

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA**

**Reposicionamento de fármacos: avaliação pré-clínica
do uso da doxazosina no combate à tumores
pediátricos e na neuroproteção em um modelo da
doença de Alzheimer**

BÁRBARA PARANHOS COELHO

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Coelho, Bárbara Paranhos
Reposicionamento de fármacos: avaliação pré-clínica
do uso da doxazosina no combate à tumores pediátricos
e na neuroproteção em um modelo da doença de Alzheimer
/ Bárbara Paranhos Coelho. -- 2019.
109 f.
Orientadora: Fátima Costa Rodrigues Guma.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Reposicionamento de Doxazosina. 2.
Neuroblastoma. 3. Hemangioma. 4. Leucemia
Mielomonocítica. 5. Doença de Alzheimer. I. Guma,
Fátima Costa Rodrigues, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA**

**Reposicionamento de fármacos: avaliação pré-clínica
do uso da doxazosina no combate à tumores
pediátricos e na neuroproteção em um modelo da
doença de Alzheimer**

BÁRBARA PARANHOS COELHO

Orientadora: Dra. Fátima T. C. R. Guma

**Tese a ser apresentada ao curso de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica da Universidade Federal do
Rio Grande do sul, como requisito parcial
à obtenção do grau de Doutor em
Bioquímica.**

Porto Alegre

2019

Perhaps the most important thing I could say is to never be thrown by failure and mistakes. Each and everything that happens, even if it was not what you hoped would happen, is a valuable, life-learning tool. And you will only achieve success if you know how to learn from your failures and mistakes. It's vital.

Christiane Amanpour - Jornalista

Agradecimentos

À Prof. Fátima Guma, pela orientação, à confiança depositada em mim, pelos ensinamentos, os cuidados e preocupação que ela tem por mim e por todos os seus alunos; por ter sido uma orientadora maravilhosa e compreensiva e por ter me acolhido no laboratório.

À Prof. Vera Trindade, à confiança depositada em mim para a colaboração e pelos ensinamentos, principalmente em didática.

À Prof. Christianne Salbego, pela confiança depositada em mim para a colaboração e o apoio com as culturas organotípicas.

À Fernanda Petry, por toda a ajuda que me deu com as células e com os experimentos, pelo “sofrimento” em conjunto para cultivar e diferenciar as SH-SY5Y, pela amizade e por todo o apoio.

À Mariana M. Gaelzer, por todo o apoio, à confiança depositada em mim para compartilhar o seu trabalho, pela dedicação e pela amizade.

À Raphaela Franceschi, por todos esses anos de amizade, apoio, risadas e momentos infantilóides; aprendi e aprendo muito com você, principalmente sobre ter dedicação e ser batalhadora.

À Juliana Hoppe pela grande ajuda com as culturas organotípicas.

A todos os colegas do Lab. 21, um dos melhores lugares para se trabalhar. Tive muita sorte de trabalhar ao lado de vocês; obrigada a todos pelas conversas, por ouvir minhas lamentações, por toda a ajuda e pela amizade; um agradecimento especial ao Leo, à Silvia, à Fran (com quem tive a sorte de conviver desde a minha Iniciação Científica); à Mari Ilha pelos ensinamentos de técnicas; ao Lucas por sempre se disponibilizar em ajudar; ao Cleverson pelas conversas sobre videogames; um agradecimento especial à Débora Bordignon (minha primeira IC) e à Patrícia Lavandoski (minha segunda IC), pela dedicação ao trabalho e paciência por serem minhas “cobaias” de orientação. À Nicolly Paz por toda a ajuda com as células EOMA.

Aos Coordenadores, professores e funcionários do PPG Bioquímica, por todo o trabalho e dedicação ao programa de pós-graduação.

À UFRGS e à Capes pela oportunidade e pela bolsa concedida durante o doutorado.

A todos os meus professores da UFRGS, da graduação, do mestrado e doutorado, por todos os ensinamentos, especialmente para o desenvolvimento de senso crítico.

Um último agradecimento mais do que especial à minha família; aos meus pais e à minha irmã que sempre me apoiaram, me ajudaram, que são um exemplo para mim e são o meu porto seguro. Eu não teria chegado até aqui sem o seu apoio. Amo muito vocês.

Sumário

Apresentação	1
Lista de Abreviações	2
Lista de figuras e tabelas	4
Resumo.....	5
Abstract	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1. Reposicionamento de fármacos	8
1.2. Doxazosina.....	11
1.3. Relação entre Câncer e Alzheimer	12
1.3.1. Vias de apoptose estão ativas na DA e inibidas no câncer	12
1.3.2. Neurotrofinas e fatores de crescimento são neuroprotetores e também estão envolvidos na progressão do crescimento tumoral.....	13
1.3.3. Via da PI3K/Akt/GSK-3β.....	15
1.4. Tumores infantis.....	17
1.4.1. Neuroblastoma.....	17
1.4.1.1. Epidemiologia.....	17
1.4.1.2. Prognóstico e estratificação de risco	18
1.4.1.3. Tratamento.....	21
1.4.1.4. Linhagem celular de NB humano SH-SY5Y	24
1.4.2. Tumores vasculares.....	25
1.4.2.1. Hemangioendotelioma epitelial	26
1.4.2.2. Hemangioma infantil.....	28
1.4.2.3. Linhagem celular EOMA.....	32
1.5. Doença de Alzheimer	34
1.5.1. Patologia da Doença de Alzheimer	35
1.5.2. Tratamento	37
2. OBJETIVOS.....	39

3. CAPÍTULO I	41
4. CAPÍTULO II	54
5. CAPÍTULO III	69
6. DISCUSSÃO	72
7. CONCLUSÃO	79
8. PERSPECTIVAS	81
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

Apresentação

Esta tese está organizada em seções dispostas da seguinte maneira: *Introdução*, *Objetivos*, *Capítulos* (I, II, III), *Discussão*, *Conclusões*, *Perspectivas* e *Referências Bibliográficas*.

A seção *Introdução* apresenta o embasamento teórico que levou à formulação das propostas da Tese, as quais estão descritas na seção *Objetivos*.

A seção *Capítulos* contém os artigos científicos publicados ou em fase de preparação, e resultados preliminares. Esta seção também apresenta os materiais e métodos e as referências bibliográficas específicas de cada artigo e está dividida em *Capítulos I, II e III*.

A seção *Discussão* contém uma interpretação geral dos resultados obtidos nos diferentes artigos científicos e dos resultados preliminares. A seção *Conclusões* aborda as conclusões gerais obtidas na Tese. A seção *Perspectivas* aborda as possibilidades de desenvolvimento de projetos a partir dos resultados obtidos, dando continuidade a essa linha de pesquisa.

A seção *Referências Bibliográficas* lista as referências citadas na *Introdução* e *Discussão* da Tese.

Lista de Abreviações

- A β** – peptídeo β -amiloide
- AChE** – Acetil-colinesterase
- Akt** – Proteína cinase B
- ALK** – Cinase de linfoma anaplásico
- ApoE** – Apolipoproteína E
- APP** – Proteína precursora amiloide
- ASCR** – Resgate com células-tronco autólogas
- BACE1** – β -secretase
- BDNF** – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
- CCL** – Comprometimento cognitivo leve
- DA** – Doença de Alzheimer
- DFMO** – Difluorometilornitina
- EGF** – Fator de Crescimento Epidérmico
- EGFR** – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
- EHE** – Hemangioendotelioma epitelióide
- FOXO1** – Fator de Transcrição “forkhead homeobox O1”
- FOXO3a** – Fator de transcrição “forkhead box O3a”
- GLUT-1** – Transportador de glicose-1
- GM-CSF** – Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
- GSK3 β** – Glicogênio Sintase Cinase-3 beta
- HI** – Hemangioma infantil
- HIF-1 α** – Fator induzido por Hipóxia 1 alfa
- HPB** – Hiperplasia prostática benigna
- IDRF** – Fatores de Risco Definidos por Imagem
- IGF-2** – Fator de crescimento semelhante à insulina 2
- INRG** – Sistema Internacional do Estadiamento do Neuroblastoma para Grupos de Risco
- INSS** – Sistema de Estadiamento Internacional para Neuroblastoma
- iPSCs** – Células-tronco pluripotentes induzidas
- LMM** – Leucemia mielomonocítica
- MAPK** – Proteína Cinase Ativada por Mitógenos

MDM2 – Double Minute murino 2
mTOR – Alvo mamífero da rapamicina
NB – Neuroblastoma
NF-κB – Fator Nuclear kappa B
NFT – Emaranhados neurofibrilares
P&D – Pesquisa e Desenvolvimento
PK1 – Proteína cinase 1 dependente de fosfoinositol-3
PI3K – Fosfoinosítídeo 3-cinase
PS – Presinilina
ERK – Ras-Cinase Regulada por Sinal Extracelular
RCT – Estudo randomizado controlado
RTK – Receptores de Tirosina Cinases
TGF-α – Fator de Crescimento Transformador alfa
TKI – Inibidoras de tirosina cinase
VEGF-A – Fator de crescimento endotelial vascular A
VEGFR-2 – Receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular

Lista de figuras e tabelas

Figura 1. Comparação entre a descoberta e desenvolvimento tradicional de novo de fármacos e o reposicionamento de fármacos.

Figura 2. Lista de bancos de dados utilizados para o reposicionamento de fármacos.

Figura 3. Estrutura química da doxazosina [4-4-amino-6,7-dimetoxiquinazolina-2-il)-piperazina]1-il-(2,3-diidro-1,4-benzodioxina-3-il).

Figura 4. Sobrevida livre de eventos para o neuroblastoma baseada na estratificação de risco do Children's Oncology Group (COG).

Figura 5. Visão geral dos principais eventos patológicos que levam à Doença de Alzheimer de acordo com a hipótese amiloide.

Figura 6. Análise da viabilidade celular de células WEHI-3B após tratamento com doxazosina.

Tabela 1. Estratificação de risco Sistema Internacional do Estadiamento do Neuroblastoma para Grupos de Risco (INRG).

Resumo

O reposicionamento de fármacos é o estudo da utilização de fármacos para outra indicação do que a originalmente aprovada. Este processo apresenta o potencial de identificação rápida de terapia eficaz contra doenças como câncer e Alzheimer (DA). Vários estudos demonstraram o efeito antitumoral da doxazosina, um bloqueador α 1-adrenérgico, e os bloqueadores β 1-adrenérgicos têm sido associados à neuroproteção em doenças neurodegenerativas. O câncer e a DA têm uma relação inversa em muitos aspectos, com vários fatores que contribuem para a inibição da apoptose e a proliferação celular sendo aumentados nos cânceres, mas diminuídos na DA. O neuroblastoma (NB) é um tumor pediátrico derivado de células da crista neural embrionária, com uma taxa de cura em torno de 40%, apesar do tratamento agressivo. Os hemangiomas infantis (HIs) são os tumores vasculares mais comuns em bebês. A morbidade pode incluir desfiguração e cicatrizes e, em casos mais graves, perda da visão, comprometimento das vias aéreas, insuficiência cardíaca congestiva, e morte. O NB, o HI e a DA apresentam alterações na via de sinalização de EGFR/Akt/GSK-3 β e a descoberta de novos fármacos para o tratamento dessas doenças tem se apresentado como um grande desafio. Assim, no presente estudo investigamos o potencial terapêutico da doxazosina como agente antitumoral contra NB e HI, e como agente neuroprotetor contra a DA. Primeiro, analisamos os efeitos do fármaco em células NB humano SH-SY5Y diferenciadas e indiferenciadas com ácido retinóico e em um modelo *in vitro* de DA, utilizando culturas organotípicas de hipocampo expostas ao peptídeo β -amiloide (A β). A doxazosina demonstrou efeito antitumoral em células indiferenciadas de NB por meio da indução de apoptose, necrose, parada no ciclo celular e diminuição dos níveis de p-EGFR_{Tyr1048}. Em células diferenciadas, a doxazosina foi menos citotóxica e aumentou os níveis de p-EGFR_{Tyr1048}, p-Akt_{Ser473} e p-GSK-3 β _{Ser9}. Além disso, o fármaco foi capaz de proteger as fatias do hipocampo da toxicidade do A β , através da prevenção da ativação da GSK-3 β e da hiperfosforilação da Tau. Em relação ao HI, utilizamos a linhagem celular murina EOMA como modelo. O fármaco foi citotóxico para as células EOMA, mas baixas concentrações de doxazosina aumentaram a migração dessas células. O processo de metástase tumoral envolve diversas fases, entre elas a migração celular e a invasão. Para avaliar se este aumento de migração celular tem relevância biológica para a patologia do HI, é necessário avaliar também o potencial de invasão dessas células. Neste estudo, também padronizamos culturas 3D de esferoides tumorais de células EOMA, o que ainda não foi descrito na literatura. Os esferoides tumorais se assemelham mais ao que ocorre com o tumor *in vivo* em comparação com as culturas 2D. Observamos que a doxazosina foi capaz de reduzir o tamanho do esferoide tumoral. Ainda, apresentamos nesse estudo resultados preliminares do potencial antitumoral da doxazosina em células WEHI-3B, que são representativas de leucemia mielomonocítica (LMM). A doxazosina foi capaz de induzir a morte das células WEHI-3B após 48h de tratamento. Desse modo, na presente tese demonstramos que a doxazosina apresenta potencial terapêutico não só para tumores como NB, HI e LMM, como também é neuroprotetora em um modelo *in vitro* da DA. Os nossos estudos estão baseados no reposicionamento da doxazosina para doenças de difícil tratamento, como NB de alto risco e DA, assim como uma doença negligenciada na literatura, como o HI.

Palabras-chave: Doxazosina; neuroblastoma; hemangioma; leucemia mielomonocítica; doença de Alzheimer; antitumoral; neuroproteção

Abstract

Drug repurposing is the study of the identification of novel indications for existing compounds. This process holds the potential of rapid identification of effective therapeutics against diseases such as cancer and Alzheimer's (AD). Several studies have demonstrated the antitumor effect of doxazosin, an alpha-adrenergic blocker, and β 1-adrenergic blockers have been associated with neuroprotection in neurodegenerative diseases. Cancer and AD have an inverse relationship in many respects, with several factors contributing to inhibition of apoptosis and cell proliferation being increased in cancers but decreased in AD. Neuroblastoma (NB) is a pediatric tumor derived from embryonic neural crest cells, with a cure rate of about 40%, despite aggressive treatment. Infantile hemangiomas (IHs) are the most common vascular tumors in infants. Morbidity may include disfigurement and scarring and, in more severe cases, loss of vision, impairment of the airways, congestive heart failure and death. NB, IH and DA present alterations in the EGFR/Akt/GSK-3 β signaling pathway and the discovery of new drugs for the treatment of these diseases has presented itself as a major challenge. Thus, in the present study we investigated the therapeutic potential of doxazosin as an antitumor agent against NB and IH, and as a neuroprotective agent against AD. First, we examined the effects of the drug on undifferentiated and retinoic-acid differentiated human SH-SY5Y NB cells, and on an *in vitro* model of organotypic hippocampal cultures exposed to β -amyloid peptide (A β). Doxazosin demonstrated an antitumor effect in undifferentiated NB cells through induction of apoptosis, necrosis, cell cycle arrest and decreased levels of p-EGFR_{Tyr1048}. On differentiated cells, doxazosin was less cytotoxic and increased levels of p-EGFR_{Tyr1048}, p-Akt_{Ser473} and p-GSK-3 β _{Ser9}. In addition, the drug was able to protect the hippocampal slices from A β toxicity by preventing the activation of GSK-3 α and of Tau hyperphosphorylation. Regarding IH, we used the EOMA murine cell line as a model. The drug was cytotoxic to EOMA cells, but low concentrations of doxazosin increased the migration of these cells. The process of tumor metastasis involves several phases, with cell migration and invasion among them. To assess whether this increase in cell migration has biological relevance for IH pathology, it is also necessary to evaluate the potential of these cells for invasion. In this study, we also standardized 3D cultures of tumor spheroids from EOMA cells, which has not yet been described in the literature. Tumor spheroids resemble more closely the tumor *in vivo* compared to 2D cultures. We observed that doxazosin was able to reduce the size of the tumor spheroid. Furthermore, we present preliminary results of the antitumor potential of doxazosin on WEHI-3B cells, which are representative of myelomonocytic leukemia (MML). Doxazosin was able to induce death of WEHI-3B cells after 48 hours of treatment. Thus, in the present thesis we demonstrated that doxazosin presents therapeutic potential not only for tumors such as NB, IH and MML, but it is also neuroprotective on an *in vitro* model of AD. Our studies are based on the repurposing of doxazosin for difficult-to-treat diseases such as high-risk NB and AD, as well as a neglected disease in the literature, such as IH.

Keywords: Doxazosin; Neuroblastoma; Hemangioma; Myelomonocytic Leukemia; Alzheimer's Disease; Antitumoral; Neuroprotection

1. INTRODUÇÃO

1.1. Reposicionamento de fármacos

O processo tradicional de desenvolvimento de fármacos consome muito tempo e recursos antes que uma molécula possa ser comercializada no mercado. Apesar de grandes investimentos, as chances de uma molécula nova entrar no mercado são mínimas. A média de tempo entre os experimentos pré-clínicos iniciais até a aprovação regulatória completa é de 11,4 a 13,5 anos (Paul *et al.*, 2010). Em termos de custo, o desenvolvimento de fármacos *de novo* varia de 161 a 1800 milhões de dólares por fármaco (Adams e Brantner, 2006).

Nas últimas décadas, diversos artigos tem demonstrado a diminuição da produtividade e o aumento dos custos com pesquisa e desenvolvimento (P&D) na indústria farmacêutica (Kuntz, 1992; Anderson, 2003; Kola e Landis, 2004; Mullin, 2014). Além disso, de 1991 a 2000, altas taxas de falhas ocorreram durante ensaios clínicos de Fase II, na qual são avaliados parâmetros de eficácia e segurança para candidatos a fármacos (Kola e Landis, 2004). Devido a esses desafios, o reposicionamento surgiu como uma estratégia em potencial para superar obstáculos durante a P&D de fármacos (Cavalla, 2005).

O reposicionamento (do inglês “repurposing” ou “repositioning”) é o estudo da utilização de fármacos para outra indicação do que a originalmente aprovada. O uso do reposicionamento pode evitar diversos problemas que acabam com o processo de desenvolvimento de novos fármacos. Alguns desses problemas incluem: seletividade do alvo; metabolismo do fármaco e farmacocinética; toxicologia; e eventos adversos. Estes aspectos normalmente tem que ser abordados através de testes tanto em espécies animais quanto em humanos. Descobertas negativas em qualquer um desses pontos do processo são as principais causas de falha nos estágios iniciais do desenvolvimento de novos fármacos (Waring *et al.*, 2015). Esses pontos normalmente não são problemas reais para o reposicionamento de um fármaco (Fig. 1); por exemplo, não precisa haver seletividade se o fármaco é eficaz e seguro (Bastos e Coelho, 2014). No entanto, outros problemas em potencial surgem do reposicionamento, como a eficácia na nova indicação (normalmente tanto em animais quanto humanos), problemas com patentes e liberdade de uso.

O reposicionamento de fármacos começou ao acaso. Mas, atualmente, com o aumento do interesse pelo assunto e pela utilização de diversas ferramentas de bioinformática e quimioinformática, o reposicionamento tem sido desenvolvido como uma estratégia inovadora e orientada por dados (Parvathaneni *et al.*, 2019).

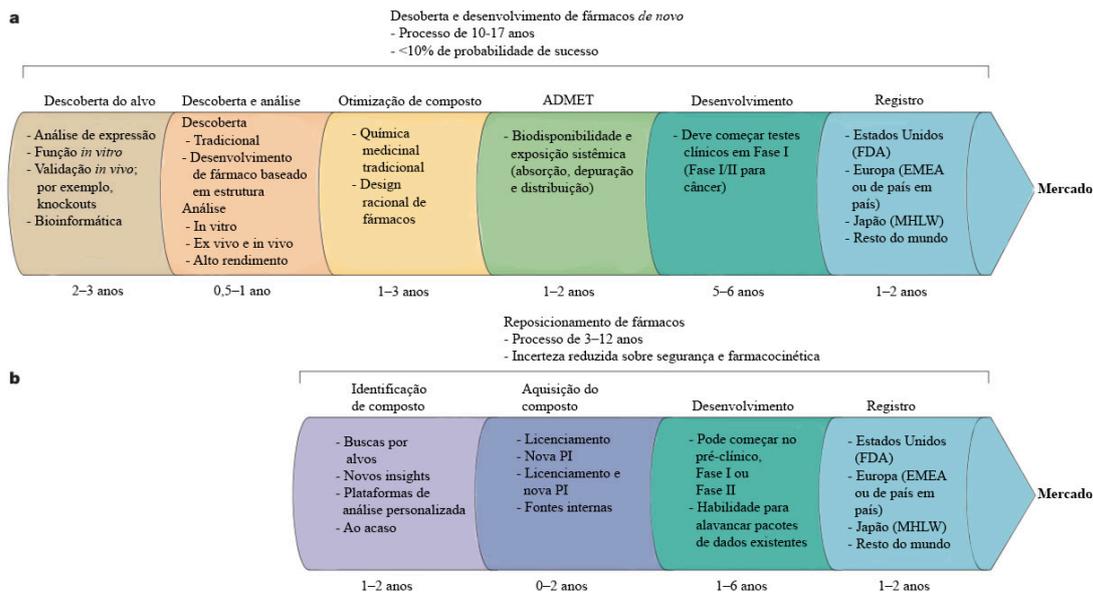


Figura 1. Comparação entre a descoberta e desenvolvimento tradicional de novo de fármacos e o reposicionamento de fármacos. **(a)** Sabe-se que a descoberta e desenvolvimento tradicional de novo de fármacos é um processo de 10-17 anos desde a ideia até a chegada ao mercado. A probabilidade de sucesso é menor que 10%. **(b)** O reposicionamento de fármacos fornece a possibilidade de reduzir risco e tempo já que diversas fases comuns do processo de desenvolvimento de novo podem ser dispensadas porque os candidatos a reposicionamento normalmente já passaram por diversas fases de desenvolvimento para a sua indicação original. ADMET, absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade; EMA, European Medicines Agency; FDA, Food and Drug Administration; PI, propriedade intelectual; MHLW, Ministry of Health, Labour and Welfare. Adaptado de Ashburn e Thor, 2004.

O reposicionamento é realizado em 2 etapas. A primeira envolve a análise *in silico* de fármacos aprovados ou presentes no mercado contra alvos terapêuticos (por meio de pesquisa em repositórios de dados, como mostrado na figura 2), seguida pela investigação em vias patofisiológicas específicas da doença de interesse com o uso de metodologias *in vitro* e *in vivo* (NIH, 2018a). A segunda etapa é a entrada do fármaco em ensaios clínicos para a indicação em estudo (NIH, 2018b).

Fármacos podem ser reposicionados em qualquer estágio a partir de sua descoberta. A seguir estão alguns exemplos de como fármacos podem ser reposicionados:

- Um fármaco aprovado que apresente um efeito adverso específico o qual, por acaso, serve como potencial terapêutico para outra indicação. Por exemplo, o sildenafil, que foi originalmente desenvolvido para tratamento de hipertensão e angina, atualmente é comercializado como Viagra® para disfunção erétil (Boolell *et al.*, 1996);
- Análise de fármacos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) pelo seu uso diferente do indicado. Descobriu-se que o itraconazole, aprovado como um agente anti-fúngico, apresenta uma propriedade

adicional como anti-angiogênico. A exploração dessa propriedade direcionou a liberação do composto através de ensaios de Fase II para investigação da sua eficácia como um agente terapêutico de segunda linha contra câncer de pulmão (NCT02357836) e câncer de próstata (NCT00887458);

- Fármacos que falharam em ensaios clínicos para uma indicação, mas apresentaram potencial em outra área terapêutica. Por exemplo, o saracatinibe, que falhou como agente anticâncer, mas exibiu reversão substancial de sintomas da Doença de Alzheimer (DA) em um modelo murino (Nygaard *et al.*, 2015). Atualmente, esse fármaco passou em ensaios de Fase I (NCT01864655) contra a DA.

Neste contexto, a presente tese avalia o potencial de reposicionamento da doxazosina contra tumores infantis e DA.

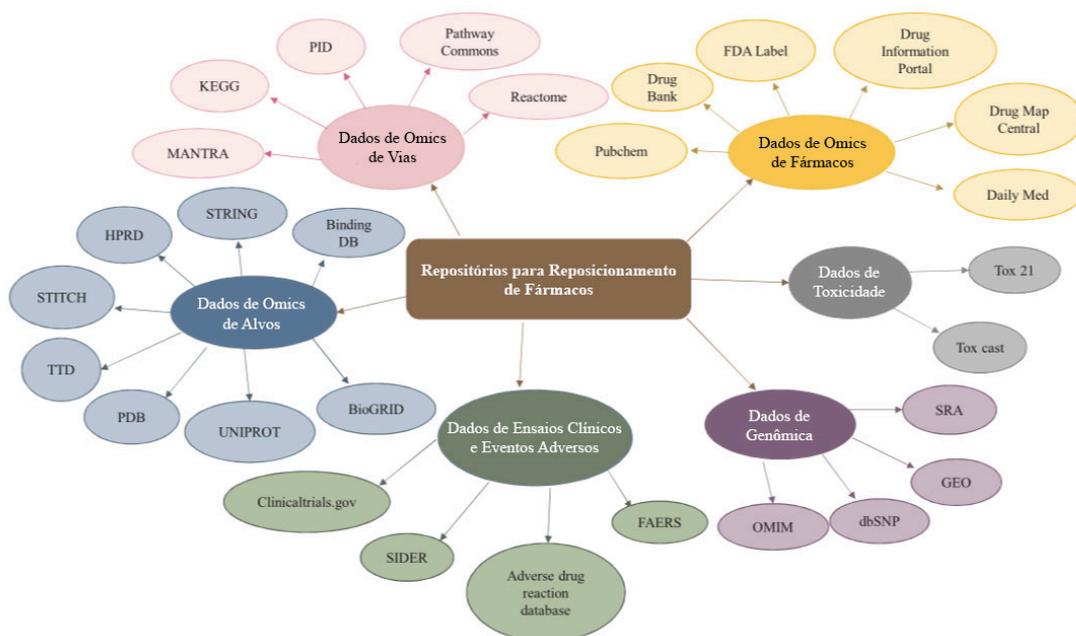


Figura 2. Lista de bancos de dados utilizados para o reposicionamento de fármacos. SRA: Sequence Read Archive, GEO: Gene Expression Omnibus, dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism database, OMIM: One Mendelian Inheritance in Man, FAERS: FDA Adverse Event Reporting System, SIDER: Side Effect Resource, BioGRID: Biological General Repository Interaction Dataset, UNIPROT: Universal Protein Knowledgebase, PDB: Protein Data Bank, STRING: Search Tool for Retrieval of Interacting Genes/Proteins, STITCH: Search Tool for Interaction of Chemicals, TTD: Therapeutic Target Database, MANTRA: Mode of Action by NeTwork Analysis, KEGG: Kyoto Encyclopedia for Genes and Genomes, PID: Pathway Interaction Database. Adaptado de Hema Sree *et al.*, 2019.

1.2. Doxazosina

A doxazosina [4-(4-amino-6,7-dimetoxiquinazolina-2-il)-piperazina] 1-il-(2,3-diidro-1,4-benzodioxina-3-il) metanona (Figura 3), é um derivado quinazolínico que compreende a classe terapêutica dos alfa-bloqueadores adrenérgicos. São fármacos que bloqueiam seletivamente os receptores alfa-1 adrenérgicos.

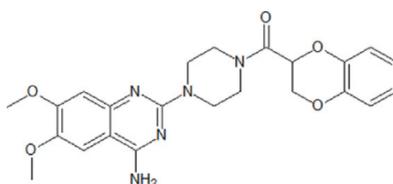


Figura 3: Estrutura química da doxazosina.

Ela é utilizada na clínica como mesilato de doxazosina (Carduran®) para o tratamento de hipertensão e hiperplasia prostática benigna (HPB). No início da década de 1990, iniciaram-se estudos clínicos para o tratamento de HPB com a doxazosina. Na época se acreditava que os efeitos do fármaco sobre os sintomas de HPB eram provenientes apenas de seu efeito de bloqueio dos receptores alfa-1 adrenérgicos do músculo liso da próstata, o que resultava em relaxamento do tônus muscular prostático e diminuição da pressão intrauretral (Janknegt e Chapple, 1993). Em 1998, Kyprianou et al. demonstraram que o mecanismo molecular de alívio dos sintomas da HPB pela doxazosina estava relacionado à capacidade do fármaco em induzir apoptose nas células musculares lisas da próstata.

Em 2000, Cal *et al.* levantaram a hipótese de que a doxazosina poderia ser um novo agente citotóxico para o câncer de próstata. Eles demonstraram que o fármaco apresentava efeito citotóxico nas linhagens celulares de câncer de próstata humano DU145 e PC-3. Além disso, Benning e Kyprianou (2002) demonstraram que o efeito da doxazosina na indução de apoptose em células de câncer de próstata era independente da ação de bloqueio de receptores alfa1, e estava relacionado ao anel quinazolínico presente na molécula. A partir deste momento, diversos estudos começaram a ser desenvolvidos em relação aos efeitos da doxazosina sobre diversos tipos de câncer e em relação aos mecanismos moleculares de ação desse fármaco. Nosso grupo de pesquisa recentemente demonstrou que a doxazosina induz apoptose e parada no ciclo celular em células de

glioma de rato e humano e diminui o tamanho do tumor em cérebros de ratos através de diminuição da ativação da via do EGFR (Gaelzer, 2017). Além disso, a doxazosina apresenta efeito antitumoral em câncer de mama, bexiga e adenoma hipofisário.

Os derivados de quinazolininas têm efeitos pleiotrópicos com a capacidade de afetar as funções e atividades dos receptores alfa1-adrenérgicos, fosfodiesterases, tirosina cinases e, a descoberta mais recente, adenosina cinases (Chilin *et al.*, 2010). Nos últimos anos, estes compostos tiveram grande progresso no combate de doenças proliferativas como câncer, baseados principalmente na atividade inibidora de RTKs.

Os RTKs desempenham um papel vital nos processos de controle da proliferação celular, diferenciação e evasão da apoptose. Até esta data, três ligantes reversíveis (anilinoquinazolininas) do EGFR (Gefitinib, Erlotinib e Lapatinib) foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) nos EUA para uso clínico no tratamento do câncer (Goldstein *et al.*, 2008; Chilin *et al.*, 2010).

Além de seus efeitos antitumorais, os derivados de quinazolininas tem efeitos biológicos sobre o Sistema Nervoso Central como antidepressivos. A doxazosina atualmente está sendo testada em ensaios clínicos como tratamento para o Transtorno do Estresse Pós-Traumático e alcoolismo (Kenna *et al.*, 2016; Rodgman *et al.*, 2016). Acredita-se que o mecanismo molecular do fármaco nesses distúrbios esteja relacionado ao seu efeito de bloqueio de receptores alfa1 (Petraakis e Simpson, 2017), mas a possível ação do anel quinazoliníco, presente na molécula da doxazosina, não deve ser descartado.

1.3. Relação entre Câncer e a Doença de Alzheimer

Existe uma relação de aumento exponencial em relação à idade e a ocorrência de DA e câncer. Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma associação recíproca entre a DA e câncer: idosos com DA apresentam um risco menor de câncer e vice-versa (Realmutto *et al.*, 2012; Musicco *et al.*, 2013). Já é conhecido que pacientes com a doença de Huntington apresentam menor incidência de câncer, e o mesmo aparenta ser verdade para a DA (Sørensen *et al.*, 1999).

1.3.1. Vias de apoptose estão ativas na DA e inibidas no câncer

A proteína p53 é um supressor tumoral ativado por vários tipos de estresses celulares e desempenha funções como a regulação do ciclo celular, respostas à danos no

DNA, morte celular, diferenciação celular e neovascularização. A p53 induz parada no ciclo celular, podendo recrutar as proteínas de reparo do DNA ou encaminhar a célula à morte após um dano muito extenso ao DNA. Esse mecanismo é responsável pelo *turnover* das células presentes nos tecidos e órgãos do nosso corpo, ao passo que animais que perdem p53 desenvolvem tumores ao longo da vida (Brenner e Mak, 2009; Guicciardi e Gores, 2009; Krakstad e Chekenya, 2010).

A inativação do gene TP53 confere uma predisposição a tumores, enquanto que a DA leva os neurônios à apoptose via p53. A p53 pode iniciar a apoptose se o dano ao DNA for irreparável. A ativação da p53 leva à parada do ciclo celular via p21. A deleção de p53/p21 em modelos murinos melhora os fenótipos de envelhecimento e aumenta a expectativa de vida, mas aumenta o risco de câncer (Dulić *et al.*, 2000).

O peptídeo β -amiloide (A β) se liga no promotor da p53 aumentando a sua transcrição, enquanto que a fosforilação da tau é estimulada indiretamente por p53 (Proctor e Gray, 2010). A deleção completa da p53 ocorre na Síndrome de Li-Fraumeni e o risco de câncer nesses pacientes aumenta para 100% na idade de 70 anos (Malkin, 2009). Isso demonstra uma relação inversa entre a DA e o câncer, visto que a ativação da P53 está presente na DA e a inibição ou deleção está envolvida com tumores.

1.3.2. Neurotrofinas e fatores de crescimento são neuroprotetores e também estão envolvidos na progressão do crescimento tumoral

O Fator de Crescimento do Nervo (Nerve Growth Factor, NGF) está envolvido na regulação do crescimento e progressão tumoral incluindo carcinomas pulmonar, prostático, mamário e pancreático. Interações entre fatores neurotróficos e o glutamato também estão envolvidas na regulação da neuroplasticidade. Por exemplo, a produção do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) é estimulada por glutamato, e o BDNF modifica a sensibilidade ao glutamato nos neurônios, a plasticidade neuronal e a homeostasia do Ca²⁺. Fatores neurotróficos modificam a expressão de subunidades de receptores de glutamato e de proteínas reguladoras de Ca²⁺, e induzem a produção de membros da família de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, de enzimas antioxidantes e proteínas reguladoras de energia. Além disso, o excesso da ativação de receptores de glutamato pelo estresse oxidativo e metabólico pode contribuir para a neurodegeneração e disfunção na DA (Mattson, 2008).

