

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Comissão de Graduação em Ciências Biológicas
Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas

**O papel das vias de PI3K/Akt e NFkappaB na proliferação e
viabilidade dos Glioblastomas.**

Autor: Rafael Schröder Pereira
Orientador: Dr. José Cláudio Fonseca Moreira
Co-orientador: Msc. Alfeu Zanotto-Filho

Artigo redigido no formato do periódico científico Brain Research.

Porto Alegre, 2010

Resumo

A identificação de novos alvos terapêuticos no tratamento de Glioblastomas multiformes (GBMs) se faz necessária devido ao mau prognóstico e a ineficiência das terapias associadas a esses tumores. Neste trabalho, avaliamos o envolvimento do Nuclear-Factor-*kappa*B (NFkappaB) e da via da PI3K/Akt no crescimento *in vitro* de glioblastomas, e o potencial uso dos inibidores de NFkappaB e de PI3K/Akt como possíveis agentes antitumorais. Para isso foram utilizados os inibidores farmacológicos de NFkappaB (BAY117082 e Parthenolide), e de PI3K/Akt (Quercetina e LY294002), e o inibidor misto de NFkappaB/Akt (Curcumina). Os inibidores de NFkappaB causaram uma significativa diminuição na viabilidade dos GBMs quando comparado com os inibidores de outras vias de sinalização (MAPK, MEK/ERK1/2, EGFr e JNK1/2), a qual foi dose dependente. Além disso, os inibidores de NFkappaB apresentaram extravasamento de LDH no meio de cultura e perda de integridade da membrana plasmática que foi vista através da técnica com iodeto de Propideo (IP). Já os inibidores de PI3K/Akt apresentaram um menor efeito do que os inibidores de NFkappaB, não demonstrando uma dose dependência, ainda assim, diminuíram a viabilidade dos GBMs. Entretanto, não apresentaram extravasamento de LDH no meio de cultura, e não houve incorporação de IP, mostrando que, diferentemente do que ocorre com os inibidores de NFkappaB, a perda de viabilidade vista nas células tratadas com os inibidores de PI3K/Akt está relacionada com uma diminuição na proliferação, e não com morte celular. Portanto, nossos resultados demonstram que a via da PI3K/Akt parece estar relacionada com a proliferação celular, enquanto a via do NFkappaB com sobrevivência.

Palavras-chave: NFkappaB, PI3K/Akt, Glioblastoma, Inibidores, Proliferação e Viabilidade.

1. Introdução

A busca por novos alvos terapêuticos para o tratamento de neoplasias sólidas e hematopoiéticas tem sido objeto de esforços na comunidade científica. O glioblastoma multiforme (GBM) é classificado como astrocitoma de grau IV pela Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo o mais comum entre os tumores cerebrais malignos (Louis DO H. et al. 2007). O GBM é considerado um câncer bastante agressivo e sem muitas alternativas terapêuticas, o que culmina em uma sobrevida média de 1 ano (Stewart et al. 2002). O tratamento padrão para glioblastomas inclui a remoção cirúrgica do tumor, seguida de radioterapia com administração concomitante e adjuvante de quimioterapia alquilante (Stewart et al. 2002). A adição da quimioterapia alquilante melhora a sobrevida desses pacientes entre 2 e 5 anos, quando comparada com a radioterapia isolada, em pacientes com diagnóstico precoce. No entanto, pacientes com diagnóstico tardio apresentam uma sobrevida de apenas 14,6 meses (Krakstad C. et al 2010). Portanto, a necessidade da caracterização de novas vias de sinalização importantes no crescimento de gliomas pode possibilitar o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos, proporcionando, além disso, novas alternativas terapêuticas aos pacientes que não respondem à terapia com os antitumorais clássicos. Recentemente, estudos vêm caracterizando a inibição da proteína cinase B (PKB/Akt) como um alvo potencial para indução de morte celular e sensibilização a quimioterápicos em diversos tipos de células tumorais como, por exemplo, câncer de pulmão, ovário e glioblastomas (Xu CX. et al., 2010; Wu H. et al., 2008; Koul N. et al., 2010).

A proteína cinase B ou Akt (PKB/Akt) é uma proteína cinase de resíduos serina/treonina. Em mamíferos foram encontradas três isoformas de PKB, a

PKB α (Akt 1), PKB β (Akt 2) (Jones et al., 1991; Cheng et al., 1992) e PKB γ (Akt 3) (Brodbeck et al., 1999). A ativação da PKB/Akt se dá através de vários estímulos tais como hormônios, fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular (Nicholson KM et al., 2002). A PKB/Akt é ativada por fosforilação pela Fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K). Após ser ativada, a PI3K pode promover a ativação de várias proteínas celulares e fatores de transcrição envolvidos em diversos processos, tais como metabolismo, proliferação, diferenciação e estímulos anti-apoptóticos (Nicholson KM et al., 2002). Particularmente em gliomas, a superativação de via PI3K/Akt tem sido demonstrada em mais de 60% dos tumores, em consequência de mutações que levam a ausência da atividade da proteína PTEN, um modulador negativo da PI3K. Devido a esse espectro de modulação anti-apoptótica e proliferativa, a PKB/Akt tem sido considerado um importante fator no desenvolvimento de gliomas (Hill MM. et al., 2002). Portanto, a inibição de PKB/Akt poderia ser um mecanismo de sensibilização de células tumorais por facilitar a ativação da maquinaria apoptótica, sendo um possível alvo na terapia contra o câncer (Hill MM. et al., 2002).

