

Fernanda Costa Nunes

**MECANISMOS DE CITOTOXICIDADE DE DERIVADOS DE
TACRINA EM LINHAGEM TUMORAL HUMANA DE
GLIOBLASTOMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof. Dr^a. Tânia Beatriz Creczynski Pasa

Florianópolis

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Nunes, Fernanda Costa
Mecanismos de citotoxicidade de derivados de
tacrina em linhagem tumoral humana de glioblastoma
/ Fernanda Costa Nunes ; orientadora, Tânia Beatriz
Creczynski Pasa - SC, 2017.
118 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2017.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Tratamento para o câncer. 3.
Glioblastoma. 4. Citotoxicidade de derivados de
tacrina. I. Pasa, Tânia Beatriz Creczynski. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Dedico este trabalho aos meus familiares e a todos que colaboraram de alguma forma para a elaboração do mesmo

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus, que permitiu que eu tivesse saúde e força para vencer todos os obstáculos da minha vida.

A toda a minha família, em especial os meus pais Jaires e Ecilda e aos meus irmãos Jean e Vinicius, que nunca mediram esforços para me darem uma boa educação, e que diversas vezes abdicaram dos seus sonhos para a realização dos meus. Agradeço em especial também à minha sobrinha Rafaela, que mesmo com a pureza da infância, tem me dado muitas lições e força durante os seus dois anos de existência.

Ao meu noivo Janio pelo amor e carinho que me dedica por nove anos, além do incentivo e companheirismo durante toda a minha trajetória acadêmica.

À minha querida coorientadora Prof. Evelyn pela amizade, pelos conselhos e pela paciência em me transmitir um pouco do seu vasto conhecimento.

À Prof. Tânia Beatriz Creczynski Pasa por ter aceitado me orientar e pela confiança que sempre me transmitiu.

Aos meus colegas do laboratório GEIMM por todo o aprendizado e diversão. Vocês alegraram muito mais os meus dias durante estes dois anos e levarei vocês sempre no meu coração como grandes amigos.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Hélio Bonacorso da Universidade Federal de Santa Maria pelas colaborações com este trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Farmácia e todo o corpo docente por todo o apoio.

Ao CNPq, CAPES e FAPESC pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho e realização deste sonho.

Muito Obrigada!

*"Cada sonho que você deixa pra trás, é um
pedaço do seu futuro que deixa de existir."
Steve Jobs*

RESUMO

Entre os tumores que acometem o Sistema Nervoso Central (SNC), os gliomas são os mais frequentes. O glioblastoma é o tipo de glioma mais comum e agressivo. Além disso, é muito resistente às terapias existentes, visto que mesmo sob tratamento, os pacientes atingem sobrevida média de um ano. Na busca por terapias mais eficientes, novas moléculas estão sendo desenhadas. Para cânceres do sistema nervoso, como o glioblastoma, moléculas que tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, por apresentarem as propriedades físico-químicas adequadas, atendem ao principal requisito. Neste sentido, a tacrina foi indicada para este estudo e modificações foram realizadas na estrutura da molécula. Entre as modificações de sucesso tem-se a inclusão de anéis espiro-heterociclos na tacrina, resultando em seis derivados. Estas moléculas foram testadas quanto à atividade citotóxica utilizando para isso uma linhagem celular de glioblastoma (SF295). Como objetivo, pretendeu-se avaliar o efeito citotóxico de derivados de tacrina em linhagem celular de glioblastoma (SF295), bem como o mecanismo de morte celular envolvido. Os derivados de tacrina mostraram-se mais ativos do que a temozolomida, visto que os compostos são mais citotóxicos para as células tumorais do que para as células não tumorais. Observou-se ainda que os compostos induziram morte celular por apoptose e/ou necrose. Adicionalmente, foi observado aumento das atividades das caspases -3, -8, -9 e -12, indicando que possivelmente o tipo de morte celular predominante seja a apoptose. Foi observado também que alguns dos derivados de tacrina aumentaram a formação de espécies reativas de oxigênio, bem como diminuíram o potencial de membrana mitocondrial, sugerindo que estresse oxidativo e danos mitocondriais podem estar envolvidos no mecanismo de morte induzido por algumas moléculas. Além disso, os derivados de tacrina possuíram ação sobre proteínas relacionadas ao glioblastoma como p53, HLA-DR, BAF-47, beta-catenina, IBA-1, MAP2c, olig-2 e IDH1, sendo estas consideradas bons alvos para o tratamento deste tipo de câncer. Portanto, através destes resultados, conclui-se que os derivados de tacrina apresentaram resultados promissores e a utilização deles no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do glioblastoma pode ser satisfatória.

Palavras-chave: Tumores do Sistema Nervoso Central. Glioblastoma. Tacrina. Espi-heterociclos. p53. HLA-DR. BAF-47. Beta-catenina. Iba-1. MAP2c. Olig-2. IDH1.

ABSTRACT

Among tumors affecting the Central Nervous System (CNS), gliomas are the most frequent, accounting for 80% of all cases of malignancy among tumors in the brain and CNS. Glioblastoma is the most common and aggressive glioma, characterized by brain invasion capability. In addition, the disease is very resistant to therapies currently employed, since even under treatment, which mainly consists in surgery and chemotherapy with temozolomide, patients achieve a median survival of one year. In the search for more efficient therapies, new molecules are being drawn. For nervous system cancers, such as glioblastoma, molecules that have the capability to cross blood-brain barrier are optimal. Considering the former information, tacrine was chosen for this study, since the drug is used in Alzheimer's disease treatment and molecule's structure has modified. Among successful modifications made to be tested in this work was the inclusion of spiro-heterocyclic rings, resulting in six derivatives. Cytotoxic activity of tacrine derivatives was assayed using glioblastoma cell line (SF295). The objective was to evaluate the cytotoxic effect of derivatives on SF295, as well as the related mechanism of cell death. Between tacrine derivatives and temozolomide's effects, tacrine derivatives are more effective. This conclusion was based on the fact that compounds were selective for tumor cells, unlike temozolomide. Cell death by apoptosis and/or necrosis was observed as general mechanism of the compounds. Additionally, increased caspases -3, -8, -9 and -12 activities were observed, indicating that the predominant type of cell death was apoptosis. Additional occurrence are some tacrine derivatives increased reactive oxygen species formation, as well as decreased mitochondrial membrane potential. These results suggest that oxidative stress and mitochondrial damage may be involved in cell death mechanism induced by some of the molecules. In addition, tacrine derivatives acted on several glioblastoma-related proteins, considered adequate targets for glioblastoma treatment, including p53, HLA-DR, BAF-47, beta-catenin, IBA-1, MAP2c, olig-2 and IDH1. Through these results, tacrine derivatives are presented as promising molecules to the development of new drugs for glioblastoma treatment could be indicated.

Keywords: Central Nervous System Tumors. Glioblastoma. Tacrina. Spiro-heterocycles. p53. HLA-DR. BAF-47. Beta-Catenin. IBA-1. MAP2c. Olig-2. IDH1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Etapas envolvidas na progressão do tumor.....	30
Figura 2 - Distribuição do glioblastoma de acordo com a idade e o sexo.....	32
Figura 3 -Estrutura química da temozolomida.	33
Figura 4 - Classificações de glioblastoma e alterações genéticas que ocorrem em cada subtipo.....	35
Figura 5 - Vias extrínseca e intrínseca da apoptose.	39
Figura 6 - Via de sinalização controlada da necrose.	42
Figura 7 - Estrutura química da tacrina.	51
Figura 8 - Reação de síntese dos derivados de tacrina.	56
Figura 9 - Efeito dos derivados de tacrina no ciclo celular utilizando células de glioblastoma.	69
Figura 10 - Tipo de morte celular induzida pelos derivados de tacrina na linhagem celular SF295.....	70
Figura 11 - Avaliação da morfologia celular após tratamento com os compostos TR6-tBu e TMZ.	71
Figura 12 - Efeito dos derivados de tacrina nas atividades das caspases -3, -8, -9 e -12.	73
Figura 13 - Efeito dos derivados de tacrina no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	74
Figura 14 - Efeito dos derivados de tacrina nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	75
Figura 15 - Efeito dos derivados de tacrina sobre proteínas relacionadas ao sistema imunológico.....	76

Figura 16 - Efeito dos derivados de tacrina na expressão gênica de proteínas relacionadas ao glioblastoma. 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estruturas dos derivados de tacrina.	57
Tabela 2 - Citotoxicidade dos derivados de tacrina.....	67
Tabela 3 - Índice de seletividade dos derivados de tacrina.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac-ATAD-AFC	N-acetil-Ala-Thr-Ala-Asp-7-amino-4-trifluorometilcumarina
Ac-DEVD-AMC	N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-amino metilcumarina
Ac-IETD-AMC	N-acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4-metilcumarina
Ac-LEHD-AFC	N-acetil-Leu-His-Asp-7-amino-4-trifluorometilcumarina
AFC	7-amino-4-trifluorometilcumarina
AMC	7-amino-4-metilcumarina
APAF1	Fator de ativação da peptidase apoptótica da proteína adaptadora 1
APCs	Células apresentadoras de antígenos
BSA	Albumina sérica bovina
cIAPs	Inibidores celulares da apoptose
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
CC _{50(24h)}	Concentração citotóxica para 50% das células no tempo de incubação de 24h
CC _{50(48h)}	Concentração citotóxica para 50% das células no tempo de incubação de 48h
CIT C	Citocromo c
DAB	3,3' Diaminobenzidina
DATP	Trifosfato de desoxiadenosina
DCFH	Diclorofluoresceína reduzida
DCFH-DA	Diacetato de Diclorofluoresceína
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GBM	Glioblastoma multiforme
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico
HHV-6	Herpes Vírus Humano 6
HLA	Antígeno leucocitário humano

HLA-DR	Subunidade de HLA
HUVEC	Célula endotelial de veia umbilical humana
IBA-1	Proteína adaptadora ligante de cálcio ionizado
IDH	Isocitrato desidrogenase
IP	Iodeto de propídeo
IS	Índice de seletividade
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide
LOH	Perda de heterozigosidade
MAPs	Proteínas associadas aos microtúbulos
MLKL	Substrato de RIP3
MMP	Permeabilização da membrana mitocondrial
NADPH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenine fostato reduzido
NF1	Neurofibromina 1
NF-KB	Fator nuclear kappa B
NAPO	Núcleo de Análises e Pesquisas Orgânicas
NUQUIMHE	Núcleo de Química de Heterocíclcos
OMS	Organização Mundial da Saúde
Olig-2	Fator de transcrição de oligodendrócitos 2
p75	Receptor de neurotrofina
PBS	Tampão fosfato salino
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina
REDOX	Reação de oxiredução
RIP1	Quinase de interação com o receptor 1
RIP3	Quinase de interação com o receptor 3
SF295	Linhagem celular de glioblastoma humano
SF295-R	Linhagem celular resistente de glioblastoma humano
SNC	Sistema Nervoso Central
Smac	Ativador de caspases derivado de mitocôndrias
SV40	Vírus símio 40
TBID	Proteína BID truncada
TGF- α	Fator de crescimento transformante alfa
TMZ	Temozolomida
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor de fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor de fator de necrose tumoral 1
TRADD	Domínio de morte associada a TNFR1

TRAF2
TROLOX

Fator associado a TNFR1
Marca de composto antioxidante

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 CÂNCER	29
2.1.1 Gliomas	30
2.1.2 Glioblastoma Multiforme	31
2.2 TIPOS DE MORTE CELULAR.....	36
2.2.1 Apoptose	36
2.2.1.1 Apoptose por Via Extrínseca	37
2.2.1.2 Apoptose por Via Intrínseca	38
2.2.1.3 Apoptose Via Estresse de Retículo Endoplasmático	40
2.2.2 Necrose.....	40
2.2.3 Autofagia	43
2.2.4 Mitose Catastrófica.....	43
2.2.5 Senescência	43
2.3 ASPECTOS RELACIONADOS À MITOCÔNDRIA E O GLIOBLASTOMA	44
2.4 COMPONENTES DO SISTEMA IMUNOLÓGICO IMPORTANTES PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER.....	45
2.4.1 HLA-DR	45
2.4.2 Micróglia.....	46
2.5 IMPORTANTES ALVOS PARA O TRATAMENTO DO GLIOBLASTOMA	46
2.5.1 BAF-47.....	47
2.5.2 Beta-Catenina.....	47
2.5.3 MAP2c	48
2.5.4 Olig-2.....	48
2.5.5 p75	49
2.5.6 IDH1.....	50
2.6 DERIVADOS DE TACRINA.....	50
2.6.1 Tacrina.....	50
2.6.2 Espiro-heterocíclis.....	51
3 OBJETIVOS	53
3.1 OBJETIVO GERAL	53
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
4 MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1 REAGENTES	55
4.2 SÍNTESE DOS COMPOSTOS - DERIVADOS DE TACRINA.....	55
4.3 CULTURA CELULAR	57
4.4 TRATAMENTO CELULAR.....	58
4.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	58
4.6 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR.....	59
4.7 AVALIAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR.....	59

4.7.1 Coloração com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio	59
4.7.2 Coloração com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo	60
4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS CASPASES -3, -8, -9 E -12 ...	60
4.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ...	61
4.10 DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	62
4.11 AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE p53 E HLA-DR	62
4.12 AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE BAF-47, BETA-CATENINA, IBA-1, MAP2c, OLIG-2, p75 E IDH1	63
4.13 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	63
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
5 RESULTADOS	65
5.1 CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS DE TACRINA.....	65
5.2 INTERFERÊNCIA NO CICLO CELULAR	68
5.3 DETERMINAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR	69
5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS CASPASES -3, -8, -9 E -12 ...	72
5.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	73
5.6 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	74
5.7 ANÁLISE DA QUANTIDADE DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO SISTEMA IMUNOLÓGICO	75
5.8 ANÁLISE DA QUANTIDADE DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO GLIOBLASTOMA.....	76
6 DISCUSSÃO	81
7 RESUMO DOS RESULTADOS	87
8 CONCLUSÃO.....	89
9 PERSPECTIVAS.....	91
REFERÊNCIAS	93
APÊNDICE A - Efeito concentração e tempo-resposta dos derivados de tacrina.....	107
APÊNDICE B - Efeito concentração e tempo-resposta da temozolomida.....	107
APÊNDICE C - Histograma representativo da marcação da proteína p53 por citometria de fluxo.....	108
APÊNDICE D - Histograma representativo da marcação da proteína HLA-DR por citometria de fluxo	109
APÊNDICE E - Imagens representativas da marcação de BAF-47	110
APÊNDICE F - Imagens representativas da marcação de Beta-Catenina.....	111
APÊNDICE G - Imagens representativas da marcação de IBA-1	112

APÊNDICE H- Imagens representativas da marcação de MAP2c.....	113
APÊNDICE I - Imagens representativas da marcação de olig-2	114
APÊNDICE J.....	115
APÊNDICE K- Imagens representativas da marcação de IDH1	116
APÊNDICE L - Capa do artigo a ser submetido à revista Translation Oncology	117

INTRODUÇÃO

O câncer, doença que acomete milhões de pessoas por todo o mundo e que pode se desenvolver em diferentes partes do organismo humano, se caracteriza pelo crescimento desordenado de células, sendo que uma das diferenças entre estas e as células normais é a perda da capacidade de realizar funções específicas (National Cancer Institute, 2017).

Os tumores primários do Sistema Nervoso Central (SNC) são responsáveis por cerca de 2% das malignidades humanas (JANSEN et al., 2010). A incidência mundial destes tipos de cânceres é de aproximadamente 7 casos por 100.000 habitantes ao ano (FURNARI et al., 2007).

No Brasil, o risco estimado é de 5 novos casos a cada 100.000 homens e 4 a cada 100.000 mulheres. Durante os últimos anos, a incidência e a mortalidade de pacientes com tumores no SNC aumentaram na maioria dos países desenvolvidos, principalmente nas faixas etárias mais avançadas e mesmo não sendo muito frequentes, as neoplasias do SNC contribuem significativamente para a morbidade global (INCA, 2016).

Entre os tumores que acometem o SNC, os gliomas são os que ocorrem com maior frequência, sendo estes responsáveis por mais de 32% de todos os tumores primários. Adicionalmente, correspondem a 80% de todos os casos de malignidade devido a tumores no cérebro e SNC. Além disso, o tratamento para os gliomas ainda é considerado um desafio, visto que nem todos os quimioterápicos disponíveis apresentam a capacidade de atravessar eficientemente a barreira hemato-encefálica. Neste sentido, justifica-se a pesquisa em novas possibilidades de tratamento (ZHANG et al., 2015).

O glioblastoma multiforme (GBM) é um tipo de glioma, o qual compreende a forma mais letal entre os cânceres que ocorrem no cérebro, visto que geralmente os pacientes com esta doença sobrevivem em média um ano mesmo sob tratamento. O GBM caracteriza-se pelo rápido desenvolvimento, ocorrendo de forma difusa e infiltrativa, com um nível considerável de heterogeneidade celular (LUO et al., 2015). Atualmente, o tratamento para pacientes com GBM consiste em cirurgia, quimioterapia e radioterapia, contudo, não foi observado melhorias na sobrevivência ao longo dos últimos 50 anos (BADRI et al., 2016). Pelo fato de apresentar uma natureza invasiva, os GBMs não podem ser completamente retirados no momento da cirurgia, o que

explica o fato de o tratamento cirúrgico não aumentar a sobrevida dos pacientes (LOUIS et al., 2007).

Uma das estratégias dos fármacos utilizados para o tratamento do câncer, inclusive o GBM é a indução de morte celular. Vários tipos de morte celular já foram definidos de acordo com as características morfológicas e bioquímicas (KROEMER et al., 2008). A apoptose, ou morte celular programada, é essencial para manutenção da homeostase devido a função de renovação das células normais. Algumas doenças podem ocorrer quando este mecanismo encontra-se deficiente, entre elas o câncer (ELMORE, 2007; KROEMER et al., 2008). A necrose consiste em outro tipo de morte celular, contudo é considerado um modo descontrolado, cujo mecanismo está relacionado com o surgimento de algumas doenças (VANLANGENAKKER et al., 2008). Apesar disso, o processo de necrose das células tumorais tem sido considerado uma via adequada de morte celular, devido a possibilidade de estímulo do sistema imunológico (ZHANG et al., 2014).

Os processos de morte celular, principalmente a apoptose, podem ser influenciados pelo estresse oxidativo, sendo a mitocôndria a principal organela envolvida neste desequilíbrio por ser o principal local de consumo de oxigênio na célula e o principal foco de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (KIM et al., 2014). Quando há geração de EROs em excesso, associados a uma deficiência nas defesas antioxidantes, danos celulares ocorrem resultando em morte celular (CIRCU; AW, 2010).

Além disso, a diminuição de um potencial na forma de gradiente de prótons presente na membrana da mitocôndria induz a célula ao processo de apoptose, reforçando ainda mais a importância desta organela na morte celular. O importante papel da mitocôndria na apoptose deve-se ainda ao fato de que esta organela é a principal reguladora de proteases importantes em vários processos que envolvem esta via de morte celular, chamadas caspases (GOTTLIEB et al., 2003).

A atividade sobre alvos específicos do tumor, que desempenham importante papel na proliferação e sobrevivência celular, é uma característica muito importante para quimioterápicos em desenvolvimento, visto que terapias alvo ou multi-alvos estão revolucionando o conceito de medicina oncológica (PETRELLI; VALABREGA, 2009). Além disso, a imunoterapia, composta por fármacos que estimulam fatores relacionados ao sistema imunológico, tem mostrado resultados positivos no desenvolvimento de quimioterápicos (LIU; ZENG, 2012).

A tacrina é um potente e reversível inibidor da colinesterase muito utilizado para tratamento paliativo de doenças neurodegenerativas, com destaque para a doença de Alzheimer, contudo, o uso contínuo do fármaco é muito limitado devido aos efeitos colaterais associados (CONTELLES et al., 2006). Este fármaco age através da inibição da enzima acetilcolinesterase, mas também apresenta outras atividades farmacológicas, incluindo bloqueio de canais de potássio, inibição do processo de recaptação de monoamina neuronal e inibição da monoamina oxidase (PISONI et al., 2010).

Vários análogos estruturais da tacrina e derivados têm sido sintetizados com o objetivo de aumentar a eficiência do fármaco e diminuir efeitos colaterais associados (CHEN et al., 2012). Uma alternativa seria a inclusão de espiro-heterocíclis na molécula do fármaco, os quais pertencem a uma importante classe de compostos naturais e sintéticos que possuem propriedades únicas como a espiroconjugação, efeito anomérico e quiralidade axial. Por estas razões, são considerados importantes blocos construtores de diversos compostos de relevância biológica e farmacêutica (ISLAM et al., 2015). Os espiroheterocíclis apresentam uma grande versatilidade, visto que além de corresponderem a potentes agentes antioxidantes, também apresentam atividade antitumoral (KARALI et al., 2010).

Portanto, os derivados de tacrina, que possuem anéis espiroheterocíclis em suas estruturas, serão avaliados neste trabalho quanto ao efeito citotóxico em linhagem celular humana de glioblastoma (SF295).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

Câncer é o termo utilizado para referir-se a diferentes doenças caracterizadas pelo aumento desordenado de células e que pode desenvolver-se em diversas partes do organismo humano. Além disso, estas doenças podem invadir e espalhar-se por outras partes do corpo, sendo este fenômeno denominado de metástase. O desenvolvimento de metástase corresponde à principal causa de morte por câncer. Mais de 100 tipos de câncer já foram caracterizados até a atualidade, correspondendo a uma das principais causas de morte no mundo. Aproximadamente 8,2 milhões de pessoas morrem devido ao câncer todos os anos e a estimativa é que este número cresça 70% nas próximas duas décadas (WHO, 2016). Estimativas apontavam que nos anos de 2016 e 2017 surgiriam 600 mil novos casos de câncer no Brasil, e somente no ano de 2016 já foram registrados 420 mil novos casos, excetuando o câncer de pele não-melanoma, o qual teve 180 mil novos registros (INCA, 2017).