Fatores ambientais como o exercício físico, além da sinalização de fatores neurotróficos, antidepressivos, e restrição calórica tem o potencial de otimizar a

sinalização glutamatérgica e proteger contra desordens neurológicas. O BDNF está envolvido com o crescimento e a sobrevivência neuronal. O BDNF também tem um papel ativo em áreas vitais para a memória e aprendizado como o hipocampo e o córtex cerebral. Ele também é importante para memória de longo prazo e neurogênese (Huang e Reichardt, 2001; Mattson, 2008).

O conhecimento atual sugere que o EGF e as neurotrofinas – NFG, BDNF, neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina 4/5 (NT-4/5) –, assim como os seus receptores tirosina cinase – EGFR e membros da família trk (trk A, trk B e trk C) – apresentam uma função significativa na patogênese do câncer de próstata (Montano e Djamgoz, 2004).

A expressão de BDNF também ocorre em cânceres como o de cólon, reduzindo a apoptose (Yang *et al.*, 2013). Na DA, existe uma redução de BDNF e outras neurotrofinas (Lee *et al.*, 2005).

Alterações genéticas de Receptores de Tirosina Cinases (RTKs), incluindo as do EGFR, têm um papel importante na resistência ao tratamento, no desenvolvimento e na progressão de diversos tumores sólidos. A estrutura de cada um dos membros da família do EGFR compreende: um ectodomínio para interação com o ligante, com 2 regiões ricas em cisteína; uma única região transmembrana; e um domínio citoplasmático com ação enzimática tirosina cinase. Os ligantes responsáveis pela sua ativação incluem: EGF, TGF- α (Fator de Crescimento Transformador alfa), anfiregulina, betacelulina, dentre outros (Yewale *et al.*, 2013).

Enquanto inativo, o EGFR é encontrado na membrana plasmática como um monômero. A ligação de uma molécula EGF ou outro ligante compatível (TGF- α , anfiregulina, betacelulina) em um monômero do receptor desencadeiam mudanças conformacionais que induzem a dimerização do receptor. A homo ou heterodimerização do receptor resulta em mais alterações conformacionais que ativam o domínio tirosina cinase intracelular. Isto resulta na autofosforilação da porção citoplasmática do receptor e indução da sinalização intracelular. A ativação do EGFR por fosforilação inicia vias de sinalização como a da Ras-Cinase Regulada por Sinal Extracelular (ERK, Proteína Cinase Ativada por Mitógenos, MAPK) e PI3K/Akt, entre outras (Tebbutt *et al.*, 2013).

A dimerização, além de ativar as cinases na porção intracelular, leva à formação de invaginações cobertas por clatrina na membrana. Essas invaginações formam vesículas endocíticas que se fusionam com endossomos iniciais. Moléculas de EGFR que estão presentes nesses compartimentos retornam à membrana plasmática (recicladas) ou são destinadas à degradação (Yewale *et al.*, 2013). A meia-vida metabólica de EGFR em

linhagens celulares tumorais é de 20 h, isso significa que o mesmo receptor poderá ciclar na via endocítica diversas vezes durante esse tempo (Hatanpaa *et al.*, 2010).

Em células saudáveis, há cerca de 4×10^4 a 1×10^5 moléculas de EGFR presentes na membrana, enquanto células tumorais expressam mais de 2×10^6 receptores por célula (Yewale *et al.*, 2013). Por essa razão, diversas alternativas terapêuticas para o câncer têm sido desenvolvidas visando o receptor EGFR como alvo.

Os agentes mais promissores são os anticorpos monoclonais (mAb) e as moléculas inibidoras de tirosina cinase (TKI), que apresentam mecanismos de ação e especificidade distintos para o mesmo alvo. Os mAbs se ligam à porção extracelular do receptor e competem com as moléculas ligantes, impedindo a ativação das cascatas de sinalização (Garrett *et al.*, 2002; Ogiso *et al.*, 2002); TKIs inibem a autofosforilação da porção citoplasmática de EGFR e competem com ATP endógeno pelo domínio catalítico da molécula (Yewale *et al.*, 2013).

Diversos tumores, incluindo o glioblastoma multiforme e câncer de pulmão estão associados com a superexpressão de EGFR. Em tumores de origem epitelial, essa superexpressão apresenta papel importante na patogênese da doença (Bodey *et al.*, 2005). Mas o EGFR está ausente no núcleo central de placas neuríticas da DA (Birecree *et al.*, 1988). O EGF ainda apresenta função importante na neurogênese hipocampal e na melhora da função cognitiva (Sun *et al.*, 2010). Desse modo, o EGFR está envolvido com o crescimento, a proliferação e a sobrevivência das células, sendo superexpresso no câncer, mas deficiente na DA. Isso também suporta a hipótese de relação inversa entre câncer e a DA.

1.3.3. Via da PI3K/Akt/GSK-3 β

A PI3K é translocada para a membrana plasmática por meio da ligação de fosfotirosina a resíduos dos RTKs. A PI3K fosforila o PIP2 (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato) à PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato), e este funciona como um importante sinalizador intracelular coordenando processos de crescimento celular, migração, metabolismo e regulação do ciclo celular (Feldkamp *et al.*, 1999; Krakstad e Chekenya, 2010). O acúmulo de PIP3 recruta a PDK1 e a Akt à membrana plasmática. A Akt é ativa quando fosforilada em dois resíduos, ao mesmo tempo: Thr308 (por PDK1) e Ser473 (por mTORC2-mTOR-Rictor Kinase Complex 2). PDK1 e o complexo mTORC2 são ambos ativados por PI3K (Guha *et al.*, 1997; Feldkamp *et al.*, 1999; Krakstad e Chekenya, 2010). A Akt é responsável pela fosforilação de vários substratos citosólicos e nucleares que

regulam o metabolismo e o crescimento celular. A Akt está relacionada com a fosforilação de proteínas que regulam a apoptose (Bad, caspase-9, Double Minute murino 2 (MDM2), p21Waf1/Cip1, Fator de Transcrição “forkhead homeobox O1” (FOXO1) e Glicogênio Sintase Cinase-3 beta (GSK3 β)), proliferação e sobrevivência celular (Gesbert *et al.*, 2000). A GSK3 β é um dos substratos da Akt, e está envolvida na regulação de várias funções celulares, incluindo diferenciação, crescimento, motilidade, proliferação, progressão do ciclo celular, apoptose e resposta à insulina. A desregulação da expressão da GSK3 β conduz a muitos estados patológicos: diabetes, DA, Parkinson, distúrbios bipolares e câncer. A ativação da GSK3 β (quando defosforilada na Ser-9) promove parada no ciclo celular e encaminhamento para apoptose (Gesbert *et al.*, 2000). O processo de fosforilação de proteínas específicas pela Akt ativa está envolvido com angiogênese, ciclo celular, metabolismo, sobrevivência celular e fornece neuroproteção. A cinase Alvo da Rapamicina em Mamíferos (Mammalian Target of Rapamycin, mTOR) está envolvida no controle da transcrição de RNAs mensageiros (mRNA) envolvidos com a proliferação e sobrevivência celular. A PI3K ativa induz a ativação da Akt, a qual pode induzir o complexo I da mTOR (mTORCI) ou ser induzida pelo complexo II da mTOR (mTORCII). A via da PI3K/Akt/mTOR é neuroprotetora. Essa via diminui a apoptose e promove a proliferação, porém existe uma ativação dessa via em câncer, e ela parece ser crucial para a maioria dos tumores (Kitagishi *et al.*, 2014; Porta *et al.*, 2014).

A GSK3 β está envolvida na proliferação, diferenciação, motilidade e sobrevivência durante a embriogênese. A proteína MDM2 é responsável pela degradação proteossomal da p53 em condições fisiológicas. Mas em momentos de estresse celular, há a estabilização da p53 e a formação de um complexo com a GSK3 β . Isso leva à hiperfosforilação da tau, aumento do acúmulo de placas de A β e ativação de GSK3 β . A P53 é estimulada e a sua degradação proteossomal inibida na presença de placas de A β . Também está sendo considerado que a p53 fosforilada e a GSK3 β atuam juntas no desenvolvimento da DA (Proctor e Gray, 2010; Jadhav *et al.*, 2019).

Por outro lado, em relação ao câncer, a GSK3 β normalmente está inibida devido à fosforilação por Akt (Luo, 2009). A GSK3 β também é descrita como um supressor de tumor por inibir a transformação neoplásica e o desenvolvimento tumoral (Medina e Wandosell, 2011). Esta proteína também está envolvida na resistência a quimioterapia. Quando tratadas com lítio, que é um inibidor de GSK3 β , as células de hepatoma tornam-se resistentes a etoposídeo e camptotecina. Por outro lado, a ativação da GSK3 β com

LY294002 sensibiliza as células de hepatoma à apoptose induzida por esses quimioterápicos (Rocha *et al.*, 2014). Outros estudos demonstram que a ativação da GSK3 β sensibiliza células de câncer de mama ao paclitaxel, 5-fluorouracila, cisplatina, taxol e prodigiosina (Luo, 2009). Além disso, outros estudos com inibidores de GSK3 β em pacientes com glioblastoma e duas linhagens celulares estabilizadas (U251 e U87-MG) demonstram que a inibição da fosforilação da GSK3 β pela Akt reduziu significativamente a invasão tumoral (Pyko *et al.*, 2013).

1.4. Tumores infantis

1.4.1. Neuroblastoma

O neuroblastoma (NB) é o tumor sólido extracranial mais comum em crianças, e pode aparecer desde o nascimento até a infância inicial, com casos raros diagnosticados em crianças com mais de 10 anos de idade. As células de NB surgem a partir de células neoplásicas imaturas da crista neural (Ross, 1995; Hogarty, 2003). Sob condições normais, precursores de células da crista neural migram do tubo neural dorsal e se diferenciam ao atingir seus locais apropriados em tecidos e órgãos do sistema nervoso simpático. Porém, em alguns casos, defeitos na migração, maturação ou diferenciação das células da crista neural podem levar ao desenvolvimento do NB. Uma das características do NB é a sua alta heterogeneidade clínica e biológica: algumas crianças apresentam tumores que regridem completamente ou que se diferenciam espontaneamente sem tratamento, enquanto outras possuem tumores metastáticos espalhados por todo o corpo com elevada taxa de mortalidade, mesmo com intensa terapia multimodal (Diede, 2014).

1.4.1.1. Epidemiologia

A incidência estimada de NB na América do Norte e na Europa é de 10,5 casos por milhão de crianças abaixo dos 15 anos de idade, com muito pouca variabilidade étnica ou geográfica (Stiller e Parkin, 1992; Ries *et al.*, 1999; Heck *et al.*, 2009; Irwin e Park, 2015). O NB é a causa de aproximadamente 10% de todos os tumores infantis, mas infelizmente é responsável por até 15% das mortes de crianças com câncer. A grande maioria das crianças com NB são diagnosticadas antes dos 5 anos de idade, com a média de 19 meses de idade no diagnóstico.

1.4.1.2. Prognóstico e estratificação de risco

Devido à heterogeneidade biológica e clínica do NB, foram identificadas uma variedade de características de prognóstico associadas com desfechos de pacientes. Esses fatores de prognóstico variam de fatores clínicos tais como estágio do tumor e idade do paciente no diagnóstico, até características biológicas como histologia, ploidia do DNA, fatores citogenéticos, como amplificação do oncogene MYCN e ganhos ou deleções cromossômicas importantes, e marcadores tumorais séricos, assim como outros marcadores moleculares (Shimada *et al.*, 1999; Peuchmaur *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2006).

Utilizando-se esses fatores, pacientes com NB podem ser classificados em um dos seguintes grupos de risco: baixo, intermediário e alto. Para muitas crianças com NB, essa estratificação de risco e subsequente determinação do tratamento tem sido bem-sucedida (figura 4), visto que o desfecho para crianças com tumores de risco baixo e intermediário tem sido excelente, com aproximadamente 90% de taxas de sobrevida livre de eventos a longo prazo (Park *et al.*, 2013). No entanto, crianças com NB de alto risco permanecem como um desafio para tratamento, apresentando taxas de sobrevida livre de eventos a longo prazo abaixo de 50% (figura 4).

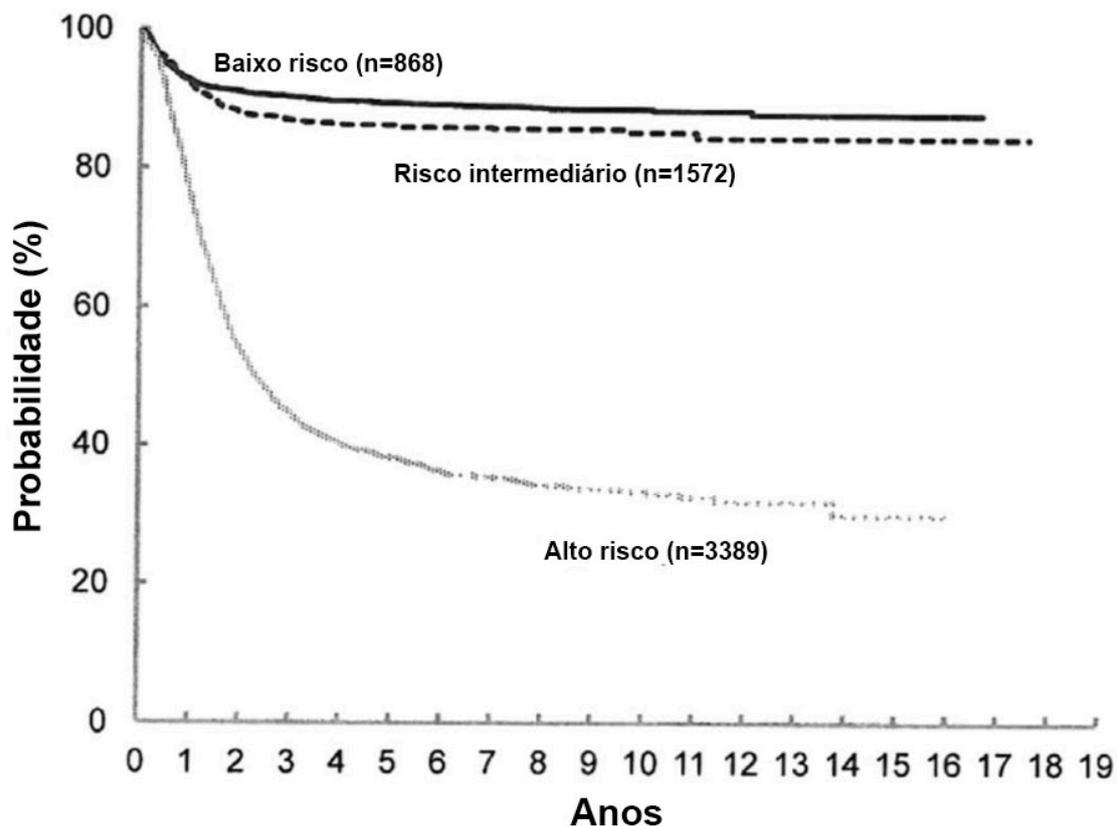


Figura 4. Sobrevida livre de eventos para o neuroblastoma baseada na estratificação de risco do Children's Oncology Group (COG). Curvas de sobrevivência Kaplan-Meier foram calculadas no diagnóstico de crianças inscritas nos ensaios clínicos de neuroblastoma do COG, Children's Cancer Group e Pediatric Oncology Group, que foram classificados como baixo, intermediário ou alto risco no momento do diagnóstico (adaptado de Park et al., 2013).

Até recentemente, era utilizado o Sistema de Estadiamento Internacional para Neuroblastoma (International Neuroblastoma Staging System, INSS) para estadiamento destes tumores. Este sistema foi desenvolvido em 1988 (Brodeur *et al.*, 1988) e subsequentemente revisado em 1993 (Brodeur *et al.*, 1993), utilizava uma combinação de avaliações de exames de imagem do tumor, comprometimento da medula óssea e avaliações pós-cirúrgicas para estadiamento apropriado. Recentemente, o sistema de estadiamento de NB foi reavaliado e foi desenvolvido o Sistema Internacional do Estadiamento do Neuroblastoma para Grupos de Risco (INRG) (tabela 1) (Cohn *et al.*, 2009; Monclair *et al.*, 2009). Esse sistema é semelhante ao INSS, mas determina o estágio do tumor antes da cirurgia com base nos resultados dos exames de imagem, bem como em outros exames e biópsias. O sistema INRG usa Fatores de Risco Definidos por Imagem (IDRFs) para determinar o quão complexa poderá ser a retirada do tumor. Isso

inclui o crescimento do tumor nas proximidades de um órgão vital ou em torno de vasos sanguíneos importantes.

O sistema INRG classifica os neuroblastomas em 4 estágios:

- L1 – O tumor não cresceu além do local onde se originou e não envolve estruturas vitais, além de estar confinado a um local, como o pescoço, tórax ou abdome;
- L2 – O tumor não cresceu além de onde se originou, porém tem pelo menos um fator de risco definido por imagem;
- M – Um tumor que se disseminou para outros órgãos, exceto os tumores de estágio MS;
- MS – Doença metastática em crianças menores de 18 meses, com disseminação para a pele, fígado e/ou medula óssea.

Além disso, o sistema INRG ainda utiliza 13 variáveis clínicas e biológicas do tumor que afetam a sobrevida livre de eventos. As variáveis incluem idade do paciente no diagnóstico, estágio tumoral do INRG, categoria histológica, grau de diferenciação, status da amplificação do gene MYCN, presença ou ausência de anomalias cromossômicas em 1p ou 11q, entre outros.

Tabela 1. Estratificação de risco do Sistema Internacional do Estadiamento do Neuroblastoma para Grupos de Risco (INRG).

Estágio INRG	Idade do paciente (meses)	Diferenciação do tumor	Amplificação do gene MYCN	Aberração 11q	Ploidia do DNA	Grupo de risco
L1/L2	Qualquer	Qualquer	Qualquer	Qualquer	Qualquer	Muito baixo
L1	Qualquer	Qualquer	Não	Qualquer	Qualquer	Muito baixo
MS	<18	Qualquer	Não	Não	Qualquer	Muito baixo
L2	<18	Qualquer	Não	Não	Qualquer	Baixo
L2	>=18	Diferenciado	Não	Não	Qualquer	Baixo
M	<18	Qualquer	Não	Qualquer	Hiperdiploid e	Baixo
L2	<18	Qualquer	Não	Sim	Qualquer	Intermediário
L2	>=18	Diferenciado	Não	Sim	Qualquer	Intermediário
L2	>=18	Pouco diferenciado ou indiferenciado	Não	Qualquer	Qualquer	Intermediário
M	<18	Qualquer	Não	Qualquer	Diploide	Intermediário
L1	Qualquer	Qualquer	Sim	Qualquer	Qualquer	Alto
L2	Qualquer	Qualquer	Sim	Qualquer	Qualquer	Alto
M	<18	Qualquer	Sim	Qualquer	Qualquer	Alto
M	>=18	Qualquer	Qualquer	Qualquer	Qualquer	Alto
MS	<18	Qualquer	Sim	Qualquer	Qualquer	Alto
MS	<18	Qualquer	Qualquer	Sim	Qualquer	Alto

1.4.1.3. Tratamento

Para crianças que apresentam NB de baixo risco e intermediário, os desfechos normalmente são excelentes e as estratégias terapêuticas são variáveis, incluindo apenas observação, ressecção cirúrgica, ou doses moderadas de quimioterapia com ressecção cirúrgica (Baker *et al.*, 2010; Strother *et al.*, 2012).

Aproximadamente metade dos pacientes diagnosticados com NB apresentam tumor de alto risco. Apesar de diversas alterações nas estratégias terapêuticas ao longo dos anos, esse grupo continua a ter desfecho desfavorável e é o mais desafiador para tratar. Taxas de sobrevida de longo prazo para crianças com NB de alto risco atualmente estão em torno de 40-50% (Berthold *et al.*, 2005; Pearson *et al.*, 2008; Matthay *et al.*, 2009; Kreissman *et al.*, 2013). Embora os regimes de tratamento para esse grupo de risco tenham evoluído nas últimas décadas, os regimes padrão continuam a ter 4 componentes principais: (1) quimioterapia de indução, (2) controle local, (3) consolidação e (4) terapia de manutenção.

1.4.1.3.1. Quimioterapia de Indução

O objetivo da quimioterapia de indução é reduzir o tamanho das metástases e do tumor, para facilitar a terapia local e aumentar o sucesso da terapia mieloablativa. No caso do NB, embora a maioria das crianças com NB de alto risco alcancem remissão após a quimioterapia de indução, muitos pacientes têm recidiva mesmo após terapia de consolidação adicional. Além disso, em torno de 20% dos pacientes com NB de alto risco apresentam progressão da doença ou têm uma resposta inadequada durante a indução (Irwin e Park, 2015).

A maioria dos regimes de indução incluem compostos de platina (cisplatina e/ou carboplatina), ciclofosfamida, etoposídeo e vincristina. Os inibidores de topoisomerase (topotecano) e antraciclinas também são incorporados em alguns regimes de indução (Park *et al.*, 2016). Os pacientes com NB de alto risco que não respondem à terapia de indução são um subgrupo ainda mais difícil de tratar, com taxas de sobrevida a longo prazo menores que 20%. Análises genômicas e proteômicas destes pacientes e de seus tumores são críticas para entender os mecanismos envolvidos com a resistência ao tratamento e para identificar novas alvos terapêuticos (Schrey *et al.*, 2015).

1.4.1.3.2. Controle local

Após uma resposta metastática adequada à quimioterapia de indução, a prática padrão é proceder com a ressecção cirúrgica do tumor primário. A excisão cirúrgica completa do tumor primário tem se mostrado segura e confere uma vantagem de sobrevivência a esse grupo de pacientes.

Além da ressecção cirúrgica, outro componente principal do controle local é a radioterapia, devido à elevada radio-sensibilidade dos tumores de NB. A radioterapia normalmente é administrada após a terapia de consolidação (Park *et al.*, 2016). Crianças com NB que recebem radioterapia, entretanto, apresentam eventos adversos tardios, em função da sensibilidade dos tecidos normais que estão em crescimento e desenvolvimento e são muito afetados pela radiação (Mazloom *et al.*, 2014). Estudos clínicos estão em andamento para avaliar a segurança e eficácia de terapias com radiação para crianças com NB (Hattangadi *et al.*, 2012; Oshiro *et al.*, 2013).

1.4.1.3.3. Consolidação

A terapia de consolidação na maioria dos regimes de tratamento de NB inclui quimioterapia mieloablativa e resgate com células-tronco autólogas (ASCR). O benefício da terapia mieloablativa com ASCR tem sido demonstrado em diversos estudos, e uma meta-análise de 2015 demonstrou que existe um aumento estatisticamente significativo na sobrevida livre de eventos (Yalçın *et al.*, 2013). Outros estudos demonstram, no entanto, que os benefícios da terapia mieloablativa com ASCR são mínimos, em comparação com outros regimes de tratamento nesta fase como o uso de imunoterapia anti-GD2 (Kushner *et al.*, 2016). Portanto, o regime ideal de consolidação para pacientes com NB de alto risco ainda deve ser determinado através de mais ensaios clínicos.

1.4.1.3.4. Manutenção

Os pacientes com NB de alto risco geralmente entram na fase de manutenção após completar a terapia de indução, ressecção cirúrgica, terapia mieloablativa com ASCR e radioterapia. Enquanto muitos pacientes atingem remissão clínica total com a abordagem multimodal descrita acima, a recidiva permanece comum, sugerindo que a doença residual mínima é um fator importante na recidiva do NB. Ao longo dos anos, diversas opções de tratamento pós-consolidação foram avaliadas numa tentativa de erradicar a doença residual e aumentar ainda mais a sobrevida livre de eventos (Heck *et al.*, 2009).

Uma das terapias utiliza isotretinoína (ácido 13-cis-retinóico), que é um retinóide sintético que reduz a proliferação e induz a diferenciação em células de NB em pacientes com doença residual mínima e administrada após a quimioterapia ou o resgate com células-tronco (Matthay *et al.*, 1999; Matthay *et al.*, 2009). Outra terapia utilizada é o uso de anticorpos contra o gangliosídeo GD2 (Cheung *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2010) – um marcador de superfície celular expresso em células de NB – que foi desenvolvida durante as décadas de 1980 e 1990 e demonstrou resultados promissores em crianças com NB.

Outra abordagem para reduzir as taxas de recidiva envolve o reposicionamento de fármacos, cujo objetivo principal é utilizar fármacos já comercializados para tratamento de outras doenças. A vantagem principal do reposicionamento é reduzir o custo e o tempo das pesquisas, pois o fármaco utilizado já passou por testes toxicológicos. No caso do NB de alto risco, tem sido estudado o reposicionamento do fármaco antiprotozoário difluorometilornitina (DFMO) para terapia de manutenção. O DFMO é um inibidor irreversível da ornitina descarboxilase, uma enzima da síntese de poliaminas, cujo gene é um alvo conhecido do MYCN (Hogarty *et al.*, 2008).

Além disso, terapias utilizando alvos moleculares estão sendo estudadas para NB de alto risco, como estudos que utilizam o crizotinibe, um inibidor da cinase de linfoma anaplásico (ALK). Mutações nessa cinase foram descritas em alguns casos de NB (Mossé *et al.*, 2013; Moore *et al.*, 2014). Já o mesilato de imatinibe (Glivec®) é um derivado quinazolinico com ação contra tirosinas cinases, que está atualmente em ensaio clínico de fase II para pacientes com NB em recidiva ou refratário (Meco *et al.*, 2005).

Outro alvo molecular em estudo é a via de sinalização da Fosfoinosítideo 3-cinase/Proteína Cinase B/Alvo mamífero da Rapamicina (PI3K/Akt/mTOR). Foi demonstrado que Akt fosforilada está relacionada com prognóstico ruim em pacientes com NB (Opel *et al.*, 2007) e a via da PI3K/Akt foi relacionada com aumento da sobrevivência celular (Boller *et al.*, 2008) e aumento da resistência à quimioterapia nesse tumor (Li e Thiele, 2007). O uso de inibidores de PI3K/mTOR tem demonstrado efeito antiproliferativo e bloqueio da angiogênese tumoral (Chanthery *et al.*, 2012; Schramm *et al.*, 2013).

A inativação do Fator de transcrição forkhead box O 3a (FOXO3a) - um fator de transcrição que promove parada do ciclo celular, diferenciação celular, autofagia e apoptose – pela Akt é essencial para a sobrevivência das células de neuroblastoma. O tratamento de células de NB com inibidores de PI3K/mTOR ativou FOXO3a e desencadeou apoptose (Santo *et al.*, 2013). Desse modo, a via de sinalização

PI3K/AKT/mTOR é um importante alvo de estudo em neuroblastomas de alto risco pela possibilidade de conferir aos tumores resistência à quimioterápicos.

Foi demonstrado que a doxazosina inibiu a fosforilação de Akt e que o tratamento de células de câncer de próstata, de câncer de mama e de glioma com esse fármaco inibiu a migração haptotática e quimiotática dessas células. Além disso, a doxazosina reduziu metástases distais de células de câncer de próstata humano e prolongou a sobrevivência do camundongo receptor em um modelo xenográfico (Petty *et al.*, 2012).

1.4.1.4. Linhagem celular de NB humano SH-SY5Y

A linhagem celular SH-SY5Y é uma sublinhagem clonada a partir de células SK-N-SH, originalmente estabelecidas de uma biópsia de medula óssea de um paciente com neuroblastoma de origem ganglial simpato-adrenérgica, na década de 1970 (Biedler *et al.*, 1973). Sabe-se que dentro de um mesmo tumor de neuroblastoma é possível encontrar muitos fenótipos celulares diferentes, entre eles neuroblastos, células não neuronais e até melanócitos. Essa heterogeneidade celular e extensão da maturação estão correlacionadas com comportamento clínico do tumor, e essas propriedades têm sido utilizadas para a classificação e prognóstico da doença (Shimada *et al.*, 2001). A mesma heterogeneidade é encontrada nas linhagens celulares derivadas desses tumores. Foram observados três tipos celulares distintos: neuroblastos simpatoadrenais (tipo N); células semelhantes a precursores não neuronais (tipo S); células com uma morfologia intermediária entre o tipo N e o S (tipo I). A linhagem celular SH-SY5Y é descrita na literatura como um clone de células do tipo N, no entanto, é descrita a presença de células tipo S nessa linhagem devido à interconversão das células (Rettig *et al.*, 1987; Ciccarone *et al.*, 1989). As SH-SY5Y apresentam atividade de enzimas marcadoras neuronais (tirosina hidroxilase e dopamina-β-hidroxilase), captação de norepinefrina, expressa uma ou mais proteínas de neurofilamentos e receptores opióides, muscarínicos e fator de crescimento de nervo (Ciccarone *et al.*, 1989). As SH-SY5Y possuem a capacidade de proliferar em cultura por longos períodos e podem ser induzidas à diferenciação por diversos agentes, incluindo ácido retinóico (Singh e Kaur, 2007), forbolester 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (Påhlman *et al.*, 1981), fator neurotrófico derivado do cérebro (Cernaianu *et al.*, 2008), dibutiril AMP cíclico (Kume *et al.*, 2008), guanosina e trifosfato de guanosina (Guarnieri *et al.*, 2009) ou estaurosporina (Mollereau *et al.*, 2007). A diferenciação das células SH-SY5Y com ácido retinóico modifica sua morfologia e promove o desenvolvimento de

neuritos e expressão de diversos marcadores neuronais (Ciccarone *et al.*, 1989; Singh e Kaur, 2007; Lopes *et al.*, 2010).

1.4.2. Tumores vasculares

Tumores vasculares são proliferações angiogênicas anormais de células endoteliais neoplásicas com um amplo espectro de doenças clínicas, desde hemangiomas benignos em crianças até hemangioendoteliomas e angiosarcomas malignos em adultos (Zheng *et al.*, 2013). Até o momento, os mecanismos celulares e moleculares que levam à formação dos tumores vasculares não são bem compreendidos.

O termo hemangioendotelioma tem sido utilizado para diversas proliferações vasculares, incluindo neoplasias benignas e malignas. Em 1908, Mallory utilizou o termo hemangioendotelioma para incluir todas as proliferações que ele considerava terem surgido a partir de células endoteliais de vasos sanguíneos, separando-as entre angiomata (neoplasmas de crescimento lento com evidente formação de lúmen vascular) e endoteliomata (neoplasias com crescimento acelerado compostas de agregados sólidos de células proliferativas). Em 1943, Stout denominou hemangioendoteliomas como uma série de neoplasias vasculares malignas, caracterizadas histopatologicamente por canais vasculares com anastomoses delimitados por células endoteliais atípicas. Em 1961, no entanto, Kauffman e Stout, em um estudo de tumores vasculares malignos em crianças e adolescentes, distinguiram entre hemangioendoteliomas benignos, os quais incluíam hemangioendoteliomas benignos juvenis (atualmente, seriam considerados hemangiomas infantis) e hemangioendoteliomas malignos caracterizados por vasos irregulares com anastomoses, delimitados por células endoteliais atípicas com alta frequência de figuras mitóticas. Em 1982, Weis e Enzinger propuseram que o termo hemangioendotelioma deveria se restringir às neoplasias vasculares que demonstram um comportamento biológico intermediário entre hemangiomas benignos e angiosarcoma altamente malignos. Subsequentemente, passou a ser utilizado o termo hemangioendotelioma epitelióide (EHE) (Weiss e Enzinger, 1982). O EHE de tecidos moles foi posteriormente estratificado em dois grupos de risco de malignidade, o clássico e o maligno, baseado na atividade mitótica e tamanho, em uma tentativa de refletir os diferentes subgrupos biológicos (Rosenberg e Agulnik, 2018). Já o termo hemangioma é utilizado atualmente para os tumores vasculares benignos infantis (Smith *et al.*, 2017).

1.4.2.1. Hemangioendotelioma epitelial

Os EHEs apresentam propensão para crescimento angiocêntrico, expandindo a parede do vaso, fechando o lúmen e se espalhando centrifugamente no tecido ao redor, no qual eles induzem uma esclerose (endurecimento do tecido). Outras características distintas incluem um padrão de crescimento infiltrativo, englobando estruturas próximas, e falta de um padrão de crescimento lobular, como normalmente encontrado em hemangiomas benignos (Antonescu, 2014).

Em 50% dos casos, o EHE possui uma apresentação clínica multifocal. Esta ocorrência representa um padrão pouco usual de metástase loco-regional. Isto é relevante em EHE visceral, no qual a doença multifocal está restrita a um órgão (por exemplo, fígado, pulmão), sem disseminação para outros locais distantes. Como resultado deste comportamento clínico, pacientes que apresentam EHE hepático multifocal são candidatos a transplante hepático (Antonescu, 2014).

A distribuição anatômica dessas lesões ocorre principalmente em tecidos moles, mas podendo ocorrer também nos ossos, variando de local, desde cabeça e pescoço, tronco e extremidades. Aproximadamente 21% dos casos ocorre no fígado, 18% no fígado e pulmão, 12% apenas no pulmão e 14% apenas nos ossos. Dada a natureza heterogênea desse tumor, no entanto, qualquer local do corpo pode ser um alvo da doença (Sardaro *et al.*, 2014).

Os pacientes podem apresentar sintomas respiratórios como dor torácica, derrame pleural ou hemoptise (expectoração com presença de sangue). A doença sintomática pode se apresentar de formas diversas como dor óssea, sintomas neurológicos e inchaço, todas de acordo com o local afetado (Bagan *et al.*, 2006). Os pacientes ocasionalmente podem apresentar manifestações sistêmicas como perda de peso ou anemia. Os pacientes sintomáticos e que apresentam metástases no diagnóstico possuem pior prognóstico. O EHE normalmente apresenta doença hepática e/ou pulmonar. Metástases ósseas são comuns, e normalmente são as mais severas clinicamente (Amin *et al.*, 2006; Sardaro *et al.*, 2014).

O prognóstico do EHE é variável, com alguns demonstrando um curso clínico indolente, enquanto outros tendem a metastizar. Historicamente, os fatores de risco para piores desfechos incluíram sintomas constitucionais, como perda de peso e anemia, bem como sintomas pulmonares, como hemoptise e derrame pleural hemorrágico (Amin *et al.*, 2006; Rosengarten *et al.*, 2011). Alguns fatores de risco para piores desfechos incluem aumento da atividade mitótica e tamanho do tumor (Deyrup *et al.*, 2008).

