além disso, ao utilizar o plasmídeo contendo eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ , a fosforilação de eIF2 $\alpha$  foi reduzida em cerca de 30% e a capacidade das células de formar SGs foi significativamente reduzida após exposição aos agentes antineoplásicos. Isso foi associado à maior redução da viabilidade celular e à indução de morte por apoptose. A outra abordagem, utilizando siRNA para a proteína nucleadora G3BP1, foi capaz de reduzir a expressão dessa proteína em cerca de 50% e a capacidade das células da linhagem humana de formar SGs foi também significativamente reduzida. Isso foi associado à maior redução na viabilidade das células a um de três siRNA testados. Os nossos dados sugerem que os Grânulos de Estresse (SGs) possuem um importante papel na resistência de células de tumores cerebrais a agentes antineoplásicos.

Palavras-chave: Grânulos de Estresse, quimioterapia, eIF2.

**ABSTRACT**

Malignant gliomas are one of the most lethal types of brain tumors. Even after surgical resection, have high risk of recurrence, are refractory to most known treatments and, even after intensive care, the patient usually dies within 12 to 15 months. Standard treatment consists of surgery, followed by radiation therapy and chemotherapy with antineoplastic agents. Due to frequent chemoresistance, the study of new therapeutic targets is paramount in order to maximize the effects of treatments without harming the patient. When the cells are exposed to hostile conditions (i.e., hypoxia, lack of nutrients and drugs), the translation of messenger RNA (mRNA) is stopped. The polysome-free untranslated mRNA will then bind to specific proteins to assemble stress granules (SG) which are involved in regulating the translation of specific mRNA. Interfering with SG formation process, therefore, may be an effective strategy to sensitize glioma cells. Thus, the aim of this study was to evaluate the role of SG in glioma cell resistance [cell lines C6 (rat glioma) and U87MG (human glioblastoma)] to antineoplastic agents. For this, we used two approaches. The first one was the use of a plasmid containing a dominant negative form of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ ), in order to reduce eIF2 $\alpha$  phosphorylation levels, which is one of the main sensors of cell stress and subsequent activation of the assembly of SG. The second approach was the use of the RNA interference technique for silencing the G3BP1 expression, a major component of SG. We demonstrated that Bortezomibe, Cisplatin and Etoposide stimulate phosphorylation eIF2 $\alpha$  and induce the formation of SG in both glioma cell lines. Furthermore, by using the plasmid containing eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ , eIF2 $\alpha$  phosphorylation was reduced by about 30% and the ability of cells to form SG was significantly reduced following exposure to the anticancer agents. This was associated with greater reduction in cell viability and induction of apoptosis. The approach using siRNA to impairing G3BP1 expression was able to reduce the protein levels by about 50% and the ability of U87MG cells of forming SG was also significantly reduced. This was associated with greater reduction in cell viability of cells exposed to at least one of three siRNA tested. Our data suggest that stress granules play an important role in the resistance of brain tumor cells to antineoplastic agents.

**Keywords:** Glioma, Stress granules, Chemotherapy, eIF2 $\alpha$

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> – Origens dos tumores cerebrais da linhagem glial -----	25
<b>Figura 2</b> – Vias moleculares envolvidas na patogênese dos gliomas -----	28
<b>Figura 3</b> – Mecanismo geral da iniciação da tradução -----	35
<b>Figura 4</b> – A fosforilação de eIF2 $\alpha$ por cinases afeta a tradução e leva a formação de Grânulos de Estresse -----	37
<b>Figura 5</b> – Fases da formação de Grânulos de Estresse (SGs)-----	41
<b>Figura 6</b> – Perfil de citotoxicidade de agentes antineoplásicos sobre a linhagem C6 (glioma de rato)-----	59
<b>Figura 7</b> – Perfil de citotoxicidade de agentes antineoplásicos sobre a linhagem U87MG (glioblastoma humano)-----	60
<b>Figura 8</b> – Avaliação do mecanismo de morte celular nas células da linhagem C6 -----	62
<b>Figura 9</b> – Células da linhagem C6 sofrem apoptose quando expostas aos agentes antineoplásicos em estudo -----	63
<b>Figura 10</b> – Avaliação do mecanismo de morte celular nas células da linhagem U87MG --	64
<b>Figura 11</b> – Células da linhagem U87MG sofrem apoptose quando expostas aos agentes antineoplásicos em estudo -----	65
<b>Figura 12</b> – Avaliação da expressão dos componentes de SGs, G3BP1 e FMR1 em células da linhagem C6 e U87MG -----	66
<b>Figura 13</b> – Células HeLa expostas ao arsenito de sódio (ASN) formam foci da proteína G3BP1, indicando formação de Grânulos de Estresse -----	67
<b>Figura 14</b> – Células da linhagem C6 expostas ao arsenito de sódio formam Grânulos de Estresse -----	68
<b>Figura 15</b> – Células da linhagem C6 expostas ao Bortezomibe formam Grânulos de Estresse -----	70
<b>Figura 16</b> – Células da linhagem C6 expostas a Cisplatina formam Grânulos de Estresse --	71
<b>Figura 17</b> – Células da linhagem C6 expostas ao Etoposídeo formam Grânulos de Estresse	72
<b>Figura 18</b> – Células da linhagem U87MG expostas a agentes antitumorais iniciam a formação de Grânulos de Estresse -----	73
<b>Figura 19</b> – Avaliação da fosforilação de eIF2 $\alpha$ pelos agentes antineoplásicos em estudo --	74
<b>Figura 20</b> – Padronização da transfecção de plasmídeo por PEIMax na linhagem C6 em placa de 24 poços-----	76

*Lista de Figuras*

<b>Figura 21</b> – Padronização da transfecção de plasmídeo por PEIMax na linhagem C6 em placa de 6 poços -----	76
<b>Figura 22</b> – Padronização da transfecção de plasmídeo por PEIMax na linhagem U87MG em placa de 24 poços -----	77
<b>Figura 23</b> – Padronização da transfecção de plasmídeo por PEIMax na linhagem U87MG em placa de 6 poços -----	77
<b>Figura 24</b> – Avaliação do efeito da transfecção com o plasmídeo contendo eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ na fosforilação de eIF2 $\alpha$ em células da linhagem C6 -----	79
<b>Figura 25</b> – Avaliação do efeito da transfecção com o plasmídeo contendo eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ na fosforilação de eIF2 $\alpha$ em células da linhagem U87MG -----	80
<b>Figura 26</b> – A transfecção com eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ reduz a formação de Grânulos de Estresse em células da linhagem C6 expostas ao Bortezomibe-----	82
<b>Figura 27</b> – A transfecção com eIF2 $\alpha^{\text{dn}}$ reduz a formação de Grânulos de Estresse em células da linhagem C6 expostas a Cisplatina -----	83
<b>Figura 28</b> – A transfecção com eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ reduz a formação de Grânulos de Estresse em células da linhagem C6 expostas ao Etoposídeo-----	84
<b>Figura 29</b> – A transfecção com eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ reduz a formação de Grânulos de Estresse em células da linhagem U87MG expostas ao Bortezomibe -----	85
<b>Figura 30</b> – A transfecção com eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ reduz a formação de Grânulos de Estresse em células da linhagem U87MG expostas a Cisplatina-----	86
<b>Figura 31</b> – A transfecção com eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ reduz a formação de Grânulos de Estresse em células da linhagem U87MG expostas ao Etoposídeo -----	87
<b>Figura 32</b> – Células das linhagens C6 e U87MG transfectadas com eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ tem sua viabilidade celular reduzida quando expostas a agentes antineoplásicos -----	89
<b>Figura 33</b> – Avaliação do efeito da transfecção com eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ na morte celular da linhagem C6 quando exposta a agentes antineoplásicos -----	90
<b>Figura 34</b> – Transfecção com eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ aumenta a apoptose em células da linhagem C6 após exposição aos agentes antineoplásicos-----	91
<b>Figura 35</b> – Avaliação da expressão da proteína pró-apoptótica BAX na linhagem C6 após transfecção com plasmídeo eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ e tratamento por 6 horas -----	92
<b>Figura 36</b> – Avaliação do silenciamento do gene de G3BP1 por RNA de interferência-----	93
<b>Figura 37</b> – Avaliação da expressão da proteína G3BP1 em células da linhagem U87MG transfectadas com siRNAs-----	94

*Lista de Figuras*

---

<b>Figura 38</b> – A transfecção com siRNAs reduz a formação de Grânulos de Estresse em células da linhagem U87MG -----	96
<b>Figura 39</b> – A transfecção com siRNAs reduz a formação de Grânulos de Estresse em células da linhagem U87MG expostas ao Bortezomibe -----	97
<b>Figura 40</b> – A transfecção com siRNAs reduz a formação de Grânulos de Estresse em células da linhagem U87MG expostas a Cisplatina -----	98
<b>Figura 41</b> – A transfecção com siRNAs reduz a formação de Grânulos de Estresse em células da linhagem U87MG expostas ao Etoposídeo -----	99
<b>Figura 42</b> – A transfecção com siRNAs altera a viabilidade celular quando associada ao tratamento com agentes antineoplásicos em células da linhagem U87MG -----	100

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> – Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária -----	17
<b>Tabela 2</b> – Primers usados nos experimentos de qPCR-----	56
<b>Tabela 3</b> – EC <sub>50</sub> de agentes antineoplásicos usados nas linhagens C6 e U87MG-----	60

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- **5-FU** – 5-Fluoracil.
- **AKT** – Proteína quinase B.
- **ATCC** – *American Tissue Culture Collection*.
- **ATP** – Adenosina trifosfato.
- **ARF** – Fator de ribosilação de ADP.
- **ASN** – Arsenito de Sódio.
- **BAX** – Proteína X associada à BCL-2.
- **BCL-2** – Proteína antiapoptótica.
- **BCL-XL** – Proteína XL associada à BCL.
- **BID** – Domínio BH3-interativo do agonista de morte.
- **BZM** – Bortezomibe.
- **Caspases** – Proteases aspartato-específica cisteíno-dependentes.
- **CDDP** – Cloreto de Cis-Di-amino-Di-platina (Cisplatina).
- **CDK** – Quinase dependente de ciclina.
- **CDKI** – Inibidor de quinase dependentes de ciclina.
- **CDNK2A** – Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A.
- **DMEM** – *Dulbecco's Modified Eagle's Media*.
- **DMSO** – Dimetilsulfóxido.
- **DN** – Dominante Negativo.
- **DNA** – Ácido desoxiribonucléico.
- **dNTPs** – desoxiribonucleotídeos.
- **E2F** – Fator de transcrição eucariótico.
- **EGF** – Fator de crescimento epidermal.
- **EGFR** – Receptor do Fator de Crescimento Epidermal.
- **eIF** – Fator de Iniciação da Tradução eu cariótico.
- **EMT** – Transição Epitelial-Mesenquimal.
- **ETO** – Etoposídeo.
- **FGF** – Fator de crescimento de fibroblasto.
- **FMR1** – Proteína do retardo mental da síndrome do X frágil 1.
- **FXR1** – Proteína relacionada a FMR1.
- **G3BP1** – Proteína de ligação a Ras ativada por GTPase 1.

*Lista de Abreviaturas e Síglas*

---

- **GAPDH** – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.
  - **GBM** – Glioblastoma multiforme.
  - **GCN2** – Controle geral não-derepressivo 2.
  - **GDP** – Guanosina Difosfato.
  - **GFAP** – Proteína fibrilar gliar ácida.
  - **GTP** – Guanosina Trifosfato.
  - **Gy** – Gray
  - **HDAC6** – Histona desacetilase 6.
  - **HRI** – Inibidor regulado por Heme.
  - **HSP90** – Proteína do Choque Térmico de 90kd.
  - **IL1 $\alpha$**  – Interleucina 1 $\alpha$ .
  - **INCA** – Instituto Nacional do Câncer José de Alencar.
  - **ISR** – Resposta Integrada ao Estresse.
  - **JNK** – Quinase c-Jun. N-terminal.
  - **MAPK** – Proteína quinase ativada por mitógeno.
  - **MDM2** – *Mouse double minute 2 homolog*.
  - **MDM4** – *Mouse double minute 4 homolog*.
  - **MGMT** – O-6-metilguanina-DNA metiltransferase.
  - **mRNA** – RNA mensageiro.
  - **mTOR** – Alvo de mamíferos para Rapamicina.
  - **NF $\kappa$ B** – Fator nuclear  $\kappa$ B.
  - **OMS** – Organização Mundial da Saúde.
  - **PABP** – Proteína de ligação a Poli-A.
  - **p14ARF** – Proteína 14 de leitura de janela alternativa.
  - **p16** – Proteína de 16kd.
  - **p21** – Proteína de 21kd.
  - **p53** – Proteína de 53kd.
  - **PDGF** – Fator de crescimento derivado das plaquetas.
  - **PI3K** – Fosfatidilinositol-3-quinase.
  - **PDGFR** – Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas.
  - **PERK** – Proteína Quinase do Retículo Endoplasmático semelhante à PKR.
  - **PKR** – Proteína Quinase R.
  - **PI** – Iodeto de Propídio.
  - **PTEN** – Homólogo de fosfatase e tensina.
-

*Lista de Abreviaturas e Siglas*

---

- **PUMA** – Modulador de apoptose ativado por p53.
- **RACK1** – Receptor para Quinase C ativada 1.
- **RAS** – Superfamília de GTPases.
- **RB** – Retinoblastoma.
- **RE** – Retículo endoplasmático.
- **RNA** – Ácido ribonucleico.
- **RNP** – Ribonucleoproteína.
- **ROCK** – Proteína quinase associada a Rho.
- **ROS** – Espécies reativas do oxigênio.
- **RT** – Radioterapia.
- **S51A** – Mutação de Serina para Alanina no Resíduo 51
- **SFB** – Soro fetal bovino.
- **siRNA** – Pequeno RNA de Interferência
- **SNC** – Sistema nervoso central.
- **STAT3** – Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3.
- **STR** – Estaurosporina.
- **T98** – Células de glioblastoma multiforme humano.
- **TCGA** – Atlas Genômico do Câncer.
- **TGF- $\beta$**  – Fator de crescimento transformador- beta.
- **TIA1** – Antígeno intracelular de célula-T 1.
- **TIAR** – Proteína relacionada a TIA1.
- **TKR** – Receptor Tirosina Quinase.
- **TMZ** – Temozolomida.
- **TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral-alfa.
- **TORC1 ou 2** – Complexo TOR 1 ou 2.
- **TRAF2** – Fator associado ao receptor de TNF 2.
- **TRAIL** – Ligante indutor de apoptose relacionado a TNF.
- **tRNA** – RNA transportador.
- **TTP** – Tristetraprolina.
- **U87MG** – Células de Glioblastoma Humano.
- **UFMG** – Universidade Federal de Minas Gerais.
- **VEGFA** – Fator de crescimento do endotélio vascular A.
- **VEGFR** – Receptor de fator de crescimento do endotélio vascular.

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 – CÂNCER

#### 1.1.1 – Aspectos gerais e epidemiologia

O termo **neoplasia**, literalmente, significa “processo de novo crescimento”, e o tecido originado denomina-se neoplasma. O termo **tumor** era originalmente usado para denominar o inchaço causado por inflamação, entretanto, essa denominação caiu em desuso e, atualmente, é utilizado como sinônimo de neoplasma. O termo **câncer**, por sua vez, é utilizado como sinônimo de tumor maligno como descrito mais detalhadamente na seção 1.1.2 (KUMAR *et al.*, 2013).

Em 2005, Breivik revisou diversos trabalhos acerca das origens e do desenvolvimento do câncer e apontou que três aspectos básicos se relacionam para a ocorrência dessa doença (BREIVIK, 2005):

- Tempo – A incidência do câncer aumenta com a idade do indivíduo e cerca de 40% da população dos países com alta expectativa de vida terão algum tipo de câncer durante a vida.
- Ambiente – Dados epidemiológicos demonstram que existe uma clara associação entre o desenvolvimento de tumores e fatores ambientais como fumo, dieta e radiação.
- Herança – Muitas alterações do código genético explicam o desenvolvimento do câncer e essas mutações podem ser herdadas aumentando a predisposição para o surgimento da doença.

De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (Iarc, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. O número de casos de câncer continuará aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em

---

## Introdução

países desenvolvidos se medidas preventivas não forem amplamente aplicadas. Estima-se que em 2030, a carga global será de 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INCA, 2014).

No Brasil, as estimativas para os anos de 2014 e 2015 apontaram para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) (INCA, 2014).

**Tabela 1 – Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária\* (INCA, 2014)**

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capitais		Estado		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	68.800	70,42	17.540	82,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.120	56,09	19.170	80,67
Colo do Útero	-	-	-	-	15.590	15,33	4.530	19,20
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	16,79	4.000	18,93	10.930	10,75	3.080	13,06
Cólon e Reto	15.070	15,44	4.860	22,91	17.530	17,24	5.650	23,82
Estômago	12.870	13,19	2.770	13,07	7.520	7,41	2.010	8,44
Cavidade Oral	11.280	11,54	2.220	10,40	4.010	3,92	1.050	4,32
Laringe	6.870	7,03	1.460	6,99	770	0,75	370	1,26
Bexiga	6.750	6,89	1.910	8,91	2.190	2,15	730	2,97
Esôfago	8.010	8,18	1.460	6,76	2.770	2,70	540	0,00
Ovário	-	-	-	-	5.680	5,58	2.270	9,62
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	410	5,72	880	0,83	420	8,64
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	1.490	6,87	4.850	4,77	1.680	7,06
Glândula Tireoide	1.150	1,15	470	1,76	8.050	7,91	2.160	9,08
Sistema Nervoso Central	4.960	5,07	1.240	5,81	4.130	4,05	1.370	5,81
Leucemias	5.050	5,20	1.250	5,78	4.320	4,24	1.250	5,15
Corpo do Útero	-	-	-	-	5.900	5,79	2.690	11,24
Pele Melanoma	2.960	3,03	950	4,33	2.930	2,85	1.150	4,57
Outras Localizações	37.520	38,40	9.070	42,86	35.350	34,73	8.590	36,49
Subtotal	203.930	208,77	51.100	241,30	190.520	187,13	58.710	248,46
Pele não Melanoma	98.420	100,75	19.650	92,72	83.710	82,24	22.540	95,26
Todas as Neoplasias	302.350	309,53	70.750	334,08	274.230	269,35	81.250	343,85

\*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Levando em consideração os cânceres do Sistema Nervoso Central (SNC), como os tumores cerebrais primários, a incidência na população mundial é de cerca de 2% de todas as

## Introdução

---

neoplasias malignas. Mesmo não sendo muito frequente, esse tipo de câncer contribui significativamente para a morbidade global (OMS, 2014). Para o Brasil, no ano de 2014, estimaram-se 4.960 casos novos de câncer do SNC em homens e 4.130 em mulheres (Tabela 1). Esses valores correspondem a um risco de 5,07 casos novos a cada 100 mil homens e 4,05 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2014).

A distribuição etária da incidência de cânceres do SNC possui um pico em crianças e outro em adultos acima dos 45 anos. A incidência desses tumores é ligeiramente mais alta no sexo masculino em comparação com o feminino. A razão de masculinidade para os gliomas é de aproximadamente 1,3. A taxa de incidência é mais alta entre grupos populacionais de maior nível socioeconômico. Parte desse alto índice pode ser explicada em razão do melhor acesso às tecnologias diagnósticas (OMS, 2014).

### 1.1.2 – Aspectos moleculares

Originalmente, pensava-se que a doença surgia quando o crescimento celular excedia a taxa de morte (BERGMAN *et al.*, 1997). Porém, essa visão reducionista não é capaz de englobar todos os aspectos envolvidos no surgimento de uma neoplasia. De fato, Hanahan e Weinberg (2000 e 2011) enumeraram seis principais características (ou *Hallmarks*) consideradas alterações essenciais na fisiologia celular e que, coletivamente, levam ao crescimento maligno e estão presentes na maioria dos tumores já descritos. Cada uma dessas capacidades adquiridas durante o desenvolvimento de um tumor representa uma alteração bem sucedida de um mecanismo de proteção de células e tecidos.

A característica primordial das células neoplásicas é a capacidade de manter uma proliferação crônica, ao contrário de células e tecidos normais que mantêm controle da liberação de sinais promotores de crescimento, assegurando a manutenção da homeostase (HANAHAN e WEINBERG, 2011). As células tumorais são capazes de produzir os próprios fatores de crescimento e de responder a eles de forma autócrina (LEMMON e SCHLESSINGER, 2010). Alternativamente, células do tumor podem enviar sinais estimulatórios para as células do estroma que, em contrapartida, fornecem fatores de crescimento diversos (CHENG *et al.*, 2008). A sinalização de receptores pode também estar alterada por meio da elevação da

## *Introdução*

---

expressão das proteínas associadas a esses receptores na superfície da membrana celular, levando a uma hiperresponsividade a uma pequena concentração de ligantes (LEMMON e SCHLESSINGER, 2010).

Outra forma de se manter a proliferação celular elevada é por meio da inibição da retroalimentação negativa. Um exemplo é a sinalização da oncoproteína Ras, cujos efeitos oncogênicos decorrem de mutações que reduzem a sua atividade GTPase que, em células não transformadas, opera como um mecanismo de retroalimentação negativa que assegura que a transmissão de sinais ativadores seja transitória (RAJALINGAM *et al.*, 2007). Além de serem capazes de induzir e manter uma alta taxa de proliferação, células tumorais também conseguem subverter programas de regulação negativa do crescimento e estas ações envolvem a atividade de genes supressores tumorais (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Existem vários genes supressores tumorais, porém, os mais bem caracterizados são os que codificam a proteína do Retinoblastoma (RB) e a proteína P53. Ambos atuam como controladores centrais de circuitos que envolvem proliferação, senescência e morte celular.

A proteína RB integra sinais de fontes tanto intra quanto extracelulares e, então, determina se a célula irá proceder em seu ciclo de crescimento e divisão, portanto, a célula tumoral que apresenta defeitos na via de RB perde um dos mecanismos críticos de controle do ciclo celular (BURKHART e SAGE, 2008).

Diferentemente de RB, p53 recebe sinais que se originam de sensores de estresse (originados de danos ao genoma, níveis de nutrientes, oxigênio ou fatores de crescimento) levando à parada do ciclo celular até que essas condições sejam normalizadas. No entanto, se o dano for irreparável ou as condições forem demasiadamente extremas, p53 pode ativar vias de morte celular programada (JUNTTILA e EVAN, 2009).

O conceito de que a morte celular programada por apoptose serve como uma barreira natural para o desenvolvimento do câncer já é algo que está estabelecido por meio de diversos estudos funcionais nas últimas décadas (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Uma das formas mais comuns que ocorre em células tumorais é a perda da função de p53, que, como mencionado acima, é um dos mais importantes mediadores da apoptose (JUNTTILA e EVAN, 2009). Além da via de p53, tumores são capazes de inibir vias de ativação da apoptose por meio da expressão aumentada reguladores antiapoptóticos como Bcl-2 e Bcl-

## *Introdução*

---

XL, ou ainda pela diminuição da expressão de fatores pró-apoptóticos como Bax e Puma (TAYLOR *et al.*, 2008).

De modo similar à apoptose, o processo de autofagia possui componentes regulatórios e efetores; dentre os últimos, estão proteínas que medeiam a formação do autofagossomo e sua fusão aos lisossomos (LEVINE e KROEMER, 2008). A via de sinalização que envolve PI3-quinase, AKT e mTOR, é estimulada por sinais de sobrevivência e estes bloqueiam a apoptose, no entanto, caso os sinais de sobrevivência não sejam suficientes, a via de PI3-quinase é inibida levando a apoptose ou autofagia (MATHEW *et al.*, 2007).

Considerando-se o câncer, há um paradoxo onde a falta de nutrientes, radioterapia e certos agentes antineoplásicos levam a um aumento da autofagia, e isso tem uma ação citoprotetora, impedindo os efeitos letais ao invés de levar a morte celular (WHITE *et al.*, 2010). Em alguns casos, células tumorais, que estão sob estresse severo, diminuem seu volume citoplasmático por meio da autofagia e entram em um estado de dormência reversível que, no fim, pode levar a uma recidiva do tumor, mesmo após o uso de agentes antineoplásicos potentes (WHITE *et al.*, 2010).

Diferentemente da apoptose e da autofagia, que são processos que ocorrem sem maiores repercussões nos arredores da células, a necrose leva uma liberação de todo o conteúdo citoplasmático no microambiente tecidual (ZHIVOTOVSKY e ORRENIUS, 2010). Apesar de historicamente este processo ter sido considerado uma morte celular ocasionada por exaustão e conseqüente ruptura de todas as estruturas celulares de modo desorganizado, essa visão está mudando e claramente em algumas circunstâncias ocorre de modo controlado e proposital (VANDEN BERGHE *et al.*, 2010).

A diferença mais significativa entre a morte celular necrótica e os demais tipos de morte citados é a liberação de sinais pró-inflamatórios no espaço intercelular (WHITE *et al.*, 2010). Como conseqüência, células necróticas recrutam células inflamatórias que possuem a função de avaliar a extensão do dano tecidual e remover os debrís celulares (GRIVENNIKOV *et al.*, 2010). Porém, no contexto de uma neoplasia, muitas evidências apontam que as células inflamatórias promovem a progressão tumoral, estimulando a angiogênese, a proliferação celular e a capacidade invasiva das células tumorais, dentre outros fatores (GRIVENNIKOV

## Introdução

---

*et al.*, 2010). Além disso, células necróticas liberam fatores como IL-1 $\alpha$  que estimula células próximas a proliferar, facilitando a progressão tumoral. Consequentemente, a necrose que poderia ser benéfica ao contrabalancear a hiperproliferação, causa mais mal que bem por ser tolerada por células tumorais com o objetivo de recrutar as células inflamatórias promotoras de tumores (GRIVENNIKOV *et al.*, 2010).

Outra característica geral de todos os tipos de células tumorais é o potencial de replicação ilimitado, que é um grande contraste em relação às demais células do organismo e está fortemente associado a duas barreiras distintas: senescência (estado viável e não replicativo) e crise (envolve morte celular) (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Um exemplo visto em laboratório é quando se estabelece uma linhagem celular, sendo que primeiramente ocorre a divisão e proliferação normal das células de interesse até o estado de senescência. As células que ultrapassam essa primeira barreira chegam à fase de crise na qual a grande maioria entra em morte celular. Em raras ocasiões, no entanto, uma pequena parte dessa população também é capaz de sobreviver a essa fase de crise e passa a exibir capacidade proliferativa ilimitada (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Assim como tecidos normais, os tumores necessitam de nutrientes, oxigênio e possuem a capacidade de excretar metabólitos e CO<sub>2</sub>. O processo de angiogênese, portanto, é imprescindível para a sobrevivência de qualquer tecido (FOLKMAN, 2006). Durante a embriogênese, o desenvolvimento da vasculatura envolve dois processos básicos que são a vasculogênese (formação de novos vasos a partir do recrutamento de células endoteliais) e a angiogênese (formação de novos vasos a partir de outros preexistentes) (FOLKMAN, 2006). Após esse período, apenas em algumas condições específicas ocorre uma ativação transiente. No entanto, durante a progressão tumoral, essas vias estão ativadas quase que de modo constitutivo, levando a vasculatura quiescente a crescer descontroladamente de modo a nutrir o tumor em desenvolvimento. O fenômeno é denominado *switch* angiogênico (BAERISWYL e CHRISTOFORI, 2009).

Essa regulação é feita por proteínas de sinalização que se ligam à superfície das células endoteliais estimulando ou inibindo sua ativação. Um exemplo clássico de estimulador e inibidor da angiogênese é o fator de crescimento do endotélio vascular A (VEGF-A – vascular endothelial growth factor-A) e a trombospondina-1 (TSP-1), respectivamente (FOLKMAN,

---

## Introdução

---

2006). O gene de VEGF-A codifica ligantes que estão envolvidos na regulação do crescimento de novos vasos sanguíneos, tanto na vida embrionária quanto no período pós-natal, e é importante na manutenção da homeostase das células endoteliais, além de cumprir funções fisiológicas e estar envolvido em certas situações patológicas no adulto (FOLKMAN, 2006).

Por meio de técnicas imunohistoquímicas, foi encontrada alta expressão de VEGF em diversas condições pré-malignas, tais como na displasia gástrica, adenoma atípico de cólon e carcinoma *in situ* de mama, sugerindo que a angiogênese não é necessariamente ligada à invasão dos tumores, mas que é um evento inicial na tumorigênese (RAICA *et al.*, 2009). Subtipos histológicos diferentes de câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC) e de carcinoma gástrico são caracterizados por diferentes níveis de VEGF (BONNESEN *et al.*, 2009). Em tumores cerebrais, a sua expressão é elevada e tem grande influência em sua malignidade (BRANDES *et al.*, 2008). Já a TSP-1 também se liga a receptores presentes na membrana citoplasmática das células endoteliais e ativa sinais supressores que contrabalanceiam o estímulo pró-angiogênico (KAZEROUNIAN *et al.*, 2008).

## 1.2 – TUMORES CEREBRAIS

### 1.2.1 – Aspectos gerais dos tumores cerebrais

Tumores do SNC apresentam diversas características que os diferenciam dos demais processos neoplásicos no restante do corpo. Primeiramente, a distinção entre lesões benignas e malignas é menos evidente. Por exemplo, alguns tumores gliais com características histológicas de um neoplasma benigno, incluindo baixa taxa mitótica, uniformidade celular e crescimento lento, ainda podem infiltrar amplas áreas do cérebro levando a sérios déficits clínicos e a um péssimo prognóstico. Em segundo lugar, a capacidade de se remover cirurgicamente neoplasias gliais infiltrativas sem comprometer as funções neurológicas é bastante limitada. Por fim, o sítio anatômico da lesão pode ter consequências letais independente da classificação histológica – um meningioma benigno, por exemplo, por meio da compressão da medula, pode causar uma parada cardiorrespiratória (KUMAR *et al.*, 2013).

## *Introdução*

---

A primeira edição da classificação dos tumores do SNC foi editada por Zülch e publicada em 1979 (LOUIS *et al.*, 2007). Era baseada em uma hipótese que ditava que neoplasmas do SNC se originavam a partir de precursores gliais ou neuronais, que paravam seu desenvolvimento em um determinado estágio, levando ao surgimento de conceitos como a “histogênese” e a “célula de origem”. Posteriormente, outros autores efetuaram melhoramentos dessa hipótese, que levaram ao surgimento da classificação da OMS, baseada em um esquema gradativo de malignidade (LOUIS *et al.*, 2007).

A graduação histológica é uma forma de prever o comportamento biológico da neoplasia. Na clínica, representa um fator essencial que irá influenciar a escolha da abordagem terapêutica, especialmente na determinação do uso de radioterapia adjuvante e protocolos quimioterapêuticos específicos (LOUIS *et al.*, 2007).

A classificação da OMS para tumores cerebrais leva em consideração um esquema gradativo de malignidade que abrange uma ampla gama de neoplasmas, ao invés de considerar apenas a gradação estritamente histológica (KLEIHUES *et al.*, 1993). Os tumores de grau III e IV, por exemplo, na ausência de tratamento, são, em geral, mais agressivos que suas contrapartes de grau menor (LOUIS *et al.*, 2007).

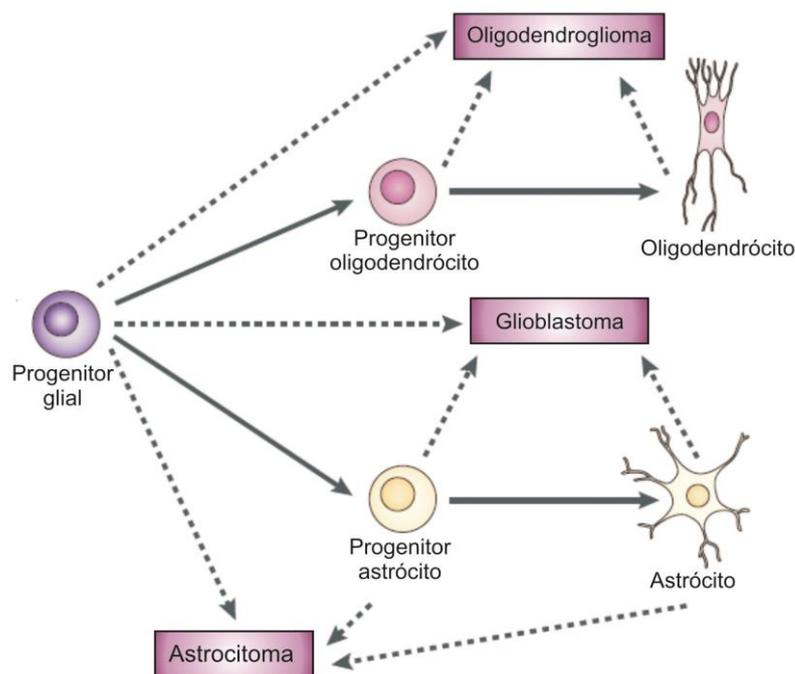
- Tumores de grau I – Apresentam crescimento lento, não são malignos e estão associados com longa sobrevida. Remoção cirúrgica frequentemente é suficiente e o paciente tem alta chance de cura.
- Tumores de grau II – Possuem crescimento relativamente lento, porém, podem retornar após cirurgia, e tendem a se transformar em tumores de grau mais elevado. Podem ser malignos ou não.
- Tumores de grau III – Apresentam evidências histológicas de malignidade, como atipia nuclear e alta taxa de proliferação. Necessárias abordagens terapêuticas adjuvantes de radio e/ou quimioterapia.

- Tumores de grau IV – Crescem rapidamente, apresentam áreas de necrose e são altamente infiltrativos e malignos. O prognóstico do paciente é bastante ruim, com alta letalidade.

Uma das principais classes de tumores cerebrais são os gliomas (tumores derivados de células gliais). As células da glia, especialmente os oligodendrócitos e os astrócitos, possuem importantes interações estruturais e metabólicas com os neurônios, além de apresentarem uma função primordial em uma ampla variedade de processos de resposta a lesões, tais como inflamação, reparo, balanço de fluidos e metabolismo energético (KUMAR *et al.*, 2013).

Os gliomas malignos consistem de uma ampla variedade de entidades histológicas que geralmente respondem mal à maioria dos tratamentos-padrão. (BRANDES *et al.*, 2008) Eles surgem em áreas funcionais críticas do cérebro, que oferecem um grande desafio para os cirurgiões, além de possuírem uma alta propensão a se infiltrarem no tecido cerebral e não haver fatores de risco conhecidos ou sequer estratégias preventivas. Cada grupo possui um prognóstico específico. Por exemplo, pacientes diagnosticados com glioblastoma (astrocitoma grau IV) – a variedade mais prevalente e agressiva – têm pouco benefício dos tratamentos-padrão (LOUIS *et al.*, 2007). A doença segue então um curso fatal com uma expectativa de vida média de 12 a 15 meses (BRANDES *et al.*, 2008; DIRKS, 2010).

A maior parte dos gliomas, independentemente de sua origem (Figura 1), se infiltra de modo difuso nas adjacências do tecido cerebral e, juntos, representam um amplo grupo, o qual a OMS divide em astrocítico, oligodendroglioma e misto ou oligoastrocítico (LOUIS *et al.*, 2007). Características tais como: núcleos atípicos, proliferação exacerbada, proliferação microvascular e necrose, tipicamente resultam em uma gradação maior tanto como glioma quanto glioblastoma.



**Figura 1 – Origens dos tumores cerebrais da linhagem glial.** Tumores podem se originar tanto de precursores gliais quanto de células já diferenciadas. Adaptado de HUSE e HOLLAND, 2010.

O glioblastoma multiforme (GBM) é a variante mais maligna e difusa dos gliomas que, apesar da avaliação por meio de marcadores, tais como a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), o insere na classe astrocítica. Sua histogênese precisa ainda permanece obscura, mesmo com avanços consideráveis na compreensão de sua biologia básica. Sabe-se, todavia, que o GBM surge a partir de neoplasmas astrocíticos de baixo grau, ao longo do tempo, (GBM secundário) apesar da maioria desses tumores aparentemente surgirem de novo (GBM primário) (BRANDES *et al.*, 2008).

### 1.2.2 – Aspectos moleculares dos gliomas malignos

Com alta heterogeneidade genética e patológica, mesmo dentro da mesma amostra, os gliomas malignos não são definidos por uma única mutação ou alteração molecular. Portanto, um processo de identificação de alvos baseado em um único marcador molecular se torna muito difícil (WANG *et al.*, 2015). É imperativa a compreensão das vias pelas quais diferentes alterações levam a gliomagenese, sua progressão e resistência aos tratamentos para,

## Introdução

---

então, focar os esforços no desenvolvimento de uma classificação biologicamente significativa para o tratamento desses tumores (WANG *et al.*, 2015).

Como parte desses esforços, a rede de pesquisa Atlas Genômico do Câncer (TCGA) identificou três vias de sinalização principais envolvidas na patogênese dos gliomas (Figura 4): p53, proteína do retinoblastoma (RB) e do receptor tirosina quinase (TKR)/RAS/fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) (TCGA, 2008). Há outras vias de sinalizações importantes na gliomagenese e na manutenção de seus fenótipos, por exemplo, a via pró-angiogênica já citada na seção 1.1.2.

O gene de supressão tumoral p53 codifica uma proteína que regula diversos processos celulares como parada do ciclo celular, resposta a danos ao DNA, senescência, apoptose e diferenciação (MASUI *et al.*, 2012; OHGAKI e KLEIHUES, 2009). Quando as células sofrem estresses tóxicos, p53 atua como fator de transcrição para regular a expressão de genes efetores que determinam o destino da célula (FURNARI *et al.*, 2007). A perda da função normal de p53 resultante de alterações da via MDM2/MDM4/p14ARF já foi ligada à expansão clonal de células de gliomas (TANAKA *et al.*, 2013). O homólogo humano de MDM2 inibe a função de p53, enquanto MDM4 regula a atividade do último e p14ARF é negativamente regulada por p53 (OHGAKI e KLEIHUES, 2009). Nesta via, o TCGA demonstrou que ocorrem mutações ou deleções em p53 (35%), amplificação de MDM2 (14%), amplificação de MDM4 (7%) e mutações ou deleções em p14ARF (49%) (TCGA, 2008). (Figura 2). Interessantemente, as amplificações de MDM2 e alterações ou mutações em p53 são encontradas juntas, e de modo semelhante às alterações em p14ARF e mutações em p53 (OHGAKI e KLEIHUES, 2009). No entanto, talvez como resultado de sua alteração extremamente comum em praticamente todos os gliomas, o status de p53 não apresenta uma relação clara com o resultado dos tratamentos de gliomas malignos (MASUI *et al.*, 2012).

