

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DO BUTIRATO DE SÓDIO E  
TYRPHOSTIN AG1478 NA PROLIFERAÇÃO DE GLIOBLASTOMA  
MULTIFORME**

MARIENELA BUENDIA DUQUE

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DO BUTIRATO DE SÓDIO E  
TYRPHOSTIN AG1478 NA PROLIFERAÇÃO DE GLIOBLASTOMA  
MULTIFORME**

MARIENELA BUENDIA DUQUE

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2016

#### CIP - Catalogação na Publicação

Buendia Duque, Marienela  
AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DO BUTIRATO DE SÓDIO  
E TYRPHOSTIN AG1478 NA PROLIFERAÇÃO DE GLIOBLASTOMA  
MULTIFORME / Marienela Buendia Duque. -- 2016.  
57 f.

Orientador: Rafael Roesler.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2016.

1. Glioblastoma Multiforme. 2. EGFR. 3. Histone  
Deacetylase. 4. Brain Tumor. I. Roesler, Rafael,  
orient. II. Título.

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

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Dr. Lauro Gregianin

Prof. Dr. Gustavo Isolán

Prof. Dr. Fábio Klamt

Prof. Dra. Ana Battastini

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Rafael por me aceitar e receber, mesmo sem me conhecer, tendo aberto para mim uma oportunidade única que mudou a minha vida. Obrigada também pelos conhecimentos e as palavras de apoio.

A Carol pelas muitas ajudas para a realização deste trabalho, e pelo apoio no dia a dia no laboratório.

Aos meus colegas de laboratório, em particular a Amanda, Kelly e Camila, que participaram diretamente com a realização dos experimentos e com a discussão dos resultados.

Aos meus amigos em Porto Alegre e os que já não estão aqui, obrigada pela força, pelos abraços e pelas incontáveis ajudas nos momentos mais difíceis.

A mi familia en el cielo y en la tierra, muchas gracias porque sin ustedes no sería ni la muestra de la mujer guerrera que soy hoy en día, los amo y los extraño.

Aos membros da Banca pela disponibilidade e as contribuições.

## RESUMO

**Introdução:** Gliomas são os tumores cerebrais mais frequentes em pacientes com neoplasias de Sistema Nervoso Central (SNC), sendo o Glioblastoma Multiforme (GBM) o mais agressivo e letal deles. Apesar dos esforços na melhoria dos tratamentos atuais, o prognóstico para os pacientes com GBM continua sendo incerto. Sendo necessário o uso de novas estratégias terapêuticas que visem melhorar o manejo dos gliomas malignos. A combinação de terapias que agem nas principais vias de sinalização celular envolvidas na progressão do câncer poderia potencializar o efeito antitumoral das monoterapias.

**Métodos:** As linhagens celulares U-87 e A-172 foram tratadas com o anti-EGFR tyrphostin AG1478, o inibidor de histonas deacetilases butirato de sódio (NaB) ou a combinação de ambos, por 72 horas. Tanto a viabilidade avaliada em 72 horas quanto a proliferação celular a longo prazo foram medidas através do ensaio de exclusão com azul de tripan em câmara de Neubauer. A influência do tratamento no ciclo celular e a capacidade de formar colônias foram avaliadas através da marcação com iodeto de propídeo e ensaio clonogênico, respectivamente.

**Resultados:** Foi possível observar que o tratamento combinado com AG1478 e NaB foi capaz de reduzir a viabilidade e a proliferação celular na linhagem U-87 de GBM.

**Conclusão:** Nosso trabalho mostrou que a inibição da via do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) combinada com a inibição das histonas deacetilases foi mais efetiva que as monoterapias na inibição da viabilidade e a proliferação celular. Esta redução foi significativa na linhagem U-87. Futuros estudos devem ser feitos para descobrir as possíveis interações entre as duas vias de sinalização em GBM.

**Palavras chave:** GBM, EGFR, butirato de sódio, Tyrphostin, Tumores do SNC.

## **ABSTRACT:**

**Introduction:** Gliomas are the most frequent brain tumors, in patients with Central Nervous system (NCS) malignancies, being the Glioblastoma Multiforme the most aggressive and lethal of all. Despite current multimodality treatment efforts, the prognosis for GBM patients remains poor. New therapeutic strategies that target these pathways to improve the treatment of malignant gliomas are needed. Combination of therapies with synergistic effects in the cellular signaling pathways of cancer could potentiate the anti-tumor effect of monotherapy alone.

**Methods:** U87 and A172 cell lines were treated with the anti-EGFR Tyrophostin AG1478, the Histone Deacetylase inhibitor (HDACi) Sodium Butyrate (NaB), or combination of both, for 72 hours. The cellular proliferation in short and in a long time was measured through the trypan-blue assay on Neubauer chamber, the influence on the cell cycle and the capability of form colonies was evaluated by nuclear staining with propidium iodide and clonogenic assay respectively.

**Results:** We found that combined treatment with AG1478 and NaB, are able to reduce the viability and proliferation in U-87.

**Conclusion:** Our work show that combined inhibition of both epidermal growth factor receptor and histone deacetylases was able to reduce cell proliferation in GBM cell lines. This reduction was considerably significant in U-87 cell lines when compared with individual treatments. Further studies should be performed to discover the possible crosstalk between the signaling pathways of both targets in GBM.