Visto que o EHE continua a ser uma malignidade rara, grandes dados randomizados não estão disponíveis no que diz respeito à estratégia de tratamento ideal. Se possível, a ressecção cirúrgica deve ser realizada. Em pacientes assintomáticos com lesões difusas, a observação atenta às vezes é uma estratégia razoável, já que regressões espontâneas foram relatadas (Kitaichi *et al.*, 1998). O tratamento para doença metastática inclui quimioterapia citotóxica, terapia imunológica e terapias direcionadas.

Além da quimioterapia citotóxica, vários pacientes com EHE foram tratados com agentes imunomoduladores. Vários relatos de caso avaliaram a talidomida como tratamento para EHE com três pacientes apresentando uma resposta parcial ou doença estável (Mascarenhas *et al.*, 2004; Raphael *et al.*, 2010; Salech *et al.*, 2016) e dois pacientes progressão da doença (Bolke *et al.*, 2006; Kassam e Mandel, 2008). Um paciente com EHE hepática irressecável apresentou estabilidade prolongada da doença após tratamento com lenalidomida (Pallotti *et al.*, 2014). Estudos mais antigos também avaliaram o interferon no tratamento de EHE irressecável devido às suas propriedades antiangiogênicas (Gaur *et al.*, 2012).

O EHE é um tumor vascular raro e talvez por isso, existam poucos dados clínicos para orientar as opções de tratamento. Apesar dos poucos relatos de casos, uma possível estratégia terapêutica se baseou no fato de alguns EHE pulmonares superexpressarem o receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-2). O apatinibe, um inibidor de tirosina cinase específico para o VEGFR-2, foi usado em um caso com boa resposta clínica e radiográfica (Zheng *et al.*, 2017). Outros relatos investigaram o sorafenibe, um inibidor de tirosina cinase de múltiplos alvos, como terapia direcionada para EHE, predominantemente no contexto de doença hepática volumosa com uma resposta parcial (Kobayashi *et al.*, 2016). Em outro relato, um paciente com EHE metastático para linfonodos cervicais e mediastinais, pulmões e fígado foi tratado por dois anos com pazopanibe (Semenisty *et al.*, 2015), com uma resposta significativa nas metástases pulmonares e linfonodais e melhora significativa nas lesões hepáticas.

O sirolimus, inibidor de mTOR, também foi avaliado no tratamento de uma pequena coorte de pacientes com EHE. O fármaco foi administrado até toxicidade inaceitável, com a dose sendo ajustada para atingir níveis plasmáticos-alvo de 15-20 ng/dL. Dezoito pacientes participaram do estudo, com 17 de 18 pacientes sendo avaliados para resposta. A dose média diária de sirolimus foi de 4,5 mg, 2 pacientes apresentaram resposta parcial; 12, doença estável e 3, doença progressiva. A mediana da sobrevida global foi de 16 meses e a mediana da sobrevida livre de progressão foi de 12 meses

(variando de 1 a 45), com quatro pacientes livres de progressão aos 24 meses. O benefício clínico (> 6 meses) foi de 56% (Stacchiotti *et al.*, 2016).

1.4.2.2. Hemangioma infantil

Os hemangiomas infantis (HIs) são os tumores vasculares mais comuns em bebês. Os HIs são tipicamente ausentes no nascimento, passam por uma fase de proliferação celular aumentada seguida por uma fase de involução e finalmente regredem com o tempo. A morbidade pode incluir desfiguração e cicatrizes e, em casos mais graves, perda da visão, comprometimento das vias aéreas, insuficiência cardíaca congestiva e morte (Chang *et al.*, 2008). A apresentação clínica do HI pode variar e a avaliação clínica precoce de lesões potencialmente problemáticas por um especialista pode ajudar a evitar maior morbidade.

Dados sobre a prevalência de HI variam. Em um estudo prospectivo nos Estados Unidos com 594 crianças até os 9 meses de idade, a prevalência relatada foi de 4,5% (Munden *et al.*, 2014). Este estudo pode ter sub-estimado o número de HI, visto que os resultados se basearam em pais respondendo a consultas telefônicas e retornando para exames de acompanhamento. Um recente estudo retrospectivo de pacientes em Minnesota demonstrou um aumento da incidência de HI na população ao longo das últimas 3 décadas, que se correlacionou fortemente com um declínio no peso ao nascer, bem como um aumento no nascimento prematuro e complicações na gravidez (Anderson *et al.*, 2016).

Sexo feminino, parto prematuro, baixo peso ao nascer e produtos de gestações múltiplas têm sido associados ao desenvolvimento de HI. Um estudo de caso controlado por Drolet *et al.* (2008) identificou um risco aumentado de HI de 40% para cada redução de 500 g no peso ao nascer. Várias associações pré-natais também foram identificadas como fatores de risco de HI, incluindo sangramento vaginal materno durante o primeiro trimestre, uso de progesterona, bem como pré-eclâmpsia, idade materna mais velha e uso de fertilização *in vitro* (Drolet *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2013). O histórico familiar também foi identificado como tendo associação com o risco de HI (Drolet *et al.*, 2008). Por outro lado, ao analisar a incidência de HI em gêmeos monozigóticos e dizigóticos o estudo de Cheung *et al.* (1997), não encontrou diferença significativa entre os dois grupos, talvez sugerindo que os fatores ambientais desempenham um papel mais importante do que a genética subjacente.

Os HIs são classificados como superficiais ou profundos ou como uma combinação. Eles podem estar presentes como uma lesão solitária ou uma de muitas, e podem variar em tamanho de alguns milímetros a muitos centímetros de diâmetro (Drolet *et al.*, 2008). As lesões superficiais crescem para se tornarem pápulas, nódulos ou placas avermelhadas ou levemente compressíveis, vermelhas ou de cor “morango”. Lesões mais profundas tendem a ter uma tonalidade mais azulada ou podem aparecer como um nódulo da cor da pele. Lesões mistas, ou aquelas que envolvem tanto a epiderme quanto tecidos subcutâneos mais profundos, podem apresentar características de ambos (Chiller *et al.*, 2002).

O HI segue um padrão temporal característico: a maioria está ausente no nascimento e aparece durante as primeiras semanas a meses de vida. Um sinal premonitório pode estar presente, como uma área esbranquiçada na pele (significando vasoconstrição), área de contusão ou grupo de telangiectasias (vasos muito finos na superfície da pele) no local de crescimento futuro (Frieden *et al.*, 2009). A proliferação ocorre até aproximadamente 1 ano de idade, com crescimento médio atingido aos 3 meses de idade e com crescimento após o primeiro ano sendo incomum. Vale ressaltar que os hemangiomas profundos proliferam mais tardiamente que os hemangiomas superficiais, e seu crescimento foi observado por um período de tempo mais longo (às vezes por 12 ou 14 meses) até os 2 anos de idade (Chang *et al.*, 2008; Drolet *et al.*, 2008). O HI então entra em um estágio de involução e desaparece completamente com o passar do tempo, em contraste com outras malformações vasculares congênitas, que não regredem espontaneamente e continuam a crescer proporcionalmente com o crescimento da criança (Wojcicki e Wojcicka, 2014).

O local anatômico de um HI pode ter implicações prognósticas; por exemplo, crianças com HIs focais ou sobrepostos à coluna lombossacral podem ter risco aumentado de problemas na medula espinhal ou anormalidades geniturinárias (Chiller *et al.*, 2002). Outros HIs envolvendo a cabeça e o pescoço podem colocar crianças em risco de oclusão do eixo ocular, astigmatismo, ambliopia, oclusão do canal lacrimal, hemangiomas das vias aéreas e risco global de ulceração e desfiguração (Chang *et al.*, 2008).

A presença de múltiplas lesões (tipicamente mais de cinco) está associada a um risco aumentado de envolvimento visceral, principalmente no fígado e no trato gastrointestinal (Chang *et al.*, 2008). As lesões viscerais são frequentemente assintomáticas, benignas e podem ser tratadas apenas com observação (Christison-Lagay *et al.*, 2007). No caso de suspeita de hemangiomas viscerais, a avaliação utilizando

ultrassonografia, tomografia computadorizada ou ressonância magnética pode ajudar a distinguir uma lesão de HI de outro processo maligno mais agressivo (Dubois *et al.*, 1998).

A patogênese do HI é pouco compreendida, mas várias hipóteses foram desenvolvidas. O transportador de glicose-1 (GLUT-1) é uma proteína transportadora de glicose do tipo eritrocitária que foi identificada como um marcador altamente seletivo de HI em todas as fases, em comparação com outras malformações vasculares (North *et al.*, 2000; North *et al.*, 2001; Leon-Villalpalos *et al.*, 2005). Em um estudo de North *et al.* (2001), a imunoreatividade de GLUT-1 endotelial microvascular foi identificada em todos os 66 HIs testados, enquanto que as outras malformações vasculares, granulomas piogênicos e tecido de granulação normal não expressaram GLUT-1. A proteína foi identificada no cérebro humano normal e no tecido placentário, mas não na pele normal ou no tecido subcutâneo. A expressão robusta e única do GLUT-1 no HI, portanto, sugere uma possível associação patogênica.

Certas observações clínicas levaram recentemente à sugestão de que o HI é desencadeado e mantido por hipóxia, tanto em consequência de eventos maternos que criam estresse hipóxico como também dos próprios fatores induzidos por hipóxia. Isto apoia ainda mais a associação de HI com GLUT-1, uma vez que o GLUT-1 é um alvo a jusante do Fator induzido por Hipóxia 1 alfa (HIF-1 α), juntamente com o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) e o fator de crescimento semelhante à insulina 2 (IGF-2). A ideia de que a hipóxia pode desencadear o desenvolvimento de HI foi recentemente explorada por de Jong *et al.* (2016), que propõem que os fatores induzidos pela hipóxia são cruciais para a vasculogênese observada nesses tumores. De fato, muitas das condições que predis põem uma criança ao desenvolvimento de um HI (ou seja, nascimento prematuro, baixo peso ao nascer e pré-eclâmpsia) estão associados à hipóxia. Por exemplo, bebês prematuros correm mais risco de morbidade respiratória neonatal que bebês nascidos a termo. Da mesma forma, os recém-nascidos com muito baixo peso podem apresentar subdesenvolvimento dos pulmões e do sistema respiratório, sofrendo assim um risco significativo de apneia e falta de oxigenação (Brown *et al.*, 2013; Mohr *et al.*, 2014).

Certos marcadores moleculares foram identificados na proliferação da célula endotelial de HI. A co-expressão de CD34 (um marcador de células endoteliais) e CD133 (um marcador de células progenitoras endoteliais) foi detectada por citometria de fluxo em 11 de 12 amostras de hemangioma infantil analisadas durante a fase proliferativa em

um estudo de Yu *et al.* (2004). Outro estudo descobriu que o receptor de hialuronina endotelial 1, um marcador para vasos linfáticos, era fortemente expresso em células HI, também preferencialmente durante a fase proliferativa, e não durante o estágio de involução (Dadras *et al.*, 2004). Este estudo destaca que a proliferação de células endoteliais de HI compartilha um imunofenótipo semelhante com veias embrionárias durante o desenvolvimento normal, sugerindo que a diferenciação das células endoteliais do HI foi interrompida em um estágio inicial da diferenciação vascular. Essa ideia foi corroborada por Ritter *et al.* (2002), que identificaram alta expressão de IGF-2 durante a fase proliferativa do desenvolvimento de HI, que diminuiu significativamente durante a fase de involução. Além disso, estudos recentes têm avaliado o papel da sinalização do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) na progressão do HI. O Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) pode promover a proliferação e motilidade *in vitro* de células de hemangioma e a inibição farmacológica do Fator Nuclear kappa B (NF-κB) atenuou o aumento de proliferação induzido por EGF (Zhang *et al.*, 2016).

A via de sinalização da PI3K/Akt também foi relacionada com a patogênese do HI. O antibiótico Pingiangmicina tem sido utilizado como tratamento de hemangioma, sendo demonstrado que os efeitos antitumorais desse fármaco estão relacionados com a redução da expressão de PI3K e da fosforilação de Akt (Peng *et al.*, 2015). O silenciamento da proteína cinase 1 dependente de fosfoinositol-3 (PDK1), que regula a ativação da Akt, reduziu significativamente a proliferação e invasão de células de hemangioma *in vitro*. Estes estudos demonstram a importância da via da PI3K/Akt na patogênese do HI (Zheng *et al.*, 2015).

A maioria dos HIs involui completamente com o tempo, mas muitos deixam uma pequena cicatriz parecida com um pergaminho. Um pequeno subconjunto, no entanto, é mais propenso a cicatrizes, ulcerações, sangramentos ou desfigurações permanentes e significativas. As lesões de alto risco incluem aquelas que têm o potencial de interferir em uma estrutura ou função vital, como lesões ao redor do olho, ponta nasal, boca, vias aéreas, trato gastrointestinal ou fígado (Chang *et al.*, 2008).

Várias terapias sistêmicas e tópicos foram estudadas no tratamento de HIs. O propranolol tem demonstrado ser um medicamento bem tolerado, com eficácia em todos os estágios, tanto para deter o crescimento durante a fase proliferativa quanto para acelerar a fase de involução. Em um estudo randomizado controlado (RCT) por (Hogeling *et al.*, 2011), o propranolol administrado por via oral a 2 mg/kg levou a uma melhora no tamanho, cor e elevação dos hemangiomas localizados e segmentares em recém-nascidos

e crianças até os 5 anos de idade. Mais recentemente, um RCT de propranolol na dose de 3 mg/kg levou a uma resolução completa ou próxima a isso em HI em comparação com o placebo, sem uma diferença significativa nos eventos adversos (Léauté-Labrèze *et al.*, 2015). O uso tópico de timolol (antagonista beta-adrenérgico) é eficaz, particularmente se utilizado precocemente no desenvolvimento do HI, ou em lesões pequenas e finas. Embora os glicocorticoides sistêmicos tenham demonstrado deter o crescimento do tumor na fase inicial da proliferação, eles são menos úteis em estágios posteriores e apresentam uma quantidade significativa de comorbidades (Bennett *et al.*, 2001). A vincristina e o interferon alfa foram estudados em hemangiomas agressivos, mas apresentam um risco significativo de eventos adversos, como a neuropatia periférica e a diplegia espástica (Perez *et al.*, 2002; Michaud *et al.*, 2004).

Evidências para a eficácia e segurança dos betabloqueadores não seletivos orais e tópicos continuam a se acumular, e o propranolol está sendo recomendado como tratamento de primeira linha para HIs complicados (Schiestl *et al.*, 2011). O timolol é agora amplamente utilizado em lesões pequenas, finas e precoces. Embora eventos adversos sejam raramente relatados nos RCTs que estudam o propranolol, é importante notar que os efeitos colaterais potenciais podem incluir hipotensão, bradicardia e hipoglicemia. Nos pacientes que não conseguem tolerar os betabloqueadores, agentes alternativos como glicocorticóides, interferon alfa ou vincristina podem ser úteis.

1.4.2.3. Linhagem celular EOMA

A linhagem celular EOMA foi estabelecida em 1980 como um modelo de estável de célula endotelial. Esta linhagem é proveniente de um hemangioendotelioma murino e, atualmente é utilizada como modelo *in vitro* de hemangioma e hemangioendotelioma (Obeso *et al.*, 1990). As células EOMA exibem propriedades celulares endoteliais características, tais como rearranjo em estruturas semelhantes a tubos em Matrigel e retenção da morfologia em paralelepípedo na confluência. Eles se comportam *in vitro* de maneira similar às células endoteliais microvasculares (Obeso *et al.*, 1990).

As células EOMA são tumorigênicas (Gordillo *et al.*, 2016) e sintetizam uma série de produtos celulares, incluindo enzima conversora de angiotensina (ECA), trombospondina, catepsina L, endostatina e interleucina-6. Os receptores de superfície para a lipoproteína de baixa densidade acetilada são expressos pelas células EOMA, assim

como a endotelina vascular, uma molécula de adesão celular endotelial específica desse tecido (Obeso *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 1996; Wen *et al.*, 1999; Felbor *et al.*, 2000).

1.4.3. Leucemia Mielomonocítica

O efeito antitumoral da doxazosina também foi avaliado nesta tese na linhagem celular WEHI-3B, representativa de leucemia mielomonocítica (LMM). A LMM é uma neoplasia hematopoiética que compartilha características clínicas e morfológicas com síndromes mielodisplásicas (SMD) e neoplasias mieloproliferativas (NPM) (Arber *et al.*, 2016). Os pacientes com LMM normalmente apresentam anemia e trombocitopenia. Eles podem também apresentar hematopoiese extramedular e hepatoesplenomegalia. A medula óssea normalmente exibe displasia e fibrose, com evidências de hematopoiese clonal (Arber *et al.*, 2016).

As terapias convencionais atuais (com exceção do transplante de medula óssea) não alteram o curso natural da doença, são apenas paliativas. Os pacientes assintomáticos podem não se beneficiar do tratamento imediato, e ele geralmente é iniciado quando a velocidade da progressão da doença aumenta (por exemplo, aumento de blastos na medula ou sangue periférico) ou quando o paciente se torna sintomático, com esplenomegalia, anemia exigindo transfusões sanguíneas, ou sangramento e machucados associados a trombocitopenia (Tefferi *et al.*, 1989; Onida *et al.*, 2002; Schuler *et al.*, 2014).

Os tratamentos convencionais incluem terapia de apoio (fator de crescimento e/ou transfusão), hidroxiureia, agentes hipometilantes, ou terapia citotóxica intensiva para pacientes com leucemia aguda. A resposta a tratamentos convencionais é variável, a recidiva é inevitável e a única opção de tratamento potencialmente curativo atualmente é o transplante alogênico com células-tronco. No entanto, avanços recentes no entendimento dos mecanismos dessa doença levaram ao surgimento de novos alvos terapêuticos que estão em investigação. A descoberta de que a LMM possui uma dependência pelo Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) despertou interesse em vários componentes da via do GM-CSF, como JAK2/STAT5 (Padron *et al.*, 2013; Padron *et al.*, 2016). Além disso, a ativação da via de sinalização da RAS/MAPK em alguns casos de LMM foram recentemente identificados (Papaemmanuil *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2017).

As vias da JAK/STAT5 e RAS/MAPK podem ser ativadas por RTKs, entre eles o EGFR. Portanto, a doxazosina pode ser um potencial agente antitumoral para LMM devido à sua ação sobre os RTKs e o EGFR.

1.5. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como uma prioridade da saúde pública global. Apesar de grandes avanços no entendimento da patogênese da DA, ainda não há tratamentos que modifiquem essa doença.

A demência é um dano cognitivo progressivo que afeta as atividades diárias e é a maior causa de dependência, incapacitação e mortalidade. Estimativas atuais sugerem que 50 milhões de pessoas vivem atualmente com demência, ao redor do mundo. Prevê-se que esse número deve mais do que triplicar até 2050 na medida em que a população envelhece e, nesse período, o custo anual com a demência pode exceder US\$ 600 bilhões, somente nos EUA (Alzheimer's Disease International, 2018). Na Inglaterra e País de Gales, a demência é a maior causa de morte, contabilizando 11,6% das mortes registradas em 2015. A DA é a maior causa de demência (50-70%) e é uma condição principal da velhice, praticamente dobrando em prevalência a cada 5 anos após os 65 anos de idade (Prince, 2014).

A etiologia da DA envolve uma combinação de fatores genéticos, moleculares e ambientais. Evidências epidemiológicas sugerem que educação e exercício físico podem proteger contra a DA, enquanto que hipertensão na meia-idade e diabetes aumentam o risco da doença (Xu *et al.*, 2015). Os mecanismos pelos quais os fatores de risco vasculares podem influenciar a DA ainda não estão esclarecidos. Acredita-se que eles possam aumentar o risco de DA através de dano cerebrovascular e que o dano vascular em si pode influenciar o desenvolvimento da DA diretamente (Xu *et al.*, 2015).

Indivíduos com DA pré-sintomática normalmente não apresentam qualquer sintoma antes de atingir o estágio de detecção clínica, conhecido como “comprometimento cognitivo leve (CCL)”. Uma certa porcentagem de pacientes que sofrem com CCL mantém sua função cognitiva ao longo do restante da vida, mas a maioria gradualmente converte de CCL para DA leve, DA moderada e, finalmente, estágio avançado da DA. O declínio cognitivo da manifestação clínica inicial dura de 10

a 15 anos em direção aos últimos estágios de um processo neurodegenerativo mais devastador. Durante a progressão da doença, pacientes com DA exibem muitas características clínicas, sendo que os deficits de memória são os sintomas mais prevalentes em todos os estágios (Xia, 2019).

1.5.1. Patologia da Doença de Alzheimer

O peptídeo β -amiloide ($A\beta$) apresenta uma importante função na patologia da DA (Selkoe, 2004). A nível molecular, as placas senis e os emaranhados neurofibrilares (NFT) são duas características neuropatológicas da DA. Mutações em genes que codificam a proteína precursora amiloide (APP) ou a presinilina (PS) causam DA familiar de início precoce, e uma ou duas cópias do alelo $\epsilon 4$ da apolipoproteína E (apoE) é um alto fator de risco para DA esporádica de início tardio (Haass *et al.*, 1992; Shoji *et al.*, 1992).

O $A\beta$ é gerado por clivagens sequenciais da APP por β - e γ -secretases. Primeiro, ocorre a proteólise da APP pela β -secretase (BACE1), gerando uma porção C-terminal de 12 kDa da APP (C99); em seguida, a C99 é clivada pela γ -secretase para gerar duas espécies principais do $A\beta$: uma terminando no resíduo 40 ($A\beta_{1-40}$) e outra terminando no resíduo 42 ($A\beta_{1-42}$). O $A\beta_{1-40}$ é o resíduo mais comum e estudos genéticos demonstram que mutações de sentido trocado em APP ou PS ligadas à DA familiar aumentam a razão do resíduo $A\beta_{1-42}$ em relação ao $A\beta_{1-40}$ e causam DA de início precoce (Jonsson *et al.*, 2012). Em relação à DA esporádica, os cérebros de pacientes com o alelo $\epsilon 4$ da apoE apresentam densidade aumentada de depósitos de $A\beta$, capacidade limitada em remover o $A\beta$, e neuroinflamação elevada (Castellano *et al.*, 2011) (figura 5).

O peptídeo $A\beta_{1-42}$ tem sido o alvo de pesquisas terapêuticas. Na DA, o $A\beta$ não ocorre como uma única espécie molecular; muitos outros peptídeos diferentes contendo $A\beta$ têm sido detectados no líquido cefalorraquidiano e/ou cérebro humano (Vigo-Pelfrey *et al.*, 1993; Portelius *et al.*, 2006). A isoforma mais comum *in vivo* é o $A\beta_{1-40}$. O aumento do acúmulo de $A\beta_{1-42}$ é particularmente associado com o desenvolvimento da DA. Os dois aminoácidos hidrofóbicos extras do $A\beta_{1-42}$ aumentam em grande medida a sua propensão à agregação (Jarrett *et al.*, 1993), levando à formação acelerada de pequenos oligômeros de $A\beta$, conjuntos intermediários maiores como protofibrilas e, eventualmente, as fibrilas típicas de aproximadamente 8 nm que são encontradas em abundância em placas neuríticas. Pequenos oligômeros solúveis de $A\beta$ têm sido relacionados a toxicidade

neuronal e dano sináptico (Walsh e Selkoe, 2004). A razão de $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$, ao invés da quantidade total de $A\beta$, está relacionada com a idade de início da DA familiar e com a quantidade de placas em modelos de camundongos (Deng *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007). O $A\beta_{1-42}$ constitui aproximadamente 10% de todas as espécies de $A\beta$ (Asami-Odaka *et al.*, 1995) e tem maior tendência a se agregar do que o $A\beta_{1-40}$ (Deng *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007). Além disso, o $A\beta_{1-40}$ pode ter um papel antagonístico de prevenir a agregação de $A\beta_{1-42}$ *in vivo* e *in vitro* (Kim *et al.*, 2007; Yan e Wang, 2007; Jan *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2009). Portanto, a inibição específica da atividade da γ -secretase para a geração de $A\beta_{1-42}$ é uma das estratégias para o tratamento da DA (De Strooper, 2007; Wolfe, 2007).

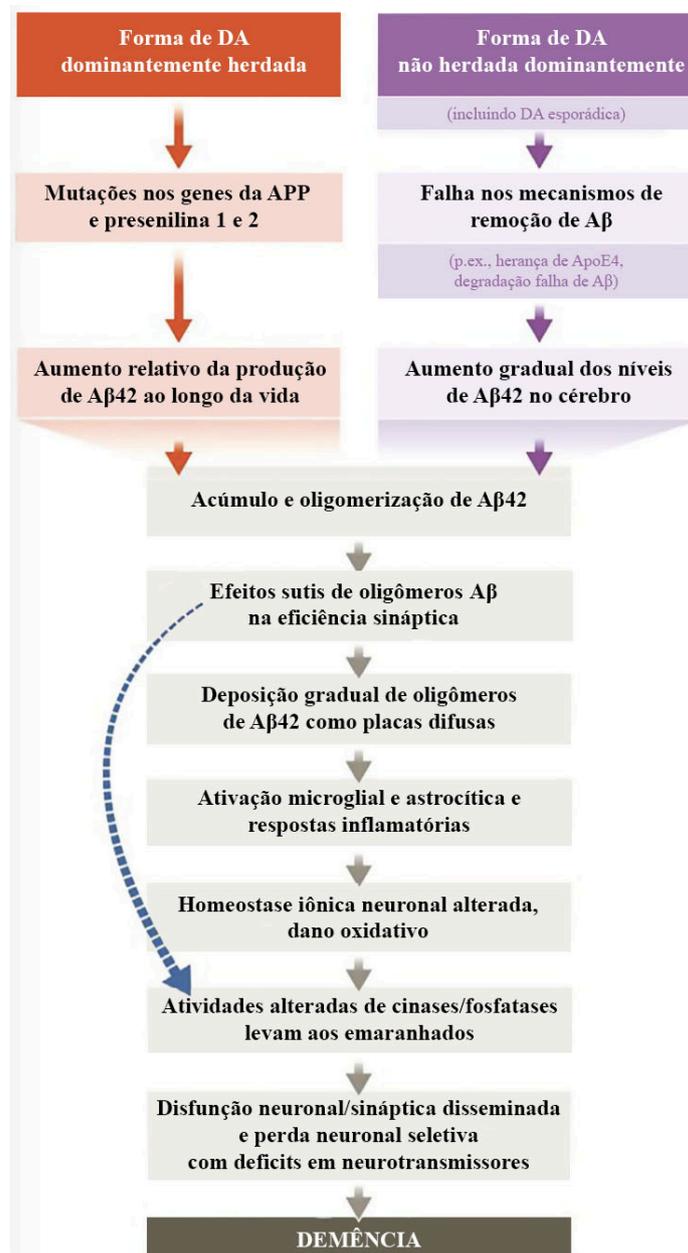


Figura 5. Visão geral dos principais eventos patológicos que levam à Doença de Alzheimer de acordo com a hipótese amiloide. A flexa azul curvada indica que os oligômeros A β podem causar dano sináptico e neurítico diretamente e induzir hiperfosforilação da tau, além de ativar cascatas de inflamação. Adaptado de Selkoe e Hardy, 2016.

O peptídeo A β está intimamente relacionado a uma segunda proteína da patologia da DA, a tau. A formação de NFTs ocorre pela deposição da proteína tau. Camundongos transgênicos expressando tau mutante demonstram uma relação próxima da mutação com a formação de NFTs e neurodegeneração (Lewis *et al.*, 2001). Além disso, tem sido demonstrado que o A β impulsiona a patologia da tau *in vivo* (Lee *et al.*, 2005). A principal função dessa proteína é estabilizar os microtúbulos responsáveis pela modulação da organização funcional do neurônio. Na DA, no entanto, a tau encontra-se hiperfosforilada e isso ocasiona no seu desprendimento dos microtúbulos, causando um acúmulo intracelular na forma de emaranhados helicoidais de filamentos pareados. A GSK-3 é uma de várias cinases associadas a microtúbulos responsáveis pela fosforilação da tau (Flaherty *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2000). Com o uso da tecnologia de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), foi demonstrado que iPSCs de pacientes com DA esporádica e familiar apresentam níveis muito elevados de A β_{1-40} , tau fosforilada (pTau) e GSK3 β ativa. Além disso, os níveis de A β , pTau e GSK3 β podem ser reduzidos por inibidores de β -secretase, indicando uma relação direta entre o substrato C99 da γ -secretase e ativação de GSK3 β /fosforilação da tau. Outros estudos têm demonstrado que células neuronais derivadas de iPSCs exibem níveis reduzidos de A β na presença de inibidor de BACE1 ou inibidores/moduladores de γ -secretase. Portanto, o A β e a tau estão envolvidas na patogênese da DA e são importantes alvos terapêuticos para esta doença (Yahata *et al.*, 2011; Israel *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014).

1.5.2. Tratamento

Até o momento, não existem fármacos que alterem a patologia ou o curso da DA. São utilizados apenas tratamentos sintomáticos que tentam contrabalancear os distúrbios existentes em neurotransmissores. Nenhum fármaco significativo para a DA foi aprovado nos últimos 14 anos, apesar de extensos ensaios clínicos (Lane *et al.*, 2018).

Inibidores da acetil-colinesterase (AChE), como donepezil, galantamina e rivastigmina, são utilizados como o principal tratamento sintomático, aumentando a disponibilidade de acetilcolina ao inibir a sua clivagem na sinapse. Essa classe de

fármacos demonstra efeito benéfico comprovado em DA leve a severa, com mais evidências para os estágios leve e moderado (Birks, 2006).

A memantina é um tratamento sintomático alternativo, licenciada para DA moderada a severa. Ela é um antagonista de baixa afinidade do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), com o objetivo de reduzir a neurotoxicidade excitatória do glutamato, sem interferir com as ações fisiológicas do neurotransmissor. A memantina tem demonstrado um benefício pequeno, mas clinicamente apreciável na cognição e declínio funcional em pacientes com DA moderada a severa (Mcshane *et al.*, 2006). Existem evidências para terapia combinatória com inibidores da acetil-colinesterase e a memantina. Um estudo de meta-análise recente encontrou uma evidência fraca para melhora cognitiva com a terapia dupla, mas houve evidência de melhora nos sintomas comportamentais (Schmidt *et al.*, 2015).

Com base no exposto acima e no potencial terapêutico da doxazosina, neste estudo a ação antitumoral desse fármaco foi testada em células de neuroblastoma e hemangioendotelioma, e também em uma linhagem de leucemia mielomonocítica (dados preliminares). Além disso, devido aos efeitos da doxazosina no SNC relatados na literatura e da relação inversa entre câncer e Alzheimer, também foi avaliado o potencial de neuroproteção do fármaco em um modelo *in vitro* da doença de Alzheimer.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar o potencial de reposicionamento da doxazosina contra tumores infantis e como neuroprotetora, em modelos *in vitro* de neuroblastoma, hemangioendotelioma, leucemia mielomonocítica e da doença de Alzheimer.

Objetivo Específico 1: Avaliar o efeito antitumoral da doxazosina em neuroblastoma

- 1) Analisar o efeito antitumoral da doxazosina na linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y;
- 2) Diferenciar as células SH-SY5Y para neurônios com ácido retinóico e avaliar os efeitos da doxazosina;
- 3) Verificar o envolvimento de algumas proteínas da via de sinalização EGFR/PI3K/Akt e p53 após o tratamento em células SH-SY5Y indiferenciadas e diferenciadas com ácido retinóico.

Objetivo Específico 2: Avaliar o efeito neuroprotetor da doxazosina em um modelo *in vitro* da Doença de Alzheimer

- 1) Analisar o efeito neuroprotetor da doxazosina em culturas organotípicas de hipocampo pré-tratadas com o fármaco e tratadas com o peptídeo beta-amiloide₁₋₄₂ para indução da doença de Alzheimer;
- 2) Verificar o envolvimento de algumas proteínas da via de sinalização EGFR/PI3K/Akt e p53, além da fosforilação da proteína tau.

Objetivo Específico 3: Avaliar o efeito antitumoral da doxazosina em hemangioendotelioma

- 1) Analisar o efeito antitumoral da doxazosina na linhagem de hemangioendotelioma murino EOMA;
- 2) Padronizar a formação de culturas 3D de esferoides tumorais com a linhagem celular EOMA;
- 3) Analisar o efeito antitumoral da doxazosina em culturas 3D de esferoides tumorais com a linhagem celular EOMA.

Objetivo Específico 4: Avaliar o efeito antitumoral da doxazosina em leucemia mielomonocítica

- 1) Avaliar a citotoxicidade da doxazosina na linhagem murina WEHI-3B.

3. CAPÍTULO I

Artigo: Dual Effect of Doxazosin: Anticancer Activity on SH-SY5Y Neuroblastoma Cells and Neuroprotection on an In Vitro Model of Alzheimer's Disease

Status: Publicado no periódico Neuroscience

Dual Effect of Doxazosin: Anticancer Activity on SH-SY5Y Neuroblastoma Cells and Neuroprotection on an *In Vitro* Model of Alzheimer's Disease

Bárbara Paranhos Coelho,* Mariana Maier Gaelzer,[†] Fernanda dos Santos Petry, Juliana Bender Hoppe, Vera Maria Treis Trindade, Christianne G. Salbego and Fátima T.C.R. Guma

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract—Several studies have demonstrated the antitumor effect of doxazosin, an α 1-adrenergic blocker, against glioma and breast, bladder and prostate cancers. Doxazosin is also being evaluated as a treatment for posttraumatic stress disorder (PTSD) and alcoholism, and α 1-adrenergic blockers have been linked to neuroprotection in neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's Disease (AD). Cancer and AD have an inverse relationship in many aspects, with several factors that contribute to apoptosis inhibition and proliferation being increased in cancers but decreased in AD. Neuroblastoma (NB) is a pediatric tumor derived from embryonic neural-crest cells, with an overall cure rate of 40%, despite aggressive treatment. Thus, due to the need of new therapeutic strategies against NB and neurodegenerative disorders and the inverse relationship between these diseases, we investigated whether doxazosin may serve as an antitumor and neuroprotective agent. We analyzed the drug's effects on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y human NB cells and on an in vitro model of organotypic hippocampal cultures exposed to amyloid- β . Doxazosin showed antitumor effect on undifferentiated NB cells by induction of apoptosis, necrosis, cell cycle arrest and decrease of p-EGFR_{Tyr1048} levels. On differentiated cells, doxazosin was less cytotoxic and increased p-EGFR_{Tyr1048}, p-Akt_{Ser473} and p-GSK-3 β _{Ser9} levels. Moreover, the drug was able to protect hippocampal slices from amyloid- β toxicity through prevention of GSK-3 β activation and of Tau hyperphosphorylation. Therefore, our results show that doxazosin has antitumor activity against undifferentiated NB and is neuroprotective on an in vitro model of Alzheimer's disease. © 2019 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: neuroblastoma, Alzheimer's disease, doxazosin, EGFR, SH-SY5Y, amyloid- β .