O risco de desenvolvimento de câncer aumenta com a idade das pessoas devido principalmente aos fatores de risco acumulados durante a vida, bem como da diminuição da eficiência do sistema imunológico. Adicionalmente, tem sido observado que os tratamentos existentes tornam-se menos eficazes em pacientes com idade avançada (ANISIMOV, 2009). Entre os fatores de risco para o desenvolvimento de câncer estão incluídos o uso de bebidas alcoólicas, a falta da prática de atividade física, a obesidade, doenças sexualmente transmissíveis, contudo o principal fator de risco, responsável por 20% de todas as mortes causadas por câncer, é o fumo de tabaco (WHO, 2016).

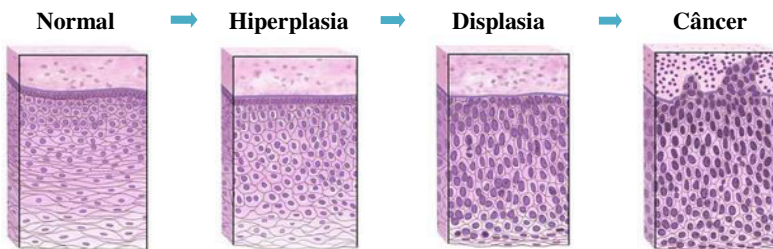
Vários estágios estão envolvidos na progressão de uma célula sadia para uma célula tumoral, sendo estes resultantes das interações de fatores genéticos com agentes externos. Os agentes externos, também conhecidos como carcinógenos, podem ser de natureza física, química ou biológica (WHO, 2016).

O estágio de iniciação é a fase em que a célula sofre interferência de agentes externos, provocando ativação de protooncogênes e/ou inativação de genes supressores de tumor. No estágio de promoção, as células iniciadas, ou seja, que possuem alguma alteração genética sofrem ação de um agente promotor, caracterizado por reduzir o período de latência para a formação de tumor. Além disso, no estágio de promoção ocorre um aumento do número de células iniciadas que

estarão em risco de conversão maligna. Portanto, as células que entram no estágio de conversão maligna passam a expressar um fenótipo maligno. Por fim, o estágio de progressão corresponde a etapa em que as células dividem-se descontroladamente, podendo resultar em metástases (WESTON; HARRIS, 2003).

Outras nomenclaturas também são utilizadas para caracterizar estas fases que antecedem a formação de tumor, sendo estas mais utilizadas para diagnóstico da doença (Figura 1). A hiperplasia caracteriza-se por um aumento do número de células, porém estas ainda apresentam aspecto normal quando observadas em microscópio. Já na etapa de displasia, as células são consideradas anormais. Estas duas alterações celulares podem ou não resultar no desenvolvimento tumoral (National Cancer Institute, 2017).

Figura 1- Etapas envolvidas na progressão do tumor.



A hiperplasia e a displasia são estágios que antecedem a formação do câncer. A hiperplasia caracteriza-se por um aumento na quantidade de células, mas estas ainda apresentam morfologia normal, diferentemente da displasia. Se não tratados, estes estágios podem progredir até câncer.

Fonte: Adaptado de NIH, 2015.

2.1.1 Gliomas

Os gliomas consistem em uma classe de tumores que ocorrem no SNC e apresentam alta taxa de malignidade (ZHANG et al., 2015). A incidência mundial é de 5,26 por 100.000 habitantes ou 17.000 novos casos por ano e estão relacionados com mau prognóstico e baixa qualidade de vida (OMURO et al., 2017). Mesmo sendo considerados raros, os gliomas causam mortalidade e morbidade significativas, visto que mesmo em se tratando do tipo menos agressivo a sobrevivência é de aproximadamente 5 anos (WEN; KESARI, 2009; OSTROM et al., 2014).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de gliomas malignos são uso de tabaco, exposição a radiação e algumas síndromes genéticas, como a síndrome de Li-Fraumeni (OMURO et al., 2017). O tratamento consiste em quimioterapia, radioterapia e cirurgia (BADRI et al., 2016). A ressecção cirúrgica continua sendo o padrão ouro no tratamento da maioria dos tipos de gliomas (TATE, 2015), contudo por tratar-se de tumores altamente invasivos torna-se muito difícil a retirada total do tumor por este procedimento (LOUIS et al., 2007).

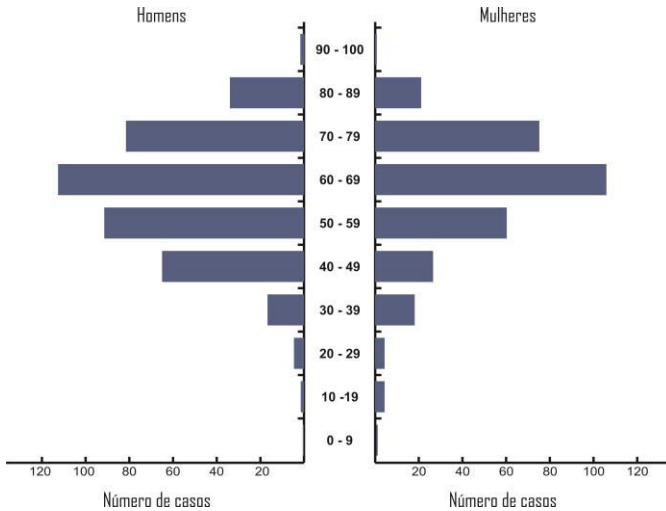
2.1.2 Glioblastoma Multiforme

O glioblastoma multiforme (GBM) é um tipo de glioma que compreende a forma mais letal entre os cânceres que acometem o cérebro, visto que os pacientes sobrevivem em média um ano mesmo sob tratamento, reforçando a necessidade do surgimento de novas estratégias terapêuticas. Este tipo de câncer caracteriza-se pelo rápido desenvolvimento e ocorre de forma difusa e infiltrativa, com um nível considerável de heterogeneidade celular (LUO et al., 2015).

Entre os casos de gliomas, o GBM corresponde a 82%, caracterizado histologicamente por alta celularidade e atividade mitótica, além de proliferação vascular e necrose. Apesar de ser altamente invasivo, o GBM não metastatiza para além do SNC (LOUIS et al., 2007; OMURO et al., 2017).

A manifestação deste tipo de tumor pode dar-se em qualquer idade, porém há maior incidência entre as idades de 45 e 75 anos (Figura 2). Quanto a localização, o GBM geralmente desenvolve-se na substância branca subcortical dos hemisférios cerebrais (LOUIS et al., 2007). A ocorrência deste tipo de tumor é mais comum em homens do que em mulheres e menos frequente em pessoas de raça negra (OMURO et al., 2017).

Figura 2 - Distribuição do glioblastoma de acordo com a idade e o sexo.



A incidência de GBM é um pouco maior em homens do que em mulheres. Além disso, nos dois sexos observa-se que a maioria dos casos ocorre na faixa de idade entre 45 e 75 anos.

Fonte: Adaptado de LOUIS, 2007.

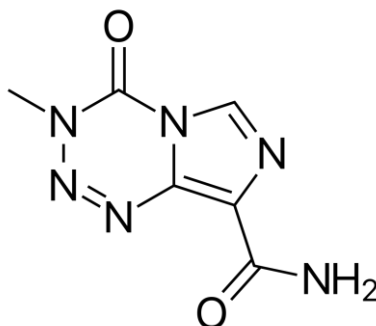
Os sintomas mais comuns do GBM são náuseas, vômito, dor de cabeça, perda de memória e hemiparesia, contudo déficits neurológico e de personalidade também podem ocorrer, devido ao envolvimento dos lobos frontal e temporal (LUO et al., 2015; OMURO et al., 2017).

Os fatores de risco para o GBM são semelhantes aos dos outros tipos de gliomas, destacando-se o tabagismo e o uso crônico de álcool, contudo, uma relação viral, principalmente com o vírus símio 40 (SV40), o herpes vírus 6 (HHV-6) e com o citomegalovírus, já foi documentada (LUO et al., 2015).

As formas de tratamento para o GBM também são as mesmas utilizadas para os outros tipos de gliomas. Em relação ao tratamento com quimioterapia, a temozolomida (TMZ), um agente alquilante administrado por via oral, corresponde ao fármaco mais efetivo no tratamento do GBM, visto que estudos demonstram que há aumento significativo da qualidade de vida dos pacientes (HUANG et al., 2012). O mecanismo de ação da TMZ ainda não foi completamente elucidado,

mas sabe-se que o fármaco age através da interrupção da fase G1 do ciclo celular. A metilação da guanina do DNA com a formação de O6-metilguanina tem sido relacionada a este efeito, resultando em problemas na replicação de DNA e morte celular (ZHANG et al., 2012; YU et al., 2015). Alguns trabalhos também comprovam que este quimioterápico induz mitose catastrófica e senescência celular (HIROSE et al., 2005; CHIELA et al., 2013). Apesar disso, o desenvolvimento de resistência do GBM a este quimioterápico já foi observado e os mecanismos vem sendo elucidados (LUO et al., 2015), o que reforça a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento deste tipo de câncer. O GBM é um tumor muito difícil de tratar e para o desenvolvimento de novos fármacos, uma abordagem multidisciplinar, bem como o conhecimento das complicações tanto da doença quanto do tratamento são evidentes (OMURO et al., 2017).

Figura 3 -Estrutura química da temozolomida.



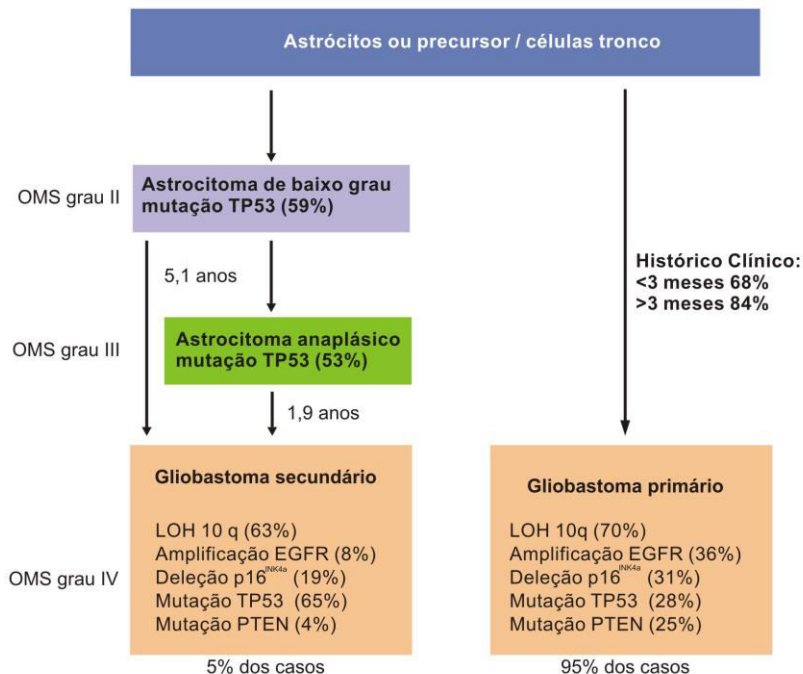
Estudos recentes classificaram o GBM em três subgrupos, os quais apresentam vias de sinalização específicas (VERHAAK et al., 2010). O GBM proneural está relacionado com a sinalização anormal do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o GBM clássico é movido pelo sinal do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), já o subgrupo mesenquimal está associado com a perda de neurofibromina do tipo 1 (NF1) (LEDER et al., 2014).

De acordo com alterações genéticas e moleculares, o GBM pode ser classificado em primário ou secundário (HAQUE et al., 2011), como demonstrado na Figura 4. O GBM primário geralmente desenvolve-se rapidamente e apresenta uma história clínica curta, diferentemente do secundário, responsável pela maioria dos casos com história clínica longa. Independentemente da classificação, as alterações genéticas que podem ocorrer são LOH 10q, amplificação de EGFR, deleção de

p16^{INK4a}, mutação em Tp53 e mutação em PTEN. O que difere entre GBM primário e secundário seria a frequência com que cada uma dessas alterações ocorrem (LOUIS et al., 2007).

De acordo com o sistema de classificação da organização mundial da saúde (OMS), que agrupa os gliomas em diferentes graus crescentes levando em conta a agressividade, o GBM é classificado como tumor de grau IV (OMURO et al., 2017).

Figura 4 - Classificações de glioblastoma e alterações genéticas que ocorrem em cada subtipo.



O GBM primário corresponde a 95% dos casos de GBM e a história clínica é curta, diferentemente do GBM secundário, que apresenta história clínica mais longa, porém corresponde somente a 5% dos casos. As alterações genéticas são as mesmas, diferindo na frequência em que cada uma ocorre. Tanto GBM primário quanto secundário são classificados como tumores de grau IV.

Fonte: Adaptado de LOUIS, 2007

A via EGFR/PTEN/Akt/mTOR é uma via de sinalização que está envolvida no desenvolvimento de GBM primário. A superexpressão de EGFR ocorre em aproximadamente 40% dos casos de GBM primário e é pouco frequente em GBM secundário (BENITO et al., 2010). O EGFR é um receptor transmembranar para o EGF (fator de crescimento epidermal) e para o TGF- α (fator de crescimento transformante alfa),

que atua em um sistema de sinalização fundamental na fisiologia normal da célula e na manutenção do estado tumorigênico. O aumento da expressão do EGFR tem sido relacionado com a progressão neoplásica, menor sobrevida e resistência aos tratamentos (NORMANNO et al., 2006).

2.2 TIPOS DE MORTE CELULAR

Em situações normais, o processo de morte celular é considerado um mecanismo de defesa contra a formação de tumores. Quando este mecanismo é desregulado a indução, progressão e manutenção do tumor tornam-se facilitadas (LABI; ERLACHER, 2015). Portanto, o objetivo das terapias contra o câncer é promover a morte das células tumorais sem causar muitos prejuízos para as células saudáveis (LOWE; LIN, 2000).

As células entram em processo de morte celular e alguns critérios moleculares e/ou morfológicos são atingidos, como a perda da integridade da membrana plasmática e consequente fragmentação. Os fragmentos celulares liberados são fagocitados por células especializadas (KROEMER et al., 2009).

Atualmente os mecanismos de morte celular são classificados de acordo com critérios morfológicos e bioquímicos, consequentemente novas terminologias estão constantemente sendo sugeridas (KROEMER et al., 2009; GALLUZZI et al., 2012). Neste trabalho serão definidos e discutidos alguns tipos mais comuns de morte celular, incluindo a apoptose, necrose, autofagia, mitose catastrófica e senescência.

2.2.1 Apoptose

A apoptose, ou também conhecida como morte celular programada, consiste em um mecanismo de morte celular dependente de energia, sendo essencial para o bom funcionamento do organismo, visto que é através deste processo que ocorre a renovação celular. Além disso, a apoptose tem grande importância para o desenvolvimento embrionário e para o bom funcionamento do sistema imunológico. Falhas neste mecanismo podem levar ao surgimento de algumas doenças, entre elas o câncer (ELMORE, 2007).

Adicionalmente, a apoptose é caracterizada por uma diminuição do volume celular, formação de poros na membrana mitocondrial, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos resultantes do aumento dos prolongamentos da membrana. No fim do processo os corpos apoptóticos são fagocitados por células especializadas, tais como

macrófagos (DOONAN; COTTER, 2008). Além disso, a fragmentação do DNA também é característica da apoptose e nesta etapa ocorre a clivagem do DNA em fragmentos menores e com tamanhos padronizados. Muitas enzimas estão envolvidas no processo de fragmentação do DNA, contudo as endonucleases recebem maior destaque (PROKHOROVA et al., 2015).

A regulação deste processo ocorre por ação de muitos fatores, entre eles as caspases, proteínas pertencentes a família Bcl-2, bem como a proteína supressora tumoral p53 (ELMORE, 2007).

As caspases são proteases que desempenham importante papel na execução da apoptose. São divididas em dois subgrupos, um constituído pelas caspases iniciadoras -2, -8, -9 e -10 e outro pelas caspases efetoras -3, -6 e -7. Para execução do processo, as caspases iniciadoras são clivadas partindo de precursores inativos, chamados de procaspases, para a forma ativa da enzima. Sequencialmente, as caspases iniciadoras ativam as efetoras, as quais realizam diferentes ações celulares culminando na morte celular (PROKHOROVA et al., 2015). A ativação das caspases ocorre por duas vias principais, as vias intrínseca e extrínseca, conduzindo a uma cascata complexa de eventos (FULDA; DEBATIN, 2006). Contudo, a ativação de caspases induzida por estresse de retículo endoplasmático também pode acontecer (SANO; REED, 2013).

Diversas proteínas, assim como a p53, são supressoras tumorais e apresentam a função de reparar o DNA quando os genes apresentam falhas. Quando a homeostase celular não é estabelecida novamente, a proteína p53 induz a célula ao processo de apoptose através de interação com a mitocôndria e diminuição do potencial de membrana mitocondrial (ELMORE, 2007; GALLUZZI et al., 2009). Além disso, mutações nesta proteína estão comumente presentes em células tumorais e relacionam-se com o grau de diferenciação do tumor, sendo portanto considerado um fator prognóstico ruim de muita importância (STIEWE, 2007). Em GBM há uma superexpressão desta proteína mutada (OGURA et al., 2015).

2.2.1.1 Apoptose pela Via Extrínseca

A apoptose pela via extrínseca (Figura 5) é induzida por fatores externos, como por exemplo, pelas células especializadas do sistema imunológico chamadas de T citotóxicas. Este estímulo ocorre através da produção de fatores citotóxicos pertencentes à família do fator de necrose tumoral (TNF), os quais ligam-se a receptores pró-apoptóticos,

sendo o principal chamado de Fas (CD95), presentes na superfície da célula-alvo, dando início a uma cascata de eventos, incluindo ativação das caspases -8 e -10, que resultará na morte celular (ASHKENAZI, 2008).

A apoptose pela via extrínseca induzida por fármacos está sendo cada vez mais estudada no câncer. Contudo, as células tumorais apresentam inúmeros mecanismos para resistir a este processo, seja pelo aumento de moléculas anti-apoptóticas ou por inibição de proteínas pró-apoptóticas, sendo esta, outra dificuldade para o desenvolvimento de quimioterápicos com ação satisfatória por esta via (FULDA; DEBATIN, 2006).

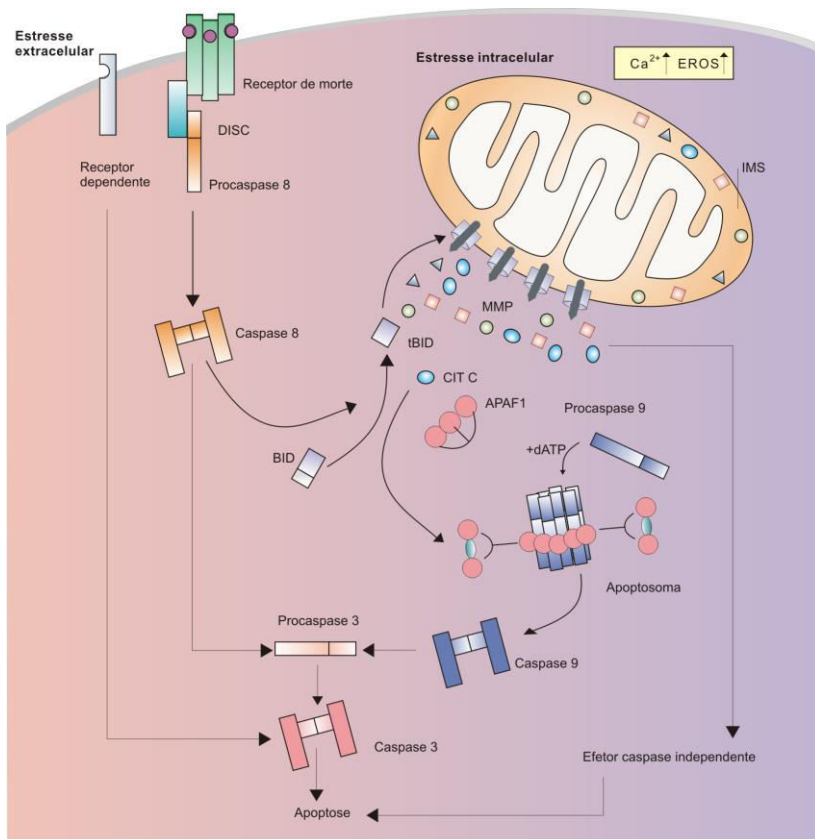
2.2.1.2 Apoptose pela Via Intrínseca

A apoptose pela via intrínseca (Figura 5) é mediada por sinais intracelulares, principalmente ligados à mitocôndria, não envolvendo a presença de receptores membranares. A ativação desta via ocorre por diversos estímulos, os quais geram a perda do potencial de membrana mitocondrial facilitando a liberação de proteínas pró-apoptóticas como o citocromo *c*, as quais ativam as caspases -3 e -9, gerando uma sequência de eventos que resultam em morte celular (FULDA; DEBATIN, 2006; ELMORE, 2007). O estresse oxidativo e a sobrecarga de cálcio intracelular são algumas condições de estresse intracelular que servem de estímulo para a ativação da apoptose pela via intrínseca (GALLUZZI et al., 2009).

Muitos quimioterápicos utilizados atualmente agem estimulando esta via de morte celular e ainda há um aumento considerável de estudos com novos quimioterápicos que induzem distúrbios no potencial presente na membrana mitocondrial e levam as células a apoptose pela via intrínseca (FULDA; DEBATIN, 2006).

As vias intrínseca e extrínseca da apoptose podem estar interligadas, visto que a caspase-8 pertencente à via extrínseca pode ativar a proteína Bid que induz a diminuição do potencial de membrana mitocondrial e desencadeia o processo de apoptose pela via intrínseca. Portanto, há a possibilidade de quimioterápicos induzirem ambas as vias da apoptose (GALLUZZI et al., 2009).

Figura 5 - Vias extrínseca e intrínseca da apoptose.