Junto com a via de PI3K/Akt, recentemente os estudos apontam o fator de transcrição NFkappaB (Nuclear Factor kappa-B) como um componente importante no processo de crescimento e resistência anti-apoptótica de gliomas, embora os mecanismos envolvidos na ativação deste fator permaneçam por ser elucidados (Barkett M. et al. 1999; Rayet B. et al. 1999; Aggarwal BB. et al. 2004; Kapoor GS. et al. 2004; Sethi G. et al. 2007; Zanotto-Filho A. et al. 2010). O NFkappaB é um fator de transcrição formado por uma família de proteínas combinadas em homo e heterodímeros (principalmente

heterodímeros entre as proteínas p65 e p50). O complexo p65/p50 é recrutado no citosol sob a forma de um complexo ternário ligado a subunidades inibitórias denominadas I κ B. Sob ação de estímulos como, por exemplo, citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, I κ B é fosforilada por IKK (I κ B cinase) e desliga-se de NF κ B sendo, então, levada a degradação no proteossoma. Uma vez desligado da subunidade inibitória (I κ B), a forma ativa de NF κ B (p65/p50) migrará para o núcleo, e participará da regulação de diversos genes. Entre os genes modulados por NF κ B encontram-se principalmente os relacionados às vias de inibição de morte celular como os anti-apoptóticos Bcl-xL, c-FLIP e cIAP1/2 (inibidor de apoptose 1 e 2), e os antioxidantes SOD2 (Superóxido dismutase mitocondrial), invasão (ICAM-1, VCAM-1, MMP2, MMP9), angiogênese (VEGF), proliferação (cyclin D1, MYC) e metástase (CXCR4 e TWIST), os quais são, conjuntamente, relacionados com a inibição da maquinaria apoptótica. Além dos processos já citados o NF κ B também ativa genes que contribuem para a imunidade adaptativa e a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Devido a esse espectro de modulação anti-apoptótica/antioxidante, o NF κ B tem sido considerado um fator de transcrição diretamente ligado aos eventos de proliferação, metástase e resistência tumoral aos quimioterápicos e ao sistema imune (Barkett M. et al. 1999; Xie TX. et al. 2010; Zanotto-Filho A. et al. 2010). Uma vez que PI3K e NF κ B estão super-estimulados em painéis de linhagens de gliomas e pacientes (Koul N. et al., 2010), nossa hipótese é que a inibição destas proteínas/vias de sinalização poderia ser uma alternativa para conter o crescimento desses tumores. Um ponto importante a ser considerado no potencial apoptótico da inibição de PI3K/Akt e NF κ B é a aumentada

expressão e ativação destas vias em glioblastomas comparado a células normais, o que, teoricamente, proporcionaria uma seletividade dos seus inibidores para as células neoplásicas comparado aos tecidos normais (Zhang J. et al., 2010; Koul N. et al., 2010; Zanotto-Filho A. et al. 2010). A seletividade é um fator importante quando consideramos os compostos antitumorais, uma vez que isso preveniria os possíveis efeitos adversos aos tecidos saudáveis. Portanto, essas observações qualificam a inibição da via PI3K/Akt e NFkappaB como um possível alvo na terapia contra os gliomas.

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo determinar os efeitos da via de PI3K/Akt e NFkappaB, e seus efeitos na morte e/ou proliferação de linhagens de glioma *in vitro*, além de comparar o papel destas vias no crescimento e defesa anti-apoptótica destas vias neste tipo tumoral.

2. Resultados

2.1. Inibidores de vias de sinalização potencialmente desreguladas em GBMs:

Como teste inicial, as células C6 foram tratadas com inibidores de diferentes vias de sinalização descritas como desreguladas em GBMs (Stewart LA. 2002; Soni D. et al. 2005; Yu C. et al. 2008; Brennan C. et al. 2009). Inibidores de PI3K/Akt (LY294002), EGFr (PD158780), MEK/ERK1/2 (UO126), JNK1/2 (SP600129), p38 MAPK (SB203580), e IKK/NFkappaB (BAY117082) foram avaliados em diferentes concentrações. Ao final de 36 horas de incubação, os inibidores PI3K/Akt e NFkappaB causaram uma diminuição significativa na viabilidade dos GBMs, quando comparado com os inibidores de outras vias. Os

inibidores de outras vias de sinalização tais como MAPKs, EGFr, PKC não apresentaram efeitos citotóxicos mesmo em altas concentrações, acima de 60 μ M (dado não mostrado) (tabela 1).

Na análise qualitativa da morfologia celular, pode-se perceber claramente que os inibidores de NFkappaB causaram significativas alterações morfológicas indicativas de morte celular, e o inibidor de PI3K/Akt não induziu alteração na morfologia celular, apenas diminuindo a densidade de células em cultivo, sugerindo inibição da proliferação (tabela 1 e fig. 1B).

2.2. Ensaio de viabilidade celular:

Para avaliar os efeitos dos inibidores de NFkappaB e PI3K/Akt na proliferação/viabilidade dos GBMs foram realizados testes de MTT em três linhagens, C6 (glioma de rato), U87MG e U373 (gliomas humanos). Para isso foram utilizados por 48 horas em diferentes concentrações: o inibidor Parthenolide (inibidor de IKK/NFkappaB), Quercetina e LY294002 (inibidores de PI3K/Akt) e o inibidor misto Curcumina (IKK/NFkappaB e PI3K/Akt). Os inibidores Curcumina e Parthenolide apresentaram uma curva tipo dose resposta na diminuição da viabilidade dos Gliomas, enquanto a Quercetina e o LY294002, embora tenham reduzido a viabilidade das culturas, não apresentaram tal efeito de dependência de dose, atingindo um platô de inibição nas diferentes linhagens (fig. 1A).

2.3. Iodeto de Propídeo:

Para verificar a viabilidade da membrana plasmática, também foi utilizada a técnica de incorporação de Iodeto de Propídeo (IP). As células C6 foram tratadas durante 48 horas com os inibidores, após esse período o meio foi trocado e as células foram mantidas por mais 1h com IP. As células tratadas com Curcumina e Parthenolide apresentaram incorporação de IP, sugerindo perda de integridade da membrana plasmática e morte celular. Já as células tratadas com Quercetina não apresentaram incorporação de IP quando comparado às células não-tratadas, confirmando os efeitos antiproliferativos destes inibidores indicados no ensaio de LDH (fig. 2A).