INTRODUCTION

Quinazolines are fused heterocycles and its derivatives present a diverse range of biological activities such as anticancer, antidepressant, antihypertensive, and many other. Several quinazoline derivatives are being investigated and used against several types of cancer for their antitumor activities as tyrosine kinase inhibitors, such as Gefitinib and Imatinib mesylate (Glivec®) (Meco et al., 2005; Tamura et al., 2007). Doxazosin is a selective α 1-adrenergic receptor

blocker that has a quinazoline scaffold and it is approved by the Food and Drug Administration (FDA) for treatment of hypertension and benign prostatic hyperplasia. Moreover, several studies demonstrate doxazosin's antitumor effects in glioblastomas (Gaelzer et al., 2016), breast cancer (Hui et al., 2008) and prostate cancer (Sakamoto and Kyrianiou, 2010). In the present study, we investigated the antitumor potential of doxazosin against neuroblastoma (NB).

NB is the most common solid tumor in childhood. This malignancy derives from embryonic neural-crest cells of the peripheral sympathetic nervous system and accounts for 15% of cancer-related deaths in children (Castel and Cañete, 2004). Treatment of high-risk NB involves tumor resection, high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation and treatment of minimal residual disease with retinoic acid to induce cell differentiation (Matthay et al., 1999; Moreno et al., 2017).

However, the overall cure rate for NB is 40%, despite aggressive treatment (Castel and Cañete, 2004). New therapeutic strategies against this cancer may expand the cure rate and improve the quality of life of patients. Due to the reported

*Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo, CEP 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.
E-mail address: coelhobarbarap@gmail.com (Bárbara Paranhos Coelho).

Abbreviations: A β , amyloid- β ; AD, Alzheimer's disease; ATRA, all-trans retinoic acid; EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor; FDA, Food and Drug Administration; NB, neuroblastoma; PI, propidium iodide; PTSD, posttraumatic stress disorder.

[†] Present Address: Department of Radiation Oncology, Miller School of Medicine/Sylvester Cancer Center, University of Miami, Miami, FL 33136, USA.

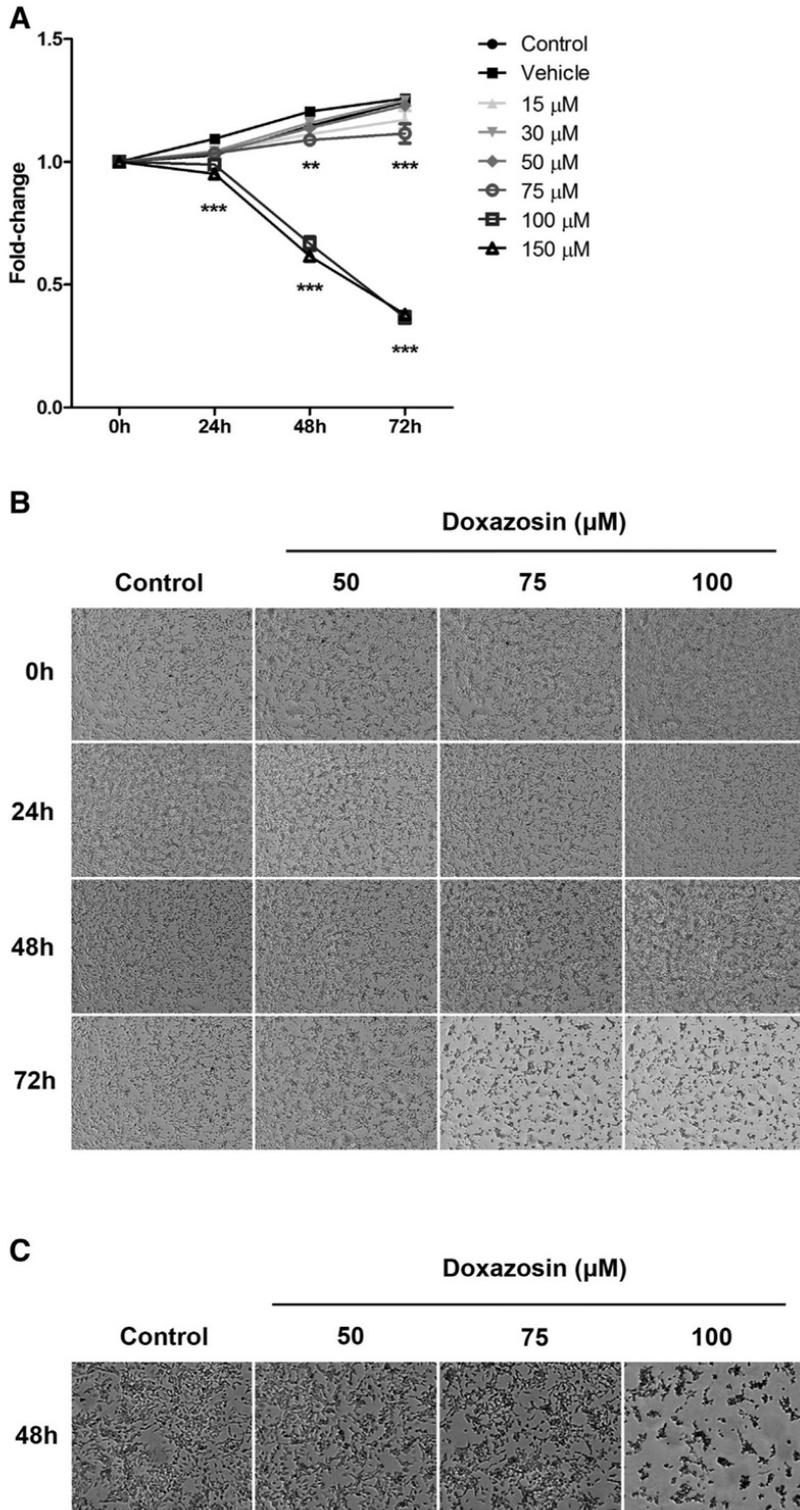


Fig. 1. Fold-change of confluence analysis of undifferentiated SH-SY5Y cells after doxazosin treatment for 24 h, 48 h and 72 h. **(A)** Graph of time versus confluence percentage. **(B)** Photomicrographs of cells after treatment in the different doxazosin concentrations and time-points. **(C)** Zoom of a portion of photomicrographs after treatment with doxazosin for 48 h. Data are expressed as means ± SEM (n = 4). **p < 0.01; ***p < 0.001 compared to control.

antitumor effects of doxazosin and the mild side effects that the drug presents, we sought to analyze the outcomes of doxazosin treatment on the human NB cell line SH-SY5Y. In gliomas, we previously showed that doxazosin induces apoptosis and cell cycle arrest through inhibition of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)/PI3K/Akt pathway and upregulation of GSK-3β and p53 (Gaelzer et al., 2016).

The tyrosine kinase EGFR is involved in cellular proliferation, inhibition of apoptosis and is abnormally activated in many epithelial tumors (Tang and Lippman, 1998; Wells, 1999). Indeed, NB cells express EGFR (Ho et al., 2005) and its signaling pathway has been correlated with cell cycle progression and cellular proliferation (Ho et al., 2005). Also, the increased chemotherapy-induced EGFR expression has been described in vincristine- and actinomycin-D-resistant NB cells (Meyers et al., 1988).

Akt (protein kinase B) is a major mediator of survival signals and is one of the targets for EGFR signaling. Akt regulates cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis (Kandel and Hay, 1999; Brazil et al., 2002). In this sense, Akt induces G1/S cell cycle progression through inactivation of GSK-3β, whereas Akt activation inhibits p53-mediated apoptosis (Kandel and Hay, 1999). In NB, high activation of Akt correlates with a poor outcome (Sartelet et al., 2008).

Human NB SH-SY5Y cells have high expression of EGFR and can be differentiated to a neuronal phenotype with retinoic acid treatment. Differentiated cells demonstrate a pronounced neuronal morphology with high expression of genes related to synapse vesicle cycle, dopamine synthesis/degradation, and dopamine transporter (Lopes et al., 2010).

Furthermore, doxazosin is less cytotoxic to rat organotypic hippocampal cultures than to glioblastoma cells (Gaelzer et al., 2016) and the drug is currently being tested in clinical trials for treatment of posttraumatic stress disorder (PTSD) and alcoholism (Kenna et al., 2016; Rodgman et al., 2016). This warrants further investigation on doxazosin's effect on neural cells and tissues and the drug's possible neuroprotective effect.

Organotypic hippocampal cultures are extensively used to investigate mechanisms and treatment strategies for central nervous system disorders. Our research group routinely uses organotypic cultures exposed to

amyloid- β (A β) peptide as an Alzheimer's disease (AD) model (Nassif et al., 2007; Hoppe et al., 2013; Arbo et al., 2017). The extracellular senile plaques that are responsible for the neurodegeneration in AD are formed by the accumulation and aggregation of A β peptide (Ittner and Götzt, 2011). A β_{1-42} is the most hydrophobic form of the A β peptide, is

more prone to form aggregates and it is the predominant isoform found in senile plaques (Selkoe, 2001). A β_{1-42} has elevated neurotoxic potential, interfering with synaptic plasticity, and significantly affecting several cellular signaling pathways (Selkoe, 2001). An increase in the levels of A β peptide is also accompanied by alterations in the activity of kinases and phosphatases, leading to Tau hyperphosphorylation and the formation of intracellular neurofibrillary tangles with consequent axonal transport damage (Takata and Kitamura, 2012). Moreover, the PI3K/Akt pathway is directly influenced by exposure to A β peptide, and this pathway is altered on the brain of patients with AD (Jimenez et al., 2011). One of the main targets of Akt is GSK-3 β , which can hyperphosphorylate the Tau protein (Avila et al., 2012).

Therefore, due to the described effects of doxazosin against PTSD and alcoholism, and the fact that the drug is less cytotoxic to neural cells than to glioma, in the present study we also tested the effect of doxazosin on neuronal-differentiated SH-SY5Y cells and whether it could protect rat organotypic hippocampal cultures against amyloid- β neurotoxicity.

There is a need for new therapeutic strategies against NB and AD that are not only effective against the disease but can also improve the patient's quality of life. Doxazosin is a potential antitumor adjuvant and neuroprotective agent, while presenting mild adverse effects. Here we showed that doxazosin demonstrates anticancer activity against NB cells in addition to having neuroprotective properties.

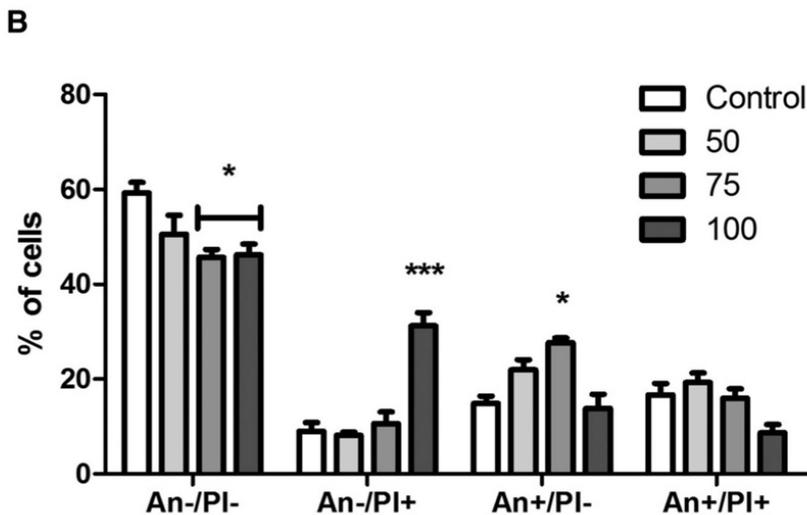
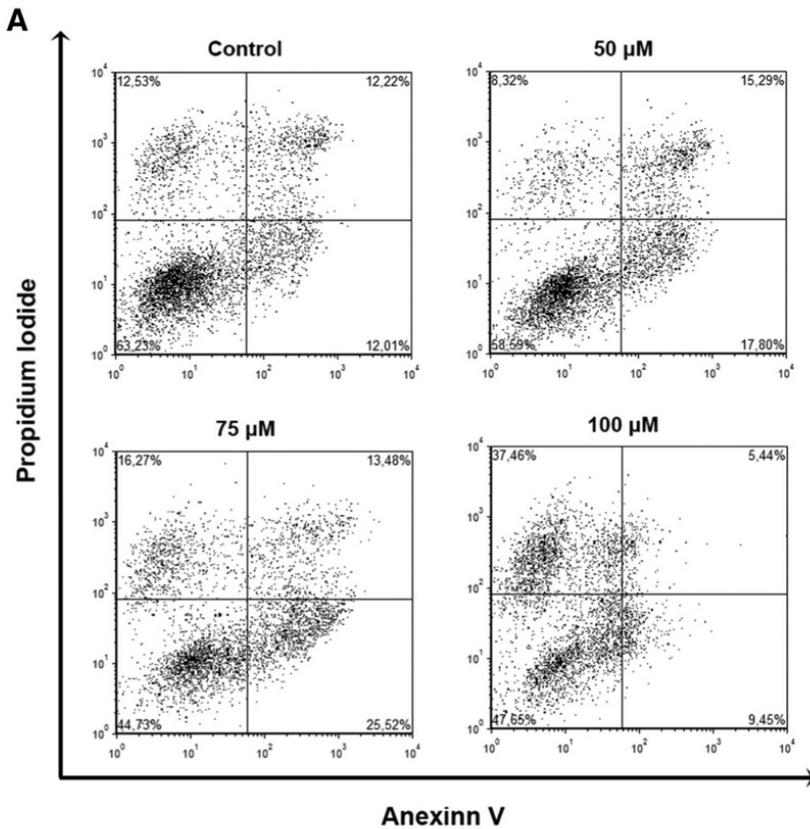


Fig. 2. Analysis of the type of cell death of undifferentiated SH-SY5Y cells after doxazosin treatment for 48 h. (A) Representative dot plot graph of cells stained with Annexin V (An) and PI. (B) Quantification of viable cells (An-/PI-), of necrosis (An-/PI+), early apoptosis (An+/PI-) and late apoptosis (An+/PI+). Data are expressed as means \pm SEM ($n = 4$). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ compared to control.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell culture

SH-SY5Y human NB cell line was obtained from American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, MD, USA). Cells were grown and maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with F12 medium (DMEM/F12, Gibco®, Life Technologies™, USA), containing 10% Fetal Bovine Serum (Cripion Biotecnologia Ltda., Andradina, SP, Brazil), 2.5 mg/mL Fungizone and 100 U/L of gentamicin (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Cells were kept at 37 °C, in an atmosphere of 5% CO₂. For induction of neuronal differentiation, cells were treated 24 h after seeding with 10 μ M of all-trans retinoic acid (ATRA, Enzo Life Sciences, USA) in DMEM/F12 medium with 1% Fetal Bovine Serum, in accordance with Lopes et al.

(2010), and media was replaced every 2 days. Treatments with ATRA-differentiated cells started on the 7th day of differentiation. Cell passaging was monitored, and cells were used only at passages in which differentiation induction occurred.

Organotypic hippocampal culture

Animal procedures were approved by local Animal Care Committee (Comissão de Ética no Uso de Animais/Universidade Federal do Rio Grande do Sul – CEUA/UFRGS) and follow national animal rights regulations (Law 11.794/2008), the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 80-23, revised 1996) and Directive 2010/63/EU. We further attest that all

efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Organotypic hippocampal slice cultures were prepared as previously described (Stoppini et al., 1991; Hoppe et al., 2013). Briefly, 400 µm-thick hippocampal slices were prepared from 6 to 8-days-old male Wistar rats (n = 12) using a Mclwain tissue chopper and separated in ice-cold Hank's balanced salt solution (HBSS) composed of (mM): glucose 36, CaCl₂ 1.26, KCl 5.36, NaCl 136.89, KH₂PO₄ 0.44, Na₂HPO₄ 0.34, MgCl₂ 0.49, MgSO₄ 0.44, HEPES 25; 1% fungizone and 0.1 mg/mL gentamicin, pH 7.2. Slices were placed on Millicell® culture membranes and the inserts were transferred to a six-well culture plate. Each well contained 1 mL of tissue culture medium consisting of Minimum Essential Media (MEM) with 25% of HBSS and 25% of horse serum supplemented with 36-mM glucose, 25-mM HEPES, 4-mM NaHCO₃, 1% fungizone and 0.1-mg/mL gentamicine, pH 7.3. Cultures were kept in an incubator at 37 °C and 5% CO₂ for 14 days.

Doxazosin and amyloid-β treatments

Doxazosin mesylate (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) was dissolved in 20% ethanol/milli-Q water (vehicle) and undifferentiated and ATRA-differentiated cells were treated for 24, 48 and 72 h with concentrations ranging from 15 to 150 µM.

For organotypic hippocampal cultures, doxazosin was added to the medium at concentrations of 50, 75, 100 and 150 µM, for 1 h prior to the addition of fibrillar Aβ_{1–42}. To obtain the fibrillar form of Aβ_{1–42} peptide, an aliquot of the stock solution was incubated at 37 °C during the 4 days preceding its use in culture (Hoppe et al., 2013). After 1 h of doxazosin pre-treatment, 2 µM of fibrillar Aβ_{1–42} was added to the culture medium for 48 h.

Imaging cytometry

For cell confluence analysis, imaging cytometry was performed using a SpectraMax i3 MiniMax 300 Imaging Cytometer plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) with the optical imaging module and transmitted light setting. Molecular Devices' StainFree™ Cell Detection Technology allows the performance of cell proliferation and cytotoxicity assays without stains. The StainFree technology enables estimation of cell confluency that is comparable to nuclear and whole-cell counts obtained using fluorescent dyes (Molecular Devices, 2019). Moreover, cells can be analyzed at any time without disrupting their growth.

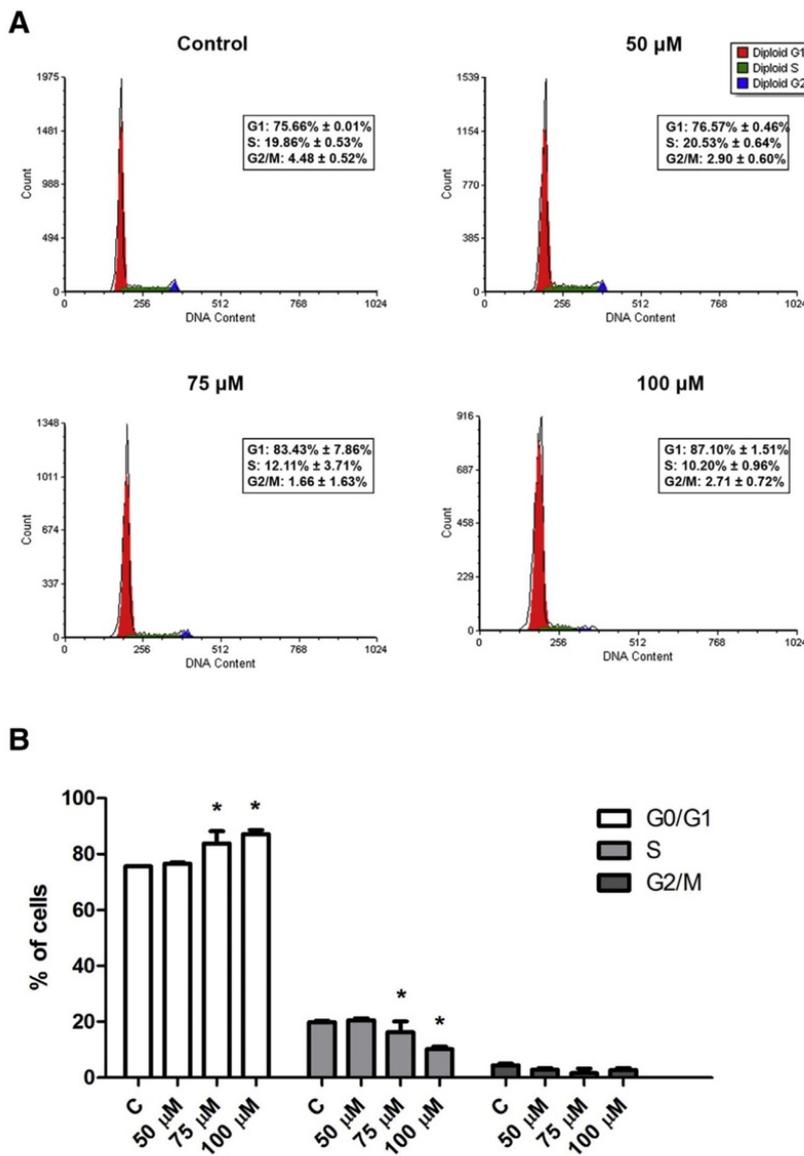


Fig. 3. Analysis of cell cycle phases on undifferentiated SH-SY5Y cells after doxazosin treatment for 48 h. (A) Representative histograms of DNA content of cells. (B) Quantification of the percentage of cells in each cycle phase. Data are expressed as means ± SEM (n = 4). *p < 0.05 compared to control.

For undifferentiated and ATRA-differentiated cells, photomicrographs were captured 24 h after seeding and before doxazosin treatment (time 0 h). Additional photomicrographs were captured without disturbing cell growth every 24 h and cell confluence per well was determined. This time course approach enabled the temporal analysis of cell proliferation and cytotoxicity.

Flow cytometry

Cell death was analyzed by flow cytometry. For undifferentiated and ATRA-differentiated cells, both floating and adherent cells were collected. Organotypic hippocampal slices were dissociated in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% collagenase IV and 0.2% trypsin and filtered through a 40 μm membrane (Millipore®). Annexin-V FITC/propidium iodide (PI) double stain kit was used, following the manufacturer's instructions (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Samples were incubated in binding buffer containing Annexin-V FITC and PI for 15 min in the dark at room temperature.

For cell cycle analysis, undifferentiated cells were seeded in 6-well plates (2×10^5 cells/well). After treatments, cells were washed with PBS, trypsinized and counted. Cells were centrifuged at $400 \times g$ for 5 min and suspended (10^6 cells/mL) in cell cycle buffer (3.5 mM trisodium citrate and 0.5 mM Tris, pH 7.6) containing RNase A

(100 $\mu\text{g/mL}$), 0.05% Nonidet and PI (5 $\mu\text{g/mL}$), for 15 min in the dark at room temperature.

For protein analysis, undifferentiated and ATRA-differentiated cells were trypsinized, while organotypic hippocampal slices were dissociated as described above. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min, centrifuged at $400 \times g$ for 5 min and incubated for 40 min in PBS containing 0.1% Triton X-100 and the following primary antibodies: rabbit anti-p-EGFR_{Tyr1068} (1:50, Cell Signaling Technology), rabbit anti-p-Akt_{Ser473} (1:50, Cell Signaling Technology), rabbit anti-p-GSK-3 β _{Ser9} (1:50, Cell Signaling Technology), rabbit anti-p-p53_{Ser15} (1:50, Cell Signaling Technology), mouse anti-Tau (1:50, Cell Signaling Technology) and mouse anti-p-Tau_{Ser396} (1:50, Cell Signaling Technology). Then, secondary goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 antibody (1:100, Invitrogen) or goat anti-mouse Alexa Fluor 568 antibody (1:100, Invitrogen) was added and, after incubation for 40 min, fluorescence intensity was measured by flow cytometry.

For experiments with undifferentiated and ATRA-differentiated cells, a total of 10,000 events were acquired; for organotypic cultures, a total of 30,000 events were acquired by a BD FACSCalibur™ flow cytometer (BD Bioscience, Mountain View, CA, USA). The obtained data were analyzed with FCS Express 6 Software (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA).

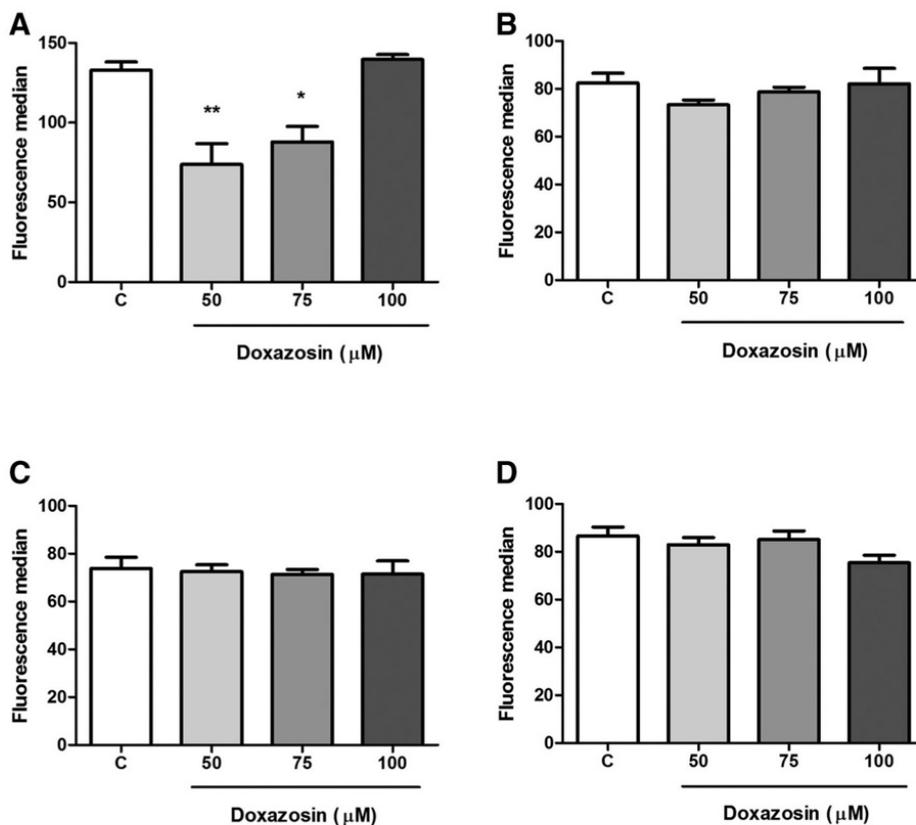


Fig. 4. Protein levels of (A) p-EGFR_{Tyr1068}, (B) p-Akt_{Ser473}, (C) p-GSK-3 β _{Ser9} and (D) p-p53_{Ser15} on undifferentiated SH-SY5Y cells after 48 h doxazosin treatment. Data are expressed as means \pm SEM ($n = 6$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to control.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. All results are representative of at least 4 independent experiments with triplicate determinations for each experiment, for undifferentiated and ATRA-differentiated cultures. Sampled distributions passed normality and equal variances test. Analysis of variance (ANOVA) was applied to the means to determine statistical differences between experimental groups. Post hoc comparisons were performed by Tukey test. Differences between mean values were considered significant when $p < 0.05$. Statistical analyses were carried out using the GraphPad Prism 5 software.

RESULTS

The effect of concentration and time of doxazosin treatment on undifferentiated cells was assessed by dose-effect curves. The choices of concentration

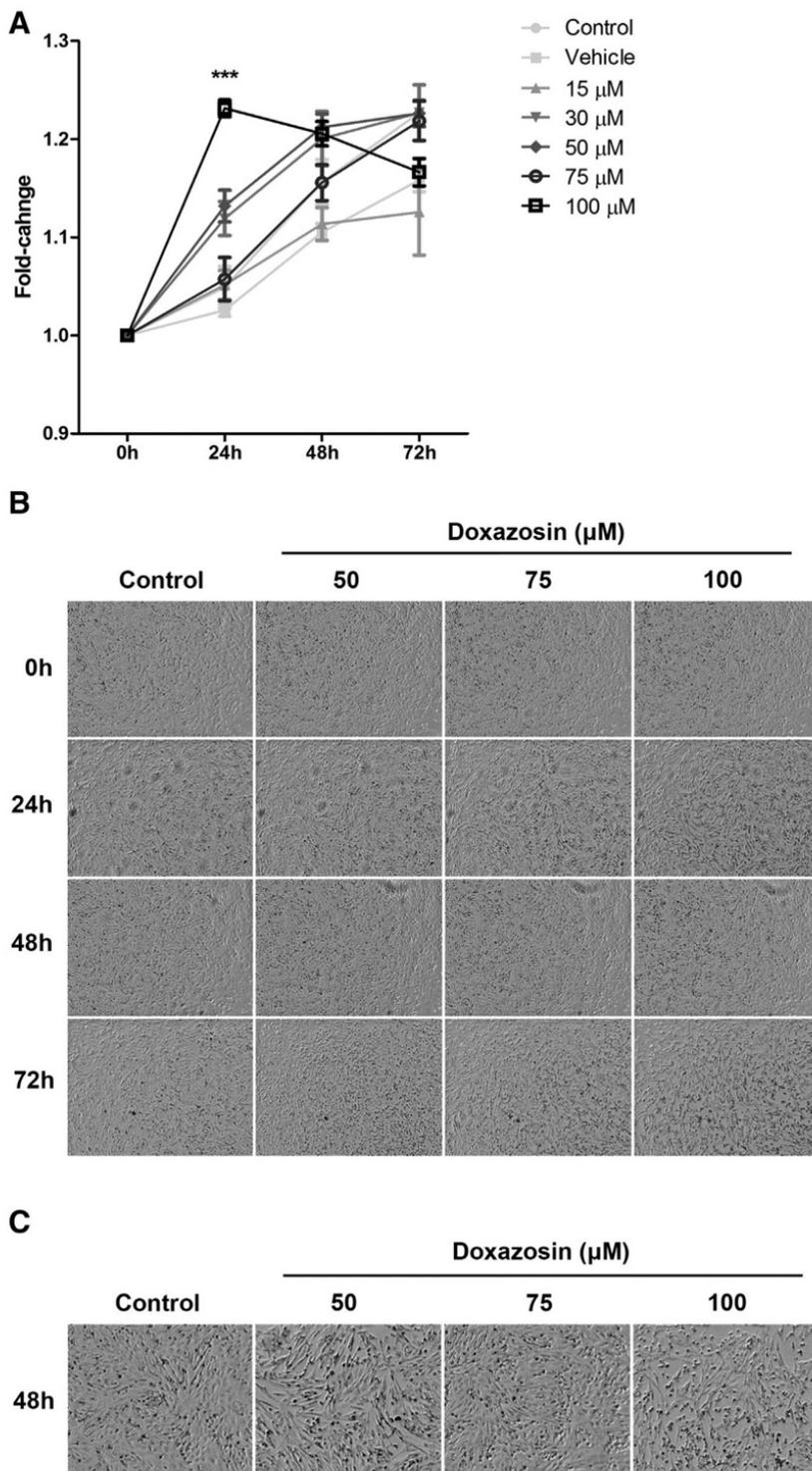


Fig. 5. Fold-change of confluence analysis of differentiated SH-SY5Y cells after doxazosin treatment for 24 h, 48 h and 72 h. (A) Graph of time versus confluence percentage. (B) Photomicrographs of cells after treatment in the different doxazosin concentrations and time-points. (C) Zoom of a portion of photomicrographs after treatment with doxazosin for 48 h. Data are expressed as means \pm SEM ($n = 4$). *** $p < 0.001$ compared to control.

and treatment times were based on previous work by our research group (Gaelzer et al., 2016). Regarding cell confluence analysis (Fig. 1), cells treated with 75 μ M doxazosin

proliferated at a much lower rate compared to control. Doxazosin at 100 and 150 μ M remarkably decreased cell confluence of undifferentiated cells from 24 h of treatment. Since the confluence of cells treated with 75 μ M of doxazosin increased less than the control, doxazosin had a cytostatic effect at this concentration. At 100 and 150 μ M, doxazosin was cytotoxic to the undifferentiated cells because the confluence at time 0 h was higher than times 48 and 72 h of treatment. In light of these results, we chose the concentrations of 50, 75 and 100 μ M and the time-point of 48 h for the other experiments with undifferentiated cells.

On undifferentiated NB cells, doxazosin treatment for 48 h induced death by apoptosis or necrosis. As shown in Fig. 2, apoptosis was increased in cells treated with 75 μ M, while treatment with 100 μ M leads to extensive necrotic death. Therefore, the type of cell death elicited by doxazosin was different depending on the drug concentration used.

Also, cell cycle analysis of undifferentiated cells (Fig. 3) shows a lower percentage of S-phase cells at 75 and 100 μ M. This result indicates a cell cycle arrest in G0/G1-phase and it is in agreement with the cytostatic effects on cell proliferation shown in Fig. 1.

At 50 and 75 μ M, doxazosin decreased EGFR_{Tyr1068} phosphorylation in undifferentiated cells (Fig. 4A). This, however, was not accompanied by reduction in p-Akt_{Ser473} and p-GSK-3 β _{Ser9} levels (Fig. 4B and C). Phosphorylation of p53 protein on Ser15 was unaltered by doxazosin treatment (Fig. 4D). Therefore, the decrease of p-EGFR_{Tyr1068} levels caused by doxazosin occurred in specific drug concentrations.

We then tested the concentration and time curves used for undifferentiated cells on ATRA-differentiated cells. As covered by the literature (Lopes et al., 2010), ATRA induces neuronal differentiation of SH-SY5Y NB cells.

On ATRA-differentiated cells, doxazosin increased cell confluence at 100 μ M at 24 h (Fig. 5). We found that doxazosin slightly increased necrosis at 50 μ M and apoptosis at 75 and 100 μ M (Fig. 6). Therefore, doxazosin was less cytotoxic to ATRA-differentiated cells compared to NB undifferentiated cells.