A apoptose pela via extrínseca é iniciada por fatores externos às células e envolve a ativação de receptores, enquanto a via intrínseca é desencadeada por estímulos intracelulares como sobrecarga de cálcio ou aumento da geração de EROs que levam à diminuição do potencial de membrana mitocondrial. Ambas as vias envolvem ativação de caspases iniciadoras, a -8 na via extrínseca e a -9 na via intrínseca, e efetoras. A permeabilização da membrana mitocondrial (MMP; do Inglês, mitochondrial membrane permeabilization) ativa tanto mecanismos dependentes de caspases como os independentes. Após a MMP, fatores pró-apoptóticos como citocromo *c* (CIT C) são liberados e interagem com o fator de ativação da peptidase apoptótica da proteína adaptadora 1 (APAF1) e também com a caspase-9, resultando em apoptose. A ativação de caspases efetoras, como a -3, desencadeia a cascata de caspases. A ativação da

proteína BID corresponde a principal ligação entre a apoptose pela via intrínseca e extrínseca, visto que após a clivagem pela caspase-8 pode haver promoção de MMP. dATP = trifosfato de desoxiadenosina; DISC = complexo de sinalização indutor de morte; tBID = BID truncado.

Fonte: Adaptado de GALLUZI et al., 2009.

2.2.1.3 Apoptose Via Estresse de Retículo Endoplasmático

O retículo endoplasmático é uma organela intracelular responsável pela translocação, desdobramento e modificações pós-traducionais de proteínas. Perturbações na função desta organela resultam em um processo denominado estresse de retículo endoplasmático. Neste caso, os defeitos nas proteínas não conseguem ser revertidos e as células são frequentemente conduzidas à morte celular (SANO; REED, 2013).

A apoptose induzida por esta via pode envolver a mitocôndria ou ocorrer sem a participação desta organela. A via independente de mitocôndria é a mais conhecida e é iniciada com a ativação da caspase-12, a qual ativa a caspase-9, desencadeando a morte celular por apoptose (GROENENDYK; MICHALAK, 2005).

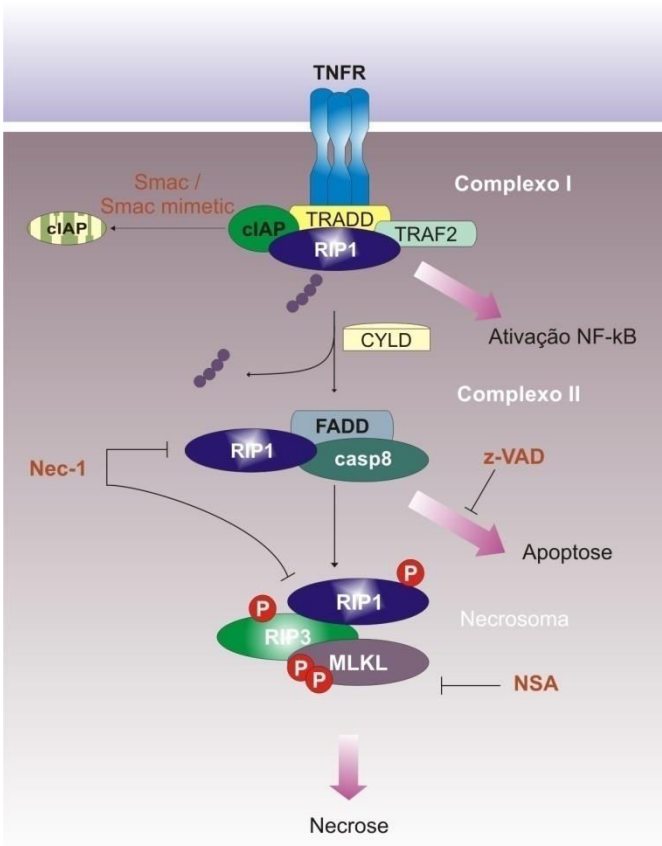
2.2.2 Necrose

Muitos estudos descrevem a necrose como um tipo de morte prejudicial para as células, visto que esta é definida como um modo descontrolado de morte celular que se caracteriza morfológicamente pelo aumento do tamanho das células e conseqüentemente das organelas, ruptura precoce da membrana plasmática e derramamento do material intracelular, resultando em um processo inflamatório. Além disso, a necrose é um processo independente de ATP e é caracterizado pela perda da função mitocondrial (KARCH; MOLKENTIN, 2015).

Algumas hipóteses de que a necrose não se trata de um tipo de morte acidental estão sendo levantadas, e ainda, que esta pode ser regulada e prevenida. Acredita-se que os aspectos relacionados a este processo, como disfunção mitocondrial, aumento da geração de EROs, depleção de ATP e ruptura da membrana plasmática podem ser controlados (GOLSTEIN, 2007). A via de sinalização controlada na necrose é mostrada na figura 6, podendo-se observar que se trata de um processo complexo (SUN, 2014).

A liberação de conteúdo intracelular característica do processo de necrose estimula o sistema imunológico, fato que contraria a supressão das células do sistema imune gerada pela administração de quimioterápicos que induzem outros tipos de morte celular. Portanto, estudos relacionados a indução de necrose para o tratamento do câncer estão crescendo e mostram que esta pode ser uma boa alternativa de tratamento (ZHANG et al., 2014).

Figura 6 - Via de sinalização controlada da necrose.



A via de sinalização controlada da morte celular por necrose ocorre mediante formação de diferentes complexos. O complexo I forma-se após ativação do receptor de fator de necrose tumoral 1 (TNFR1) e é composto por este receptor, pela proteína de domínio de morte associada a TNFR1 (TRADD) pelo fator 2 associado a TNFR1 (TRAF2), pela quinase de interação com o receptor 1 (RIP1) e por inibidores celulares da apoptose (cIAPs). RIP1 é modificada e a nova forma serve como sinalização para a ativação do fator nuclear kappaB (NF-κB). As mitocôndrias liberam o ativador de caspases derivado de mitocôndrias (Smac) e a partir disso os cIAPs sofrem auto-degradação. RIP1 sofre nova transformação e é separado do receptor de morte, indizindo a formação do complexo II. Quando há inibição da caspase-8, RIP1 e RIP3 formam um complexo de morte por necrose. RIP3 recruta o seu substrato (MLKL), o ativa e o processo de necrose se concretiza.

Fonte: Adaptade do SUN, 2014.

2.2.3 Autofagia

Levando em conta a morfologia, o termo morte celular por autofagia é muito utilizado nos casos em que há morte celular acompanhada pela formação de vacúolos no citoplasma (GALLUZZI et al., 2012). Além disso, é considerado um processo de auto-degradação de componentes das células e é regulada positivamente em resposta a estresse intra ou extracelular (HE; KLIONSKY, 2009).

Existem relatos de que a autofagia promove a morte celular por apoptose, visto que são observadas muitas interações físicas e funcionais entre reguladores de autofagia e apoptose. Alguns estudos demonstram que as proteínas da autofagia regulam as proteínas pertencentes ao processo de apoptose, e o contrário também pode ser considerado (YONEKAWA; THORBURN, 2013).

2.2.4 Mitose Catastrófica

A mitose catastrófica é um tipo de morte celular no qual uma mitose aberrante é observada e pode ocorrer tanto na mitose quanto na interfase. Contudo, de acordo com considerações funcionais, a mitose catastrófica não pode ser considerada propriamente um mecanismo de morte celular, e sim um processo iniciado por perturbações no ciclo mitótico, que geralmente é iniciado na fase M do ciclo celular e desencadeia a morte celular por senescência (GALLUZZI et al., 2012).

Algumas alterações morfológicas ocorrem nas células em mitose catastrófica, como síntese incompleta de DNA e condensação prematura de cromossomos. Esta condensação dos cromossomos ocorre em pequenas unidades, resultando na visualização de células multinucleadas. Além disso, o aumento do volume celular também é uma característica importante deste processo de morte celular (VAKIFAHMETOGLU et al., 2008).

2.2.5 Senescência

As células sofrem constantemente a ação de fatores endógenos ou exógenos, resultando em estresse para as mesmas. Com isso, as células podem parar permanentemente o processo de divisão e adotar um estado denominado de senescência. Este processo pode ser iniciado por diversos fatores, como deterioração de telômeros, danos no DNA,

modificações na cromatina e aumento do estresse oxidativo (CAMPISI; FAGAGNA, 2007).

Como este mecanismo é capaz de limitar a proliferação celular excessiva, é considerado um bom alvo para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais (CHIANTORE et al., 2009).

2.3 ASPECTOS RELACIONADOS À MITOCÔNDRIA E O GLIOBLASTOMA

As mitocôndrias são organelas essenciais para a realização de diversos mecanismos celulares, visto que são fundamentais para o metabolismo energético e responsáveis pela produção de quase todo o ATP celular (BRATIC; TRIFUNOVIC, 2010). Além disso, esta organela também está envolvida no processo de apoptose pela via intrínseca, visto que é o local onde se encontram os principais reguladores das caspases e fatores pró-apoptóticos como o citocromo *c* (GOTTLIEB et al., 2003).

Íons como H^+ são impermeáveis à membrana interna da mitocôndria, os quais acabam acumulando no espaço intermembranar da organela, formando um gradiente eletroquímico (PERRY et al., 2011). Quando o potencial eletroquímico é desestabilizado, o citocromo *c* e/ou outros fatores pró-apoptóticos são lançados no citoplasma e ativam caspases, induzindo a célula à apoptose (GOBE; CRANE, 2010). Portanto, a utilização de fármacos que desestabilizem este potencial da membrana mitocondrial pode ser uma alternativa promissora no tratamento de neoplasias (WEN et al., 2013).

A mitocôndria também está envolvida no desequilíbrio do metabolismo oxidativo, chamado estresse oxidativo. Este desequilíbrio ocorre quando há produção excessiva de EROs associada a uma deficiência nas defesas antioxidantes, culminando em morte celular (BIRBEN et al., 2012).

Várias vias pelas quais as EROs induzem morte celular já foram descritas, mas uma das mais importantes seria a interação de EROs com o DNA, que pode resultar em danos no ácido nucleico e indução da expressão de genes supressores tumorais, como o p53. Este mecanismo desencadeia o aumento da expressão de proteínas indutoras de citocromo *c*, proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, e como consequência, ocorre a ativação de caspases, resultando em morte celular. Além disso, EROs também agem promovendo a peroxidação de lípidios na mitocôndria, fato que facilita a passagem de Ca^{2+} pela

membrana mitocondrial, que exerce um importante papel na indução de morte celular (OTT et al., 2007).

Portanto, fármacos que induzam o aumento da geração de EROs também podem corresponder a alvos estratégicos para os agentes antitumorais (WEN et al., 2013).

2.4 COMPONENTES DO SISTEMA IMUNOLÓGICO IMPORTANTES PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER

A imunoterapia está sendo cada vez mais abordada como uma ótima estratégia para o tratamento do câncer, visto que tem sido comprovado que as imunidades inata e adaptativa contribuem para o efeito citotóxico de fármacos utilizados atualmente (ZITVOGEL et al., 2008). Além disso, evidências sugerem que interações entre o sistema imunológico e as células tumorais regulam a progressão tumoral e o desenvolvimento de metástases (HAQUE et al., 2011).

Duas estratégias de imunoterapia são conhecidas, a passiva e a ativa. Na imunoterapia passiva não ocorre estimulação do sistema imunológico do paciente, visto que este recebe células e anticorpos produzidos *in vitro* que são capazes de direcionar-se às células tumorais. Já a imunoterapia ativa caracteriza-se por impulsionar o sistema imunológico do próprio paciente (THOMAS et al., 2012).

Como os gliomas são caracterizados por uma forte imunossupressão, que pode gerar diversos efeitos maléficos para os pacientes, incluindo a progressão tumoral, estratégias terapêuticas que revertam este estado vem sendo estudadas (KANU et al., 2009).

2.4.1 HLA-DR

O Antígeno leucocitário humano (HLA) e a respectiva subunidade HLA-DR são moléculas pertencentes ao MHC (do Inglês, Major Histocompatibility Complex) de classe II e são principalmente expressas em Células Apresentadoras de Antígenos (APCs) especializadas, tais como células dendríticas, linfócitos B e macrófagos (HAQUE et al., 2007). Contudo, o HLA também é encontrado em outras células, inclusive as tumorais (APTSIAURI et al., 2007). No GBM ocorre a expressão deste antígeno, principalmente da subunidade HLA-DR (KENNEDY et al., 2013).

Sabe-se que HLA-DR tem papel essencial na apresentação do antígeno aos linfócitos T e no desencadeamento da resposta imune (SILVA et al., 2013). Para que ocorra a ativação de células T (linfócitos

CD4+ e CD8+) e a resposta imune antitumoral, a apoptose é um processo prévio importante, visto que há a liberação de muitos peptídeos do antígeno, fazendo com que as APCs formem uma resposta imune contra as células tumorais (HAQUE et al., 2007).

De uma forma geral, as células tumorais diminuem a expressão dos níveis de HLA, sendo estes frequentemente indetectáveis. Portanto, a indução da expressão de HLA e a conversão de células tumorais em APCs para o melhor reconhecimento do sistema imunológico pode ser um aspecto importante da imunoterapia (HAQUE et al., 2007; SILVA et al., 2013).

2.4.2 Micróglia

A proteína adaptadora ligante de cálcio ionizado (IBA-1) é expressa especificamente em células chamadas micróglia, que consistem em macrófagos presentes no SNC (TUCKER et al., 2016).

Em gliomas, as micróglia presentes no ambiente tumoral sofrem ação de fatores produzidos pelas células tumorais e liberam fatores de crescimento e citocinas que atuam facilitando a proliferação, sobrevivência e migração de células tumorais. Portanto, a diminuição do recrutamento destas células, bem como a inativação das mesmas seria uma boa estratégia farmacológica (HAMBARDZUMYAN et al., 2015).

Apesar disso, já foi relatado que a micróglia também apresenta atividade antitumoral, visto que nos estágios iniciais do desenvolvimento do glioma estas células podem promover uma resposta imune adaptativa, resultando em morte das células tumorais (WEI et al., 2013).

2.5 IMPORTANTES ALVOS PARA O TRATAMENTO DO GLIOBLASTOMA

Nos últimos anos os estudos para o desenvolvimento de fármacos que restrinjam o crescimento e propagação de tumores vêm crescendo muito, conseqüentemente novos alvos terapêuticos estão sendo identificados (TOBIN et al., 2015).

Uma das formas consideradas mais promissoras para o tratamento do câncer é a terapia alvo, que direciona o fármaco para um alvo específico que apresenta importante papel no crescimento e propagação do tumor. Uma das principais vantagens deste tipo de terapia é a melhora da toxicidade, visto que doses mais altas do fármaco podem ser

utilizadas de forma que as células não tumorais não sejam prejudicadas (PETRELLI; GIORDANO, 2008; National Cancer Institute, 2017).

Entretanto, a utilização de um único alvo para a terapia facilitou o desenvolvimento de resistência por parte das células tumorais, através do surgimento de vias alternativas para o crescimento da massa tumoral. Portanto, o conceito de terapia multi-alvo está sendo valorizada e já existe um consenso por parte dos pesquisadores de que moléculas que interferem em vários alvos são mais promissoras do que as que agem em um único alvo (PETRELLI; GIORDANO, 2008; PETRELLI; VALABREGA, 2009).

A seguir serão apresentadas algumas proteínas importantes na inibição ou progressão do GBM e que podem ser alvos promissores para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para este tipo de câncer.

2.5.1 BAF-47

As BAFs são proteínas pertencentes ao complexo SWI/SNF, o qual tem função de remodelamento da cromatina e remoção de nucleossomos, influenciando na regulação gênica, reparação e replicação do DNA. As subunidades das BAFs apresentam papéis específicos, sendo que a BAF-47 é uma das proteínas essenciais para o processo de remodelação da cromatina (JOLIOT et al., 2014).

Existem muitas evidências de que a expressão de BAF-47 relaciona-se com efeito antitumoral, pois atua como supressor tumoral, e a sua diminuição pode estar relacionada com defeito na proliferação celular e diminuição da indução de apoptose (YEIVIN et al., 2006).

O GBM expressa BAF-47 e consequentemente este marcador é utilizado no diagnóstico da doença (ZUNARELLI et al., 2011), mas nenhum estudo que tenha relacionado à interferência na expressão destas proteínas como alvo para o tratamento para este tipo de tumor foi encontrado na literatura.

2.5.2 Beta-Catenina

A beta-catenina é uma das proteínas que compõem a via de sinalização Wnt. Esta via desempenha diferentes funções no SNC, destacando-se a participação na proliferação, adesão e migração de diferentes células. A beta-catenina age como um tradutor de sinais enviados por componentes citoplasmáticos, visto que a proteína entra no

núcleo e interfere na transcrição de genes também pertencentes a via de sinalização Wnt (LEE et al., 2015).

A ativação da via Wnt envolvendo beta-catenina tem sido observada em uma variedade de tumores humanos, incluindo os gliomas. Além disso, a beta-catenina é encontrada principalmente em gliomas de alto grau e é relacionada com um mau prognóstico no GBM (ROSSI et al., 2011).

Portanto, a inibição ou diminuição da quantidade de componentes pertencentes a via de sinalização Wnt/beta-catenina é considerada uma boa estratégia para o tratamento do câncer (LUU et al., 2004). Alguns inibidores desta via, como por exemplo, pequenas moléculas que visam proteínas citoplasmáticas, fatores transcricionais ou co-ativadores, já foram sugeridos como bons fármacos para o tratamento de diversos tipos de cânceres, inclusive para o GBM (LEE et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

2.5.3 MAP2c

As proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs) apresentam a função de estabilização dos microtúbulos contra a despolimerização, bem como regulação de diversas características destas estruturas celulares. Os microtúbulos são estruturas do citoesqueleto celular que apresentam importante função na regulação da divisão celular (KAVALLARIS, 2010).

Entre as MAPs existe a MAP2, sendo esta uma proteína expressa majoritariamente em neurônios, encontrada em grande quantidade no SNC, mas também já identificada no melanoma (SOLTANI et al., 2005; LIU et al., 2008). MAP2c é uma subunidade de MAP2 expressa principalmente em neurônios imaturos (SOLTANI et al., 2005).

Um estudo realizado com linhagem celular de melanoma mostrou que a expressão de MAP2 estabiliza os microtúbulos e a inibição do crescimento tumoral é observada devido a indução da parada do ciclo celular (SOLTANI et al., 2005). Portanto, acredita-se que o aumento da quantidade de MAP2 e respectivas subunidades auxiliem na inibição do crescimento tumoral também de outros tipos de câncer.

A expressão de MAP2 e subunidades já foi encontrada em células de glioma (YAN et al., 2011), mas nenhum estudo relacionando a expressão destas proteínas como possíveis alvos no tratamento de gliomas foi encontrado.

2.5.4 Olig-2

O fator de transcrição da linhagem de oligodendrócitos 2 (olig-2) é um membro da família de fatores de transcrição bHLH expresso somente no SNC e desempenha um papel essencial no desenvolvimento de tumores no cérebro (LIN et al., 2005).

A expressão de olig-2 já foi observada em gliomas (BOUVIER et al., 2003), sendo um fator necessário para a gliomatogênese e encontra-se aumentado em linhagens celulares muito proliferativas e tumorigênicas (GUNTHER et al., 2008; BADRI et al., 2016).

Muitos mecanismos que relacionam olig-2 e gliomas estão sendo estudados, contudo, já se conclui que a via do olig-2 é complexa e necessita do desenvolvimento de inibidores para satisfatória inibição da progressão tumoral (TSIGELNY et al., 2016). Entre os mecanismos de olig-2 estudados, está a repressão de p21, sendo este um importante gene inibitório pertencente ao ciclo celular cuja inibição resulta em estimulação da gliomatogênese. Portanto, o aumento da quantidade de olig-2 resulta em estimulação da proliferação celular tanto de células saudáveis como também de células neoplásicas (GUNTHER et al., 2008). Supõe-se também que o aumento da quantidade de olig-2 dá-se através de genes relacionados aos gliomas, como EGF (do Inglês, Epidermal growth factor) e PDGF (do Inglês, Platelet-derived growth factor), o que conseqüentemente leva a uma rápida proliferação celular (MITTEW et al., 2014).

2.5.5 p75

O receptor de neurotrofina (p75) é uma glicoproteína que funciona como receptor transmembranar membro da superfamília de receptores TNF (do Inglês, Tumor Necrosis Factor). Não há relatos de que este receptor apresente alguma atividade enzimática intrínseca, visto que exerce atividade traduzindo sinais através do recrutamento de diversas proteínas intracelulares que induzem proliferação, sobrevivência ou até mesmo morte celular, dependendo da via de tradução de sinal ativada (MOLLOY et al., 2011).

Muitos estudos indicam que p75 é um importante regulador do comportamento invasivo de gliomas. Além disso, sabe-se que a expressão de p75 está relacionada com a invasão e proliferação de GBM (JOHNSTON et al., 2007).

Portanto, a inibição de p75 tem sido mencionada como uma boa estratégia terapêutica principalmente para o GBM, o que resultaria em

inibição da proliferação e sobrevivência do tumor (WANG et al., 2008; AHN et al., 2015).

2.5.6 IDH1

A enzima isocitrato desidrogenase (IDH) é necessária para a produção de NADPH, sendo este um cofator envolvido na regulação da produção do antioxidante glutatona. Portanto, mutações nesta enzima resultam em diminuição de glutatona e conseqüentemente ao aumento do estresse oxidativo. Esta interferência no estresse oxidativo pode causar alterações no DNA e indução da célula à morte por apoptose (TEWARIE et al., 2013; COHEN et al., 2013).

A IDH1 é uma subunidade de IDH que ocorre com muita frequência em gliomas, principalmente no GBM secundário. A mutação nesta subunidade resulta na produção de um oncometabólito envolvido na gliomatogênese (TEWARIE et al., 2013).

Por outro lado, a mutação de IDH1 também é considerada um bom fator prognóstico, pois está associada a uma maior sobrevida dos pacientes, visto que há redução na capacidade de captar EROs gerados durante a radio e quimioterapia, induzindo à apoptose. Portanto, esta mutação torna o GBM mais vulnerável ao tratamento (CHEN et al., 2016).

2.6 DERIVADOS DE TACRINA

Os compostos utilizados neste trabalho são derivados de tacrina, ou seja, foram sintetizados através da molécula da tacrina ligada a diferentes espiro-heterocíclis, resultando em seis compostos cujas estruturas químicas estão mostradas na Tabela 1.