2.4. Quantificação da atividade de LDH liberada nos meios de cultura:

Os dados de morfologia e perfil de inibição nos ensaios de MTT, sugerem que os inibidores de PI3K/Akt causam inibição de proliferação ao passo que a inibição de NFkappaB parece ser citotóxica. Para confirmar essa hipótese, realizamos ensaios de LDH e incorporação de iodeto de propídeo, os quais indicam perda de viabilidade da membrana plasmática. Nos ensaios de LDH as células C6 foram tratadas por 48 horas com os inibidores Curcumina, Parthenolide, BAY117082 (IKK/NFkappaB), Quercetina e LY294002 em doses correspondentes aos seus respectivos IC₅₀. O meio foi coletado para determinação da atividade de LDH e as células foram utilizadas para os ensaios de MTT. Os Inibidores de NFkappaB (Parthenolide e BAY117082) e o inibidor misto, Curcumina, apresentaram um potente efeito no extravasamento de LDH no meio de cultura, indicando uma perda na viabilidade da membrana

plasmática. Por outro lado, os inibidores de PI3K/Akt (Quercetina e LY294002) não apresentaram diferença significativa do controle, confirmando que a redução no ensaio MTT foi causada por inibição da proliferação celular, e não por indução de morte (fig. 2B).

2.5. Western Blotting:

Foi realizado o teste de Western Blotting para Akt fosforilada (p-Akt, forma ativa) com a finalidade de confirmar os efeitos das concentrações dos inibidores de PI3K/Akt, Quercetina (110uM) e LY294002 (25uM), sobre seu alvo farmacológico. As células da linhagem de glioma humano U87MG foram tratadas por 12 horas e os experimentos foram realizados em extratos totais. A β -actina foi utilizada com controle interno do experimento. Os resultados demonstram que os inibidores foram capazes de promover uma diminuição no imuno-conteúdo de p-Akt, confirmando o efeito esperado e descrito na literatura (fig. 3A).

2.6. Atividade do NFkappaB:

No ensaio para confirmar o efeito dos inibidores do NFkappaB sobre seu alvo, as células de glioma C6 foram tratadas por 6 h com Parthenolide e BAY117082, o inibidor misto de NFkappaB/Akt (Curcumina) e de PI3K/Akt (LY294002) e os extratos nucleares foram isolados para análise por ELISA. Os inibidores de NFkappaB, como esperado, demonstraram um potente efeito em promover a diminuição na atividade do NFkappaB, enquanto o inibidor LY294002 não apresentou tal efeito. Isso mostra que os efeitos apresentados ao longo dos experimentos são específicos de cada via (fig.3B).

3. Discussão

Os glioblastomas multiformes são os tumores cerebrais malignos mais comuns em adultos. Esses tumores apresentam uma alta taxa de proliferação, e são bastante agressivos devido a sua grande capacidade de invasão e de adquirir resistência as terapias convencionais (Stewart 2002; Braganhol et al. 2006; Zanotto-Filho A. et al. 2010). O tratamento se limita a intervenção cirúrgica, seguida de radioterapia e quimioterapia alquilante, e ainda assim os pacientes apresentam baixa expectativa de sobrevida (Ohgaki H. et al. 2005). Isso nos mostra a necessidade da busca por novos alvos terapêuticos que visem à sensibilização e quebra de resistência desses tumores as terapias existentes. Nesse contexto estudos tem demonstrado que o fator de transcrição NFkappaB, assim como a via da PI3K/Akt estão super-estimuladas em Glioblastomas multiformes, e essa super-estimulação está relacionada com o mau prognóstico desses pacientes (Robe et al. 2004; Brown e Law 2006; Raychaudhuri et al. 2007; Park et al. 2009 a,b; Engelman JA. et al. 2009; Karin M. et al. 2002; Wang H. et al. 2004). A ativação de Akt se dá por fosforilação e está relacionada com sobrevivência por facilitar a translocação nuclear do NFkappaB, que ao ser transcrito, ativa genes relacionados com sobrevivência celular e proliferação (Karin M. et al. 2002). Um estudo em que foi realizado a análise imunohistoquímica de 70 GBMs, mostrou que 91,3% deles apresentavam uma alta atividade do NFkappaB, a qual estava correlacionada positivamente com elevados níveis de ativação de Akt (Wang H. et al. 2004).

Dessa forma, nesse trabalho nós avaliamos os efeitos da inibição da via de PI3K/Akt e NFkappaB, na morte e/ou proliferação de linhagens de glioma *in*

vitro (C6, U87MG e U373MG), além de comparar o papel destas vias no crescimento e defesa anti-apoptótica neste tipo tumoral. Sendo assim, foram testados os inibidores de NFkappaB (BAY117082 e Parthenolide), os inibidores de PI3K/Akt (LY294002 e Quercetina) e o inibidor misto de NFkappaB/Akt (Curcumina). BAY117082 é um inibidor específico de IKK-beta (Pierce JW. et al. 1997); Parthenolide inibe NFkappaB indiretamente através da inibição da IKK-beta e diretamente através da inibição da subunidade p65 do NFkappaB (Kwok BH. et al. 2001; Hehner SP. et al. 1999); o LY294002 é um inibidor da PI3K (Luangdilok S. et al. 2010); a Curcumina é um inibidor de IKKs não apresentando um efeito específico, inibindo, também a proteína ativadora-1 (AP-1) e a glicoxalase (Kasinski AL. et al. 2008; Santel T. et al. 2008; Dhandapani KM. et al. 2007) Os inibidores de NFkappaB causaram uma diminuição significativa na viabilidade dos GBMs quando comparado com os inibidores de outras vias de sinalização, a qual foi dose dependente. Além disso, apresentaram extravasamento de LDH no meio de cultura e perda de integridade da membrana plasmática que foi vista através da técnica de incorporação de Iodeto de Propídeo (IP). Estudos recentes têm demonstrado que o BAY117082, Parthenolide e Curcumina (Zanotto-Filho A. et al. 2010), PDTC e helenalina (Dhandapani et al. 2007), compostos com propriedades inibitórias do NFkappaB, diminuem significativamente a viabilidade de diversos tipos de GBMs, tais como C6, U87MG, U138MG, U373MG, U251MG e T98G. Já os inibidores de PI3K/Akt apresentaram um menor efeito quando comparados aos inibidores de NFkappaB, não demonstrando uma dose dependência, ainda assim, diminuíram a viabilidade dos GBMs. Entretanto, não apresentaram extravasamento de LDH no meio de cultura, e não houve

incorporação de IP, mostrando que, diferentemente do que ocorre com os inibidores de NFkappaB, a perda de viabilidade vista nas células tratadas com os inibidores de PI3K/Akt está relacionada com uma diminuição na proliferação, e não com morte celular. Alguns autores já vêm demonstrando que a Quercetina e o LY294002, ao inibirem a via da PI3K/Akt, interferem na viabilidade de alguns tipos de GBMs, tais como U138MG, U251MG e LN229 (Braganhof E. et al. 2007; Han L. et al. 2010), embora não tenham diferenciado se este efeito foi por citotoxicidade ou inibição da proliferação celular.