Similar a p53, RB é um gene de supressão tumoral que codifica a proteína RB1 que atua como inibidor da entrada das células da fase G1 na fase S do ciclo celular (OHGAKI e KLEIHUES, 2009). Quando ocorre a fosforilação de RB1 pela ciclina D, a quinase dependente de ciclina CDK4 e CDK6, RB1 se torna inativa, portanto ativando a progressão do ciclo celular (TANAKA *et al.*, 2013). Portanto, alterações nos componentes da via p16INK4a/CDK4/RB1 que regulam o ciclo celular, levam à proliferação dos gliomas

## Introdução

---

(FURNARI *et al.*, 2007). Deleção ou mutação em RB1 e amplificação de CDK4 levam à inativação de RB1, assim como mutações ou deleções de CDKN2A (inibidor de CDK2A), levam à perda da função normal de RB1 (OHGAKI e KLEIHUES, 2009). De modo geral, a frequência de alterações genéticas nessa via são comuns a 78% de GBMs, sendo que a deleção de CDKN2B corresponde a 47%, a deleção de CDKN2C a 2 %, a amplificação de ciclina D2 a 2%, a amplificação de CDK6 1%, a mutação ou deleção de RB1 a 11%, a amplificação de CDK4 a 18% e a deleção ou mutação de CDKN2A(p16INK4a) a 52% (TCGA, 2008).

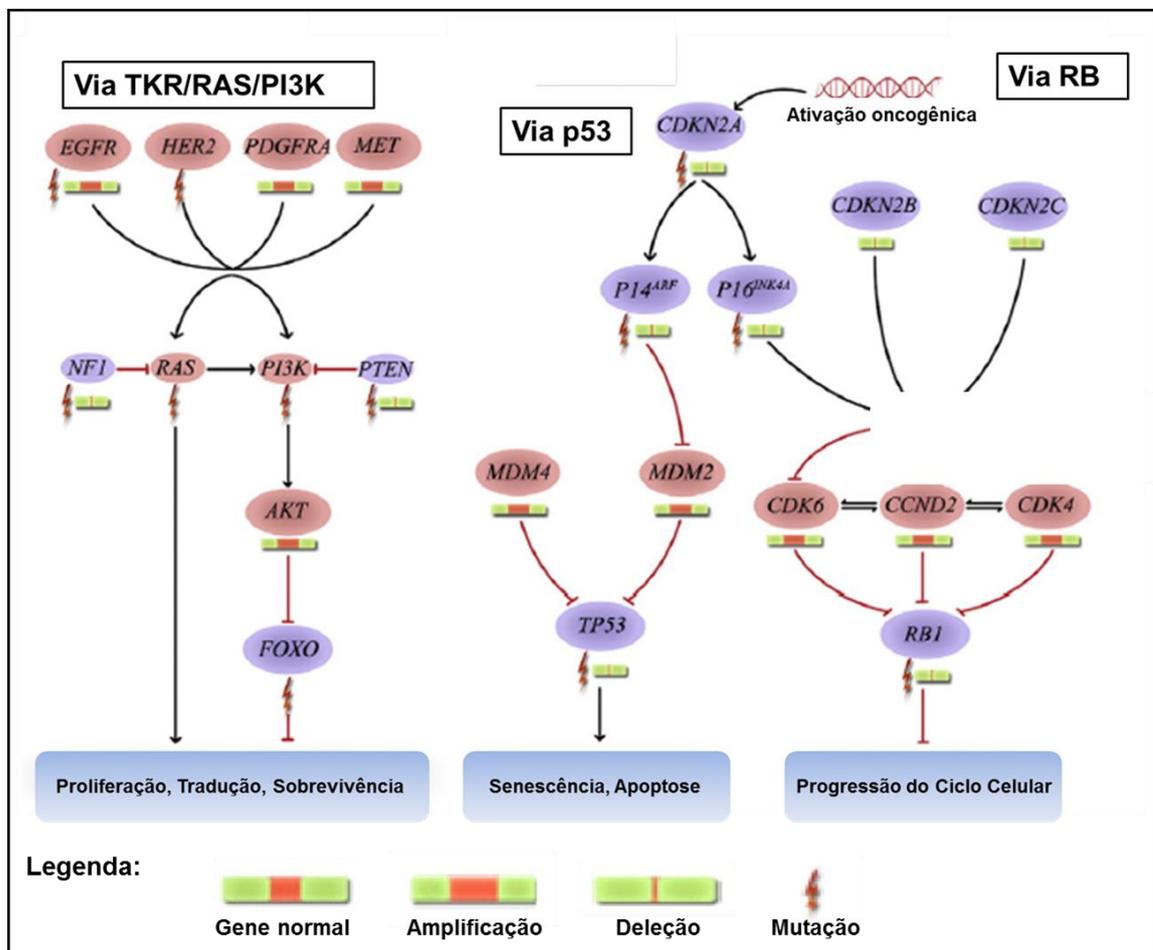
Entre todas essas alterações, uma das mais importantes é a mutação ou deleção de CDKN2A, que leva à perda tanto de p16INK4a (da via de RB) quanto de p14ARF (da via de p53), demonstrando que uma única inativação gênica exerce grande impacto no crescimento dos gliomas malignos (TANAKA *et al.*, 2013).

Receptores Tirosina Quinase (TKRs) tais como EGFR e PDGFR proteínas de membrana que possuem um domínio extracelular que reconhece seus ligantes específicos (EGF e PDGF, respectivamente) e domínios intracelulares associados a uma atividade tirosina cinase. A ativação de vários desses receptores é frequentemente encontrada em gliomas malignos, como a amplificação de EGFR presente em 40% dos pacientes e a amplificação de PDGFRA presente em 16% dos pacientes (HATANPAA *et al.*, 2010; NAZARENKO *et al.*, 2012).

Geralmente, os TKRs são ativados por meio da interação de seus ligantes, porém, há um variante de EGFR denominado EGFRvIII que apresenta uma atividade constitutiva, independente de ligante. Este mutante é observado em 30 a 50% de todos os gliomas que apresentam amplificação de EGFR (HATANPAA *et al.*, 2010). TKRs mutados contribuem para o recrutamento de PI3K, RAS etc., para a membrana citoplasmática para ativar cascatas de transdução de sinal. Ocorre então a ativação de efetores da via de PI3K, como AKT e mTOR que funcionam como reguladores centrais do metabolismo celular, proliferação, ciclo celular, diferenciação e angiogênese (Figura 2) (WEN *et al.*, 2012). Esta via de ativação é mantida inibida pela proteína PTEN que inativa a via de PI3K. No entanto, a inativação bialélica do gene de PTEN localizado no cromossomo 10q está presente em 40% dos gliomas malignos, levando à ativação constitutiva da via de PI3K/AKT (WEN *et al.*, 2012).

## Introdução

A mutação de RAS provoca o aumento da atividade da via da proteína quinase mitógena ativada por RAS-RAF (RAS/RAF/MAPK) que desencadeia uma proliferação celular descontrolada. Contudo, a mutação do gene de RAS é relativamente rara em gliomas (TCGA, 2008). No entanto, mutação ou amplificação de TKRs e mutação ou deleção da proteína neurofibrina (regulador negativo de RAS) ativam permanentemente RAS, aumentando a proliferação, motilidade e sobrevivência celular (TCGA, 2008). Resumindo, todas as alterações genéticas da via TKR/RAS/PI3K em GBMs foi confirmada pelo TCGA em 88% dos tumores analisados.



**Figura 2 – Vias moleculares envolvidas na patogênese dos gliomas.** As três principais vias alteradas em gliomas malignos (TKR/RAS/PI3K, p53 e RB) apresentam alterações gênicas. Alterações que levam à ativação gênica são mostradas em vermelho e alterações que levam à inativação são apresentadas em roxo. Para cada via, os componentes alterados e o tipo de alteração estão indicados. Adaptado de Wang *et al*, 2015.

---

### 1.3 – ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

Atualmente, o tratamento-padrão para pacientes com GBM é a ressecção máxima segura do tumor, seguida de radioterapia concomitante e uso de quimioterápicos adjuvantes, sendo a droga de escolha atual a Temozolomida (TMZ) (CLARKE *et al.*, 2010). Somente a cirurgia leva a uma sobrevivência média de seis meses, combinada à radioterapia pode aumentar a expectativa de vida em 12,1 meses e a adição de TMZ pode aumentar esta para 12 a 15 meses (STUPP *et al.*, 2005).

#### 1.3.1 – Ressecção cirúrgica

A cirurgia ainda é um componente importante no tratamento de GBM, pois permite tanto a confirmação histológica do diagnóstico quanto a redução da lesão (WILSON *et al.*, 2014). A cirurgia também possui um papel terapêutico, uma vez que reduz a pressão intracranial e dependendo da localização do tumor, pode provocar a recuperação de alguma função neurológica (WILSON *et al.*, 2014).

O objetivo da cirurgia é a ressecção total da massa tumoral principal, sem comprometer a função neurológica (PERRY *et al.*, 2012). A remoção total pode não ser possível dependendo das estruturas anatômicas invadidas pelo tumor, no entanto, avanços em técnicas cirúrgicas tais como as de imagem por ressonância magnética intraoperativa, craniotomia desperta, mapeamento cortical, dentre outras, facilitam o delineamento das bordas do tumor e otimizam a ressecção cirúrgica segura (PERRY *et al.*, 2012).

#### 1.3.2 – Químio e radioterapia

A combinação de radioterapia (RT) com TMZ é a terapia adjuvante que tem se mostrado mais eficaz para prolongar a vida do paciente após o procedimento cirúrgico. Este tratamento geralmente consiste de seis semanas de RT localizada e TMZ, seguido de seis ciclos complementares de TMZ (STUPP *et al.*, 2009).

## Introdução

---

O tratamento-padrão utilizando RT em GBM é a teleterapia focal e fracionada diretamente na cavidade da ressecção do tumor até 2 cm de margem do tecido cerebral ao redor da lesão (AGUILAR *et al.*, 2012). Geralmente, uma dose de 60 Gy (Gray) é aplicada em frações de 2 Gy durante seis semanas (SHAPIRO *et al.*, 1989).

A TMZ, um agente alquilante administrado via oral, causa danos ao DNA e ativa vias que induzem a apoptose das células tumorais (FRIEDMAN *et al.*, 2000). Recentemente, a TMZ foi adicionada como tratamento-padrão para GBM (WEILER *et al.*, 2010). Anteriormente, a quimioterapia não era reconhecida como algo que pudesse trazer benefícios clínicos e a RT permaneceu como único tratamento para pacientes que passaram por remoção cirúrgica (ANTON *et al.*, 2012). Em 2005, um teste clínico demonstrou que a administração de RT concomitante a TMZ, seguida de TMZ de modo adjuvante, prolongou significativamente a sobrevivência média mais do que somente a radiação. Durante os cinco anos de análise deste estudo, a maior parte dos pacientes tratados com TMZ ainda estavam vivos (STUPP *et al.*, 2005). Estes achados estabeleceram os benefícios da combinação de RT e TMZ, estabelecendo o assim denominado “Regime Stupp” de tratamento para GBM (STUPP *et al.*, 2005).

TMZ é um agente alquilante da família dos imidazotetrazinas, que é estável apenas em pH ácido (PLETSAS *et al.*, 2013). Esta pró-droga sofre rápida conversão química na circulação sistêmica em pH fisiológico para o composto ativo 3-metil-(triazen-1-yl-imidazole-4-carboxamida (MTIC), o qual reage com água para produzir o 5-aminoimidazole-4-carboxamida (AIC) e o cátion altamente reativo metildiazônio (meia-vida de 0,4 s). Este cátion instável transfere um grupo metil para o DNA causando o efeito citotóxico da TMZ (FRIEDMAN *et al.*, 2000). Esta metilação ocorre nas posições O6 e N7 de guaninas e na posição N3 de adeninas. A metilação na posição O6 corresponde a 5% do total das lesões causadas por TMZ no DNA, mas é a maior causa de sua toxicidade (DRABLOS *et al.*, 2004). Por outro lado, as metilações nas posições N7 e N3 são mais frequentes e representam 80 a 85% e 8 a 18% de todas as alquilações respectivamente (CHRISTMANN *et al.*, 2011).

Como mencionado anteriormente, a TMZ adiciona grupos metil a bases de purina, causando danos ao DNA e o principal alvo deste agente é a guanina, adicionando um grupo metil na posição O6 formando a O6-metilguanina (CHRISTMANN *et al.*, 2011). Esse grupo metila

---

## Introdução

---

adicionado pode ser removido pela enzima O6-metilganinametiltransferase (MGMT), uma proteína do sistema de reparo de DNA e a remoção confere resistência das células tumorais a TMZ e a outros agentes alquilantes, protegendo as células de seus efeitos danosos (CHRISTMANN *et al.*, 2011). Em alguns pacientes, a expressão de MGMT foi reduzida ou silenciada pela metilação das regiões promotoras do gene de MGMT (VILALVA *et al.*, 2012). Portanto, o estado de metilação deste gene é um dos principais mecanismos de resistência em pacientes com GBM (CHRISTMANN *et al.*, 2011; KAINA *et al.*, 2007).

Um novo agente antineoplásico atualmente em uso clínico para o tratamento de mieloma e em testes clínicos para o GBM é o inibidor de proteassoma Bortezomibe. Bortezomibe é um inibidor reversível do proteassoma, que inibe a atividade do tipo quimiotripsina do proteassoma constitutivo e do imunoproteassoma (CRAWFORD *et al.*, 2006). As avaliações iniciais feitas *in vitro* deste agente demonstraram que ele é capaz de induzir o acúmulo de proteínas intracelulares que afetam diversos processos celulares. Inibição da atividade de NFκB, alteração na degradação de proteínas do ciclo celular e no equilíbrio de proteínas pró e antiapoptóticas, ativação do estresse do retículo endoplasmático; e inibição de angiogênese e do reparo de DNA, já foram descritas como sendo causadas pela ação do Bortezomibe e sendo responsáveis pelo seu efeito antitumoral (CRAWFORD *et al.*, 2012). Somado a isso, Bortezomibe foi capaz de sensibilizar células a quimioterapia convencional e de superar a resistência quimioterápica em mielomas (HIDESHIMA *et al.*, 2001).

Trabalhos já demonstraram sua atividade em GBM, induzindo morte celular por meio da ativação de proteínas pró-apoptóticas e reguladoras do ciclo celular, além da ativação da sinalização JNK (SEOL, 2011; TIANHU *et al.*, 2010; YIN *et al.*, 2005). A utilização da inibição de proteassoma como forma de superar a resistência de GBM a TMZ já foi feita com resultados de testes fase I e II (KUBICEK *et al.*, 2009; PORTNOW *et al.*, 2012). Em um trabalho mais recente, Vlachostergios *et al.* (2013) demonstraram que BZM exerce um efeito quimiossensibilizador em linhagens celulares de GBM, pela inibição de MGMT pela interferência de diversas vias de sinalização importantes como NFκB, MAPK, STAT3 e HIF-1α (VLACHOSTERGIOS *et al.*, 2013).

A Cisplatina já foi usada como primeira opção de tratamento para diversos tipos tumorais como testicular, de ovário, cervical, de cabeça e pescoço, e pulmão tanto sozinha quanto em

## Introdução

---

combinação com outros agentes. Também é usada com adjuvante após cirurgia e radioterapia (BASU e KRISHNAMURTHY, 2010). No entanto, pacientes que inicialmente respondem bem à terapia frequentemente desenvolvem resistência e, além disso, o sucesso do tratamento é comprometido pela nefrotoxicidade (BASU e KRISHNAMURTHY, 2010). A Cisplatina ou cis-diamino-dicloro-platina(II) é um complexo de platina divalente e sua configuração cis é necessária para sua atividade antitumoral (TODD e LIIPPARD, 2009). Possui dois grupos cloreto lábeis e dois relativamente inertes grupos amino. A Cisplatina sofre hidrólise em água e a concentração de cloreto é um importante fator para se haverá hidrólise ou aquação (TODD e LIIPPARD, 2009). A alta concentração de cloreto no sangue (~103mM) impede sua hidrólise até a entrada na célula. Assim que entra na célula, a concentração de cloreto cai para 4mM, o que facilita o processo de aquação (WANG e LIIPPARD, 2005).

A forma aquosa da Cisplatina é um potente eletrófilo e reage com uma ampla variedade de nucleófilos, incluindo ácidos nucléicos e grupos sulfidríla de proteínas (WANG e LIIPPARD, 2005). Porém, o principal mecanismo de ação é a formação de adutos de DNA. O átomo de platina da molécula forma ligações covalentes com a posição N7 de purinas para formar 1,2 ou 1,3 *crosslinks* intrafita e um pequeno percentual de *crosslinks* interfitas. A Cisplatina é considerada um agente alquilante bifuncional (TODD e LIIPPARD, 2009). A ligação intrafita entre duas guaninas adjacentes parece ser a lesão crítica, responsável por seu efeito citotóxico. A formação de adutos de DNA interfere tanto na replicação quanto na transcrição e a lesão causada é reconhecida por proteínas que reparam este tipo de dano e a ativação dessas vias é uma das responsáveis pela resistência ao agente (DRABLOS *et al.*, 2004). Além das vias ligadas ao reparo de DNA, também são ativadas vias que levam a parada do ciclo celular e apoptose (WANG e LIIPPARD, 2005).

Seu uso como adjuvante no tratamento de gliomas associado à radioterapia e a TMZ já foi reportado (CAPDEVILA *et al.*, 2014; IWAMA *et al.*, 2015; ZUSTOVICH *et al.*, 2009). Apresenta um sucesso relativo em casos onde há resistência do paciente ao tratamento-padrão com TMZ, e quando a ressecção cirúrgica não é possível. Porém, a questão da nefrotoxicidade ainda é um fator que limita o seu uso (KIM *et al.*, 2011).

Outro agente antineoplásico de uso comum na clínica é o Etoposídeo. É uma droga amplamente prescrita para o tratamento de diversos tipos de cânceres como tumores de

---

## *Introdução*

---

pulmão, células germinativas, sarcomas, leucemias e linfomas (BALDWIN e OSHEROFF, 2005). O alvo celular primário do Etoposídeo é a enzima topoisomerase II, que tem a função de helicase, desenvolve o DNA e introduz quebras de fita dupla transientes durante a replicação e transcrição (NITISS, 2009). Esse agente é ciclo celular dependente e tem o efeito máximo durante as fases S e G2 e seu mecanismo de ação é por meio da criação de uma ligação covalente entre a enzima e o DNA que está sendo clivado (complexo de clivagem), que é uma fase intermediária do processo da atividade da topoisomerase II (KLUZA *et al*, 2006). A geração de altos níveis de complexos covalentes tem grandes efeitos na fisiologia da célula e agentes como o Etoposídeo efetivamente bloqueiam tanto a replicação quanto a transcrição, levando a célula a apoptose (NITISS, 2009).

Quanto ao uso do Etoposídeo como adjuvante na terapia para pacientes com GBM, não há muitos trabalhos na literatura. No entanto, esse agente tem sido usado em combinação com outros compostos para o tratamento de pacientes com recorrência da doença, ou como 4<sup>a</sup> ou 5<sup>a</sup> linha de tratamento para pacientes que não respondem bem ao tratamento-padrão (AOKI *et al*, 2010; IWAMA *et al.*, 2015; TONDER *et al.*, 2015). Os resultados são controversos e, em alguns casos, a relação risco-benefício não é favorável, principalmente em pacientes que já passaram por vários tratamentos (TONDER *et al.*, 2015).

### **1.3.3 – Outras terapias**

GBM é um tipo tumoral altamente heterogêneo, contendo muitas alterações genéticas, havendo uma coexistência de clones não relacionados (BAI *et al.*, 2011). Como já mencionado na seção 1.2.2, muitas vias de sinalização desreguladas, como as vias dependentes de TKR, são de grande interesse para a geração de terapias que tenham como alvo seus componentes ou vias dependentes de sua ativação (PATEL *et al.*, 2012). A grande parte dos receptores para fatores de crescimento são TKRs transmembrana com domínios extracelulares de ligação e domínios intracelulares de quinases. Sua ativação desencadeia uma cascata de eventos subsequentes, que levam a um maior crescimento tumoral e invasão do tecido cerebral e secreção de fatores angiogênicos (LEMMON e SCHLESSINGER, 2010). Portanto, a inibição dessas vias e seus componentes efetores é o principal objetivo das terapias molecularmente direcionadas para o tratamento de GBM.

---

## *Introdução*

---

Essas abordagens terapêuticas podem ser divididas em pequenas moléculas inibitórias e anticorpos monoclonais. Os inibidores são compostos orgânicos não poliméricos capazes de atravessar a membrana celular e se ligar componentes intracelulares específicos (DAY e WAZIR, 2012), tais como os domínios com atividade quinase dos TKRs. Os inibidores podem ser específicos para uma quinase ou apresentar atividade contra múltiplas quinases (OKONOGI *et al.*, 2015). Diferentemente, anticorpos monoclonais são muito grandes para atravessar a membrana celular e têm como alvo peptídeos e proteínas da superfície (OKONOGI *et al.*, 2015). Em testes clínicos, esses agentes específicos têm sua eficácia estudada tanto como tratamento único em GBM recorrentes ou usadas como terapia combinada com RT e TMZ em pacientes recém-diagnosticados (DAY e WAZIR, 2012). Em geral, os resultados até o momento demonstraram apenas benefícios limitados (WILSON *et al.*, 2014). Há ainda outras abordagens terapêuticas que têm como alvo outras vias e componentes da maquinaria celular, porém, até o momento, possuem eficácia limitada e novos estudos são necessários para se determinar outros alvos de interesse.

## 1.4 – INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO, RESPOSTA INTEGRADA AO ESTRESSE E GRÂNULOS DE ESTRESSE

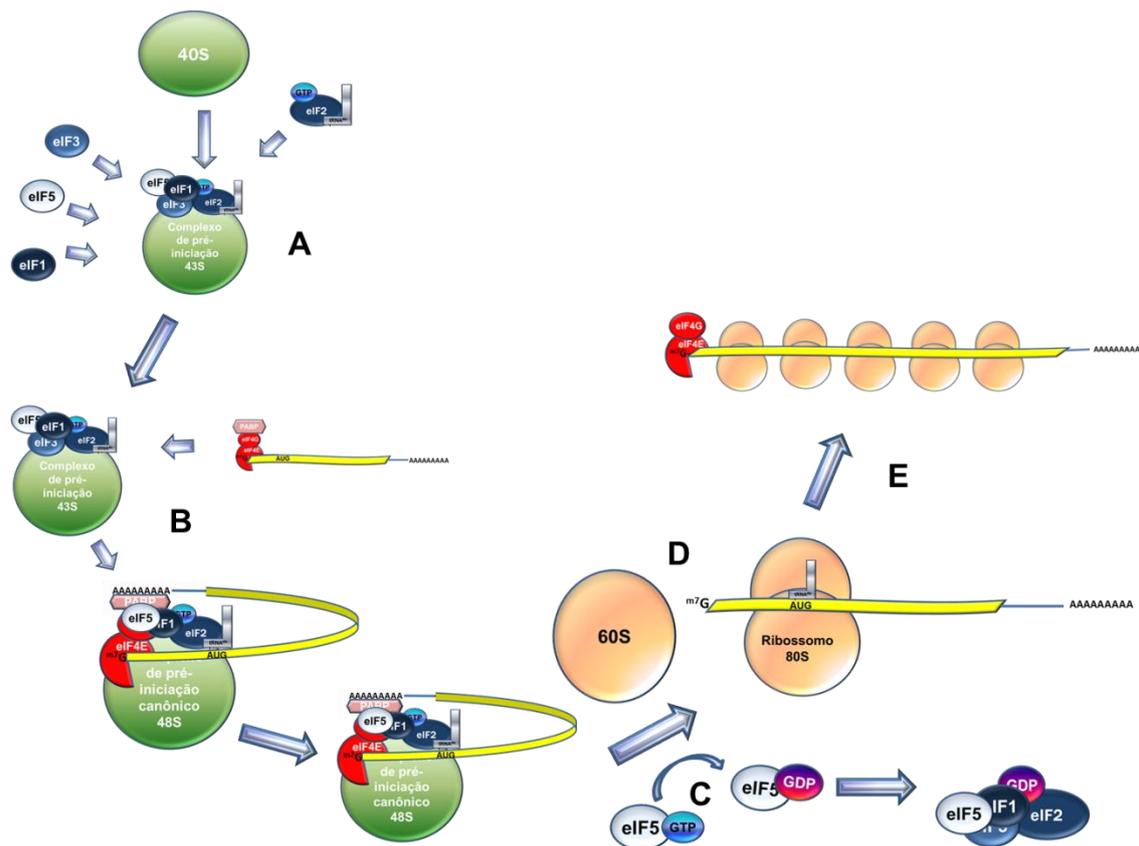
### 1.4.1 – Iniciação da Tradução

Quando há uma condição considerada estressora pela célula (calor excessivo, estresse oxidativo, falta de nutrientes etc.), ocorre drástica redução da síntese proteica com objetivo de conservar energia para o reparo dos danos causados por esses estímulos (ANDERSON e KEDERSHA, 2002). A redução da tradução é, entretanto, seletiva, pois, enquanto genes constitutivamente expressos deixam de serem traduzidos, outros que são induzidos por estresse celular como, por exemplo, proteínas de choque térmico e fatores de transcrição, têm sua expressão mantida ou aumentada (ANDERSON e KEDERSHA, 2002). De fato, um estudo demonstrou que a tradução de 25% de mRNAs está significativamente reduzida enquanto outros 25% está significativamente aumentada (KAWAI *et al.*, 2004)

O início da tradução começa com a montagem do complexo de pré-iniciação 43S, que é formado por eIF1, eIF2-GTP, eIF3 e eIF5 a subunidade ribossomal 40S (Figura 3A) (PHAN, *et al.*, 2001). O complexo 43S recruta um 7metilguanosina-mRNA e o os seus fatores de

## Introdução

iniciação associados (eIF4E, eIF4G, e poli(A)-binding protein) para formar o complexo de pré-iniciação canônico 48S (Figura 3B). Este complexo faz a leitura da região não traduzida 5' (5'UTR) do transcrito de mRNA, até parar no códon de iniciação AUG que é reconhecido pelo anticódon tRNA<sup>Met</sup>. Este reconhecimento ativa a hidrólise de um GTP associado a eIF2, reação catalisada por eIF5 (Figura 3C) (ANDERSON e KEDERSHA, 2002). Os fatores iniciais da tradução (eIF2-GDP, eIF3, eIF5, eIF1 $\alpha$ ) se dissociam da subunidade 40S e a subunidade 60S é recrutada para formar um ribossomo 80S funcional (Figura 3D). O processo se repete para cada ribossomo 80S e estes se ligam a extremidade 5' do mRNA para formar um poliribossomo (Figura 3E) (ANDERSON e KEDERSHA, 2002).



**Figura 3 – Mecanismo Geral da iniciação da tradução.** O complexo ternário se une a subunidade ribossomal 40S para formar o complexo de pré-iniciação 43S (A). Em seguida, há o recrutamento de um mRNA e há a formação do complexo 48S (B). Ocorre a hidrólise de um GTP catalisada por eIF5 e a liberação dos fatores iniciais (C). Há o recrutamento da subunidade 60S ribossomal para a formação de um ribossomo 80S funcional (D). Vários ribossomos se ligam ao mRNA para formar um poliribossomo (E).

---

#### 1.4.2 – A Resposta Integrada ao Estresse

O processo de início da tradução é muito bem regulado. Uma tradução excessiva pode levar a uma transformação celular, enquanto, se o início da tradução não for adequado, pode levar à morte celular (KIMBALL *et al.*, 2003). A associação próxima entre a iniciação da tradução e a sobrevivência da célula é evidente pelo efeito funcional do complexo ternário, eIF2-GTP-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>, que carrega o iniciador tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> na subunidade ribossomal menor durante a montagem do complexo de pré-iniciação 43S (KEDERSHA *et al.*, 2002).

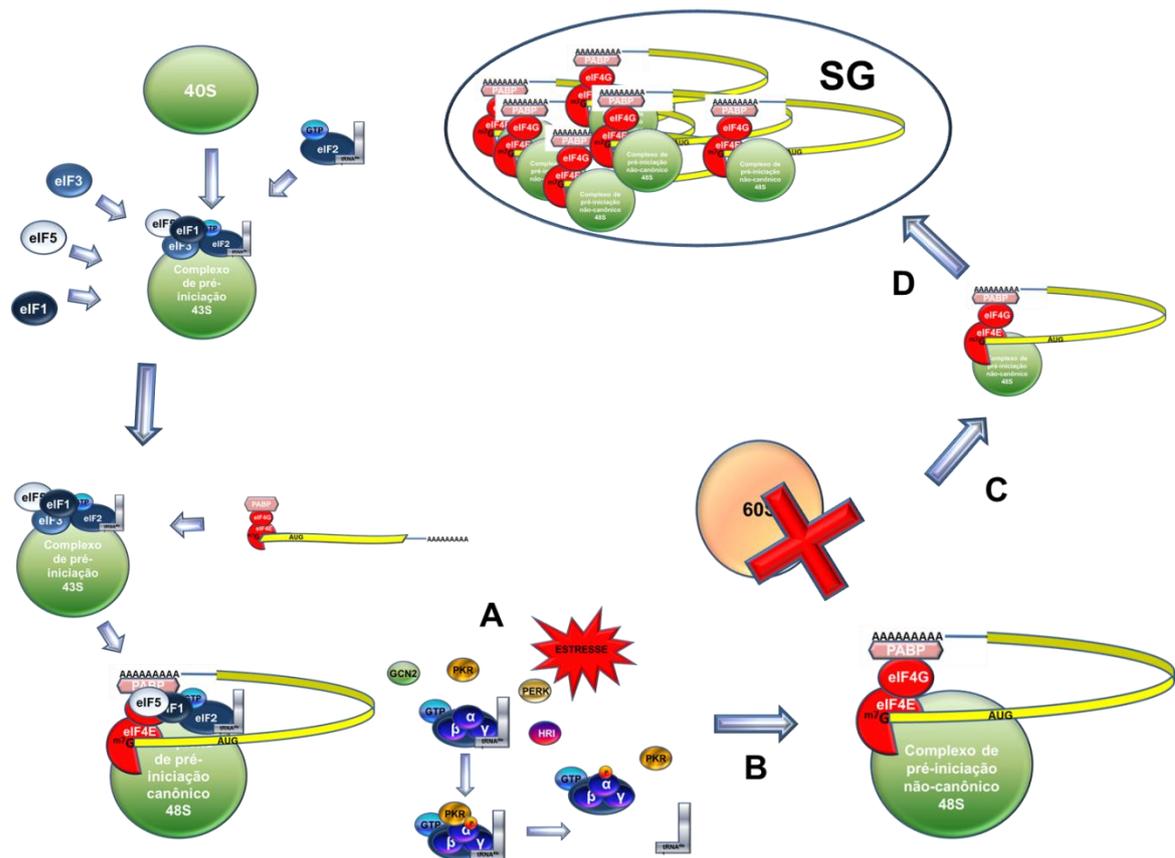
As vias de sinalização responsáveis pela reprogramação da tradução em células sob estresse são ativadas por uma família de serina e treonina quinases que atuam como sensores do estresse ambiental e modulam diretamente o aparato traducional. A saber: proteína quinase R (PKR – do inglês *Protein Kinase R*) quinase dependente de RNA dupla fita ativada por infecção viral, choque térmico e radiação UV (ANDERSON e KEDERSHA, 2002); quinase do retículo endoplasmático (PERK – do inglês *PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase*), proteína residente do retículo endoplasmático (RE) (HARDING *et al.*, 2000) ativada pela entrada de proteínas mal formadas no RE; o controle geral não-depressivo 2 (GCN2 – do inglês *General Control Nonderepressible 2*), proteína responsável pelo monitoramento dos níveis de aminoácidos no meio intracelular e ativada em resposta ao estresse nutricional (CASTILHO *et al.*, 2014); fator iniciador regulado por heme 2 $\alpha$  (HRI – do inglês *Heme-Regulated Initiation Fator 2 alpha*), proteína geralmente responsável por garantir uma síntese equilibrada de globinas e grupos heme durante a maturação de eritrócitos, mas que pode atuar como sensor de estresse oxidativo (McEWEN *et al.*, 2005).

A proteína eIF2 é composta por três subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (KIMBALL, 1999). Uma vez que ocorre a ativação de uma das quinases, ocorre então a fosforilação da subunidade alfa do fator de iniciação da tradução, eIF2 $\alpha$  (do inglês *eukariotic Initiation Factor 2 alpha*), na serina 51 que provoca a depleção do complexo ternário eIF2-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>-GTP necessário para o início da tradução (Figura 4A) (KIMBALL *et al.*, 2003). Na ausência deste complexo, o surgimento do complexo de pré-iniciação 48S que normalmente se formaria na extremidade 5' do mRNA é impedida, produzindo um complexo 48S não-canônico, traducionalmente parado que é incapaz de recrutar a subunidade ribossomal 60S (Figura 4B) (KIMBALL *et al.*, 2003). Então, os ribossomos que estão ligados se desacoplam dos polissomos, convertendo-os em partículas de ribonucleoproteínas mensageiras (mRNPs) (Figura 4C) que, então, poderão

---

## Introdução

formar os denominados Grânulos de Estresse (SGs – do inglês Stress Granules) (Figura 4D) (KEDERSHA *et al.*, 2000). A esta via que ativa a fosforilação de eIF2 $\alpha$ , que pode levar a entre outras vias, à formação de SGs, se dá o nome de ISR (do inglês – *Integrated Stress Response*).



**Figura 4 – A fosforilação de eIF2 $\alpha$  por quinases afeta a tradução e leva a formação de Grânulos de Estresse.** Na presença de estímulos estressores, uma das quatro quinases (PKR, PERK, GCN2 ou HRI) fosforilam a subunidade  $\alpha$  de eIF2 levando à depleção do complexo ternário (A). O complexo de pré-iniciação então se converte para o complexo denominado não-canônico e incapaz de recrutar a subunidade 60S e prosseguir a tradução (B). Ocorre o desacoplamento da subunidade 43S e a liberação da mRNP (C). AS mRNPs acumuladas no citoplasma se ligam a proteínas e formam os Grânulos de Estresse – SG (D). Adaptado de Anderson e Kedersha, 2009.

Paralelamente, a necessidade da fosforilação de eIF2 $\alpha$  para a formação de SGs pode ser contornada por meio de drogas que impeçam o início da tradução por ter como alvo a helicase eIF4A, impedindo sua ligação a eIF4G mesmo em células que não possuam p-eIF2 $\alpha$  (BORDELEAU *et al.*, 2005; MAZROUI *et al.*, 2006;). Isso indica que o acúmulo de mRNPs livres é crucial para a formação de SGs.

Um dos primeiros conceitos de que SGs regulam a tradução foi suplantado por descobertas de que, na verdade, a parada na tradução regula a formação de SGs, questionando o propósito desses grânulos (KEDERSHA *et al.*, 2013). Atualmente, um viés importante a ser explorado é como a formação desses SGs afeta vias relacionadas à proliferação, motilidade, produção de ROS e sobrevivência das células, ao invés de apenas levar em consideração o efeito na inibição da formação de SGs na regulação da expressão de mRNAs (KEDERSHA *et al.*, 2013). Contudo, o estudo da inibição da formação de SGs possui grande importância por evidenciar que certamente a formação desses grânulos possui efeito citoprotetor (BUCHAN e PARKER, 2009).

### **1.4.3 – Componentes e formação de Grânulos de Estresse**

A formação de Grânulos de Estresse é altamente complexa e é um processo comum a todas as células eucarióticas (ANDERSON e KEDERSHA, 2008; BUCHAN e PARKER, 2009). Estudos genômicos estabeleceram que mais de 100 proteínas regulam a formação de SGs, sugerindo que esses grânulos possuem importante papel na resposta a condições ambientais adversas no contexto celular (OHN *et al.*, 2008).

Os componentes de SGs são divididos em três principais classes (ANDERSON e KEDERSHA, 2008):

- Complexos de iniciação ligados ao mRNA: são recrutados para os SGs a partir da desagregação de polissomos e constituídos por transcritos de mRNA, eIF4E, eIF4F, eIF4B, subunidades ribossomais pequenas e PABP-1 (Proteína que se liga a cauda poli(A) dos mRNAs).
- Proteínas ligantes de mRNA relacionadas ao silenciamento ou estabilização: podem ou não estar presentes em SGs e são agrupadas em proteínas silenciadoras (ex. TIA-1 e TIAR; FMRP e FXR1) ou de degradação (ex. proteínas argonautas, TTP).
- Proteínas ligantes de RNA que regulam aspectos como localização, splicing e edição: G3BP1, FAST e caprina. São proteínas importantes para a nucleação dos SGs.

## Introdução

---

Além da presença de um *pool* de mRNPs, a formação de SGs é afetada por três fatores. O primeiro são as modificações em proteínas que regulam tanto a interação quanto a função de vários componentes de SGs. Enquanto a fosforilação de eIF2 $\alpha$  é necessária em algumas situações (ANDERSON e KEDERSHA, 2008), a fosforilação em componentes importantes como G3BP1, por exemplo, reduz sua localização em SGs (TOURRIÈRE *et al.*, 2003). A acetilação também afeta SGs uma vez que células mutantes em HDAC6 não são capazes de formar Grânulos de Estresse, apesar de os alvos dessa acetilação serem incertos, especula-se que HSP90 e microtúbulos serem sejam possíveis candidatos (KWON *et al.*, 2007).

Outro aspecto da formação dos SGs são os domínios de interação proteína-proteína presentes em diversas proteínas ligantes de RNA. A proteína G3BP1 possui um domínio de dimerização que contribui na formação de SGS durante o estresse oxidativo causado pelo arsenito (TOURRIÈRE *et al.*, 2003). Além disso, várias proteínas envolvidas no metabolismo de RNA possuem domínios ricos em glutamina e asparagina (Q-N) semelhantes a proteínas príon e a habilidade desses domínios de se auto agregar promovem a formação de SGs. Um exemplo são as proteínas TIA-1 e TIA-R que ao terem seus domínios ricos em Q-N deletados, perdem a capacidade de se auto agregar, portanto, não são capazes de formar SGs enquanto a superexpressão do domínio Q-N de TIA-1 leva a inibição de SGS pelo sequestro de ambas as proteínas em micro agregados constitutivos (KEDERSHA *et al.*, 2000).