**Keywords:** GBM, EGFR, Sodium Butyrate, Tyrophostin, Brain tumors.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de variância (Analysis of variance)

AG1478: Tyrphostin 4-(3-chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (AG1478)

bp: Pares de base (base pair)

cDNA Ácido desoxirribonucléico complementar

DNA: Ácido desoxirribonucléico (Desoxirribonucleic acid)

DNase: Desoxirribonuclease

dNTP Deoxinucleotídeos

EGFR: Epidermal Grow Factor (Fator de Crescimento Epidérmico)

GBM: Glioblastoma Multiforme

GFAP: Glial fibrillary acidic protein

HATs: Histona acetil transferases

HDAC Histonas Deacetilases

HDACi Inibidor de Histonas Deacetilases

INCA: Instituto Nacional do Câncer.

mg: Miligrama

$\mu$ M: Micromolar

$\mu$ g: Micrograma

$\mu$ L: Microlitro

mM: Milimolar

mL: Mililitro

NaB: Butirato de Sódio (Sodium Butyrate)

OMS: Organização Mundial da Saúde

RNA: Ácido ribonucléico (Ribonucleic acid)

SNC: Sistema Nervoso Central

STAT3: Signal Transducers and Activators of Transcription

TRK: Receptor Tyrosine-kinase (Receptor tirosina cinase)



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Sinalização por EGFR.

**Figura 2:** Estrutura química do Butirato de Sódio (NaB).

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Estratégia de busca de referencias bibliográficas baseada nas áreas de interesse que envolve o objetivo do estudo.

**Tabela 2:** Classificação dos Glioblastomas baseado nas novas modificações moleculares da WHO.

**Tabela 3:** Classificação dos inibidores de histonas.

## **INDICE:**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	11
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES .....	14
2.2 MARCO TEÓRICO .....	15
2.2.1 Aspectos gerais do câncer e epidemiologia dos tumores de Sistema Nervoso Central .....	15
2.2.2 Gliomas .....	16
2.2.3 Classificação dos glioblastomas.....	17
2.2.4 Manejo no tratamento dos glioblastomas.....	19
2.2.5 Alvos terapêuticos: sinalização por EGFR .....	19
2.2.6 Alvos terapêuticos: Histona deacetilases (HDAC) .....	21
2.2.7 Butirato de sódio .....	23
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	25
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	26
4.1 OBJETIVO PRIMÁRIO .....	26
4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS .....	26
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	27
<b>6. ARTIGO</b> .....	33
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	58

## 1. INTRODUÇÃO

Glioblastoma multiforme (GBM) é o mais maligno e comum dos gliomas, sendo os membros do grupo um conjunto de tumores que se originam da glia e acometem o Sistema Nervoso Central (SNC) (CARLSSON; BROTHERS; WAHLESTEDT, 2014). Os gliomas são caracterizados por ser amplamente heterogêneos e complexos, representando um desafio para os médicos e pesquisadores da área (BANSAL; LIANG; RUTKA, 2006). Para os pacientes com GBM, a mediana da sobrevida oscila em torno dos 15 meses, o que tem inspirado inúmeras pesquisas que ampliaram enormemente o conhecimento relacionado à biologia desse tumor.

O tratamento da doença, que consiste em possível ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia com temozolamida, não tem variado muito pese aos avanços realizados (OMURO, 2013). Devido a que o câncer, particularmente o GBM, possui mutações específicas que estão diretamente envolvidas no aumento da proliferação e resistência ao tratamento das células cancerígenas, as terapias alvo-específicas aparentam ser um bom caminho a seguir para melhorar o tratamento atual e aumentar a sobrevida dos pacientes (MAO *et al.*, 2012).

Um dos receptores de maior enfoque na busca de novas terapias contra tumores malignos é o receptor EGFR, pois pode ser encontrado mutado ou superexpresso, sugerindo o papel dele no desenvolvimento e na progressão do câncer (BEREZOWSKA; SCHLEGEL, 2011). Diversos fármacos têm sido sintetizados para inibir a fosforilação do EGFR, dentre eles o Tyrophostin AG1478, uma pequena molécula quinoxilona com uma estrutura e atividade semelhante a outras pequenas moléculas tais como o erlotinib e lapatinib, sendo este capaz de inibir especificamente o EGFR. O AG1478 atua bloqueando a migração e invasão celular (BOJKO *et al.*, 2015; ELLIS *et al.*, 2001).

Além disso, inibidores de histonas deacetilases (HDACi) têm sido consideradas promissórias terapias anti-câncer, tendo em vista que a desregulação do processo de acetilação/desacetilação, na qual eles agem, está envolvida no processo carcinogênico. Entre os principais HDACi descritos está o butirato de sódio (NaB), um ácido graxo de 4 carbonos, encontrado naturalmente nos lipídeos com a capacidade de inibir as deacetilases de histonas, causando a hiperacetilação (SEALY; CHALKLEY, 1978). A

regulação dos processos epigenéticos são descritas como fatores importantes para a diferenciação, apoptose e parada no ciclo celular, sendo o NaB um agente modulatório capaz de induzir uma parada do ciclo celular na fase G1/S, interferindo diretamente na capacidade de proliferação das células tumorais (KRUH, 1982).

Desta forma, a combinação de terapias em duas das principais vias de sinalização do processo carcinogênico poderia significar uma importante estratégia terapêutica de combate ao câncer.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Esta revisão da literatura está focada nos aspectos relacionados à biologia do glioblastoma multiforme, incluindo pesquisas farmacológicas básicas e clínicas que visam à melhoria dos tratamentos atuais da doença. Pesquisas existentes que combinaram as vias dos receptores tirosina cinase com as vias epigenéticas das histonas deacetilases, dois importantes alvos das terapias de combate ao câncer também são usadas para o envasamento teórico. A estratégia de busca envolveu a base de dados PubMed, onde foram realizadas buscas conforme os termos apresentados na tabela 1.