Dessa forma, nossos resultados demonstram que a via da PI3K/Akt parece estar relacionada com a proliferação celular, enquanto a via do NFkappaB com sobrevivência. Isso concede a essas vias o *status* de potenciais alvos terapêuticos contra os Glioblastomas, na medida em que elas regulam funções primordiais nesses tipos celulares, tais como proliferação e sobrevivência, além de estarem superexpressas nesses tumores, o que lhes conferiria seletividade. Como perspectivas do estudo temos a intenção de testar o uso dos inibidores em outros tipos celulares e posteriormente o modelo *in vivo*, assim como o uso concomitante com drogas antitumorais clássicas, e também realizar testes de siRNA para NFkappaB e PI3K/Akt.

4. Procedimentos Experimentais:

4.1. Reagentes e anticorpos:

BAY117082 ((E)3-[(4-methylphenil)-sulfonil]-2-propenenitrile); curcumina, iodeto de propídeo, HEPES, CHAPS, dithiothreitol, EDTA, tripsina, MTT (3-(4,5-dimethyl)-2,5-diphenil tetrazolium bromide), Nonidet-P40, Quercetina [2-(3,4-Dihydroxyphenyl)- 3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one, 3,3',4',5,6-

Pentahydroxyflavone] foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). O anticorpo rabbit anti-human p-Akt policlonal e anti- β -actin foram comprados da Cell Signaling Technology; SP600129 da Promega Corporation (Madison, USA). SB203580 da Merck Biosciences (Darmstadt, Germany). Parthenolide, LY294002 e UO126 da Biomol International (Plymouth Meeting, PA). PD158780 da Tocris Bioscience (MO, USA). Os reagentes usados para Electrophoresis/immunoblotting foram adquiridos da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA).

4.2. Cultura de Células:

As linhagens de glioblastomas de rato (C6) e as humanas (U87MG e U373MG) foram obtidas da American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA). As células foram cultivadas e mantidas em Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL, Carlsbad, USA) contendo 0.1% Fungizona, 100U/l de gentamicina e suplementadas com 5% de soro fetal bovino nas células C6 e 10% na U87MG e U373MG. As células foram conservadas em estufa a 37°C com 5% CO₂ (M.L. da Frota Jr. et al. 2009).

4.3. Ensaio de MTT e de LDH:

A redução do MTT pelas desidrogenases celulares e a liberação da lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura foram utilizados para estimar a viabilidade celular (K.M. Dhandapani. et al. 2007; A. Zanotto-Filho et al. 2009). As células (10⁴/por poço) foram semeadas em placas de 96 poços, após atingir a confluência de 60-70% essas células foram tratadas. Após os tratamentos foram realizados os ensaios de MTT e LDH. A liberação de Lactato Desidrogenase (LDH) no meio de cultura das células é um indicativo de perda

de integridade de membrana, a qual foi determinada pelo kit de fluorescência (CytoTox 96-NonRadioactive Cytotoxicity Assay, Promega) segundo instruções do fabricante. A morfologia das células foi avaliada por microscopia de luz (Nikon Eclipse TE 300) e classificadas como: Normal (células com morfologia inalterada e densidade normal); Baixa densidade (células com morfologia normal e baixa densidade na placa); Células mortas (morfologia celular e nuclear alterada, vacuolização citoplasmática, presença de células soltas).

4.4. Incorporação de Iodeto de Propídeo:

O iodeto de propídeo (IP) penetra nas células com perda na integridade da membrana plasmática e pode ser analisado por microscopia de fluorescência. Para isso, as células tratadas com os inibidores eram incubadas com 2 µg/mL de IP em meio por 1h em estufa (Braganhol E. et al. 2006). A fluorescência do IP foi excitada a 515-560 nm usando um microscópio invertido (Nikon Eclipse TE 300) equipado com filtro rodamina; foram coletadas as microfotografias representativas (até 5 por poço).

4.5. Fracionamento Celular:

Para a preparação dos extratos nucleares, as células (~ 5×10^6 , 70-80 % confluência) foram lavadas com tampão salina-fosfato (phosphate-buffered saline - PBS) e ressuspendidas em 0.4 mL de tampão de lise hipotônico (10 mmol/L HEPES (pH 7.9), 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L phenilmethylsulfonyl fluoreto, 0.5 mmol/L dithiothreitol, e um coquetel de inibidor de proteases (Roche) por 15 minutos. Após, foi adicionado 12,5 µL de Igepal a

10% para completar a lise. Os homogenatos foram centrifugados (13000 x g, 30 seg), e o sobrenadante contendo o extrato citoplasmático foi conservado a -80°C. O pellet contendo os núcleos foi ressuspendido em 100 µL de tampão hipertônico de extração nuclear (10 mmol/L HEPES pH 7.9, 0.42 M NaCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L phenilmethylsulfonyl fluoreto, 1 mmol/L dithiothreitol e inibidores de protease). Após 40 minutos de agitação contínua, os extratos foram centrifugados (13000 x g, 10 min, 4°C), e os sobrenadantes contendo os extratos nucleares foram armazenados a -80°C para posterior análise. O conteúdo de proteínas foi estimado através da técnica de Bradford (Zanotto-Filho A. et al. 2009; Zanotto-Filho A. et al. 2010).