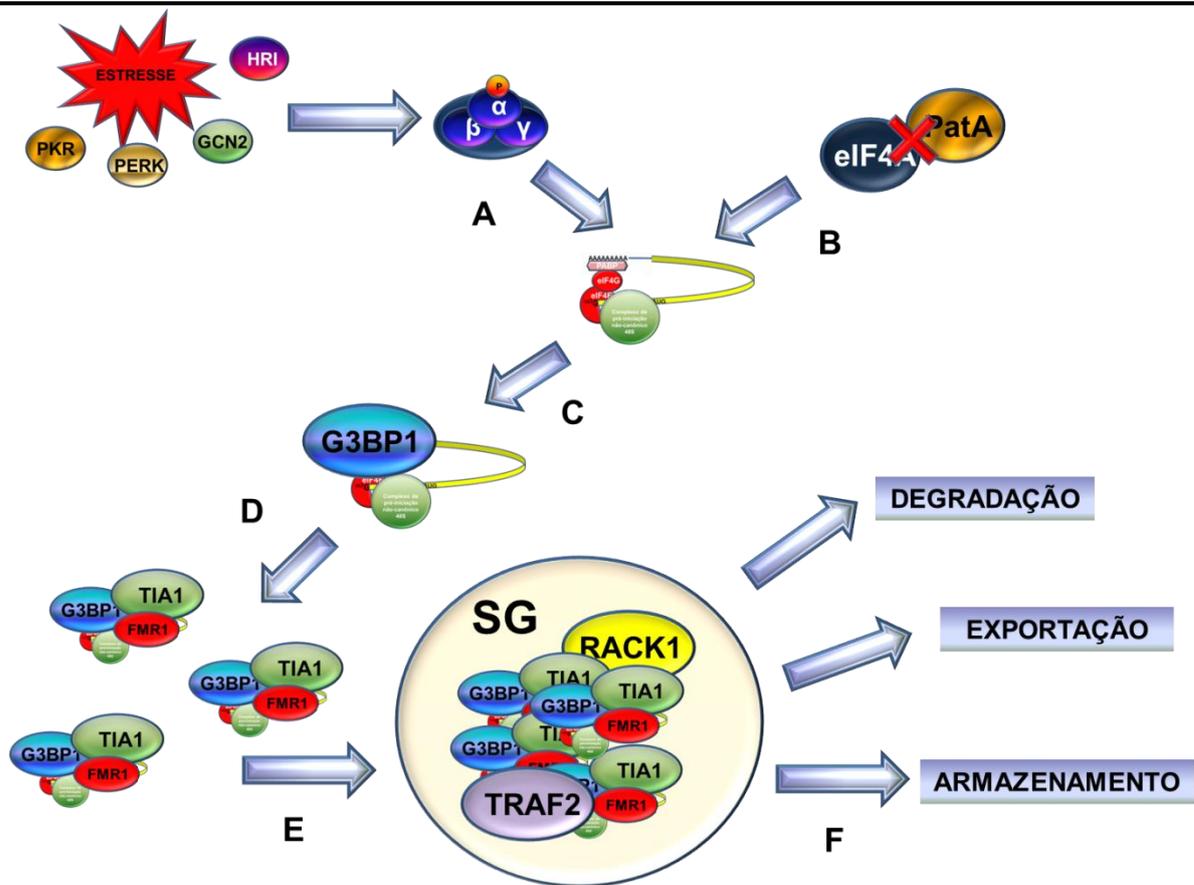
Por fim, a rede de microtúbulos é o último elemento que contribui para a formação de SGs, uma vez que drogas, como o Nocodazol, que levam a despolimerização de microtúbulos inibem a formação de Grânulos de Estresse, apesar de ainda pequenos SGs serem visíveis (KWON *et al.*, 2007). As proteínas motoras dineína e quinesina são também observadas em SGs e experimentos de *knockdown* sugerem sua função na cinética de SGs (LOSCHI *et al.*, 2009).

As fases da formação de Grânulos de Estresse e seus principais eventos são assim descritos (ANDERSON e KEDERSHA, 2008):

- 1) Parada da tradução e desacoplamento dos ribossomos – A fosforilação de eIF2 $\alpha$  (Figura 5A) ou inativação de eIF4A (Figura 5B) levam ao surgimento de complexos de iniciação parados.

- 2) Agregação primária e nucleação de SGs – Mediada por proteínas que se ligam e agregam as mRNPs e fisicamente nucleiam SGs (Figura 5C). Leva a uma mudança no equilíbrio entre mRNPs e polissomos, competindo pelos complexos 48S.
- 3) Agregação secundária – Cada transcrito de mRNA se liga a múltiplas proteínas que, por interações proteína-proteína, formam SGs menores que se agregam e geram a formação de SGs microscopicamente visíveis (Figura 5D).
- 4) Integração e sinalização – Proteínas que não possuem propriedades de se ligar a mRNAs são recrutadas para SGs por meio de interações proteína-proteína integrando outras vias de sinalização importantes com a resposta traducional ao estresse (Figura 5E).
- 5) Triagem de mRNA – mRNAs específicos são selecionados para a degradação, exportação ou ainda armazenamento para posterior liberação para tradução (Figura 5F).

A dissolução dos SGs em células que se recuperam de estresse ocorre rapidamente. Esse processo ocorre similarmente a uma dissolução, ao invés de uma fragmentação, e de modo sincronizado, SGs de uma única célula se dispersam de modo homogêneo (KEDERSHA *et al.*, 2005).



**Figura 5 – Fases da formação de Grânulos de Estresse (SG).** A fosforilação de eIF2 $\alpha$  (A) ou a inibição de eIF4A (B), geram parada da tradução e formação dos mRNPs. Esses, por sua vez, se ligam a proteínas ligadoras de RNA e nucleiam SGs – Ex. G3BP1 (C). Outras proteínas, que também se ligam aos mRNPs, são recrutadas e auxiliam na nucleação e formam protogrânulos (D). Ocorre o recrutamento de outras proteínas importantes para a ativação de vias de sinalização de resposta ao estresse celular – Ex: RACK1 e TRAF2 (E). Após a recuperação da célula, é feita uma triagem dos mRNAs para degradação, exportação ou armazenamento (F). Adaptado de Anderson e Kedersha, 2009.

#### 1.4.4 – Sinalização celular e SGs

Diversas proteínas sinalizadoras e enzimas podem ser recrutadas para SGs, incluindo proteínas adaptadoras, quinases, fosfatases, nucleases, helicases, transferases, dentre outras (KEDERSHA *et al.*, 2013). Algumas dessas proteínas são nucleadoras de SGs e a redução da sua expressão inibe a formação de grânulos, portanto, sua habilidade de promover a formação de SGs pode influenciar qualquer via de sinalização cujos componentes migram para os SGs (KEDERSHA *et al.*, 2013).

## Introdução

---

Por exemplo, o recrutamento de proteínas como TRAF2 (do inglês – *TNF Receptor Associated Factor 2*) e RACK1 (do inglês – *Receptor for Activated C Kinase*) para SGs inibe as vias de sinalização nas quais essas proteínas participam, sem afetar a formação dos SGs, portanto atuando abaixo na via (KEDERSHA *et al.*, 2013).

TRAF2 é uma proteína que liga o receptor de TNF à ativação do fator de transcrição NFκB. Em células submetidas a choque térmico, por exemplo, eIF4G recruta TRAF2 para os SGs, desabilitando a cascata de ativação de NF-κB que, por sua vez, ativa a expressão de uma série de genes pró-inflamatórios (KIM *et al.*, 2005).

RACK1 é uma proteína que integra adesão celular, polaridade e motilidade (ADAMS *et al.*, 2011). É parte integral da subunidade ribossomal 40S e se liga ao complexo eIF3, que são componentes principais de SGs. O sequestro de RACK1 para os grânulos tem como consequência, então, a não ativação da via p38/JNK inibindo a ativação da apoptose (ARIMOTO *et al.*, 2008).

A quinase altamente conservada TOR forma dois complexos distintos (TORC1 e TORC2) que controlam o crescimento e o metabolismo celular (EFEYAN *et al.*, 2012). A formação de SGs altera a sinalização de TORC1 também por recrutar esta proteína e outras quinases dessa via durante o estresse (WIPPICH *et al.*, 2013). Sob condições ótimas de crescimento, sinais vindos de receptores de fatores de crescimento e nutrientes mantêm TORC1 ativo em membranas lisossomais e vacuolares (EFEYAN *et al.*, 2012), permitindo que TORC1 promova a síntese proteica e iniba a autofagia. A privação de aminoácidos inativa TORC1 e ocorre a sua liberação da membrana lisossomal (YAN *et al.*, 2012). A TORC1 inativada então se acumula em SGs formados pela fosforilação de eIF2α por GCN2. Durante a recuperação do estresse nutricional, a reativação de TORC1 se correlaciona a sua liberação dos SGs dissolvidos e isso sugere que SGs possuem um papel fundamental na regulação da atividade de TORC1 (WIPPICH *et al.*, 2013).

Outra via de sinalização já descrita como sendo regulada pela formação de Grânulos de Estresse é a da Rho GTPase, responsável pelo tráfego de vesículas no interior da célula, progressão do ciclo celular e rearranjo do citoesqueleto (CHI *et al.*, 2013; HANNA E EL-SIMBAI, 2013). Quando ativada, a proteína RhoA (do inglês – *Ras homolog gene Family member A*) se liga e ativa a proteína ROCK que, por sua vez, ativa a via JNK por fosforilação

de um de seus componentes, levando a célula à apoptose (ONGUSAHA *et al.*, 2008). De modo antagônico ao recrutamento de RACK1 para os SGs, o que impede a apoptose induzida por JNK, o recrutamento de ROCK1 ativo para os SGs ativa JNK e causa apoptose (TSAI e WEI, 2010). Portanto, a formação de SGs sinaliza um estado emergencial que altera o programa de RhoA/ROCK1 para preservar a sobrevivência da célula.

#### **1.4.5 – Envolvimento de SGs na resistência a agentes antitumorais**

Apesar dos estudos a respeito do envolvimento da sinalização que leva a formação de Grânulos de Estresse e sua relação com a resistência a diversos tipos de estresse, pouco é conhecido do envolvimento direto da formação de SGs e mecanismos associados à quimiorresistência a agentes antitumorais.

Alguns estudos já relacionaram a sobrevivência de células tumorais com a formação de SGs em resposta à exposição de agentes quimioterapêuticos.

A primeira relação direta descrita entre Grânulos de Estresse e resistência a drogas antitumorais foi feita por Fournier *et al.* (2010), que realizaram ensaios com o inibidor de proteassoma Bortezomibe e observaram que essa droga é capaz de estimular a formação de SGs e que esta formação influencia na resistência das linhagens tumorais HeLa (cervix), Calu-1 (pulmão) e Caco (cólon) à apoptose. Por outro lado, a linhagem Hs578T (mama) não apresentou a formação de SGs, sendo mais susceptível à droga. Isto demonstra que, apesar de a indução da formação dos SGs não ser comum a todas as linhagens tumorais, a ausência da formação dos mesmos está, de certa forma, associada à susceptibilidade a agentes antineoplásicos (FOURNIER *et al.*, 2010). Bortezomibe leva a fosforilação de eIF2 $\alpha$ , levando a formação de SGs, via a quinase HRI e o silenciamento desta proteína, impede que ocorra a formação de SGs em células expostas ao Bortezomibe e leva a ativação de apoptose, o que correlaciona a presença de SGs a estímulos anti apoptóticos (FOURNIER *et al.*, 2010).

Em um estudo seguinte do mesmo grupo, foi demonstrado que a inibição da formação de SGs por meio ensaios de *knockdown* leva a apoptose devido à liberação do mRNA de p21, que se localiza nos SGs durante o estresse celular (GAREAU *et al.*, 2011). A proteína p21 é um inibidor de quinase dependente de ciclina (CDKI) que possui funções relacionadas à

---

## Introdução

---

supressão tumoral que quando ativada leva a parada do ciclo celular, podendo culminar na apoptose (GAREAU *et al.*, 2011). Foi demonstrado que há uma localização do mRNA de p21 em SGs que leva a redução da expressão da proteína p21, conseqüentemente a resistência a apoptose mediada por Bortezomibe. Em contrapartida, a inibição da formação de SGs leva ao aumento da expressão de p21 e conseqüente apoptose induzida por Bortezomibe (GAREAU *et al.*, 2011).

Há outro agente antineoplásico usado para o tratamento de vários tipos de tumores como mama, colorretal e de cabeça e pescoço, o 5-Fluoracil (5-FU) que induz a formação de SGs. O 5-FU causa citotoxicidade por um mecanismo de ação que envolve a interferência com a atividade da enzima timidilato sintase e pela incorporação do composto em intermediários de DNA e RNA. A incorporação de 5-FU em RNA leva a ativação da quinase PKR, fosforilação de eIF2 $\alpha$  e a formação de SGs (GARCIA *et al.*, 2011). Os grânulos formados sequestram RACK1, inibindo então a apoptose e reduzindo o efeito da droga (GARCIA *et al.*, 2011).

Selenito de sódio, agente antineoplásico que contém selênio, promove a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e apoptose de células tumorais. Ativa a via de estresse do retículo endoplasmático, provocando a fosforilação de eIF2 $\alpha$  e a formação de SGs dependentes de ROS em células de próstata e osteosarcoma (FUJIMURA *et al.*, 2012). Porém, os SGs induzidos por selenito não possuem componentes como eIF3b e Rack1, além da fosforilação de eIF2 $\alpha$  ser dispensável (FUJIMURA *et al.*, 2012).

A fosforilação de eIF2 $\alpha$  é um ativador-chave na formação de SGs e da via ISR, porém, também há a formação de grânulos de modo independente de eIF2 $\alpha$ . Compostos que induzem a formação de SGs sem a fosforilação de eIF2 $\alpha$  já foram descritos, alguns dos quais são particularmente relevantes a biologia de tumores (ANDERSON *et al.*, 2015; KEDERSHA *et al.*, 2013).

Conforme citado acima, a formação de SGs induzida por selenito é independente da fosforilação de eIF2 $\alpha$  e depende sim da ação da proteína 4EBP1, que se liga ao fator eIF4F, impedindo que haja a formação do complexo de tradução, ativando a formação de SGs. Porém, esses SGs são funcionalmente distintos dos SG canônicos, pois a sua formação leva à morte celular, ao invés de ativar vias de sobrevivência (FUJIMURA *et al.*, 2012).

## *Introdução*

---

Pelo menos outras três drogas têm como alvo componentes do complexo eIF4F, principalmente a helicase eIF4A e induzem a formação de SGS. Uma delas é a Pateamina A, que é um metabólito isolado de uma esponja marítima que é capaz de se ligar a eIF4A, estimular sua atividade enzimática, gerando a quebra da ligação entre eIF4A e eIF4G, levando à mesma consequência das células tratadas com selenito (BORDELEAU *et al.*, 2005; DANG *et al.*, 2006;).

O eIF4A é necessário para a tradução de mRNAs que possuem regiões 5'UTR altamente estruturadas que codificam proteínas envolvidas na carcinogênese, portanto a sua inativação e consequente formação de SGs podem regular a tradução e/ou sublocalização celular de tais transcritos (ANDERSON *et al.*, 2015). Novos estudos que possam contar com abordagem genômicas amplas, tais como análise do perfil de poliribossomos correlacionando com a localização subcelular de mRNAs alvos selecionados, podem ser capazes de compreender melhor os complexos mecanismos pelos quais agentes quimioterapêuticos induzem a formação de SGs em células de tumores (ANDERSON *et al.*, 2015).

## **2 – JUSTIFICATIVA**

Tumores do SNC, tais como os glioblastomas, possuem uma baixa incidência relativa na população, porém, contribuem de modo significativo para a morbidade global (OMS, 2014). No Brasil, em 2014, foram estimados cerca de 9 mil novos casos de tumores desse tipo e a taxa de risco fica de 5,07 casos novos a cada 100 mil homens e 4,05 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2014). A distribuição etária da incidência possui um pico em crianças e outro em adultos acima dos 45 anos (OMS, 2014).

Os gliomas malignos consistem em uma ampla variedade de entidades histológicas que respondem mal à maioria dos tratamentos-padrão. Eles surgem em áreas funcionais críticas do cérebro que oferecem um grande desafio para os cirurgiões, além de possuir uma alta propensão a se infiltrarem no tecido cerebral e não haver fatores de risco conhecidos ou sequer estratégias preventivas (DIRKS, 2010).

Considerando-se a resistência dos glioblastomas, aos tratamentos-padrão, faz-se necessário o estudo de novas estratégias de se sensibilizar células tumorais aos compostos quimioterápicos e/ou à radioterapia. Um possível alvo de interferência são os Grânulos de Estresse (SGs), que estão envolvidos na maquinaria de regulação da expressão de proteínas celulares (ANDERSON e KEDERSHA, 2009) mais especificamente proteínas envolvidas na resposta a danos celulares.

Esses Grânulos de Estresse se formam em células submetidas ao estresse (falta de nutrientes, hipóxia, exposição a agentes quimioterapêuticos), são compostos por diferentes mRNA os quais pode ser, eventualmente, traduzidos, além de proteínas responsáveis pelo início da tradução (ANDERSON e KEDERSHA, 2008). Durante uma situação de estresse, como a exposição a agentes citotóxicos, hipóxia ou privação de nutrientes, a célula interrompe a tradução de várias proteínas (ANDERSON e KEDERSHA, 2009). O principal evento que ocorre nessas situações é a fosforilação da subunidade  $\alpha$  do fator de iniciação da tradução (eIF2 $\alpha$ ), um dos principais componentes da denominada resposta integrada ao estresse (ISR). As principais características desta via são redução global da tradução, dissociação dos polissomos e a formação de SGs, que levam a célula a reprogramar seu repertório translacional por meio da triagem dos mRNAs. Por ser a principal via de formação de SGs, a interferência na fosforilação de eIF2 $\alpha$  é um alvo interessante para incapacitar a célula de responder ao estresse (ANDERSON e KEDERSHA, 2009).

---

---

Em uma revisão recente, Kedersha *et al.* (2013) sugerem que a ativação e formação dos Grânulos de Estresse não são apenas uma forma de a célula sobreviver ao estresse citotóxico por meio de armazenamento de mRNAs não-traduzidos, mas sim funcionam como forma de integrar diversas vias de sobrevivência por meio da interação de proteínas ligadoras de RNA com seus respectivos alvos e proteínas acessórias de vias clássicas de sobrevivência (KEDERSHA *et al.*, 2013)

Alguns trabalhos já demonstraram que agentes quimioterapêuticos são capazes de fosforilar eIF2 $\alpha$ , ativando a formação de SGs e que interferir nessa via é uma forma viável de sensibilização de células tumorais a esses agentes (FOURNIER *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2011; GAREAU *et al.*, 2011).

Portanto, uma vez que a fosforilação de eIF2 $\alpha$  é um dos eventos principais na formação dos SGs, a redução dessa sinalização poderia ser uma ferramenta interessante para também reduzir a capacidade das células de glioblastoma de formar SGs e, conseqüentemente, torná-las mais sensíveis a drogas antitumorais.

***A nossa hipótese é de que existe uma relação direta entre a formação destes Grânulos de Estresse e a resistência multidrogas pelos tumores cerebrais.*** Algo que ainda não foi descrito na literatura e que pode representar alvo interessante no tratamento dessas neoplasias.

Dessa forma, especulamos que, ao se interferir na formação dos SGs, poder-se-ia aumentar a sensibilidade dos tumores cerebrais a fármacos utilizados atualmente na prática clínica. Com isso, aumentar-se-ia a eficácia dos tratamentos sem, contudo, expor o paciente a doses elevadas de drogas que ocasionariam efeitos colaterais nocivos sem, necessariamente, melhorar o prognóstico.

### **3 – OBJETIVOS**

#### 3.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação dos Grânulos de Estresse na resposta a agentes antineoplásicos em linhagens celulares de tumores cerebrais.

#### 3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade (e determinar a  $EC_{50}$ ) de compostos antineoplásicos de uso comercial, que apresentam diferentes mecanismos de ação, sobre as linhagens C6 (murina) e U87MG (humana) de glioblastoma;
- Avaliar se as linhagens celulares em estudo são capazes de formar Grânulos de Estresse quando expostas aos agentes antineoplásicos;
- Avaliar o efeito da inibição da fosforilação da proteína eIF2 $\alpha$ , sobre a citotoxicidade aos agentes antineoplásicos em estudo;
- Avaliar o efeito da inibição da formação de Grânulos de Estresse por meio de RNA de interferência (RNAi), tendo como alvo o componente de Grânulos de Estresse G3BP1, sobre a citotoxicidade e morte celular.

## **4 – MATERIAIS E MÉTODOS**

### 4.1 – CULTIVO CELULAR

Células tumorais cerebrais das linhagens C6 (glioma murino) e U87MG (glioblastoma humano), provenientes da ATCC (*American Type Culture Collection*), foram cultivadas em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> e a 37°C de temperatura. O meio de cultura utilizado foi o *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), enriquecido com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina e Glutamax 1X – meio DMEM completo. Para a linhagem C6 foi usado DMEM com 1g/L de glicose (baixa glicose) e para a linhagem U87MG foi usado DMEM com 4,5g/L de glicose (alta glicose). Meios de cultura usados e suplementos fornecidos por Cultilab e Glutamax por Gibco.

As células que foram utilizadas nos experimentos estavam entre 70–80% de confluência no momento do repique e assíncronas (apresentando todas as fases do ciclo celular). Após tratamento com uma solução de tripsina bovina/EDTA (Cultilab) para descolamento das mesmas por cinco minutos, tiveram sua viabilidade avaliada pelo método de exclusão do azul de Tripán.

O azul de Tripán é um corante de alto peso molecular que apenas penetra em células que apresentem a integridade estrutural de sua membrana plasmática comprometida ou em células que estejam mortas. A avaliação da viabilidade celular por meio desse método consiste em incubar as células por um minuto com este corante e quantificá-las com o auxílio de uma câmara de *Neubauer*. As células consideradas viáveis são aquelas que se apresentaram incolores em contraste com as consideradas inviáveis, que se coraram em azul. Apenas as células consideradas viáveis foram levadas em conta no cálculo final para o plaqueamento.

A manutenção das culturas foi garantida através do congelamento em nitrogênio líquido (fase de vapor) de alíquotas contendo  $2,0 \times 10^6$  células em meio de congelamento (80% SFB, 10% DMEM completo e 10% de DMSO -dimetilsulfóxido).

---

#### 4.2 – AGENTES ANTINEOPLÁSICOS

Os agentes usados no presente estudo possuem características químicas e mecanismos de ação diversos, a saber: Bortezomibe (inibidor de proteassoma, envolvido na degradação de proteínas intracelulares), Cisplatina (agente intercalante que se insere no DNA impedindo a transcrição) e Etoposídeo (inibidor de topoisomerase, enzima envolvida na replicação do DNA). Todos esses agentes são usados na clínica para tratamento de diversas malignidades, além de eventualmente serem usados como adjuvantes no tratamento de GBM. Todos foram preparados em forma de solução estoque, de acordo com instruções do fabricante, e armazenados em pequenas alíquotas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

Além desses, em ensaios de avaliação de formação de Grânulos de Estresse foi usado o Arsenito de sódio e nos ensaios de avaliação de apoptose foi usada a Estaurosporina como controles positivos. Bortezomibe foi fornecido por LC Labs: Arsenito de sódio, Cisplatina, Etoposídeo e Estaurosporina fornecidos por Sigma.

#### 4.3 – AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Para avaliar a citotoxicidade dos agentes em estudo foi utilizado o reagente PrestoBlue (Invitrogen). Este reagente é uma solução baseada em resazurina que funciona como um indicador de viabilidade celular por meio da utilização do poder redutor de células vivas para converter a resazurina (azul) em resorufina (vermelha). A detecção da alteração de cor foi feita por espectrofotometria, com leitura a 570 nm tendo como referência 600 nm. A densidade óptica (DO) é o valor de absorbância dado pela fórmula  $Ab_{570\text{nm}} - Ab_{600\text{nm}}$ . A partir dos valores obtidos foi feita uma curva concentração resposta tendo como parâmetro o percentual de conversão de resazurina, indicativo da viabilidade celular e foi feito o cálculo do  $EC_{50}$ , dado importante para determinar a concentração a ser usada nos testes seguintes.

---

#### 4.4. – WESTERN BLOT

A avaliação da expressão de todas as proteínas de interesse foi feita por meio de *western blot*, usando um aparato Bio Rad. Todo o protocolo utilizado foi previamente estabelecido por Sousa *et al.* (2005)

Após os tratamentos descritos nos itens anteriores desta seção, as células tiveram seu meio de cultura removido, foram lavadas com PBS e foi feita a lise em gelo utilizando 300 µl de um tampão de lise celular (1% v/v de Triton X-100, 100mM de Tris/HCl pH 8,0, 10% de glicerol, 0,2 mM de EDTA, 1mM de NaVO<sub>3</sub>, 1mM de DTT, 1mM de PMSF, 200mM de NaCl, 25 mM de NaF, leupeptina e aprotinina), em seguida foi realizada a raspagem da placa por meio de um *cell scraper*. O extrato foi aspirado e acondicionado em tubos de micro centrífuga e homogeneizado por vortex em pulsos. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 12.000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C (centrífuga Eppendorf modelo 580R), sendo o sobrenadante aliqüotado e guardado à -20°C até o momento de uso.

Para realizar a dosagem de proteínas totais contidas no lisado celular foi utilizado o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad), baseado no método de Bradford. O ensaio foi realizado em uma placa de micro titulação de 96 poços e consistiu na adição de 2 µL de cada amostra a 200 µL do corante diluído 5 vezes em água MilliQ, em duplicatas. Paralelamente é feita uma curva-padrão utilizando como padrão BSA 1mg/mL. Após 5 minutos de incubação, a leitura é feita em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) a 595 nm. A absorvância das amostras é comparada com a absorvância da curva.

Os extratos proteicos totais (30 mg) foram desnaturados, misturando-se a amostra com tampão de amostra (10% SDS, 10% b-mercaptoetanol, 40% glicerol, 0.05% azul de bromofenol, 0.250M Tris/HCl pH 6,8) e a mistura mantida a 100°C por 5 minutos. Os extratos foram fracionados em gel de 10% de poliacrilamida/SDS e transferidos para membrana de nitrocelulose (Millipore). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com TBS-Tween 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado, lavadas com TBS-Tween, e incubadas com o anticorpo primário de interesse a 4°C por uma noite.

Os anticorpos utilizados no presente trabalho foram anti-G3BP1 (Santa Cruz #sc-365338 – 1:500), anti-FMR1 (Santa Cruz #sc-10547 – 1:500), anti-eIF2 $\alpha$  (Cell Signaling #5324S – 1:1000), anti-peIF2 $\alpha$  (Cell Signaling #3398S – 1:1000), anti-BAX (Cell Signaling #2772 –

1:1000) e anti- $\beta$ -Actina (Sigma # A2228 – 1:3000. Após nova lavagem com TBS-Tween e incubação durante 1 hora à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário respectivo ligado à peroxidase, as membranas foram incubadas em solução reveladora ECL-Plus (GE Healthcare), expostas contra filme de raio X (Kodak) e reveladas utilizando-se revelador e fixador (Kodak), de acordo com indicações do fabricante.

#### 4.5 – DETECÇÃO DE GRÂNULOS DE ESTRESSE

Os Grânulos de Estresse (SGs) são compostos por diversas proteínas, além de fatores de iniciação da tradução e mRNAs não traduzidos. Portanto, primeiramente foi avaliado por *western blot* (descrito na seção 4.3) se as células em estudo eram capazes de expressar dois dos componentes dos SGs, as proteínas G3BP1 e FMR1. Uma vez confirmada a presença desses marcadores, foram realizados os ensaios de detecção dos SGs.

Para esse fim, as células em estudo foram semeadas na densidade de  $2 \times 10^5$  células/poço em lamínulas de vidro circulares pré-tratadas com uma solução de gelatina a 0,2% em uma placa de 24 poços e incubadas por uma noite para permitir sua adesão.

Após este período, as células foram tratadas com os agentes antineoplásicos em estudo, além do arsenito de sódio como controle positivo em vários tempos. Decorrido este tempo, o meio foi aspirado, as células foram lavadas com PBS e fixadas e permeabilizadas com uma solução de paraformaldeído 4% em PBS, por 15 minutos, seguida de metanol gelado por 30 minutos. Em seguida, foi feito o bloqueio por 30 minutos com PBS contendo 3% de BSA. Foi feita a marcação com anticorpos primários específicos para as proteínas G3BP1 e FMR1 (os mesmos usados para *western blot*). Foram usados anticorpos secundários fluorescentes, AlexaFluor 488 (excitação 488nm e emissão 490-525nm) e AlexaFluor 594 (excitação 594nm e emissão 590-617nm), respectivamente. Todos os anticorpos foram diluídos a uma razão de 1:200 em PBS contendo 3% de BSA. Anticorpos primários fornecidos por Santa Cruz e secundários por Molecular Probes. As imagens foram obtidas com o microscópio de fluorescência Fluid (Life Technologies) e a presença de SGs foi avaliada pela formação de *foci* duplamente marcados.

#### **4.5.1 – Inibição da formação de Grânulos de Estresse**

A fim de avaliarmos a importância da formação dos Grânulos de Estresse para a resposta aos diversos agentes aqui propostos, foram feitos experimentos utilizando abordagens diferentes para cada linhagem celular.

##### 4.5.1.1 – Plasmídeo

Para as linhagens C6 e U87, foi usado um plasmídeo contendo o dominante negativo do gene eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ ) fornecido pelo Prof. Aristóblo Mendes da Silva e descrito por Kaufman et al. (1989). Este dominante negativo apresenta uma mutação no resíduo de serina 51 para uma alanina (S51A) da proteína, que impede a sua fosforilação. Isto levaria a uma diminuição do sinal gerado pela fosforilação, pois haveria uma competição entre o dominante negativo e a proteína endógena.

A transfecção deste plasmídeo foi realizada por meio do reagente PEI (Poli-etileno-imino) Max, fornecido pelo Prof. Aristóblo. Anteriormente à transfecção de eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ , foi feita a padronização usando um plasmídeo contendo a sequência de uma proteína eGFP que tem o mesmo tipo de promotor e foi usado para avaliar a eficiência da transfecção.

Para o protocolo de transfecção, as células foram semeadas em placas de 24 poços, em densidades entre 1 e  $2 \times 10^5$  células por poço, de modo a estarem cerca de 80 a 90% confluentes no momento da transfecção. Em seguida, foram preparados dois mix de transfecção, contendo 1 $\mu$ g de plasmídeo em duas razões diferentes de PEI, 1:5 e 1:10, sendo 1 $\mu$ g para 5 ou 10 $\mu$ L de PEI respectivamente. Estes mix foram preparados em meio OptiMEM e posteriormente foi adicionado DMEM completo. O mix final foi então adicionado a cada poço da placa por gotejamento e em seguida foi feita uma breve homogeneização. Após 24h de incubação, as células foram levadas a um microscópio de fluorescência e tanto a eficiência quanto a toxicidade do reagente usado foram avaliadas.

Após a otimização, para a transfecção de eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$  foi usada a razão 1:5 e o protocolo foi realizado conforme descrito acima. Foram usadas  $2 \times 10^5$  células/poço em placa de 24 poços e após 24h, as células foram tratadas com os agentes antineoplásicos em estudo por 2 horas e para avaliação da formação de SGs foi seguido o protocolo descrito na seção 4.5.

### *Materiais e Métodos*

---

Para análises de expressão proteica e fosforilação de eIF2 $\alpha$ , as células foram semeadas na densidade de  $1 \times 10^6$  células/poço em placa de 6 poços, foram usados 3 $\mu$ g de plasmídeo, também na razão de 1:5 por 24 horas, as células foram tratadas por 2 e 6 horas e os procedimentos foram seguidos de acordo com a seção 4.4.

#### 4.5.1.2 – Silenciamento de RNA

O segundo método que foi utilizado para a linhagem U87MG é mais específico e envolve a utilização da técnica de RNA de interferência, na qual se utiliza de uma pequena sequência de RNA denominada de siRNA (pequeno RNA interferente – do inglês *small interfering RNA*) que é desenhado para um gene específico e se liga ao mRNA de modo a formar um duplex, que é encaminhado para degradação e leva a uma diminuição transiente da expressão gênica (OHN *et al.*, 2008).

Foi usado o kit TriFecta da IDT que contém: três siRNAs específicos para o mRNA de G3BP1, um siRNA controle negativo ou *scramble* (siRNA aleatório sem qualquer alvo conhecido) e um controle positivo para o mRNA de HPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) geralmente usado como gene de referência para ensaios de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Os siRNAs foram ressuspensos em tampão apropriado e armazenados a -20°C até o momento do uso.

Para a transfecção foi usado o reagente Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen). O mix de transfecção foi preparado de acordo com instruções do fabricante. Foi usado o meio OptiMEM (Gibco), contendo 5 pmol de siRNA e 0,5  $\mu$ l de lipofectamina por poço em placa de 24 poços e após 24 ou 48h, as células foram tratadas com os agentes antineoplásicos em estudo por 2 horas e para avaliação da formação de SGs foi seguido o protocolo descrito na seção 4.5 e para quantificação do mRNA, os procedimentos estão descritos na seção 4.6. Para avaliação da expressão proteica, as células foram semeadas em placas de 6 poços, foram usados 25 pmol de siRNA e 9  $\mu$ l de Lipofectamine por 48 horas e os demais procedimentos foram seguidos de acordo com a seção 4.4.

---

#### 4.6 – PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

Para verificar o *knockdown* de G3BP1 por meio de RNAi foi utilizada a técnica de PCR em tempo real ou qPCR.

Primeiramente foi feita a extração do RNA total das células transfectadas com cada um dos siRNAs fornecidos no kit supracitado, além do controle negativo (NC1) e de células controle não transfectadas. A extração foi feita com Trizol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, e após quantificação usando um espectrofotômetro NanoDrop, foi feita a síntese do cDNA. Para a síntese foi usado o kit Superscript III (Invitrogen).

A síntese foi feita em duas etapas. Na primeira etapa foi feito um mix contendo 1µl de OligodT, 1µl de dNTPs (10 µM), 1 µl de água livre de nuclease e 1 µg de RNA total. Cada tubo contendo o mix acima foi aquecido a 65°C por 5 minutos em um termociclador, seguido de imersão em gelo por 2 minutos.

Na segunda etapa, foi feito um mix contendo 4 µl do tampão, 1 µl de Taq Superscript III, 1 µl de ditiotreitol (DTT) e 1 µl de RNaseOut (para impedir a ação de RNases que pudessem degradar as amostras). Este mix foi acrescentado a cada tubo contendo o mix anterior e a síntese prosseguiu usando um termociclador (50°C por 90 minutos e 75°C por 15 minutos) em seguida, as amostras foram acondicionadas a -20°C até a realização do qPCR.

Para o experimento de qPCR foi utilizado um equipamento 7500 Fast (Applied Biosystems) e a química SYBR Green.

O mix de reação foi preparado com 5 µl do reagente Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 µl de água livre de nuclease, 1 µl de primer sense e 1 µl de primer antisense específicos para cada um dos genes avaliados (Tabela 2), sendo que a concentração final de cada primer no poço é de 500nM . Este mix foi dispensado em uma placa de 96 poços MicroAmp® Fast Optical (Applied Biosystems) e em seguida foi adicionado a cada poço 2 µl de cada amostra de cDNA diluída 10x (10 ng de cDNA) e a reação foi conduzida a 60°C. A análise da expressão gênica relativa foi feita pelo método  $\Delta\Delta CT$  e a normalização foi feita usando GAPDH como gene de referência. Os valores foram expressos em unidades arbitrárias.

Tabela 2 – Primers usados nos experimentos de qPCR.

Primer	Sequência
<b>hG3BP1 sense</b>	5'CTTGGTGGGTTTGTCACCTGAGC3'
<b>hG3BP1 antisense</b>	5'GGTGTTTGCTGTCTTTCTTCAGGTCC3'
<b>hGAPDH sense</b>	5'GGAGTCCACTGGCGTCTTCAC3'
<b>hGAPDH antisense</b>	5'GAGGCATTGCTGATGATCTTGAGG3'

#### 4.7. – AVALIAÇÃO DA APOPTOSE

A apoptose foi avaliada por citometria de fluxo por meio da marcação das células apoptóticas com *Annexin V/FITC* (BD Biosciences), conforme instruções do fabricante. O método se baseia na marcação celular dupla por Anexina V/FITC e iodeto de propídio (PI). Durante a fase inicial da apoptose, um dos primeiros eventos é a exposição de moléculas de fosfatidilserina (PS) para a face externa da membrana citoplasmática, que é um de seus constituintes. A anexina possui uma grande afinidade por PS e, portanto, se liga a células que tenham PS exposta. O iodeto de propídio (PI) é um corante que apenas penetra em células que tenham a integridade física da membrana plasmática comprometida, o que pode ocorrer tanto na fase final da apoptose quanto na necrose. Então, células Anexina V<sup>-</sup> e PI<sup>-</sup> são consideradas viáveis, Anexina V<sup>+</sup> e PI<sup>-</sup> são consideradas em fase inicial da apoptose e células Anexina V<sup>+</sup> e PI<sup>+</sup> são consideradas mortas (por apoptose ou necrose). As leituras foram feitas em um equipamento Guava EasyCyte 5HT (Millipore) em colaboração com o professor Dawidson Gomes, do departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB. O resultados foram analisados pelo software FlowJo.

A avaliação foi feita também por meio da análise da expressão da proteína pró-apoptótica BAX por meio de *western blot* (descrito na seção 4.4).