	Pubmed	Uso
“Brain Cancer” AND “review”	492	5
“Glioma epidemiology”	1108	7
“Glioblastoma AND EGFR”	1436	11
“Glioblastoma AND Sodium Butyrate”	25	3
“HDAC AND Epigenetics”	426	6
“EGFR AND Butyrate”	39	6

**Tabela 1:** Estratégia de busca de referencias bibliográficas baseada nas áreas de interesse que envolve o objetivo do estudo.

## **2.2 MARCO TEÓRICO**

### **2.2.1 Aspectos gerais do câncer e epidemiologia dos tumores de Sistema Nervoso Central**

O câncer é definido pela Organização Mundial da Saúde como uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado e disseminado das células, podendo afetar qualquer parte do corpo (“WHO | Cancer”, 2015). Diversas mutações gênicas devem acontecer para que uma célula desenvolva um fenótipo neoplásico. Essas mutações se acumulam ao longo das diferentes divisões, gerando um desequilíbrio entre os fatores que facilitam a angiogênese e favorecem a divisão celular, assim como os fatores capazes de inibir a proliferação celular, favorecendo a apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Com o avanço dos estudos, foi possível compreender que a doença neoplásica não corresponde somente às células proliferativas cancerígenas, mas também é composta por uma massa celular heterogênea onde também participam células normais, como as células endoteliais e as do sistema imune, as quais, em conjunto, formam o microambiente tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Os fatores sistêmicos, que ao mesmo tempo são influenciados pelo ambiente externo do indivíduo (macroambiente), tem uma importante participação no funcionamento do sistema, o que faz desta uma doença multifatorial e complexa (CAO; DURING, 2012).

Teoricamente, o câncer pode ser desenvolvido em qualquer tecido, mas quando acomete o sistema Nervoso Central (SNC), o dano pode ser mais severo devido ao papel central do cérebro no funcionamento do corpo (BEHIN *et al.*, 2003). Nos Estados Unidos, a incidência anual de tumores malignos de SNC no período entre 2008 e 2011 foi de 239,835 novos casos, sendo que 55.0% homens e 45% mulheres. A idade também é um fator importante na estatística, por exemplo, em indivíduos entre 0 a 19 anos, a taxa de incidência média foi de 5,37 por 100 mil habitantes, enquanto para a população de adultos maiores de 20 anos, a incidência aumentou para 28.57 por cada 100 mil (OSTROM *et al.*, 2015). No Brasil, de acordo com a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2016), no presente ano de 2016, estimam-se 5.440 casos novos de câncer que acometem o Sistema Nervoso Central (SNC) em homens e 4.830 em

mulheres, correspondendo a um risco de 5,50 casos novos a cada 100 mil homens e 4,68 para cada 100 mil mulheres.

Os tumores de SNC foram classificados durante muitos anos de acordo com as suas características morfológicas visualizadas na histopatologia (BEHIN *et al.*, 2003). Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reportou uma nova reestruturação na classificação deste tipo de tumores, enfatizando a genética de cada um. Entre os destacados pela frequência de aparição estão os linfomas de SNC e os gliomas (LOUIS *et al.*, 2016).

### **2.2.2 Gliomas**

Os gliomas são um grupo heterogêneo de neoplasias que surgem das células gliais ou dos seus precursores. A origem da célula tronco iniciante dos gliomas ainda permanece controversa, porém algumas hipóteses são relatadas a partir da transformação de uma célula tronco neural, desde precursores oligodendrogliais ou a partir da desdiferenciação de uma das células da glia, que são encarregadas de dar suporte funcional aos neurônios (SCHIFFER *et al.*, 2015).

Os neuropatologistas têm classificado os gliomas baseados nos graus de malignidade, em ependimomas, astrocitomas, oligodendrogliomas e oligoastrocitomas, os quais apresentam baixa taxa mitótica, necrose, proliferação vascular e menores núcleos atípicos quando comparados com os GBM (OMS-grau IV) (ILKANIZADEH *et al.*, 2014). O diagnóstico dos gliomas é então definido pelas características celulares do tumor, assim como pelas características malignas dessas células. Esta classificação subjetiva leva à possibilidade de um diagnóstico errado e a demora na escolha do tratamento adequado para o paciente (HATTORI *et al.*, 2016).

De acordo com o reporte estatístico da organização CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United States), perto de 27% dos tumores do cérebro diagnosticado são gliomas, sendo que 80% destes são malignos (OSTROM *et al.*, 2015). O mais comum dos gliomas é o Glioblastoma Multiforme (GBM), o mais agressivo e letal relatado em adultos (GURNEY; KADAN-LOTTICK, 2001). Nos



Estados Unidos, 45,6% dos tumores cerebrais malignos diagnosticados são GBM, com uma incidência de 3,19 novos casos por cada 100.000 pessoas, acometendo pacientes com idade superior a 30 anos (AHMED *et al.*, 2014; OSTROM *et al.*, 2012).

Apesar dos últimos progressos nos tratamentos cirúrgicos e médicos, o prognóstico para as pessoas diagnosticadas com GBM continua sendo incerto e a evolução clínica de gliomas de baixo grau para GBM tem sido frequentemente observada em adultos. Entre as principais características deste tipo de tumor encontram-se o alto índice mitótico, a proliferação vascular, a tendência à necrose, a resistência à apoptose e uma série de mutações genômicas (RAIZER, 2005; ZAHONERO; SÁNCHEZ-GÓMEZ, 2014). Outra característica é a grande heterogeneidade, tanto dentro quanto fora do tumor, podendo-se encontrar células em vários estágios de diferenciação e exibindo diferentes propriedades, sendo geneticamente heterogênea, embora seja considerada uma mesma doença. O termo “multiforme” faz referência à histopatologia extremamente variável do tumor (KONDO *et al.*, 2014).