2.6.1 Tacrina

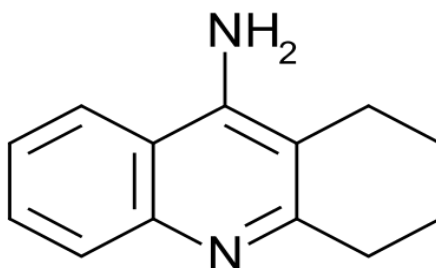
A tacrina (Figura 7) é um fármaco utilizado para o tratamento de doenças neurodegenerativas, principalmente a doença de Alzheimer. Portanto, apresenta uma propriedade essencial para o tratamento do GBM que é a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (CONTELLES et al., 2006).

Este fármaco funciona inibindo a enzima acetilcolinesterase, aumentando os níveis e a atividade da acetilcolina no córtex cerebral. Contudo outras atividades farmacológicas também já foram descritas para tacrina, como bloqueio dos canais de potássio, inibição da

recaptação de monoaminas neuronais, bem como inibição da monoamina oxidase (PISONI et al., 2010). Além disso, um estudo realizado por JANOCKAVÁ et al. (2015) evidenciou que moléculas derivadas da tacrina apresentaram ação na diminuição da proliferação celular.

Apesar disso, o uso da tacrina é limitado devido aos efeitos colaterais que gera, principalmente hepatotoxicidade, provavelmente devido a estimulação na produção de EROs, bem como depleção de glutatona (SAMEEM et al., 2016). Portanto, vários análogos estruturais da tacrina e derivados tem sido sintetizados com o objetivo de aumentar a eficiência deste fármaco e diminuir os efeitos colaterais (CHEN et al., 2012).

Figura 7 - Estrutura química da tacrina.



2.6.2 Espiro-heterocíclis

Compostos espiro são formados pela fusão de dois anéis através de um ponto comum, chamado espiro átomo. No caso dos espiro-heterocíclis, o espiro átomo consiste em um ou dois anéis heterocíclis (GUPTA, 2012).

Os espiro-heterocíclis pertencem a uma importante classe de compostos naturais e sintéticos que correspondem a importantes blocos construtores de diversos compostos de relevância biológica e farmacêutica (ISLAM et al., 2015). Os espiro-heretocíclis apresentam uma grande versatilidade, visto que são relacionados inclusive com o efeito antiproliferativo e atividade antitumoral (KARALI et al., 2010).

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o mecanismo de citotoxicidade de derivados de tacrina em linhagem celular humana de glioblastoma (SF295).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Após incubação das células com os derivados de tacrina:

- 1) Avaliar o efeito citotóxico sobre a linhagem celular SF295;
- 2) Verificar o tipo de morte celular induzida;
- 3) Analisar o efeito sobre o ciclo celular;
- 4) Avaliar o efeito sobre as atividades das caspases -3, -8, -9 e -12;
- 5) Quantificar a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs);
- 6) Analisar o efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial;
- 7) Avaliar o efeito sobre a quantidade de p53, HLA-DR, BAF-47, beta-catenina, IBA-1, MAP2c, olig-2, p75 e IDH1.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

O meio de cultura RPMI 1640, DCFH-DA (acetato de diclorofluoresceína), HEPES (ácido N-[2-Hidroxitil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]), iodeto de propídeo, anti-MAP2c (063M4802), DAB (3,3'-diaminobenzidina), laranja de acridina, brometo de etídio e os substratos das caspases foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). O soro fetal bovino e os antibióticos penicilina e estreptomicina foram comprados da GIBCO (Grand Island, NY, USA). A sonda JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbocianina) foi adquirida da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Anexina-V-FITC e os anticorpos anti-p53 (557027), anti-BAF-47 (612111) anti-HLA-DR (339194) e anti-Beta-Catenina (610154) foram comprados da BD (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). O anticorpo anti-IBA-1 (019-19741) foi comprado da WAKO (USA). O anticorpo anti-IDH1 (ab172964) foi adquirido da ABCAM (USA). O anticorpo anti-p75 (sc-5634) foi obtido da Santa Cruz Biotechnology (USA). O anticorpo anti-Olig2 (AB9610) foi comprado da Merck (Darmstadt, German). O anticorpo secundário anti-mouse e anti-rabbit foi adquirido da Dako (Santa Clara, CA, USA).

4.2 SÍNTESE DOS COMPOSTOS - DERIVADOS DE TACRINA

Os compostos foram sintetizados pela aluna Letícia Barros, no Núcleo de Química de Heterocíclis (NUQUIMHE) e no Núcleo de Análises e Pesquisas Orgânicas (NAPO) da Universidade Federal de Santa Maria, coordenados pelo Prof. Dr. Helio Gauze Bonacorso. Para a síntese (Figura 8), moléculas de espiro-heterocíclis foram incluídas na estrutura da tacrina, resultando em seis análogos (Tabela 1). Resumidamente, a síntese foi realizada pela mistura de aminonitrila 3 mmol e espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-ona 3 mmol, à qual foi adicionado ácido de Lewis 3 mmol, cloreto de alumínio (AlCl_3) ou cloreto de índio (InCl_3). Posteriormente, esta mistura foi aquecida a 110 °C sob agitação magnética por 24 horas. Em seguida, foi adicionado NaOH 2M e a mistura reacional permaneceu sob agitação magnética na mesma temperatura por mais 24 horas. Os compostos foram resfriados

em temperatura ambiente, e na seqüência foram extraídos com clorofórmio. A secagem da fase orgânica foi realizada com NaSO_4 , e posteriormente a mesma foi filtrada e o solvente eliminado com o auxílio de um rotaevaporador. Por fim, o produto foi purificado por recristalização com álcool etílico. Os compostos foram caracterizados estruturalmente por RMN (Ressonância magnética nuclear) (BONACORSO et al., 2016).

Figura 8 - Reação de síntese dos derivados de tacrina.

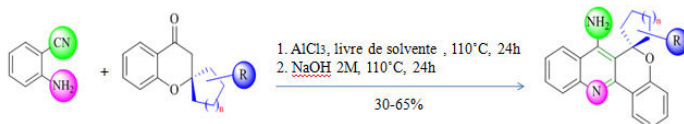
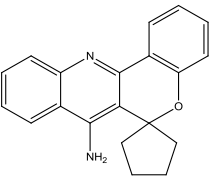
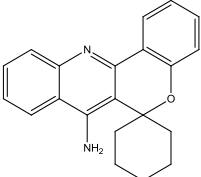
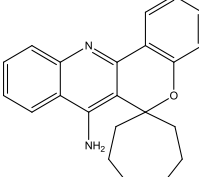
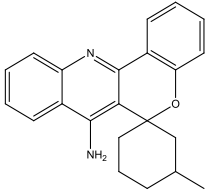
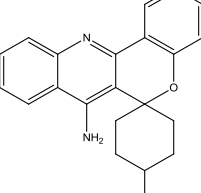
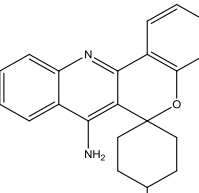


Tabela 1 - Estruturas dos derivados de tacrina.

		
TR5 MM: 302,37 g/mol Log P = 4	TR6 MM: 316,40 g/mol Log P = 4,41	TR7 MM: 330,42 g/mol Log P = 4,83
		
TR6-3'Me MM: 330,42 g/mol Log P = 4,74	TR6-4'Me MM: 330,42 g/mol Log P = 4,74	TR6-tBu MM: 372, 50 g/mol Log P = 5,96

Os derivados de tacrina foram sintetizados através da molécula da tacrina e inclusão de espiro-heterocíclis na sua estrutura, resultando no surgimento de seis derivados. MM = Massa Molar. Log P = Log do coeficiente de partição.

4.3 CULTURA CELULAR

Para a realização dos experimentos foram utilizadas linhagens celulares de glioblastoma humano (**SF295**), de glioblastoma humano resistentes (**SF295-R**) e endoteliais da veia umbilical humana

(HUVEC). As linhagens SF295 e SF295-R foram gentilmente fornecidas pelos Drs. R.W. Robey e S.E. Bates (NCI, Bethesda, MD, EUA), enquanto a linhagem celular HUVEC foi adquirida pelo American Type Culture Cell (ATCC®, Manassas, VA). As células foram mantidas em garrafas plásticas de cultura, contendo meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10 mM HEPES, pH 7.4 em estufa umidificada, a 37°C e com 5% de CO₂. Além dos cuidados citados anteriormente, na linhagem tumoral resistente também foi incluído o quimioterápico Mitoxantrona (500 nM) para manter o fenótipo resistente. Para todas as linhagens foi utilizado somente células com até dez passagens. Anteriormente à realização de cada experimento, as células viáveis foram observadas com o auxílio de um reagente chamado azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer.

4.4 TRATAMENTO CELULAR

Os compostos foram solubilizados em solução de DMSO e armazenados em freezer -20°C. Testes de absorvância realizados em espectrofotômetro demonstraram que estes compostos permanecem estáveis nesta solução e nesta temperatura. Antes de cada experimento, estas soluções foram diluídas em meio de cultura RPMI 1640 com o objetivo de atingir a concentração desejada, a qual varia de acordo com cada procedimento. As células foram incubadas juntamente com os compostos em placas de 6, 12, 24 e 96 poços e por diferentes tempos, sendo que o tamanho da placa, bem como o tempo de incubação dependem de cada procedimento experimental. Em todos os experimentos foram utilizados controles contendo apenas o solvente DMSO diluído em meio de cultura. A concentração máxima de DMSO adicionado as células foi de 1%.

4.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de Alamar Blue® (PAGE et al., 1993). Neste ensaio, utiliza-se um indicador REDOX na forma oxidada chamado de resazurina, sendo esta uma substância de coloração azul e sem nenhuma fluorescência. Já a resofurina, forma reduzida, apresenta fluorescência e tem coloração vermelha. Portanto, medindo-se a alteração da fluorescência resultante da atividade redox das células, tem-se a detecção do número de células metabolicamente ativas (BONNIER et al., 2015). Para realização do ensaio, foram

incubadas $1,5 \times 10^4$ células por 24 horas, 7×10^3 células por 48 horas e 5×10^3 por 72 horas, em triplicata com os compostos, em placa de 96 poços. Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado e uma nova solução de meio contendo a solução de Alamar Blue® (0,1 mg/mL) foi acrescentado em todos os poços. Posteriormente, as células foram novamente incubadas por 75 minutos à 37°C. A leitura foi realizada em espectrofluorímetro Perkin Elmer LS55. O valor obtido do grupo controle foi considerado como 100% de células viáveis. Para cálculo dos valores de CC_{50} , concentração que resulta em redução de 50% das células viáveis, foram utilizadas curvas dose-resposta sigmoidais obtidas pelo GraphPad Prism 6 (número de série: GPW6-242831-RBMZ-03274). O índice de seletividade (IS) foi calculado através da divisão da CC_{50} encontrada para a linhagem celular não tumoral pela CC_{50} encontrada para as linhagens celulares tumorais.

4.6 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

O ciclo celular, após incubação com os compostos, foi analisado através da marcação das células com iodeto de propídeo com posterior análise por citometria de fluxo. Para isso, 2×10^5 células foram incubadas com os seis derivados de tacrina por 24 horas nas concentrações de $CC_{50(24h)}$. Passadas as 24 horas de incubação, as células foram lavadas com PBS, o sobrenadante foi descartado, etanol 70% gelado foi adicionado e a incubação foi realizada por mais 30 min à -20°C. Com o objetivo de inibir ligações inespecíficas, PBS+BSA 2% foi adicionado às células e as mesmas passaram por centrifugação por 10 minutos à 800 xg. O sobrenadante foi removido e adicionou-se RNase 100 µg/mL + 0,1% de Triton-X em PBS. No momento da análise adicionou-se 20 µg/mL de iodeto de propídeo. 1×10^4 células foram utilizadas para a análise em citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences) e para determinação da população de células presentes em cada fase do ciclo utilizou-se o software WinMDI 2.9.

4.7 AVALIAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR

4.7.1 Coloração com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio

Neste método, as células em apoptose aparecem com núcleo condensado e fragmentado de cor verde, enquanto as células necróticas apresentam núcleos corados em laranja e/ou vermelho. Células em apoptose tardia podem apresentar núcleo condensado e fragmentado,

mas com coloração laranja e/ou vermelha. Para realização deste ensaio, 5×10^4 células foram incubadas por 24 horas com as concentrações de $CC_{50(24h)}$ dos compostos. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS e coradas com $0,3 \mu\text{g/ml}$ de laranja de acridina e $1 \mu\text{g/ml}$ de brometo de etídio. As células foram rapidamente observadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse TS100) com aumento de $400\times$.

4.7.2 Coloração com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo

A anexina V-FITC liga-se na fosfatidilserina que se encontra externalizada nas células em apoptose, já o iodeto de propídeo cora somente as células em necrose, as quais apresentam rompimento de membrana. Portanto, este ensaio permite a quantificação de células em apoptose, necrose, com dupla marcação e também células viáveis que não apresentam nenhuma marcação.

As células na densidade de 2×10^5 foram inseridas em cada poço, em placa de 12 poços e posteriormente incubadas por 24 horas com os derivados de tacrina nas concentrações de $CC_{50(24h)}$. As células foram então lavadas com PBS e ressuspensas em tampão de ligação (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, $MgCl_2$ 1 mM e $CaCl_2$ 1,8 mM). Quinze minutos antes da análise as células foram marcadas com anexina V-FITC e mantidas à 4°C em ambiente escuro. No momento da análise, a qual foi realizada em citômetro de fluxo FACS Verse da BD Biosciences, adicionou-se iodeto de propídeo. Foram utilizados controles, sendo que em um havia somente células sem tratamento e sem marcação por anexina V-FITC e iodeto de propídeo, tendo como objetivo avaliar a autofluorescência das células. Além disso, utilizou-se um controle positivo para apoptose, tratado com camptotensina, além de um controle positivo para necrose, sendo que para este último as amostras foram colocadas por um período de 10 minutos em nitrogênio líquido antes da adição de iodeto de propídeo. O software FacSuite foi utilizado para determinar a população de células presentes em cada quadrante.

4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS CASPASES -3, -8, -9 E -12

As atividades das caspases foram avaliadas pela produção de fluorescência após incubação de lisados celulares com os substratos

específicos de cada uma destas enzimas. Para este experimento 2×10^5 células foram incubadas com os compostos nas concentrações de $CC_{50(24h)}$ e dobro da $CC_{50(24h)}$ por 4 horas, sendo este curto tempo de incubação escolhido pelo fato de que se desejava detectar apoptose precoce e evitar a ruptura celular total. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS e lisadas com tampão de lise (HEPES 10 mM, KCl 42 mM, $MgCl_2$ 5 mM, PMSF 1 mM, EDTA 100 μ M, EGTA 100 μ M, pepstatina 1 μ g/mL, leupeptina 1 μ g/mL, aprotinina 5 μ g/mL, CHAPS 0,5% e DTT 1 mM) por 10 minutos entre 4 e 8°C. Posteriormente, as células foram incubadas com os substratos fluorogênicos das caspases por 2 horas em meio de reação específico, utilizando-se 100 μ M de substrato para caspase-9 (Ac-LEHD-AFC), 50 μ M do substrato fluorogênico para caspase-3 (DEVD-AMC), 25 μ M do substrato para caspase-8 (IETD-AMC) ou 25 μ M do substrato para caspase-12 (Ac-ATAD-AFC). A fluorescência emitida por AMC (7-amino-4-metilcumarina) ou AFC (7-amino-4-trifluorometilcumarina) clivado foi monitorada através da utilização do espectrofluorímetro PerkinElmer LS55. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade de caspase, considerando o controle, células incubadas na ausência dos compostos, como 100%. Contudo, para facilitar o entendimento gráfico todos os valores foram divididos por 100.

4.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Para avaliar o efeito dos derivados de tacrina no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), a sonda lipofílica fluorescente JC-1 foi utilizada, sendo esta uma substância catiônica que penetra na membrana negativa da mitocôndria quando o potencial está estabelecido e apresenta-se como agregados que emitem fluorescência vermelha. Contudo, quando ocorre perda do potencial de membrana mitocondrial esta sonda é liberada para o citoplasma, passando para a forma de monômeros que emitem fluorescência verde. Para isso, 2×10^5 células foram incubadas em placa de 12 poços com os compostos nas concentrações de $CC_{50(24h)}$. Uma solução de 10 μ g/mL de JC-1 foi adicionada às células, as quais foram mantidas por 30 minutos à 37°C e 5% de CO_2 . Posteriormente, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS, sendo o sobrenadante utilizado para leitura das fluorescências vermelha e verde em espectrofluorímetro. O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 488 nm, e os comprimentos de onda de emissão foram de 590 nm e de 527 nm para as fluorescências vermelha

e verde, respectivamente. Os resultados foram expressos em porcentagem, sendo o controle considerado 100%.

4.10 DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A avaliação da presença de EROs foi realizada através da adição de uma sonda chamada diclorofluoresceína (DCFH-DA) às células após incubação com os compostos. Esta sonda na forma reduzida não apresenta fluorescência, porém em presença de EROs a mesma é oxidada, emitindo fluorescência de coloração verde (WU; YOTNDA, 2011).

Para a determinação de EROs, 2×10^5 células foram incubadas por 4 e 24 horas à 37°C e 5% de CO_2 com os seis derivados de tacrina nas concentrações de $\text{CC}_{50(24\text{h})}$ de cada substância isoladamente e também em conjunto com um composto antioxidante baseado em vitamina E chamando TROLOX[®] (TRABER, ATKINSON, 2007) em placa de 12 poços. Posteriormente adicionou-se DCFH-DA às células, as quais foram incubadas novamente por 30 minutos. As células foram lavadas com PBS e a leitura da fluorescência foi realizada em espectrofluorímetro. O composto antioxidante foi utilizado para confirmar a formação de EROs pelos compostos. Os resultados foram expressos em porcentagem de EROs, considerando o controle, células sem nenhuma adição além do meio de cultura, como 100%. Contudo, para facilitar o entendimento gráfico todos os valores foram divididos por 100. Os valores de fluorescência obtidos foram corrigidos pela dosagem de proteínas, a qual também foi obtida por fluorescência nos comprimentos de onda de 280 nm (excitação) e 340 nm (emissão).

4.11 AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE p53 E HLA-DR

A quantidade de p53 e HLA-DR foi avaliada através da marcação celular com anticorpos ligados a fluoróforos, com posterior análise por citometria de fluxo. Para isso, 3×10^5 células foram incubadas com os compostos nas concentrações de $\text{CC}_{50(48\text{h})}$ por 24 horas à 37°C . Para a TMZ foi utilizada a concentração de 1000 μM . Concentrações menores (CC_{50} de 48 horas) foram utilizadas neste experimento pelo fato de que uma alta viabilidade celular era desejada.

A quantidade de p53 foi analisada através da utilização de um anticorpo conjugado com ficoeritrina (1:20) juntamente com todos os tampões indicados pelo fabricante (BD Cytotfix/Cytopermend BD

Perm/Wash.) Para a análise da quantidade de HLA-DR, as células foram incubadas com PBS e soro fetal bovino 1% contendo o anticorpo conjugado com ficoeritrina (1:20) por 45 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Citômetro de fluxo foi utilizado para obtenção dos níveis de proteínas e os resultados foram analisados pelo software FacSuite. Os resultados dos dois marcadores foram expressos em porcentagem, sendo o controle considerado 100%.

4.12 AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE BAF-47, BETA-CATENINA, IBA-1, MAP2c, OLIG-2, p75 E IDH1

Os anticorpos anti-BAF-47 (1:100), anti-Beta-Catenina (1:400), anti-Iba1 (1:600), anti-MAP2c (1:1000), anti-Olig-2 (1:200), anti-p75 (1:400) e anti-IDH1 (1:600) foram utilizados para análise destas proteínas através do método de imunocitoquímica. Para isso, 7×10^3 células foram incubadas com os compostos com a $CC_{50(48h)}$ dos mesmos por 24 horas à 37°C , sendo que a escolha de concentrações menores (CC_{50} de 48 horas) deu-se pela mesma razão já mencionada anteriormente. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS e fixadas com formaldeído 4% por 40 minutos. A permeabilização da membrana celular foi realizada com Triton X-100[®] (detergente) por 30 minutos e posteriormente as células foram incubadas com soro fetal bovino 5% por 60 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através da utilização de peróxido de hidrogênio 6% por 40 minutos. As células foram lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos durante 12 horas à 4°C . Após este tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário (1:1000) por 1 hora à temperatura ambiente e protegido da luz. As células foram novamente lavadas com PBS e a reação foi revelada através da utilização de DAB 1%. O corante hematoxilina foi utilizado para contracoloração. As células foram observadas através do microscópio Olympus IX71 e as imagens foram capturadas com a câmera Olympus DP71 utilizando o software cellSens. O programa Image J com os plugins *color deconvolution* e *cell counter* foram utilizados para analisar as imagens, sendo que a intensidade de marcação mensurada por este programa foi dividida pelo número de células. Os resultados de todos os marcadores foram expressos em porcentagem, sendo o controle considerado 100%.

4.13 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas foi realizada em placa de 96 poços e em triplicata pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). A solução de Lowry, composta por Na_2CO_3 2%, NaOH 0,4%, tartarato de sódio 2% e CuSO_4 1%, foi adicionada às amostras, as quais foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente sob agitação. O reagente Folin[®] foi também inserido em cada poço, os quais foram novamente incubados por 30 minutos em temperatura ambiente e sob agitação. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 750 nm em um leitor de microplacas. Uma curva analítica com BSA (do Inglês, *bovin serum albumin*) foi utilizada para determinar as concentrações das proteínas.

Este ensaio foi utilizado no experimento de caspase, em que os resultados obtidos foram corrigidos pelas concentrações das proteínas.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm erro-padrão da média (EPM). Cada experimento foi realizado em triplicata e repetido pelo menos três vezes. Para a avaliação estatística, foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Dunnet para comparar todos os tratamentos com o grupo controle. Além disso, o teste t de Student foi utilizado nos casos em que se desejava avaliar a diferença entre dois grupos. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

5.1 CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS DE TACRINA

A citotoxicidade dos derivados de tacrina e da TMZ nas linhagens celulares de glioblastoma não resistente (SF295), resistente (SF295-R) e não tumoral (HUVEC) foi demonstrada através dos valores de CC_{50} , expostos na Tabela 2. As curvas concentração \times resposta podem ser encontradas nos Apêndices A e B para os derivados de tacrina e TMZ, respectivamente. Estes valores de CC_{50} foram calculados após 24, 48 e 72 de incubação com os compostos.