---

#### 4.8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi usado o programa Graphpad Prism. A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se o teste t de Student, quando os dados consistiam de apenas dois grupos, e por análise de variância (ANOVA), quando foram comparados três ou mais grupos. Quando a ANOVA indicou significância, os dados foram analisados utilizando o pós-teste de Dunnet ou Newman-Keuls para comparação entre os grupos. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

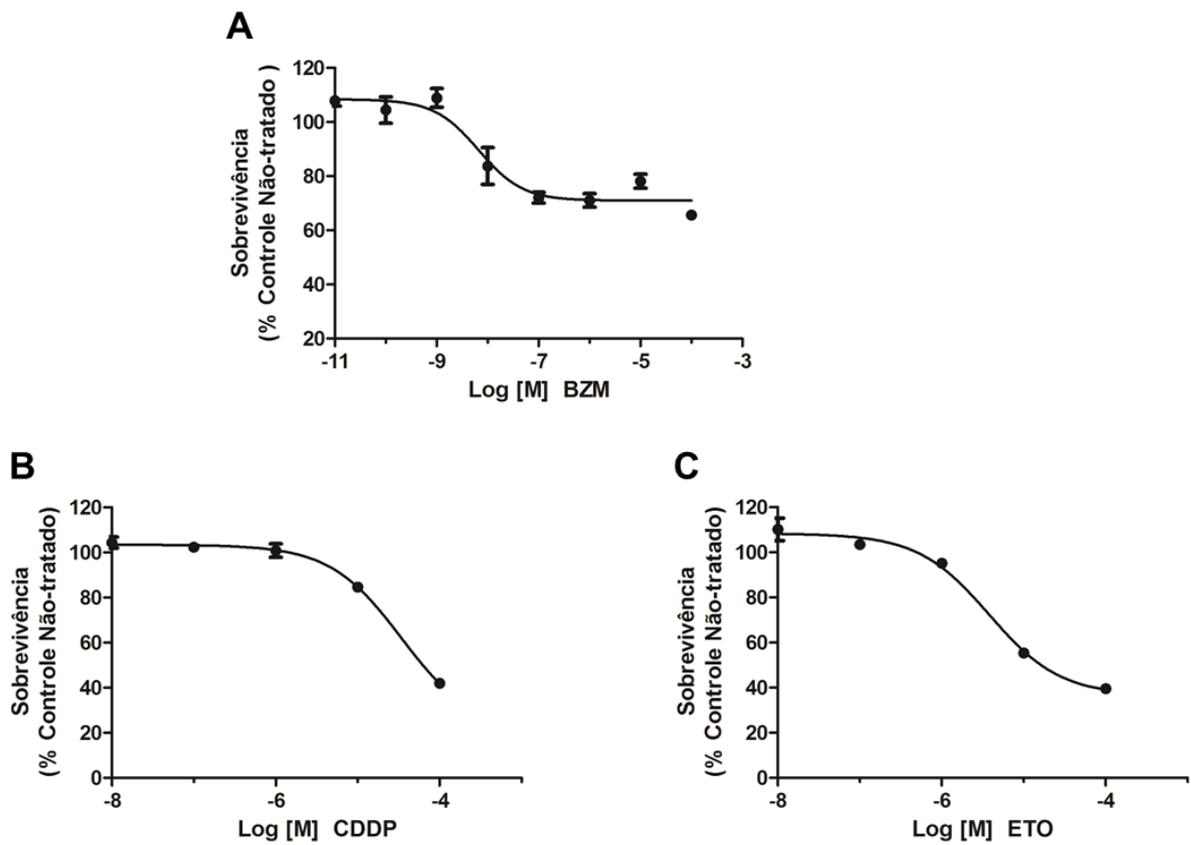
## **5 - RESULTADOS**

### 5.1 – AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

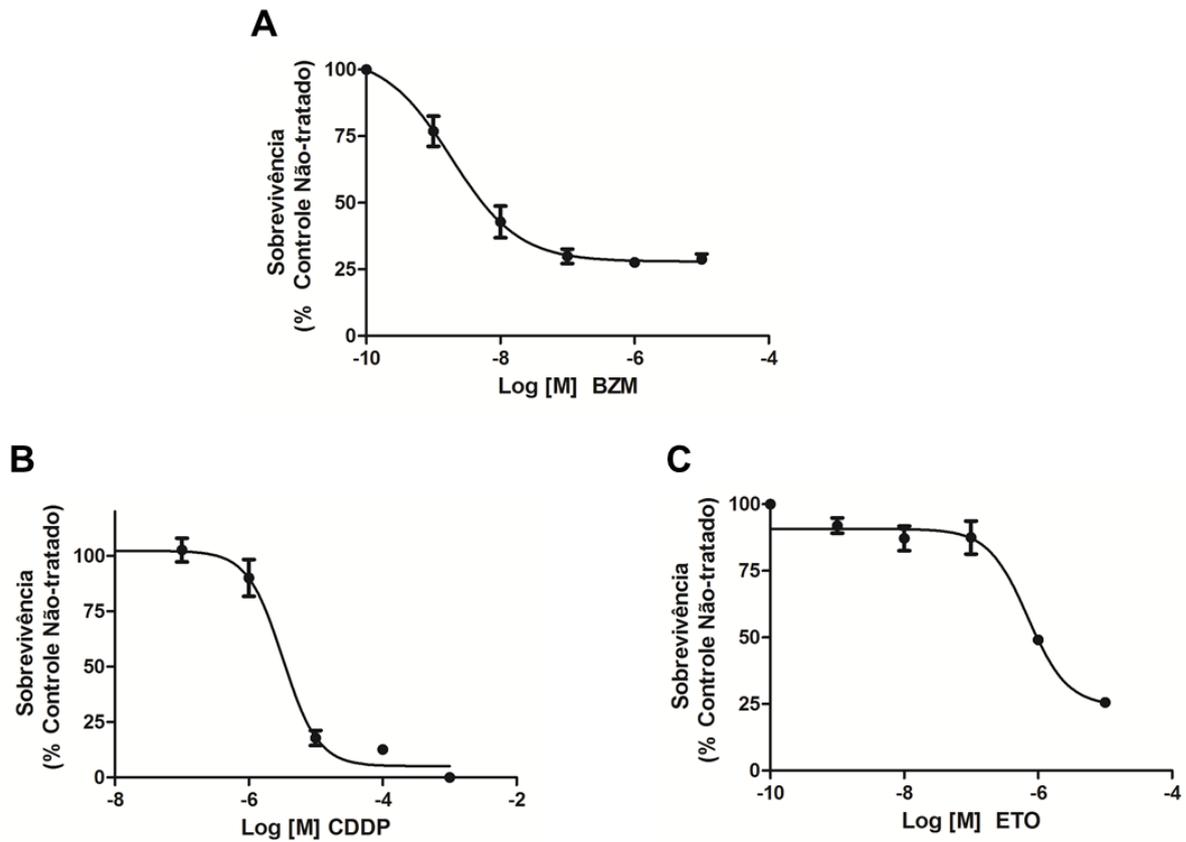
Com objetivo de se estabelecer os parâmetros iniciais de concentração dos agentes usados neste trabalho para os estudos posteriores, realizamos uma avaliação da citotoxicidade de cada um deles nas linhagens C6 e U87MG. Os resultados obtidos (Figuras 6 e 7 respectivamente) demonstraram que todos apresentam uma relativa redução da viabilidade celular. A figura 8 mostra que, após 48 horas de tratamento, pode ser visto que, enquanto Cisplatina (CDDP) e Etoposídeo (ETO) apresentam perfil de citotoxicidade similar, com uma diferença entre drogas de pouco menos que uma ordem de grandeza, o Bortezomibe (BZM) possui um efeito similar, mas com concentração cerca de mil vezes menor. Para a linhagem U87MG (Figura 9), foram obtidos resultados praticamente iguais. Com CDDP e ETO apresentando as mesmas diferenças entre as drogas enquanto BZM é bem mais eficiente, assim como o visto para a outra linhagem.

Interessantemente, a linhagem C6 parece ser um pouco mais resistente em relação a U87MG quando consideramos CDDP e ETO.

Os resultados obtidos foram plotados no programa Graphpad Prism e o valor de  $EC_{50}$  (concentração correspondente a 50% do efeito máximo de cada droga) foi calculado para ambas as linhagens. Ao compararmos os  $EC_{50}$  de cada droga (Tabela 3) observamos que para a linhagem C6, como já mencionado, a diferença entre Cisplatina e Etoposídeo é inferior a uma ordem de grandeza, enquanto o Etoposídeo é 1000 vezes mais eficiente. As mesmas diferenças foram observadas para U87MG. O comparativo entre as linhagens mostra que C6 apresenta uma resistência maior às drogas em questão do que a linhagem U87MG. Uma diferença de cerca de 10 vezes para CDDP e ETO e 5 vezes para BZM.



**Figura 6 - Perfil de citotoxicidade de agentes antineoplásicos sobre a linhagem C6 (glioma de rato).** As células foram semeadas em placas de 96 poços e tratadas por 48h com Bortezomibe (A), Cisplatina (B) e Etoposídeo (C). A viabilidade foi avaliada por PrestoBlue entre os tratamentos. Os experimentos foram feitos em quadruplicata. A figura mostra um resultado representativo de três experimentos independentes.



**Figura 7 - Perfil de citotoxicidade de agentes antineoplásicos sobre a linhagem U87MG (glioblastoma humano).** As células foram semeadas em placas de 96 poços e tratadas por 48h com Bortezomibe (A), Cisplatina (B) e Etoposídeo (C). A viabilidade foi avaliada por PrestoBlue, entre os tratamentos. Os experimentos foram feitos em quadruplicata. A figura mostra um resultado representativo de três experimentos independentes.

**Tabela 3 -  $EC_{50}$  de agentes antineoplásicos usados nas linhagens C6 e U87MG**

Agente	C6	U87MG
<b>Bortezomibe</b>	$6,6 \times 10^{-9}$	$1,5 \times 10^{-9}$
<b>Cisplatina</b>	$3,4 \times 10^{-5}$	$5,1 \times 10^{-6}$
<b>Etoposídeo</b>	$3,8 \times 10^{-6}$	$8,5 \times 10^{-7}$

## *Resultados*

---

### 5.2 – AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR

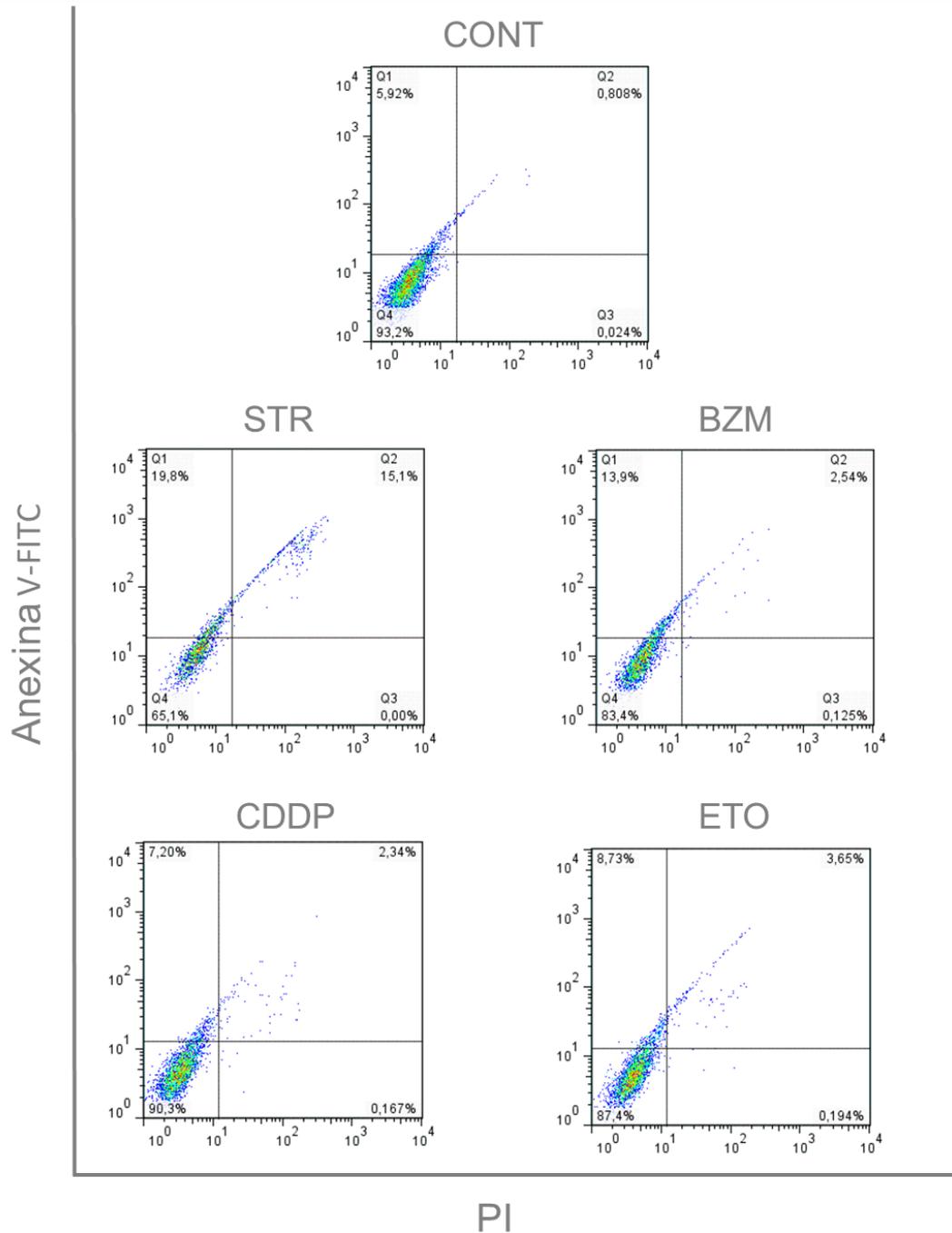
A fim de se avaliar se os agentes em teste causam morte por apoptose, células de ambas as linhagens foram tratadas por 24 horas com os agentes em estudo e em seguida foi realizada a marcação com anexinaV-FITC/PI e analisadas por citometria de fluxo (Figuras 8 e 10).

Foi possível notar que todos os tratamentos levam a marcação tanto de anexina apenas, quanto a marcação por anexina e PI em ambas as linhagens. Os dados obtidos a partir desse experimento foram plotados no Graphpad Prism e analisados quanto ao mecanismo de morte envolvido (Figura 9 e 11).

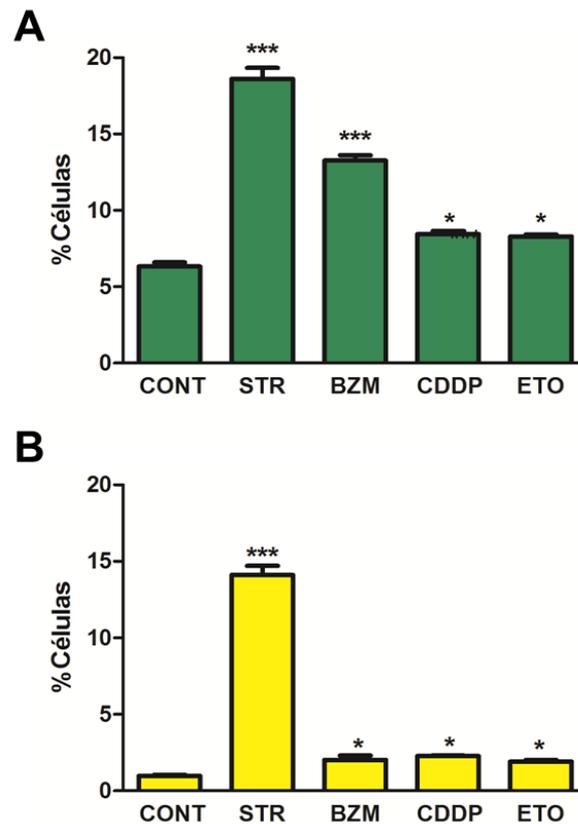
Em todos os tratamentos, foi possível notar diferença significativa entre o percentual de células marcadas somente com anexinaV (verde) e o percentual de células marcadas com PI (amarelo).

Para a linhagem C6, foi possível notar que o Bortezomibe leva a um maior percentual de células a apoptose quando comparado às demais drogas e em um patamar próximo da Staurosporina, enquanto Cisplatina e Etoposídeo estão mais próximos. Entre 10 e 15% das células tratadas com BZM apresentam marcação positiva para anexina-V, enquanto CDDP e ETO apresentam menos de 10%. Células duplamente marcadas ficam abaixo de 5%, exceto as células tratadas com STR, que é o controle (Figura 9).

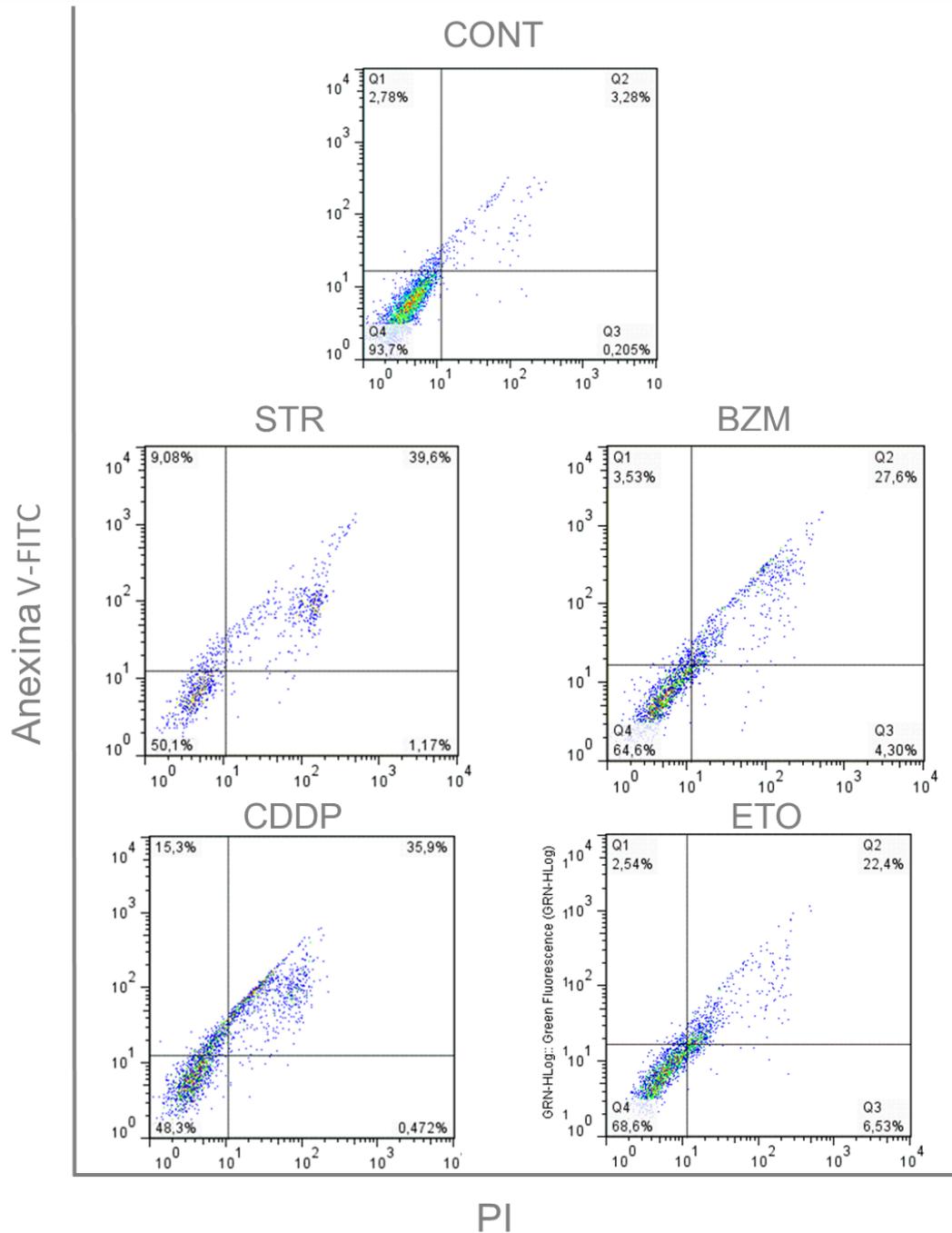
Em contrapartida, nas células da linhagem U87MG foi possível notar que a maior parte das células apresenta dupla marcação, o que pode indicar que no momento da análise, estas células estavam em sua maioria em fase avançada da apoptose. Por exemplo, as células tratadas com BZM apresentam cerca de 80% de dupla marcação enquanto cerca de 5% apresentam marcação com anexinaV. CDDP e ETO também levam a um percentual maior de células com dupla marcação em relação às marcadas somente com anexinaV (Figura 11).



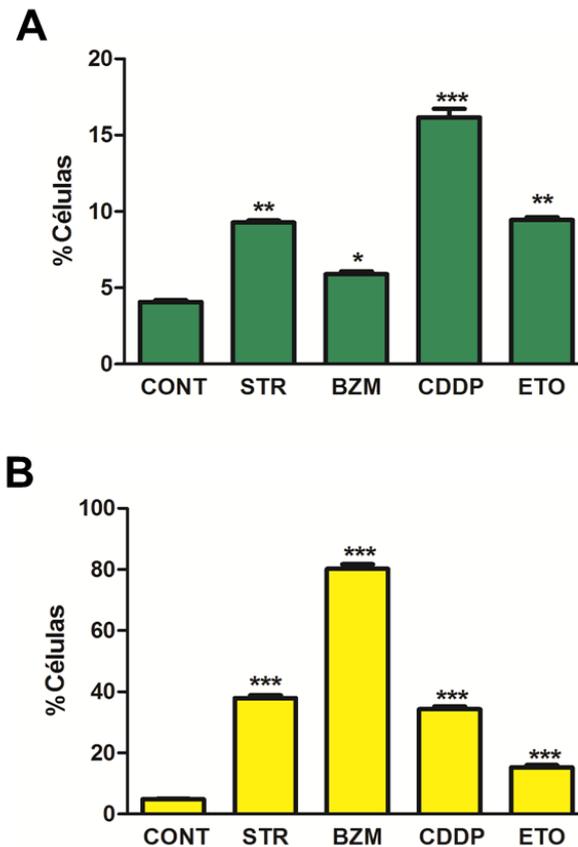
**Figura 8 – Avaliação do mecanismo de morte celular nas células da linhagem C6.** As células foram semeadas em placa de 24 poços e tratadas por 24 horas com Bortezomibe (BZM – 50nM), Cisplatina (CDDP - 500μM) ou Etoposídeo (ETO – 50μM). Estaurosporina (STR – 100nM) foi usada como controle positivo. As células foram marcadas com AnexinaV/PI e as leituras foram feitas com um citômetro Guava Easycyte. Os dados foram analisados pelo software FlowJo. A figura mostra um resultado representativo de três experimentos independentes.



**Figura 9 – Células da linhagem C6 sofrem apoptose quando expostas aos agentes antineoplásicos em estudo.** As células tratadas com Bortezomibe (BZM – 50nM), Cisplatina (CDDP - 500 $\mu$ M) ou Etoposídeo (ETO – 50 $\mu$ M) foram marcadas com anexina V/PI 24 horas após o tratamento e submetidas à citometria de fluxo. Os agentes em estudo levam as células a apoptose, visto que o percentual de células marcadas com anexinaV somente (A) muito superior ao das células com dupla marcação (B). Estaurosporina (STR – 100nM) foi usado como controle positivo. Teste 2-way Anova, \* denota  $p < 0,05$  e \*\*\* denota  $p < 0,001$ . A figura mostra um resultado representativo de três experimentos independentes.



**Figura 10 – Avaliação do mecanismo de morte celular nas células da linhagem U87MG.** As células foram semeadas em placa de 24 poços e tratadas por 24 horas com Bortezomibe (BZM – 50nM), Cisplatina (CDDP 50 $\mu$ M) ou Etoposídeo (ETO – 5 $\mu$ M). Estaurosporina (STR – 100nM) foi usada como controle positivo. As células foram marcadas com AnexinaV/PI e as leituras foram feitas com um citômetro Guava Easycyte. Os dados foram analisados pelo software FlowJo. A figura mostra um resultado representativo de três experimentos independentes.



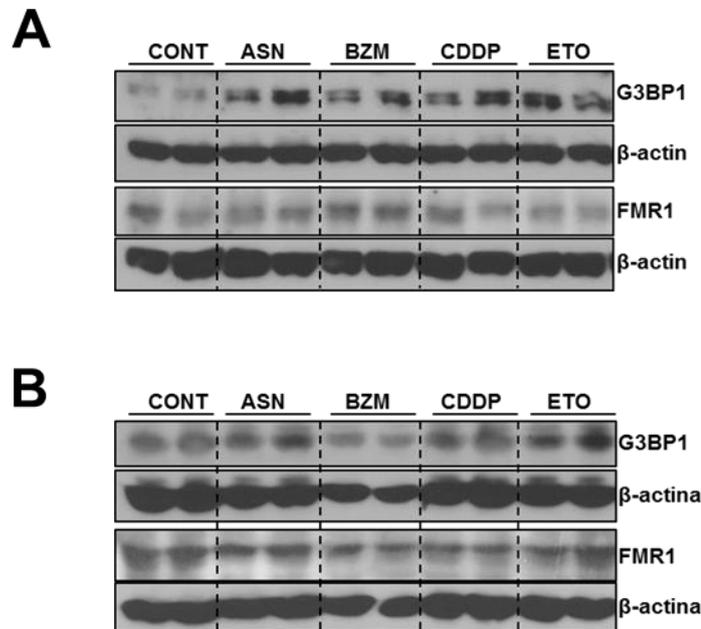
**Figura 11 – Células da linhagem U87MG sofrem apoptose quando expostas aos agentes antineoplásicos em estudo.** As células tratadas com Bortezomibe (BZM – 50nM), Cisplatina (CDDP 50 $\mu$ M) ou Etoposídeo (ETO – 5 $\mu$ M) foram marcadas com anexina V/PI 24 horas após o tratamento e submetidas à citometria de fluxo. As células se apresentam em fase avançada de apoptose, pois o percentual de células marcadas somente com anexinaV (A) é inferior ao percentual de células que apresentam dupla marcação (B). Estaurosporina foi usado como controle positivo. Teste 2-way Anova, \* denota  $p < 0,05$ ; \*\* denota  $p < 0,01$  e \*\*\* denota  $p < 0,001$ . A figura mostra um resultado representativo de três experimentos independentes.

### 5.3 – AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE GRÂNULOS DE ESTRESSE

Antes de avaliar o efeito dos agentes em estudo sobre a formação de Grânulos de Estresse, foi analisada a expressão dos marcadores selecionados para a detecção da formação de SGs, G3BP1 e FMR1. Células de ambas as linhagens foram expostas aos agentes antineoplásicos em estudo por duas horas e foi obtido um extrato proteico. Em seguida, foi realizado um *western blot* e os resultados obtidos estão na figura 12. Na linhagem C6 (A), aparentemente, há um aumento da expressão de G3BP1, enquanto não há alterações na expressão de FMR1. Na linhagem U87MG (B), não há alteração na expressão de ambas as proteínas. O resultado

## Resultados

geral deste experimento aponta que as duas linhagens expressam as proteínas selecionadas e, portanto, elas podem ser usadas como marcadores para a análise da expressão dos Grânulos de Estresse.

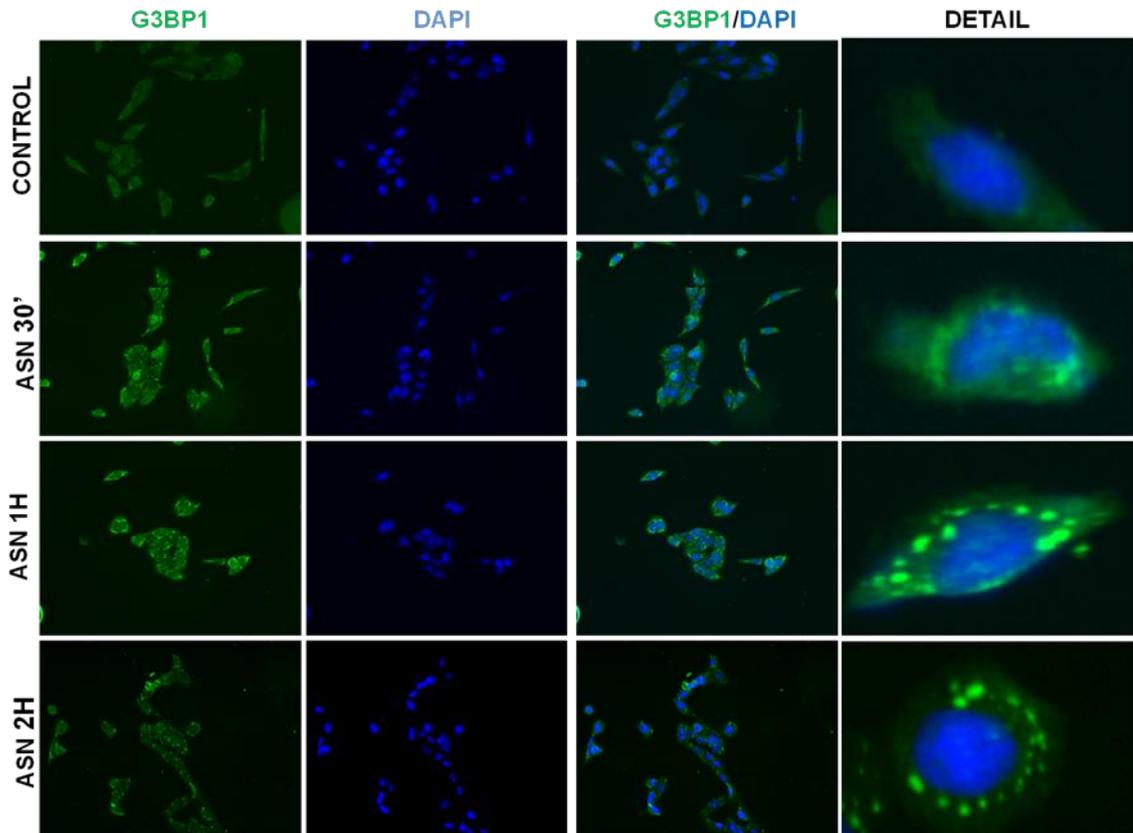


**Figura 12 - Avaliação da expressão dos componentes de SGs, G3BP1 e FMR1 em células da linhagem C6 e U87MG.** Células foram tratadas com os agentes em estudo Bortezomibe (BZM – 50 $\mu$ M), Cisplatina (CDDP – 5mM) e Etoposídeo (ETO – 50 $\mu$ M) por 2 horas em seguida lisadas e o extrato submetido a uma eletroforese seguida de *western blotting*. Arsenito de sódio (ASN) foi usado como controle positivo. Experimentos feitos em duplicata.

A formação de SGs depende da agregação das proteínas que, juntamente com o mRNA não traduzido e seus fatores associados, já são expressas pelas células submetidas ao estímulo estressor e após a ativação da sinalização de parada da tradução, se agregam.

Porém, antes de iniciar os experimentos de detecção de SGs em células de gliomas, realizamos um teste com o objetivo aperfeiçoar e validar os experimentos de detecção de SGs, utilizamos a linhagem celular HeLa (adenocarcinoma cervical). Esta linhagem é a mais comumente usada para os estudos de grânulos estresse (ARIMOTO *et al.*, 2008; FOURNIER *et al.*, 2010; GAREAU *et al.*, 2011). Estimulamos as células HeLa com arsenito de sódio na concentração de 500 $\mu$ M nos tempos de 30 minutos, 1 e 2 horas. Foram usados anticorpos para a proteína G3BP1 e a detecção de formação de *foci* desta proteína já é por si só um forte indicativo da presença de SGs (figura 13).

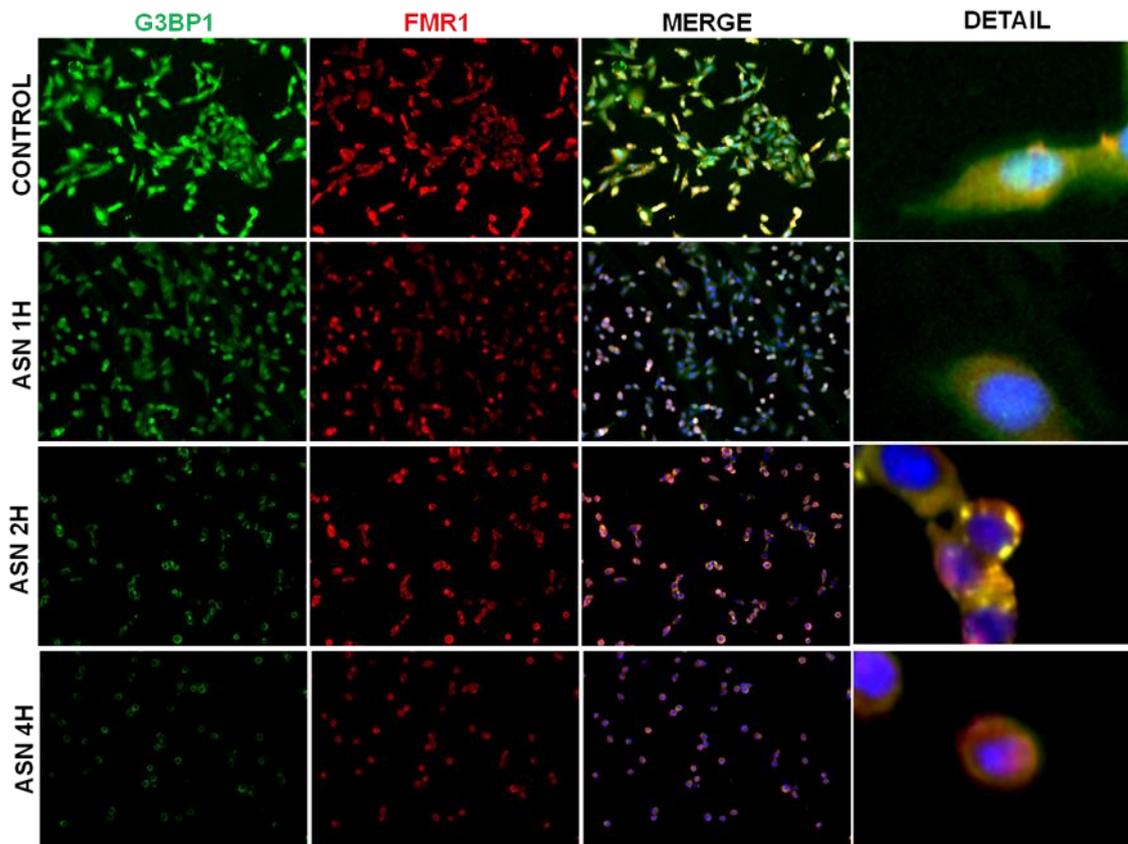
## Resultados



**Figura 13 - Células HeLa expostas ao arsenito de sódio (ASN) formam foci da proteína G3BP1, indicando formação de Grânulos de Estresse.** Células foram semeadas sobre lamínulas de vidro pré-tratadas com gelatina 0,2% e expostas ao arsenito de sódio (ASN - 500 $\mu$ M) nos tempos indicados. Após a marcação com anticorpos anti-G3BP1(verde), foram obtidas imagens com o microscópio Fluid. A formação de SGs é dinâmica e apresenta um pico no tempo de 1 hora. 20X, detalhe 400X

Foi possível notar que a formação de grânulos é dinâmica e que a marcação, nesse tipo celular, é maior no tempo de 1 hora.

Em seguida, foram feitos experimentos com a linhagem C6 com a mesma metodologia daqueles feitos com a linhagem HeLa. As células foram expostas ao arsenito de sódio (500 $\mu$ M) por 1, 2 e 4 horas. Após a fixação, as células foram marcadas com anticorpos específicos para G3BP1 e FMR1. A análise das imagens mostra que a dinâmica de formação dos SGs é diferente da linhagem HeLa, e o pico de formação se dá com 2 horas de exposição ao arsenito. Neste tempo os foci formados pela co-localização das duas proteínas são claramente visíveis (Figura 14).



**Figura 14 - Células da linhagem C6 expostas ao arsenito de sódio formam Grânulos de Estresse.** Células foram semeadas sobre lamínulas de vidro pré-tratadas com gelatina 0,2% e expostas com arsenito de sódio (ASN – 500 $\mu$ M) nos tempos indicados. Após a marcação com anticorpos anti-G3BP1(verde) e anti-FMR1(vermelho), foram obtidas imagens com o microscópio Flood. Diferentemente da linhagem HeLa, células C6 possuem uma formação mais lenta de SGs. O pico de formação é no tempo de 2 horas. Aumento 20X, detalhe 400X

Uma vez demonstrado que as células da linhagem C6 formam SGs quando expostas ao arsenito de sódio e também quando expostas aos agentes antineoplásicos em estudo (Bortezomibe, Cisplatina e Etoposídeo), a seguir, objetivamos avaliar a cinética do processo. A formação destes grânulos é um processo dinâmico e pode variar com o tempo. Portanto, foi importante determinar como ocorre esta formação. Com esta finalidade, as células foram expostas por 1, 2 e 4 horas a cada um dos agentes em estudo nas concentrações já determinadas. Os resultados obtidos estão nas figuras 15 a 17.

Todos os agentes em estudo foram capazes de induzir a formação de SGs nas células da linhagem C6. Bortezomibe em 1 hora aumentou significativamente o número de células positivas, que chegou a cerca de 40% em 2 horas e se estabilizou até o período avaliado de 4 horas (Figura 15). De modo similar, o Etoposídeo levou a um aumento rápido e maior que

## *Resultados*

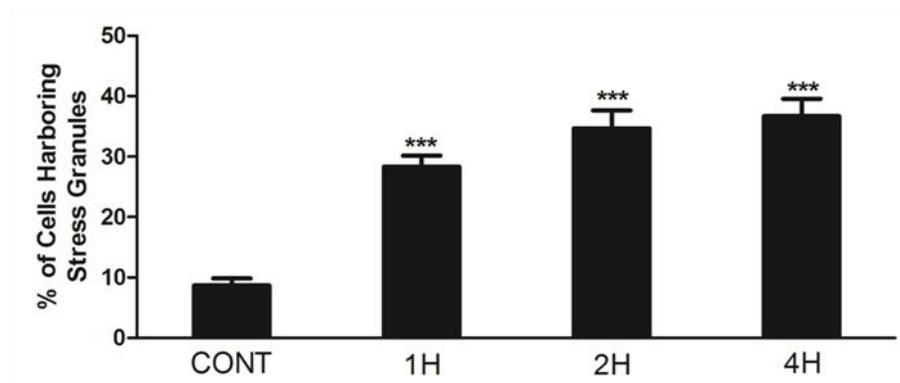
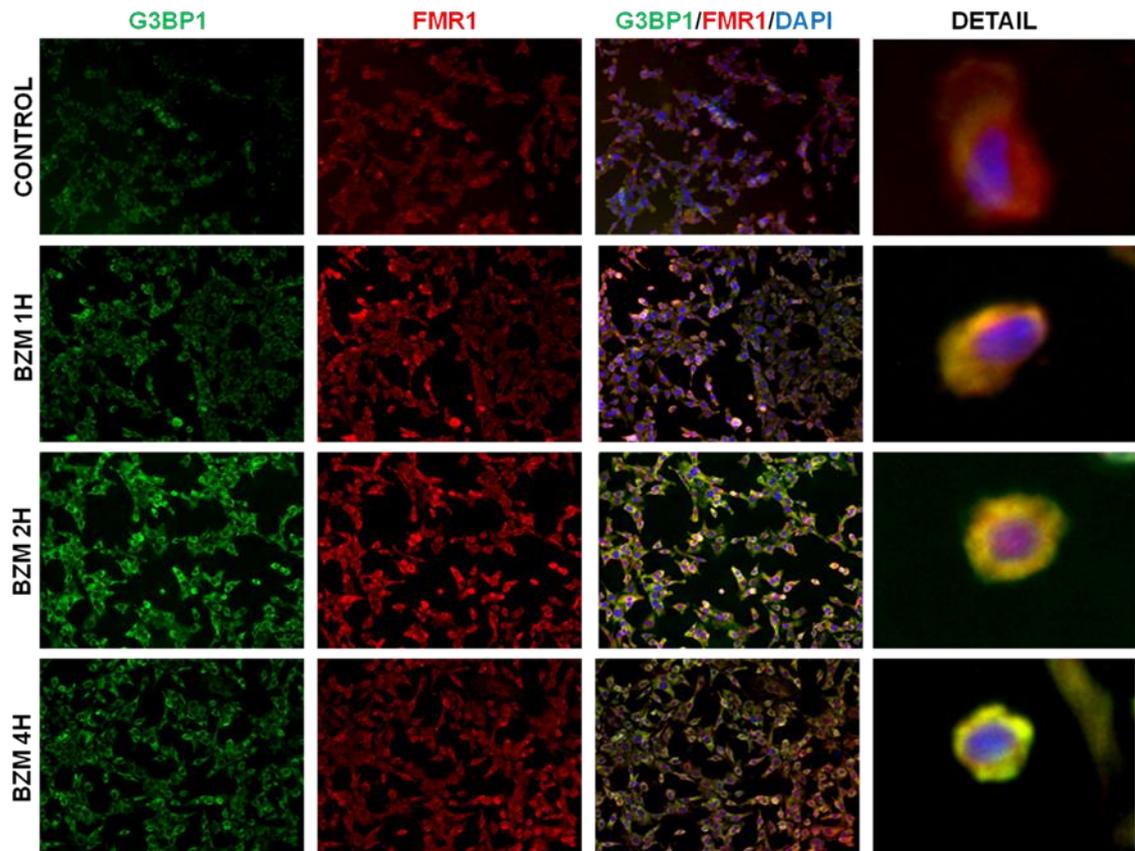
---

BZM, chegando a cerca de 50% e se mantendo estável até o período máximo avaliado (Figura 17).