### **2.2.3 Classificação dos glioblastomas**

Atualmente, existem diferentes classificações para os glioblastomas de acordo com as mutações que possuem. Em termos gerais, a ativação da tumorigenicidade está associada à superexpressão de genes pró-tumorais ou ao silenciamento de genes supressores tumorais (ZAHONERO; SÁNCHEZ-GÓMEZ, 2014). De acordo com a classificação clínica feita por (SCHERER, 1940), podem se encontrar dois subtipos de GBM: os primários e os secundários. Os GBM primários são tumores que surgem *de novo*, ou seja, sem evidência de uma lesão precursora de menor malignidade, porém, não sugere uma transformação de um passo só, já que resulta da aquisição de múltiplas alterações genéticas. Estes possuem frequência elevada e normalmente estão presentes em pessoas com idade mais avançada, representando mau prognóstico devido à agressividade do tumor. Ao contrário, os GBM secundários são mais raros (de 5 a 10% do total), se originam a partir do desenvolvimento dos gliomas de menor grau, através da progressão de astrocitoma de baixo grau difuso (OMS classe II) ou astrocitoma

anaplásico (OMS grau III). Os GBM do tipo secundário são geralmente encontrados em pacientes mais novos, com um melhor prognóstico de vida (JOY *et al.*, 2014).

	<b>Glioblastoma IDH-Wildtype</b>	<b>Glioblastoma IDH - Mutante</b>
Sinônimos	Glioblastoma Primário IDH - Wildtype	Glioblastoma Secundário IDH - Mutante
Lesão Precursora	Não identificável; desenvolve-se <i>de novo</i>	Astrocytoma difuso Astrocitoma Anaplásico
Proporção de glioblastomas	~ 90%	~ 10%
Mediana da idade ao diagnóstico	~ 62 anos	~ 44 anos
Relação de homem para mulher	1,42 : 1	1,05 : 1
Comprimento médio da história clínica	4 meses	15 meses
Mediana da sobrevida global:		
• Cirurgia + Radioterapia	9,9 meses	24 meses
• Cirurgia + Radioterapia + Quimioterapia	15 meses	31 meses
Localização	Supratentorial	Preferencialmente frontal
Necroses	Extensiva	Limitada
Mutações no promotor TERT	72%	26%
Mutações <i>TP53</i>	27%	81%
Mutações <i>ATRX</i>	Excepcionais	71%
Amplificação de <i>EGFR</i>	35%	Excepcional
Mutação <i>PTEN</i>	24%	Excepcional

**Tabela 2:** Classificação dos Glioblastomas baseado nas novas modificações moleculares da WHO (Adaptado de (LOUIS *et al.*, 2016).

Felizmente, a reestruturação na classificação dos gliomas incorporou entidades definidas geneticamente e separou os glioblastomas como aqueles que expressam ou não a mutação no gene que expressa a isocitrato desidrogenase (IDH), uma enzima do ciclo do ácido cítrico (Tabela 2), além da variante de glioblastoma epitelióide e do glioblastoma com componente neural primitivo (LOUIS *et al.*, 2016). Os pacientes que expressam a mutação no gene IDH possuem melhor prognóstico e o motivo ainda é desconhecido.

#### **2.2.4 Manejo no tratamento dos glioblastomas**

As opções do tratamento pra GBM continuam sendo limitadas. O tratamento padrão consiste da ressecção cirúrgica do tumor, seguida de radioterapia e quimioterapia, sendo que na maioria dos casos, devido à característica altamente infiltrativa do tumor, a cirurgia torna-se impossível. Na quimioterapia o fármaco temozolamida (TMZ), um agente alquilante de DNA, tem sido frequentemente utilizado, porém se caracteriza como um tratamento altamente invasivo e paliativo, sendo que a sobrevida dos pacientes após o rigoroso protocolo é de 12 a 15 meses, devido à resistência desenvolvida pelo tumor e à toxicidade do tratamento (STUPP *et al.*, 2001). Vários ensaios clínicos têm sido realizados usando TMZ em combinação com outros quimioterápicos e/ou seções de radioterapia, conseguindo aumentar a sobrevida em alguns pacientes, mas sem aumento considerável e com problemas de toxicidade (MINNITI *et al.*, 2008; PEEREBOOM *et al.*, 2010; STUPP *et al.*, 2001).