Como observado na primeira coluna da Tabela 2, os derivados de tacrina induziram citotoxicidade dependente do tempo na linhagem celular SF295 com valores de CC_{50} variando entre 16 e 29 μ M após 72 horas de incubação, sendo estes menores do que os valores obtidos após 24 e 48 horas. Um comportamento semelhante foi observado com a utilização da linhagem celular SF295-R, sendo estes resultados demonstrados na segunda coluna da Tabela 2. Os valores de CC_{50} encontrados na linhagem celular SF295-R foram maiores que os encontrados com a linhagem SF295, exceto para o composto TR6-4'Me. As curvas demonstradas no Apêndice A confirmam que a toxicidade dos compostos é dependente da concentração.

O índice de seletividade (IS) indica a seletividade dos compostos entre células tumorais e não tumorais e foi calculado através da divisão dos valores de CC_{50} obtidos na linhagem celular não tumoral pelos valores de CC_{50} obtidos nas linhagens tumorais. Através dos resultados apresentados na Tabela 3, observa-se que os derivados de tacrina apresentaram na grande maioria dos casos valores de IS maiores do que 1, tanto com a utilização de SF295 quanto de SF295-R, indicando que estes compostos apresentam seletividade pelas células tumorais, inclusive para as resistentes.

Também conclui-se através dos resultados apresentados na Tabela 2 que os derivados de tacrina apresentam maior citotoxicidade que a TMZ em todas as linhagens celulares analisadas. No Apêndice B observa-se o efeito concentração \times resposta da TMZ, caracterizado por um comportamento linear em grande parte do gráfico, havendo citotoxicidade somente ao final do gráfico, nos tempos de incubação de 48 e 72 horas, reforçando o fato de a TMZ apresentar citotoxicidade somente em altas concentrações (CITISLI et al., 2015).

Mesmo nos casos em que a TMZ induziu toxicidade, observou-se que esta resultou em valores de IS mais baixos que os encontrados para os derivados de tacrina. Além disso, na maioria dos casos os valores de IS foram menores do que 1, indicando que a TMZ seria mais citotóxica para as células não tumorais do que para as células tumorais.

Tabela 2 - Citotoxicidade dos derivados de tacrina.

Composto	CC ₅₀ (μ M)								
	SF295			SF295-R			HUVEC		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
TR5	46 \pm 8	29 \pm 4	29 \pm 4	68 \pm 22	27 \pm 6	37 \pm 8	63 \pm 3	53 \pm 2	39 \pm 0
TR6	38 \pm 12	23 \pm 0	16 \pm 1	43 \pm 7	22 \pm 2	33 \pm 1	49 \pm 5	34 \pm 1	26 \pm 0
TR7	44 \pm 16	30 \pm 4	18 \pm 2	50 \pm 0	19 \pm 7	26 \pm 1	59 \pm 2	34 \pm 0	35 \pm 15
TR6-3'Me	37 \pm 16	23 \pm 1	18 \pm 2	46 \pm 3	23 \pm 6	32 \pm 1	46 \pm 4	45 \pm 1	37 \pm 3
TR6-4'Me	44 \pm 18	31 \pm 0	22 \pm 2	45 \pm 0	19 \pm 3	24 \pm 0	49 \pm 2	38 \pm 2	29 \pm 2
TR6-tBu	33 \pm 3	31 \pm 2	18 \pm 2	77 \pm 7	25 \pm 15	30 \pm 0	73 \pm 14	53 \pm 1	35 \pm 2
TMZ	>1000	>1000	482 \pm 65	>1000	>1000	905 \pm 17	>1000	857 \pm 0	762 \pm 0

Resultados expressos como média \pm SEM. TMZ = Temozolomida

Tabela 3 - Índice de seletividade dos derivados de tacrina.

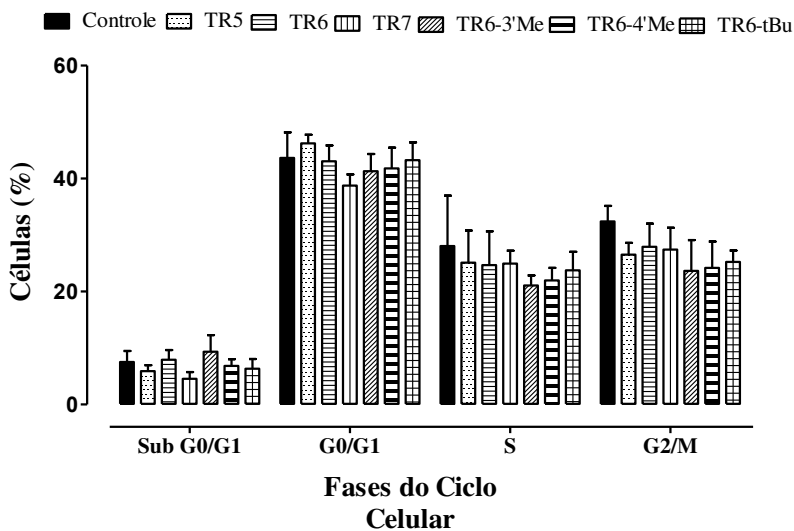
Compostos	Índice de Seletividade (IS)					
	SF295			SF295-R		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
TR5	1,4	1,8	1,3	0,9	2,0	1,1
TR6	1,3	1,5	1,6	1,1	1,5	0,8
TR7	1,3	1,1	1,9	1,2	1,8	1,3
TR6-3'Me	1,2	2,0	2,1	1,0	2,0	1,2
TR6-4'Me	1,1	1,2	1,3	1,1	2,0	1,2
TR6-tBu	2,2	1,7	1,9	0,9	2,1	1,2
TMZ	n.d.	<0,9	1,6	n.d.	<0,9	0,8

Índice de Seletividade (IS): CC_{50} (linhagem celular não tumoral)/ CC_{50} (linhagem celular tumoral). TMZ = Temozolomida. n.d. = não determinado

5.2 INTERFERÊNCIA NO CICLO CELULAR

Muitos quimioterápicos agem induzindo parada do ciclo celular, sendo este, um dos mecanismos de ação também da TMZ (FRIEDMAN et al., 2000). Portanto, buscamos avaliar se os derivados de tacrina poderiam atuar através deste mesmo mecanismo. Contudo, através da Figura 9 observa-se que os compostos não induziram alterações em nenhuma das fases do ciclo celular.

Figura 9 - Efeito dos derivados de tacrina no ciclo celular utilizando células de glioblastoma.



As células foram incubadas por 24 horas com a $CC_{50(24h)}$ dos compostos e coradas com iodeto de propídeo. No gráfico encontra-se representado a média \pm EPM de três experimentos independentes.

5.3 DETERMINAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR

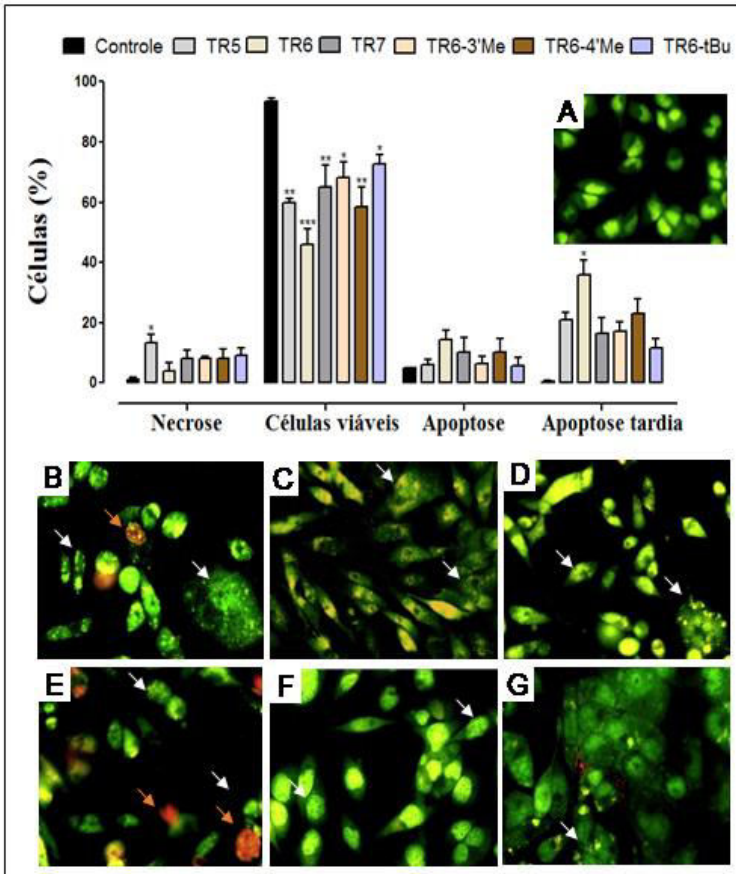
Dois ensaios foram utilizados na investigação do tipo de morte celular envolvido no mecanismo de ação dos derivados de tacrina, sendo eles marcação com Anexina V-FITC e IP (iodeto de propídeo), além de coloração por laranja de acridina e brometo de etídeo.

O ensaio de Anexina-V/IP encontra-se representado no gráfico demonstrado no topo da figura 10 e através dele é possível observar que todos os compostos induziram uma pequena marcação tanto por Anexina-V quanto por IP, sendo esta uma característica de apoptose tardia ou uma mistura entre apoptose e necrose. Contudo, somente o composto TR6 apresentou aumento estatisticamente significativo. Além disso, é possível observar que houve aumento significativo de células em necrose após incubação com o composto TR5.

No ensaio com laranja de acridina e brometo de etídeo, as células viáveis emitem fluorescência verde, da mesma forma que as células em

apoptose inicial, no entanto na apoptose a fragmentação nuclear também ocorre. Além disso, as células em apoptose tardia aparecem com fluorescência laranja e fragmentação nuclear, enquanto as células em necrose são identificadas pela fluorescência vermelha. Este ensaio está representado nas imagens presentes na Figura 10 e através delas é possível observar que a maioria dos compostos induziu principalmente apoptose, com exceção dos compostos TR5 e TR6-3'Me, que mostraram também células em necrose.

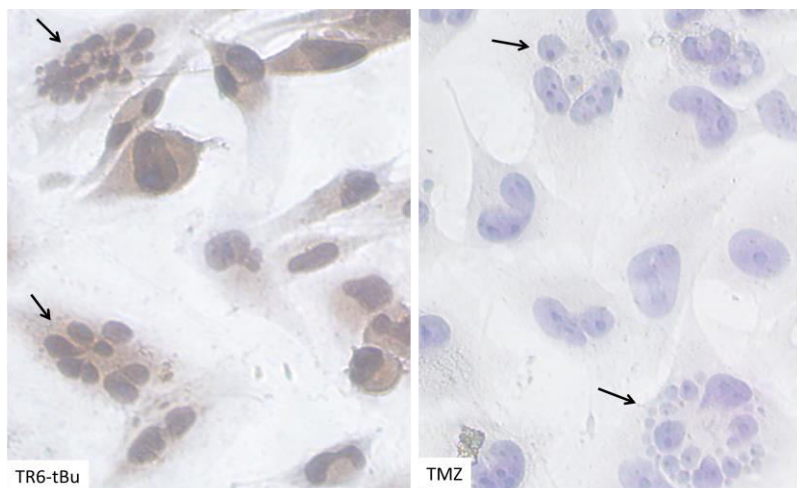
Figura 10 - Tipo de morte celular induzida pelos derivados de tacrina na linhagem celular SF295.



A morte celular foi mensurada através do ensaio com Anexina V-FITC e IP (gráfico presente no tipo da figura), além de coloração com laranja de acridina e brometo de etídeo. Os dois ensaios foram realizados após 24 horas de incubação com $CC_{50(24h)}$ dos seis compostos. (A) Controle, (B) TR5, (C) TR6, (D) TR7, (E) TR6-3'Me, (F) TR6-4'Me, G TR6-tBu. As setas brancas representam as células em apoptose, enquanto as setas laranjas representam as células em necrose. O gráfico presente no topo da figura mostra média \pm EPM de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos, utilizando ANOVA, seguido de teste de Dunnet.

Durante o ensaio de imunocitoquímica, apresentado posteriormente, observou-se a presença de muitas células multinucleadas, com cromatina condensada e volume celular aumentado após incubação com TR6-tBu e TMZ (Figura 11). Estes resultados indicam que estes compostos podem estar induzindo morte celular envolvendo mitose catastrófica.

Figura 11 - Avaliação da morfologia celular após tratamento com os compostos TR6-tBu e TMZ.



As imagens foram obtidas através do ensaio de imunocitoquímica após 24 horas de incubação com os compostos com $CC_{50(48h)}$. As setas pretas indicam as células multinucleadas, com cromatina condensada e volume celular aumentado.

5.4 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES DAS CASPASES -3, -8, -9 E -12

Com o objetivo de auxiliar na investigação do mecanismo de ação dos derivados de tacrina, as atividades das caspases -3, -8, -9 e -12 foram avaliadas, visto que estas são proteases responsáveis pela regulação da apoptose.

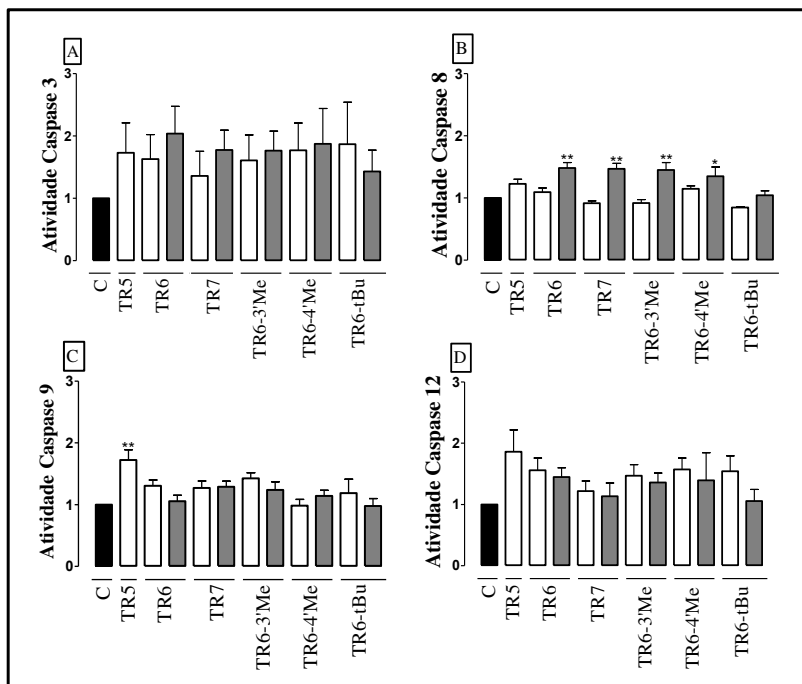
Através da Figura 12A pode-se observar que todos os compostos aumentaram a atividade da caspase-3, principal caspase efetora, após tratamento com $CC_{50(24h)}$ e dobro da $CC_{50(24h)}$, contudo, nenhum composto apresentou resultados estatisticamente significativos.

Os compostos TR6, TR7, TR6-3'Me e TR6-4'Me induziram aumento da atividade da caspase-8, protease pertencente a classe das iniciadoras, utilizando o dobro da $CC_{50(24h)}$ dos compostos. Em relação ao tratamento com a $CC_{50(24h)}$, nenhum resultado significativo foi observado (Figura 12B).

A atividade da caspase-9, envolvida com a via intrínseca da apoptose, apresentou-se aumentada principalmente no tratamento com o composto TR5 (Figura 12C).

Em relação a caspase-12, a qual está relacionada com a via de estresse de retículo endoplasmático, é possível observar que todos os compostos aumentaram a sua atividade, contudo, nenhum apresentou resultados estatisticamente significativos (Figura 12D).

Figura 12 - Efeito dos derivados de tacrina nas atividades das caspases -3, -8, -9 e -12.

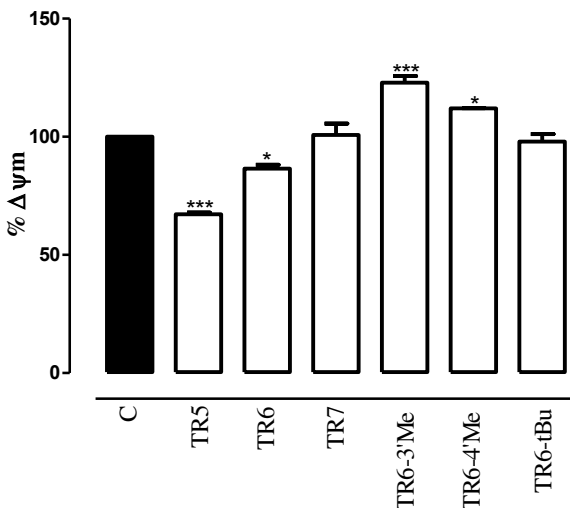


A atividade das caspases foi mensurada mediante utilização de substratos fluorescentes destas proteases. O ensaio foi realizado após 4 horas de incubação com a $CC_{50(24h)}$ e o dobro da $CC_{50(24h)}$ dos compostos. As barras brancas representam o tratamento com $CC_{50(24h)}$, enquanto as barras cinzas representam o tratamento com o dobro da $CC_{50(24h)}$. (A) Caspase-3, (B) Caspase-8, (C) Caspase-9 e (D) Caspase-12. Cada barra presente no gráfico representa a média \pm EPM, (n=5). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ foram considerados estatisticamente significativos, utilizando ANOVA, seguido de teste de Dunnet.

5.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Na Figura 13 pode-se observar que os compostos TR5 e TR6 induziram diminuição estatisticamente significativa do potencial de membrana mitocondrial e que os compostos TR6-3'Me e TR6-4'Me induziram aumento deste potencial. Por outro lado, os compostos TR6-tBu e TR7 não perturbaram o potencial de membrana mitocondrial.

Figura 13 - Efeito dos derivados de tacrina no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).



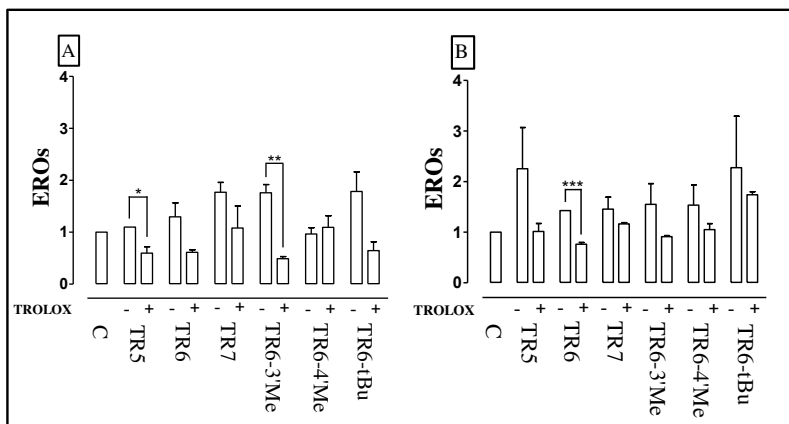
O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado através da utilização da sonda fluorescênte JC-1. O ensaio foi realizado após 24 horas de incubação com a $CC_{50(24h)}$ dos compostos. As barras presentes no gráfico representam a média \pm EPM de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos, utilizando ANOVA, seguido de teste de Dunnet.

5.6 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Na Figura 14A, observamos o efeito dos compostos após 4 horas de incubação em relação a geração de EROs. Pode-se observar que os compostos TR6, TR7, TR6-3'Me e TR6-tBu causaram aumento nos níveis de EROs. O composto TR6-3'Me causou diminuição dos níveis de EROs na presença de TROLOX[®] e o composto TR5 apesar de não ter exercido efeito no conteúdo de EROs causou diminuição de EROs na presença de TROLOX[®].

No tempo de incubação de 24 horas com os compostos (Figura 14B) observou-se que todos os compostos aumentaram a formação de EROs. Além disso, a presença de TROLOX[®] impediu este efeito, principalmente com o composto TR6.

Figura 14 - Efeito dos derivados de tacrina nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs).



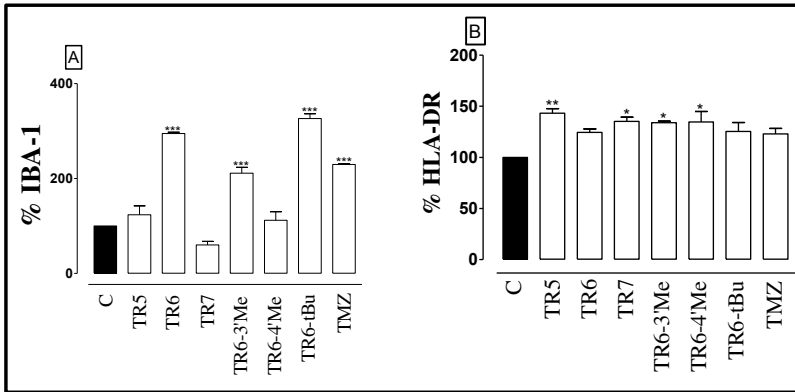
O conteúdo de EROs foi avaliada através da utilização da sonda fluorescente DCFH-DA. O ensaio foi realizado após 4 e 24 horas de incubação com a $CC_{50(24h)}$ dos compostos. O símbolo "-" representa os níveis de EROs na ausência de TROLOX[®], enquanto o símbolo "+" representa este mesmo efeito, na presença de TROLOX[®]. (A) 4 horas de incubação, (B) 24 horas de incubação. As barras presentes nos gráficos representam a média \pm EPM de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos, utilizando o teste t Student. ANOVA, seguido do teste de Dunnet também foram utilizados para comparação entre os tratamentos e o controle.

5.7 ANÁLISE DA QUANTIDADE DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO SISTEMA IMUNOLÓGICO

Através da Figura 15A e Apêndice G observa-se que os compostos TR6, TR6-3'Me, TR6-tBu e a TMZ induziram aumento da quantidade de IBA-1. O composto TR7 foi o único composto que diminuiu a quantidade desta proteína.

Todos os derivados de tacrina, bem como a TMZ induziram aumento da quantidade de HLA-DR (Figura 15B e Apêndice D), contudo apresentaram resultados considerados estatisticamente significativos somente os compostos TR5, TR7, TR6-3'Me e TR6-4'Me.