At 100 μ M, doxazosin increased EGFR_{Tyr1068} phosphorylation in ATRA-differentiated cells (Fig. 7A), while increasing p-Akt_{Ser473} and p-GSK-3 β _{Ser9} levels (Fig. 7B and C). On the other hand, 50 and 75 μ M

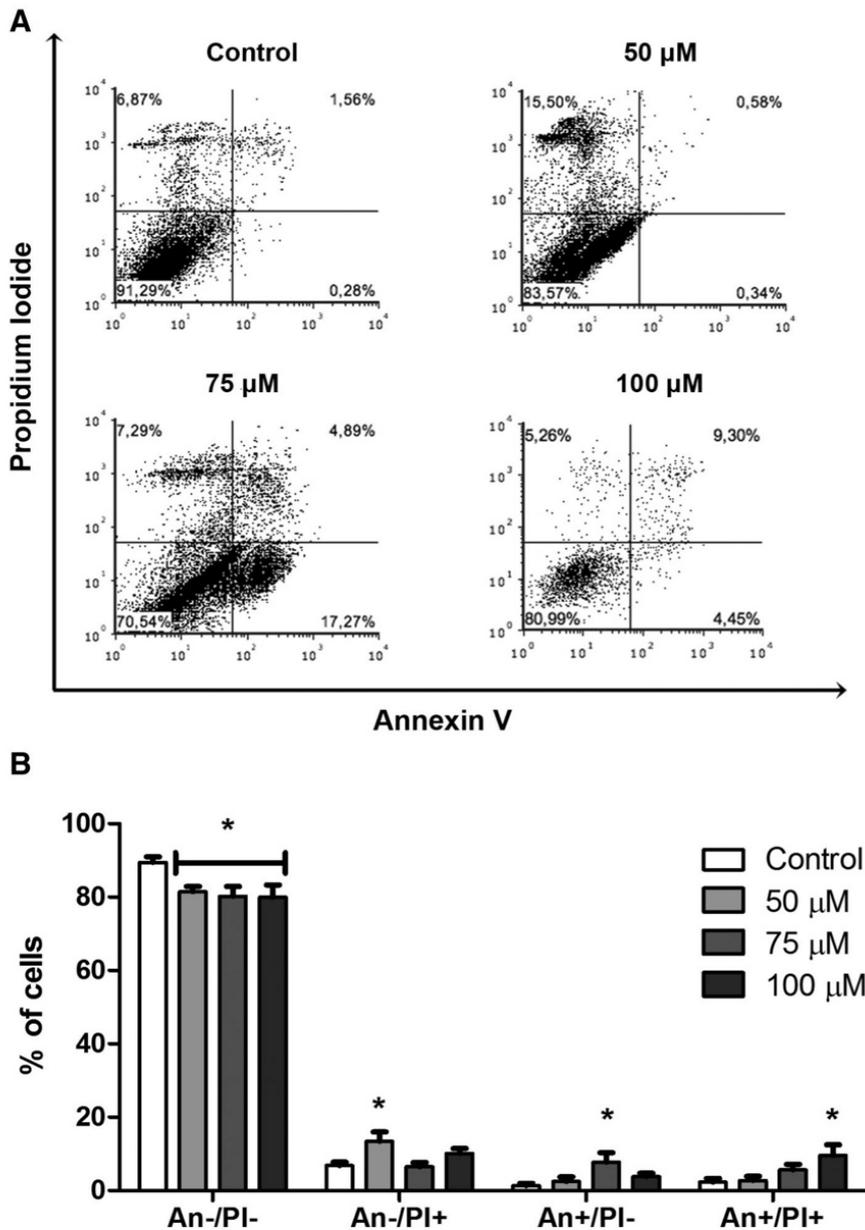


Fig. 6. Analysis of the type of cell death of differentiated SH-SY5Y cells after doxazosin treatment for 48 h. (A) Representative dot plot graph of cells stained with An and PI. (B) Quantification of viable cells (An-/PI-), of early apoptosis (An+/PI-), late apoptosis (An+/PI+) and necrosis (An-/PI+). Data are expressed as means \pm SEM (n = 4). *p < 0.05 compared to control.

doxazosin increased p-p53_{Ser15} levels (Fig. 7D). Thus, doxazosin's effects on the EGFR/Akt/GSK-3 β pathway and on p53 activation varied according to the drug concentration.

The results of doxazosin's effects on ATRA-differentiated cells indicate that the drug can have different biological activities on neural cells compared to cancer cells. Thus, we sought to analyze if doxazosin could have a neuroprotective effect on organotypic hippocampal cultures challenged with fibrillar A β ₁₋₄₂ treatment. We treated the cultures with 50, 75, 100 and 150 μ M doxazosin for 1 h, added fibrillar A β ₁₋₄₂ and incubated for 48 h. As expected, fibrillar A β ₁₋₄₂

alone induced apoptosis on hippocampal slices (Fig. 8). Doxazosin protected the cultures from fibrillar A β ₁₋₄₂ toxicity at all concentrations, since the percentage of apoptotic cells decreased compared to A β ₁₋₄₂ alone and, at 150 μ M, the percentage of apoptosis was similar to the control (Fig. 8). Moreover, the percentage of cell death from treatment with doxazosin alone remained unaltered (Fig. 8). Therefore, doxazosin demonstrated a neuroprotective effect against A β ₁₋₄₂ peptide.

Next, we evaluated the effects of doxazosin pretreatment followed by fibrillar A β ₁₋₄₂ treatment on the EGFR/Akt/GSK-3 β pathway, p-p53 levels and p-Tau_{Ser396}/Tau ratio (Fig. 9). Similar to what was observed for differentiated NB cells, doxazosin alone increased EGFR phosphorylation (Fig. 9A). Pretreatment with doxazosin followed by treatment with A β ₁₋₄₂, however, did not alter p-EGFR levels. A β ₁₋₄₂ alone decreased p-Akt levels and 100- μ M doxazosin pretreatment prevented this decrease (Fig. 9B). Accordingly, A β ₁₋₄₂ treatment alone decreased GSK-3 β phosphorylation in Ser 9 (Fig. 9C), while pretreatment with 150 μ M doxazosin almost prevented this decrease (A β vs. D150 + A β , p = 0.0663). Phosphorylation of p53 protein remained unaltered for all treatments (Fig. 9D). Moreover, p-Tau/Tau ratio increased in hippocampal slices treated with A β ₁₋₄₂ alone, while pretreatment with doxazosin prevented Tau phosphorylation (Fig. 9E). Therefore, doxazosin neuroprotection from A β ₁₋₄₂ toxicity occurred via sustained activation of Akt, with consequent inhibition of GSK-3 β and Tau phosphorylation.

DISCUSSION

NB is a pediatric tumor with elevated heterogeneity, with a subset of cases presenting spontaneous regression while others show aggressive tumor growth and poor response to therapy (Meco et al., 2005). In children over 1 year with metastatic disease the outcome is very poor, despite aggressive therapy (Castel and Cañete, 2004). Moreover, current NB chemotherapy presents severe systemic side effects and its prolonged use interferes with childhood development, greatly affecting the patient's quality of life. Therefore, there is a need for the development of novel agents with a better

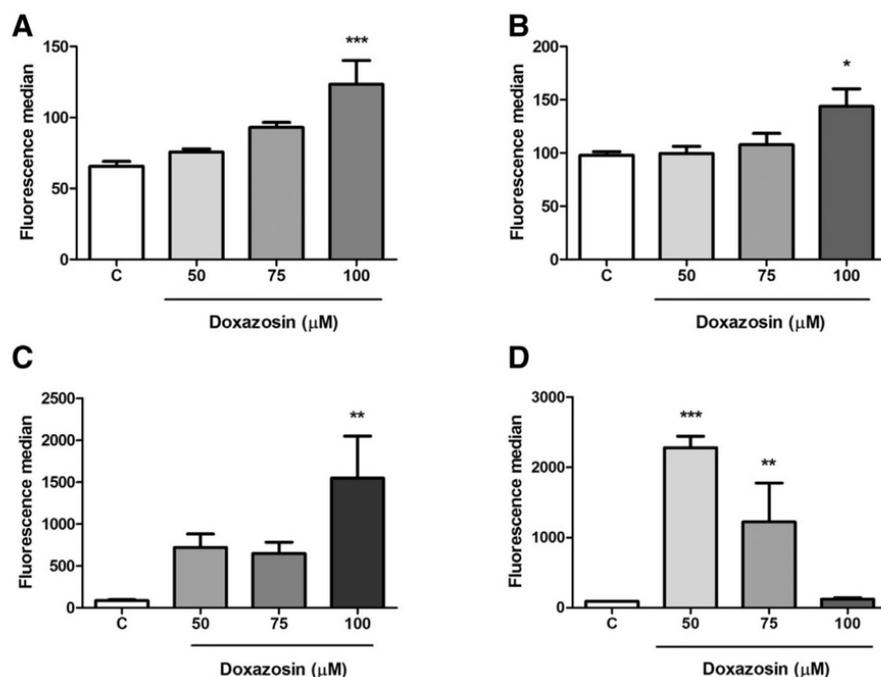


Fig. 7. Protein levels of (A) p-EGFR_{Tyr1068}, (B) p-Akt_{Ser473}, (C) p-GSK-3β_{Ser9} and (D) p-p53_{Ser15} in proliferative SH-SY5Y cells after 48 h doxazosin treatment. Data are expressed as means ± SEM (n = 6). *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 compared to control.

antitumor selectivity to reduce mortality and morbidity of the disease. Doxazosin is an FDA approved drug with mild side effects, like dizziness and hypotension (Lepor, 2007).

In the present study, doxazosin induced NB cells death and cytostasis, and decreased EGFR_{Tyr1068} phosphorylation. Tamura et al. (2007) showed that 10 μM gefitinib inhibits EGFR phosphorylation in NB cells, while the needed concentrations to induce apoptotic cell death and cytostasis were 2 to 3-fold higher. In addition, we observed that the decrease in EGFR phosphorylation was not accompanied by a decrease in Akt_{Ser473} phosphorylation. Mecco et al. (2005) demonstrated that imatinib mesylate induced inhibition of NB cells growth and inhibited ligand-induced phosphorylation of the tyrosine kinases c-kit and Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR). However, *in vivo*, the phosphorylation of the downstream effectors Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) and Akt was not affected by the treatment with imatinib mesylate (Mecco et al., 2005). We observed a similar variation of response on undifferentiated SH-SY5Y cells to doxazosin, which means different outcomes can be expected with different drug concentrations. This may be explained by the fact that doxazosin has been shown to bind to some types of tyrosine kinase receptors (Hui et al., 2008; Petty et al., 2012; de Marcondes et al., 2016). Furthermore, the effect of EGF on its receptor depends on ligand concentration in NB cells. Stimulation of NB cells growth by EGF occurs with concentrations between 5 and 20 and 150–250 ng/mL, and this effect is mediated by p-Akt and p-GSK-3β; however, cell growth decreased at concentrations ranging between 50 and 100 ng/mL (Chiu et al., 2006). Therefore, the

responses of NB cells to quinazoline derivatives appear to involve multiple mechanisms of action.

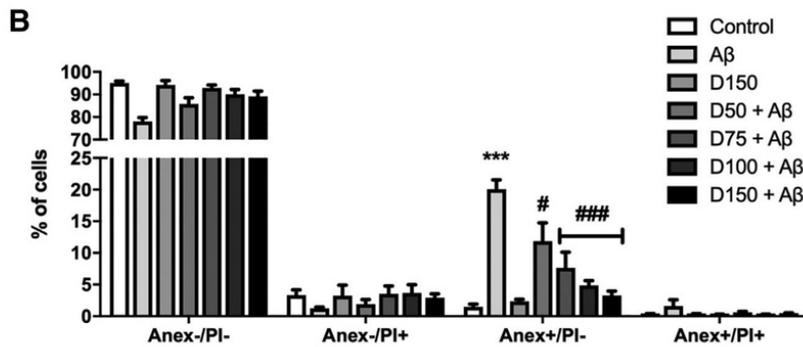
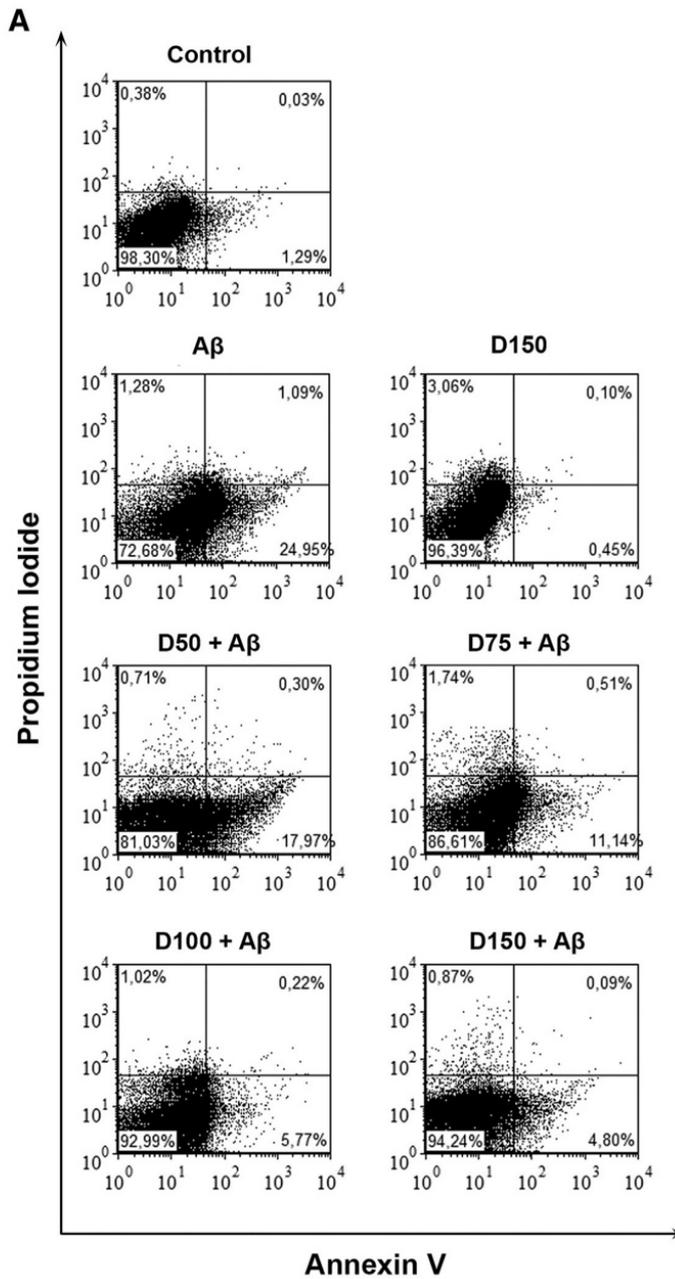
In addition, it is well-known that activation of EGFR by different ligands causes distinct downstream biological activities. For instance, the physiological EGFR ligands Epidermal growth factor (EGF) and Neuregulin (NRG) can stimulate the ERK1/2, Protein kinase C (PKC) and Akt pathways (Wee and Wang, 2017). Therefore, in the present study, doxazosin decrease of p-EGFR_{Tyr1068} levels may be targeting downstream pathways other than Akt.

The p53 protein is a tumor suppressor activated by various types of cellular stresses and is involved with induction of programmed cell death and cell cycle arrest (Lane and Levine, 2010). In the present study, doxazosin-induced cell death and apoptosis on undifferentiated NB cells without altering p-p53_{Ser15} levels. Gong et al. (2017) showed that the alkaloid (–)-curine-induced G0/G1 arrest and cell death regardless of p53 status in hepatocellular carcinoma cells.

In addition, there are several reports on apoptosis and cell cycle arrest induction independent of p53 for proliferating lymphoid cells (Strasser et al., 1994), MCF7 breast cancer cells (Etti et al., 2017), HCT116 colorectal carcinoma cells (Park et al., 2017), among others. Our findings suggest that the induction of undifferentiated NB cells death and G0/G1 arrest are independent of p53 signaling.

Regarding ATRA-differentiated SH-SY5Y cells, treatment with doxazosin maintained the neuronal morphology of the cells and induced a slight increase in cell death compared to the control. A long-standing paradigm had been that p53 regulates apoptosis but have no control over necrosis. Recently, however, Tu et al. (2009) showed that H₂O₂-induced necrosis on *Bax* and *Bak* double-knockout mouse fibroblasts was mediated by p53 signaling. Moreover, Vaseva et al. (2012) found a direct necrotic signaling mediated by p53 in response to oxidative stress, in addition to the p53 apoptotic induction. Therefore, the increase of p-p53 after 50-μM doxazosin treatment may be related to the induction of necrosis observed. However, more experiments are needed to determine if this occurs. Anyway, the cell death induction observed in differentiated NB cells was minimal and may not have a biological relevance.

We showed in this study that 100-μM doxazosin induced a slight increase in apoptosis in differentiated SH-SY5Y cells, but with concomitant increase in p-EGFR_{Tyr1068}, p-Akt_{Ser473} and p-GSK-3β_{Ser9} levels (Fig. 8). The PI3K/Akt/GSK-3β pathway is known to play an important role in neuronal cell survival and to be affected in several injuries and neurodegenerative disorders (Lee et al., 2008; de Oliveira et al.,



2012). GSK-3β dysregulation, especially, is well described as participating in various cellular processes involved with the pathology of neurodegenerative diseases, such as Parkinson's and Alzheimer's (Hanger and Noble, 2011; Avila et al., 2012). Malagelada et al. (2008) found that phospho-Akt/total Akt ratio is decreased in patients with PD, and Akt signaling activation protects murine dopaminergic neurons treated with the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Furthermore, our research group has shown that doxazosin induces apoptosis in glioma cells but show no neurotoxicity on organotypic hippocampal cultures in the same concentration, being selective towards tumor cells (Gaelzer et al., 2016). Thus, we tested whether the activation of the PI3K/Akt/GSK-3β pathway by doxazosin could have a neuroprotective effect in an organotypic hippocampal culture model of AD.

The present study showed that doxazosin not only causes selective toxicity towards tumor cells, but also presents neuroprotective effects. The drug prevented the apoptosis induction caused by Aβ₁₋₄₂ through prevention of Tau phosphorylation. The main function of Tau is to stabilize microtubules, by regulating their polymerization/depolymerization, and to regulate motor-driven axonal transport (Goedert et al., 2006; Querfurth and Laferla, 2010). Hyperphosphorylated Tau, however, detach from the microtubule, leading to its destabilization and to deposition of Tau protein in the form of neurofibrillary tangles in the cellular body and dendrites of neurons (Goedert et al., 2006; Querfurth and Laferla, 2010). GSK-3β is the main protein involved with Tau phosphorylation (Avila et al., 2012). Although there was only a statistical tendency of maintenance of p-GSK-3β levels by doxazosin pretreatment in this study, this could have contributed for the inhibition of Tau phosphorylation.

Moreover, we found that doxazosin alone increased p-EGFR levels on organotypic hippocampal cultures. Although this indicates that the neural effect of the drug involves EGFR signaling, an α-1-adrenergic receptor (α1-AR) signaling should also be considered. Doxazosin's effects on PTSD and alcoholism treatment are believed to involve its α1-AR antagonism, but the mechanism of action is largely unknown (Funk et al., 2016; Petrakis and Simpson, 2017). ARs are distributed throughout the brain and their signaling has been investigated in AD (reviewed in D Femminella et

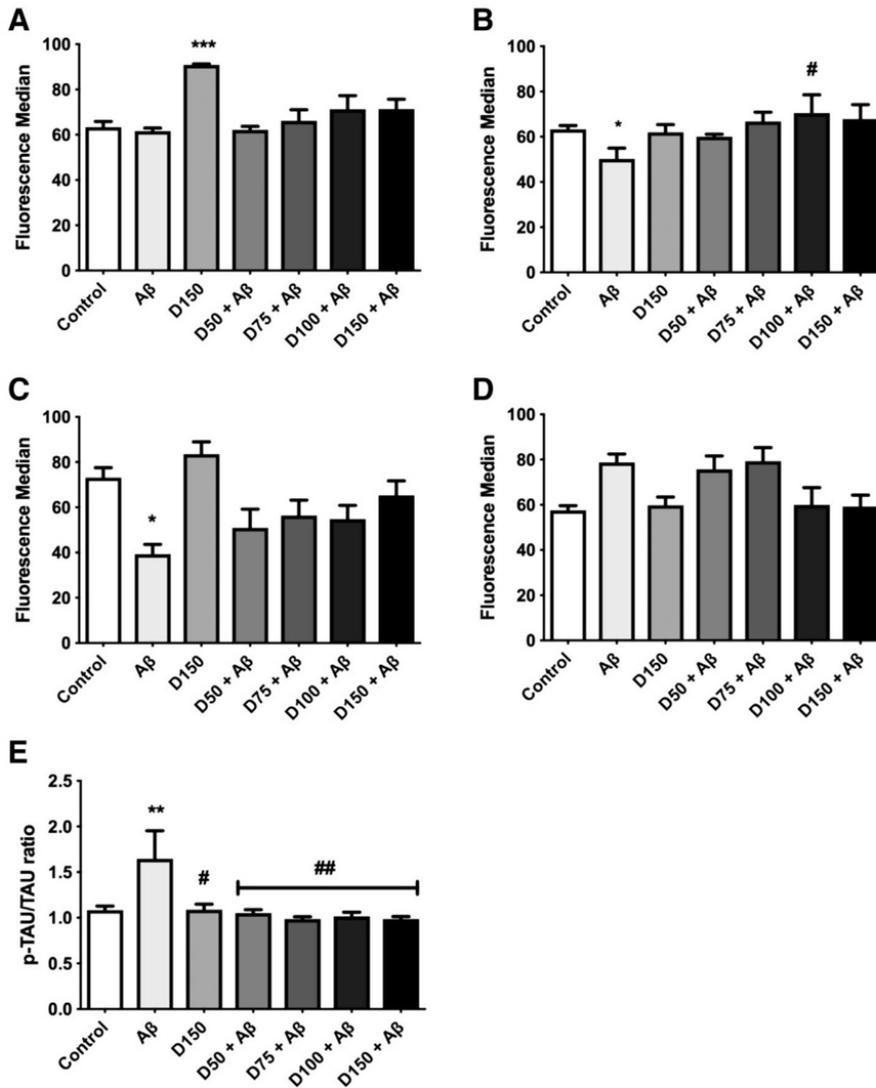


Fig. 9. Protein levels of (A) p-EGFR_{Tyr1068}, (B) p-Akt_{Ser473}, (C) p-GSK-3β_{Ser9}, (D) p-p53_{Ser15} and p-Tau/Tau_{Ser396} ratio on organotypic hippocampal cultures after doxazosin pretreatment for 1 h followed by addition of fibrillar Aβ_{1–42} for 48 h. Concentrations of doxazosin are expressed as μM. Data are expressed as mean ± SEM (n = 12). *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 compared to control. #p < 0.05, ##p < 0.01 compared to Aβ alone.

al., 2016). In addition, treatment of a mice model of AD with prazosin, an α1-AR antagonist, prevented memory deficits over time (Katsouri et al., 2012).

On the other hand, in a systematic review by Shafi (2016), the author highlights the inverse relationship between AD and cancer. Epidemiological studies have demonstrated that elderly with cancer have a decreased risk of AD dementia and vice versa (Realmuto et al., 2012; Musicco et al.,

2013). Moreover, while growth factors are neuroprotective, they are also involved in tumor growth. For example, EGFR is overexpressed in cancer, but the receptor is absent in AD neuritic plaques; and EGF is involved with hippocampal neurogenesis and improvement of cognitive function (Huang and Reichardt, 2001; Montano and Djamgoz, 2004; Mattson, 2008; Yang et al., 2013). This inverse relationship hypothesis explains the results we found in the present study. Doxazosin could be acting on the EGFR and the outcomes of the treatment are dependent on the status of the cell/tissue being treated: in cancer cells the drug is antiproliferative and induces cell death, while in ATRA-differentiated cells the drug increased proliferation (Fig. 5, 100 μM, 24 h) and in organotypic hippocampal cultures challenged with fibrillar Aβ_{1–42} doxazosin prevented apoptosis and Tau phosphorylation. However, further studies are required to elucidate the precise mechanism of action of the drug on undifferentiated NB cells and against neuronal injury.

Drug repurposing or repositioning is the use of a drug for another indication than the one it was originally approved (Sleire et al., 2017). Doxazosin is an anti-hypertensive that already has been repurposed with FDA approval for benign prostatic hyperplasia and it is under evaluation in clinical studies for treatment of PTSD and alcoholism. Our data suggest that doxazosin may be a potential drug for NB treatment and as a neuroprotective agent. Repurposing of drugs that may act as adjuvants to other anti-tumor or neuroprotective

therapies could be a very useful strategy for treatment of NB or AD and could also be used to improve patient's quality of life. Pharmacology and safety profile of doxazosin is well characterized in humans and its side effects are mild. Moreover, Kyprianou and Benning (Kyprianou and Benning, 2000) showed that the therapeutic doses of doxazosin with anticancer activity in mice (3 to 100 mg/kg) are compared to intracellular concentrations of the drug that are effective

Fig. 8. Analysis of the type of cell death on organotypic hippocampal cultures after doxazosin pretreatment for 1 h followed by addition of fibrillar Aβ_{1–42} for 48 h. (A) Representative dot plot graph of cells stained with An and PI. (B) Quantification of viable cells (An-/PI-), of necrosis (An-/PI+), early apoptosis (An+/PI-) and late apoptosis (An+/PI+). Concentrations of doxazosin are expressed as μM. Data are expressed as means ± SEM (n = 12). ***p < 0.001 compared to control. #p < 0.05, ####p < 0.001 compared to Aβ alone.

against human prostate cancer cells *in vitro* (100 μM). Thus, our study suggests that doxazosin should be further evaluated, and its mechanism of action investigated, for the treatment of NB and AD.

FUNDING

This study was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

REFERENCES

- Arbo B, Hoppe J, Rodrigues K, Garcia-Segura L, Salbego C, Ribeiro M. (2017) 4'-Chlorodiazepam is neuroprotective against amyloid-beta in organotypic hippocampal cultures. *J Steroid Biochem Mol Biol* 171:281-287.
- Avila J, León-Espinosa G, García E, García-Escudero V, Hernández F, DeFelipe J. (2017) Tau phosphorylation by GSK3 in different conditions. *Alzheimers Dis* 2012.
- Brazil DP, Park J, Hemmings BA. (2017) PKB binding proteins: getting in on the Akt. *Cell* 111:293-303.
- Castel V, Cañete A. (2017) A comparison of current neuroblastoma chemotherapeutics. *Expert Opin Pharmacother* 5:71-80.
- Chiu B, Mirkin B, Madonna MB. (2017) Mitogenic and apoptotic actions of epidermal growth factor on neuroblastoma cells are concentration-dependent. *J Surg Res* 135:209-212.
- D Femminella G, Leosco D, Ferrara N, Rengo G. (2017) Adrenergic drugs blockers or enhancers for cognitive decline? What to choose for Alzheimer's disease patients? *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 15. p. 665-671.
- Etti IC, Rasedee A, Hashim NM, Abdul AB, Kadir A, Yeap SK, Waziri P, Malami I, Lim KL, Etti CJ. (2017) Artonin E induces p53-independent G1 cell cycle arrest and apoptosis through ROS-mediated mitochondrial pathway and livin suppression in MCF-7 cells. *Drug Des Devel Ther* 11:865.
- Funk D, Coen K, Tamadon S, Li Z, Loughlin A, Lê A. (2017) Effects of prazosin and doxazosin on yohimbine-induced reinstatement of alcohol seeking in rats. *Psychopharmacology* 233:2197-2207.
- Gaelzer MM, Coelho BP, De Quadros AH, Hoppe JB, Terra SR, Guerra MCB, Usach V, Guma FCR, Gonçalves CAS, Setton-Avruj P. (2017) Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway inhibition by doxazosin promotes glioblastoma cells death, upregulation of p53 and triggers low neurotoxicity. *PLoS One* 11e0154612.
- Goedert M, Klug A, Crowther RA. (2017) Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 9:195-207.
- Gong S, Xu D, Zou F, Peng R. (2017) (-)-Curine induces cell cycle arrest and cell death in hepatocellular carcinoma cells in a p53-independent way. *Biomed Pharmacother* 89:894-901.
- Hanger DP, Noble W. (2017) Functional implications of glycogen synthase kinase-3-mediated tau phosphorylation. *Alzheimers Dis* 2011.
- Ho R, Minturn JE, Hishiki T, Zhao H, Wang Q, Nnaan A, Maris J, Evans AE, Brodeur GM. (2017) Proliferation of human neuroblastomas mediated by the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 65:9868-9875.
- Hoppe JB, Frozza RL, Pires ENS, Meneghetti AB, Salbego C. (2017) The curry spice curcumin attenuates beta-amyloid-induced toxicity through beta-catenin and PI3K signaling in rat organotypic hippocampal slice culture. *Neurol Res* 35:857-866.
- Huang EJ, Reichardt LF. (2017) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736.
- Hui H, Fernando MA, Heaney AP. (2017) The α 1-adrenergic receptor antagonist doxazosin inhibits EGFR and NF- κ B signalling to induce breast cancer cell apoptosis. *Cancer* 44:160-166.
- Ittner LM, Götz J. (2017) Amyloid- β and tau—a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 12:67.
- Jimenez S, Torres M, Vizuete M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, Carmona-Cuenca I, Caballero C, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J. (2017) Age-dependent accumulation of soluble amyloid β (A β) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein- α (sAPP α) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3 β pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem* 286:18414-18425.
- Kandel ES, Hay N. (2017) The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 253:210-229.
- Katsouri L, Vizcaychipi MP, McArthur S, Harrison I, Suárez-Calvet M, Lleo A, Lloyd DG, Ma D, Sastre M. (2017) Prazosin, an α 1-adrenoceptor antagonist, prevents memory deterioration in the APP23 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 30e11.
- Kenna GA, Haass-Koffler CL, Zywiak WH, Edwards SM, Brickley MB, Swift RM, Leggio L. (2017) Role of the α 1 blocker doxazosin in alcoholism: a proof-of-concept randomized controlled trial. *Addict Biol* 21:904-914.
- Kyprianou N, Benning CM. (2017) Suppression of human prostate cancer cell growth by α 1-adrenoceptor antagonists doxazosin and terazosin via induction of apoptosis. *Cancer Res* 60:4550-4555.
- Lane D, Levine A. (2010) p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(12)a000893.
- Lee K-Y, Koh S-H, Noh MY, Kim SH, Lee YJ. (2017) Phosphatidylinositol-3-kinase activation blocks amyloid beta-induced neurotoxicity. *Toxicology* 243:43-50.
- Lepor H. (2017) Alpha blockers for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Rev Urol* 9:181.
- Lopes FM, Schröder R, da Frota Júnior MLC, Zanotto-Filho A, Müller CB, Pires AS, Meurer RT, Colpo GD, Gelain DP, Kapczinski F. (2017) Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an *in vitro* model for Parkinson disease studies. *Brain Res* 1337:85-94.
- Malagelada C, Jin ZH, Greene LA. (2017) RTP801 is induced in Parkinson's disease and mediates neuron death by inhibiting Akt phosphorylation/activation. *J Neurosci* 28:14363-14371.
- de Marcondes PG, Bastos LG, de-Freitas-Junior JCM, Rocha MR, Morgado-Díaz JA. (2017) EphA4-mediated signaling regulates the aggressive phenotype of irradiation survivor colorectal cancer cells. *Tumor Biol* 37:12411-12422.
- Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM. (2017) Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *Med* 341:1165-1173.
- Mattson MP. (2017) Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Y Acad Sci* 1144:97-112.
- Meco D, Riccardi A, Servidei T, Brueggen J, Gessi M, Riccardi R, Dominici C. (2017) Antitumor activity of imatinib mesylate in neuroblastoma xenografts. *Cancer Lett* 228:211-219.
- Meyers MB, Shen WV, Spengler BA, Ciccarone V, O'Brien JP, Donner DB, Furth ME, Biedler JL. (2017) Increased epidermal growth factor receptor in multidrug-resistant human neuroblastoma cells. *Biochem* 38:87-97.
- Molecular Devices. (2017) StainFree technology for cellular image analysis without fluorescent dyes. [cited 2019 01/06/2019]. Available from: <https://www.moleculardevices.com/en/assets/app-note/br/stainfree-technology-for-cellular-image-analysis-without-fluorescent-dyes> 2019.
- Montano X, Djamgoz MB. (2017) Epidermal growth factor, neurotrophins and the metastatic cascade in prostate cancer. *FEBS Lett* 571:1-8.
- Moreno L, Caron H, Geoerger B, Eggert A, Schleiernacher G, Brock P, Valteau-Couanet D, Chesler L, Schulte JH, De Preter K. (2017) Accelerating drug development for neuroblastoma-new drug development strategy: an innovative therapies for children with cancer, European network for cancer research in children and

- adolescents and international society of paediatric oncology Europe neuroblastoma project. *Expert Opin Drug Discovery* 12:801-811.
- Musicco M, Adorni F, Di Santo S, Prinelli F, Pettenati C, Caltagirone C, Palmer K, Russo A. (2017) Inverse occurrence of cancer and Alzheimer disease a population-based incidence study. *Neurology*, <https://doi.org/10.1212/WNL.1210b1013e31829c31825ec31821>.
- Nassif M, Hoppe J, Santin K, Frozza R, Zamin LL, Simão F, Horn AP, Salbego C. (2017) β -Amyloid peptide toxicity in organotypic hippocampal slice culture involves Akt/PKB, GSK-3 β , and PTEN. *Neurochem Int* 50:229-235.
- de Oliveira AC, Candelario-Jalil E, Langbein J, Wendeburg L, Bhatia HS, Schlachetzki JC, Biber K, Fiebich BL. (2017) Pharmacological inhibition of Akt and downstream pathways modulates the expression of COX-2 and mPGES-1 in activated microglia. *J Neuroinflammation* 9:2.
- Park HY, Park S-H, Jeong J-W, Yoon D, Han MH, Lee D-S, Choi G, Yim M-J, Lee JM, Kim D-H. (2017) Induction of p53-independent apoptosis and G1 cell cycle arrest by fucoidan in HCT116 human colorectal carcinoma cells. *Mar Drugs* 15:154.
- Petrakis IL, Simpson TL. (2017) Posttraumatic stress disorder and alcohol use disorder: a critical review of pharmacologic treatments. *Alcohol Clin Exp Res* 41:226-237.
- Petty A, Myshkin E, Qin H, Guo H, Miao H, Tochtrop GP, Hsieh J-T, Page P, Liu L, Lindner DJ. (2017) A small molecule agonist of EphA2 receptor tyrosine kinase inhibits tumor cell migration in vitro and prostate cancer metastasis *in vivo*. *PLoS One* 7e42120.
- Querfurth HW, Laferla FM. (2017) Alzheimer's disease reply. *Med* 362:1844-1845.
- Realmuto S, Cinturino A, Arnao V, Mazzola MA, Cupidi C, Aridon P, Ragonese P, Savettieri G, D'Amelio M. (2017) Tumor diagnosis preceding Alzheimer's disease onset: is there a link between cancer and Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 31:177-182.
- Rodgman C, Verrico CD, Holst M, Thompson-Lake D, Haile CN, Raskind M, Newton T. (2017) Doxazosin XL reduces symptoms of posttraumatic stress disorder in veterans with PTSD: a pilot clinical trial. *J Clin Psychiatry* 77:e561-e565.
- Sakamoto S, Kyprianou N. (2017) Targeting anoikis resistance in prostate cancer metastasis. *Mol Asp Med* 31:205-214.
- Sartelet H, Oligny L-L, Vassal G. (2017) AKT pathway in neuroblastoma and its therapeutic implication. *Expert Rev Anticancer Ther* 8:757-769.
- Selkoe DJ. (2017) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81:741-766.
- Shafi O. (2017) Inverse relationship between Alzheimer's disease and cancer, and other factors contributing to Alzheimer's disease: a systematic review. *BMC Neurol* 16:236.
- Sleire L, Førde HE, Netland IA, Leiss L, Skeie BS, Enger PØ. (2017) Drug repurposing in cancer. *Pharmacol Res* 124:74-91.
- Stoppini L, Buchs P-A, Muller D. (2017) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173-182.
- Strasser A, Harris AW, Jacks T, Cory S. (2017) DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell* 79:329-339.
- Takata K, Kitamura Y. (2017) Molecular approaches to the treatment, prophylaxis, and diagnosis of Alzheimer's disease: tangle formation, amyloid- β , and microglia in Alzheimer's disease. *J Pharmacol Sci* 118:331-337.
- Tamura S, Hosoi H, Kuwahara Y, Kikuchi K, Otabe O, Izumi M, Tsuchiya K, Iehara T, Gotoh T, Sugimoto T. (2017) Induction of apoptosis by an inhibitor of EGFR in neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358:226-232.
- Tang CK, Lippman ME. (2017) EGF family receptors and their ligands in human cancer. *Hormones and signaling*. Elsevier. p. 113-165.
- Tu H-C, Ren D, Wang GX, Chen DY, Westergard TD, Kim H, Sasagawa S, Hsieh JJ-D, Cheng EH-Y. (2017) The p53-cathepsin axis cooperates with ROS to activate programmed necrotic death upon DNA damage. *Proc Natl Acad Sci* 106:1093-1098.
- Vaseva AV, Marchenko ND, Ji K, Tsirka SE, Holzmann S, Moll UM. (2017) p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell* 149:1536-1548.
- Wee P, Wang Z. (2017) Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers* 9:52.
- Wells A. (2017) EGF receptor. *Biochem Cell Biol* 31:637-643.
- Yang X, Martin TA, Jiang WG. (2017) Biological influence of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on colon cancer cells. *Exp Ther Med* 6:1475-1481.