4.6. Ensaio de ELISA para determinação da atividade do NFκB:

Para determinar a atividade do NFκappaB, foi utilizado 10 µg de proteína do extrato nuclear conforme o protocolo do fabricante (NFκappaB p65 Elisa kit, Stressgen/Assays designs). O método de ELISA se baseia na detecção da quimioluminescência provocada pela ligação do NFκappaB ativo (detecção da subunidade p65) na sequência oligonucleotídica consenso aderida na placa. Como controle positivo do NFκappaB o kit fornece um extrato nuclear de células Hela estimuladas com TNF-α e oligonucleotídeos mutantes para competição (Dhandapani K.M. et al. 2007).

4.7. Western Blotting:

As proteínas (30 µg) foram separadas por SDS-PAGE com 10% (w/v) de acrilamida, 0.275% (w/v) de bisacrilamida, e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Essas membranas foram incubadas em TTBS [20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 137

mmol/L NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20] contendo 5% (w/v) de albumina bovina por 1h a temperatura ambiente. Após essa primeira incubação, essas membranas foram mantidas durante 12 horas em câmara fria, com o anticorpo primário adequado. Passado esse período, as membranas foram lavadas com TTBS e incubadas com o anticorpo secundário por 2h a temperatura ambiente. As bandas com quimioluminescência foram detectadas por exposição da membrana a um filme, que posteriormente foi analisado por densitometria através do software Image-J® (Zanotto-Filho A. et al. 2009).

4.8. Análise Estatística:

Os dados foram expressos como média \pm D.P. (desvio padrão) e analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste post hoc de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Apoio Financeiro: CNPq, Fapergs e Capes.

Referências

- Aggarwal BB. (2004) Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell*; 6(3):203–8.
- Barkett M., Gilmore TD. (1999) Control of apoptosis by Rel/NFkappaB transcription factors. *Oncogene*;18:6910–24.
- Braganhol E, Tamajusuku AS, Bernardi A, Wink MR, Battastini AM. (2007) Ecto-5'-nucleotidase/CD73 inhibition by quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Biochim Biophys Acta. Sep*;1770(9):1352-9. Epub 2007 Jun 16.

- Braganhol E, Zamin LL, Cañedo AD, Horn F, Tamajusuku AS, Wink MR, Salbego C and Battastini AM (2006). Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anticancer Drugs*; 17(6): 663-71.
- Brennan C, Momota H, Hambardzumyan D, Ozawa T, Tandon A, Pedraza A and Holland E (2009). Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS One*; 4(11): e7752.
- Brodbeck, D., Cron, P., & Hemmings, B. A. (1999). A human protein kinase B γ with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. *J Biol Chem* 274, 9133– 9136.
- Brown RE, Law A. (2006) Morphoproteomic demonstration of constitutive nuclear factor-kappaB activation in glioblastoma multiforme with genomic correlates and therapeutic implications. *Ann Clin Lab Sci*;36(4):421–6.
- Cheng, J. Q., Godwin, A. K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T. F., Hamilton, T. C., Tsihchlis, P. N., & Testa, J. R. (1992). AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 9267– 9271.
- Dhandapani KM, Mahesh VB and Brann DWJ(2007) Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkappaB transcription factors. *J. Neurochem.*102 (2): 522-38.
- Engelman JA: (2009) Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*, 9:550-562.
- Gerstner ER, Sorensen AG, Jain RK and Batchelor TT (2009). Anti-vascular endothelial growth factor therapy for malignant glioma. *Curr Neurol Neurosci*

Rep; 9(3): 254-62.

Han L, Yang Y, Yue X, Huang K, Liu X, Pu P, Jiang H, Yan W, Jiang T, Kang C.

(2010) Inactivation of PI3K/AKT signaling inhibits glioma cell growth through modulation of β -catenin-mediated transcription. *Brain Res.* Oct 1

Hehner SP, Hofmann TG, Droge W, Schmitz ML. The anti inflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF- κ B by targeting the I κ B kinase complex. *J Immunol* 1999;163:5617–23.

Hill MM, Hemmings BA (2002). Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy. *Pharmacology e Therapeutics* 93(2-3):243-51.

Jones, P. F., Jakubowicz, T., & Hemmings, B. A. (1991). Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. *Cell Regul* 2, 1001– 1009.

Kapoor GS, Zhan Y, Johnson GR, O'Rourke DM. (2004) Distinct domains in the SHP-2 phosphatase differentially regulate epidermal growth factor receptor/NF- κ B activation through Gab1 in glioblastoma cells. *Mol Cell Biol*; 24(2):823–36.

Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW: (2002) NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*, 2:301-310.

Kasinski AL, Du Y, Thomas SL, Zhao J, Sun SY, Khuri FR, et al. (2008) Inhibition of I κ B kinase–nuclear factor- κ B signaling pathway by 3,5-bis(2-flur-obenzylidene)piperidin-4-one (EF24), a novel monoketone analog of curcumin. *Mol Pharmacol*;74:654–61.

Koul N, Sharma V, Dixit D, Ghosh S, Sen E (2010). Bicyclic triterpenoid Iripallidal induces apoptosis and inhibits Akt/mTOR pathway in glioma cells. *BMC Cancer* 24;10:328.