Figura 15 - Efeito dos derivados de tacrina sobre proteínas relacionadas ao sistema imunológico.



A quantidade de IBA-1 (A) foi avaliada através de imunocitoquímica, enquanto a citometria de fluxo foi utilizada para avaliação de HLA-DR (B). Para a análise da quantidade destas proteínas, as células foram incubadas com os compostos (CC_{50(48h)}) por 24 horas. As barras presentes no gráfico representam a média \pm EPM de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos utilizando ANOVA, seguido de teste de Dunnet.

5.8 ANÁLISE DA QUANTIDADE DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO GLIOBLASTOMA

Através da Figura 16A e Apêndice C, observa-se que alguns compostos induziram a diminuição da quantidade de p53, sendo eles o TR6, o TR7 e o TR6-3'Me. Os outros compostos praticamente não alteraram a quantidade desta proteína.

Na Figura 16B e Apêndice F observa-se que todos os compostos analisados diminuíram a quantidade de beta-catenina, no entanto, sem significância estatística. O derivado de tacrina TR7 foi o composto que diminuiu a quantidade desta proteína com maior intensidade.

Em relação à proteína BAF-47 (Figura 16C e Apêndice E), observa-se que todos os compostos induziram diminuição da quantidade, inclusive a TMZ, embora com o fármaco o resultado não tenha sido significativo estatisticamente.

Através da Figura 16D e Apêndice H observa-se que os compostos TR5, TR6, TR6-4'Me e TR6-tBu aumentaram a quantidade da proteína MAP2c, contudo somente TR6-tBu apresentou resultado

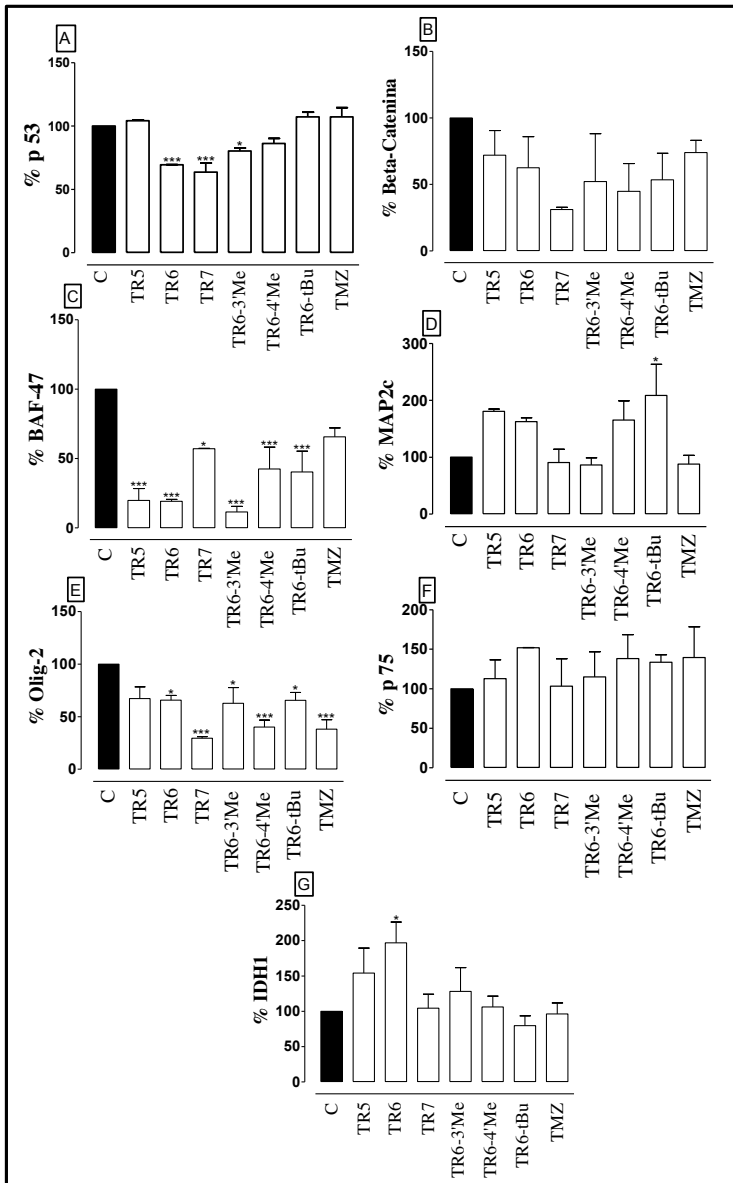
estatisticamente significativo. Os compostos TR7, TR6-3'Me e a TMZ praticamente não interferiram na quantidade desta proteína.

Em relação à olig-2 (Figura 16E e Apêndice I), observa-se que todos os derivados de tacrina e também a TMZ diminuíram a quantidade da proteína. Além disso, observa-se que somente o composto TR5 não apresentou resultado estatisticamente significativo.

Não foram observadas alterações estatisticamente significativas na quantidade do receptor de neurotrofina p75 (Figura 16F e Apêndice J) após incubação das células com os compostos.

Na Figura 16G e apêndice K, observa-se que TR5 e TR6 foram os compostos que mais aumentaram a quantidade de IDH1 (isocitrato desidrogenase 1).

Figura 16 - Efeito dos derivados de tacrina na expressão gênica de proteínas relacionadas ao glioblastoma.



A quantidade de p53 foi avaliada através de citômetria de fluxo, enquanto o método de imunocitoquímica foi utilizado para avaliação dos outros marcadores. (A) p53, (B) Beta-catenina, (C) BAF-47, (D) MAP2c, (E) Olig-2, (F) p75, (G) IDH1. Para a análise da quantidade de todas estas proteínas, as células foram incubadas com os compostos (CC_{50(48h)}) por 24 horas. As barras presentes no gráfico representam a média \pm EPM de três experimentos independentes. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 foram considerados estatisticamente significativos utilizando ANOVA, seguido de teste de Dunnet.

DISCUSSÃO

O GBM é um tipo de câncer que necessita ainda de muitos estudos direcionados ao desenvolvimento de novas terapias visto que atualmente a temozolomida, principal fármaco utilizado, não apresenta o efeito necessário para a erradicação do tumor (GOTO et al., 2002; HAPPOLD, 2012). O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo de novas terapias para o tratamento do GBM com derivados de tacrina, os quais foram sintetizados e avaliados quanto a toxicidade para células derivadas deste tipo de neoplasia.

Os derivados de tacrina contendo espiro-heterocíclis foram escolhidos pelo fato de a molécula de tacrina atravessar a barreira hematoencefálica. Além disso, alguns estudos demonstraram que a presença de espiro-heterocíclis nas moléculas de fármacos resultou em atividade citotóxica (REED et al., 2011; NEPOVIMOVA et al., 2015; BONACORSO et al., 2016).

Neste estudo, os valores de CC_{50} encontrados para os derivados de tacrina foram bem menores que os valores encontrados para a TMZ, visto que para os derivados de tacrina os valores ficaram na faixa de μM , diferentemente da TMZ, que na maioria dos casos apresentou CC_{50} na faixa de mM. Valores elevados de CC_{50} para a TMZ não foram encontrados somente em nosso estudo, visto que Citish et al. (2015) encontraram CC_{50} de 5 mM para este quimioterápico após 24 horas de incubação utilizando linhagem celular de neuroblastoma. Deste modo, observou-se que os derivados de tacrina apresentaram uma importante citotoxicidade nas linhagens celulares de GBM.

Além disso, os ISs calculados para os seis compostos e para a TMZ demonstram que os derivados de tacrina são mais seletivos para as células tumorais testadas do que o fármaco, sendo que em quase todos os casos os compostos apresentaram IS maior que 1.

Todos os derivados de tacrina apresentam lipofilicidade, sendo esta propriedade determinada pelo Log P. O composto TR6-tBu é o que apresenta maior Log P (Tabela 1) e conseqüentemente pode ser considerado o mais lipofílico. Esta propriedade pode facilitar a entrada dos compostos na célula tumoral para realização de suas ações, embora para as ações farmacológicas tem sido evidenciada uma faixa com limites mínimos e máximos de lipofilicidade (ROSSO, 2008)

O conhecimento do mecanismo pelo qual as células morrem é muito importante para contornar estratégias de sobrevivência celular, bem como para o desenvolvimento de novos fármacos. Neste trabalho foi observado que as células apresentaram marcação tanto por IP quanto

por Anexina V após incubação com os compostos, indicando que a morte celular observada está envolvida com necrose e apoptose. Sabe-se que as células tumorais utilizam diversos mecanismos para desviar da morte celular por apoptose (MOHAMMAD et al., 2015), portanto a indução de necrose pode ser muito interessante nestes casos. Além disso, alguns trabalhos tem sugerido que a necrose e a apoptose compartilham redes bioquímicas tanto por mecanismos envolvendo caspases como por mecanismos que não dependem de caspases, bem como que a indução de necrose não é um mecanismo indesejado para matar células tumorais (ZEISS, 2003; ZHANG et al., 2014).

A apoptose pode ser ativada por vias envolvendo sinais intrínsecos e extrínsecos, mas também pode ser iniciada por estresse de retículo endoplasmático (KIRAZ et al., 2016). Neste trabalho, as vias de apoptose pertencentes ao mecanismo de ação dos derivados de tacrina foram investigadas através da avaliação da atividade das caspases, análise do potencial de membrana mitocondrial e geração de EROs (GREEN et al., 2014; KIM et al., 2014).

De uma forma geral, os compostos não induziram uma via de apoptose específica. O composto TR5 induziu uma forte perda do potencial de membrana mitocondrial e foi o único composto que induziu aumento significativo da caspase-9, não alterando a atividade da caspase-8. Estes dados sugerem que a apoptose por via intrínseca é a principal via de morte celular induzida por este composto. Contudo, o aumento da atividade da caspase-12 observado indica que a via de estresse de retículo endoplasmático também pode ser parte do mecanismo de ação do TR5. O composto TR6 apresentou um comportamento similar ao TR5, no entanto induziu aumento da atividade da caspase-8 indicando uma indução das vias intrínseca e extrínseca da apoptose. Por outro lado, os compostos TR6-3'Me e TR6-4'Me induziram um inesperado aumento do potencial de membrana mitocondrial, além do aumento da atividade da caspase-8, indicando envolvimento maior da via extrínseca da apoptose no mecanismo de ação destes compostos. O composto TR7 parece ter seu mecanismo de ação relacionado principalmente com a indução da apoptose pelas vias extrínseca (caspase-8) e estresse de retículo (caspase-12). Diferentemente de todos os compostos, o derivado TR6-tBu não alterou a atividade de nenhuma das caspases e nem do potencial mitocondrial, sugerindo que a apoptose pode não ser o tipo de morte celular observado. Este derivado também não mostrou indícios de necrose. Entretanto, células com morfologia semelhante à mitose catastrófica foram encontradas após incubação com TR6-tBu e TMZ. Estudos já

comprovaram que a mitose catastrófica faz parte do mecanismo de ação da TMZ (HIROSE et al., 2005; CHIELA et al., 2013), e devido a semelhança morfológica do TR6-tBu com este quimioterápico, sugere-se que a mitose catastrófica também seja um importante mecanismo envolvido na ação deste derivado de tacrina, no entanto, ensaios adicionais mais específicos são necessários para confirmação.

Estes resultados indicam que os derivados de tacrina aqui testados apresentam mecanismos de ação diferentes uns dos outros. Outros estudos também apresentaram resultados similares ao nosso trabalho, em que não foi definida uma via de morte celular única para os compostos em estudo (BUYTAERT; DAWAELE; AGOSTINIS, 2007; MUHTASIB, 2015). Além disso, muitos dos quimioterápicos utilizados atualmente, como a doxorubicina, apresentam múltiplos mecanismos de ação, nem todos bem definidos, e apesar disso atua com efetividade (THORN et al., 2011). Entretanto, o fármaco apresenta vários efeitos adversos, neste sentido deve-se avaliar bem entre os alvos, os mais adequados a ação farmacológica.

Compostos que inibem um ou vários alvos específicos representam uma nova possibilidade de tratamento não só para o GBM, mas para outros tipos de câncer. A vantagem destas terapias é explicada pelo fato de que uma ação mais direcionada às células tumorais resulta em menos prejuízo aos tecidos saudáveis (PETRELLI; GIORDANO, 2008). Como o GBM envolve mutação e alteração na quantidade de importantes genes e proteínas (HAQUE et al., 2011; LIU et al., 2016), foram selecionados marcadores utilizados atualmente no diagnóstico e prognóstico para este tipo de câncer com o objetivo de prospectar novos alvos terapêuticos.

Entre os marcadores para diagnóstico, tem sido verificado que a mutação na enzima isocitrato desidrogenase (IDH) geralmente está presente em gliomas. Contudo, sabe-se que o aumento da quantidade de IDH mutado resulta em melhora no prognóstico de pacientes (COHEN et al., 2013). Este efeito positivo provavelmente se deve ao fato de que mutações nesta enzima causam aumento do estresse oxidativo, causando alterações no DNA e indução de apoptose (TEWARIE et al., 2013). Os derivados de tacrina TR5 e TR6 induziram aumento da quantidade de IDH1 mutado. Portanto, o aumento na geração de EROs por estes compostos, observado neste trabalho, pode ter sido resultado também do aumento da quantidade desta enzima mutada. Além disso, propõem-se que a utilização desta estratégia no tratamento do GBM pode resultar em melhora do prognóstico dos pacientes.

Muitos quimioterápicos, como é o caso da TMZ, induzem parada do ciclo celular (CHIELA et al., 2013). Contudo, foi observado que os derivados de tacrina não alteraram o ciclo celular. Apesar disso, os derivados de tacrina e a TMZ diminuíram a quantidade de um fator de transcrição que interfere no ciclo celular através da diminuição da quantidade da proteína anti-proliferativa p53, chamado olig-2 (TSIGELNY et al., 2016). O olig-2 também é importante para o crescimento de células normais e células progenitoras neurais malignas, sendo a diminuição da quantidade desta proteína considerada positiva (LIGON et al., 2007; KANU et al., 2009). Portanto, sugere-se que este fator de transcrição é um importante alvo para o tratamento de GBM. Estes resultados opuseram-se a diminuição da quantidade de p53 induzida pelos compostos TR6, TR7 e TR6-3'Me, já que se esperava que a diminuição de olig-2 resultasse em aumento de p53. Porém, sugere-se que as proteínas p53 das linhagens celulares analisadas neste trabalho não se encontram na forma selvagem, visto que esta apresenta meia-vida muito curta (MAKI et al., 1996), o que dificultaria a detecção pelo método utilizado. A forma mutada de p53 funciona como oncogene e a diminuição da quantidade da proteína é considerada um importante fator para o tratamento de diversos tipos de câncer (PARRALES; IWAKUMA, 2015; AGOSTINO et al., 2016). Portanto, a diminuição da quantidade de p53 mutada pode também ser considerado uma estratégia para o tratamento de GBM.

BAF-47 é uma proteína supressora tumoral responsável pela regulação de genes e reparo do DNA (EUSKIRCHEN et al., 2012). Alguns estudos demonstraram que a diminuição na quantidade desta proteína pode alterar a proliferação celular e diminuir a indução de apoptose (YEIVIN et al., 2006). Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que os derivados de tacrina induzem diminuição da quantidade de BAF-47, indicando que este não é um alvo promissor dos derivados de tacrina.

A imunossupressão geralmente é uma característica presente em pacientes com GBM, visto que o próprio tumor secreta fatores imunossupressores e o SNC não apresenta muitas células imunes nativas. Além disso, a barreira hematoencefálica encontra-se íntegra, dificultando a passagem de células de defesa (KANU et al., 2009).

HLA-DR são moléculas que proporcionam uma resposta imune anti-tumoral devido a ativação de células T (THIBODEAU et al., 2012). Devido ao aumento da quantidade de HLA-DR no tratamento com os derivados de tacrina e com a TMZ, sugere-se que estes compostos poderiam promover resposta imune contra as células tumorais.

IBA-1 é uma proteína expressa principalmente em microglia e é o marcador utilizado para avaliar a presença e ativação destas células (TUCKER et al., 2016). Os compostos TR5, TR6, TR6-3'Me e TR6-tBu e a TMZ aumentaram a ativação de microglia, sendo este fato observado através do aumento da quantidade de IBA-1. Apesar de existirem muito relatos quanto ao papel pró-tumoral da microglia, estudos mencionam que este tipo celular também tem papel anti-tumoral devido a ativação das respostas imune inata e adaptativa (WEI et al., 2013), podendo esta ser outra estratégia para o tratamento de GBM. Entretanto, estudos adicionais seriam interessantes para caracterizar bem os benefícios desta abordagem como alvo terapêutico para evitar-se eventualmente o desenvolvimentos de efeitos adversos.

A beta-catenina é uma proteína pertencente a via Wnt, a qual apresenta funções como proliferação, adesão e migração celular (LEE et al., 2015). Além disso, é considerada um marcador prognóstico, visto que encontra-se expressa em grande quantidade em GBM de alto grau (ROSSI et al., 2011). Alguns trabalhos já observaram inibição do crescimento de diversos tumores, bem como melhora do prognóstico através da utilização de inibidores de beta-catenina (TAI et al., 2014; PRAMANIK et al., 2015; VILCHEZ et al., 2016). Neste estudo foi observado diminuição da quantidade de beta-catenina pelos derivados de tacrina, outra possibilidade para a aplicação como agentes antitumorais.

MAP2 pertence a uma família de proteínas com função de estabilização de microtúbulos e a diminuição da quantidade da proteína tem sido relacionada com apoptose e parada do ciclo celular em células de melanoma (BHAT; SETALURI, 2007; SONG et al., 2010). No GBM, a proteína MAP2c é uma isoforma de MAP2 e é encontrada em células jovens indiferenciadas (SOLTANI et al., 2005). Neste trabalho foi observado aumento na quantidade de MAP2c principalmente no tratamento com o composto TR6-tBu. Como a estabilização de microtúbulos está relacionada a indução de mitose catastrófica, sugere-se que este pode ser o mecanismo de morte celular induzida pelo composto TR6-tBu, assim como outros quimioterápicos como paclitaxel e docetaxel (MORSE et al., 2005; WEI; SEEMANN, 2010).

O receptor de neurotrofina (p75) apresenta importante papel no comportamento invasivo do GBM (AHN et al., 2015). Como este marcador está relacionado com a invasão e proliferação celular, alguns estudos apresentam a inibição deste receptor como uma importante estratégia terapêutica para o GBM (WANG et al., 2008). Neste sentido, Vanhecke et al. (2011) observou que a inibição de p75 diminuiu o efeito anti-apoptótico. Contudo, como os derivados de tacrina e a TMZ não

interferiram na quantidade de p75, conclui-se que o mecanismo de ação destes compostos não está relacionado com este receptor.

RESUMO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que:

-Os derivados de tacrina apresentam melhor citotoxicidade que a TMZ nas linhagens celulares testadas.

-Os derivados de tacrina apresentam IS maior para as células tumorais que a TMZ.

-Os compostos não apresentaram mecanismo de morte celular único, mas induziram diversas vias que envolvem apoptose, necrose e possivelmente mitose catastrófica.

-A principal via de morte celular induzida pelos compostos TR5 e TR6 é a via intrínseca da apoptose, sendo este fato evidenciado pela perda do potencial de membrana mitocondrial e pelo aumento da atividade da caspase-9.

-A principal via de morte celular induzida pelos compostos TR6-3'Me e TR6-4'Me é a via extrínseca da apoptose, sendo este fato observado pelo aumento do potencial de membrana mitocondrial e aumento da atividade da caspase-8.

-Todos os derivados de tacrina induziram estresse oxidativo nas células, evidenciado pela indução da formação de EROs.

-Os derivados de tacrina apresentaram a capacidade de agir sobre alvos específicos do GBM, como no aumento da quantidade de IDH mutado, HLA-DR e MAP2c e na diminuição da quantidade de beta-catenina e olig-2.

-O tratamento com os derivados de tacrina pode melhorar o prognóstico dos pacientes.

-Apesar de a parada no ciclo celular não fazer parte do mecanismo de ação dos derivados de tacrina, estes agem sobre proteínas com funções na proliferação celular, inibindo a progressão do tumor.

-Os derivados de tacrina também funcionam como imunoterapia, fato evidenciado principalmente pelo aumento na quantidade de HLA-DR.

Além disso, observou-se indícios de que os compostos aumentaram a ativação de microglias.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, conclui-se que os derivados de tacrina podem apresentar vantagens em relação ao fármaco utilizado atualmente para o tratamento do GBM, como baixa CC_{50} e menor toxicidade para as células não tumorais.

Estes compostos agem através de diversos mecanismos, mas a apoptose é o tipo de morte celular que mais se destaca no mecanismo de ação dos mesmos. Além disso, os derivados de tacrina apresentaram ação sobre alvos importantes para imunoterapia, bem como sobre alvos específicos do GBM, podendo inferir-se que os compostos podem diminuir a progressão tumoral e consequentemente o prognóstico dos pacientes seria melhorado.

Portanto, sugere-se que os derivados de tacrina são moléculas com propriedades promissoras para a continuidade nas investigações de fármacos para o tratamento do GBM.

PERSPECTIVAS

Com o objetivo de melhor caracterizar o mecanismo de ação dos derivados de tacrina, existem como perspectivas:

-Avaliar o efeito dos derivados na indução de metástase através de testes de invasão.

-Avaliar a quantidade das proteínas por imunoblotting.

-Avaliar a importância dos marcadores p53-mutante, HLA-DR, BAF-47, beta-catenina, Iba-1, MAP2c, olig-2, p75 e IDH-1 na proliferação do GBM através de siRNA.

-Realizar ensaios específicos para confirmar a indução de mitose catastrófica pelo composto TR6-tBu.

REFERÊNCIAS

AGOSTINO, S. D. et al. YAP enhances the pro-proliferative transcriptional activity of mutant p53 proteins. **EMBO Reports**, v. 17, n. 2, p. 188-201, 2016.

AHN, B. Y. et al. Glioma invasion mediated by the p75 neurotrophin receptor (p75NTR[[sol](#)][CD271]) requires regulated interaction with PDLIM1. **Oncogene**, v. 35, n. 11, p. 1411-1422, 2015.