Em contrapartida, as células expostas a Cisplatina apresentaram um aumento rápido em 1 hora, atingindo o ápice em 2 horas, de cerca de 40%, em seguida houve uma queda no percentual das células positivas para um nível inferior ao tempo de 1 hora (Figura 16).

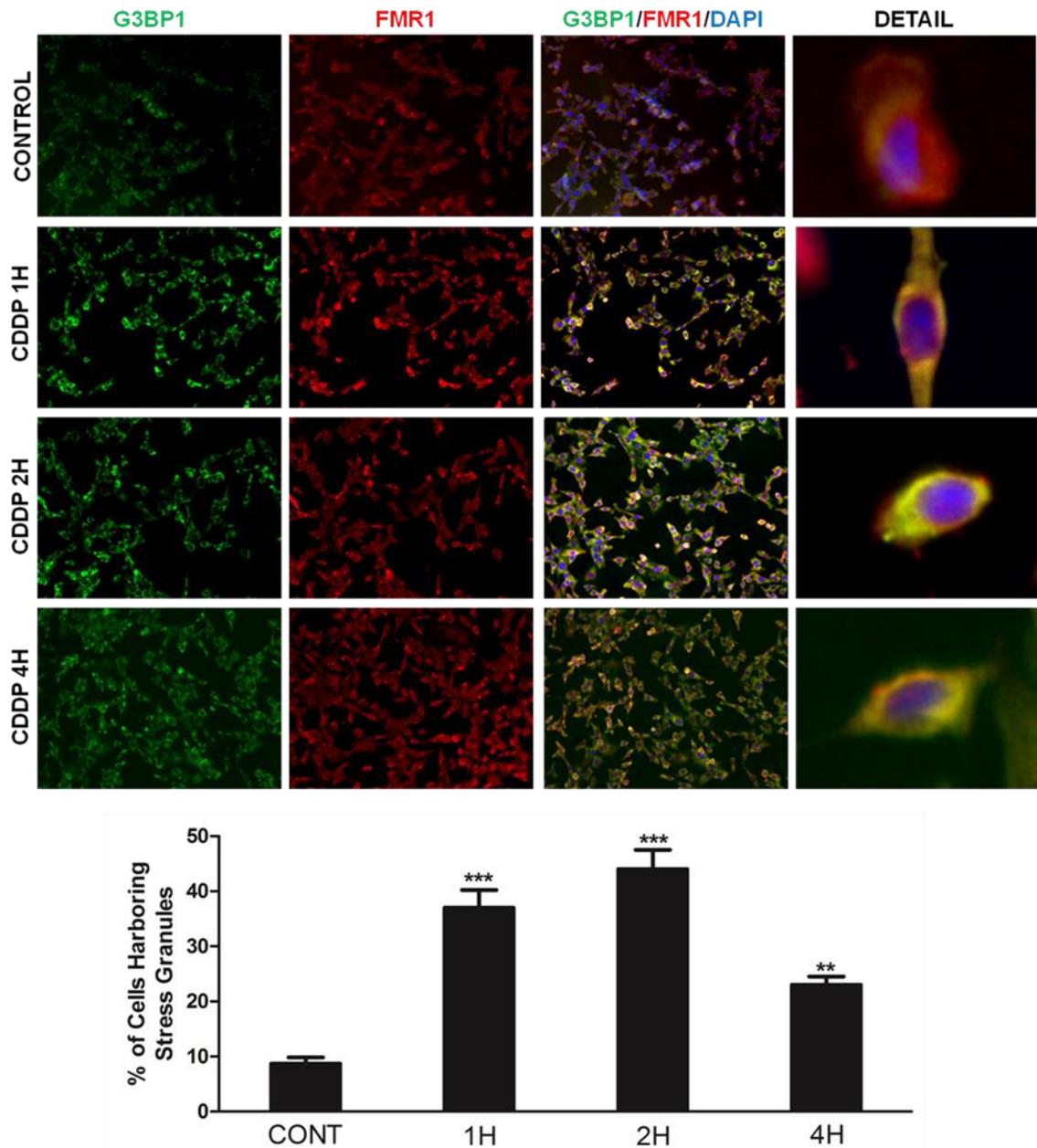
Procedimento similar foi realizado com a linhagem U87MG para verificar se os agentes antitumorais em teste eram capazes de induzir a formação de Grânulos de Estresse em células humanas. Para esta linhagem o tratamento foi em um tempo único de 2 horas. Os resultados estão na figura 18. Assim como a linhagem C6, a linhagem U87MG também possui a capacidade de formar SGs quando exposta aos agentes em teste. Foi observado que nas condições experimentais, a Cisplatina foi o agente que levou a um maior aumento do percentual de células positivas.

## Resultados



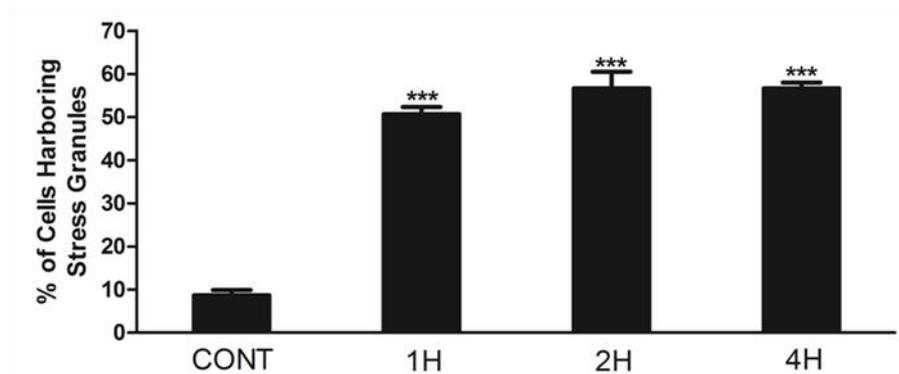
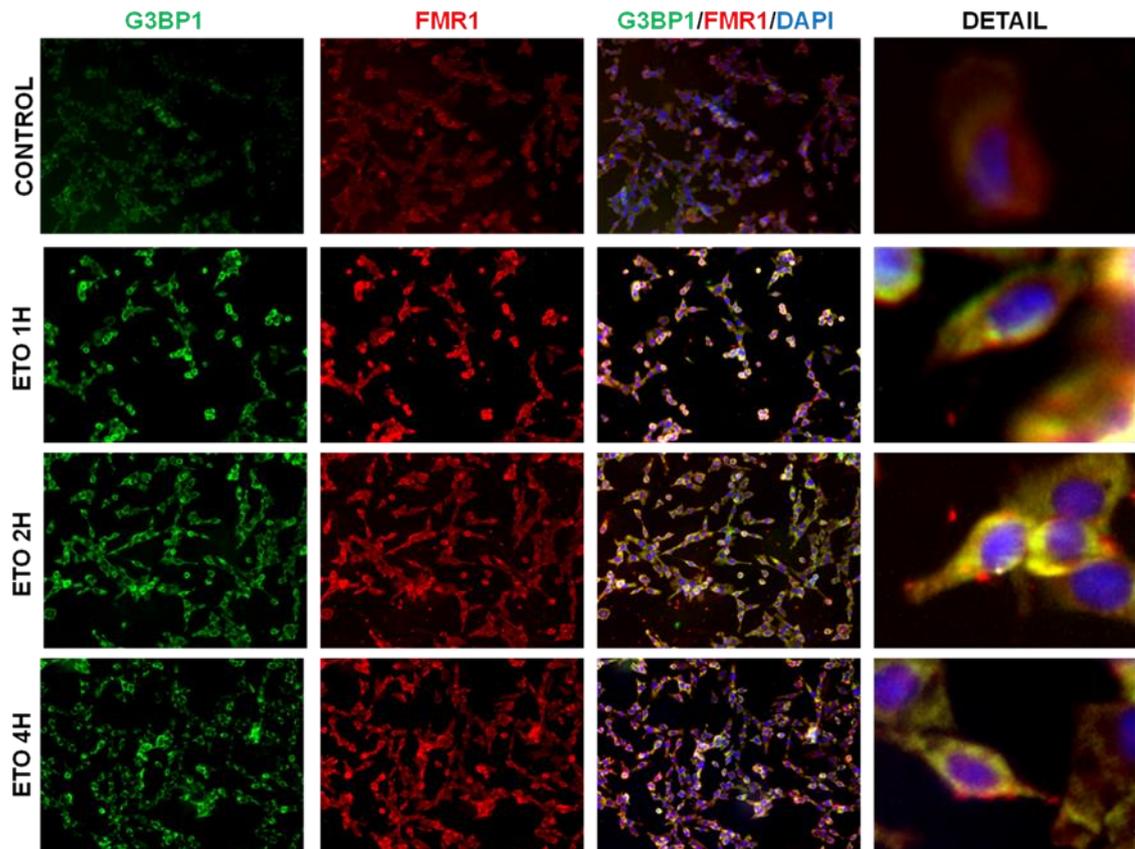
**Figura 15 - Células da linhagem C6 expostas ao Bortezomibe formam Grânulos de Estresse.** Células foram tratadas com 50 $\mu$ M de Bortezomibe (BZM) por 1, 2 e 4 horas, fixadas e marcadas com anticorpos para G3BP1 (verde) e FMR1 (vermelho). O núcleo foi marcado com DAPI (azul). O Experimento foi realizado em triplicata e foram feitas contagens de 5 campos aleatórios. Resultados expressos em percentual de células contendo Grânulos de Estresse. One way Anova, \*\*\* denota  $p < 0,001$ . Aumento 20X, detalhe 400X.

## Resultados



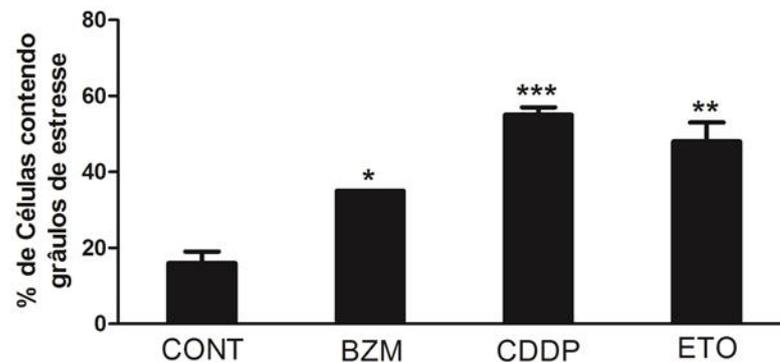
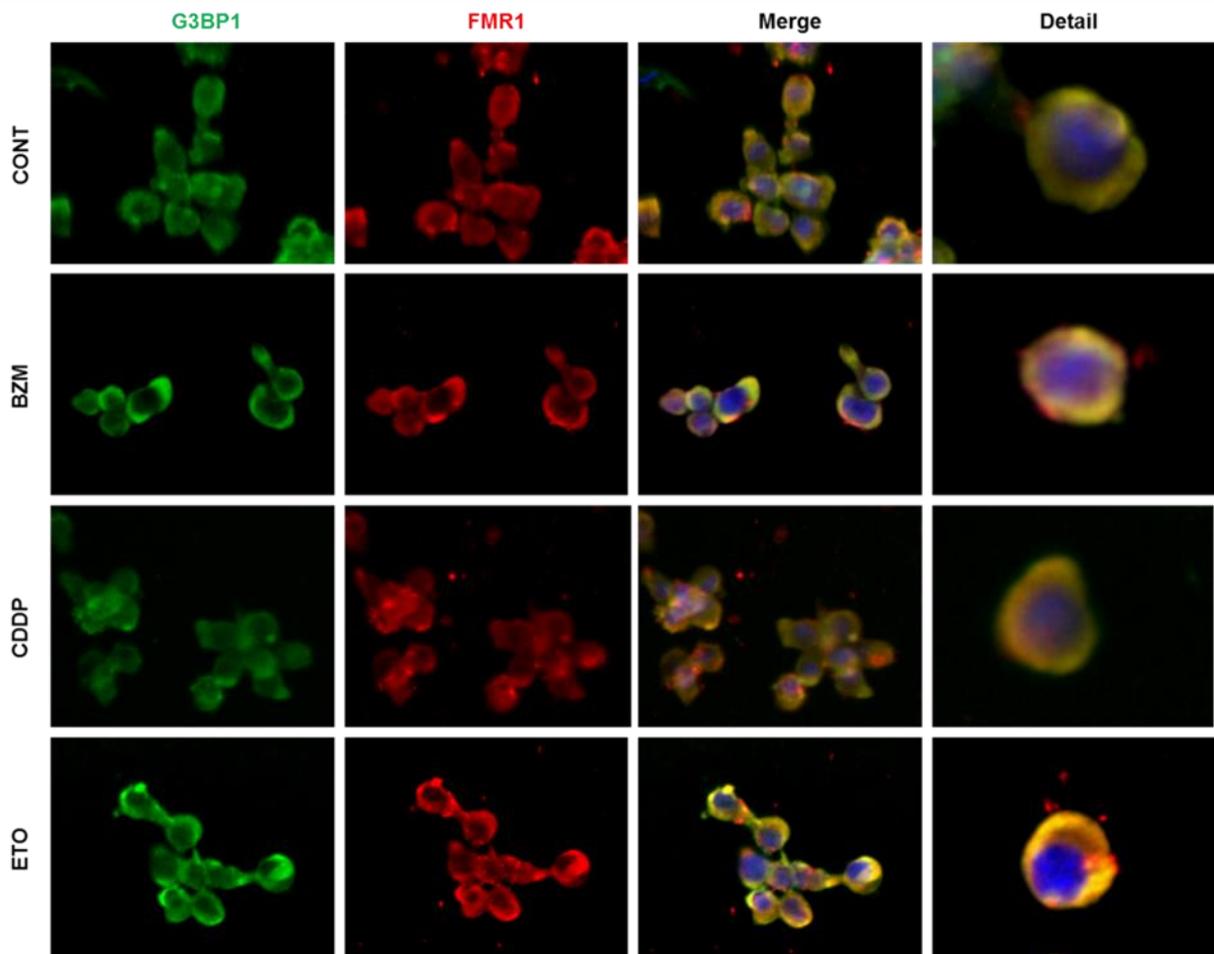
**Figura 16 - Células da linhagem C6 expostas a Cisplatina formam Grânulos de Estresse.** Células foram tratadas com 5mM de Cisplatina (CDDP) por 1, 2 e 4 horas, fixadas e marcadas com anticorpos para G3BP1 (verde) e FMR1 (vermelho). O núcleo foi marcado com DAPI (azul). O Experimento foi realizado em triplicata e foram feitas contagens de 5 campos aleatórios. Resultados expressos em percentual de células contendo Grânulos de Estresse. One way Anova, \*\* denota  $p < 0,01$  e \*\*\* denota  $p < 0,001$ . Aumento 20X, detalhe 400X.

## Resultados



**Figura 17 - Células da linhagem C6 expostas ao Etoposídeo formam Grânulos de Estresse.** Células foram tratadas com 50 $\mu$ M de Etoposídeo (ETO) por 1, 2 e 4 horas, fixadas e marcadas com anticorpos para G3BP1 (verde) e FMR1 (vermelho). O núcleo foi marcado com DAPI (azul). O experimento foi realizado em triplicata e foram feitas contagens de 5 campos aleatórios. Resultados expressos em percentual de células contendo Grânulos de Estresse. One way Anova, \*\*\* denota  $p < 0,001$ . Aumento 20X, detalhe 400X.

## Resultados



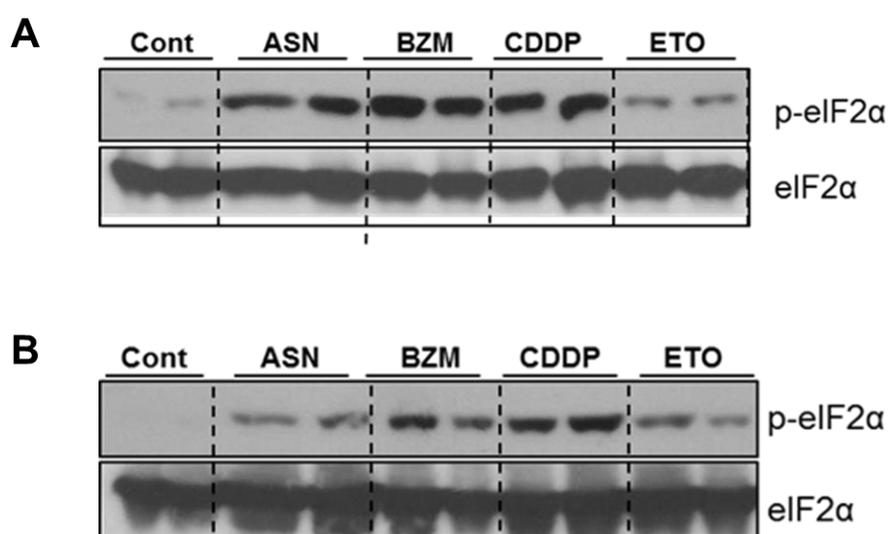
**Figura 18 - Células da linhagem U87MG expostas a agentes antitumorais iniciam a formação de Grânulos de Estresse.** As células foram semeadas sobre lamínulas de vidro pré-tratadas com gelatina 0,2% e expostas a um dos agentes em estudo: Bortezomibe (BZM), Cisplatina (CDDP) ou Etoposídeo (ETO) por 2 horas. Após a fixação, foi feita a marcação com anticorpos anti-G3BP1(verde) e anti-FMR1(vermelho) O núcleo foi marcado com DAPI (azul). O Experimento foi realizado em triplicata e foram feitas contagens de 5 campos aleatórios. Resultados expressos em percentual de células contendo Grânulos de Estresse. One way Anova, \* denota  $p < 0,05$ ; \*\* denota  $p < 0,01$  e \*\*\* denota  $p < 0,001$ . Aumento 40X, detalhe 400X.

## Resultados

### 5.4 – AVALIAÇÃO DO PAPEL DE eIF2 $\alpha$ NA FORMAÇÃO DE GRÂNULOS DE ESTRESSE

A proteína eIF2 $\alpha$  é dos fatores envolvidos na tradução de proteínas celulares e da sua fosforilação decorre a ativação de uma das principais vias que leva à formação dos Grânulos de Estresse. Portanto, interferir neste processo pode ser uma ferramenta viável para inibir a formação dos SGs e sensibilizar as células as drogas em estudo. Para atingir esse objetivo, foi usado um plasmídeo contendo o dominante negativo desta proteína, que possui uma mutação no serina 51 para uma alanina, levando à perda do sítio de fosforilação envolvido na via de sinalização que leva a formação dos SGs (eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ ).

Primeiramente, avaliamos o potencial dos agentes antineoplásicos em estudo em estimular a fosforilação de eIF2 $\alpha$ .



**Figura 19 – Avaliação da fosforilação de eIF2 $\alpha$  pelos agentes antineoplásicos em estudo.** Células das linhagens C6 (A) e U87MG (B) foram expostas a Bortezomibe (BZM – 50 $\mu$ M), Cisplatina (CDDP – 5mM) ou Etoposídeo (ETO – 50 $\mu$ M) por 2 horas em seguida as células foram lisadas e o extrato submetido a uma eletroforese seguida de western blotting. Arsenito de sódio (ASN) foi usado como controle positivo. Experimentos realizados em duplicata.

Como visto na figura 19, demonstramos, portanto que ambas as linhagens os agentes em estudo levam a fosforilação de eIF2 $\alpha$ , sendo que BZM e CDDP foram mais eficientes em causar a fosforilação do que ETO.

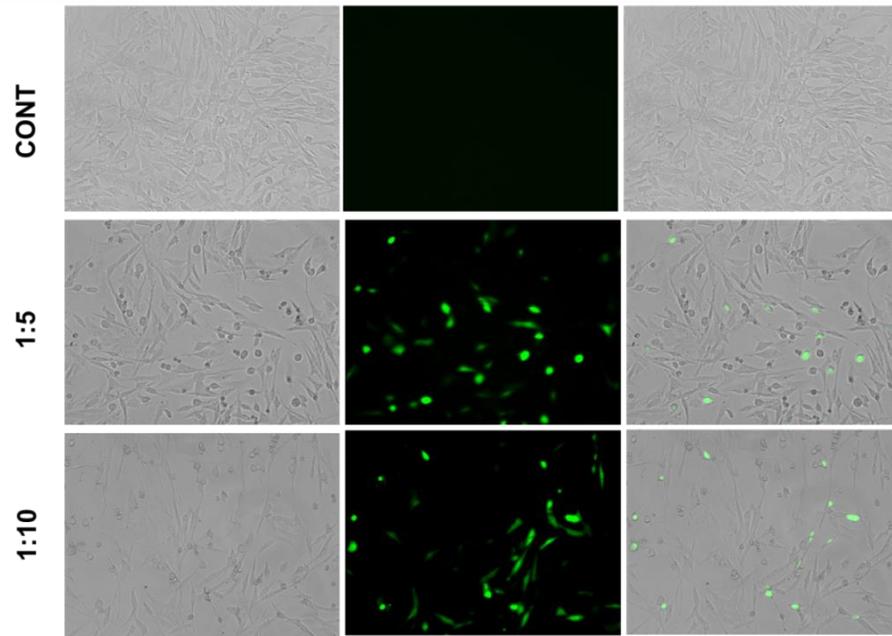
## *Resultados*

---

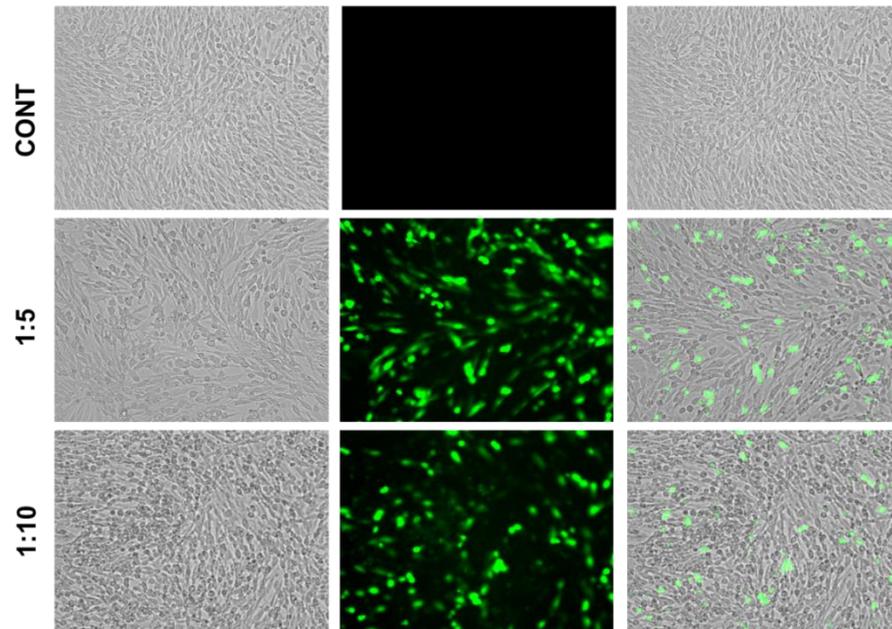
Muitos fatores afetam a eficiência de uma transfecção, como confluência no momento do procedimento, proporção entre o plasmídeo a ser transfectado e reagente utilizado, toxicidade do reagente, etc. Portanto, antes de proceder com os experimentos de transfecção usando o plasmídeo contendo eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ , foram realizadas padronizações com o objetivo de se determinar a razão ideal entre plasmídeo ( $\mu\text{g}$ ) e PEIMax ( $\mu\text{L}$ ). Para isto, utilizamos um plasmídeo contendo a sequência de uma proteína fluorescente (eGFP). Os experimentos foram realizados em placas de 24 e 6 poços. As quantidades de plasmídeo usadas foram  $1\mu\text{g}$  e  $3\mu\text{g}$  por poço respectivamente.

As figuras 20 e 21 mostram que na linhagem C6 que não há diferença significativa entre as razões de 1:5 e 1:10 em termos de aumento da eficiência da transfecção. Para evitar níveis excessivos de toxicidade, no entanto, foi determinado então que todos os demais experimentos, com esta linhagem, que envolvessem a transfecção com plasmídeos seriam feitos com a razão 1:5.

Assim como foi feito para a linhagem de rato, realizamos a padronização da transfecção para a linhagem humana com PEIMax utilizando o mesmo plasmídeo eGFP. Semelhantemente ao observado anteriormente, a melhor opção foi a razão 1:5, com base nos resultados obtidos. Porém, diferentemente observamos que há toxicidade na razão 1:10 (figuras 22 e 23). Concluindo, então, que a razão ideal também seria 1:5.

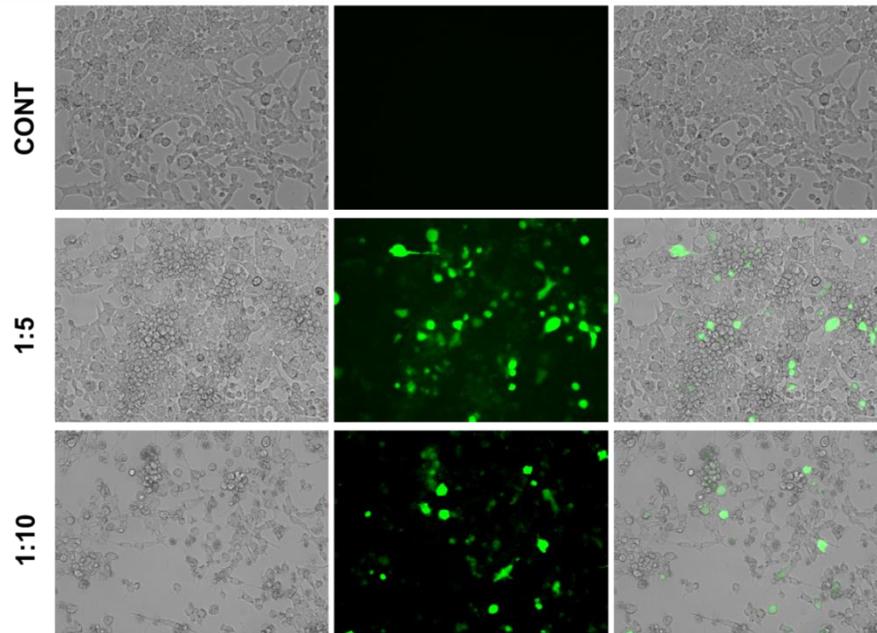
*Resultados*

**Figura 20 – Padronização da transfecção de plasmídeo por PEIMax na linhagem C6 em placa de 24 poços.** As células foram semeadas e após atingirem cerca de 80 a 90% de confluência, transfectadas com 1 $\mu$ g de plasmídeo eGFP e visualizadas após 24 horas com auxílio do microscópio Fluid. Aumento 20X

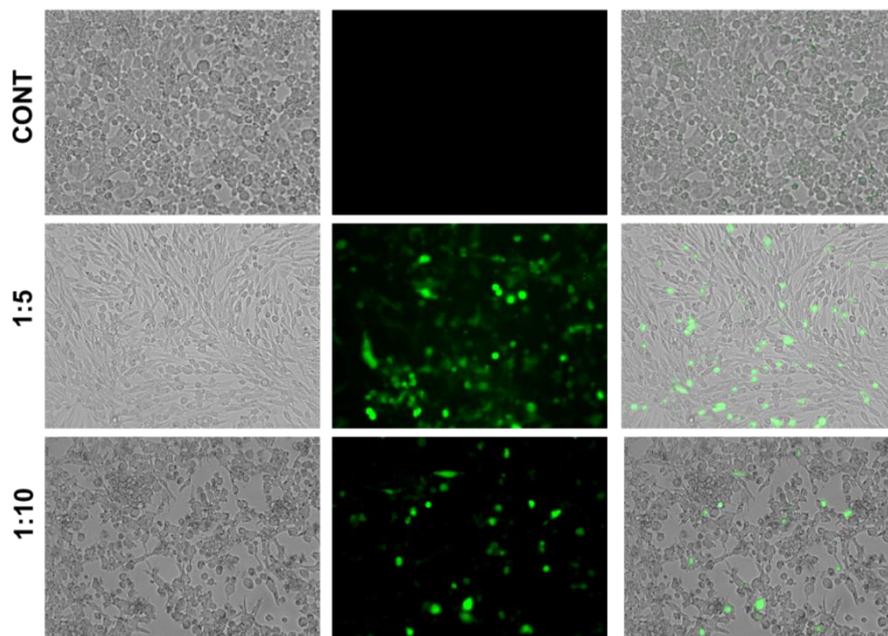


**Figura 21 - Padronização da transfecção de plasmídeo por PEIMax na linhagem C6 em placa de 6 poços.** As células foram semeadas e após atingirem cerca de 80 a 90% de confluência, transfectadas com 1 $\mu$ g de plasmídeo eGFP e visualizadas após 24 horas com auxílio do microscópio Fluid. Aumento 20X

## Resultados



**Figura 22 - Padronização da transfecção de plasmídeo por PEIMax na linhagem U87 em placa de 24 poços.** As células foram semeadas e transfectadas com  $1\mu\text{g}$  de plasmídeo eGFP e visualizadas após 24 horas. As células foram semeadas e após atingirem cerca de 80 a 90% de confluência, transfectadas com  $1\mu\text{g}$  de plasmídeo eGFP e visualizadas após 24 horas com auxílio do microscópio Fluid. Aumento 20X



**Figura 23 - Padronização da transfecção de plasmídeo por PEIMax na linhagem U87 em placa de 6 poços.** As células foram semeadas e transfectadas com  $3\mu\text{g}$  de plasmídeo eGFP e visualizadas após 24 horas. As células foram semeadas e após atingirem cerca de 80 a 90% de confluência, transfectadas com  $1\mu\text{g}$  de plasmídeo eGFP e visualizadas após 24 horas com auxílio do microscópio Fluid. Aumento 20X

## *Resultados*

---

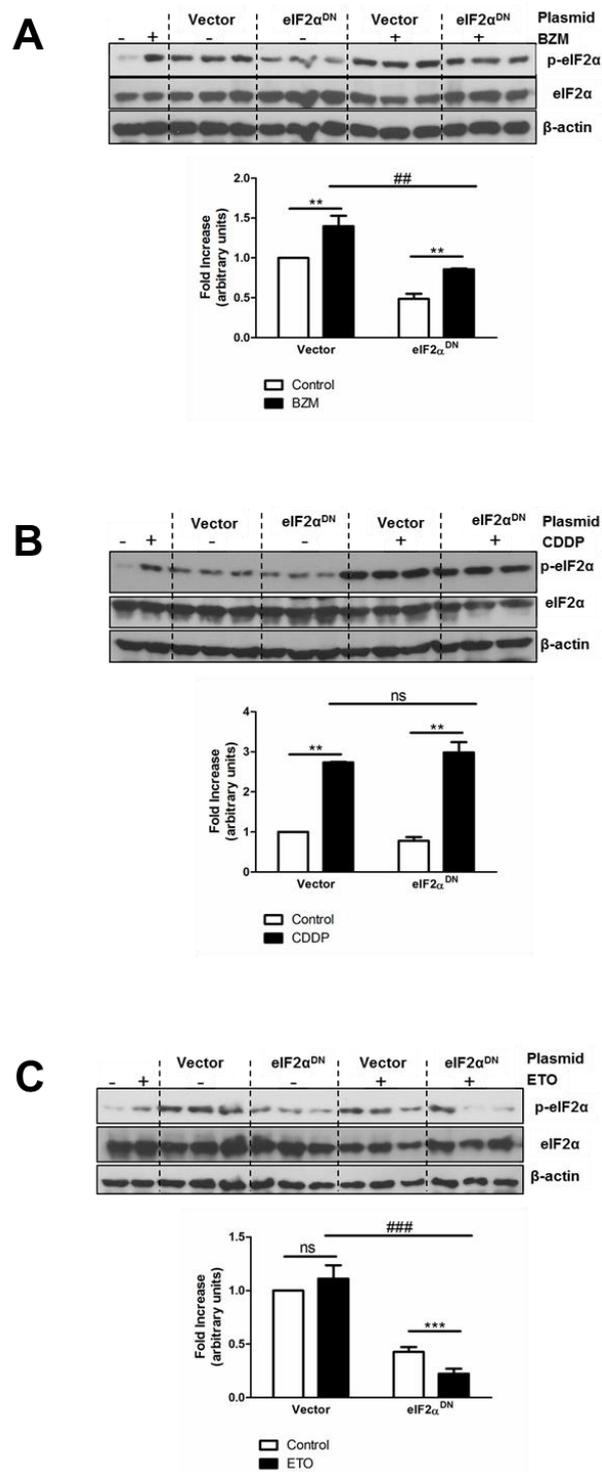
### **5.4.1 – Avaliação do efeito da transfecção com eIF2 $\alpha$ <sup>DN</sup> na fosforilação de eIF2 $\alpha$**

Antes de analisar o efeito da transfecção com o dominante negativo sobre a formação dos Grânulos de Estresse, realizamos *western blots* para avaliar se de fato ocorre uma redução na fosforilação de eIF2 $\alpha$  pela transfecção com o plasmídeo eIF2 $\alpha$  dominante negativo. As células de ambas as linhagens foram semeadas em placas de 6 poços e transfectadas com plasmídeo contendo eIF2 $\alpha$ <sup>DN</sup>. Após 24 horas, as células foram expostas aos agentes em estudo por 2 horas e foi obtido o extrato proteico e submetido ao *western blot*. Em seguida, foi realizada uma análise densitométrica pelo software ImageJ e os dados obtidos estão nas figuras 24 e 25.

Para a linhagem C6, foi detectada uma redução significativa da fosforilação de eIF2 $\alpha$  nas células transfectadas com eIF2 $\alpha$ <sup>DN</sup> quando comparadas as transfectadas com o vetor vazio, mas sem tratamento. O mesmo foi observado quando comparamos as células tratadas com BZM e ETO, porém não foi observada diferença significativa nas células tratadas com CDDP. A redução foi de uma média de 30% para BZM e 70% para ETO (Figura 24).

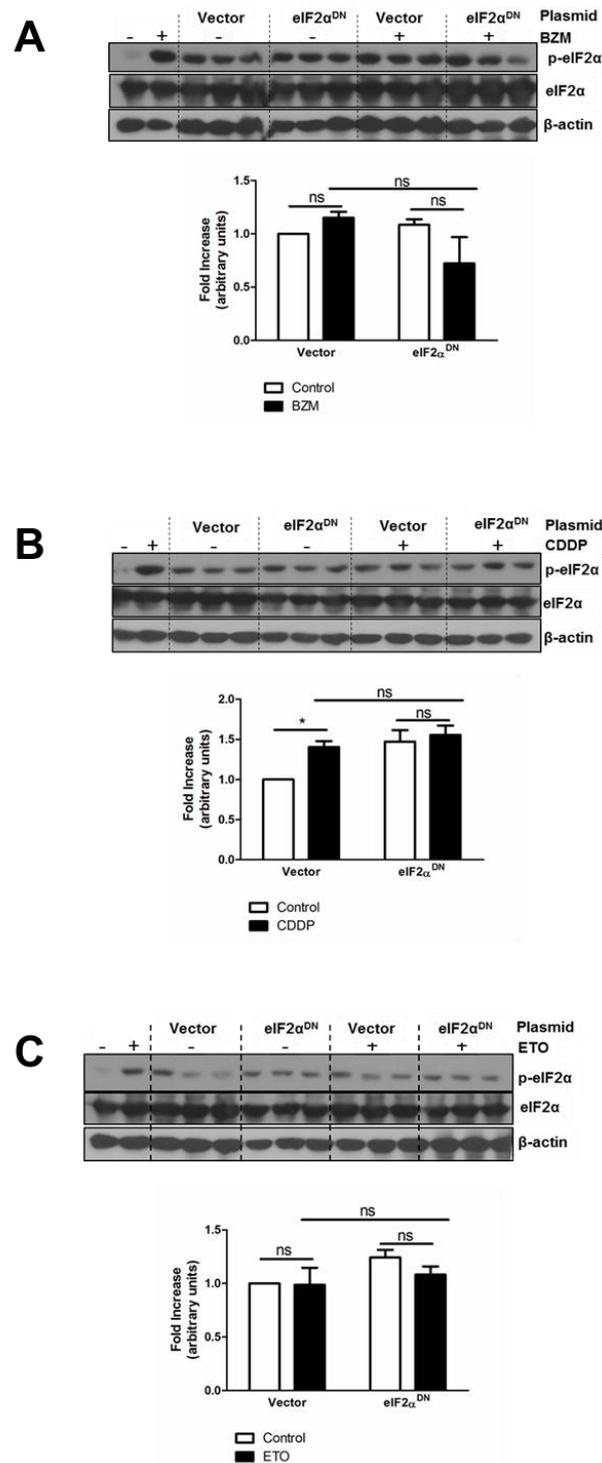
No caso da linhagem U87MG, os dados obtidos mostraram que, aparentemente, não há diferenças significativas entre os grupos transfectados com eIF2 $\alpha$ <sup>DN</sup> e os grupos transfectados com o vetor vazio em ambas as condições, controle e tratado (Figura 25).

Concluimos que na linhagem C6 houve uma maior eficiência na redução da fosforilação de eIF2 $\alpha$  nas células transfectadas com eIF2 $\alpha$ <sup>DN</sup>, enquanto o mesmo não pôde ser observado na linhagem U87MG.



**Figura 24 – Avaliação do efeito da transfecção com o plasmídeo contendo eIF2α<sup>DN</sup> na fosforilação de eIF2α em células da linhagem C6.** As células foram transfectadas com o plasmídeo contendo eIF2α<sup>DN</sup> ou o vetor vazio (Vector) e após 24 horas tratadas com Bortezomibe (A), Cisplatina (B) ou Etoposídeo (C) por 2 horas e em seguida foi obtido o extrato proteico seguido de *western blot*. Foi realizada uma análise densitométrica das bandas pelo software ImageJ e os dados foram plotados no software GraphPad Prism. Experimentos realizados em triplicata. One-Way ANOVA. \*\* denota  $p < 0,01$  e \*\*\* denota  $p < 0,001$  Controle vs Droga. ## denota  $p < 0,01$  e ### denota  $p < 0,001$  Vector + Droga vs eIF2α<sup>DN</sup> + Droga. ns – não significativo.

## Resultados



**Figura 25 - Avaliação do efeito da transfecção com o plasmídeo contendo eIF2α<sup>DN</sup> na fosforilação de eIF2α em células da linhagem U87MG.** As células foram transfectadas com o plasmídeo contendo eIF2α<sup>DN</sup> ou o vetor vazio (Vector) e após 24 horas tratadas com Bortezomibe (A), Cisplatina (B) ou Etoposídeo (C) por 2 horas e em seguida foi obtido o extrato proteico seguido de *western blot*. Foi realizada uma análise densitométrica das bandas pelo software ImageJ e os dados foram plotados no software GraphPad Prism. Experimentos realizados em triplicata. One-Way ANOVA. \* denota  $p < 0,05$ . ns – não significativo.