(Received 7 January 2019, Accepted 4 February 2019)
(Available online 14 February 2019)

4. CAPÍTULO II

Artigo: Doxazosin is Cytotoxic to Hemangioma Cells and 3D Tumor Spheroids

Status: em preparação

Doxazosin Is Cytotoxic to Hemangioma Cells and 3D Tumor Spheroids

Bárbara Paranhos Coelho^a, Mariana Maier Gaelzer^{a1}, Nicolly Paz^a, Christianne G. Salbego^a, Fátima T. C. R. Guma^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author:

Bárbara Paranhos Coelho

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS
Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

Telephone: +55 (51) 3308.5545

Fax: +55 (51) 3308.5535

E-mail: coelhobarbarap@gmail.com

¹ Present Address: Department of Radiation Oncology, Miller School of Medicine/Sylvester Cancer Center, University of Miami, Miami, FL 33136, USA.

Abstract

Vascular tumor is an abnormal buildup of blood vessels in the skin or internal organs that can lead to disfigurement and/or life-threatening consequences. The mechanism of hemangioma (HA) development remains unknown. Doxazosin is a quinazoline compound with antitumor activity against several types of cancer. The aim of the present study was to explore the effects of doxazosin on HA cells and 3D tumor spheroids. To our knowledge, this is the first report of HA 3D tumor spheroids. The effects of doxazosin on HA viability were determined by imaging cytometry and MTT assay. Cell migration was assessed by the wound-healing assay. 3D tumor spheroids were examined under an inverted microscope equipped with a digital camera, the size was measured using the ImageJ software. Doxazosin was cytotoxic to HA cells at higher concentrations (100 to 250 μM) and increased cell migration at lower concentrations (10-75 μM). The drug reduced the size of HA 3D tumor spheroids at the higher concentrations tested (200 and 250 μM). Therefore, our results show that doxazosin has antitumor activity against HA cells and tumor spheroids and should be studied as a potential adjuvant to other anti-tumor therapies against HAs.

Keywords: Hemangioma, hemangioendothelioma, doxazosin, EOMA, 3D tumor spheroids

Introduction

Hemangiomas (HA) are common vascular endothelial cell tumors that occur with a wide range of clinical manifestations. They can appear as benign cases of infantile HA to low-graded malignant Hemangioendothelioma and Angiosarcoma, more commonly in adults. In comparison to normal vascular endothelial cells, the proliferation rate and invasion capabilities of a vascular tumor endothelial cells are much greater [1]. At the moment, the cellular and molecular mechanisms leading to vascular tumor formation are poorly understood and under-investigated.

Doxazosin is a quinazoline compound and a selective $\alpha 1$ -adrenoceptor antagonist widely used for treatment of high blood pressure and benign prostatic hyperplasia. Several studies demonstrate doxazosin's antitumor effects against neuroblastomas [2], glioblastomas [3], breast cancer [4] and prostate cancer [5].

There are few studies on new therapeutic strategies against HA. Although most infantile HAs regress spontaneously and do not leave significant sequelae, a minority of lesions cause impairment of vital function (e.g., respiratory or visual obstruction), permanent scarring and/or disfigurement [6]. Therefore, there is a need for new therapeutic strategies that are not only effective against the disease but can also improve the patient's quality of life. Doxazosin is a potential antitumor adjuvant and here we tested the drug's effects against HAs cells and on 3D HA tumor spheroids.

Material and Methods

Cell Culture

Murine EOMA cell line was obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ-Duque de Caxias, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Cells were grown and maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco®, Life Technologies™, USA), containing 10% Fetal Bovine Serum (Cripion Biotecnologia Ltda., Andradina, SP, Brazil), 2.5 mg/mL Fungizone and 100 U/L of gentamicin (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Cells were kept at 37°C, in an atmosphere of 5% CO₂.

Single cell-derived tumor spheroid (SCTS) formation

For spheroid generation, seeding cell densities of 0.1 to 1.5 x 10⁴ viable cells/mL were tested in a 96-well round bottom plate coated with 1% agarose in complete cell

medium. Twenty-four hours after seeding, photomicrographs were taken with an inverted microscope (Nikon Eclipse TE300; Nikon, Tokyo, Japan) fitted with a digital camera. Tumor spheroid area was measured using the ImageJ software.

Doxazosin treatment

Doxazosin mesylate (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) was dissolved in 20% ethanol/milli-Q water (vehicle). EOMA cells and tumor spheroids were treated for 24, 48 and 72h with concentrations ranging from 5 to 250 μ M.

Imaging Cytometry

For cell counting analysis, imaging cytometry was performed using a SpectraMax i3 MiniMax 300 Imaging Cytometer plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) with the optical imaging module and transmitted light setting. Molecular Devices' StainFree™ Cell Detection Technology allows the performance of cell proliferation and cytotoxicity assays without stains. Moreover, cells can be analyzed at any time without disrupting their growth. Photomicrographs obtained were submitted to automatic cell counting by ImageJ software, with exclusion of cell debris.

MTT Assay

EOMA cells were plated in 96-well plates at 8×10^3 cells/well and grown for 24 h. Following treatment for 24, 48 or 72 h, cells were incubated with 0,2 mg/mL MTT (3-(4,5-methylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) for 2 h. The solution was then removed and the formazan product in the cells was solubilized by addition of DMSO. Absorbance was read in a SpectraMax® M5 Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) at 570 and 630 nm. The 630 nm absorbance read was subtracted from the 570 nm absorbance.

Wound-healing assay

EOMA cells were cultured in 96-well plates for wound healing assays. When the cells reached confluence, round wounds were created by placing the tip of a 200- μ L pipet on the cell monolayers. Images of wounded cells were captured using a SpectraMax i3 MiniMax 300 Imaging Cytometer plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) at 0, 12, and 24 h. Acellular areas were measured using Image J software. The

percentage of migration was calculated by comparing the difference of acellular area from time-points 12 and 24 h with the 0 h time-point.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. All results are representative of at least 4 independent experiments with triplicate or more determinations for each experiment. Analysis of variance (ANOVA) was applied to the means to determine statistical differences between experimental groups. Post hoc comparisons were performed by Tukey test. Differences between mean values were considered significant when $p < 0.05$. Statistical analyses were carried out using the GraphPad Prism 5 software.

Results

The effect of concentration and time of doxazosin treatment on EOMA cells was assessed by dose-effect curves. The choices of concentration and treatment times were based on previous work by our research group [2, 3]. Regarding cell confluence analysis (Fig. 1a), cells treated with 200 and 250 μ M doxazosin proliferated at a much lower rate compared to control at 48 h. At 72 h of treatment, cells treated with 100, 150, 200 and 250 μ M doxazosin proliferated less than the control. The morphology of the treated cells in those concentrations indicate doxazosin was cytotoxic to EOMA cells (Fig. 1b).

Next, we performed the MTT assay to confirm this cytotoxic effect. At 24 h, 150, 200 and 250 μ M doxazosin induced cell death (Fig. 2a). At 48 h, we observed the drug decreased the optical density also on the concentrations of 75 and 100 μ M. At 72 h, the drug's cytotoxicity was higher than on 48 h for the 100 μ M concentration, while this effect was not as expressive on 75 μ M. Therefore, doxazosin was cytotoxic for EOMA cells, from 100 to 250 μ M, confirming what was observed from the morphology of the cells.

We then evaluated doxazosin's effect on cell migration with the wound-healing assay (Fig. 3). Interestingly, doxazosin increased EOMA cells migration at the concentrations which it was not cytotoxic: 10-75 μ M, both after 12 and 24 h of treatment. Thus, doxazosin was cytotoxic at higher concentrations (100 to 250 μ M) and increased cell migration at lower concentrations (10-75 μ M).

Subsequently, we sought to test doxazosin's cytotoxicity on EOMA tumor spheroids, which is a 3D *in vitro* model that better resembles what occurs on the tumor *in vivo*. The potential of 3D tumor spheroid models composed of cells in different proliferative and metabolic states for the development of new anticancer strategies has been amply demonstrated. However, to our knowledge, there are no reports on the literature of tumor spheroid culture for EOMA cells. So, we first tested the best cell density for spheroid formation (Fig. 4). We used cell densities of 0.1 to 1.5×10^4 cells/mL to form spheroids and, after 24 h of seeding, we measured spheroid area for 9 days. In the first 3 days, cells start to cluster together and begin to form more tightly 3D spheroids. Cell densities of 0.1, 0.25 and 0.5×10^4 cells/mL formed smaller and disform spheroids. The density of 0.75×10^4 cells/mL formed spheroids of regular size, densely packed and with spherical shape. Higher cell densities did not form densely packed spheroids. Therefore, due to the size and morphology, the cell density of 0.75×10^4 cells/mL was chosen as the ideal one for EOMA tumor spheroids. Moreover, we started doxazosin treatment 3 days after seeding to allow for the complete formation of the tumor spheroids.

Next, we tested whether doxazosin have cytotoxic activity against EOMA tumor spheroids (Fig. 5). We found that 250 μ M doxazosin decreased tumor spheroid size at 24, 48 and 72 h. At 72 h, the drug concentration of 200 μ M was also able to decrease tumor spheroid size (Fig. 5a). Moreover, spheroids treated with 150-250 μ M doxazosin showed a looser morphology, with cells less densely packed, possibly due to cell death (Fig. 5b). Thus, doxazosin at high concentrations reduced the size of EOMA tumor spheroids.

Discussion

Doxazosin is a selective α 1-adrenergic receptor blocker that has a quinazoline scaffold and it has been shown to present antitumor activity in several types of cancer, including neuroblastoma [2], glioblastoma [3], breast cancer [4] and prostate cancer [5]. Here we showed that doxazosin is cytotoxic on 2D and 3D cultures of hemangioma (HA) cells.

Although the mechanisms of doxazosin's toxicity against HA are unknown, they may involve the PI3K/Akt signaling pathway. The PI3K/Akt signaling pathway act on a series of cellular processes including cell cycle regulation, cell survival, proliferation, differentiation, among others [7, 8]. In HA, studies show that the abnormal activation of

PI3K/Akt pathway is involved with tumor development [1, 9]. Moreover, inhibition of the PI3K/Akt pathway in EOMA cells decreases cell viability [10]. Previous studies of our research group found that doxazosin induces apoptosis on glioblastoma cells [3] and decreases tumor size *in vivo* through inhibition of the PI3K/Akt pathway [11]. Therefore, the decreased viability of EOMA cells we found in the present study could be related to doxazosin's inhibitory effect on the PI3K/Akt pathway.

On the other hand, we also found that lower concentrations of doxazosin increased cell migration in the wound-healing assay. Migration is defined as the directed movement of cells on a substrate such as basal membranes, extracellular matrix (ECM) fibers or plastic plates. Therefore, migration is occurring on 2D surfaces without any obstructive fiber network. Invasion is defined as cell movement through a 3D matrix, which is accompanied by a restructuring of the 3D environment. Invasion requires adhesion, proteolysis of ECM components and migration. Thus, migration is only one of many processes that cells must endure in order to invade or, in the case of cancer cells, metastasize to a secondary location [12, 13]. Hence, the increase in cell migration caused by lower concentrations of doxazosin may not be accompanied by increased cell invasion. Further studies are needed to test if the drug affects EOMA cells invasion.

As one of the most common tumor types in infants, HA has an incidence rate of 5-10% at the end of the first year of life worldwide [14]. Although most HA patients have a general watchful waiting policy, approximately 10% of HAs will grow dramatically and even be life threatening [6]. Development of new therapeutic strategies is essential to reduce mortality and scarring/disfigurement in HA patients. Here we show that doxazosin was cytotoxic to HA cells and HA tumor spheroids. Although more studies are needed to understand the molecular mechanisms of doxazosin's effects on EOMA cells, the drug should be considered as a potential adjuvant to other anti-tumor therapies against hemangiomas.

Funding: This study was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Zheng, N., et al., *PDK1 activity regulates proliferation, invasion and growth of hemangiomas*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2015. **36**(5): p. 1903-1910.
2. Coelho, B.P., et al., *Dual Effect of Doxazosin: Anticancer Activity on SH-SY5Y Neuroblastoma Cells and Neuroprotection on an In Vitro Model of Alzheimer's Disease*. Neuroscience, 2019. **404**: p. 314-325.
3. Gaelzer, M.M., et al., *Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway inhibition by doxazosin promotes glioblastoma cells death, upregulation of p53 and triggers low neurotoxicity*. PloS one, 2016. **11**(4): p. e0154612.
4. Hui, H., M.A. Fernando, and A.P. Heaney, *The $\alpha 1$ -adrenergic receptor antagonist doxazosin inhibits EGFR and NF- κ B signalling to induce breast cancer cell apoptosis*. European Journal of Cancer, 2008. **44**(1): p. 160-166.
5. Sakamoto, S. and N. Kyprianou, *Targeting anoikis resistance in prostate cancer metastasis*. Molecular aspects of medicine, 2010. **31**(2): p. 205-214.
6. Chang, L.C., et al., *Growth characteristics of infantile hemangiomas: implications for management*. Pediatrics, 2008. **122**(2): p. 360-367.
7. Brazil, D.P., J. Park, and B.A. Hemmings, *PKB binding proteins: getting in on the Akt*. Cell, 2002. **111**(3): p. 293-303.
8. Kandel, E.S. and N. Hay, *The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB*. Experimental cell research, 1999. **253**(1): p. 210-229.
9. Zheng, N., X. Ding, and H. Zhang, *Targeting rictor inhibits mouse vascular tumor cell proliferation and invasion in vitro and tumor growth in vivo*. Neoplasma, 2013. **60**(1): p. 41-45.
10. Peng, L.X., et al., *Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway is involved in pingyangmycin-induced growth inhibition, apoptosis and reduction of invasive potential in EOMA mouse hemangioendothelioma cells*. Molecular medicine reports, 2015. **12**(6): p. 8275-8281.
11. Gaelzer, M. M. *Investigação do potencial terapêutico da doxazosina em modelos de gliomas in vivo e in vitro*. 2017. Thesis (PhD in Biochemistry). Biochemistry Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
12. Alexander, S., et al., *Dynamic imaging of cancer growth and invasion: a modified skin-fold chamber model*. Histochemistry and cell biology, 2008. **130**(6): p. 1147-1154.

13. Friedl, P. and S. Alexander, *Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity*. Cell, 2011. **147**(5): p. 992-1009.
14. Greenberger, S. and J. Bischoff, *Infantile hemangioma—mechanism (s) of drug action on a vascular tumor*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2011. **1**(1): p. a006460.

Figure Legends

Figure 1. Cell number analysis of EOMA cells after doxazosin treatment for 24h, 48h and 72h. **(a)** Graph of time (hours) versus cell counting. **(b)** Photomicrographs of cells after treatment in the different doxazosin concentrations and time-points. Magnification: 40X. Data are expressed as means±SEM (n=4). ***p<0.001 compared to control.

Figure 2. Cell viability through the MTT assay of EOMA cells after doxazosin treatment for 24h **(a)**, 48h **(b)** and 72h **(c)**. Graph of time (hours) versus optical density (O.D.) units. Data are expressed as means±SEM (n=4). **p<0.01, ***p<0.001 compared to control. C: Control; V: Vehicle.

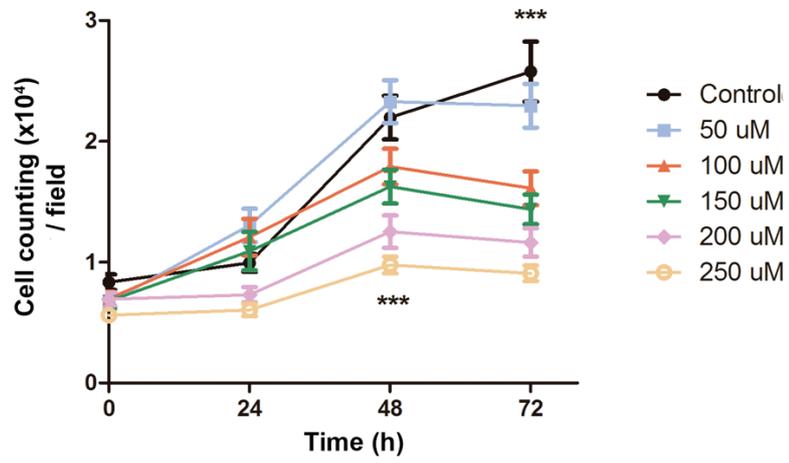
Figure 3. Cell migration analysis through wound-healing assay of EOMA cells after doxazosin (concentrations in µM) treatment for 12h and 24 h. **(a)** Graph of time (hours) versus percentage of migration. **(b)** Photomicrographs of cells after treatment in the doxazosin concentrations of 50 and 250 µM. Magnification: 40X. Data are expressed as means±SEM (n=4). **p<0.01, ***p<0.001 compared to control.

Figure 4. Evaluation of 3D tumor spheroid culture of EOMA cells. **(a)** Graph of time (days) versus spheroid area. Different cell densities (in 10⁴ cells/mL) were used to form tumor spheroids. **(b)** Photomicrographs of 3D tumor spheroids. Magnification: 200X.

Figure 5. Evaluation of doxazosin treatment on 3D EOMA tumor spheroid after treatment with doxazosin (concentrations in µM) for 24, 48 and 72 h. **(a)** Graph of time (hours) versus fold-change of spheroid area. **(b)** Photomicrographs of cells after treatment in the doxazosin concentrations of 100, 150, 200 and 250 µM. Magnification: 200X. Data are expressed as means±SEM (n=4). **p<0.01, ***p<0.001 compared to control.

Figure 1

a



b

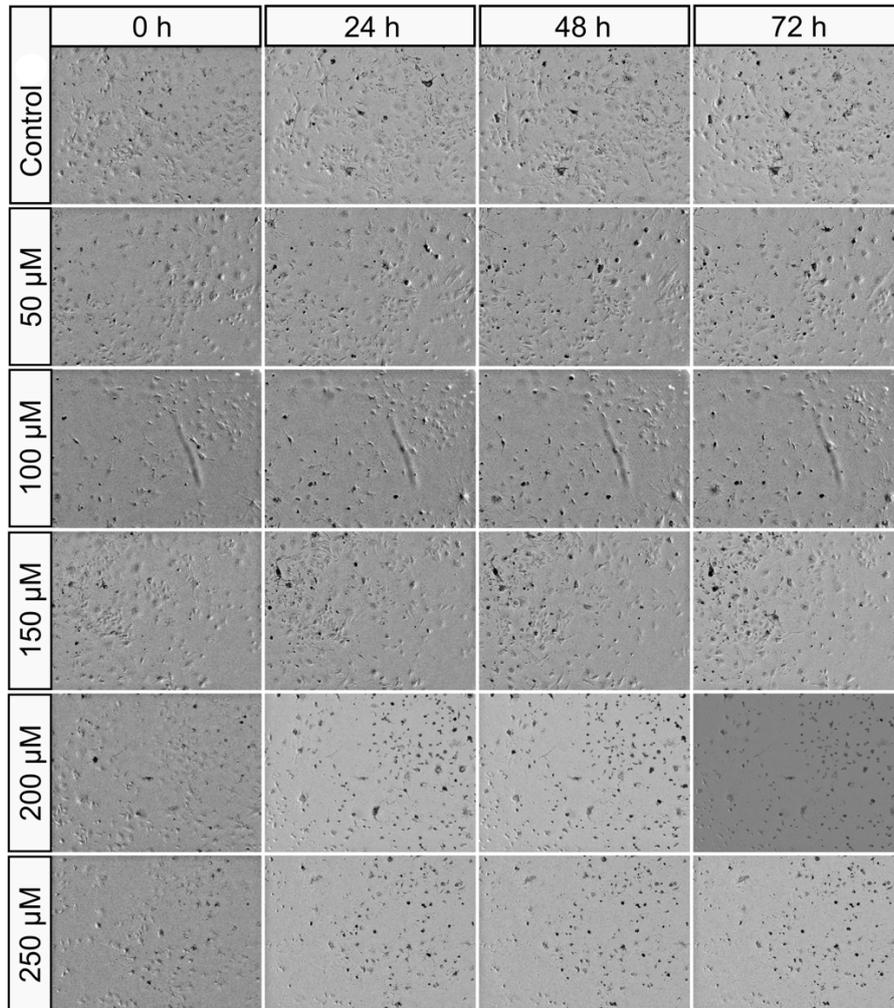


Figure 2

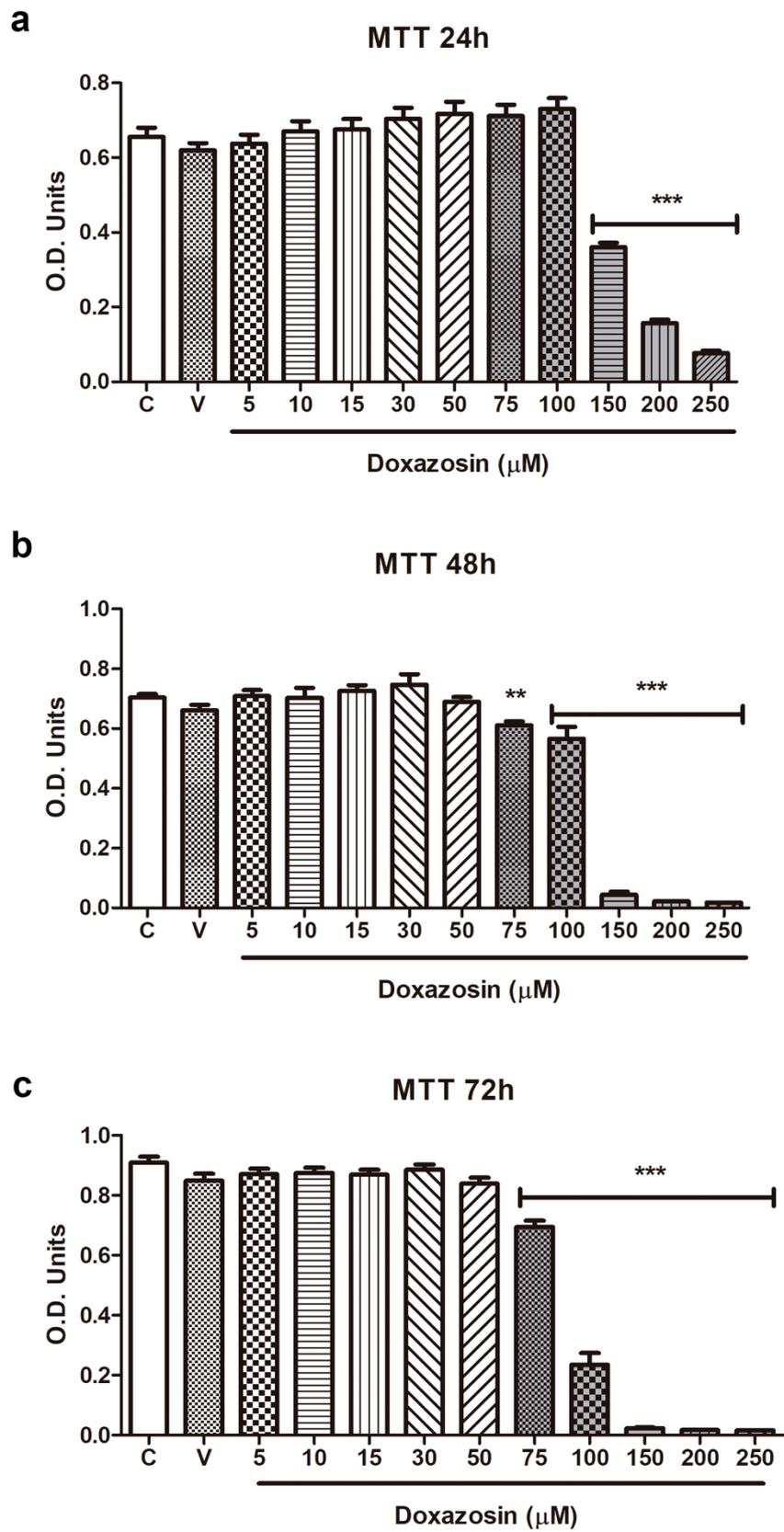
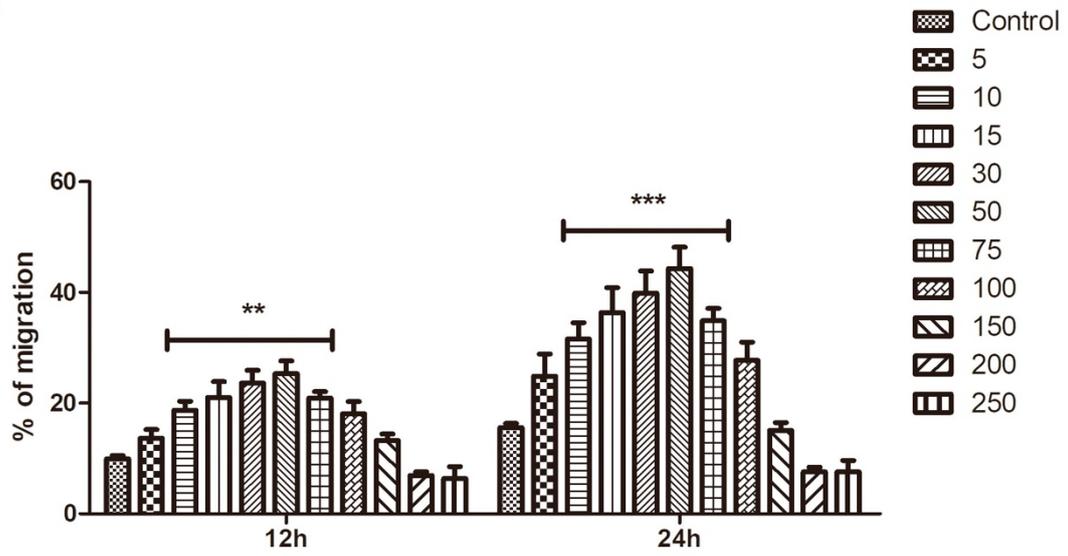


Figure 3

a



b

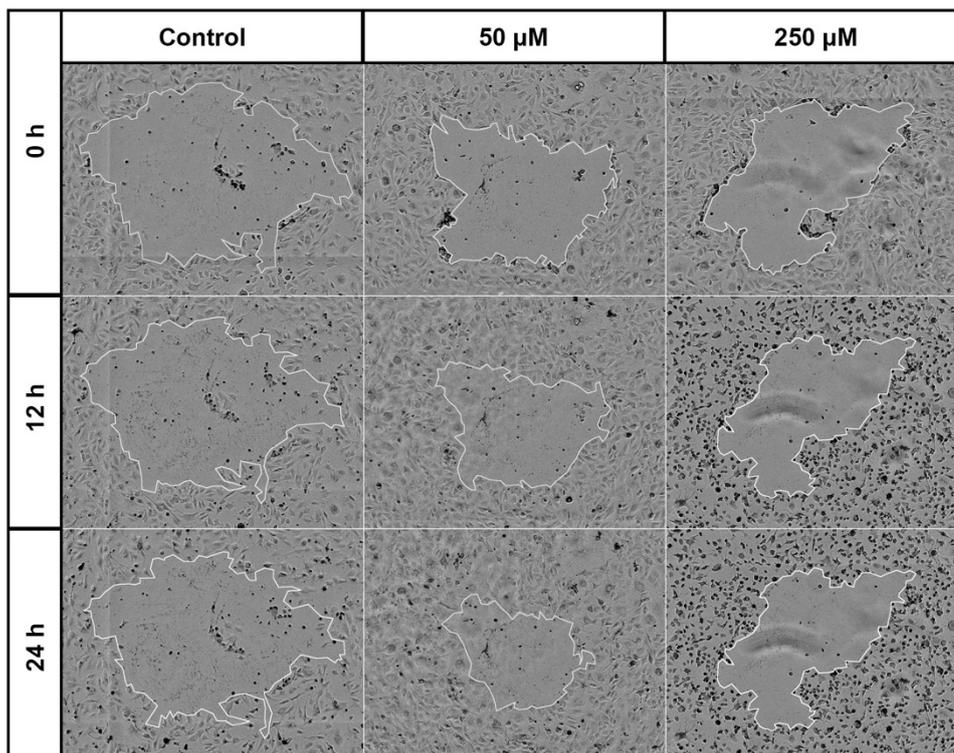
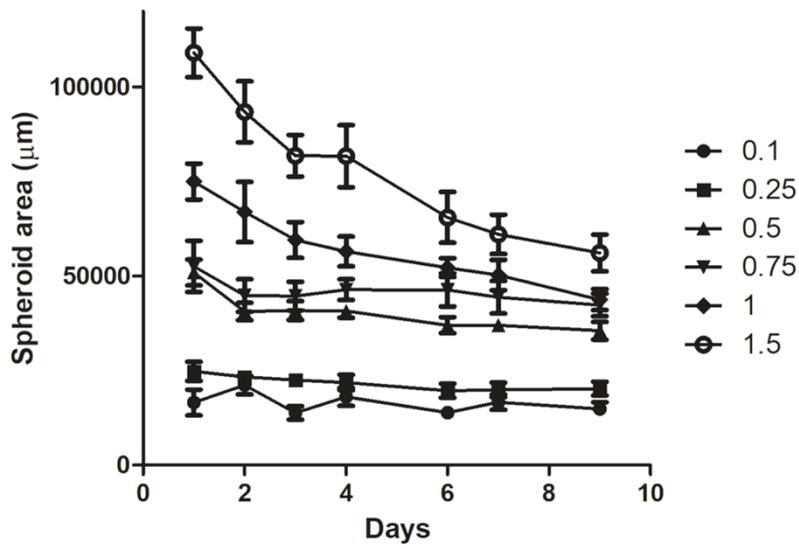


Figure 4

a



b

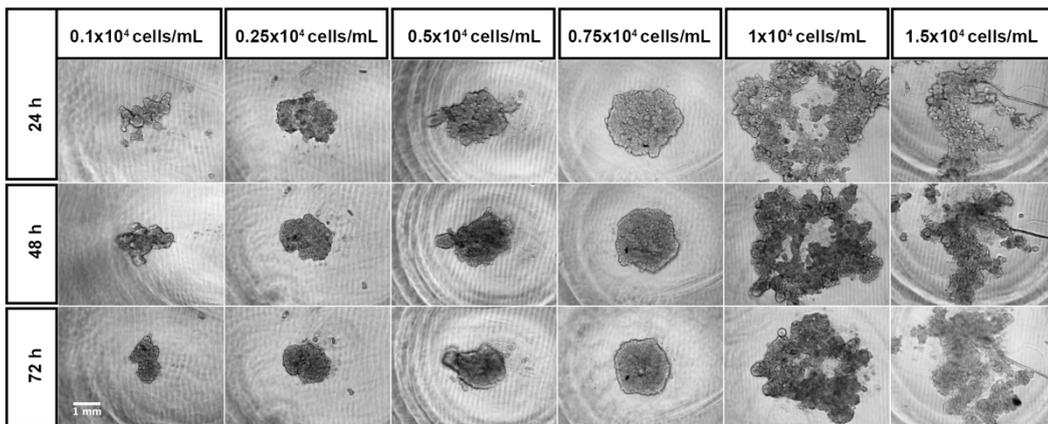
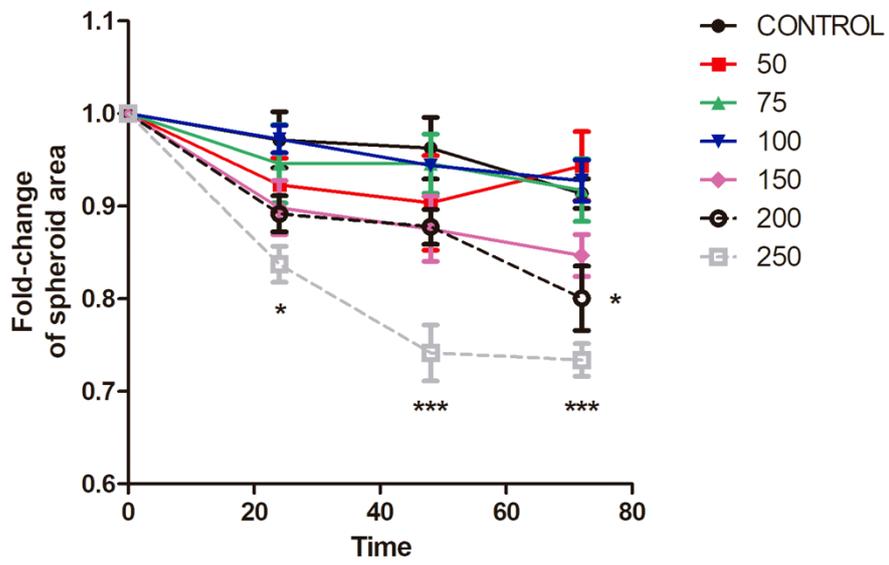
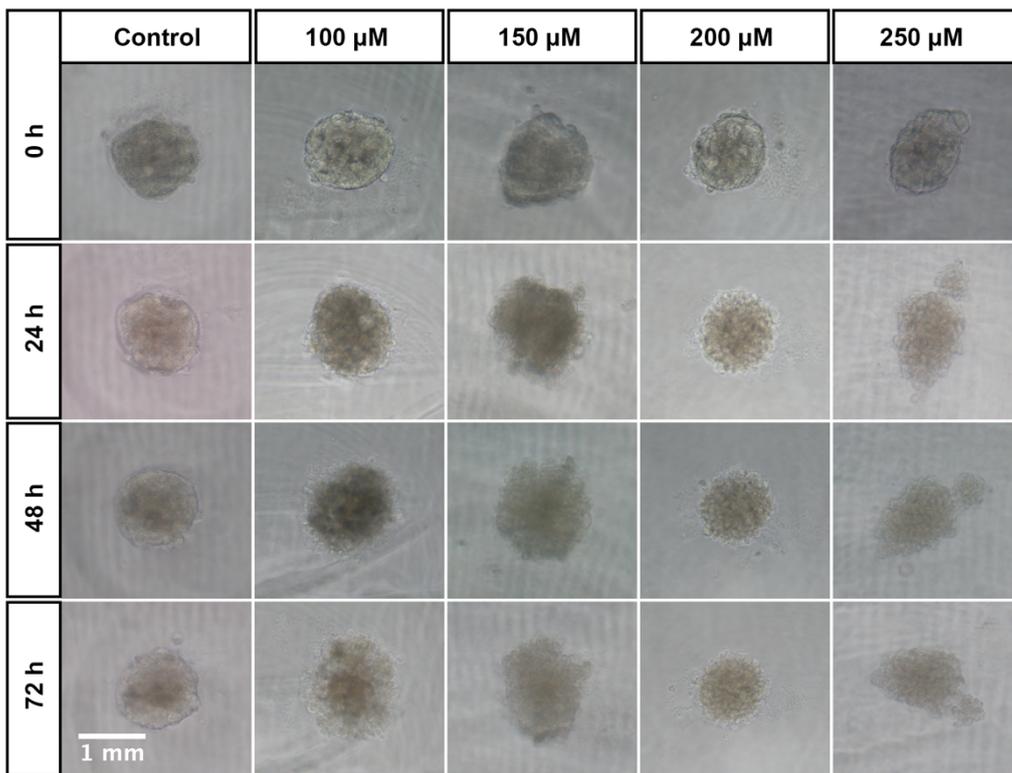


Figure 5

a



b



5. CAPÍTULO III

Resultados preliminares

Nesta tese, também avaliamos a citotoxicidade da doxazosina na linhagem murina de leucemia mielomonocítica WEHI-3B. Essa linhagem foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ - Duque de Caxias, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e mantidas em meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino, contendo 2,5 mg/mL de Fungizona e 100 U/L de gentamicina. As células foram mantidas a 37°C e em atmosfera com 5% de CO₂.