ANISIMOV, V. N. Carcinogenesis and aging 20 years after: Escaping horizon. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 130, n. Issues 1–2, p. 105–121, 2009.

APTSIAURI, N. et al. Role of altered expression of HLA class I molecules in cancer progression. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 601, p. 123-31, 2007.

ASHKENAZI, A. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 12, p. 1001-1012, 2008.

BADRI, H. et al. Optimization of radiation dosing schedules for proneural glioblastoma. **Journal of Mathematical Biology**, v. 72, n. 5, p. 1301-1336, 2016.

BENITO, R. et al. Primary glioblastomas with and without EGFR amplification: relationship to genetic alterations and clinicopathological features. **Neuropathology**, v. 30, n. 4, p. 392-400, 2010.

BHAT, K. M.; SETALURI, V. Microtubule-associated proteins as targets in cancer chemotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 10, p. 2849-2854, 2007.

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organ Journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BONACORSO, H. G. et al. Synthesis, biological evaluation and molecular docking study of 7-amine-spiro[chromeno[4,3-b]quinoline-

6,1'-cycloalkanes] as new tacrine hybrids. **Tetrahedron Letters**, v. 56, p. 7024-7027, 2016.

BONNIER, F. et al. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models. **Toxicology In Vitro**, v. 29, n. 1, p. 124-131, 2015.

BOUVIER, C. et al. Shared oligodendrocyte lineage gene expression in gliomas and oligodendrocyte progenitor cells. **Journal of Neurosurgery**, v. 99, n. 2, p. 344-350, 2003.

BRATIC, I.; TRIFUNOVIC, A. Mitochondrial energy metabolism and ageing. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1797, n. 6-7, p. 961-967, 2010.

BUYTAERT, E. DEWAELE, M. AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1776, n. 1, p. 86-107, 2007.

CAMPISI, J.; FAGAGNA, F. D. A. D. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 9, p. 729-740, 2007.

CHEN, J. R. et al. Isocitrate Dehydrogenase (IDH)1/2 Mutations as Prognostic Markers in Patients With Glioblastomas. **Medicine**, v. 95, n. 9, p. 2583, 2016.

CHEN, X. et al. Tacrine-silibinin codrug shows neuro- and hepatoprotective effects in vitro and pro-cognitive and hepatoprotective effects in vivo. **Journal Medical Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 5231-5242, 2012.

CHIANTORE, M. V. et al. Senescence and cell death pathways and their role in cancer therapeutic outcome. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 287-300, 2009.

CHIELA, E. C. et al. Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells. **BMC Cancer**, v. 13, p. 147, 2013.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive Oxygen Species, cellular redox systems and apoptosis. **Free Radical Biology Medicine**, v. 48, n. 6, p. 749-762, 2010.

CITISLI, V. et al. Temozolomide may induce cell cycle arrest by interacting with URG4/URGCP in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Tumour Biology**, v. 36, n. 9, p. 6765-6772, 2015.

COHEN, A.; HOLMEN, S.; COLMAN, H. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. **Current Neurology Neuroscience Reports**, v. 13, n. 5, p. 345, 2013.

CONTELLES, J. et al. New multipotent tetracyclic tacrines with neuroprotective activity. **Bioorganic and Medical Chemistry**, v. 14, n. 24, p. 8176-8185, 2006.

DOONAN, F.; COTTER, T. G. Morphological assessment of apoptosis. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 200-204, 2008.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

EUSKIRCHEN, G.; AUERBACH, R. K.; SNYDER, M. SWI/SNF chromatin-remodeling factors: multiscale analyses and diverse functions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 37, p. 30897-30905, 2012.

FRIEDMAN, H. S.; KERBY, T.; CALVERT, H. Temozolomide and Treatment of Malignant Glioma. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 7, p. 2585-2597, 2000.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4798-4811, 2006.

FURNARI, F. B. et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes and Development**, v. 21, n. 21, p. 2683-2710, 2007.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107-120, 2012.

GALLUZZI, L.; BLOMGREN, K.; KROEMER, G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 7, p. 481-494, 2009.

GOBE, G.; CRANE, D. Mitochondria, reactive oxygen species and cadmium toxicity in the kidney. **Toxicology Letters**, v. 198, n. 1, p. 49-55, 2010.

GOLSTEIN, G. K. KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 37-43, 2007.

GOTO, S. et al. Significance of nuclear glutathione S-transferase pi in resistance to anti-cancer drugs. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 93, n. 9, p. 1047-1056, 2002.

GOTTLIEB, E. et al. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. **Cell Death Differentiation**, v. 10, n. 6, p. 709-717, 2003.

GREEN, D. R.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Metabolic control of cell death. **Journal List**, v. 345, p. 1250256, 2014

GROENENDYK, J.; MICHALAK, M. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 2, p. 381-395, 2005.

GUNTHER, H. S. et al. Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. **Oncogene**, v. 27, n. 20, p. 2897-2909, 2008.

GUPTA R.R., K. M., GUPTA V. Heterocyclic Chemistry. 2012.

HAMBARZUMYAN, D.; GUTMANN, D. H.; KETTENMANN, H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. **Nature Neuroscience**, v. 19, p. 20-27, 2015.

HAPPOLD, C. et al. Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 122, n. 2, p. 444-455, 2012.

HAQUE, A. et al. Induction of apoptosis and immune response by all-trans retinoic acid plus interferon-gamma in human malignant glioblastoma T98G and U87MG cells. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 56, n. 5, p. 615-625, 2007.

HAQUE, A.; BANIK, N. L.; RAY, S. K. Molecular alteration in glioblastoma: potential targets for immunotherapy. **Progress in Molecular Biology Translational Science**, v. 98, p. 187-234, 2011.

HE, C.; KLIONSKY, D. J. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. **Annual Review Genetics**, v. 43, p. 67-93, 2009.

HIROSE, Y. et al. Akt activation suppresses Chk2-mediated, methylating agent-induced G2 arrest and protects from temozolomide-induced mitotic catastrophe and cellular senescence. **Cancer Research**, v. 65, n. 11, p. 4861-4869, 2005.

HUANG, H. et al. Resveratrol reverses temozolomide resistance by downregulation of MGMT in T98G glioblastoma cells by the NF-kappaB-dependent pathway. **Oncol Rep**, v. 27, n. 6, p. 2050-2056, 2012.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>, Acesso em 25 nov. 2016.

ISLAM, M. S. et al. Synthesis, molecular structure and spectroscopic investigations of novel fluorinated spiro heterocycles. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8223-8241, 2015.

JANONOCKOVÁ, J. et al. Tacrine derivatives as dual tomoisomerase I and II catalytic inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, v. 59, p. 168-176, 2015.

JANSEN, M.; YIP, S.; LOUIS, D. N. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. **Lancet Neurology**, v. 9, n. 7, p. 717-726, 2010.

JOHNSTON, A. L. et al. The p75 neurotrophin receptor is a central regulator of glioma invasion. **Plos Biology**, v. 5, n. 8, p. 212, 2007.

JOLIOT, V. et al. The SWI/SNF subunit/tumor suppressor BAF47/INI1 is essential in cell cycle arrest upon skeletal muscle terminal differentiation. **Plos One**, v. 9, n. 10, p. 108858, 2014.

KANU, O. O. et al. Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets. **Expert Opinion Therapeutic Targets**, v. 13, n. 6, p. 701-718, 2009.

KARALI, N. et al. Synthesis of new spiroindolinones incorporating a benzothiazole moiety as antioxidant agents. **European Journal Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 1068-1077, 2010.

KARCH, J.; MOLKENTIN, J. D. Regulated Necrotic Cell Death. **Circulation Research**, v. 116, n. 11, p. 1800-1809, 2016.

KAVALLARIS, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. **Nature Review Cancer**, v. 10, n. 3, p. 194-204, 2010.

KENNEDY, B. C. et al. Tumor-associated macrophages in glioma: friend or foe? **Journal of Oncology**, v. 2013, p. 486912, 2013.

KIM, S. H.; KWON, C. H.; NAKANO, I. Detoxification of oxidative stress in glioma stem cells: mechanism, clinical relevance, and therapeutic development. **Journal of Neuroscience Research**, v. 92, n. 11, p. 1419-1424, 2014.

KIRAZ, Y. et al. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. **Tumor Biology**, v. 37, n. 7, p. 8471-8486, 2016.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.

LABI, V.; ERLACHER, M. How cell death shapes cancer. **Cell Death & Disease**, v. 6, n. 3, 2015-2015.

- LEDER, K. et al. Mathematical modeling of PDGF-driven glioblastoma reveals optimized radiation dosing schedules. **Cell**, v. 156, n. 3, p. 603-616, 2014.
- LEE, Y. et al. WNT signaling in glioblastoma and therapeutic opportunities. **Laboratory Investigation**, v. 96, n. 2, p. 137-150, 2015.
- LIGON, K. L. et al. Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. **Neuron**, v. 53, n. 4, p. 503-517, 2007.
- LIN, Y. W. et al. OLIG2 (BHLHB1), a bHLH transcription factor, contributes to leukemogenesis in concert with LMO1. **Cancer Research**, v. 65, n. 16, p. 7151-7158, 2005.
- LIU, A. et al. Genetics and Epigenetics of Glioblastoma: Applications and Overall Incidence of IDH1 Mutation. **Frontier Oncology**, v. 6, 2016.
- LIU, S. Y. et al. Involvement of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in oral cancer cell motility: a novel biological function of MAP2 in non-neuronal cells. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 366, n. 2, p. 520-525, 2008.
- LIU, Y.; ZENG, G. Cancer and Innate Immune System Interactions: Translational Potentials for Cancer Immunotherapy. **Journal of Immunotherapy**, v. 35, n. 4, p. 299-308, 2012.
- LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. **Acta Neuropathologica**, v. 114, p. 97-109, 2007.
- LOWE, S. W.; LIN, A. W. Apoptosis in cancer. **Oxford Journal**, v. 21, n. 3, p. 485-495, 2000.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.
- LUO, H. et al. c-Myc-miR-29c-REV3L signalling pathway drives the acquisition of temozolomide resistance in glioblastoma. **Brain**, v. 138, p. 3654-3672, 2015.

LUU, H. H. et al. Wnt/beta-catenin signaling pathway as a novel cancer drug target. **Current Cancer Drug Targets**, v. 4, n. 8, p. 653-671, 2004.

MAKI, C. G.; HUIBREGTSE, J. M.; HOWLEY, P. M. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). **Cancer Research**, v. 56, n. 11, p. 2649-2654, 1996.

MITEW, S. et al. Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin. **Neuroscience**, v. 276, p. 29-47, 2014.

MOHAMMAD, R. M. et al. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. **Seminars Cancer Biology**, v. 35, p. 78-103, 2015.

MOLLOY, N. H.; READ, D. E.; GORMAN, A. M. Nerve growth factor in cancer cell death and survival. **Cancers**, v. 3, n. 1, p. 510-530, 2011.

MORSE, D. L. et al. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 4, n. 10, p. 1495-1504, 2005.

MUHTASIB, H. et al. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis. **Apoptosis**, v. 20, n. 12, p. 1531-1562, 2015.

NCI - National Cancer Institute. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/>> Acesso em 05 jan. 2017.

NEPOVIMOVA, E. et al. Tacrine-Trolox Hybrids: A Novel Class of Centrally Active, Nonhepatotoxic Multi-Target-Directed Ligands Exerting Anticholinesterase and Antioxidant Activities with Low In Vivo Toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 23, p. 8985-9003, 2015.

NORMANNO, N. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. **Gene**, v. 366, n. 1, p. 2-16, 2006.

OGURA, R. et al. Immunohistochemical profiles of IDH1, MGMT and P53: practical significance for prognostication of patients with diffuse gliomas. **Neuropathology**, v. 35, n. 4, p. 324-335, 2015.

OMURO, A. et al. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review. **JAMA**, v. 310, n. 17, p. 1842-1850, 2017.

OSTROM, Q. T. et al. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. **Neuro-Oncology**, v. 16, n. 7, p. 896-913, 2014.

OTT, M. et al. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis**, v. 12, n. 5, p. 913-922, 2007.

PAGE, B.; PAGE, M.; NOEL, C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. **International Journal Oncology**, v. 3, n. 3, p. 473-476, 1993.

PARRALES, A.; IWAKUMA, T. Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. **Frontier in Oncology**, v. 5, 2015.

PERRY, S. W. et al. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. **Biotechniques**, v. 50, n. 2, p. 98-115, 2011.

PETRELLI, A.; GIORDANO, S. From single- to multi-target drugs in cancer therapy: when aspecificity becomes an advantage. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 422-432, 2008.

PETRELLI, A.; VALABREGA, G. Multitarget drugs: the present and the future of cancer therapy. **Expert Opin Pharmacother**, v. 10, n. 4, p. 589-600, 2009.

PISONI, D. et al. Synthesis and AChE inhibitory activity of new chiral tetrahydroacridine analogues from terpenic cyclanones. **European Journal Medical Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 526-535, 2010.

PRAMANIK, K. C. et al. Inhibition of β -Catenin signaling suppresses pancreatic tumor growth by disrupting nuclear β -Catenin/TCF-1 complex: Critical role of STAT-3. **Oncotarget**, v. 6, n. 13, p. 11561-11574, 2015.

PROKHOROVA, E. A. et al. Role of the nucleus in apoptosis: signaling and execution. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 23, p. 4593-4612, 2015.

REED, D. M. et al. Design and synthesis of spiro derivatives of parthenin as novel anti-cancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 3210–3217, 2011.

ROSSI, M. et al. beta-catenin and Gli1 are prognostic markers in glioblastoma. **Cancer Biol Ther**, v. 11, n. 8, p. 753-761, 2011.

ROSSO, R et al. Relationship between the lipophilic of gallic acid n-alkyl ester derivatives and myeloperoxidase activity and HPCl scavenging. **Bioorganic & Medical Chemistry**, v. 14, n. 18, p. 6409-6413, 2008.

SAMEEM, B. et al. A review on tacrine-based scaffolds as multi-target drugs (MTDLs) for Alzheimer's disease. **European Journal Medicinal Chemistry**, 2016.

SANO, R.; REED, J. C. ER stress-induced cell death mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1833, n. 12, p. 3460-3470, 2013.

SILVA, G. et al. Expression of the Classical and Nonclassical HLA Molecules in Breast Cancer. **International Journal Breast Cancer**, v. 2013, 2013.

SOLTANI, M. H. et al. Microtubule-Associated Protein 2, a Marker of Neuronal Differentiation, Induces Mitotic Defects, Inhibits Growth of Melanoma Cells, and Predicts Metastatic Potential of Cutaneous Melanoma. **American Journal of Pathology**, v. 166, n. 6, p. 1841-1850, 2005.

SONG, Z. et al. Increased expression of MAP2 inhibits melanoma cell proliferation, invasion and tumor growth in vitro and in vivo. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 11, p. 958-964, 2010.

STIEWE, T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 3, p. 165-167, 2007.

SUN, X. W. A new kind of cell suicide: mechanisms and functions of programmed necrosis. **Trends in Biochemical Science**, v. 39, n. 12, p. 587-593, 2014.

TAI, W. P. et al. The inhibition of Wnt/beta-catenin signaling pathway in human colon cancer cells by sulindac. **Tumori**, v. 100, n. 1, p. 97-101, 2014.

TATE, M. C. Surgery for gliomas. **Cancer Treatment and Research**, v. 163, p. 31-47, 2015.

TEWARIE, N. M. et al. NADP⁺-dependent IDH1 R132 mutation and its relevance for glioma patient survival. **Medical Hypotheses**, v. 80, n. 6, p. 728-731, 2013.

THIBODEAU, J.; BOURGEOIS-DAIGNEAULT, M. C.; LAPOINTE, R. Targeting the MHC Class II antigen presentation pathway in cancer immunotherapy. **Oncoimmunology**, v. 1, p. 908-916, 2012.

THOMAS, A. A.; ERNSTOFF, M. S.; FADUL, C. E. Immunotherapy for the Treatment of Glioblastoma. **Cancer Journal**, v. 18, n. 1, p. 59-68, 2012.

THORN, C. F. et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenet Genomics**, v. 21, n. 7, p. 440-446, 2011.

TOBIN, N. P. et al. The importance of molecular markers for diagnosis and selection of targeted treatments in patients with cancer. **Journal of Internal Medicine**, v. 278, n. 6, p. 545-570, 2015.

TRABER, M. G., ATKINSON, J. Vitamin E, Antioxidant and nothin more. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 1, p. 4-15, 2016.

TSIGELNY, I. F. et al. Molecular mechanisms of OLIG2 transcription factor in brain cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 33, p. 53074-53101, 2016.

TUCKER, E. W. et al. Microglia activation in a pediatric rabbit model of tuberculous meningitis. **Disease Models and Mechanisms**, v. 9, n. 12, 2016.

VAKIFAHMETOGLU, H.; OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, n. 7, p. 1153-1162, 2008.

VANHECKE, E. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-4/5 Are Expressed in Breast Cancer and Can Be Targeted to Inhibit Tumor Cell Survival. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 7, p. 1741-1752, 2011.

VANLANGENAKKER, N. et al. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. **Current Molecular Medicine**, v. 8, n. 3, p. 2072-2020, 2008.

VERHAAK, R. G. et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 98-110, 2010.

VILCHEZ, V. et al. Targeting Wnt/ β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma treatment. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 2, p. 823-832, 2016.

WANG, L. et al. Gamma-secretase represents a therapeutic target for the treatment of invasive glioma mediated by the p75 neurotrophin receptor. **Plos Biology**, v. 6, n. 11, p. 289, 2008.

WEI, J. H.; SEEMANN, J. Nakiterpiosin Targets Tubulin and Triggers Mitotic Catastrophe in Human Cancer Cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 9, n. 12, 2010.

WEI, J.; GABRUSIEWICZ, K.; HEIMBERGER, A. The controversial role of microglia in malignant gliomas. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, p. 285246, 2013.

WEN, P. Y.; KESARI, S. Malignant Gliomas in Adults. *The New England Journal of Medicine*, v. 359, n. 5, p. 492-507, 2009.

WEN, S.; ZHU, D.; HUANG, P. Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach. **Future Medical Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 53-67, 2013.

WESTON, A.; HARRIS, C. C. Multistage Carcinogenesis. 6th Edição. BC Decker, 2003.

WHO - World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer>>, Acesso em 06 dez. 2016.

WU, D. YOTNDA, P. Production and Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cancers. **Journal Visualized Experiment**, v. 21, n. 57, 2011.

YAN, T. et al. Neuronal markers are expressed in human gliomas and NSE knockdown sensitizes glioblastoma cells to radiotherapy and temozolomide. **BMC Cancer**, v.11, p. 524, 2011 .

YEIVIN, A.; PICARSKY, E.; YANIV, M. Increased DNA damage sensitivity and apoptosis in cells lacking the Snf5/Ini1 subunit of the SWI/SNF chromatin remodeling complex. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 7, p. 2661-2674, 2006.

YONEKAWA, T.; THORBURN, A. Autophagy and Cell Death. **Essays Biochemistry**, v. 55, p. 105-117, 2013.

YU, Z. et al. NVP-BEZ235, a novel dual PI3K-mTOR inhibitor displays anti-glioma activity and reduces chemoresistance to temozolomide in human glioma cells. **Cancer Letters**, v. 367, n. 1, p. 58-68, 2015.

ZEISS, C. J. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 5, p. 481-495, 2003.

ZHANG, F.; XU, C. L.; LIU, C. M. Drug delivery strategies to enhance the permeability of the blood-brain barrier for treatment of glioma. **Journal of Drug Design Development and Therapy**, v. 9, p. 2089-2100, 2015.

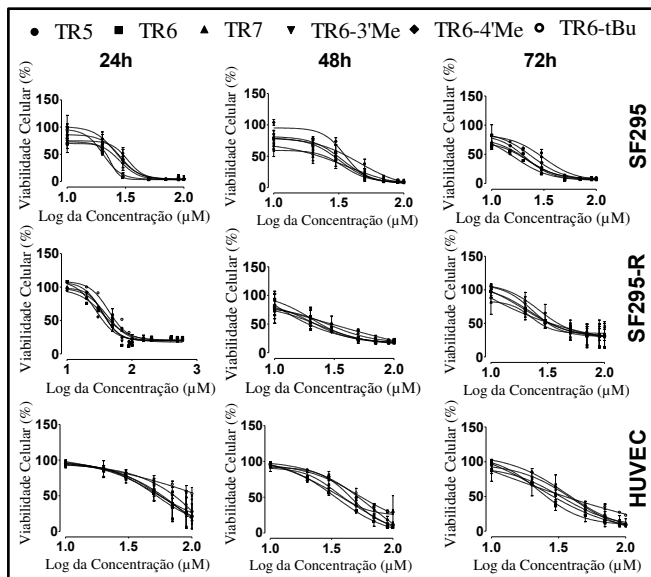
ZHANG, J. et al. Necrosis, and then stress induced necrosis-like cell death, but not apoptosis, should be the preferred cell death mode for chemotherapy: clearance of a few misconceptions. **Oncoscience**, v. 1, n. 6, p. 407-422, 2014.

ZHANG, J.; STEVENS, M. F.; BRADSHAW, T. D. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. **Current Molecular Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 102-114, 2012.

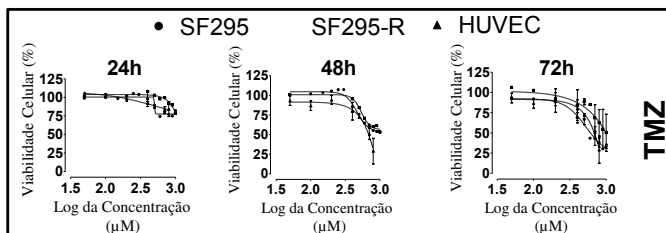
ZITVOGEL, L. et al. Immunological aspects of cancer chemotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 1, p. 59-73, 2008.

ZUNARELLI, E. et al. INI1 immunohistochemical expression in glioblastoma: correlation with MGMT gene promoter methylation status and patient survival. **Pathology**, v. 43, n. 1, p. 17-23, 2011.