---

**5.4.2 – Avaliação do efeito da transfecção com eIF2 $\alpha$ <sup>DN</sup> na formação dos Grânulos de Estresse**

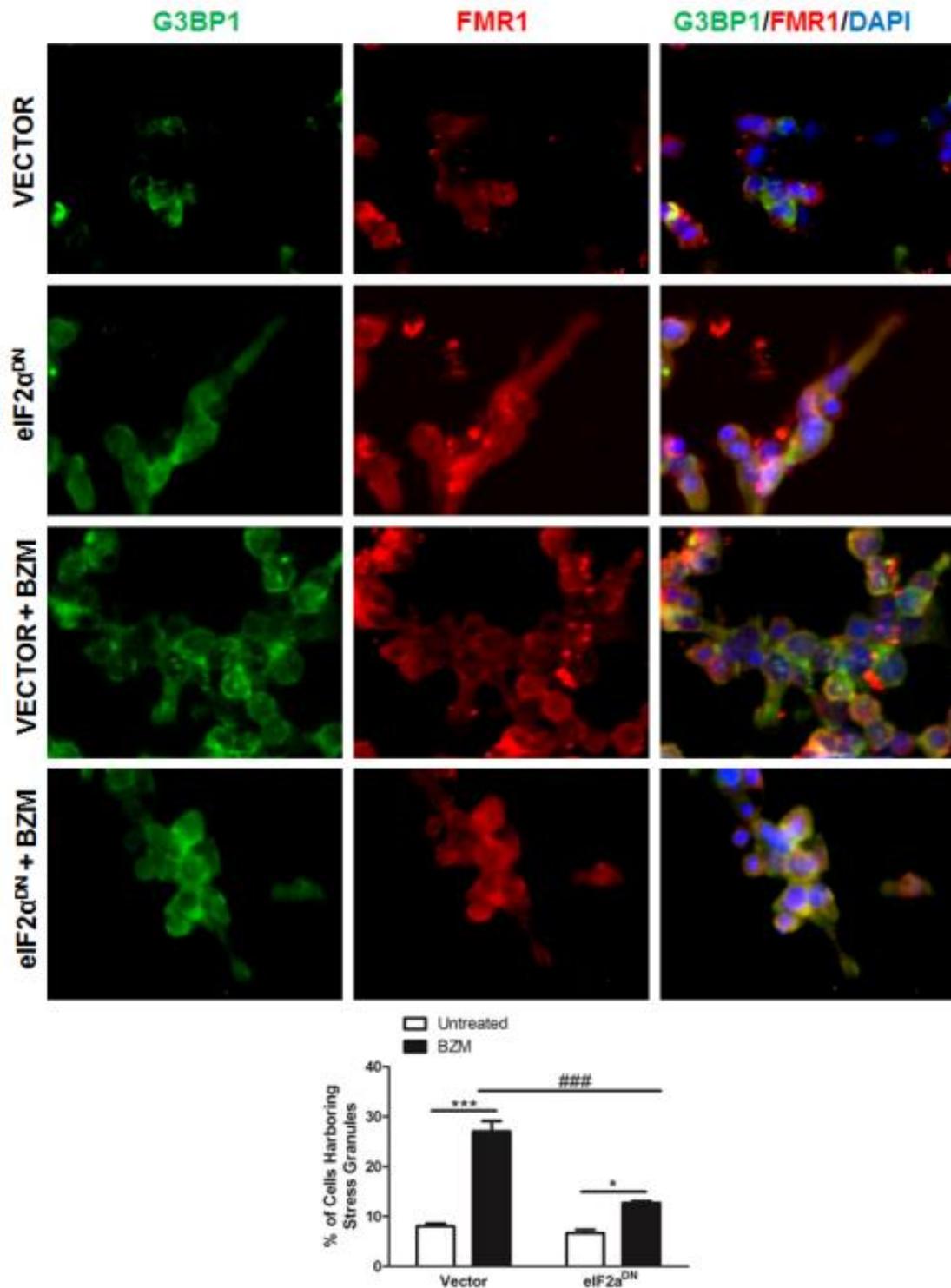
Uma vez realizada a padronização da transfecção e a avaliação do efeito de eIF2 $\alpha$ <sup>DN</sup> na fosforilação de eIF2 $\alpha$ , seguimos com os experimentos para avaliar se a transfecção com o plasmídeo seria capaz de reduzir a formação de SGs nas linhagens C6 e U87MG, considerando que fosforilação é uma das principais vias pelas quais ocorre a formação de SGs.

Foi possível observar que há uma redução do número de células contendo foci correspondente a co-localização de G3BP1 e FMR1. Indicando que a transfecção com o plasmídeo contendo o dominante negativo interferiu na formação de Grânulos de Estresse quando as células são expostas aos agentes antineoplásicos em estudo. Verificamos que a transfecção com o vetor vazio ou o DN apresentam o mesmo efeito na indução da formação de SGs, causando uma pequena elevação (não significativa) no número de células positivas de menos de 10%. Para o Bortezomibe, pudemos notar que há uma significativa redução (cerca de 50%) no número de células positivas para SGs. Para a Cisplatina, essa redução também é bastante acentuada (cerca de 60%). Por fim, para o Etoposídeo, também há uma redução significativa de 30%. (Figuras 26 a 28)

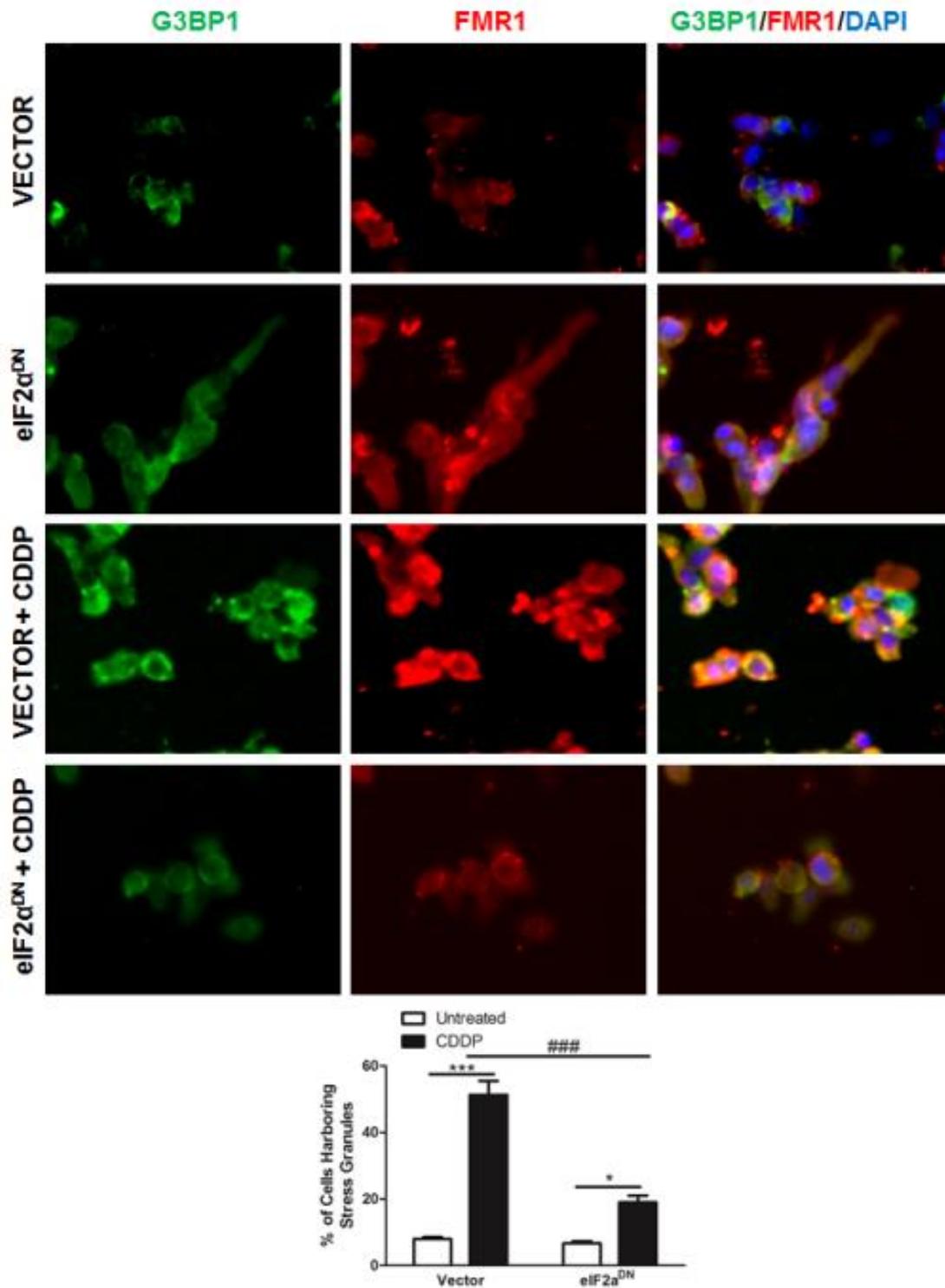
Considerando a linhagem U87MG, foi verificada a mesma redução significativa em todos os tratamentos, sendo de 10% nas células tratadas com Bortezomibe, 20% para as tratadas com Cisplatina e 20% para as tratadas com Etoposídeo (Figuras 29 a 31).

Dessa maneira, os nossos dados sugerem que eIF2 $\alpha$  possui um papel importante na formação de Grânulos de Estresse nas células de ambas as linhagens, quando estimuladas com os agentes antineoplásicos usados.

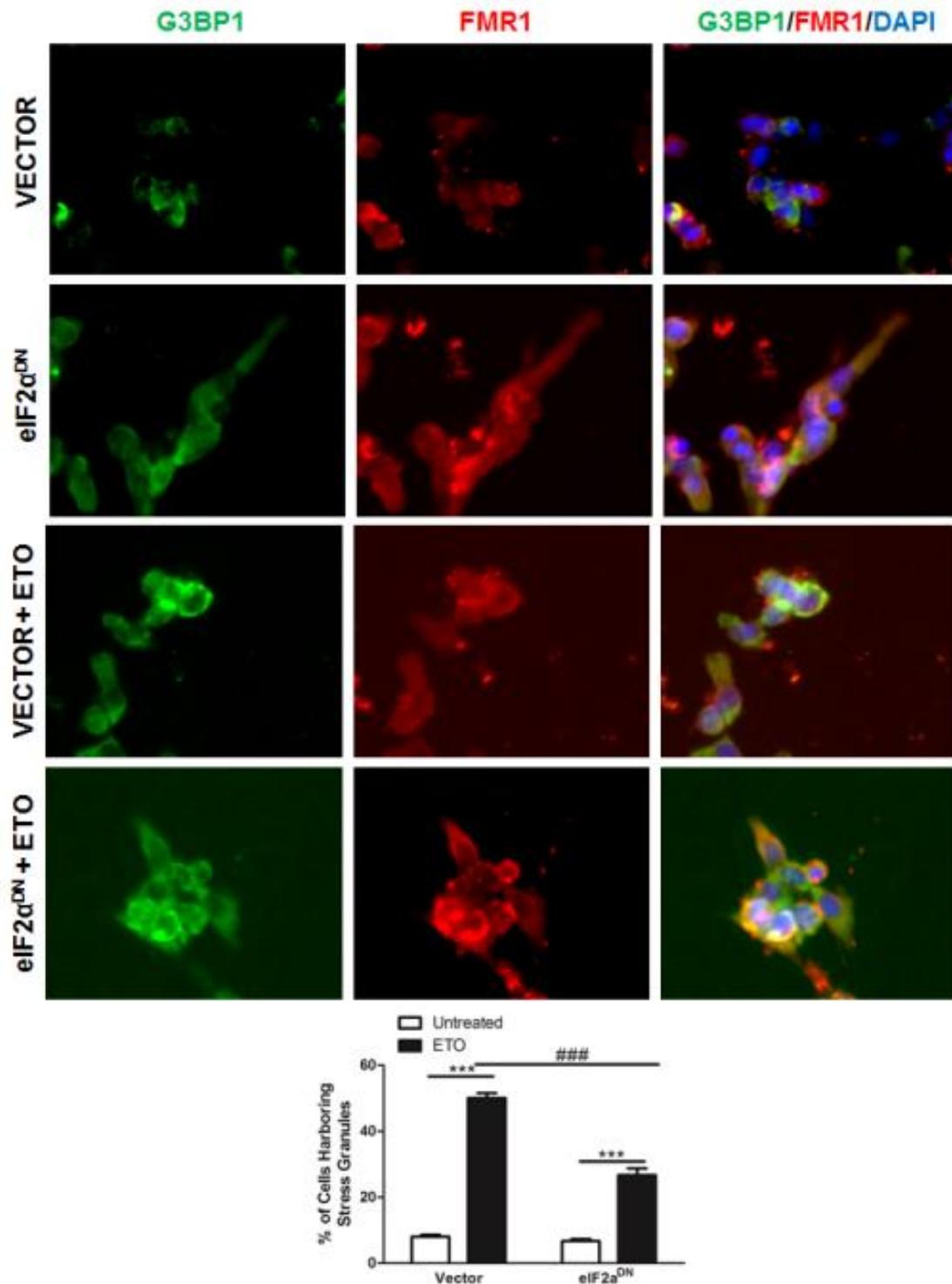
## Resultados



**Figura 26 – A transfecção com eIF2α<sup>DN</sup> reduz a formação de Grânulos de Estresse em células da linhagem C6 expostas ao Bortezomibe.** Após a transfecção, as células foram expostas a 50μM de Bortezomibe (BZM) por 2 horas, fixadas e marcadas com anticorpos para G3BP1 (verde) e FMR1 (vermelho). O núcleo foi marcado com DAPI (azul). O Experimento foi realizado em triplicata e foram feitas contagens de 5 campos aleatórios. Resultados expressos em percentual de células contendo Grânulos de Estresse. One way Anova, \* denota p<0,05 e \*\*\* denota p<0,001 Controle vs Droga. ### denota p<0,001 Vector + Droga vs eIF2α<sup>DN</sup> + Droga Aumento 200X.

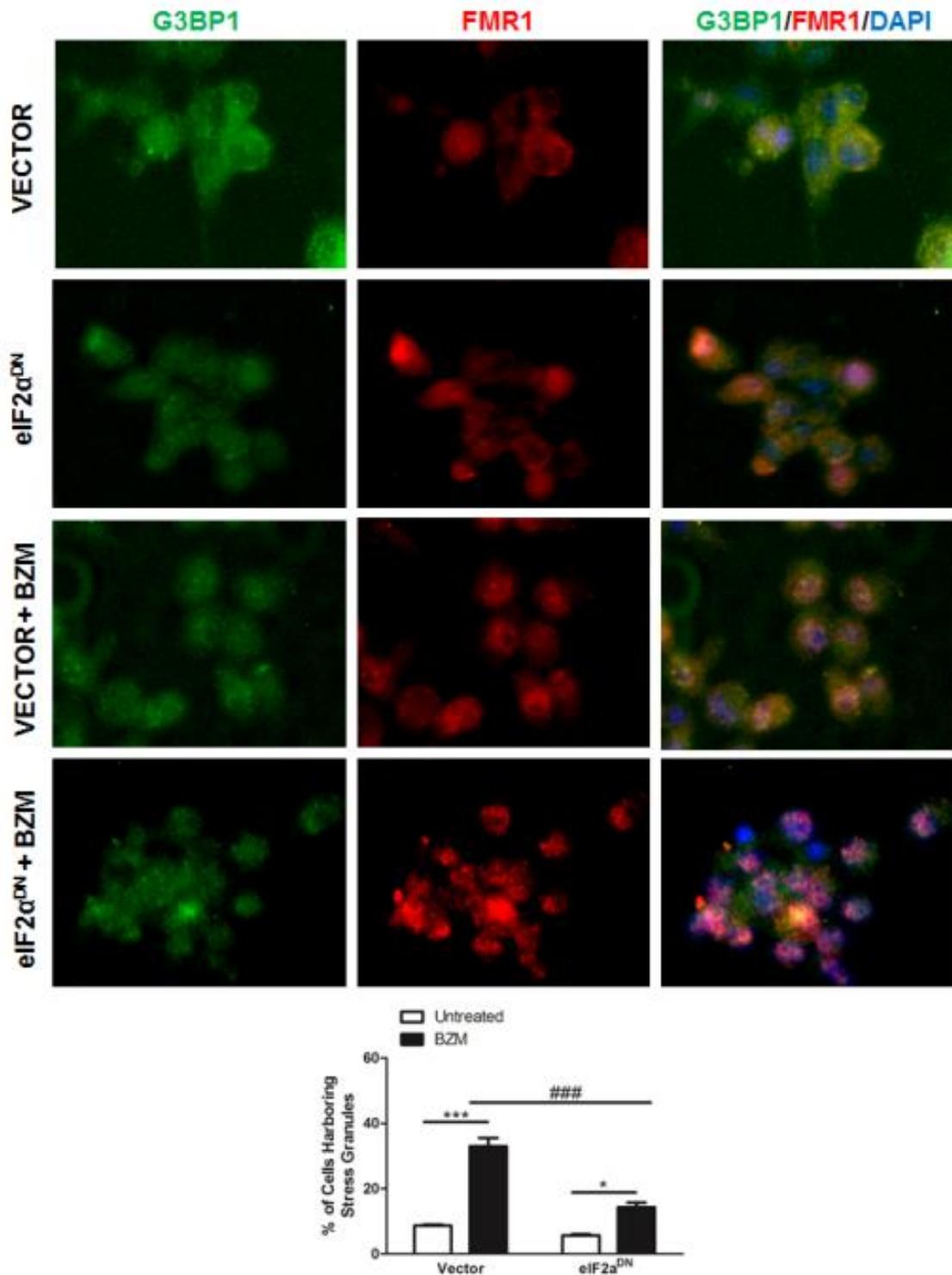


**Figura 27 – A transfecção com eIF2α<sup>DN</sup> reduz a formação de Grânulos de Estresse em células da linhagem C6 expostas a Cisplatina.** Após a transfecção, as células foram expostas a 5mM de Cisplatina (CDDP) por 2 horas, fixadas e marcadas com anticorpos para G3BP1 (verde) e FMR1 (vermelho). O núcleo foi marcado com DAPI (azul). O Experimento foi realizado em triplicata e foram feitas contagens de 5 campos aleatórios. Resultados expressos em percentual de células contendo Grânulos de Estresse. One way Anova, \* denota  $p < 0,05$  e \*\*\* denota  $p < 0,001$  Controle vs Droga. ### denota  $p < 0,001$  Vector + Droga vs eIF2α<sup>DN</sup> + Droga Aumento 200X.

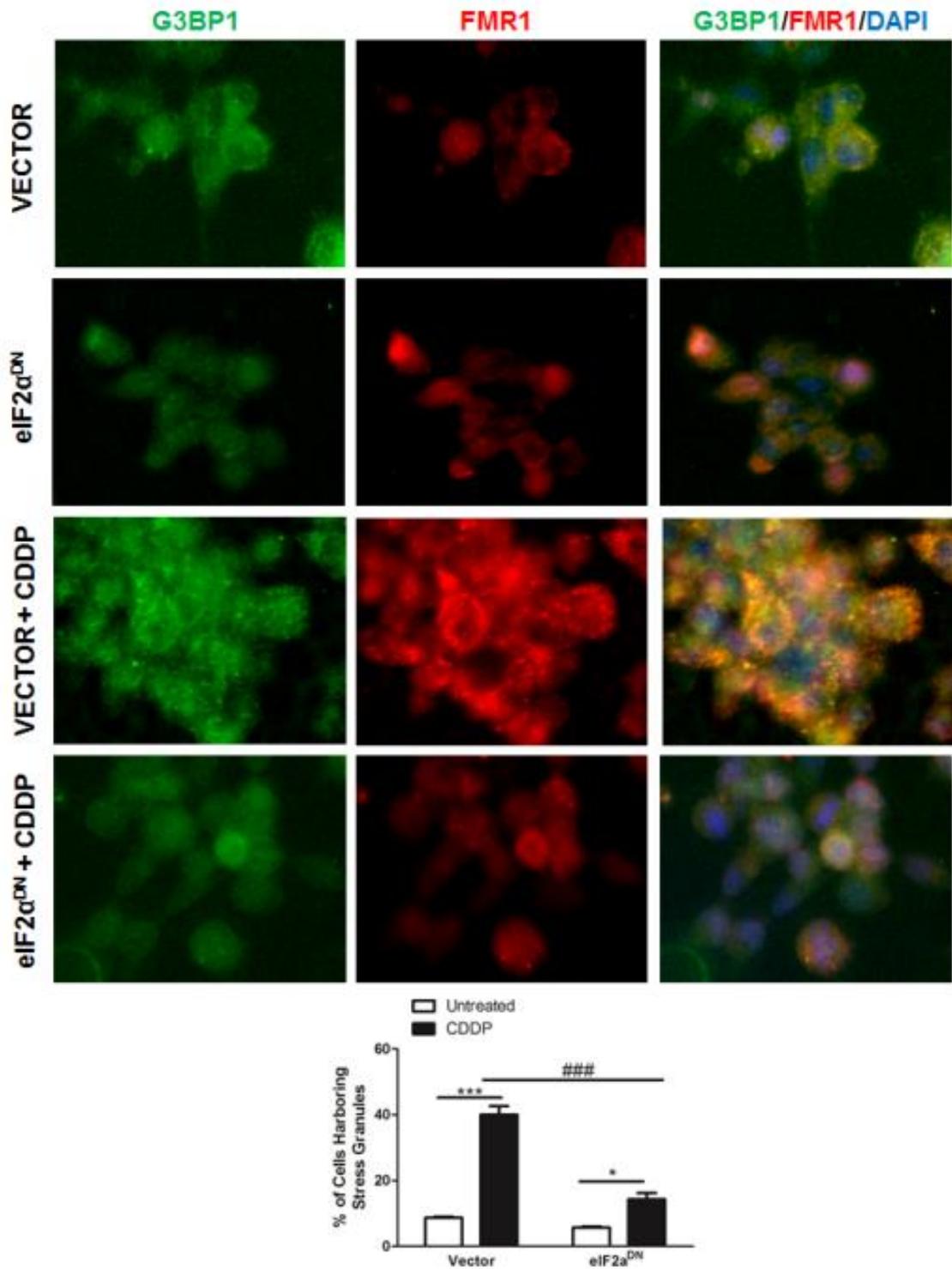


**Figura 28 – A transfecção com eIF2α<sup>DN</sup> reduz a formação de Grânulos de Estresse em células da linhagem C6 expostas ao Etoposídeo.** Após a transfecção, as células foram expostas a 50μM de Etoposídeo (BZM) por 2 horas, fixadas e marcadas com anticorpos para G3BP1 (verde) e FMR1 (vermelho). O núcleo foi marcado com DAPI (azul). O Experimento foi realizado em triplicata e foram feitas contagens de 5 campos aleatórios. Resultados expressos em percentual de células contendo Grânulos de Estresse. One way Anova, \*\*\* denota  $p < 0,001$  Controle vs Droga. ### denota  $p < 0,001$  Vector + Droga vs eIF2α<sup>DN</sup> + Droga Aumento 200X.

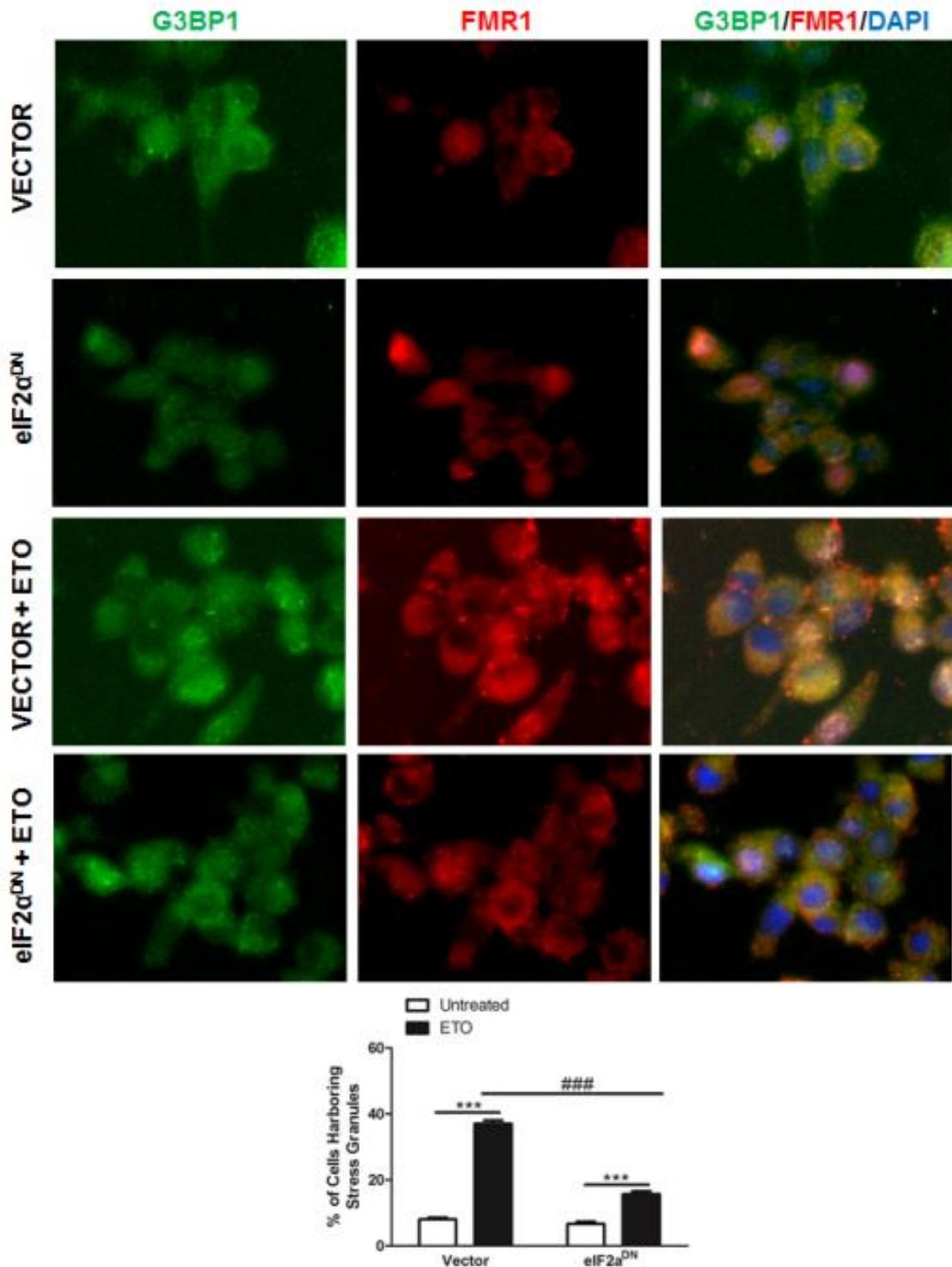
## Resultados



**Figura 29 – A transfecção com eIF2α<sup>DN</sup> reduz a formação de Grânulos de Estresse em células da linhagem U87MG expostas ao Bortezomibe.** Após a transfecção, as células foram expostas a 50μM de Bortezomibe (BZM) por 2 horas, fixadas e marcadas com anticorpos para G3BP1 (verde) e FMR1 (vermelho). O núcleo foi marcado com DAPI (azul). O Experimento foi realizado em triplicata e foram feitas contagens de 5 campos aleatórios. Resultados expressos em percentual de células contendo Grânulos de Estresse. One way Anova, \* denota p<0,05 e \*\*\* denota p<0,001 Controle vs Droga. ### denota p<0,001 Vector + Droga vs eIF2α<sup>DN</sup> + Droga Aumento 200X.



**Figura 30 – A transfecção com eIF2 $\alpha^{DN}$  reduz a formação de Grânulos de Estresse em células da linhagem U87MG expostas a Cisplatina.** Após a transfecção, as células foram expostas a 5mM de Cisplatina (CDDP) por 2 horas, fixadas e marcadas com anticorpos para G3BP1 (verde) e FMR1 (vermelho). O núcleo foi marcado com DAPI (azul). O Experimento foi realizado em triplicata e foram feitas contagens de 5 campos aleatórios. Resultados expressos em percentual de células contendo Grânulos de Estresse. One way Anova, \* denota p<0,05 e \*\*\* denota p<0,001 Controle vs Droga. ### denota p<0,001 Vector + Droga vs eIF2 $\alpha^{DN}$  + Droga Aumento 200X.



**Figura 31 – A transfecção com eIF2 $\alpha^{DN}$  reduz a formação de Grânulos de Estresse em células da linhagem U87MG expostas ao Etoposídeo.** Após a transfecção, as células foram expostas a  $5 \times 10^{-4}$  M de Etoposídeo (BZM) por 2 horas, fixadas e marcadas com anticorpos para G3BP1 (verde) e FMR1 (vermelho). O núcleo foi marcado com DAPI (azul). O Experimento foi realizado em triplicata e foram feitas contagens de 5 campos aleatórios. Resultados expressos em percentual de células contendo Grânulos de Estresse. One way Anova, \*\*\* denota  $p < 0,001$  Controle vs Droga. ### denota  $p < 0,001$  Vector + Droga vs eIF2 $\alpha^{DN}$  + Droga Aumento 200X.

## *Resultados*

---

### **5.4.3 – Avaliação do efeito da transfecção com eIF2 $\alpha$ <sup>DN</sup> na viabilidade e morte celular**

Demonstrado que a transfecção com o plasmídeo contendo eIF2 $\alpha$ <sup>DN</sup> reduz a fosforilação de eIF2 $\alpha$  e a formação, prosseguimos para avaliar seu efeito na viabilidade e morte celular.

Visto que a formação de Grânulos de Estresse é considerada uma resposta celular a estímulos nocivos, a importância da participação da sinalização de eIF2 $\alpha$  na ativação desse mecanismo e tendo demonstrado que ao usarmos o dominante negativo, conseguimos reduzir a fosforilação de eIF2 $\alpha$  e reduzir a formação de SGS, avaliamos agora avaliação do impacto da redução da formação de SGs na viabilidade e morte celular.

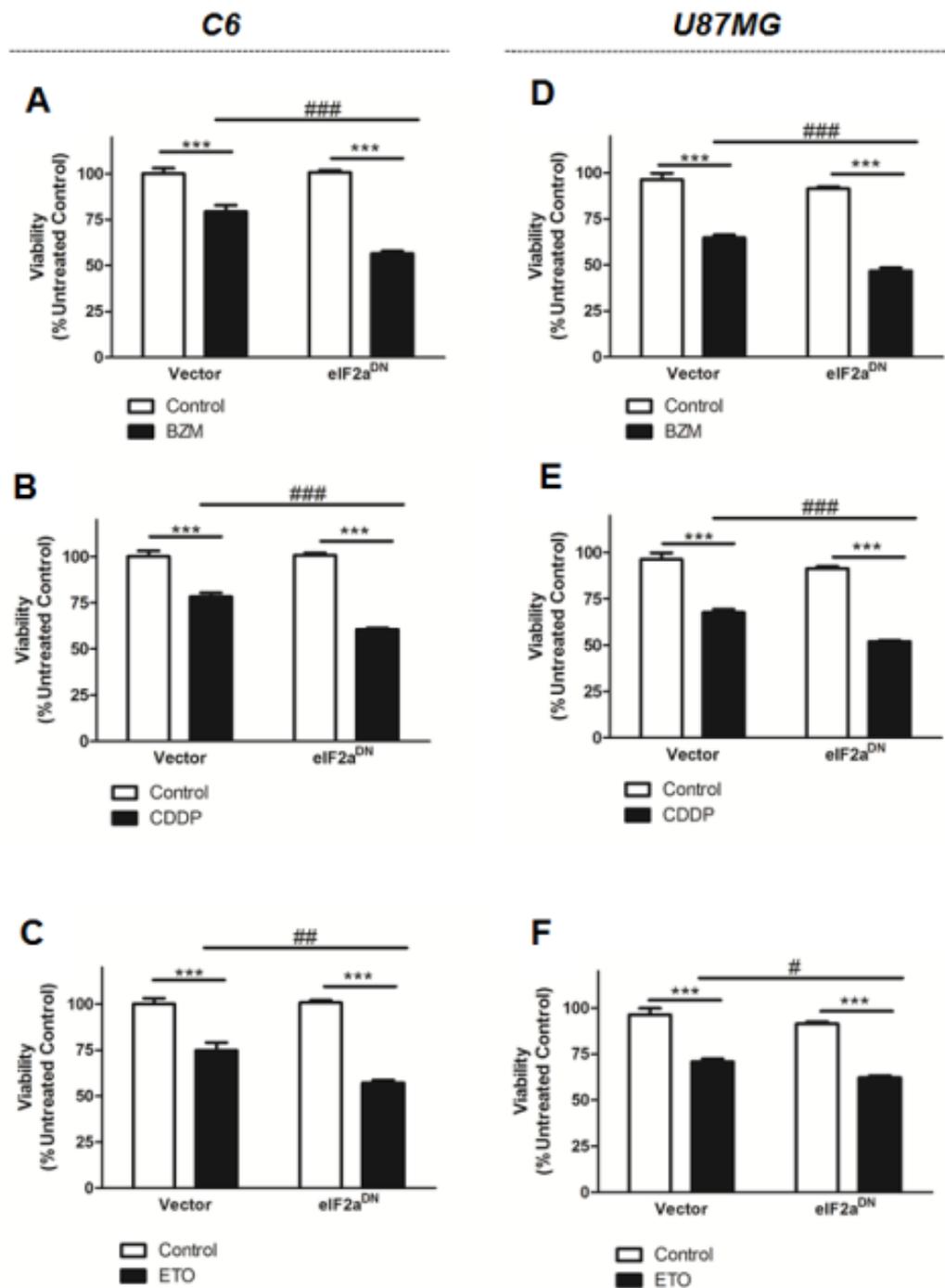
Para atingir esse objetivo, as células das linhagens C6 e U87MG foram semeadas em placas de 96 poços, transfectadas por 24 horas e, em seguida, tratadas com os agentes em estudo por 48 horas. O reagente Presto Blue foi usado para a avaliação da viabilidade celular. Foi verificada uma significativa redução da viabilidade celular, em relação às células transfectadas somente com vetor vazio (Figura 32).

Não há redução significativa na viabilidade celular das células transfectadas tanto com o vetor vazio quanto o dominante negativo. No entanto, ao compararmos as células transfectadas com o vetor vazio e posteriormente expostas aos agentes em estudo e as transfectadas com eIF2 $\alpha$ <sup>DN</sup> e posteriormente tratadas há uma redução da viabilidade celular entre 20-30%.

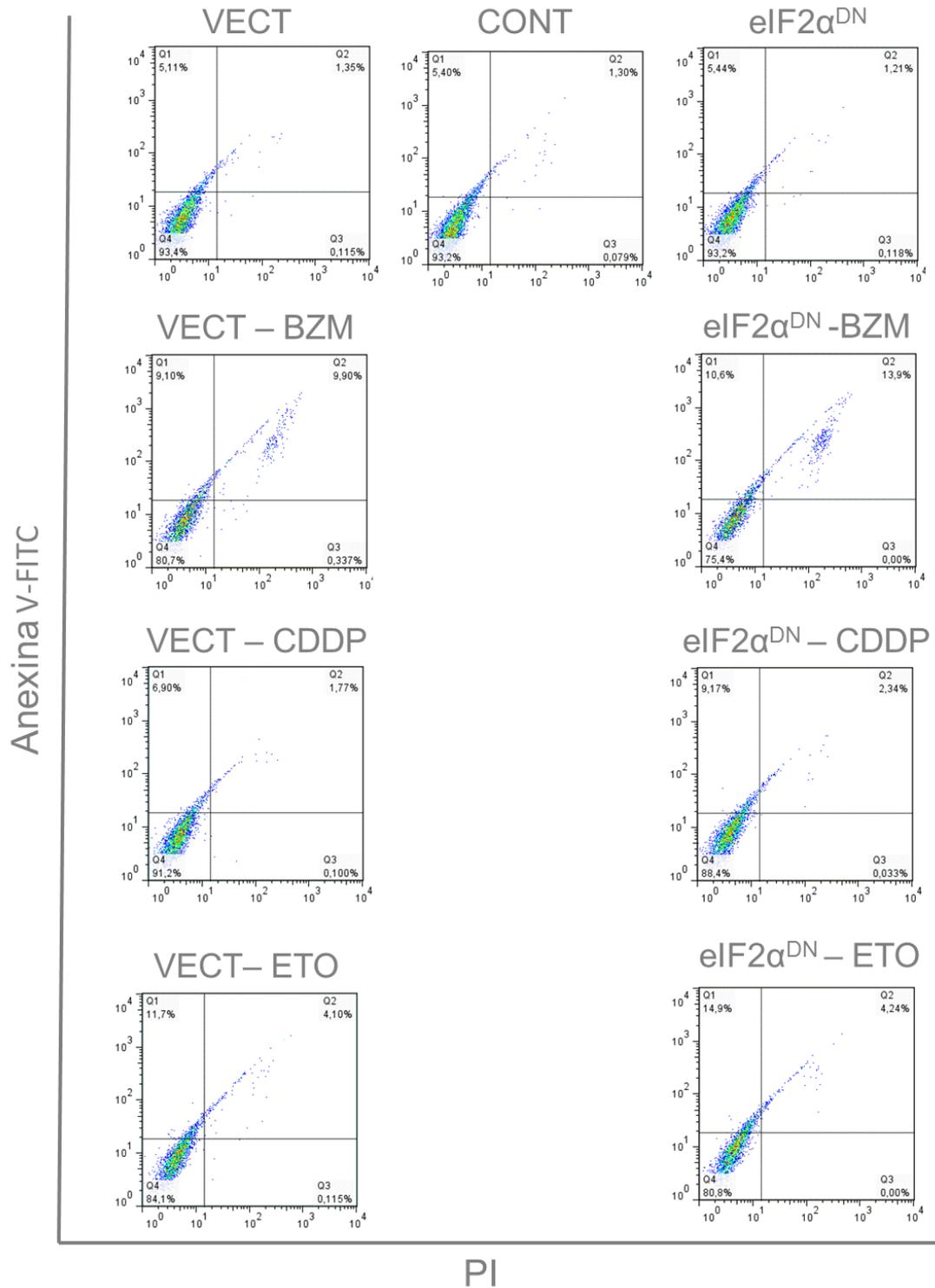
Concluindo que, ao se interferir a capacidade das células de formar Grânulos de Estresse via redução da sinalização de eIF2 $\alpha$ , ocorre uma sensibilização das células de gliomas aos agentes antineoplásicos em estudo.

A seguir, com o objetivo de verificar se o mecanismo de morte celular envolvido é a apoptose, as células da linhagem C6 foram usadas como modelo. Após a transfecção as células foram tratadas por 24 horas com os agentes em estudo e a avaliação foi feita por citometria de fluxo. A figura 33 mostra os resultados obtidos.