- Krakstad C, Chekenya M (2010). Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Molecular Cancer* 1;9:135.
- Kwok BH, Koh B, Ndubuisi MI, Elofsson M, Crews CM. (2001) The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Fever few directly binds to and inhibits I κ B kinase. *ChemBiol*; 8:759–66.
- Louis DO H, Wiestler OD, Cavenee WK: (2007) WHO classification of tumours of the central nervous system. Lyon: IARC.
- Luangdilok S, Box C, Harrington K, Rhys-Evans P, Eccles S. (2010) MAPK and PI3K signalling differentially regulate angiogenic and lymphangiogenic cytokine secretion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer*. Nov 10.
- Mercer RW, Tyler MA, Ulasov IV and Lesniak MS. Targeted therapies for malignant glioma: progress and potential. *BioDrugs* 2009; 23(1): 25-35.
- M.L. da Frota Jr, E. Braganhol, A.D. Canedo, F. Klamt, M.A. Apel and B. Mothes (2009). Brazilian marine sponge *Polymastia janeirensis* induces apoptotic cell death in human U138MG glioma cell line, but not in a normal cell culture, *Invest New Drugs* **27** (1), pp. 13–20.
- Nicholson KM, Anderson NG (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling* 14(5):381-95.
- Ohgaki H, Kleihues P (2005) Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 64(6):479–489.
- Park S, Hatanpaa KJ, Xie Y, Mickey BE, Madden CJ, Raisanen JM, et al. (2009) The receptor interacting protein 1 inhibits p53 induction through NF-

- kappaB activation and confers a worse prognosis in glioblastoma. *Cancer Res*; 69(7):2809–16.
- Park S, Zhao D, Hatanpaa KJ, Mickey BE, Saha D, Boothman DA, et al. (2009) RIP1 activates PI3K–Akt via a dual mechanism involving NF-kappaB-mediated inhibition of the mTOR–S6K–IRS1 negative feedback loop and down-regulation of PTEN. *Cancer Res*;69(10):4107–11
- Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Collins T, et al. (1997) Novel inhibitors of cytokine-induced IκBα phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem*, 272:21096–103.
- Raychaudhuri B, Han Y, Lu T, Vogelbaum MA. (2007) Aberrant constitutive activation of nuclear factor kappaB in glioblastoma multiforme drives invasive phenotype. *J Neurooncol*;85(1):39–47.
- Rayet B., Gelinas C. (1999) Aberrant rel/NFkappaB genes and activity in human cancer. *Oncogene*, 18(49):6938–47.
- Robe PA, Bentires-Alj M, Bonif M, Rogister B, Deprez M, Haddada H, et al. (2004) In vitro and in vivo activity of the nuclear factor-kappaB inhibitor sulfasalazine in human glioblastomas. *Clin Cancer Res*, 10(16):5595–603.
- Santel T, Pflug G, Hemdan NY, Schäfer A, Hollenbach M, Buchold M, et al. (2008) Curcumin inhibits glyoxalase 1: a possible link to its anti-inflammatory and anti-tumor activity. *PLoS ONE*;3(10):e3508.
- Sethi G, Ahn KS, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. (2007) Epidermal growth factor (EGF) activates nuclear factor-kappaB through IκBα kinase-independent but EGF receptor-kinase dependent tyrosine 42 phosphorylation of IκBα. *Oncogene*;26(52):7324–32.

- Soni D, King JA, Kaye AH and Hovens CM (2005). Genetics of glioblastoma multiforme: mitogenic signaling and cell cycle pathways converge. *J Clin Neuroscience*; 12: 1-5.
- Stewart LA (2002). Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet*; 359: 1011-18.
- Wang H, Wang H, Zhang W, Huang HJ, Liao WS, Fuller GN. (2004) Analysis of the activation status of Akt, NFkappaB, and Stat3 in human diffuse gliomas. *Lab Invest*;84(8):941–51.
- Wu H, Cao Y, Weng D, Xing H, Song X, Zhou J, Xu G, Lu Y, Wang S, Ma D (2008). Effect of tumor suppressor gene PTEN on the resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines and related mechanisms. *Cancer Letters* 28;271(2):260-71.
- Xie TX, Xia Z, Zhang N, Gong W, Huang S. (2010) Constitutive NF-kappaB activity regulates the expression of VEGF and IL-8 and tumor angiogenesis of human glioblastoma. *Oncol Rep*;23(3):725–32.
- Xu CX, Jin H, Shin JY, Kim JE, Cho MH (2010). Roles of protein kinase B/Akt in lung cancer. *Frontiers in bioscience* 1;2:1472-84.
- Yu C, Friday BB, Yang L, Atadja P, Wigle D, Sarkaria J and Adjei AA (2008). Mitochondrial Bax translocation partially mediates synergistic cytotoxicity between histone deacetylase inhibitors and proteasome inhibitors in glioma cells. *Neuro Oncology*; 10(3): 309-19.
- Zanotto-Filho A, Schröder R, Moreira JC (2008). Xanthine oxidase-dependent ROS production mediates vitamin A pro-oxidant effects in cultured Sertoli cells. *Free Radical Research* 42; 593-601.

Zanotto-Filho A, Delgado-Cañedo A, Schröder R, Becker M, Klamt F, Moreira JC (2009). The pharmacological NFkappaB inhibitors BAY117082 and MG132 induce cell arrest and apoptosis in leukemia cells through ROS-mitochondria pathway activation. *Cancer Letters* 28;288(2):192-203.

Zanotto-Filho A, Gelain DP, Schröder R, Souza LF, Pasquali MA, Klamt F, Moreira JC (2009). The NF kappa B-mediated control of RS and JNK signaling in vitamin A-treated cells: duration of JNK-AP-1 pathway activation may determine cell death or proliferation. *Biochemical Pharmacology* 1;77(7):1291-301.

Zanotto-Filho A, Braganhol E, Schröder R, de Souza LH, Dalmolin RJ, Pasquali MA, Gelain DP, Battastini AM, Moreira JC. (2010) NFkB inhibitors induce cell death in glioblastomas. *Biochem Pharmacol.* Oct 30.

Zhang J, Han L, Zhang A, Wang Y, Yue X, You Y, Pu P, Kang C (2010). AKT2 expression is associated with glioma malignant progression and required for cell survival and invasion. *Oncology Reports* 24(1):65-72.

Legendas das Figuras:

Fig. 1: Os inibidores de NFkappaB e PI3K/Akt induziram diminuição da viabilidade e alterações morfológicas em linhagens de glioblastoma multiforme. **(A)** MTT realizado nas células C6, U87MG e U373MG. As células foram tratadas por 48 horas com os inibidores em diferentes concentrações (gráficos expressos em média \pm D.P. $p < 0,05$). **(B)** Microfotografias representativas (aumento de 20x) mostrando a morfologia das células U87MG após 48 horas de tratamento com os IC_{50} dos inibidores. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3). * Diferente do controle.