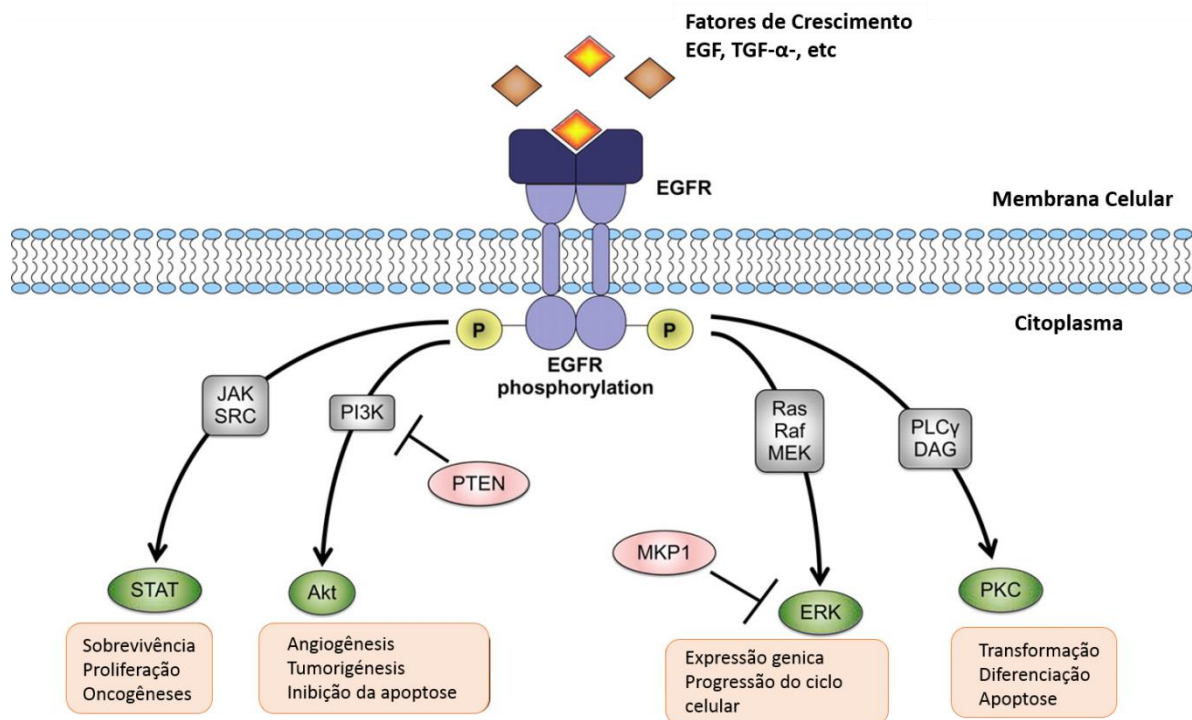
#### **2.2.5 Alvos terapêuticos: sinalização por EGFR**

Em humanos, a família dos receptores tirosina-cinase transmembranais (ErbB, /HER) inclui quatro membros que estão relacionados estruturalmente, HER1/EGFR (do inglês Epidermal Grow Factor EGFR), ErbB/HER2, ErbB/HER3 e ErbB/HER4. A ativação dos receptores é desencadeada, em quase todos os casos, pela união do ligante extracelular, junto com a homo e/ou heterodimerização dos receptores, o que dispara as vias de sinalização intracelular que conduzem ao aumento da proliferação, migração e sobrevivência celular (BEREZOWSKA; SCHLEGEL, 2011). Um dos receptores de maior enfoque na busca de novas terapias contra tumores malignos é o receptor EGFR, pois pode se encontrar mutado ou superexpresso, sugerindo o papel dele no desenvolvimento e na progressão tumoral (APPERT-COLLIN *et al.*, 2015).

EGFRwt (*wildtype*) é uma proteína de 170 kDa que compreende tres domínios funcionais: um domínio extracelular de união ao ligante, um domínio hidrofóbico transmembrana e o domínio citoplásmico com atividade tirosina cinase (HARARI, 2004; RAIZER, 2005). A ativação do receptor é desencadeada pela união do ligante

extracelular, que são o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), neuregulinas, anfirregulinas (AS), betacelulinas (BTC), epiregulinas e o fator de crescimento ligante de heparina (HB-EGF) (YARDEN, 2001). A união do ligante induz então a dimerização e a consequente auto fosforilação do receptor. O recrutamento de diferentes moléculas sinalizadoras conduzirá à ativação de uma série de cascatas de sinalização como a MAPK/ERK, associada com a proliferação, a sinalização PI3K/Akt, que junto à perda da função PTEN inibe a apoptose e a transcrição de fatores como Src cinase e STAT3 que são transportados ao núcleo e ativam a transcrição de genes pro-tumorais (Figura 1) (HYNES; MACDONALD, 2009).

Em gliomas, EGFR encontra-se amplificado em 30-40% dos pacientes, onde a variante mutada mais comum, a EGFRvIII, também é encontrada. EGFRvIII é produto de uma mutação *missense* que deleta os éxons 2-7 do ectodomínio, condição que está relacionada com um pior prognóstico (ZAHONERO; SÁNCHEZ-GÓMEZ, 2014). Tal expressão aberrante do EGFR correlaciona-se positivamente com um fenótipo mais maligno e com a sua capacidade altamente invasiva dentro do parênquima cerebral (KATAKOWSKI *et al.*, 2010). Portanto, o papel de EGF e seu receptor na proliferação, migração e sobrevivência celular converteu-lhe num importante alvo para as terapias anticâncer (TARUN; PAUL, 2005).



**Figura 1:** Sinalização por EGFR. (Adaptado de (VELIZ *et al.*, 2015).

Muitos fármacos têm sido sintetizados para inibir a fosforilação do EGFR e/ou inativar as cascatas de sinalização que são consequentemente ativadas. Um destes fármacos é o Tyrphostin AG1478, uma pequena molécula quinazolinamina com uma estrutura e atividade semelhante às outras pequenas moléculas tais como o erlotinib e lapatinib, sendo que é capaz de inibir especificamente o EGFR. Estudos recentes têm demonstrado que o AG1478 age bloqueando a migração e invasão de linhagens de adenocarcinoma de pulmão (MA; YAN; ZHOU, 2014), e regula o crescimento em linhagens de câncer cerebral (BOJKO *et al.*, 2015).