## Resultados



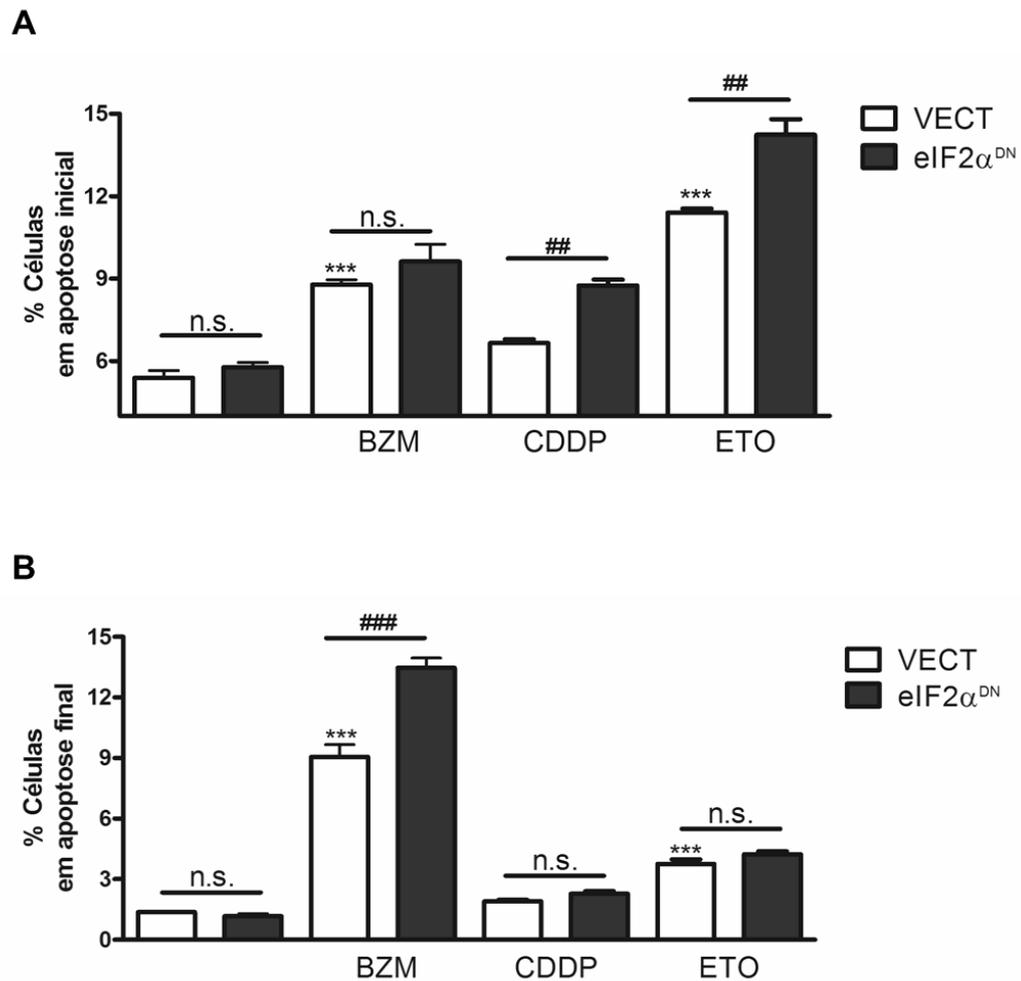
**Figura 32 – Células das linhagens C6 e U87MG transfetadas com eIF2α<sup>DN</sup> têm sua viabilidade celular reduzida quando expostas a agentes antineoplásicos.** Células da linhagem C6 (A-C) e U7MG (D-F) foram transfetadas com vetor vazio (Vector) ou dominante negativo para eIF2α (eIF2α<sup>DN</sup>) por 24h e tratadas por 48h com Bortezomibe (BZM), Etoposídeo (ETO) ou Cisplatina (CDDP) e avaliadas com Presto Blue. Experimento feito em quadruplicata One-way ANOVA. \*\*\* denota p<0,001 vetor vs vetor+droga e DN vs DN+droga. # denota p<0,05, ## denota p<0,01 e ### denota p<0,001 vetor+Droga vs DN+droga.



**Figura 33 – Avaliação do efeito da transfecção com eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$  na morte celular da linhagem C6 quando exposta a agentes antineoplásicos.** Células transfectadas com plasmídeo eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$  foram tratadas por 24 horas com Bortezomibe (BZM), Cisplatina (CDDP) ou Etoposídeo (ETO). A avaliação foi feita pela marcação por Anexina-V/PI em um equipamento Guava EasyCyte. Os dados obtidos foram analisados com o software FlowJo. Experimentos realizados em triplicata.

## Resultados

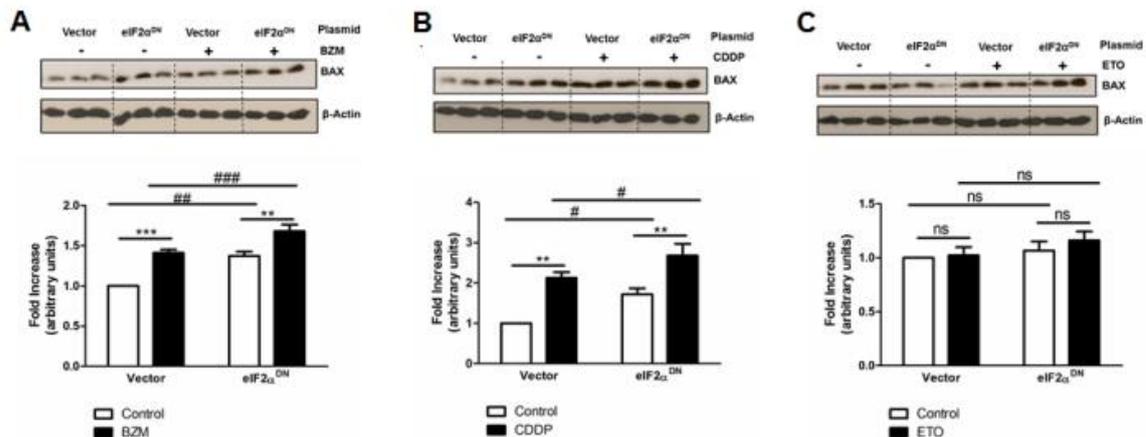
Após análise dos dados obtidos, demonstramos que, embora de modo reduzido, há um efeito significativo no aumento de células apoptóticas quando comparadas as células transfectadas com eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$  e as células transfectadas com um vetor vazio (VECT). Interessantemente há uma diferença entre as células tratadas com Cisplatina e Etoposídeo e as tratadas com Bortezomibe. A figura 34 mostra que enquanto nas células tratadas com as primeiras há um aumento nas células em fase inicial de apoptose (A) o Bortezomibe causa um aumento apenas nas células em fase avançada de apoptose (B).



**Figura 34 – Transfecção com eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$  aumenta a apoptose em células da linhagem C6 após exposição aos agentes antineoplásicos.** 24 horas após a transfecção com um plasmídeo contendo eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$  as células foram expostas a Bortezomibe (BZM), Cisplatina (CDDP) ou Etoposídeo (ETO) por 24 horas. Foi feita a marcação com anexinaV/PI e a análise foi feita por citometria de fluxo. Os dados obtidos foram plotados no software Graphpad Prism. Gráfico A mostra o percentual de células na fase inicial enquanto o gráfico B mostra o percentual de células em fase avançada de apoptose. One-way Anova (Controle vs Drogas - \*\*\* p < 0,001). Teste t de student (eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ +droga vs. vetor +droga - ## p < 0,01 e ### p < 0,001). n.s. – não significativo

## Resultados

Após verificar um aumento da apoptose em células transfectadas com o plasmídeo contendo eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ , prosseguimos em verificar se há aumento da expressão de uma das proteínas pró-apoptóticas, BAX. Os resultados estão apresentados na figura 37. Tanto Bortezomibe quanto Cisplatina aumentam de modo significativo a expressão de BAX enquanto o Etoposídeo aparentemente não afeta de modo significativo a expressão dessa proteína no tempo avaliado.



**Figura 35 – Avaliação da expressão da proteína pró-apoptótica BAX na linhagem C6 após transfecção com plasmídeo eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$  e tratamento por 6 horas.** Células foram transfectadas por 24 horas e em seguida expostas aos agentes quimioterápicos Bortezomibe (A), Cisplatina (B) ou Etoposídeo (C) por 6 horas. Foi obtido o extrato proteico e submetido a uma eletroforese, seguida de *western blotting*. As bandas foram quantificadas por meio de análise densitométrica usando o software ImageJ.

## 5.5 – UTILIZAÇÃO DE RNA DE INTERFERÊNCIA COMO FERRAMENTA PARA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE GRÂNULOS DE ESTRESSE

Até o presente momento, todos os experimentos tiveram como objetivo avaliar o efeito da interferência na fosforilação de eIF2 $\alpha$ . Esta proteína é um importante alvo a ser avaliado, mas está acima da via de sinalização que leva a formação dos Grânulos de Estresse. Há outros alvos como as quinases que fosforilam eIF2 $\alpha$  e a proteína eIF4A que também está envolvida na formação de SGs (KEDERSHA *et al.*, 2013). Porém, alvos de interesse mais específicos para o estudo da formação dos SGs são as proteínas nucleadoras que são responsáveis pela ligação às mRNPs que se acumulam após a parada da síntese proteica e desencadeiam as agregações secundárias que formam os SGs. A proteína G3BP1 é um desses alvos de interesse, e sua inibição via silenciamento por RNA de interferência (RNAi) se mostrou uma

## Resultados

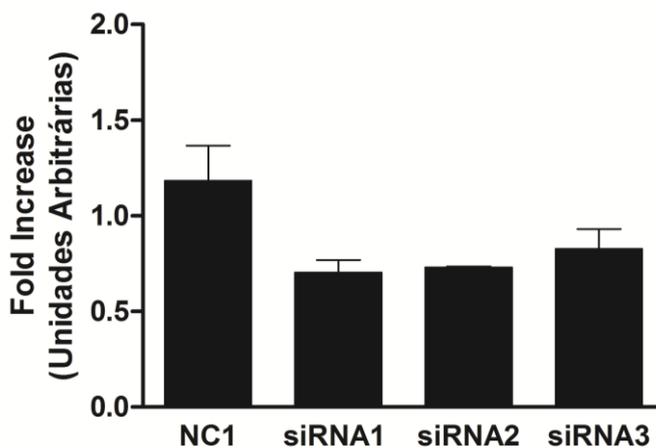
forma eficaz de inibir, de forma mais específica, a formação de SGs (AULAS *et al.*, 2015; TOURRIÈRE *et al.*, 2003).

A proposta desta etapa do trabalho foi usar pequenos RNAs de interferência (siRNAs) específicos para G3BP1 com objetivo de silenciar sua expressão e avaliar este efeito na formação dos Grânulos de Estresse em células de gliomas da linhagem humana U87MG.

### 5.5.1 – Seleção do siRNA

Antes de iniciar os experimentos relacionados ao silenciamento de RNA propriamente ditos, foi necessário realizar a seleção do siRNA que apresentasse o melhor *knockdown* possível do gene de G3BP1. Para tal, usamos o kit TRIFECTA (IDT) que contém um controle negativo (NC1) e três siRNAs (siRNA1, siRNA2 e siRNA3). Células da linhagem U87MG foram transfectadas por 24 horas e foi feita a extração do RNA total, seguida de síntese de cDNA e realização da PCR em tempo real, usando o gene de GAPDH como referência. Os resultados estão na figura 36.

Foi possível detectar uma redução da expressão gênica de cerca de 40% em média.

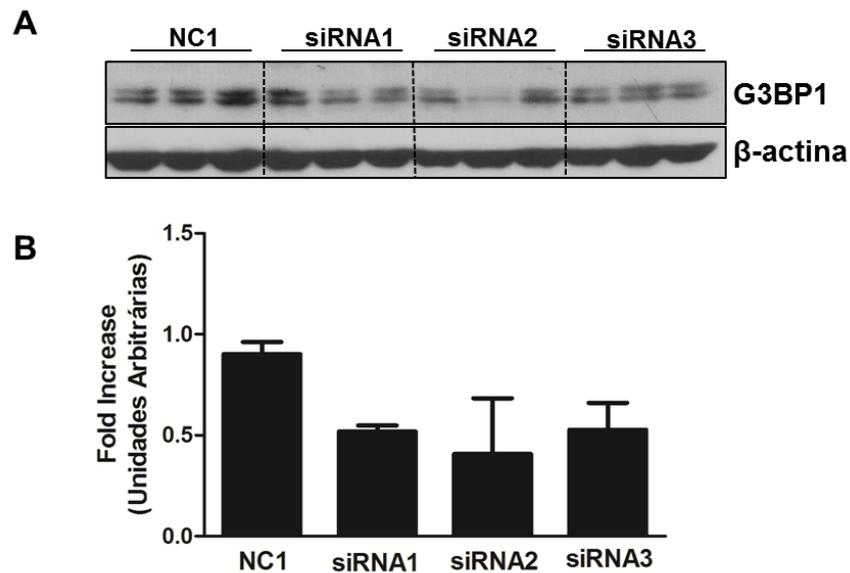


**Figura 36 – Avaliação do silenciamento do gene de G3BP1 por RNA de interferência.** Células transfectadas por 24 horas tiveram seu RNA total extraído, foi realizada a síntese do cDNA seguida de PCR quantitativa em tempo real. Resultados mostram que houve silenciamento de cerca de 40%.

## Resultados

Para verificar se, de fato, a redução de 40% do mRNA iria levar a uma redução significativa da proteína G3BP1, foi realizado um *western blot* após 48 horas de transfecção e os resultados estão na figura 37.

Detectamos uma redução média de 40-50% na expressão da proteína, quando os dados foram normalizados em relação às células transfectadas com o controle negativo (NC1). Não houve diferenças significativas entre os siRNA testados.



**Figura 37 – Avaliação da expressão da proteína G3BP1 em células da linhagem U87MG transfectadas com siRNAs.** As células foram transfectadas por 48 horas e tiveram seus níveis de expressão da proteína G3BP1 avaliados por *western blot* (A). Foi realizada a análise densitométrica das bandas pelo software ImageJ e foi detectada uma redução média de 50% na expressão (B).

### 5.5.2 – Efeito da inibição da expressão de G3BP1 na formação de SGs

Como não houve diferenças muito significativas entre os siRNAs em relação a modulação da expressão de G3BP1, foi decidido realizar o experimento de inibição da formação de Grânulos de Estresse utilizando todos os três siRNAs.

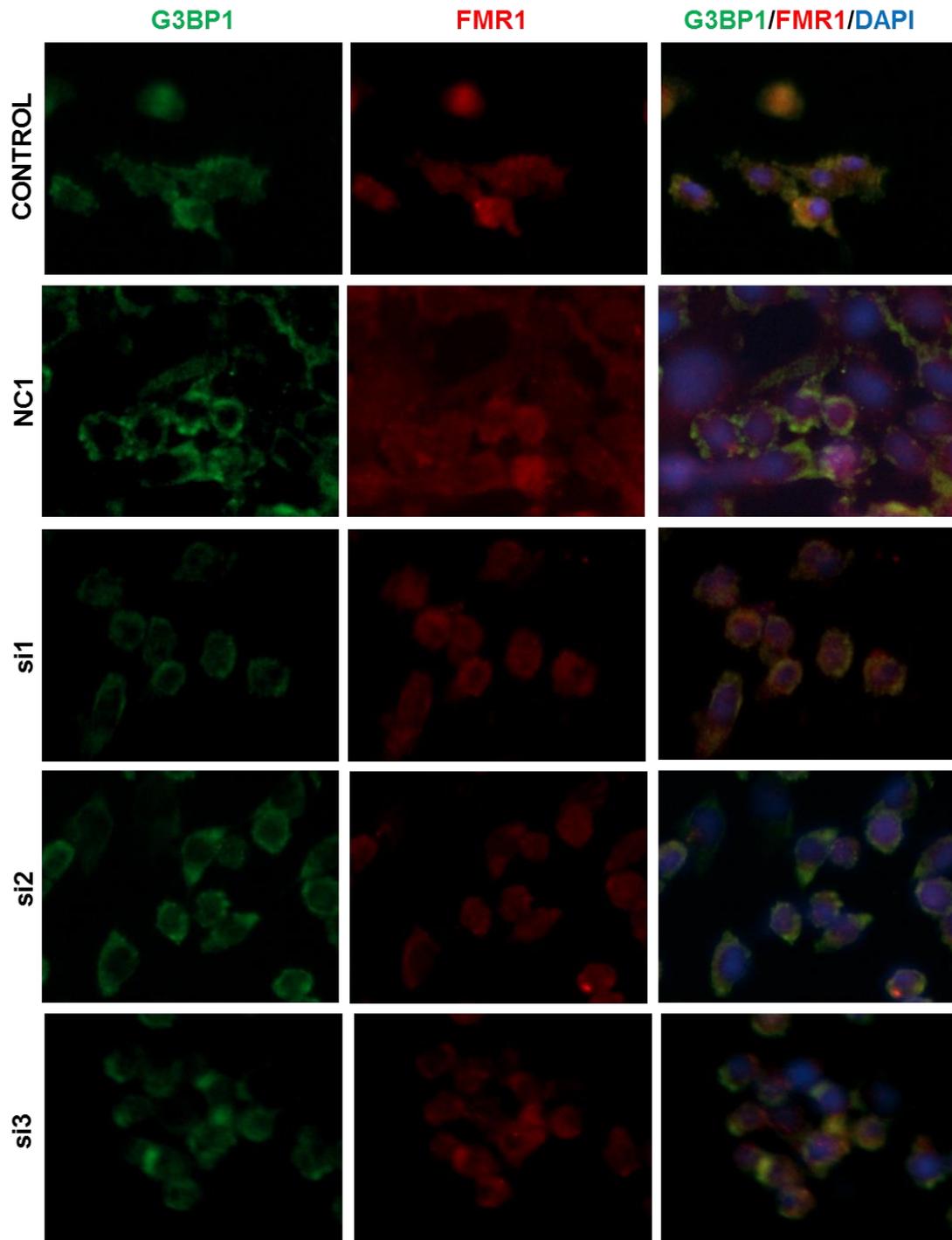
As células foram, então, transfectadas com os siRNAs do kit e após 48 horas elas foram expostas aos agentes em estudo por um período de 2 horas, fixadas e foi realizada a marcação com os anticorpos para G3BP1 e FMR1. No grupo controle após 48h de transfecção, o meio foi substituído por meio de cultura completo fresco. Foram feitas imagens utilizando

## *Resultados*

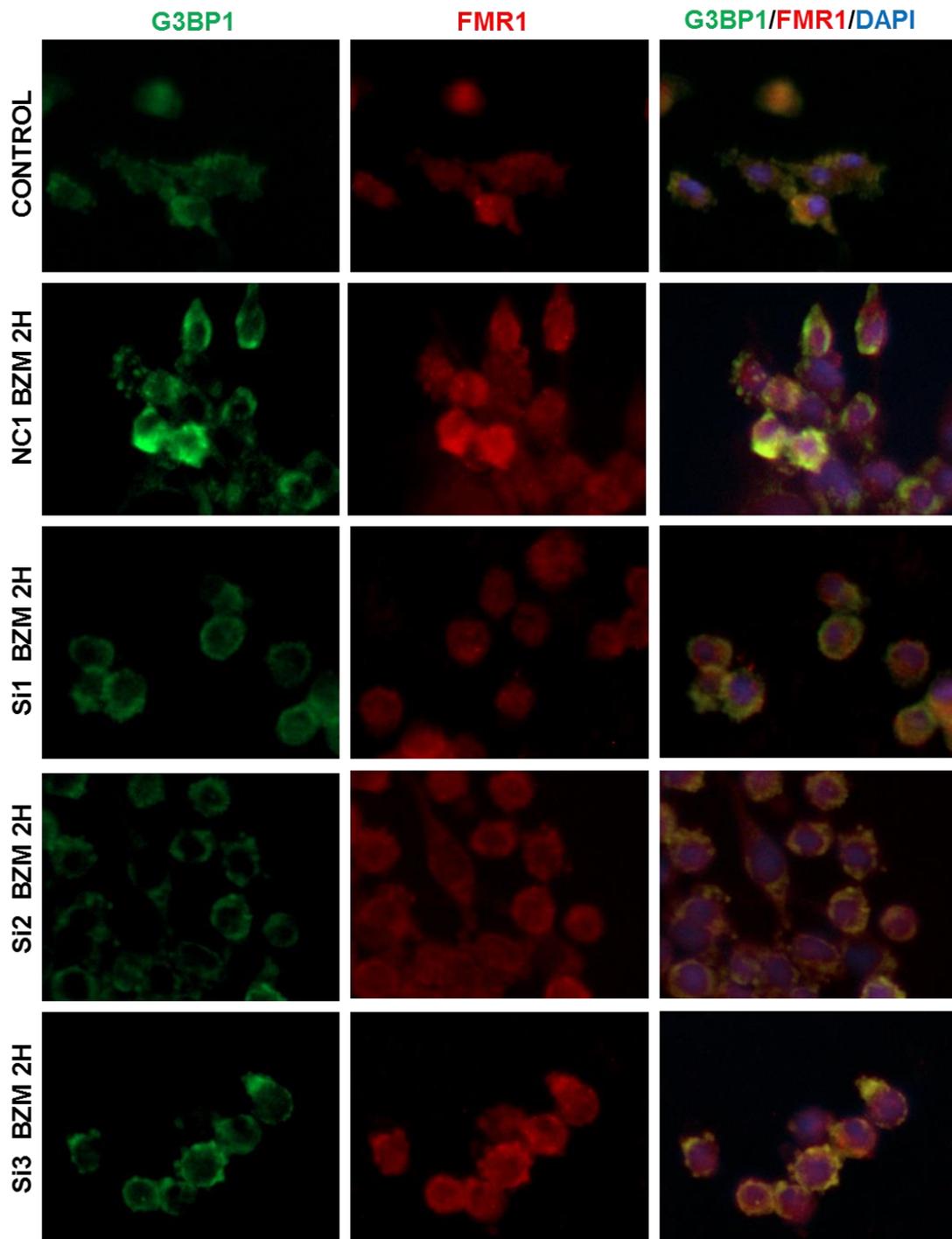
---

microscópio de fluorescência invertido Fluid. As figuras 38 a 41 mostram os resultados obtidos.

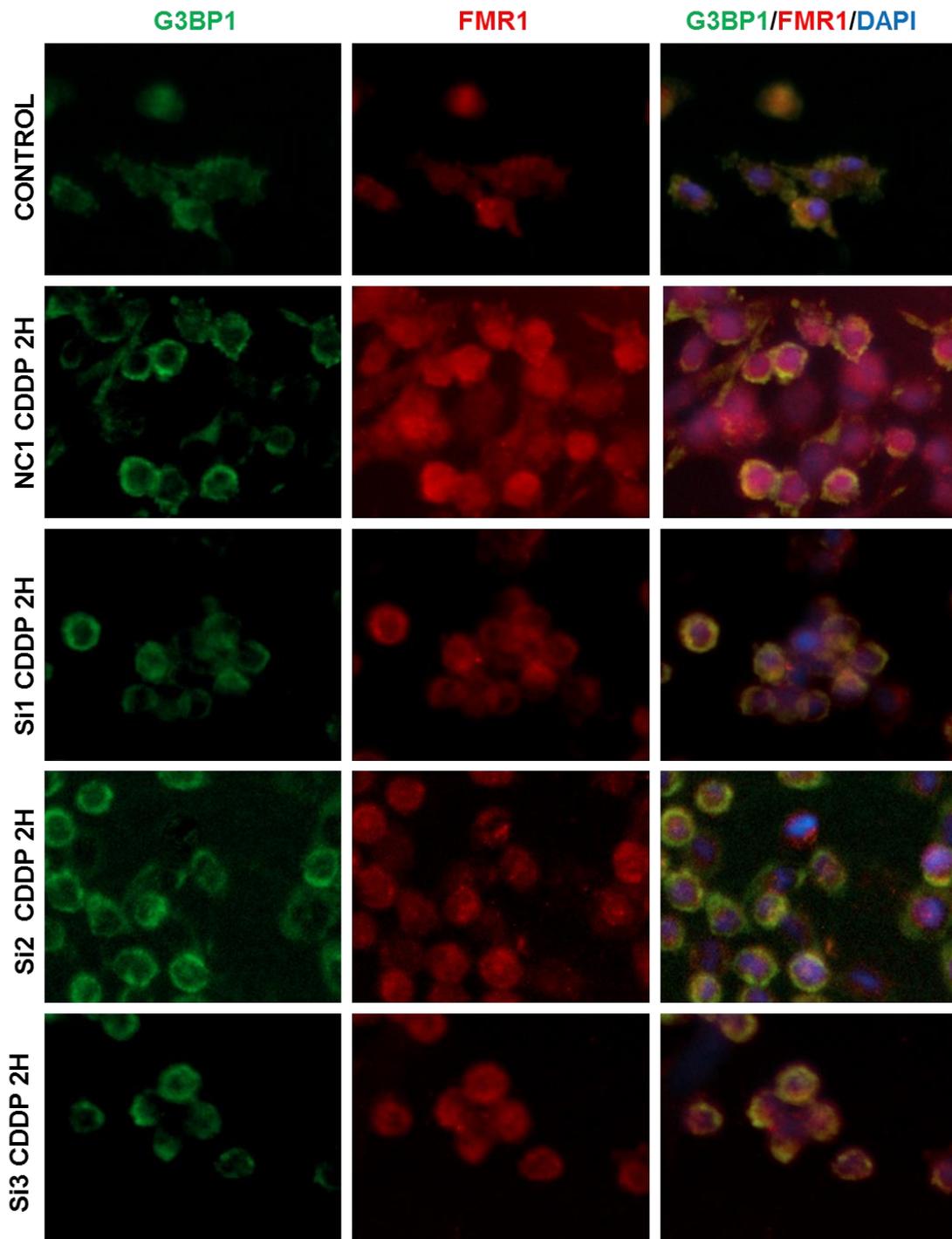
Mesmo com uma redução na expressão da proteína G3BP1 de cerca de 50% e esta ainda ser visível pelas imagens, pudemos notar uma redução nos *foci* em relação ao controle negativo NC1, que por sua vez parece apresentar um número de *foci* maior que o controle, indicando um possível estresse celular causado pelo procedimento de transfecção, que com o uso dos siRNAs, pareceu ser atenuado. Isso foi observado também para os grupos tratados com os agentes em estudo. Confirmando a importância da proteína G3BP1 para a formação de Grânulos de Estresse.



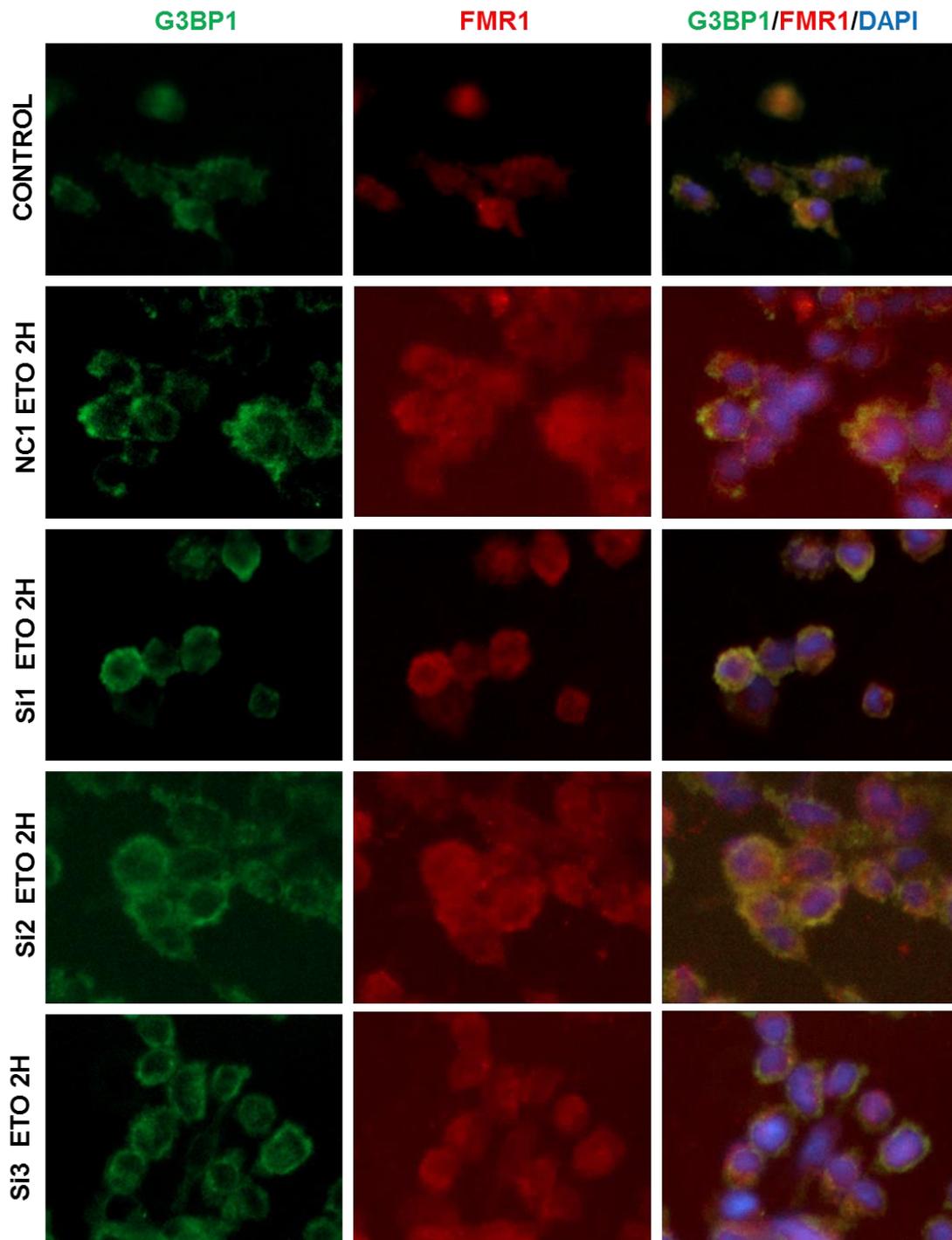
**Figura 38** – A transfecção com siRNAs reduz a formação de Grânulos de Estresse em células da linhagem U87MG. Após 48h de transfecção, as células tiveram o meio contendo siRNAs substituído por meio de cultura completo fresco, fixadas e marcadas com anticorpos para G3BP1 (verde) e FMR1 (vermelho). O núcleo foi marcado com DAPI (azul). Aumento 200X



**Figura 39 – A transfecção com siRNAs reduz a formação de Grânulos de Estresse em células da linhagem U87MG expostas ao Bortezomibe.** Após a transfecção, as células foram tratadas com 50 $\mu$ M de Bortezomibe, fixadas e marcadas com anticorpos para G3BP1 (verde) e FMR1 (vermelho). O núcleo foi marcado com DAPI (azul). Aumento 200X.



**Figura 40 – A transfecção com siRNAs reduz a formação de Grânulos de Estresse em células da linhagem U87MG expostas a Cisplatina.** Após a transfecção, as células foram tratadas com 5mM de Cisplatina, fixadas e marcadas com anticorpos para G3BP1 (verde) e FMR1 (vermelho). O núcleo foi marcado com DAPI (azul). Aumento 200X.

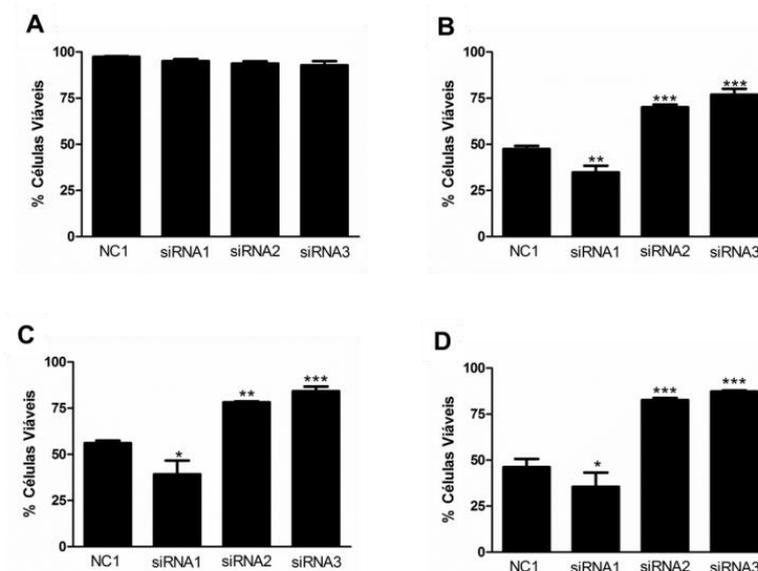


**Figura 41** – A transfecção com siRNAs não reduz a formação de Grânulos de Estresse em células da linhagem U87MG expostas ao Etoposídeo. Após a transfecção, as células foram tratadas com 50μM de Etoposídeo, fixadas e marcadas com anticorpos para G3BP1 (verde) e FMR1 (vermelho). O núcleo foi marcado com DAPI (azul). Aumento 200X.

## Resultados

### 5.5.3 – Avaliação do efeito da transfecção com siRNAs na viabilidade celular da linhagem U87MG

O próximo passo foi avaliar o efeito da transfecção dos siRNAs na viabilidade celular pelo método da exclusão do Azul de Tripán. As células foram transfectadas e após 48 horas tratadas com os agentes antineoplásicos por 24 horas. As células foram tripsinizadas e procedeu-se a contagem em câmara de *Neubauer*. O número de células consideradas viáveis foi convertido em valores percentuais e os resultados obtidos estão na figura 42. Foi possível verificar que a transfecção com os siRNAs somente não possui efeitos que levem a redução da viabilidade celular (A), enquanto nos demais tratamentos é possível ver que há diferenças entre o grupo tratado somente com a droga (NC1) e os demais grupos que foram transfectados com siRNAs 1, 2 e 3. Em linhas gerais, percebeu-se que o siRNA1 levou a uma maior redução da viabilidade celular das células tratadas com BZM (B), CDDP (C) ou ETO (D) em relação ao grupo NC1, porém os siRNAs 2 e 3 não sensibilizaram as células aos tratamentos e em todos os tratamentos o percentual de células viáveis foi maior do que o grupo NC1.



**Figura 42 – A transfecção com siRNAs altera a viabilidade celular quando associada ao tratamento com agentes antineoplásicos em células da linhagem U87MG.** As células foram transfectadas e após 48 horas tratadas com agentes antineoplásicos por 24 horas. Após este período, as células foram tripsinizadas e foi realizada a avaliação pela exclusão do Azul de Tripán. Os experimentos foram feitos em triplicata. Os resultados são expressos em percentual de células viáveis. Somente a transfecção em si não causa alteração significativa na viabilidade celular como pode ser visto no grupo controle (A). Nos outros grupos Bortezomibe (B), Cisplatina (C) e Etoposídeo (D), foi possível notar que o siRNA1 associado a droga leva a uma maior redução da viabilidade celular em relação ao grupo controle NC1+ droga.

## 6 – DISCUSSÃO

Gliomas apresentam um desafio na oncologia pelas limitações atuais no tratamento. Apesar de um melhor conhecimento sobre o desenvolvimento desses tumores e da existência de tratamentos avançados, a taxa de sobrevida global em pacientes portadores de glioblastomas ainda permanece muito baixa. A principal opção terapêutica inclui cirurgia seguida de radioterapia e quimioterapia com agente alquilante. As limitações incluem dificuldade em realizar a ressecção total sem prejudicar a porção saudável do cérebro (dada a natureza difusa do tumor) e o desenvolvimento da resistência aos agentes antineoplásicos os quais ainda possuem efeitos bastante modestos (DIRKS, 2010; STUPP *et al.*, 2005). A fim de se superar essas limitações, existe muito interesse não apenas na melhoria dos procedimentos de neurocirurgia, mas também na otimização dos tratamentos adjuvantes, incluindo o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos ou terapias combinadas visando sensibilização das células tumorais de forma a aumentar a eficácia, diminuir os efeitos colaterais, bem como de superar os mecanismos de resistência aos agentes quimioterápicos existentes (LU e SHERVINGTON, 2008; SARKARIA *et al.*, 2008)

No presente trabalho, a hipótese principal foi a de que grânulos de RNA, mais especificamente os Grânulos de Estresse (SGs), possuem um importante papel na resposta de células de glioma a agentes quimioterapêuticos. Demonstramos que a redução da capacidade de formar SGs, seja reduzindo a fosforilação do fator 2 alfa de iniciação da tradução (eIF2 $\alpha$ ) ou reduzindo os níveis de expressão da proteína nucleadora de SGs G3BP1, aumenta a citotoxicidade dos agentes antineoplásicos Bortezomibe (BZM – inibidor de proteassoma), Cisplatina (CDDP – agente alquilante) e Etoposídeo (ETO – inibidor de topoisomerase II). Em conjunto, os dados obtidos sugerem que a formação de SGs representa um importante mecanismo de resistência em células de glioma e que a inibição da formação de SGs pode representar uma forma efetiva de sensibilizar gliomas a agentes quimioterapêuticos.

Experimentos iniciais indicaram que todos os agentes em estudo (BZM, CDDP e ETO) apresentam citotoxicidade relativa em ambas as linhagens, C6 (roedor) e U87MG (humano), como esperado, uma vez que já é bem estabelecido que estas drogas possuem efeito em células tumorais, inclusive em células de glioma (AOKI *et al.*, 2010; FOURNIER *et al.*, 2010; KLUZA *et al.*, 2006; SEDLESTSKA *et al.*, 2005; VLACHOSTERGIOS *et al.*, 2013;

### Discussão

ZUSTOVICH *et al.*, 2009;). Porém, foi importante realizar esses testes iniciais uma vez que os valores encontrados seriam referência futura para o desenvolvimento do presente estudo nas condições experimentais utilizadas. É importante também salientar que todas as drogas utilizadas neste trabalho são atualmente utilizadas no tratamento de tumores sólidos e também como terapia adjuvante para pacientes com glioblastoma (AOKI *et al.*, 2010; CAPDEVILA *et al.*, 2014; PORTNOW *et al.*, 2012). Especialmente nos casos onde o paciente é refratário ao tratamento-padrão com Temozolomida ou o tumor é recorrente

O Bortezomibe é um agente quimioterápico utilizado no tratamento de mielomas (MOREAU *et al.*, 2012) e tem sido proposto o seu uso em associação à Temozolomida (TMZ) para o tratamento de gliomas como meio de superar a resistência à TMZ (KUBICEK *et al.*, 2009; PORTNOW *et al.*, 2012; UNTERKIRCHER *et al.*, 2011; VLACHOSTERGIOS *et al.*, 2013). A Cisplatina, por sua vez, é utilizada como primeira linha de tratamento para vários tipos de tumores sólidos, como o testicular, o cervical, o cabeça e pescoço, ente outros, tanto como terapia única ou combinada a outros agentes e também como adjuvante à cirurgia e à radioterapia. No entanto, os pacientes que inicialmente respondem à droga frequentemente desenvolvem resistência durante o curso do tratamento (BASU e KRISHNAMURTHY, 2010). Em relação ao tratamento de gliomas, a Cisplatina tem sido usada como adjuvante no tratamento de pacientes refratários à TMZ ou quando a cirurgia não é possível (CAPDEVILA *et al.*, 2014; ZUSTOVICH *et al.*, 2009). Porém, a questão da toxicidade inerente da Cisplatina ainda apresenta um grande desafio, o que limita o seu uso (KIM *et al.*, 2011; SILVANI *et al.*, 2009). Portanto, estudos que possam levar a um uso mais seguro desse fármaco como adjuvante no tratamento de glioblastoma são de grande relevância. O Etoposídeo, por sua vez, é um dos agentes antineoplásicos mais prescritos na clínica para tratar uma ampla variedade de malignidades como, por exemplo, tumores de pulmão, malignidades de células germinativas, sarcomas, leucemias e linfomas (BALDWIN e OSHEROF, 2005). Assim como a Cisplatina, também pode ser usado como terapia adjuvante para o tratamento de gliomas (AOKI *et al.*, 2010; IWAMA *et al.*, 2015) Um fator limitante ao uso deste agente, no entanto, além dos característicos efeitos colaterais, é o surgimento de leucemias após exposições por longos períodos (LEONE *et al.*, 2011; PENDELTON *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos nos testes iniciais mostram que há algumas diferenças entre as linhagens com relação à sensibilidade aos agentes utilizados, sendo que para se obter o mesmo efeito da Cisplatina observado na linhagem U87MG, na linhagem C6 é necessário

### Discussão

---

utilizar uma concentração 10 vezes maior, enquanto para o Etoposídeo é necessário 5 vezes maior. Porém, para ambas as linhagens o Bortezomibe foi igualmente potente. Ao compararmos a Cisplatina e o Etoposídeo ao Bortezomibe, notou-se que o inibidor de proteassoma BZM apresenta um  $EC_{50}$  significativamente inferior, o que indica que, mesmo em baixas concentrações (na escala de nanomolar), essa droga tem alta atividade, sendo a mais potente entre as três drogas utilizadas. O agente intercalante Cisplatina, por sua vez, apresentou  $EC_{50}$  em escala micromolar e efeito máximo em escala milimolar e o inibidor da topoisomerase II Etoposídeo apresentou  $EC_{50}$  em escala micromolar para C6, nanomolar para U87MG, e efeito máximo em escala micromolar para U87MG e milimolar para C6, ainda são concentrações estas relativamente altas.