A doxazosina foi dissolvida em 20% de etanol/água ultra-pura (veículo) e as células WEHI-3B foram tratadas com concentrações variando de 15 a 200 µM, por 24 ou 48h. Após os tratamentos, as células mortas foram marcadas com iodeto de propídeo (PI) e analisadas em um citômetro de fluxo FACSCalibur e software Cell Quest (BD Bioscience, Mountain View, CA, EUA). Os dados obtidos foram analisados com o software FCS Express 4 (DeNovo Software, Los Angeles, CA, EUA).

Os dados foram expressos como a média±EPM. Análise de Variância (ANOVA) foi aplicada às médias para determinar diferenças estatísticas entre os grupos, seguido de teste de Tukey. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

A doxazosina diminuiu a porcentagem de células vivas após 24h, na concentração de 200 µM (fig. 6a). Após 48h de tratamento, o fármaco diminuiu a viabilidade celular nas concentrações de 100, 150 e 200 µM (fig. 6b).

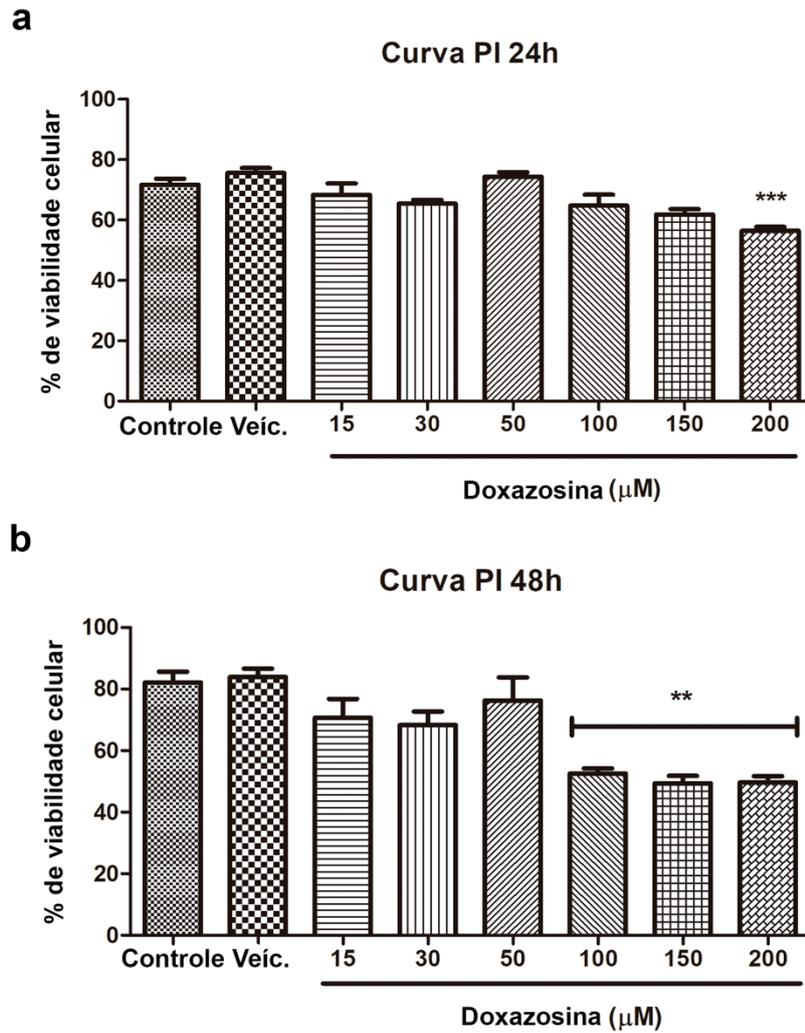


Figura 6. Análise da viabilidade celular por meio da marcação de células mortas com o iodeto de propídeo (PI) após tratamento de células WEHI-3B com doxazosina, por 24 (a) ou 48h (b). O gráfico demonstra a concentração de doxazosina pela porcentagem de viabilidade celular. Os dados são expressos como média±EPM (n=3). **p<0,01; ***p<0,001 em comparação com o controle.

A doxazosina apresentou efeito citotóxico em células WEHI-3B. Os resultados aqui obtidos indicam que a doxazosina apresenta potencial terapêutico contra LMM e mais estudos devem ser realizados para confirmar essa ação antitumoral e identificar o mecanismo de ação do fármaco nesse tumor.

6. DISCUSSÃO

Em 2012, mais de 14 milhões de pessoas foram diagnosticadas com câncer e houve uma estimativa de 8,2 milhões de mortes por câncer (Mcguire, 2016). De acordo com estatísticas globais, mais de 20 milhões de pessoas serão diagnosticadas com câncer em 2025 (Mcguire, 2016). No Brasil, ocorrem mais de 225 mil mortes por câncer a cada ano (Wentzel, 2018). Para demências, esses números são ainda mais alarmantes. Estimativas atuais sugerem que 50 milhões de pessoas vivem atualmente com demência, ao redor do mundo. Prevê-se que esse número deve mais do que triplicar até 2050 na medida em que a população envelhece (Alzheimer's Disease International, 2018). A causa de demência mais comum e melhor caracterizada é a DA, que engloba mais de 50-70% dos casos (Prince, 2014). Desse modo, para lidar com estes desafios atuais e futuros, são necessários mais fármacos eficazes contra o câncer e a DA.

Tradicionalmente, a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos envolve a identificação e otimização de compostos, seguido por estudos pré-clínicos e clínicos para testar e caracterizar extensivamente as suas propriedades farmacológicas, efeitos e toxicidade. Apesar destes esforços, no entanto, o êxito no desenvolvimento de fármacos para câncer e DA tem se demonstrado um grande desafio. A média de tempo entre os experimentos iniciais até a revisão e aprovação regulatória completa é de 11,4 a 13,5 anos (Paul *et al.*, 2010). Além disso, as estimativas do custo do desenvolvimento dos fármacos variam de 161 a 1800 milhões de dólares por fármaco (Adams e Brantner, 2006). No momento existem mais de 10.000 ensaios clínicos investigando fármacos contra câncer registrados em www.clinicaltrials.gov. No entanto, apenas um número limitado de fármacos candidatos progridem para a próxima fase nos ensaios clínicos e a taxa de aprovação para fármacos antitumorais entrando na fase I dos ensaios tem sido menor do que 5% (Kola e Landis, 2004). Em relação à DA, apenas 1708 ensaios clínicos intervencionais estão registrados atualmente. O estágio avançado da descoberta de fármacos é financiado principalmente pela indústria farmacêutica e investidores privados. Devido aos incentivos voltados ao lucro deste estilo de financiamento, os fármacos que conseguem receber aprovação clínica custam caro, para cobrir os custos gerais que incluem os tanto fármacos que obtêm êxito quanto os que falham (Kantarjian *et al.*, 2013; Jensen *et al.*, 2016). Em conjunto, esses desafios aumentaram a busca por formas alternativas de aumentar as taxas de sucesso, diminuir o tempo de processamento e reduzir custos no desenvolvimento de fármacos.

O reposicionamento refere-se à utilização de um fármaco para outra indicação do que a originalmente aprovada, e tem despertado grande interesse como uma alternativa a

síntese *de novo* de fármacos (Pantziarka *et al.*, 2014). A grande vantagem é que normalmente existe grande quantidade de dados disponíveis sobre as propriedades farmacocinéticas e toxicidade. No entanto, ainda é necessário avaliar efeitos adversos ao se realizar o reposicionamento de fármacos e um novo ensaio clínico é necessário para validar o potencial terapêutico. Mas o perfil de segurança provavelmente será semelhante à indicação original, o que aumenta a probabilidade de o fármaco avançar nos ensaios clínicos. Com isso em mente, na presente tese propomos o reposicionamento da doxazosina como possível agente antitumoral para neuroblastoma (NB) e hemangioma (HA), e como possível neuroprotetor para a DA.

O NB é um dos tumores sólidos mais comuns da infância, se originando de células embrionárias da crista neural que darão origem ao sistema nervoso simpático. Apesar do tratamento agressivo, o NB é responsável por 15% das mortes relacionadas à câncer em crianças (Ross, 1995; Hogarty, 2003). Embora diversas alterações nas estratégias terapêuticas tenham sido estudadas ao longo dos anos, os pacientes que apresentam NB de alto risco continuam a ter desfecho desfavorável, com taxas de sobrevida de longo prazo de apenas 40 a 50% (Berthold *et al.*, 2005; Kreissman *et al.*, 2013). Além disso, o uso de quimioterápicos, radiação e transplante de medula óssea em crianças acarreta efeitos adversos de longo prazo, se estendendo para a vida adulta, nos sobreviventes da doença (Galligan, 2017). Assim, novas estratégias terapêuticas são necessárias para atingir as células tumorais e também melhorar a qualidade de vida do paciente a longo prazo.

No Brasil, os gastos do Sistema Único de Saúde (SUS) com assistência oncológica aumentaram 26% entre 2010 e 2012, passando de R\$ 1,9 bilhão em 2010 para R\$ 2,4 bilhões em 2012 (iSaúde.net). O Hycamtin (topotecano), um dos medicamentos referência utilizados para o tratamento de neuroblastomas, apresenta um custo de R\$ 205,00 por 4 mg de pó para solução injetável (sendo que a posologia recomendada é de 1,5 mg/m²) para o governo (consulta de pregão eletrônico N° 00005/2018 do Hospital Universitário Alcides Carneiro), enquanto que o mesilato de doxazosina é comercializado como genérico, apresentando um custo de R\$ 2,12 por cápsula de 4 mg (sendo que a posologia recomendada para hiperplasia benigna de próstata é de até 4 mg/dia).

Além de seu baixo custo em comparação com anti-neoplásicos utilizados atualmente, a doxazosina apresenta menos efeitos adversos. Em crianças, foi demonstrada a eficácia da doxazosina no tratamento de disfunção miccional (El-Hefnawy *et al.*, 2012) e cálculo de ureter distal (Aydogdu *et al.*, 2009). Para tratamento da disfunção miccional,

foi utilizada doxazosina em pacientes com idade média de 7 anos; 15% dos pacientes apresentaram efeitos adversos, dos quais o principal foi dor epigástrica (10%). Em estudo sobre efeito da doxazosina em cálculo de ureter distal, foram tratados pacientes com idade entre 2 a 14 anos; nenhum paciente sofreu efeitos adversos ao tratamento. A doxazosina, apesar de ser um anti-hipertensivo utilizado na clínica, possui características na sua estrutura química que a torna uma molécula semelhante a vários fármacos antitumorais já em uso, bem como a outros que ainda estão em desenvolvimento (Gaelzer, 2017).

Em um estudo recente do nosso grupo de pesquisa, a doxazosina apresentou baixa toxicidade em culturas primárias de astrócitos e culturas organotípicas de hipocampo, modelos de célula e tecido não tumoral, respectivamente. O fármaco induziu morte celular apoptótica e necrótica em células de glioma de rato C6 nas concentrações de 150 e 180 μM e morte celular apoptótica nas concentrações de 50 e 75 μM em células de glioma humano (U138-MG) (Gaelzer *et al.*, 2016). A doxazosina também foi capaz de reduzir o volume tumoral *in vivo*, em um modelo de implantação de glioma no cérebro de ratos. Neste estudo anterior, também foi observado que a doxazosina exerce seus efeitos antitumorais em glioma por meio da inibição da via EGFR/Akt/GSK-3 β (Gaelzer, 2017).

No Capítulo I desta tese, observamos que a doxazosina induz morte celular e parada do ciclo celular em células de NB humano SH-SY5Y. A doxazosina também diminuiu a fosforilação do EGFR. Corroborando nossos resultados, Hui e colaboradores (2008) demonstraram que a doxazosina inibe o EGFR em células de câncer de mama. O gefitinibe, que, como a doxazosina, apresenta o anel quinazolidínico na sua estrutura química, inibe a fosforilação de EGFR em células de NB e induz apoptose em concentrações maiores (Tamura *et al.*, 2007). Também observamos no Capítulo I que a doxazosina diminui os níveis de p-EGFR sem alterar a fosforilação de Akt. Um efeito similar foi demonstrado com o mesilato de imatinibe, que reduziu o crescimento tumoral por meio da inibição das tirosinas cinase c-kit e PDGFR, enquanto que os efetores MAPK e Akt não foram afetados pelo tratamento (Meco *et al.*, 2005). Observamos variação semelhante, o que indica que diferentes mecanismos moleculares podem ser esperados com diferentes concentrações de doxazosina. Esta variação de efeitos em relação à concentração do ligante ocorre com o EGF em NB. O EGF estimula o crescimento de células de NB nas faixas de concentração de 5-20 e 150-250 ng/mL, por meio de aumento dos níveis de p-Akt e p-GSK-3 β . No entanto, o crescimento dessas células diminui na faixa de concentração de 50-100 ng/mL de EGF (Chiu *et al.*, 2006). Assim, o NB pode

apresentar respostas moleculares variadas para diferentes concentrações de um mesmo ligante, possivelmente devido à heterogeneidade elevada desse tumor.

No Capítulo I não observamos alteração nos níveis de p-Akt, mas a doxazosina induziu morte celular nas células de NB. É possível que o fármaco esteja agindo em outras vias de sinalização do EGFR, como a via da ERK1/2 e PKC, que também estão envolvidas com sobrevivência tumoral (Wee e Wang, 2017).

Demonstramos ainda que o tratamento com doxazosina em células SH-SY5Y diferenciadas apresentou efeitos contrários sobre a via de sinalização do EGFR em relação ao que foi observado nas células indiferenciadas. A doxazosina ativou a via do EGFR/Akt/GSK-3 β , a qual possui um importante papel na sobrevivência neuronal e que está alterada em diversas doenças neurodegenerativas, como a DA (Hanger e Noble, 2011). A ativação da sinalização da Akt protege neurônios dopaminérgicos contra a neurotoxina MPTP e a razão p-Akt/Akt está diminuída em pacientes com a DA (Malagelada *et al.*, 2008). Além disso, a GSK-3 β é a principal proteína envolvida com a fosforilação da Tau (Hanger e Noble, 2011).

Por esses motivos e pelos resultados que obtivemos com as células SH-SY5Y diferenciadas, analisamos a possibilidade de a doxazosina apresentar efeito neuroprotetor. Para isso, utilizamos um modelo *in vitro* de DA, as culturas organotípicas de hipocampo tratadas com o A β ₁₋₄₂. Ainda no Capítulo I, demonstramos que a doxazosina foi neuroprotetora neste modelo, prevenindo a apoptose e a fosforilação da Tau. Dessa forma, demonstramos que a doxazosina apresenta efeitos contrários em NB e na DA. No NB, o fármaco é citotóxico, enquanto que na DA ele é neuroprotetor. Embora a doxazosina esteja agindo em vias de sinalização relacionadas como a do EGFR e Akt, seu efeito final parece ser determinado pelo estado de ativação dessas vias e possivelmente de outras RTKs nas quais o fármaco possa se ligar. Também não podemos descartar uma possível interferência da ação da sinalização do receptor α 1-adrenérgico.

Os tratamentos para a DA e para outros tipos de demências apenas aliviam os sintomas, e a eficácia deles geralmente é ruim ou diminui ao longo da progressão da doença. Os fármacos não cessam nem diminuem o processo patológico. Na DA, embora os tratamentos atuais consigam melhorar um pouco o comprometimento cognitivo e a qualidade de vida, eles atrasam a institucionalização de pacientes por apenas 6 meses (Corvol, 2012).

A dificuldade de um tratamento demonstrar um efeito modificador na DA provavelmente é devido ao inevitável atraso entre o início da neurodegeneração e a intervenção terapêutica. De fato, os sintomas clínicos normalmente ocorrem após uma avançada e irreversível perda neuronal. A estratégia ideal seria administrar fármacos neuroprotetores antes do início dos sintomas ou logo no início do processo patológico. No entanto, para desenvolver tais estratégias, uma série de marcadores são necessários para identificar a população em risco, capturar o momento preciso do início do processo patológico e monitorar o seu progresso. Os marcadores para triagens em uma grande população devem ser sensíveis, confiáveis, reprodutíveis, de fácil realização e de baixo custo. No momento, tais biomarcadores não estão disponíveis para a DA (Corvol, 2012). Testes “padrão-ouro” têm sido desenvolvidos, mas eles são inapropriados para triagens em larga escala, pois são invasivos (punção lombar) e/ou caros (imagem cerebral) (Mollenhauer *et al.*, 2007; Jack *et al.*, 2008). Mesmo neste contexto, fármacos que promovam neuroproteção poderiam ser testados para DA familiar, visto que, nesses casos, a possibilidade de detecção precoce é maior devido ao histórico familiar.

No Capítulo II, avaliamos o efeito antitumoral da doxazosina em células de HA. Assim como o NB, este tumor também é comum em crianças. Mesmo sendo um tumor benigno, ele pode apresentar risco de vida devido ao comprometimento de funções vitais. Além disso, há um risco elevado de cicatrizes e desfiguração relacionado ao local de crescimento desse tumor (Chang *et al.*, 2008). Os HAs também apresentam ativação da via do EGFR e da PI3K/Akt, o que leva a crer que a doxazosina possa apresentar ação antitumoral nessa doença (Peng *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2015). De fato, demonstramos que o fármaco é citotóxico para as células EOMA, as quais são utilizadas como modelo de HA. No entanto, a doxazosina em baixas concentrações estimulou a migração destas células. O processo de metástase tumoral envolve diversos mecanismos, dentre os quais a migração e invasão celular (Friedl e Alexander, 2011). Este aumento da migração pode não apresentar efeito biológico importante, sendo necessário testar os efeitos do fármaco na capacidade de invasão das células de HA.

Além disso, padronizamos um modelo de cultura 3D de esferoides tumorais das células EOMA, o que até o momento não havia sido realizado. Utilizamos a cultura 3D para testar a ação antitumoral da doxazosina em um modelo mais representativo do tumor. Os modelos 3D de esferoides tumorais mimetizam com maior precisão do que as culturas 2D o que ocorre *in vivo*, visto que o fármaco necessita se distribuir por várias camadas celulares até atingir o centro do tumor, onde normalmente se encontram as células mais

resistentes à terapia (Rodrigues *et al.*, 2018). No presente estudo, demonstramos que a doxazosina reduziu o tamanho dos esferoides tumorais de EOMA, o que é um forte indicativo de que o fármaco possa apresentar efeitos antitumorais *in vivo*.

No Capítulo III apresentamos resultados preliminares dos efeitos da doxazosina nas células WEHI-3B, representativas de leucemia mielomonocítica (LMM). O fármaco também apresentou efeito citotóxico nessas células. Possivelmente essa ação da doxazosina também envolva a via de sinalização de RTKs como o EGFR, visto que as vias da RAS/MAPK e da JAK/STAT5, as quais estão envolvidas na patologia da LMM, podem ser ativadas por EGFR e outros RTKs, respectivamente (Papaemmanuil *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2017).

Desse modo, na presente tese demonstramos que a doxazosina apresenta potencial terapêutico não só para tumores como NB, HA e LMM, como também é neuroprotetora em um modelo *in vitro* da DA. Os nossos estudos estão baseados no reposicionamento da doxazosina para doenças de difícil tratamento, como NB de alto risco e DA, assim como uma doença negligenciada na literatura como o HA. Além de demonstrar potencial terapêutico para essas doenças, a doxazosina é um fármaco que apresenta eventos adversos leves a moderados (Carruthers, 1994), o que pode ser uma grande vantagem no seu uso como adjuvante em terapia antitumoral e para neuroproteção na DA. Portanto, nosso estudo propõe a consideração do potencial terapêutico da doxazosina contra os tumores testados e a DA para o desenvolvimento de estudos *in vivo* que confirmem esse potencial e, possivelmente, que a doxazosina seja reposicionada para o tratamento de alguma dessas doenças.

7. CONCLUSÃO

Esta tese apresentou os resultados obtidos no estudo do reposicionamento da doxazosina em modelos *in vitro* de neuroblastoma, hemangioma, leucemia mielomonocítica e doença de Alzheimer. Como importantes contribuições para o tema de pesquisa desenvolvido nesta tese destacam-se:

- O efeito antitumoral da doxazosina na linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y e a seletividade que o fármaco demonstrou pelas células tumorais, visto que causou baixa toxicidade em células SH-SY5Y diferenciadas para neurônio (Capítulo I);
- A capacidade da doxazosina em reduzir os níveis de p-EGFR e induzir apoptose, necrose e parada do ciclo celular na linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Capítulo I);
- O efeito neuroprotetor da doxazosina em modelo *in vitro* da DA por meio da prevenção da diminuição de p-Akt e da fosforilação da Tau pelo pré-tratamento com doxazosina (Capítulo I);
- O efeito citotóxico da doxazosina na linhagem EOMA de hemangioma murino (Capítulo II);
- O desenvolvimento de culturas 3D de esferoides tumorais da linhagem EOMA (Capítulo II);
- O efeito antitumoral da doxazosina em culturas 3D de esferoides tumorais da linhagem EOMA (Capítulo II);
- A ação citotóxica da doxazosina na linhagem murina WEHI-3B de leucemia mielomonocítica (Capítulo III).

8. PERSPECTIVAS

Como continuação desse trabalho, pretende-se seguir com os seguintes objetivos:

- Avaliar dos efeitos da doxazosina na via da ERK1/2 em células de neuroblastoma SH-SY5Y;
- Analisar se a doxazosina apresenta efeito neuroprotetor em modelo *in vivo* da Doença de Alzheimer;
- Avaliar o potencial de invasão das células EOMA após tratamento com doxazosina;
- Determinar o tipo de morte celular induzida nas células EOMA pela doxazosina;
- Avaliar dos efeitos da doxazosina na via do EGFR/PI3K/Akt em células EOMA;
- Analisar o mecanismo de ação da doxazosina na redução do tamanho dos esferoides tumorais das células EOMA.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, C. P.; BRANTNER, V. V. Estimating the cost of new drug development: is it really \$802 million? **Health affairs**, v. 25, n. 2, p. 420-428, 2006. ISSN 0278-2715.

AMIN, R. M. et al. Risk factors and independent predictors of survival in patients with pulmonary epithelioid haemangioendothelioma. Review of the literature and a case report. **Respirology**, v. 11, n. 6, p. 818-825, 2006. ISSN 1323-7799.

ANDERSON, A. C. The process of structure-based drug design. **Chem Biol**, 10, 787-797, 2003.

ANDERSON, K. R. et al. Increasing incidence of infantile hemangiomas (IH) over the past 35 years: Correlation with decreasing gestational age at birth and birth weight. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 1, p. 120-126, 2016. ISSN 0190-9622.

ANTONESCU, C. Malignant vascular tumors—an update. **Modern Pathology**, v. 27, n. S1, p. S30, 2014. ISSN 1530-0285.

ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391-2405, 2016. ISSN 0006-4971.

ASAMI-ODAKA, A. et al. Long amyloid. beta.-protein secreted from wild-type human neuroblastoma IMR-32 cells. **Biochemistry**, v. 34, n. 32, p. 10272-10278, 1995. ISSN 0006-2960.

AYDOGDU, O. et al. Effectiveness of doxazosin in treatment of distal ureteral stones in children. **The Journal of urology**, v. 182, n. 6, p. 2880-2884, 2009. ISSN 0022-5347.

ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. World Alzheimer Report 2018 – The State of the art of dementia research: New frontiers. 2018. Disponível em: <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2018.pdf>.

BAGAN, P. et al. Prognostic factors and surgical indications of pulmonary epithelioid hemangioendothelioma: a review of the literature. **The Annals of thoracic surgery**, v. 82, n. 6, p. 2010-2013, 2006. ISSN 0003-4975.

BAKER, D. L. et al. Outcome after reduced chemotherapy for intermediate-risk neuroblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 14, p. 1313-1323, 2010. ISSN 0028-4793.

BASTOS, L. F., COELHO, M. M. Drug repositioning: playing dirty to kill pain. **CNS Drugs**, 28(1), 45-61, 2014.

BENNETT, M. L. et al. Oral corticosteroid use is effective for cutaneous hemangiomas: an evidence-based evaluation. **Archives of dermatology**, v. 137, n. 9, p. 1208-1213, 2001. ISSN 0003-987X.

BENNING, C. M.; KYPRIANOU, N. Quinazoline-derived α 1-adrenoceptor antagonists induce prostate cancer cell apoptosis via an α 1-adrenoceptor-independent action. **Cancer research**, v. 62, n. 2, p. 597-602, 2002. ISSN 0008-5472.

BERTHOLD, F. et al. Myeloablative megatherapy with autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidation treatment in patients with high-risk neuroblastoma: a randomised controlled trial. **The lancet oncology**, v. 6, n. 9, p. 649-658, 2005. ISSN 1470-2045.

BIEDLER, J. L.; HELSON, L.; SPENGLER, B. A. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. **Cancer research**, v. 33, n. 11, p. 2643-2652, 1973. ISSN 0008-5472.

BIRECREE, E. et al. Immunoreactive epidermal growth factor receptors in neuritic plaques from patients with Alzheimer's disease. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 47, n. 5, p. 549-560, 1988. ISSN 1554-6578.

BIRKS, J. S. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Cochrane database of systematic reviews**, n. 1, 2006. ISSN 1465-1858.

BODEY, B.; KAISER, H. E.; SIEGEL, S. E. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in childhood brain tumors. **In vivo**, v. 19, n. 5, p. 931-941, 2005. ISSN 0258-851X.

BOLKE, E. et al. Multifocal epithelioid hemangioendothelioma: case report of a clinical chamaeleon. **European journal of medical research**, v. 11, n. 11, p. 462, 2006. ISSN 0949-2321.

BOLLER, D. et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase isoform p110 δ impairs growth and survival in neuroblastoma cells. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 4, p. 1172-1181, 2008. ISSN 1078-0432.

BOOLELL, M. et al. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. **Int J Impot Res**, 8, 47-52, 1996.

BRENNER, D.; MAK, T. W. Mitochondrial cell death effectors. **Current opinion in cell biology**, v. 21, n. 6, p. 871-877, 2009. ISSN 0955-0674.

BRODEUR, G. M. et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. **Journal of clinical oncology**, v. 11, n. 8, p. 1466-1477, 1993. ISSN 0732-183X.

BRODEUR, G. M. et al. International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 6, n. 12, p. 1874-1881, 1988. ISSN 0732-183X.

BROWN, H. K. et al. Neonatal morbidity associated with late preterm and early term birth: the roles of gestational age and biological determinants of preterm birth. **International journal of epidemiology**, v. 43, n. 3, p. 802-814, 2013. ISSN 1464-3685.

- CAL, C. et al. Doxazosin: a new cytotoxic agent for prostate cancer? **BJU international**, v. 85, n. 6, p. 672-675, 2000. ISSN 1464-4096.
- CARRUTHERS, S. G. Adverse effects of α 1-adrenergic blocking drugs. **Drug Safety**, v. 11, n. 1, p. 12-20, 1994. ISSN 0114-5916.
- CASTELLANO, J. M. et al. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. **Science translational medicine**, v. 3, n. 89, p. 89ra57-89ra57, 2011. ISSN 1946-6234.
- CAVALLA, D. Therapeutic switching: a new strategic approach to enhance R&D productivity. **IDrugs**, 8, 914-918, 2005.
- CERNAIANU, G. et al. All-trans retinoic acid arrests neuroblastoma cells in a dormant state. Subsequent nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor treatment adds modest benefit. **Journal of pediatric surgery**, v. 43, n. 7, p. 1284-1294, 2008. ISSN 0022-3468.
- CHANG, L. C. et al. Growth characteristics of infantile hemangiomas: implications for management. **Pediatrics**, v. 122, n. 2, p. 360-367, 2008. ISSN 0031-4005.
- CHANTHERY, Y. H. et al. Paracrine signaling through MYCN enhances tumor-vascular interactions in neuroblastoma. **Science translational medicine**, v. 4, n. 115, p. 115ra3-115ra3, 2012. ISSN 1946-6234.
- CHEN, X. D. et al. Maternal and perinatal risk factors for infantile hemangioma: a case-control study. **Pediatric dermatology**, v. 30, n. 4, p. 457-461, 2013. ISSN 0736-8046.
- CHEUNG, D.; WARMAN, M. L.; MULLIKEN, J. B. Hemangioma in twins. **Annals of plastic surgery**, v. 38, n. 3, p. 269-274, 1997. ISSN 0148-7043.
- CHEUNG, N. et al. Anti-G (D2) antibody treatment of minimal residual stage 4 neuroblastoma diagnosed at more than 1 year of age. **Journal of clinical oncology**, v. 16, n. 9, p. 3053-3060, 1998. ISSN 0732-183X.
- CHILIN, A. et al. Exploring epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor features: the role of fused dioxygenated rings on the quinazoline scaffold. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1862-1866, 2010. ISSN 0022-2623.
- CHILLER, K. G.; PASSARO, D.; FRIEDEN, I. J. Hemangiomas of infancy: clinical characteristics, morphologic subtypes, and their relationship to race, ethnicity, and sex. **Archives of dermatology**, v. 138, n. 12, p. 1567-1576, 2002. ISSN 0003-987X.
- CHIU, B.; MIRKIN, B.; MADONNA, M. B. Mitogenic and apoptotic actions of epidermal growth factor on neuroblastoma cells are concentration-dependent. **Journal of Surgical Research**, v. 135, n. 2, p. 209-212, 2006. ISSN 0022-4804.

CHRISTISON-LAGAY, E. R. et al. Hepatic hemangiomas: subtype classification and development of a clinical practice algorithm and registry. **Journal of pediatric surgery**, v. 42, n. 1, p. 62-68, 2007. ISSN 0022-3468.

CICCARONE, V. et al. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. **Cancer research**, v. 49, n. 1, p. 219-225, 1989. ISSN 0008-5472.

COHN, S. L. et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG task force report. **Journal of clinical oncology**, v. 27, n. 2, p. 289, 2009.

CORVOL, J. -C. Neuroprevention: A new challenge? **Revue Neurologique**, v. 168, p. 796, 2012.

DADRAS, S. S. et al. Infantile hemangiomas are arrested in an early developmental vascular differentiation state. **Modern pathology**, v. 17, n. 9, p. 1068, 2004. ISSN 1530-0285.

DE JONG, S. et al. Does hypoxia play a role in infantile hemangioma? **Archives of dermatological research**, v. 308, n. 4, p. 219-227, 2016. ISSN 0340-3696.

DE STROOPER, B. Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease: Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. **EMBO reports**, v. 8, n. 2, p. 141-146, 2007. ISSN 1469-221X.

DENG, Y. et al. Deletion of presenilin 1 hydrophilic loop sequence leads to impaired γ -secretase activity and exacerbated amyloid pathology. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 14, p. 3845-3854, 2006. ISSN 0270-6474.

DEYRUP, A. T. et al. Epithelioid hemangioendothelioma of soft tissue: a proposal for risk stratification based on 49 cases. **The American journal of surgical pathology**, v. 32, n. 6, p. 924-927, 2008. ISSN 0147-5185.