### 2.2.6 Alvos terapêuticos: Histona deacetilases (HDAC)

Os mecanismos epigenéticos são essenciais para a sobrevivência dos mamíferos. As modificações epigenéticas são definidas como modificações produzidas na expressão de genes sem que estes alterem ou modifiquem a sequência de DNA (FOUSE; COSTELLO, 2009). O câncer é a manifestação da instabilidade genômica causada pela alteração tanto genética quanto epigenética da célula, afetando a expressão de diversos tipos de genes, como os oncogenes, os genes supressores tumorais, os genes envolvidos no processo apoptótico e os genes de proteínas reparadoras de DNA. É

também conhecida a influência que os fatores herdáveis possuem, como as proteínas que participam no remodelamento da cromatina, cujas alterações estruturais afetam a sua função (MACK *et al.*, 2015).

Os cromossomos eucarióticos são compostos pela cromatina, que constitui um complexo formado pelo DNA e pelas proteínas tanto histônicas quanto não histônicas. As histonas acetil transferasas (HAT), que adicionam grupos acetil nas histonas estão associadas com a transcrição de genes, relaxando a cromatina. Por outro lado, as histonas deacetilases (HDACi) tem função contrária, diminuindo a expressão gênica, já que a compactação da cromatina impede a chegada da maquinaria de transcrição e, portanto, a ativação da região promotora (ROPERO; ESTELLER, 2007). A alteração do equilíbrio dinâmico entre a acetilação e a deacetilação das histonas está relacionada com o desenvolvimento de várias patologias incluindo o câncer (ADAMOPOULOU; NAUMANN, 2013). Os inibidores de histonas deacetilases (HDACi) têm sido considerados como terapias antitumorais promissórias. Vários modificadores epigenéticos já foram aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration), sendo relativamente bem tolerados pelos pacientes (KIM, H.-J.; BAE, 2011).

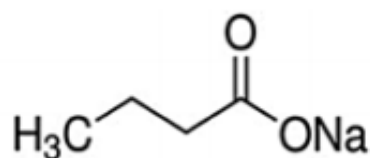
As histonas deacetilases são um grupo de enzimas que tem como função a remoção do grupo acetil encontrado no resíduo de lisina. Atualmente, têm sido caracterizadas 4 classes de HDACs: A classe I compreende as HDAC 1,2,3 e 8, a classe II encontra-se dividida nos subgrupos IIA (HDAC 4,5,6,7 e 9) e IIB (HDACs 6 and 10), a classe III corresponde à família sirtuina sirt1-7 e a classe IV integrada pela HDAC 11 (YOON; EOM, 2016).

Classificação	Exemplos	Especificidade a HDAC
1. Ácidos graxos alifáticos	Butirato Acido Valpróico	Clase 1 e IIA
2. Hidroxamato	SAHA (vorinostat) PXD101 (belinostat) LBH589 (panobinostat) ITF2357 (givinostat)	Pan-inibidor Pan-inibidor Clase I e IIA Pan-inibidor
3. Benzamidas	MS-275 (entinostat) MGCD0103 (mocetinostat) CI-994 (tacedinaline) MGCD-0103	Clase I Clase I Clase I Clase I e IV
4. Pépticos cíclicos	Depsipeptidos FK228 (romidepsin)	Clase I
5. Mercapto cetona	Apicidin KD5170	Clase I Clase I e II

**Tabela 3:** Classificação dos inibidores de histonas. Adaptado de (KUMAR; TANDON; RAMAKRISHNAN, 2016).

### 2.2.7 Butirato de Sódio

Entre os mais antigos HDACi conhecidos encontra-se o butirato de sódio (NaB), um ácido graxo de 4 carbonos, produzido pela fermentação anaeróbica bacteriana de fibras dietéticas no cólon, com a capacidade de inibir as deacetilases de histonas, o que pode restaurar o balance transcripcional das células neoplásicas (CUMMINGS, 1981). O alvo principal do butirato são as HDAC de classe I e IIA (Tabela 3).



**Figura 2:** Estrutura química do Butirato de Sódio (NaB) (WANG, H.-G. *et al.*, 2013).

A inibição da hiperacetilação se traduz numa série de efeitos antineoplásicos como diferenciação, apoptose e parada do ciclo celular (KRUH, 1982; SEALY; CHALKLEY,

1978), onde o NaB é capaz de realizar a parada na fase G1/S, o que interfere diretamente na capacidade de proliferação da célula tumoral (PRASAD, 1980).



### **3 JUSTIFICATIVA**

Mesmo que os esforços científicos têm se elevado consideravelmente nos últimos anos, o prognóstico dos pacientes com glioblastoma multiforme continua sendo devastador. A procura de novos alvos terapêuticos nas vias de sinalização relacionadas com a sobrevivência, proliferação e invasão das células tumorais, com o propósito de aumentar a sobrevida dos pacientes é fundamental (AHMED *et al.*, 2014).

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO PRIMARIO**

Avaliar o efeito sinérgico do NaB e tyrphostin AG1478, sobre a viabilidade, sobrevivência e a proliferação de linhagens de Glioblastoma Multiforme e as possíveis interações entre as vias de sinalização envolvidas.

### **4.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS**

- Avaliar o efeito de NaB, tyrphostin AG1478 e a combinação de ambos na viabilidade das linhagens A-172 e U87.
- Avaliar o efeito em longo prazo de NaB, tyrphostin AG1478 a combinação de ambos.
- Avaliar o efeito de NaB, tyrphostin AG1478 e a combinação de ambos no ciclo celular.
- Avaliar a expressão do mRNA de EGFR, STAT3 e TUBB3 e relacionar a variação na expressão dos genes com o efeito na sobrevivência das células.