Fig. 2: Os inibidores de NFkappaB, mas não os de PI3K/Akt, induziram perda de integridade da membrana plasmática após 48 horas de tratamento. **(A)** Microfotografias representativas (aumento de 40x) do ensaio com Iodeto de Propídeo (IP) e contraste de fase, mostrando a perda de integridade da membrana plasmática nas células tratadas com os inibidores de NFkappaB. **(B)** Ensaio de LDH em que os inibidores de NFkappaB apresentaram extravasamento de LDH. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e n=3 (gráficos expressos em média \pm D.P. $p < 0,05$). * Diferente do controle.

Fig. 3: Experimento controle para a avaliação do efeito dos inibidores farmacológicos sobre seus alvos celulares. **(A)** Células foram tratadas por 12 horas com Quercetina e LY294002, e os extratos celulares foram processados por Western blotting para avaliação dos níveis de p-Akt. **(B)** Células foram tratadas por 6 horas com os inibidores de PI3K/Akt e NFkappaB, e os extratos nucleares foram analisados por Elisa para avaliação da atividade do NFkappaB. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e n=3 (gráficos expressos em média \pm D.P. $p < 0,05$). * Diferente do controle.

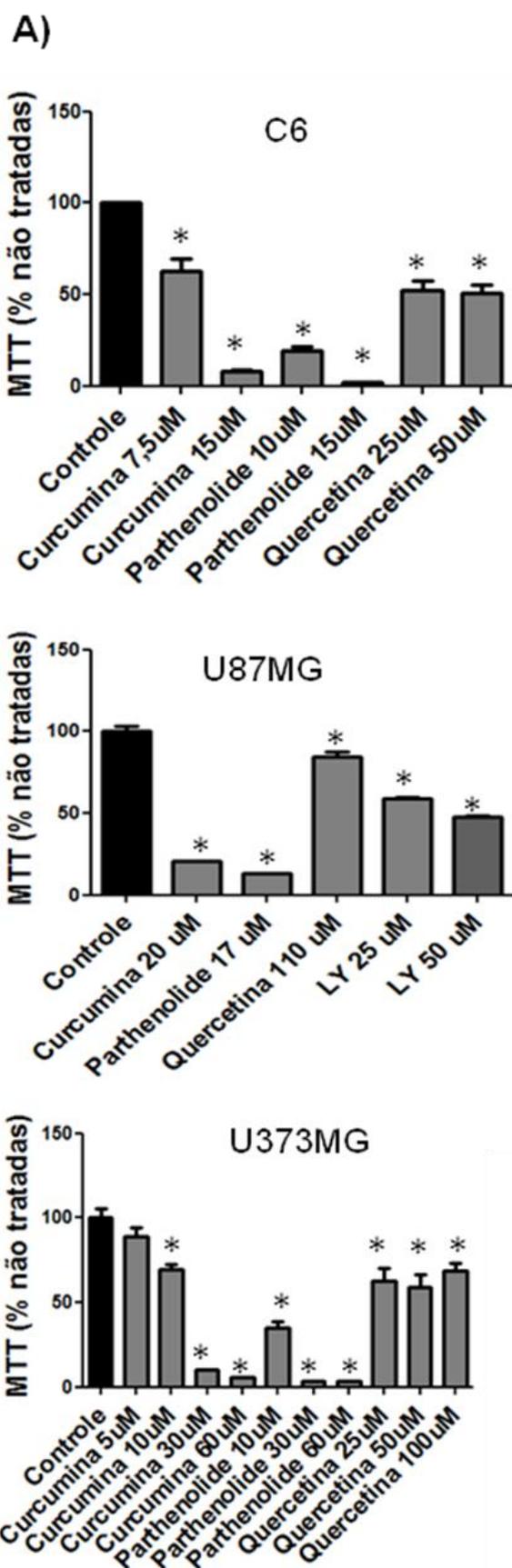
Tabela:

Tabela 1: Efeito de inibidores de vias de sinalização celular na viabilidade de Glioblastomas

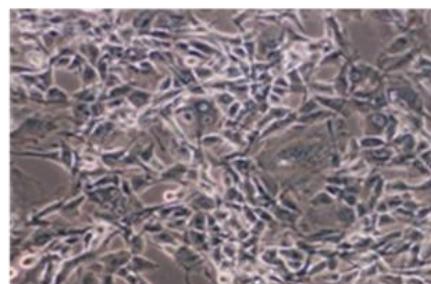
| Tratamentos | Viabilidade (MTT) | Morfologia qualitativa |
|----------------------|-------------------|------------------------|
| | C6 | C6 |
| Não tratadas | 100 ± 4 | Normal |
| UO126 (30 µM) | 93 ± 15 | Normal |
| SP600129 (30 µM) | 103 ± 11 | Normal |
| SB203580 (30 µM) | 98 ± 10 | Normal |
| PD158780 (50 µM) | 99 ± 4 | Normal |
| LY294002 (50 µM) | 64 ± 17* | Baixa densidade |
| BAY117082 (30 µM) | 15 ± 6* | Células mortas |
| Parthenolide (25 µM) | 54 ± 5* | Células mortas |

Legenda: Efeito dos inibidores de vias de sinalização celular na viabilidade dos GBMs. As células C6 foram tratadas por 36h com os inibidores das vias e foi realizado o ensaio de MTT e a microscopia qualitativa. Os experimentos foram repetidos por 3 vezes (n=3) em triplicata, e os resultados expressos como média ± DP.