DIEDE, S. J. Spontaneous regression of metastatic cancer: learning from neuroblastoma. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 2, p. 71, 2014. ISSN 1474-1768.

DROLET, B. A. et al. Infantile hemangiomas: an emerging health issue linked to an increased rate of low birth weight infants. **The Journal of pediatrics**, v. 153, n. 5, p. 712-715. e1, 2008. ISSN 0022-3476.

DUBOIS, J. et al. Imaging of hemangiomas and vascular malformations in children. **Academic radiology**, v. 5, n. 5, p. 390-400, 1998. ISSN 1076-6332.

DULIĆ, V. et al. Uncoupling between phenotypic senescence and cell cycle arrest in aging p21-deficient fibroblasts. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 18, p. 6741-6754, 2000. ISSN 0270-7306.

EL-HEFNAWY, A. S. et al. Doxazosin versus tizanidine for treatment of dysfunctional voiding in children: a prospective randomized open-labeled trial. **Urology**, v. 79, n. 2, p. 428-433, 2012. ISSN 0090-4295.

FELBOR, U. et al. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. **The EMBO journal**, v. 19, n. 6, p. 1187-1194, 2000. ISSN 0261-4189.

FELDKAMP, M. M. et al. Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens. **Neurosurgery**, v. 45, n. 6, p. 1442-1453, 1999. ISSN 0148-396X.

FLAHERTY, D. et al. Phosphorylation of human tau protein by microtubule-associated kinases: GSK3 β and cdk5 are key participants. **Journal of neuroscience research**, v. 62, n. 3, p. 463-472, 2000. ISSN 0360-4012.

FRIEDEN, I. J.; ROGERS, M.; GARZON, M. C. Conditions masquerading as infantile haemangioma: part 1. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 50, n. 2, p. 77-97, 2009. ISSN 0004-8380.

FRIEDL, P.; ALEXANDER, S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. **Cell**, v. 147, n. 5, p. 992-1009, 2011. ISSN 0092-8674.

GAEZLER, M. M. Investigação do potencial terapêutico da doxazosina em modelos de gliomas *in vitro* e *in vivo*. 2017. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GAEZLER, M. M. et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway inhibition by doxazosin promotes glioblastoma cells death, upregulation of p53 and triggers low neurotoxicity. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0154612, 2016. ISSN 1932-6203.

GALLIGAN, A. J. Childhood cancer survivorship and long-term outcomes. **Advances in pediatrics**, v. 64, n. 1, p. 133-169, 2017. ISSN 0065-3101.

GARRETT, T. P. et al. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor α . **Cell**, v. 110, n. 6, p. 763-773, 2002. ISSN 0092-8674.

GAUR, S.; TORABI, A.; O'NEILL, T. J. Activity of angiogenesis inhibitors in metastatic epithelioid hemangioendothelioma: a case report. **Cancer biology & medicine**, v. 9, n. 2, p. 133, 2012.

GESBERT, F. et al. BCR/ABL regulates expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 through the phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 50, p. 39223-39230, 2000. ISSN 0021-9258.

GOLDSTEIN, D. M.; GRAY, N. S.; ZARRINKAR, P. P. High-throughput kinase profiling as a platform for drug discovery. **Nature reviews Drug discovery**, v. 7, n. 5, p. 391, 2008. ISSN 1474-1784.

GORDILLO, G. M. et al. Multidrug resistance-associated protein-1 (MRP-1)-dependent glutathione disulfide (GSSG) efflux as a critical survival factor for oxidant-enriched tumorigenic endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 19, p. 10089-10103, 2016. ISSN 0021-9258.

GUARNIERI, S. et al. Extracellular guanosine and GTP promote expression of differentiation markers and induce S-phase cell-cycle arrest in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 27, n. 2, p. 135-147, 2009. ISSN 0736-5748.

GUHA, A. et al. Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation. **Oncogene**, v. 15, n. 23, p. 2755, 1997. ISSN 1476-5594.

GUICCIARDI, M. E.; GORES, G. J. Life and death by death receptors. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 6, p. 1625-1637, 2009. ISSN 0892-6638.

HAASS, C. et al. Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. **Nature**, v. 359, n. 6393, p. 322, 1992. ISSN 1476-4687.

HANGER, D. P.; NOBLE, W. Functional implications of glycogen synthase kinase-3-mediated tau phosphorylation. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2011, 2011.

HATANPAA, K. J. et al. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. **Neoplasia**, v. 12, n. 9, p. 675-684, 2010. ISSN 1476-5586.

HATTANGADI, J. A. et al. Proton radiotherapy for high-risk pediatric neuroblastoma: early outcomes and dose comparison. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 83, n. 3, p. 1015-1022, 2012. ISSN 0360-3016.

HECK, J. E. et al. The epidemiology of neuroblastoma: a review. **Paediatric and perinatal epidemiology**, v. 23, n. 2, p. 125-143, 2009. ISSN 0269-5022.

HOGARTY, M. D. The requirement for evasion of programmed cell death in neuroblastomas with MYCN amplification. **Cancer letters**, v. 197, n. 1-2, p. 173-179, 2003. ISSN 0304-3835.

HOGARTY, M. D. et al. ODC1 is a critical determinant of MYCN oncogenesis and a therapeutic target in neuroblastoma. **Cancer research**, v. 68, n. 23, p. 9735-9745, 2008. ISSN 0008-5472.

HOGELING, M.; ADAMS, S.; WARGON, O. A randomized controlled trial of propranolol for infantile hemangiomas. **Pediatrics**, v. 128, n. 2, p. e259-e266, 2011. ISSN 0031-4005.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annual review of neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 677-736, 2001. ISSN 0147-006X.

IRWIN, M. S.; PARK, J. R. Neuroblastoma: paradigm for precision medicine. **Pediatric Clinics**, v. 62, n. 1, p. 225-256, 2015. ISSN 0031-3955.

iSaúde.net. 2012. Disponível em: <<http://www.isaude.net/pt-BR/noticia/32903/geral/gastos-do-governo-com-tratamento-de-cancer-no-sus-umentam-26>>. acessado em 14 de junho de 2014.

ISRAEL, M. A. et al. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. **Nature**, v. 482, n. 7384, p. 216, 2012. ISSN 1476-4687.

JACK JR, C. R. et al. 11CPiB and structural MRI provide complementary information in imaging of Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. **Brain**, v. 131, p. 665, 2008.

JADHAV, S. et al. A walk through tau therapeutic strategies. **Acta neuropathologica communications**, v. 7, n. 1, p. 22, 2019. ISSN 2051-5960.

JAN, A. et al. The ratio of monomeric to aggregated forms of A β 40 and A β 42 is an important determinant of amyloid- β aggregation, fibrillogenesis, and toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 42, p. 28176-28189, 2008. ISSN 0021-9258.

JANKNEG, R.; CHAPPLE, C. Efficacy and safety of the alpha-1 blocker doxazosin in the treatment of benign prostatic hyperplasia. **European urology**, v. 24, p. 319-326, 1993. ISSN 0302-2838.

JARRETT, J. T.; BERGER, E. P.; LANSBURY JR, P. T. The carboxy terminus of the beta. amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Biochemistry**, v. 32, n. 18, p. 4693-4697, 1993. ISSN 0006-2960.

JENSEN, I. S. et al. Evaluating cost benefits of combination therapies for advanced melanoma. **Drugs in context**, v. 5, 2016.

JONSSON, T. et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 96, 2012. ISSN 1476-4687.

KANTARJIAN, H. M. et al. Cancer drugs in the United States: Justum Pretium—the just price. **Journal of clinical oncology**, v. 31, n. 28, p. 3600, 2013.

KASSAM, A.; MANDEL, K. Metastatic hepatic epithelioid hemangioendothelioma in a teenage girl. **Journal of pediatric hematology/oncology**, v. 30, n. 7, p. 550-552, 2008. ISSN 1077-4114.

KAUFFMAN, S. L.; STOUT, A. P. Malignant hemangioendothelioma in infants and children. **Cancer**, v. 14, n. 6, p. 1186-1196, 1961. ISSN 0008-543X.

KENNA, G. A. et al. Role of the α 1 blocker doxazosin in alcoholism: a proof-of-concept randomized controlled trial. **Addiction biology**, v. 21, n. 4, p. 904-914, 2016. ISSN 1355-6215.

- KIM, J. et al. A β 40 inhibits amyloid deposition *in vivo*. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 3, p. 627-633, 2007. ISSN 0270-6474.
- KITAGISHI, Y. et al. Dietary regulation of PI3K/AKT/GSK-3 β pathway in Alzheimer's disease. **Alzheimer's research & therapy**, v. 6, n. 3, p. 35, 2014. ISSN 1758-9193.
- KITAICHI, M. et al. Pulmonary epithelioid haemangioendothelioma in 21 patients, including three with partial spontaneous regression. **European Respiratory Journal**, v. 12, n. 1, p. 89-96, 1998. ISSN 0903-1936.
- KOBAYASHI, N. et al. Sorafenib monotherapy in a patient with unresectable hepatic epithelioid hemangioendothelioma. **Case reports in oncology**, v. 9, n. 1, p. 134-137, 2016. ISSN 1662-6575.
- KOLA, I.; LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 8, p. 711, 2004. ISSN 1474-1784.
- KRAKSTAD, C.; CHEKENYA, M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. **Molecular cancer**, v. 9, n. 1, p. 135, 2010. ISSN 1476-4598.
- KREISSMAN, S. G. et al. Purged versus non-purged peripheral blood stem-cell transplantation for high-risk neuroblastoma (COG A3973): a randomised phase 3 trial. **The lancet oncology**, v. 14, n. 10, p. 999-1008, 2013. ISSN 1470-2045.
- KUME, T. et al. Dibutyryl cyclic AMP induces differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into a noradrenergic phenotype. **Neuroscience letters**, v. 443, n. 3, p. 199-203, 2008. ISSN 0304-3940.
- KUNTZ, I. D. Structure-based strategies for drug design and discovery. **Science**, v. 257, 1078-1082, 1992.
- KUSHNER, B. H. et al. Lack of survival advantage with autologous stem-cell transplantation in high-risk neuroblastoma consolidated by anti-GD2 immunotherapy and isotretinoin. **Oncotarget**, v. 7, n. 4, p. 4155, 2016.
- KYPRIANOU, N. et al. Induction of prostate apoptosis by doxazosin in benign prostatic hyperplasia. **The Journal of urology**, v. 159, n. 6, p. 1810-1815, 1998. ISSN 0022-5347.
- LANE, C. A.; HARDY, J.; SCHOTT, J. M. Alzheimer's disease. **European Journal of Neurology**, v. 25, n. 1, p. 59-70, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ene.13439>>.
- LÉAUTÉ-LABRÈZE, C. et al. A randomized, controlled trial of oral propranolol in infantile hemangioma. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 8, p. 735-746, 2015. ISSN 0028-4793.
- LEE, J. et al. Decreased levels of BDNF protein in Alzheimer temporal cortex are independent of BDNF polymorphisms. **Experimental neurology**, v. 194, n. 1, p. 91-96, 2005. ISSN 0014-4886.

LEON-VILLAPALOS, J.; WOLFE, K.; KANGESU, L. GLUT-1: an extra diagnostic tool to differentiate between haemangiomas and vascular malformations. **British journal of plastic surgery**, v. 58, n. 3, p. 348-352, 2005. ISSN 0007-1226.

LEWIS, J. et al. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. **Science**, v. 293, n. 5534, p. 1487-1491, 2001. ISSN 0036-8075.

LI, Z.; THIELE, C. J. Targeting Akt to increase the sensitivity of neuroblastoma to chemotherapy: lessons learned from the brain-derived neurotrophic factor/TrkB signal transduction pathway. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 11, n. 12, p. 1611-1621, 2007. ISSN 1472-8222.

LIU, Q. et al. Effect of potent γ -secretase modulator in human neurons derived from multiple presenilin 1-induced pluripotent stem cell mutant carriers. **JAMA neurology**, v. 71, n. 12, p. 1481-1489, 2014. ISSN 2168-6149.

LOPES, F. M. et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an *in vitro* model for Parkinson disease studies. **Brain research**, v. 1337, p. 85-94, 2010. ISSN 0006-8993.

LUO, J. Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. **Cancer letters**, v. 273, n. 2, p. 194-200, 2009. ISSN 0304-3835.

MALAGELADA, C.; JIN, Z. H.; GREENE, L. A. RTP801 is induced in Parkinson's disease and mediates neuron death by inhibiting Akt phosphorylation/activation. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 53, p. 14363-14371, 2008. ISSN 0270-6474.

MALKIN, D. Li-Fraumeni syndrome. In: (Ed.). **Adrenocortical Carcinoma**: Springer, 2009. p.173-191.

MALLORY, F. B. The results of the application of special histological methods to the study of tumors. **The Journal of experimental medicine**, v. 10, n. 5, p. 575, 1908.

MASCARENHAS, R. C. et al. Thalidomide inhibits the growth and progression of hepatic epithelioid hemangioendothelioma. **Oncology**, v. 67, n. 5-6, p. 471-475, 2004. ISSN 0030-2414.

MATTHAY, K. K. et al. Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. **Journal of clinical oncology**, v. 27, n. 7, p. 1007, 2009.

MATTHAY, K. K. et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 16, p. 1165-1173, 1999. ISSN 0028-4793.

MATTSON, M. P. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1144, n. 1, p. 97-112, 2008. ISSN 1749-6632.

MAZLOOM, A. et al. Radiation therapy to the primary and postinduction chemotherapy MIBG-avid sites in high-risk neuroblastoma. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 90, n. 4, p. 858-862, 2014. ISSN 0360-3016.

MCGUIRE, S. **World cancer report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, international agency for research on cancer, WHO Press, 2015: Oxford University Press 2016.**

MCSHANE, R.; SASTRE, A. A.; MINAKARAN, N. Memantine for dementia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, 2006. ISSN 1465-1858.

MECO, D. et al. Antitumor activity of imatinib mesylate in neuroblastoma xenografts. **Cancer letters**, v. 228, n. 1-2, p. 211-219, 2005. ISSN 0304-3835.

MEDINA, M.; WANDOSELL, F. Deconstructing GSK-3: the fine regulation of its activity. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2011, 2011.

MICHAUD, A. P. et al. Spastic diplegia and other motor disturbances in infants receiving interferon-alpha. **The Laryngoscope**, v. 114, n. 7, p. 1231-1236, 2004. ISSN 0023-852X.

MOHR, M. A. et al. Very long apnea events in preterm infants. **Journal of Applied Physiology**, v. 118, n. 5, p. 558-568, 2014. ISSN 8750-7587.

MOLLENHAUER, B. et al. Tauopathies and synucleinopathies: do cerebrospinal fluid beta-amyloid peptides reflect disease-specific pathogenesis? **J Neural Transm**, v. 114, p. 919, 2007.

MOLLEREAU, C.; ZAJAC, J.-M.; ROUMY, M. Staurosporine differentiation of NPFF2 receptor-transfected SH-SY5Y neuroblastoma cells induces selectivity of NPFF activity towards opioid receptors. **Peptides**, v. 28, n. 5, p. 1125-1128, 2007. ISSN 0196-9781.

MONCLAIR, T. et al. The international neuroblastoma risk group (INRG) staging system: an INRG task force report. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 2, p. 298, 2009.

MONTANO, X.; DJAMGOZ, M. B. Epidermal growth factor, neurotrophins and the metastatic cascade in prostate cancer. **FEBS letters**, v. 571, n. 1-3, p. 1-8, 2004. ISSN 1873-3468.

MOORE, N. F. et al. Molecular rationale for the use of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors in combination with crizotinib in ALK-mutated neuroblastoma. **Oncotarget**, v. 5, n. 18, p. 8737, 2014.

MOSSÉ, Y. P. et al. Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a Children's Oncology Group

phase 1 consortium study. **The lancet oncology**, v. 14, n. 6, p. 472-480, 2013. ISSN 1470-2045.

MULLIN, R. Tufts study finds big rise in cost of drug development. *Chem Eng News*, v. 92, n. 6, 2014.

MUNDEN, A. et al. Prospective study of infantile haemangiomas: incidence, clinical characteristics and association with placental anomalies. **British Journal of Dermatology**, v. 170, n. 4, p. 907-913, 2014. ISSN 0007-0963.

MURRAY, M. M. et al. Amyloid β Protein: A β 40 Inhibits A β 42 Oligomerization. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 18, p. 6316-6317, 2009/05/13 2009. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <https://doi.org/10.1021/ja8092604> >.

MUSICCO, M. et al. Inverse occurrence of cancer and Alzheimer disease: a population-based incidence study. **Neurology**, v. 81, n. 4, p. 322-328, 2013. ISSN 0028-3878.

NAVARRO, S. et al. Prognostic value of International Neuroblastoma Pathology Classification in localized resectable peripheral neuroblastic tumors: a histopathologic study of localized neuroblastoma European Study Group 94.01 Trial and Protocol. **Journal of clinical oncology**, v. 24, n. 4, p. 695-699, 2006. ISSN 0732-183X.

NIH. Early-Stage Repurposing | National Center for Advancing Translational Sciences. Acesso em 18 de março de 2019. <https://ncats.nih.gov/preclinical/repurpose/early>.

NIH. Late-Stage Repurposing | National Center for Advancing Translational Sciences. Acesso em 18 de março de 2019. <https://ncats.nih.gov/preclinical/repurpose/late>.

NORTH, P. E. et al. GLUT1: a newly discovered immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas. **Human pathology**, v. 31, n. 1, p. 11-22, 2000. ISSN 0046-8177.

NORTH, P. E. et al. A unique microvascular phenotype shared by juvenile hemangiomas and human placenta. **Archives of dermatology**, v. 137, n. 5, p. 559-570, 2001. ISSN 0003-987X.

NYGAARD, H. B. et al. A phase Ib multiple ascending dose study of the safety, tolerability, and central nervous system availability of AZD0530 (saracatinib) in Alzheimer's disease. **Alzheimers Res Ther**, v. 7, n. 35, 2015.

OBESO, J.; WEBER, J.; AUERBACH, R. A hemangioendothelioma-derived cell line: its use as a model for the study of endothelial cell biology. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 63, n. 2, p. 259-269, 1990. ISSN 0023-6837.

OGISO, H. et al. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 775-787, 2002. ISSN 0092-8674.

- ONIDA, F. et al. Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. **Blood**, v. 99, n. 3, p. 840-849, 2002. ISSN 0006-4971.
- OPEL, D. et al. Activation of Akt predicts poor outcome in neuroblastoma. **Cancer research**, v. 67, n. 2, p. 735-745, 2007. ISSN 0008-5472.
- OSHIRO, Y. et al. Clinical results of proton beam therapy for advanced neuroblastoma. **Radiation oncology**, v. 8, n. 1, p. 142, 2013. ISSN 1748-717X.
- PADRON, E. et al. A multi-institution phase I trial of ruxolitinib in patients with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 15, p. 3746-3754, 2016. ISSN 1078-0432.
- PADRON, E. et al. GM-CSF-dependent pSTAT5 sensitivity is a feature with therapeutic potential in chronic myelomonocytic leukemia. **Blood**, v. 121, n. 25, p. 5068-5077, 2013. ISSN 0006-4971.
- PÅHLMAN, S. et al. Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. **International Journal of Cancer**, v. 28, n. 5, p. 583-589, 1981. ISSN 0020-7136.
- PALLOTTI, M. C. et al. Long-term durable response to lenalidomide in a patient with hepatic epithelioid hemangioendothelioma. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 22, p. 7049, 2014.
- PANTZIARKA, P. et al. The repurposing drugs in oncology (ReDO) project. **ecancermedicalsecience**, v. 8, 2014.
- PAPAEMMANUIL, E. et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 122, n. 22, p. 3616-3627, 2013. ISSN 0006-4971.
- PARK, J. R. et al. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: neuroblastoma. **Pediatric blood & cancer**, v. 60, n. 6, p. 985-993, 2013. ISSN 1545-5009.
- PARK, J. R. et al. **A phase III randomized clinical trial (RCT) of tandem myeloablative autologous stem cell transplant (ASCT) using peripheral blood stem cell (PBSC) as consolidation therapy for high-risk neuroblastoma (HR-NB): A Children's Oncology Group (COG) study**: American Society of Clinical Oncology 2016.
- PARVATHENENI, V. et al. Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process. **Drug Discov Today**, 2019. ISSN 1359-6446.
- PATEL, B. et al. Genomic determinants of chronic myelomonocytic leukemia. **Leukemia**, v. 31, n. 12, p. 2815, 2017. ISSN 1476-5551.

- PAUL, S. M. et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. **Nature reviews Drug discovery**, v. 9, n. 3, p. 203, 2010. ISSN 1474-1784.
- PEARSON, A. D. et al. High-dose rapid and standard induction chemotherapy for patients aged over 1 year with stage 4 neuroblastoma: a randomised trial. **The lancet oncology**, v. 9, n. 3, p. 247-256, 2008. ISSN 1470-2045.
- PENG, L. X. et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway is involved in pinyangmycin-induced growth inhibition, apoptosis and reduction of invasive potential in EOMA mouse hemangioendothelioma cells. **Molecular medicine reports**, v. 12, n. 6, p. 8275-8281, 2015. ISSN 1791-2997.
- PEREZ, J.; PARDO, J.; GOMEZ, C. Vincristine--an effective treatment of corticoid-resistant life-threatening infantile hemangiomas. **Acta Oncologica**, v. 41, n. 2, p. 197-199, 2002. ISSN 0284-186X.
- PETRAKIS, I. L.; SIMPSON, T. L. Posttraumatic stress disorder and alcohol use disorder: a critical review of pharmacologic treatments. **Alcoholism: clinical and experimental research**, v. 41, n. 2, p. 226-237, 2017. ISSN 0145-6008.
- PETTY, A. et al. A small molecule agonist of EphA2 receptor tyrosine kinase inhibits tumor cell migration *in vitro* and prostate cancer metastasis *in vivo*. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e42120, 2012. ISSN 1932-6203.
- PEUCHMAUR, M. et al. Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 98, n. 10, p. 2274-2281, 2003. ISSN 0008-543X.
- PORTA, C.; PAGLINO, C.; MOSCA, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. **Frontiers in oncology**, v. 4, p. 64, 2014. ISSN 2234-943X.
- PORTELIUS, E. et al. Determination of β -amyloid peptide signatures in cerebrospinal fluid using immunoprecipitation-mass spectrometry. **Journal of proteome research**, v. 5, n. 4, p. 1010-1016, 2006. ISSN 1535-3893.
- PRINCE, M. J. **World Alzheimer Report 2014: dementia and risk reduction: an analysis of protective and modifiable factors**. Alzheimer's Disease International, 2014.
- PROCTOR, C. J.; GRAY, D. A. GSK3 and p53-is there a link in Alzheimer's disease? **Molecular neurodegeneration**, v. 5, n. 1, p. 7, 2010. ISSN 1750-1326.
- PYKO, I. V. et al. Glycogen synthase kinase 3 β inhibition sensitizes human glioblastoma cells to temozolomide by affecting O 6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation via c-Myc signaling. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 10, p. 2206-2217, 2013. ISSN 1460-2180.

RAPHAEL, C. et al. Successful treatment of metastatic hepatic epithelioid hemangioendothelioma with thalidomide: a case report. **Journal of medical case reports**, v. 4, n. 1, p. 413, 2010. ISSN 1752-1947.

REALMUTO, S. et al. Tumor diagnosis preceding Alzheimer's disease onset: is there a link between cancer and Alzheimer's disease? **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 31, n. 1, p. 177-182, 2012. ISSN 1387-2877.

RETTIG, W. J. et al. Coordinate changes in neuronal phenotype and surface antigen expression in human neuroblastoma cell variants. **Cancer research**, v. 47, n. 5, p. 1383-1389, 1987. ISSN 0008-5472.

REYNOLDS, C. H. et al. Phosphorylation sites on tau identified by nanoelectrospray mass spectrometry: differences *in vitro* between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and P38, and glycogen synthase kinase-3 β . **Journal of neurochemistry**, v. 74, n. 4, p. 1587-1595, 2000. ISSN 0022-3042.

RIES, L. A. G. et al. Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995. **Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995.**, 1999.

RITTER, M. R. et al. Insulin-like growth factor 2 and potential regulators of hemangioma growth and involution identified by large-scale expression analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 11, p. 7455-7460, 2002. ISSN 0027-8424.

ROCHA, C. R. R. et al. Glutathione depletion sensitizes cisplatin-and temozolomide-resistant glioma cells *in vitro* and *in vivo*. **Cell death & disease**, v. 5, n. 10, p. e1505, 2014. ISSN 2041-4889.

RODGMAN, C. et al. Doxazosin XL reduces symptoms of posttraumatic stress disorder in veterans with PTSD: a pilot clinical trial. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 77, n. 5, p. e561-5, 2016. ISSN 0160-6689.

RODRIGUES, T. et al. Emerging tumor spheroids technologies for 3D *in vitro* cancer modeling. **Pharmacology & therapeutics**, v. 184, p. 201-211, 2018. ISSN 0163-7258.

ROSENBERG, A.; AGULNIK, M. Epithelioid hemangioendothelioma: update on diagnosis and treatment. **Current treatment options in oncology**, v. 19, n. 4, p. 19, 2018. ISSN 1527-2729.

ROSENGARTEN, D. et al. Pulmonary epithelioid hemangioendothelioma. **IMAJ-Israel Medical Association Journal**, v. 13, n. 11, p. 676, 2011. ISSN 1565-1088.

ROSS, R. A. Human Neuroblastoma I-Type Cells Are Malignant Neural Crest Stem Cells'. **chemotherapy**, v. 5, p. 6, 1995.

SALECH, F. et al. Thalidomide for the treatment of metastatic hepatic epithelioid hemangioendothelioma: a case report with a long term follow-up. **Annals of hepatology**, v. 10, n. 1, p. 99-102, 2016.

SANTO, E. E. et al. FOXO3a is a major target of inactivation by PI3K/AKT signaling in aggressive neuroblastoma. **Cancer research**, v. 73, n. 7, p. 2189-2198, 2013. ISSN 0008-5472.

SARDARO, A. et al. Epithelioid hemangioendothelioma: an overview and update on a rare vascular tumor. **Oncology reviews**, v. 8, n. 2, 2014.

SCHIESTL, C. et al. Efficacy and safety of propranolol as first-line treatment for infantile hemangiomas. **European journal of pediatrics**, v. 170, n. 4, p. 493-501, 2011. ISSN 0340-6199.

SCHMIDT, R. et al. EFNS-ENS/EAN Guideline on concomitant use of cholinesterase inhibitors and memantine in moderate to severe Alzheimer's disease. **European journal of neurology**, v. 22, n. 6, p. 889-898, 2015. ISSN 1351-5101.

SCHRAMM, A. et al. Next-generation RNA sequencing reveals differential expression of MYCN target genes and suggests the mTOR pathway as a promising therapy target in MYCN-amplified neuroblastoma. **International journal of cancer**, v. 132, n. 3, p. E106-E115, 2013. ISSN 1097-0215.

SCHREY, D. et al. Additional therapies to improve metastatic response to induction therapy in children with high-risk neuroblastoma. **Journal of pediatric hematology/oncology**, v. 37, n. 3, p. e150-e153, 2015. ISSN 1077-4114.

SCHULER, E. et al. Refined medullary blast and white blood cell count based classification of chronic myelomonocytic leukemias. **Leukemia research**, v. 38, n. 12, p. 1413-1419, 2014. ISSN 0145-2126.

SELKOE, D. J. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. **Annals of internal medicine**, v. 140, n. 8, p. 627-638, 2004. ISSN 0003-4819.

SEMENISTY, V. et al. Pazopanib for metastatic pulmonary epithelioid hemangioendothelioma—a suitable treatment option: case report and review of anti-angiogenic treatment options. **BMC cancer**, v. 15, n. 1, p. 402, 2015. ISSN 1471-2407.

SHIMADA, H. et al. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors. **Cancer**, v. 86, n. 2, p. 349-363, 1999. ISSN 1097-0142.

SHIMADA, H. et al. International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. **Cancer**, v. 92, n. 9, p. 2451-2461, 2001. ISSN 0008-543X.

SHOJI, M. et al. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. **Science**, v. 258, n. 5079, p. 126-129, 1992. ISSN 0036-8075.

SINGH, J.; KAUR, G. Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures. **Brain research**, v. 1154, p. 8-21, 2007. ISSN 0006-8993.

SMITH, C. J. F. et al. Infantile hemangiomas: an updated review on risk factors, pathogenesis, and treatment. **Birth defects research**, v. 109, n. 11, p. 809-815, 2017. ISSN 2472-1727.

SØRENSEN, S. A.; FENGER, K.; OLSEN, J. H. Significantly lower incidence of cancer among patients with Huntington disease: an apoptotic effect of an expanded polyglutamine tract? **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 86, n. 7, p. 1342-1346, 1999. ISSN 0008-543X.

STACCHIOTTI, S. et al. Sirolimus in advanced epithelioid hemangioendothelioma: a retrospective case-series analysis from the Italian Rare Cancer Network database. **Annals of surgical oncology**, v. 23, n. 9, p. 2735-2744, 2016. ISSN 1068-9265.

STILLER, C.; PARKIN, D. International variations in the incidence of neuroblastoma. **International journal of cancer**, v. 52, n. 4, p. 538-543, 1992. ISSN 0020-7136.

STOUT, A. P. Hemangio-endothelioma: a tumor of blood vessels featuring vascular endothelial cells. **Annals of Surgery**, v. 118, n. 3, p. 445, 1943.

STROTHER, D. R. et al. Outcome after surgery alone or with restricted use of chemotherapy for patients with low-risk neuroblastoma: results of Children's Oncology Group study P9641. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 15, p. 1842, 2012.

SUN, D. et al. The effect of epidermal growth factor in the injured brain after trauma in rats. **Journal of neurotrauma**, v. 27, n. 5, p. 923-938, 2010. ISSN 0897-7151.

TAMURA, S. et al. Induction of apoptosis by an inhibitor of EGFR in neuroblastoma cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 358, n. 1, p. 226-232, 2007. ISSN 0006-291X.

TEBBUTT, N.; PEDERSEN, M. W.; JOHNS, T. G. Targeting the ERBB family in cancer: couples therapy. **Nature reviews Cancer**, v. 13, n. 9, p. 663, 2013. ISSN 1474-1768.

TEFFERI, A. et al. Chronic myelomonocytic leukemia: natural history and prognostic determinants. *Mayo Clinic Proceedings*, 1989, Elsevier. p.1246-1254.

VIGO-PELFREY, C. et al. Rapid Communication: Characterization of β -Amyloid Peptide from Human Cerebrospinal Fluid. **Journal of neurochemistry**, v. 61, n. 5, p. 1965-1968, 1993. ISSN 0022-3042.

WALSH, D. M.; SELKOE, D. J. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 181-193, 2004. ISSN 0896-6273.

WARING, M. J. et al. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. **Nat Rev Drug Discov**, v. 14, n. 7, p. 475-486, 2015.

WEE, P.; WANG, Z. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. **Cancers**, v. 9, n. 5, p. 52, 2017.

WEISS, S. W.; ENZINGER, F. Epithelioid hemangioendothelioma a vascular tumor often mistaken for a carcinoma. **Cancer**, v. 50, n. 5, p. 970-981, 1982. ISSN 0008-543X.

WEN, W. et al. The generation of endostatin is mediated by elastase. **Cancer research**, v. 59, n. 24, p. 6052-6056, 1999. ISSN 0008-5472.

WENTZEL, M. *Quanto o câncer custa à economia do Brasil?*, 2018. Disponível em <<https://www.bbc.com/portuguese/geral-43047430>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

WOJCICKI, P.; WOJCICKA, K. Epidemiology, diagnostics and treatment of vascular tumours and malformations. **Adv Clin Exp Med**, v. 23, n. 3, p. 475-84, 2014.

WOLFE, M. S. When loss is gain: reduced presenilin proteolytic function leads to increased A β 42/A β 40: talking point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. **EMBO reports**, v. 8, n. 2, p. 136-140, 2007. ISSN 1469-221X.

XIA, W. γ -Secretase and its modulators: twenty years and beyond. **Neuroscience letters**, 2019. ISSN 0304-3940.

XU, W. et al. Meta-analysis of modifiable risk factors for Alzheimer's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 86, n. 12, p. 1299-1306, 2015. ISSN 0022-3050.

YAHATA, N. et al. Anti-A β drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e25788, 2011. ISSN 1932-6203.

YALÇIN, B. et al. High-dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell rescue for children with high-risk neuroblastoma. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 8, 2013. ISSN 1465-1858.

YAN, Y.; WANG, C. A β 40 protects non-toxic A β 42 monomer from aggregation. **Journal of molecular biology**, v. 369, n. 4, p. 909-916, 2007. ISSN 0022-2836.

YANG, X.; MARTIN, T. A.; JIANG, W. G. Biological influence of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on colon cancer cells. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 6, n. 6, p. 1475-1481, 2013. ISSN 1792-0981.

YEWALE, C. et al. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies. **Biomaterials**, v. 34, n. 34, p. 8690-8707, 2013. ISSN 0142-9612.

YU, A. L. et al. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 14, p. 1324-1334, 2010. ISSN 0028-4793.

YU, Y. et al. Endothelial progenitor cells in infantile hemangioma. **Blood**, v. 103, n. 4, p. 1373-1375, 2004. ISSN 0006-4971.

ZHANG, L. et al. Epidermal growth factor (EGF) triggers the malignancy of hemangioma cells via activation of NF- κ B signals. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 82, p. 133-140, 2016. ISSN 0753-3322.

ZHENG, N. et al. PDK1 activity regulates proliferation, invasion and growth of hemangiomas. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 5, p. 1903-1910, 2015. ISSN 1015-8987.

ZHENG, N.; DING, X.; ZHANG, H. Targeting rictor inhibits mouse vascular tumor cell proliferation and invasion *in vitro* and tumor growth *in vivo*. **Neoplasma**, v. 60, n. 1, p. 41-45, 2013. ISSN 0028-2685.

ZHENG, Z. et al. Apatinib for the treatment of pulmonary epithelioid hemangioendothelioma: A case report and literature review. **Medicine**, v. 96, n. 45, 2017.

ZHU, X.-L. et al. Kinetics of cytokine gene expression in macrophage and endothelial cell lines following liposome encapsulated haemoglobin (LEH) treatment *in vitro*. **Cytokine**, v. 8, n. 7, p. 541-547, 1996. ISSN 1043-4666.