## 5 REFERÊNCIAS

ADAMOPOULOU, E.; NAUMANN, U. Hdac inhibitors and their potential applications to glioblastoma therapy. **Oncoimmunology**, 1 ago. 2013. v. 2, n. 8, p. e25219. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24167760>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

AHMED, R. *et al.* Malignant gliomas: current perspectives in diagnosis, treatment, and early response assessment using advanced quantitative imaging methods. **Cancer management and research**, 2014. v. 6, n. 1, p. 149–170.

APPERT-COLLIN, A. *et al.* Role of erbb receptors in cancer cell migration and invasion. **Frontiers in pharmacology**, 2015. v. 6, p. 283. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26635612>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

BANSAL, K.; LIANG, M. L.; RUTKA, J. T. Molecular biology of human gliomas. **Technology in cancer research & treatment**, 1 jun. 2006. v. 5, n. 3, p. 185–194. Disponível em: <<http://tct.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/153303460600500302>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

BEHIN, A. *et al.* Primary brain tumours in adults. **The lancet**, 2003. v. 361, n. 9354, p. 323–331.

BEREZOWSKA, S.; SCHLEGEL, J. Targeting erbb receptors in high-grade glioma. **Current pharmaceutical design**, 2011. v. 17, n. 23, p. 2468–87. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21827413>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

BOJKO, A. *et al.* Modulatory effects of curcumin and tyrphostins (ag494 and ag1478) on growth regulation and viability of ln229 human brain cancer cells. **Nutrition and cancer**, 3 out. 2015. v. 67, n. 7, p. 1170–1182. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01635581.2015.1073764>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

CAO, L.; DURING, M. J. What is the brain-cancer connection? **Annual review of neuroscience**, 2012. v. 35, p. 331–45. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22462541>>. Acesso em: 25 out. 2016.

CARLSSON, S. K.; BROTHERS, S. P.; WAHLESTEDT, C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. **Embo molecular medicine**, 13 out. 2014. v. 6, n. 11, p. 1359–70. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25312641>>. Acesso em: 25 out. 2016.

CUMMINGS, J. H. Short chain fatty acids in the human colon. **Gut**, set. 1981. v. 22, n. 9, p. 763–79. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7028579>>. Acesso em: 21 nov. 2016.

ELLIS, A. G. *et al.* High-performance liquid chromatographic analysis of the tyrphostin ag1478, a specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in mouse plasma. **Journal of chromatography. b, biomedical sciences and applications**, 15 abr. 2001. v. 754, n. 1, p. 193–9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11318415>>. Acesso em: 5 nov. 2016.

FOUSE, S. D.; COSTELLO, J. F. Neurological cancers. 2009. p. 1615–1629.

GURNEY, J. G.; KADAN-LOTTICK, N. Brain and other central nervous system tumors: rates, trends, and epidemiology. **Current opinion in oncology**, maio. 2001. v. 13, n. 3, p. 160–6. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11307058>>. Acesso em: 15 out. 2016.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 2011. v. 144, n. 5, p. 646–674. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>>.

HARARI, P. M. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. **Endocrine related cancer**, 1 dez. 2004. v. 11, n. 4, p. 689–708. Disponível em: <<http://erc.endocrinology-journals.org/cgi/doi/10.1677/erc.1.00600>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

HATTORI, N. *et al.* World health organization grade ii-iii astrocytomas consist of genetically distinct tumor lineages. **Cancer science**, ago. 2016. v. 107, n. 8, p. 1159–64. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27196377>>. Acesso em: 8 nov. 2016.

HYNES, N. E.; MACDONALD, G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer.

**Current opinion in cell biology**, abr. 2009. v. 21, n. 2, p. 177–184. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067409000143>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

ILKANIZADEH, S. *et al.* Glial progenitors as targets for transformation in glioma. **Advances in cancer research**, 2014. v. 121, p. 1–65. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24889528>>. Acesso em: 8 nov. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Inca - instituto nacional de câncer - estimativa 2016**. [S.l.]: [s.n.], 2016.

JOY, A. *et al.* Akt pathway genes define 5 prognostic subgroups in glioblastoma. **Plos one**, 1 jul. 2014. v. 9, n. 7, p. e100827. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0100827>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

KATAKOWSKI, M. *et al.* Mir-146b-5p suppresses egfr expression and reduces *in vitro* migration and invasion of glioma. **Cancer investigation**, 27 nov. 2010. v. 28, n. 10, p. 1024–1030. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07357907.2010.512596>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

KIM, H.-J.; BAE, S.-C. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. **American journal of translational research**, fev. 2011. v. 3, n. 2, p. 166–79. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21416059>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

KONDO, Y. *et al.* Epigenetic dysregulation in glioma. **Cancer science**, abr. 2014. v. 105, n. 4, p. 363–9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24843883>>. Acesso em: 22 out. 2016.

KRUH, J. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. **Molecular and cellular biochemistry**, 5 fev. 1982. v. 42, n. 2, p. 65–82. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6174854>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

KUMAR, S.; TANDON, N.; RAMAKRISHNAN, V. Clinical use and applications of histone deacetylase inhibitors in multiple myeloma. **Clinical pharmacology: advances and applications**, maio. 2016. p. 35. Disponível em:

<<https://www.dovepress.com/clinical-use-and-applications-of-histone-deacetylase-inhibitors-in-mul-peer-reviewed-article-CPAA>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

LOUIS, D. N. *et al.* The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Acta neuropathologica**, 2016. v. 131, n. 6, p. 803–820. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>>.

MA, L.; YAN, H.; ZHOU, Q. Ag1478 inhibits the migration and invasion of cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma cells via the cell cycle regulation by matrix metalloproteinase-9. **Oncology letters**, 4 jun. 2014. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2014.2224>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

MACK, S. C. *et al.* An epigenetic gateway to brain tumor cell identity. **Nature neuroscience**, 29 dez. 2015. v. 19, n. 1, p. 10–19. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nn.4190>>. Acesso em: 21 nov. 2016.