Os tumores frequentemente crescem e se desenvolvem em ambientes considerados hostis, caracterizados por várias condições de estresse, tais como hipóxia e privação de nutrientes, devido a uma vascularização irregular, ou estresses genotóxicos e oxidativos induzidos pela acelerada divisão celular e exposição a quimioterápicos (LIU e QIAN, 2014; SPRIGGS *et al.*, 2010). É importante mencionar que essas características são especialmente verdadeiras para gliomas (DIRKS, 2010).

As células tumorais devem ser capazes, portanto, de superar estes e outros tipos de estresse, sendo que a forma pelo qual elas respondem a isso irá determinar a progressão tumoral e como o paciente irá reagir aos tratamentos. Em nível celular, a resposta ao estresse amplamente depende da preservação de energia e na geração de uma resposta adaptativa, que, combinadas, mantêm a sobrevivência da célula (LIU e QIAN, 2014). No entanto, os mecanismos de adaptação ao estresse interferem na proliferação celular, gerando um paradoxo durante a progressão tumoral, uma vez que para se adaptar a célula necessita alterar w muitas vezes reduzir a expressão de diversas proteínas envolvidas no desenvolvimento tumoral até que o estímulo negativo cesse.

Uma das formas principais de se adaptar ao estresse ambiental é por meio de uma regulação rígida da tradução do RNA mensageiro (SPRIGGS *et al.*, 2010). De fato, a tradução é um processo de alto consumo energético (HERSHEY *et al.*, 2012) e é tipicamente inibida em resposta a inúmeros tipos de estresse em células tumorais (LIU e QIAN, 2014), permitindo a essas células manter o equilíbrio energético. Somado a isso, a redução da tradução previne a célula de sintetizar proteínas que podem inclusive interferir na resposta adaptativa ao estresse

### Discussão

(HERSHEY *et al.*, 2012). Nessas situações de estresse, os denominados Grânulos de Estresse possuem um papel de grande importância. Entretanto, apenas nos últimos anos, o papel dessas estruturas vem sendo avaliado.

Nesse sentido, vários estudos têm demonstrado uma estreita relação entre a formação de SGs e a viabilidade celular em diferentes tipos celulares. Especificamente, no âmbito da resposta de células tumorais a agentes antineoplásicos, destacam-se alguns estudos, tais como os de Fournier *et al.* (2010) que demonstraram que o Bortezomibe é um potente ativador da formação de SGs em linhagens celulares de pulmão, cólon e cérvix. A inibição da formação de SGs levou a um aumento da morte celular por apoptose nestas células, demonstrando a importância destas via na resposta ao Bortezomibe. Outro agente que leva a formação de SGs é o 5-Fluorouracil (5-FU), usado no tratamento de tumores de mama, colorretal e de cabeça e pescoço (LONGLLEY *et al.*, 2003). Kaehler *et al.* (2014) demonstraram que o acúmulo de metabólitos de RNA contendo 5-FU ativa vias que levam à formação de SGs e inibem a apoptose. Entretanto, não há nenhuma evidência na literatura de que as células de glioma são capazes de formar Grânulos de Estresse.

Vários mecanismos pelos quais as células de glioma resistem a agentes quimioterápicos, desde os mais gerais como, por exemplo, o efluxo ou a inativação de drogas, até os mais específicos como, por exemplo, a ativação da maquinaria de reparo de DNA, são bem estabelecidos (LU e SHERVINGTON, 2008; SARKARIA *et al.*, 2008). No entanto, a contribuição das respostas primárias ao estresse, tais como a ativação da via de resposta ao estresse integrada (ISR - Integrated Stress Response), ainda não havia sido investigada para esse tipo de tumor. Em linhas gerais, essa via leva ao bloqueio global da tradução de proteínas através da desmontagem dos polissomos e tem como resultado a formação de SGs a partir da atividade de algumas proteínas inicialmente associadas à maquinaria de tradução como, por exemplo, o eIF2 $\alpha$  (ANDERSON e KEDERSHA, 2009). A ISR permite que as células se adaptem a condições de estresse, reprogramando o seu repertório traducional através de um processo de triagem mRNA em grânulos citoplasmáticos, tais como os SGs, compostos principalmente por proteínas de ligação de RNA e mRNA não traduzidos (ANDERSON e KEDERSHA, 2002; ANDERSON e KEDERSHA, 2009; KEDERSHA *et al.*, 2013).

No presente estudo, propomos que a formação de SGs pode ser uma resposta primária de células de glioma frente ao estresse citotóxico causado por agentes quimioterapêuticos,

### Discussão

---

independentemente de seus mecanismos de ação específicos, e pode representar um mecanismo de resistência importante para glioblastomas. Os nossos resultados mostram pela primeira vez que as células de glioma são capazes de formar SGs quando expostas a agentes antineoplásicos.

Além disso, sabe-se que um dos principais ativadores da formação de SGs é a proteína eIF2 $\alpha$ , cuja fosforilação na serina 51 leva à parada da tradução e à formação de SGs (ANDERSON e KEDERSHA, 2002; CASTILHO *et al.*, 2014; HARDING *et al.*, 2000; McEWEN *et al.*, 2005). Ampliando a nossa proposta, hipotetizamos que a modulação dessa via representa uma potencial estratégia para sensibilizar células de gliomas a agentes quimioterapêuticos.

Inicialmente, demonstramos que os agentes em estudo são capazes de estimular a fosforilação de eIF2 $\alpha$  e a formação de SGs, sugerindo que esta pode ser uma via de formação de SGs em resposta a agentes antineoplásicos em células de glioma.

Foi proposto, então, como forma de interferir na formação de SGs, o uso de um plasmídeo (eIF2-S51A) que contém a sequência para uma forma de eIF2 $\alpha$  que apresenta uma mutação no sítio de fosforilação, com a alteração do resíduo de serina 51 por uma alanina levando a perda deste sítio. Esse plasmídeo é amplamente utilizado em estudos de sinalização de eIF2 $\alpha$ , incluindo , envolvendo a formação de SGs. Ao ser forçadamente expresso juntamente com a proteína endógena, a presença da forma mutante dominante negativa de eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$ ) resulta na redução dos níveis da fosforilação de eIF2 $\alpha$  (GERLITZ *et al.*, 2002; KEDERSHA *et al.*, 1999; TENG *et al.*, 2014). Vale ressaltar que, devido ao fato de ambos eIF2 $\alpha$  endógeno e a forma mutante migrarem de forma semelhante em gel de poliacrilamida, não é possível distinguir entre as duas proteínas se a forma mutante não tiver sido previamente marcada (com GFP, por exemplo) como é o caso do nosso estudo. A análise densitométrica de eIF2 $\alpha$  total indicou que a expressão da proteína eIF2 $\alpha$  não foi significativamente alterada nas células de glioma utilizadas em nosso estudo quando da presença do vetor dominante negativo, indicando que os nossos achados não se devem a um artefato de superexpressão.

Os resultados obtidos mostraram que, de fato, o uso deste método foi capaz de reduzir de modo significativo a fosforilação de eIF2 $\alpha$ , a formação de SGs, a viabilidade celular e de aumentar a apoptose nas células transfectadas com o dominante negativo em resposta aos agentes quimioterapêuticos BZM, CDDP e ETO. Corroborando esses achados, os tratamentos com Bortezomibe e Cisplatina foram relatados como desencadeadores da fosforilação de

---

### Discussão

eIF2 $\alpha$  em outras linhagens celulares como A549 (carcinoma de pulmão) e HeLa (adenocarcinoma cervical) (FOURNIER *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2013). Exceto para o Bortezomibe, o qual foi recentemente demonstrado estimular a fosforilação de eIF2 $\alpha$  na linhagem de células de glioma T98G (VLACHOSTERGIOS *et al.*, 2013), esta é a primeira demonstração de que diferentes classes de agentes quimioterapêuticos, especialmente o agente alquilante Cisplatina e o inibidor de topoisomerase II Etoposídeo, são capazes de estimular a fosforilação de eIF2 $\alpha$  em células de glioma. Além disso, Bortezomibe e MG132, ambos inibidores de proteassoma, foram demonstrados estimular a formação de SGs de maneira dependente da fosforilação eIF2 $\alpha$  em linhagens celulares de tumor de cólon, colo do útero, pulmão e cabeça e pescoço (FOURNIER *et al.*, 2010; GAREAU *et al.*, 2011). Sendo que uma vez feito o silenciamento da quinase HRI, houve a inibição da fosforilação e consequente redução da formação de SGs.

Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que a formação de Grânulos de Estresse ocorre em células de gliomas quando estas são expostas a agentes quimioterápicos, independentemente dos seus respectivos mecanismos de ação, como um primeiro mecanismo de resposta. Além disso, os resultados também sugerem que essa formação de SGs depende, pelo menos em parte, da fosforilação de eIF2 $\alpha$ . Uma vez que esta via sofre uma inibição parcial na presença do vetor dominante negativo, as células reduzem a sua capacidade de formar SGs, se tornando mais susceptíveis aos efeitos citotóxicos das drogas em estudo, aumentando a sua eficácia.

Com objetivo de interferir na formação de SGs de modo mais específico, decidimos utilizar a estratégia de RNA de interferência para levar a uma redução transiente da expressão da proteína G3BP1, uma das proteínas nucleadoras de SG. Sua inibição é conhecida por reduzir a formação e o tamanho dos SGs, enquanto a sua superexpressão leva à formação de SGs espontaneamente, sem estímulo (AULAS *et al.*, 2015; KEDERSHA *et al.*, 2005; MATSUKI *et al.*, 2013; TOURRIÈRE *et al.*, 2003). Para tal, usamos um kit contendo três siRNAs com o objetivo de selecionar um que atingisse o maior nível de silenciamento para prosseguir com os demais experimentos.

Em um primeiro momento, foram feitas PCRs em tempo real (qPCRs) para avaliar o nível de mRNA presente nas células transfectadas com todos os siRNAs presentes no kit, inclusive um controle negativo denominado NC1. Foram feitas transfecções pelo método denominado

### Discussão

---

forward, pelo qual as células são semeadas e depois transfectadas, bem como pelo modo reverso, onde primeiro os duplexes são complexados com o reagente de transfecção e pipetados na placa onde será feita a semeadura das células e, em seguida, então, as células são semeadas (dados não mostrados). O método tradicional (forward) foi o que resultou em maior homogeneidade dos resultados e, portanto, foi o adotado neste estudo. Como resultado observou-se que os três siRNAs foram capazes de reduzir a presença do mRNA para G3BP1 em cerca de 40% após 24 horas de transfecção.

Além de verificar a redução do mRNA, também observamos que houve redução de cerca de 50% na expressão da proteína. Em seguida, avaliamos o efeito da inibição de G3BP1 na formação dos SGs. Interessantemente, observamos que houve redução na capacidade das células de formar SGs.

Outras proteínas tem grande importância na formação de SGs e não foram avaliadas neste estudo como TIA1/TIAR (KEDERSHA *et al.*, 2000), por exemplo. Um trabalho mais recente de Matsuki *et al* (2013) mostrou que além de G3BP1, há outra proteína correlacionada denominada G3BP2 que também é recrutada para SGs em situações de estresse celular (KOBAYASHI *et al.*, 2012) e também tem função importante na formação de SGs. Foi demonstrado que mesmo quando feito o silenciamento de G3BP1, apenas com o silenciamento de G3BP2 também levaria a uma redução quase que total da capacidade das células de formar SGs.

O estudo de vias alternativas de quimiorresistência é importante não apenas para melhor compreender a biologia dos glioblastomas, mas também para aumentar as possibilidades de superar a resistência aos medicamentos para esse tipo letal de tumor, e bem como para explorar a descoberta de novos biomarcadores. De uma maneira geral, o presente trabalho revela *insights* importantes sobre como células de glioma podem responder a agentes quimioterápicos e desenvolver resistência através da rápida formação de Grânulos de Estresse. Postulamos que, sob estresse quimioterapêutico, a via do eIF2 $\alpha$ , como parte da ISR, seria desviada para a reprogramação da expressão proteica, através da proteção de mRNAs importantes dentro dos SGs, não somente para a recuperação imediatamente após o estresse celular, mas também para a proteção contra a morte celular durante o período de estresse. Dessa maneira, a modulação da formação de SGs poderia representar estratégia terapêutica eficaz na sensibilização de células de glioma a agentes quimioterapêuticos.

## 7 – CONCLUSÕES

- Células de gliomas formam Grânulos de Estresse quando expostas ao arsenito de sódio e aos agentes antineoplásicos Bortezomibe, Cisplatina e Etoposídeo;
- Os agentes antineoplásicos Bortezomibe, Cisplatina e Etoposídeo estimulam a fosforilação de eIF2 $\alpha$ ;
- A redução da fosforilação de eIF2 $\alpha$  reduz a formação de Grânulos de Estresse induzida pelos agentes antineoplásicos Bortezomibe, Cisplatina e Etoposídeo;
- A redução da capacidade de formar Grânulos de Estresse, seja na presença do vetor dominante negativo eIF2 $\alpha^{\text{DN}}$  ou de siRNA para G3BP1, leva ao aumento da citotoxicidade dos agentes antineoplásicos Bortezomibe, Cisplatina e Etoposídeo em células de glioma.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ADAMS, D. R.; RON, D e KIELY, P A. RACK1, a multifaceted scaffolding protein: structure and function. **Cell Communication and Signalling**. Vol. 9, pp. 1478-1481, 2011.
- AGUILAR, L. K. et al. The spectrum of vaccine therapies for patients with glioblastoma multiforme. **Current Treatment Options in Oncology** . 2012, Vol. 13, pp. 437-450, 2012
- ANDERSON, P. e KEDERSHA, N. Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. **Cell Stress and Chaperones**. 2002, Vol. 7, pp. 213-221, 2001.
- ANDERSON, P. e KEDERSHA, N. Stressful initiations. **Journal of Cell Science**. Vol. 115, pp. 3227-3234, 2002.
- ANDERSON, P. e KEDERSHA, N. Stress granules: the Tao of RNA triage. **Trends in Biochemical Sciences**. Vol. 33, pp. 141-150, 2008.
- ANDERSON, P. e KEDERSHA, N. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. Vol. 10, pp. 430-436, 2009.
- ANDERSON, P.; KEDERSHA, N. e IVANOV, P. Stress granules, P-bodies and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta** . Vol. 1849, pp. 861-870, 2015
- ANTON, K.; BAEHRING, J. M. e MAYER, T. Glioblastoma multiforme: Overview of current treatment and future perspectives. **Hematology/Oncology Clinics of North America**. Vol. 26, pp. 825-853, 2012..
- AOKI, T. et al. Phase II study of ifosfamide, carboplatin, and etoposide in patients with a first recurrence of glioblastoma multiforme. **Journal of Neurosurgery**. Vol. 112, pp. 50-56, 2010.
- ARIMOTO, K. et al. Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. **Nature Cell Biology**. Vol. 10, pp. 1324-1332, 2008.
- AULAS, A. et al. G3BP1 promotes stress-induced RNA granule interactions to preserve polyadenylated mRNA. **The Journal of Cell Biology**. Vol. 209, pp. 73-84, 2015.
- BAERISWYL, V e CHRISTOFORI, G. The angiogenic switch in carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**. Vol. 19, pp. 329–337, 2009.
- BAI, R. Y.; STAEDTKE, V. e RIGGINS, G. J. Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. **Trends in Molecular Medicine**. Vol. 17, pp. 301-312, 2011.
- BALDWIN, E. L. e OSHEROFF, N. Etoposide, Topoisomerase II and Cancer. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**. Vol. 5, pp. 363-372, 2005.
- BASU, A. e KRISHNAMURTHY, S. Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage. **Journal of Nucleic Acids**. Vol. doi: 10.4061/2010/201367, 2010.

*Referências Bibliográficas*

---

BERGMAN, P. J. e HARRIS, D. Radioresistance, chemoresistance and apoptosis resistance. The past, present and future. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. Vol. 27, pp. 47-57, 1997.

BONNESEN, B. et al. Vascular endothelial growth factor A and vascular endothelial growth factor receptor 2 expression in non-small cell lung cancer patients: relation to prognosis. **Lung Cancer**. Vol. 66, pp. 314-318, 2009.

BORDELEAU, M. E. et al. Stimulation of mammalian translation initiation factor eIF4A activity by a small molecule inhibitor of eukaryotic translation. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. Vol. 102, pp. 10460-10465, 2005.

BRANDES, A. A. et al. Glioblastoma in adults. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. Vol. 67, pp. 139-12, 2008.

BREIVIK, J. The evolutionary origin of genetic instability in cancer development. **Seminars in Cancer Biology**. Vol. 15, pp. 51-60, 2005.

BUCHAN, J. R. e PARKER, R. Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Outs of Translation. **Molecular Cell**. Vol. 36, 6, pp. 932-941, 2009.

BURKHART, D. L. e SAGE, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. **Nature Reviews Cancer**. Vol. 8, pp. 671-682, 2008.

CAPDEVILA, L. et al. Neoadjuvant cisplatin plus temozolomide versus standard treatment in patients with unresectable glioblastoma or anaplastic astrocytoma: a differential effect of MGMT methylation. **Journal of Neurooncology**. Vol. 117, pp. 77-84, 2014.

CASTILHO, B. A. et al. 2014. Keeping the eIF2 alpha kinase Gcn2 in check. **Biochimica et Biophysica Acta**. Vol. 1843, 9, pp. 1948-1968, 2014.

CHENG, N, et al. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Molecular Cancer Research**. Vol. 6, pp. 1521-1533, 2008.

CHI, X, et al. Roles of rho GTPases in intracellular transport and cellular transformation. **International Journal of Molecular Sciences**. Vol. 14, pp. 7089-7108, 2013.

CHRISTMANN, M. et al. O(6)-Methylguanine-DNA (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. **Biochimica et Biophysica Acta**. Vol. 1816, pp. 179-190, 2011.

CLARKE, J.; BUTOWSKI, N. e CHANG, S. Recent advances in therapy for glioblastoma. **Archives of Neurology**. Vol. 67, pp. 279-283, 2010.

CRAWFORD, L. J. e IRVINE, A. E. Proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma. In. **Multiple Myeloma - An Overview**. InTech, pp. 3-32, 2012.

CRAWFORD, L. J. et al. Comparative selectivity and specificity of the proteasome inhibitors BzLLLCOCHO, PS-341, and MG-132. **Cancer Research**. Vol. 66, pp. 6379-6386, 2006.

*Referências Bibliográficas*

---

- DANG, Y. et al. Eukaryotic initiation factor 2alpha-independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 281, pp. 32870-32878, 2006.
- DAY, S. E. e WAZIRI, A. Clinical trials of small molecule inhibitors in high-grade glioma. **Neurosurgery and Clinics of North America**. Vol. 23, pp. 407-416, 2012.
- DeLELLIS, R. A. et al. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon : **IARC Press**, ISBN 92-832-2416-7. 2004.
- DIRKS, P.B. Brain tumor stem cells: The cancer stem cell hypothesis writ large. **Molecular Oncology**. Vol. 4, 5, pp. 420-430, 2010.
- DRABLOS, F. et al. Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. **DNA Repair (Amst)** . Vol. 3, pp. 1389-1407, 2004.
- EFEYAN, A.; ZONCU, R. e SABATINI, D. M. Amino acids and mTORC1: from lysosomes to disease. **Trends in Molecular Medicine**. Vol. 18, pp. 524-533, 2012.
- FOLKMAN, J. Angiogenesis. **Annual Reviews in Medicine**. Vol. 57, pp. 1-18, 2006.
- FOURNIER, M.; GAREAU, C. e MAZROUI, R. The chemotherapeutic agent Bortezomibe induces the formation of stress granules. **Cancer Cell International**. Vol. 10, 2010.
- FRIEDMAN, H. S.; KERBY, T. e CALVERT, H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. **Clinical Cancer Research**. Vol. 6, pp. 2585-2597, 2000.
- FUJIMURA, K.; SASAKI, A. T. e ANDERSON, P. Selenite targets eIF4E-binding protein-1 to inhibit translation initiation and induce the assembly of non-canonical stress granules. **Nucleic Acids Research**. Vol. 40, pp. 8099-8110, 2012.
- FURNARI, F. B. et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes & Development**. Vol. 21, pp. 2683-2710, 2007
- GARCIA, M. A. et al. The Chemotherapeutic Drug 5-Fluorouracil Promotes PKR-Mediated Apoptosis in a p53- Independent Manner in Colon and Breast Cancer Cells. **PLoS One**. Vol. 6, p. e23887, 2011.
- GAREAU, C. et al. p21(WAF1/CIP1) upregulation through the stress granule-associated protein CUGBP1 confers resistance to Bortezomibe-mediated apoptosis. **PLoS One**. Vol. 5, p. e20254. 2011.
- GERLITZ, G.; JAGUS, R. e ELROY-STEIN, O. Phosphorylation of initiation factor-2 alpha is required for activation of internal translation initiation during cell differentiation. **European Journal of Biochemistry** . Vol. 269, pp. 2810-1819, 2002.
- GRANT, C. S. 2005. Insulinoma. **Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology**. Vol. 19, pp. 783-798, 2005.
- GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R. e KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell** .Vol. 140, pp. 883-899, 2010.

*Referências Bibliográficas*

---

- GUO, L. et al. Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  suppresses cisplatin-induced A549 cell apoptosis via p38 inhibition. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**. Vol. 28, pp. 268-273, 2013.
- HANAHAN, D. e WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**. Vol. 100, pp. 57-70, 2000.
- HANAHAN, D. e WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**. Vol. 144, pp. 646-674, 2011.
- HANNA, S. e EL-SIMBAI, M. Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. **Cellular Signaling**. Vol. 25, pp. 1955–1961, 2013.
- HARDING, H. P. et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. **Molecular Cell**. Vol. 6, 5, pp. 1099-1108, 2000.
- HATANPAA, K. J. et al. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. **Neoplasia**. Vol. 12, pp. 675–684, 2010.
- HERSHEY, J. W.; SONENBERG, N. e MATHEWS, M. B. Principles of translational control: an overview. **Cold Springs Harbor Perspectives in Biology**. Vol. 4, p. a011528. doi: 10.1101/cshperspect.a011528, 2012.
- HIDESHIMA, T. et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. **Cancer Research**. Vol. 61, pp. 3071-3076, 2001.
- HUSE, J. T. e HOLLAND, E. C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. **Nature Reviews Cancer**. Vol. 10, pp. 319-331, 2010.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014 - Incidência de Câncer no Brasil**. [Online] 24 de abril de 2014. [Citado em: 20 de agosto de 2014.] <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>. 978-85-7318-237-8.
- IWAMA, J. et al. Neoadjuvant chemotherapy for brain tumors in infants and young children. **Journal of Neurosurgery**. Pediatrics. Vol. 15, pp. 488-492, 2015.
- JUNTILLA, M. R. e EVAN, G. I. p53 — a Jack of all trades but master of none. **Nature Reviews Cancer**. Vol. 9, pp. 821-829, 2009.
- KAEHLER, C. et al. 5-Fluorouracil affects assembly of stress granules based on RNA incorporation. **Nucleic Acids Research**. Vol. 42, pp. 6436-6447, 2014.
- KAINA, B. et al. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. **DNA Repair**. Vol. 6, pp. 1079–1099, 2007.
- KAUFMAN R. J. et al. The phosphorylation state of eukaryotic initiation factor 2 alters translational efficiency of specific mRNAs. **Molecular and Cellular Biology**. Vol. 9, pp. 946–958, 1989.

*Referências Bibliográficas*

- KAWAI, T. et al. Global mRNA Stabilization Preferentially Linked to Translational Repression during the Endoplasmic Reticulum Stress Response. **Molecular and Cellular Biology**. Vol. 24, pp. 6773-6787, 2004.
- KAZEROUNIAN, S.; YEE, K. O. e LAWLER, J. Thrombospondins in cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**. Vol. 65, pp. 700–712, 2008.
- KEDERSHA, N. L. et al. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. **Journal of Cell Biology**. Vol. 147, pp. 1431-1442, 1999.
- KEDERSHA, N. et al. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. **Journal of Cell Biology**. Vol. 151, pp. 1257-1268, 2000.
- KEDERSHA, N. et al. Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. **Molecular Biology of the Cell**. Vol. 13, pp. 195-210, 2002.
- KEDERSHA, N. et al. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. **Journal of Cell Biology**. Vol. 169, pp. 871-884, 2005.
- KEDERSHA, N.; IVANOV, P. e ANDERSON, P. Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase? **Trends Biochemical Sciences**. Vol. 38, pp. 494-506, 2013.
- KIM, I. H. et al. Radiotherapy followed by adjuvant temozolomide with or without neoadjuvant ACNU-CDDP chemotherapy in newly diagnosed glioblastomas: a prospective randomized controlled multicenter phase III trial. **Journal of Neurooncology**. Vol. 103, pp. 595-602, 2011.
- KIM, W. et al. Sequestration of TRAF2 into stress granules interrupts tumor necrosis factor signaling under stress conditions. **Molecular and Cellular Biology**. Vol. 25, pp. 2450-2462, 2005.
- KIMBALL, S. R. Eukaryotic initiation factor eIF2. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. Vol. 31, pp. 25-29, 1999.
- KIMBALL, S R, et al. 2003. Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. **American Journal of Physiology**. Cell Physiology. Vol. 284, pp. 273-284, 2003.
- KLEIHUES, P.; BURGER, P. C. e SCHEITHAUER, B. W. The new WHO classification of brain tumours. **Brain Pathology**. Vol. 3, 3, pp. 255-268, 1993.
- KLUZA, J. et al. Relationships between DNA strand breakage and apoptotic progression upon treatment of HL-60 leukemia cells with tafluposide or etoposide. **Anticancer Drugs** . Vol. 17, pp. 155-164, 2006.
- KOBAYASHI, T. et al. PKC $\alpha$  binds G3BP2 and regulates stress granule formation following cellular stress. **PLoS One**. Vol. 7, p. doi: 10.1371/journal.pone.0035820, 2012.

Referências Bibliográficas

- KUBICEK, G. J. et al. Phase I trial using proteasome inhibitor Bortezomibe and concurrent temozolomide and radiotherapy for central nervous system malignancies. **International Journal of Radiation Oncology, Biology and Biophysics**. Vol. 74, pp. 433-439, 2009.
- KUMAR, V. K.; ABBAS A. e ASTER, J. C. **Robbins Patologia Básica**. Rio de Janeiro : Elsevier, ISBN 978-85-3526294-0, 2013.
- KWON, S.; ZHANG, Y. e MATTHIAS, P. The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. **Genes & Development**. Vol. 21, pp. 3381-3394, 2007.
- LEMMON, M. A. e SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**. Vol. 141, pp. 1117-1134, 2010.
- LEONE, G.; FIANCHI, L. e VOSO, M. T. Therapy-related myeloid neoplasms. **Current Opinion in Oncology** . Vol. 23, pp. 672-680, 2011.
- LEVINE, B. e KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**. Vol. 132, pp. 27-42, 2008.
- LIU, B. e QIAN, S. B. Translational reprogramming in cellular stress response. **Wiley Interdisciplinary Reviews**. Vol. 5, pp. 301-315, 2014.
- LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P. e JOHNSTON, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**. Vol. 3, pp. 330-338, 2003.
- LOSCHI, M. et al. Dynein and kinesin regulate stress-granule and P-body dynamics. **Journal os Cell Science**. Vol. 122, pp. 3973-3982, 2009.
- LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. **Acta Neuropathologica**. Vol. 114, pp. 97-109, 2007.
- LU, C. e SHERVINGTON, A. Chemoresistance in gliomas. **Molecular and Cellular Biochemistry**. Vol. 312, pp. 71-80, 2008.
- MASUI, K.; CLOUGHESY, T. F. e MISCHEL, P. S. Molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies. **Neuropathology and Applied Neurobiology**. Vol. 38, 3, pp. 271-291, 2012.
- MATHEW, R.; KARANTZA-WADSWORTH, V. e WHITE, E. Role of autophagy in cancer. **Nature Reviews Cancer**. Vol. 7, pp. 961-967, 2007.
- MATSUKI, H, et al. Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation. **Genes to Cells**. Vol. 18, pp. 135-146, 2013
- MAZROUI, R. et al. Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. **Molecular Biology of the Cell**. Vol. 17, pp.4212-4219, 2006.
- McEWEN, E. et al. Heme-regulated inhibitor kinase-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 inhibits translation, induces stress granule formation, and

*Referências Bibliográficas*

---

mediates survival upon arsenite exposure. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 280, 17, pp. 16925-16933, 2005.

MOREAU, P. et al. Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. **Blood**. Vol. 120, pp. 947-59, 2012.

NAZARENKO, I. et al. PDGF and PDGF receptors in glioma. **Upsala Journal of Medicinal Sciences**. 2012, Vol. 117, pp. 99–112, 2012.

NITISS, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**. Vol. 9, pp. 338-350, 2009.

OHGAKI, H. e KLEIHUES, P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. **Cancer Science**. Vol. 100, pp. 2235–2241, 2009.

OHN, T. et al. A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. **Nature Cell Biology**. Vol. 10, pp. 1224-1231, 2008.

OKONOGI, N. et al. Topics in chemotherapy, molecular-targeted therapy, and immunotherapy for newly-diagnosed glioblastoma multiforme. **Anticancer Research**. Vol. 35, pp. 1229-1235, 2015.

OMS. 2014. World Health Organization. [Online] 2014. [Citado em: 17 de dezembro de 2014.] <http://www.who.int>.

ONGUSAHA, P. P. et al. Identification of ROCK1 as an upstream activator of the JIP-3 to JNK signaling axis in response to UVB damage. **Science Signalling**. Vol. 1, p. doi: 10.1126/scisignal.1161938, 2008.

PATEL, M. et al. Molecular targeted therapy in recurrent glioblastoma: Current challenges and future directions. **Expert Opinion on Investigational Drugs**. Vol. 2, pp. 1247-1266, 2012.

PENDELTON, M. et al. Topoisomerase II and leukemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**. Vol. 1310, pp. 98-110, 2014.

PERRY, J. et al. Novel therapies in glioblastoma. **Neurological Research International**. Vol. PMC3316989, 2012.

PHAN, L. et al. A subcomplex of three eIF3 subunits binds eIF1 and eIF5 and stimulates ribosome binding of mRNA and tRNA(i)Met. **The EMBO Journal**. Vol. 20, pp. 2954–2965, 2001.

PLETSAS, D. et al. Synthesis and quantitative structure-activity relationship of imidazotetrazine prodrugs with activity independent of O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, DNA mismatch repair, and p53. **Journal of Medicinal Chemistry**. Vol. 56, pp. 7120-7132, 2013.

PORTNOW, J. et al. A phase I study of Bortezomibe and temozolomide in patients with advanced solid tumors. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. Vol. 69, pp. 505-514, 2012.

*Referências Bibliográficas*

---

- RAICA, M.; CIMPEAN, A. M. e RIBATTI, D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. **European Journal of Cancer**. Vol. 45, pp. 1924–1934, 2009.
- RAJALINGAM, K. et al. Ras oncogenes and their downstream targets. **Biochimica et Biophysica Acta**. Vol. 1773, pp. 1177–1195, 2007.
- SARKARIA, J. N. et al. Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma. **Clinical Cancer Research**. Vol. 14, 10, pp. 2900-2908, 2008.
- SEDLSTSKA, Y.; GIRAUD-PANIS, M. J. e MALINGE, J. M. Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways. **Current Medicinal Chemistry: Anticancer Agents**. Vol. 5, pp. 251-265, 2005.
- SEMENZA, G.L. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. **Cell**. Vol. 148, 3, pp. 399-408, 2012.
- SEOL, D W. p53-Independent up-regulation of a TRAIL receptor DR5 by proteasome inhibitors: a mechanism for proteasome inhibitor-enhanced TRAIL-induced apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Vol. 416, pp. 222-225, 2011.
- SHAPIRO, W. R. et al. Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma. Brain Tumor Cooperative Group Trial 8001. **Journal of Neurosurgery**. Vol. 71, pp. 1-9, 1989.
- SILVANI, A. et al. Cisplatin and BCNU chemotherapy in primary glioblastoma patients. **Journal of Neurooncology**. Vol. 94, pp. 57-62, 2009.
- SOUSA L. P. et al. Plasminogen/plasmin regulates c-fos and egr-1 expression via the MEK/ERK pathway. **Biochemical e Biophysical Research Communications**. Vol. 329, pp. 1065-1071, 2005.
- SPRIGGS, K. A. BUSHELL, M. e WILLIS, A. E. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. **Molecular Cell**. Vol. 40, pp. 228-237, 2010.
- STUPP, R. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **New England Journal of Medicine**. Vol. 352, pp. 987-996, 2005.
- STUPP, R. et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **Lancet Oncology**. Vol. 10, pp. 459-466, 2009.
- TANAKA, S. et al. Diagnostic and therapeutic avenues for glioblastoma: no longer a dead end? **Nature Reviews Clinical Oncology**. Vol. 10, pp. 14–26, 2013.
- TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P. e MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. Vol. 9, pp. 231-241, 2008.
- TCGA. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**. Vol. 455, pp. 1061-1068, 2008.

*Referências Bibliográficas*

---

- TENG, Y. et al. Inhibition of eIF2 $\alpha$  dephosphorylation enhances TRAIL-induced apoptosis in hepatoma cells. **Cell Death & Disease**. Vol. 5, p. e106, 2014.
- TIANHU, Z.; SHIGUANG, Z. e XINGHAN, L. Bmf is upregulated by PS-341-mediated cell death of glioma cells through JNK phosphorylation. **Molecular Biology Reports**. Vol. 37, pp. 1211-1219, 2010.
- TODD, R. C. e LIIPPARD, S. J. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds,”. **Metallomics**. Vol. 1, pp. 280–291, 2009.
- TONDER, M. et al. Carboplatin and Etoposide in Heavily Pretreated Patients with Progressive High-Grade Glioma. **Chemotherapy**. Vol. 60, pp. 375-378, 2015.
- TOURRIÈRE, H. et al. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. **Journal of Cell Biology**. Vol. 160, pp. 823-831, 2003.
- TSAI, N. P. e WEI, L. N. RhoA/ROCK1 signaling regulates stress granule formation and apoptosis. **Cellular Signalling**. Vol. 22, pp. 668-675, 2010.
- UNTERKIRCHER, T. et al. Bortezomibe primes glioblastoma, including glioblastoma stem cells, for TRAIL by increasing tBid stability and mitochondrial apoptosis. **Clinical Cancer Research**. Vol. 17, 12, pp. 4019-4030, 2011.
- VANDEN BERGHE, T. et al. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. **Cell Death and Differentiation**. Vol. 17, pp. 922-930, 2010.
- VILALVA, C. et al. O6-Methylguanine-Methyltransferase (MGMT) promoter methylation status in glioma stem-like cells is correlated to temozolomide sensitivity under differentiation-promoting conditions. **International Journal of Molecular Science**. Vol. 13, pp. 6983-6994, 2012.
- VLACHOSTERGIOS, P. J. et al. Bortezomibe overcomes MGMT-related resistance of glioblastoma cell lines to temozolomide in a schedule-dependent manner. **Investigational New Drugs**. Vol. 31, 5, pp. 1169-1181, 2013.
- WANG, D. e LIIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature Review Drug Discovery**. Vol. 4, pp. 307-320, 2005.
- WANG, H. et al. The Challenges and the Promise of Molecular Targeted Therapy in Malignant Gliomas. **Neoplasia**. Vol. 17, pp. 239–255, 2015.
- WEILER, M. et al. Chemoradiotherapy of newly diagnosed glioblastoma with intensified temozolomide. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**. Vol. 77, pp. 670-676, 2010.
- WEN, P. Y. et al. Current clinical development of PI3K pathway inhibitors in glioblastoma. **Neuro-Oncology**. Vol. 14, pp. 819–829, 2012.
- WHITE, E. et al. Role of autophagy in suppression of inflammation and cancer. **Current Opinion in Cell biology**. Vol. 22, pp. 212–217, 2010.

Referências Bibliográficas

---

WILSON, T.A.; KARAJANNIS, M. A. e HARTEK, D. H. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. **Surgical Neurological International**. 2014, Vol. 64, pp. doi: 10.4103/2152-7806.132138. eCollection 2014.

WIPPICH, F. et al. Dual specificity kinase DYRK3 couples stress granule condensation/dissolution to mTORC1 signaling. **Cell**. Vol. 152, pp. 791-805, 2013.

YAN, G.; LAI, Y. e JIANG, Y. The TOR complex 1 is a direct target of Rho1 GTPase. **Molecular Cell**. Vol. 45, pp. 743-753, 2012.

YIN, D. et al. Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM). **Oncogene**. Vol. 24, pp. 344-354, 2005.

ZHIVOTOVSKY, B. e ORRENIUS, S. Cell death mechanisms: Cross-talk and role in disease. **Experimental Cell Research**. Vol. 316, pp. 1374-1383, 2010.

ZUSTOVICH, F. et al. A phase II study of cisplatin and temozolomide in heavily pre-treated patients with temozolomide-refractory high-grade malignant glioma. **Anticancer Research**. Vol. 29, pp. 4275-4279, 2009.