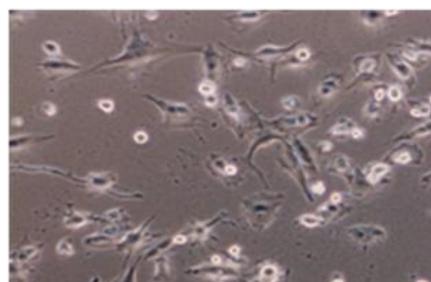
Fig. 1: MTT e morfologia celular



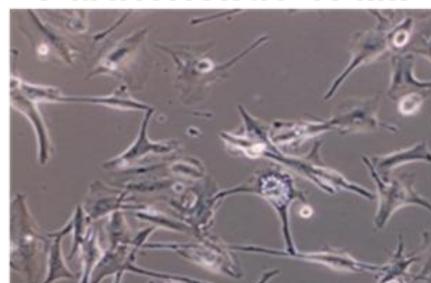
B) Controle



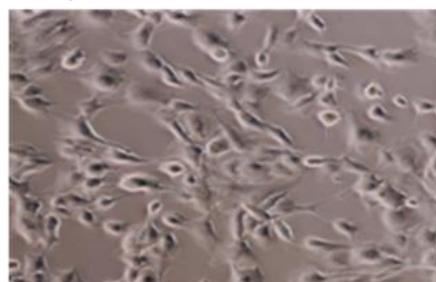
Curcumina 20uM



Parthenolide 17uM



Quercetina 110uM



LY 25uM

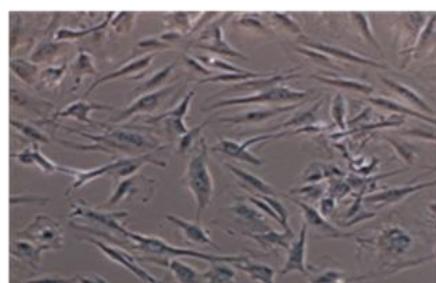
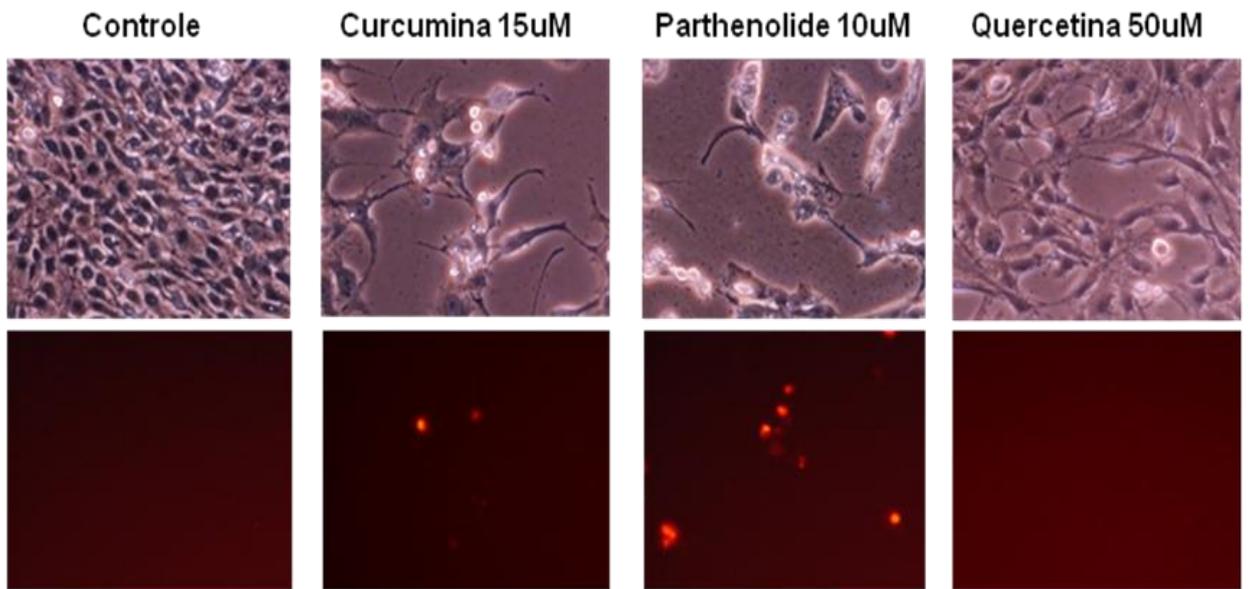


Fig. 2: Coloração com Iodeto de Propídeo e LDH da linhagem de glioma C6

A)



B)

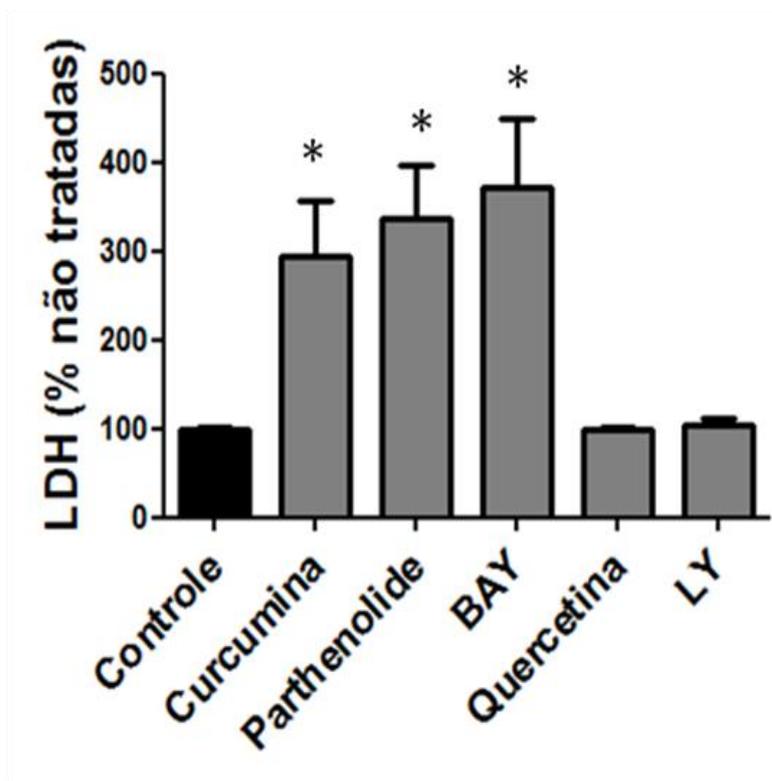


Fig. 3: Western Blotting U87MG e atividade do NFkB C6