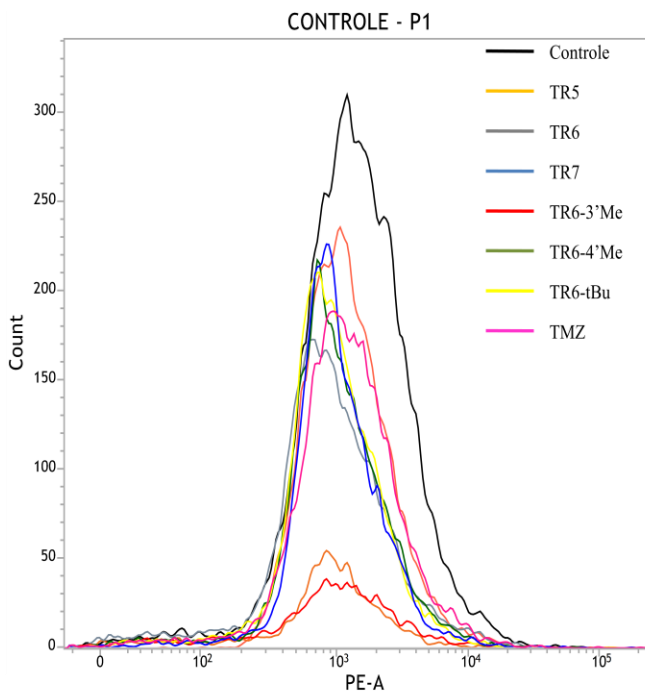
APÊNDICE A - Efeito concentração e tempo-resposta dos derivados de tacrina



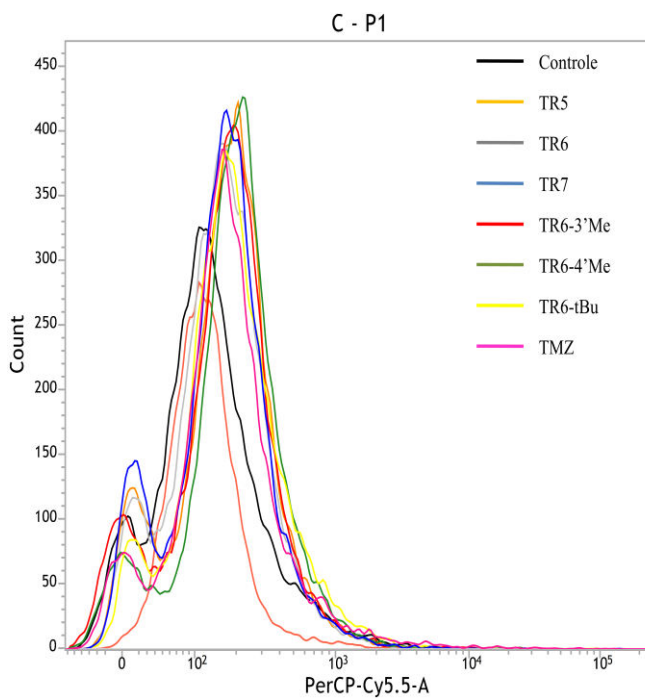
APÊNDICE B - Efeito concentração e tempo-resposta da temozolomida

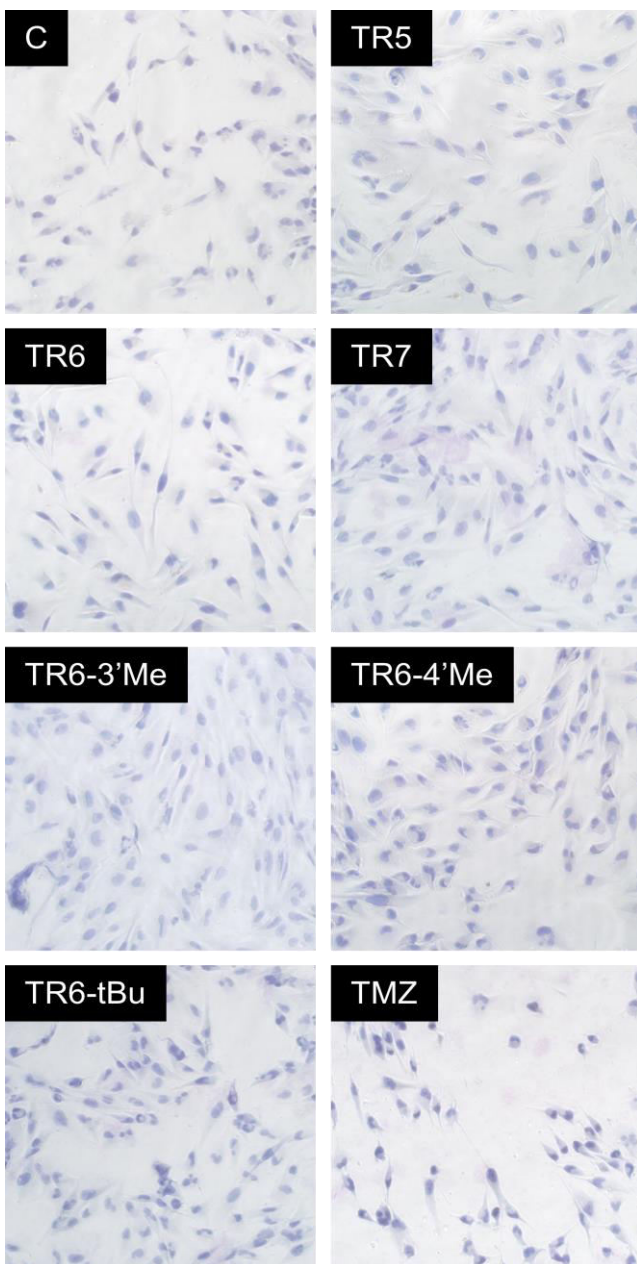


APÊNDICE C - Histograma representativo da marcação da proteína p53 por citometria de fluxo

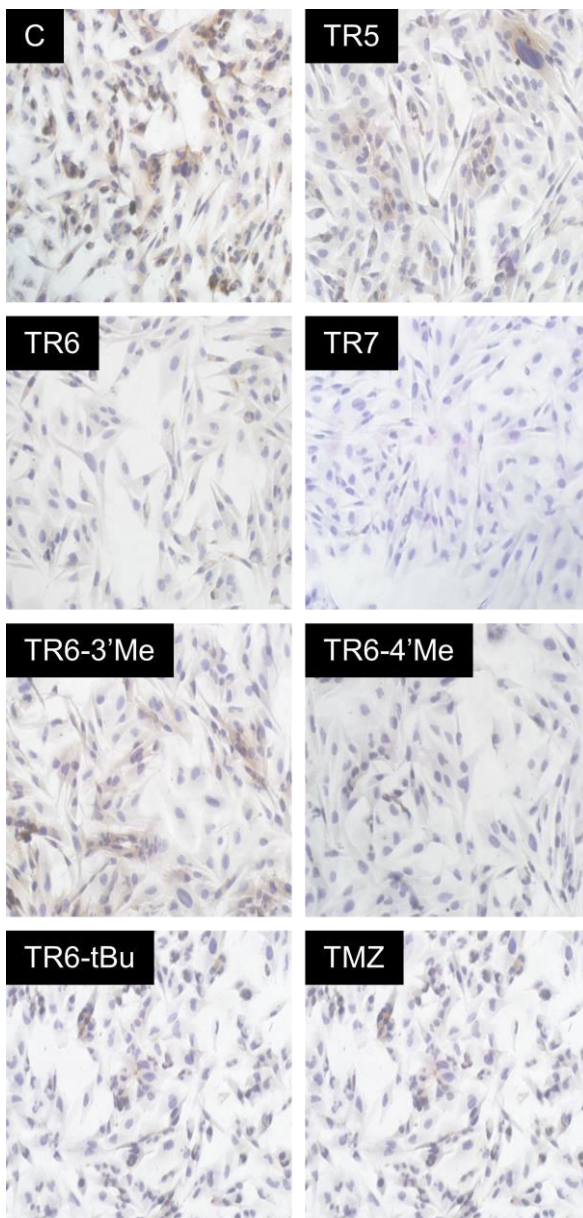


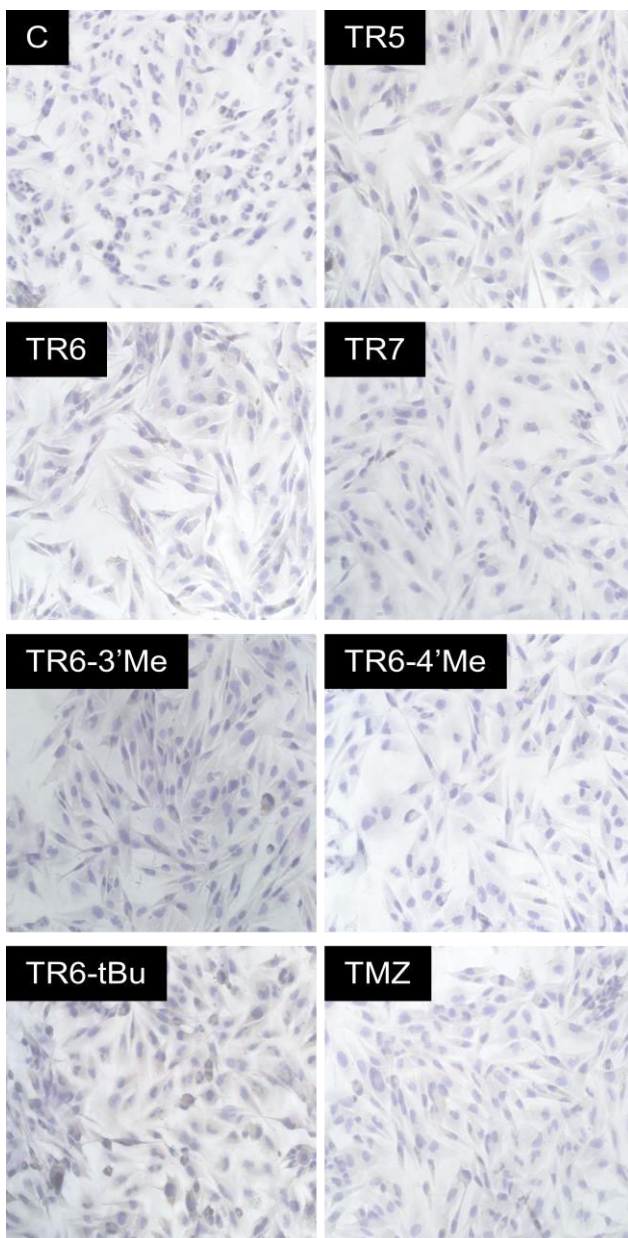
APÊNDICE D - Histograma representativo da marcação da proteína HLA-DR por citometria de fluxo

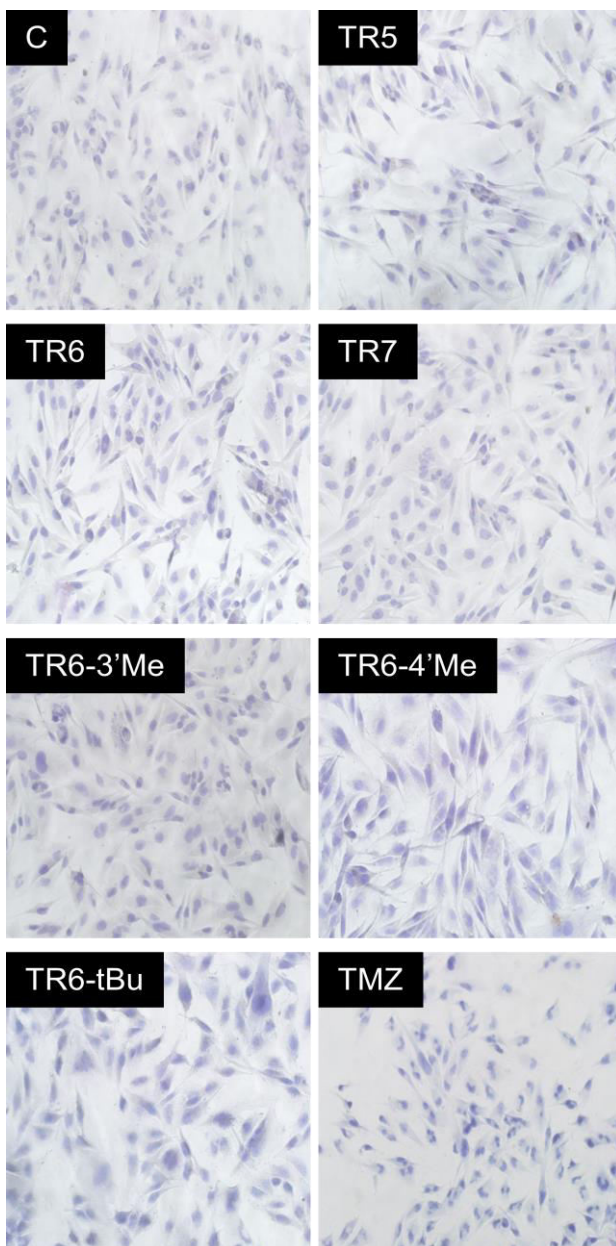


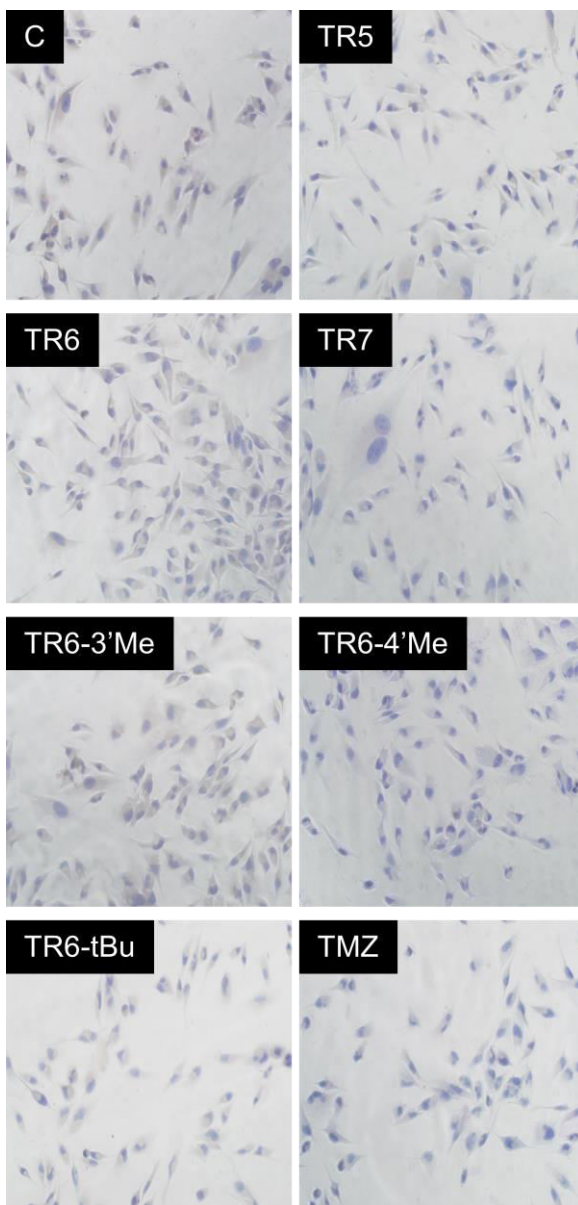
APÊNDICE E - Imagens representativas da marcação de BAF-47

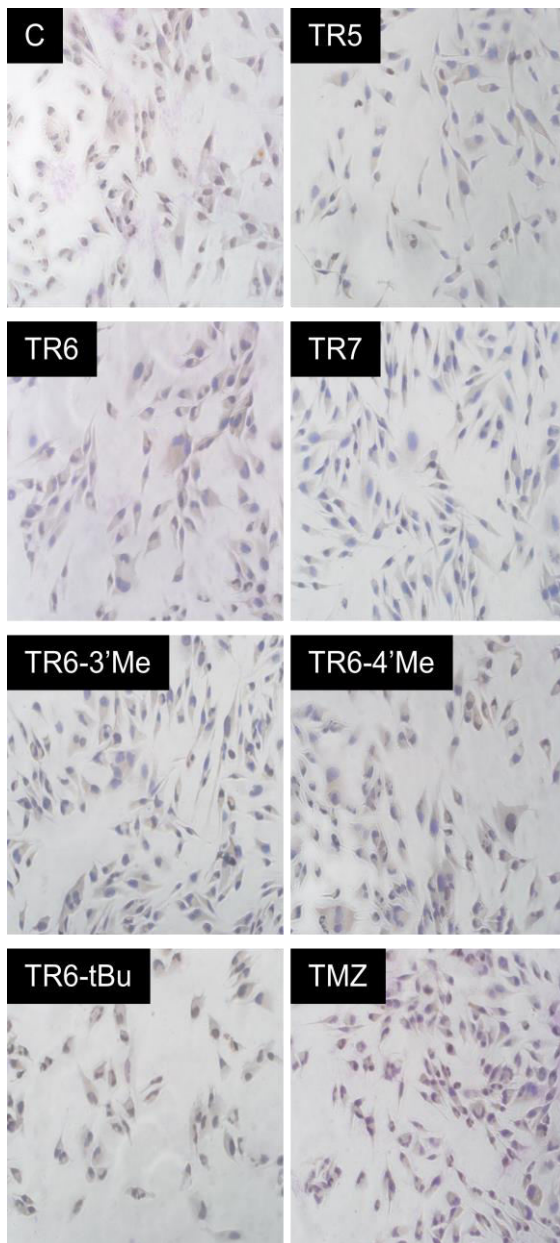
APÊNDICE F - Imagens representativas da marcação de Beta-Catenina

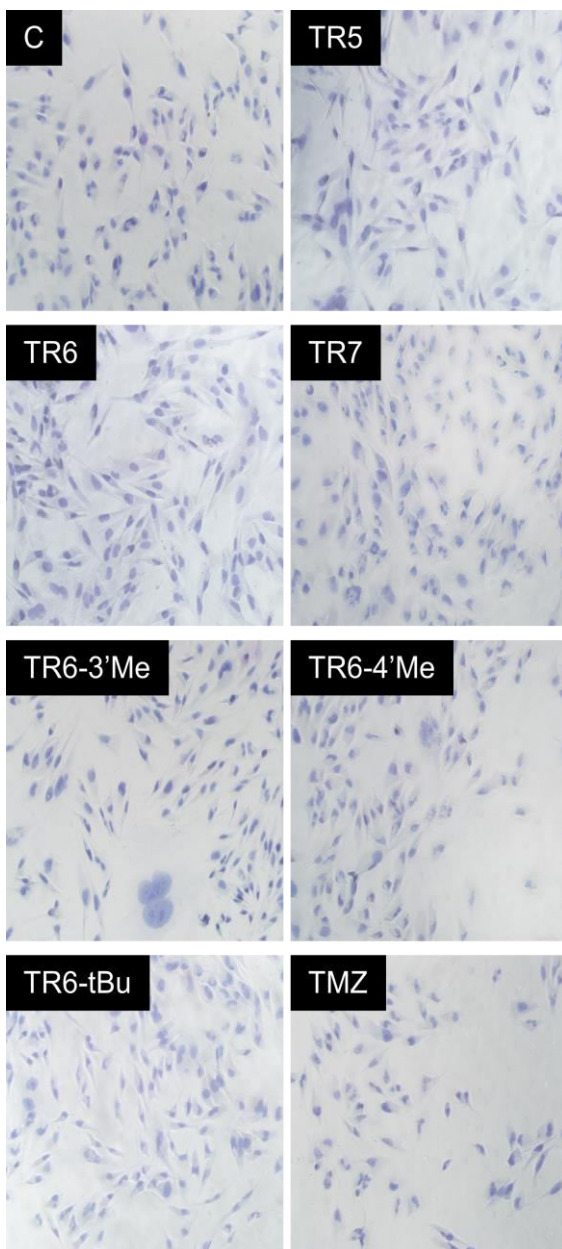


APÊNDICE G- Imagens representativas da marcação de IBA-1

APÊNDICE H- Imagens representativas da marcação de MAP2c

APÊNDICE I- Imagens representativas da marcação de olig-2

APÊNDICE J - Imagens representativas da marcação de p75

APÊNDICE K- Imagens representativas da marcação de IDH1

APÊNDICE L - Capa do artigo a ser submetido à revista Translation Oncology

Tacrine derivatives stimulate human glioma SF295 cell death and alter important proteins related to disease development: an old drugs for new targets.

NUNES, Fernanda¹; BARROS Letícia²; RODE, Michele¹; WINTER, Evelyn¹;
BONACORSO, Hélio Gauze²;CRECZYNSKI-PASA, Tânia Beatriz¹

¹Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brasil

²Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, RS Brasil

ABSTRACT

Among tumors affecting Central Nervous System (CNS), gliomas are the most frequent, accounting for 80% of all cases of malignancy among tumors in the brain and CNS. Glioblastoma is the most common and aggressive glioma, characterized by brain invasion capability. In addition, is very resistant to therapies currently employed, since even under treatment, which mainly consists in surgery and chemotherapy with temozolomide, patients achieve a median survival of one year. In the search for more efficient therapies, new molecules are being drawn. For nervous system cancers, such as glioblastoma, molecules that have the capability to cross blood-brain barrier are better considered. In this sense, tacrine was chosen for this study, since the drug is used in Alzheimer's disease treatment, and modifications have been made in molecule structure. Among successful modifications made to be tested in this work was the inclusion of spiro-heterocyclic rings, resulting in six derivatives. Cytotoxic activity of tacrine derivatives was assayed using glioblastoma cell line (SF295). The objective was to evaluate the cytotoxic effect of derivatives on SF295, as well as the related mechanism of cell death. It was observed that tacrine derivatives seems to be interesting comparing with temozolomide effects, considered here as a positive control. This conclusion was based on the fact that compounds were selective to tumor cells, unlike temozolomide. It was further noted that compounds induced cell death by apoptosis and/or necrosis. Additionally, increased caspases -3, -8, -9 and -12 activities were observed, indicating that predominant type of cell death was apoptosis. It was also observed that some tacrine derivatives increased reactive oxygen species formation, as well as decreased mitochondrial membrane potential. These results suggest that oxidative stress and mitochondrial damage may be involved in cell death mechanism induced by some of the molecules. In addition, tacrine derivatives acted on several glioblastoma-related proteins, considered good targets for glioblastoma treatment, including p53, HLA-DR, BAF-47, beta-catenin, Iba-1, MAP2c, olig-2 and IDH1. Therefore, through these results, it is