MAO, H. *et al.* Deregulated signaling pathways in glioblastoma multiforme: molecular mechanisms and therapeutic targets. **Cancer investigation**, 31 jan. 2012. v. 30, n. 1, p. 48–56. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07357907.2011.630050>>. Acesso em: 28 nov. 2016.

MINNITI, G. *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma in elderly patients. **Journal of neuro-oncology**, 5 maio. 2008. v. 88, n. 1, p. 97–103. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11060-008-9538-0>>. Acesso em: 28 nov. 2016.

OMURO, A. Glioblastoma and other malignant gliomas. **Jama**, 6 nov. 2013. v. 310, n. 17, p. 1842. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2013.280319>>. Acesso em: 28 nov. 2016.

OSTROM, Q. T. *et al.* Cbtrus statistical report primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2008-2012. **Neuro oncol**, 2012. v. 14(suppl 5, n. February, p. 1–57. Disponível em: <[www.cbtrus.org](http://www.cbtrus.org)>.

OSTROM, Q. T. *et al.* Cbtrus statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2008-2012. **Neuro-oncology**, 2015. v. 17, n. Suppl 4, p. iv1–iv62. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4623240/>>. Acesso em: 24 out. 2016.

PEEREBOOM, D. M. *et al.* Phase ii trial of erlotinib with temozolomide and radiation in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. **Journal of neuro-oncology**, 4 maio. 2010. v. 98, n. 1, p. 93–99. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11060-009-0067-2>>. Acesso em: 28 nov. 2016.

PRASAD, K. N. Butyric acid: a small fatty acid with diverse biological functions. **Life sciences**, 13 out. 1980. v. 27, n. 15, p. 1351–8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7003281>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

RAIZER, J. J. Her1/egfr tyrosine kinase inhibitors for the treatment of glioblastoma multiforme. **Journal of neuro-oncology**, ago. 2005. v. 74, n. 1, p. 77–86. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16078112>>. Acesso em: 22 out. 2016.

ROPERO, S.; ESTELLER, M. The role of histone deacetylases (hdacs) in human cancer. **Molecular oncology**, jun. 2007. v. 1, n. 1, p. 19–25. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1574789107000026>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

SCHERER, H. J. The forms of growth in gliomas and their practical significance. **Brain**, 1940. v. 63, n. 1.

SCHIFFER, D. *et al.* The microenvironment in gliomas: phenotypic expressions. **Cancers**, 3 dez. 2015. v. 7, n. 4, p. 2352–9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26633514>>. Acesso em: 8 nov. 2016.

SEALY, L.; CHALKLEY, R. The effect of sodium butyrate on histone modification. **Cell**, maio. 1978. v. 14, n. 1, p. 115–21. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/667928>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

STUPP, R. *et al.* Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours. **The lancet. oncology**, set. 2001. v. 2, n. 9, p. 552–60. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11905710>>. Acesso em: 15 out.

2016.

TARUN, P. B.; PAUL, B. J. **Epidermal growth factor**. New Jersey: Humana Press, 2005. V. 327.

VELIZ, I. *et al.* Advances and challenges in the molecular biology and treatment of glioblastoma-is there any hope for the future? **Annals of translational medicine**, 2015. v. 3, n. 1, p. 7. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4293478&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

WANG, H.-G. *et al.* Anticancer effects of sodium butyrate on hepatocellular carcinoma cells in vitro. **International journal of molecular medicine**, 2013. v. 31, n. 4, p. 967–74. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23440283>>.

Who | cancer. **Who**, 2015.

YARDEN, Y. The egfr family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. **European journal of cancer (oxford, england : 1990)**, set. 2001. v. 37 Suppl 4, p. S3-8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11597398>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

YOON, S.; EOM, G. H. Hdac and hdac inhibitor: from cancer to cardiovascular diseases. **Chonnam medical journal**, 2016. v. 52, n. 1, p. 1. Disponível em: <<http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4068/cmj.2016.52.1.1>>. Acesso em: 8 nov. 2016.

ZAHONERO, C.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, P. Egfr-dependent mechanisms in glioblastoma: towards a better therapeutic strategy. **Cellular and molecular life sciences : cmls**, set. 2014. v. 71, n. 18, p. 3465–88. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24671641>>. Acesso em: 15 out. 2016.



**6 ARTIGO:**

**Título:**

**“Antiproliferative effects of combined treatment with histone deacetylase inhibitor  
and EGFR inhibitor on human glioblastoma cancer cells.”**

A ser submetido na revista: “Journal of Molecular Neuroscience”

**Antiproliferative effects of combined treatment with histone deacetylase inhibitor  
and EGFR inhibitor on human glioblastoma cancer cells.**

**Marienela Buendia Duque<sup>1</sup> • Kelly de Vargas Pinheiro<sup>1,2</sup> • Amanda Cristina  
Godot Thomaz<sup>1</sup> • Camila Alves da Silva<sup>1</sup> • Algemir Lunardi Brunetto<sup>3</sup> • Caroline  
Brunetto de Farias<sup>1,3</sup> • Rafael Roesler<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical  
Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003  
Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal  
University of Rio Grande do Sul, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup> Children's Cancer Institute, 90420-140 Porto Alegre, RS, Brazil

**Correspondence:** Rafael Roesler

Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of  
Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 (ICBS, Campus Centro/UFRGS), 90050-  
170 Porto Alegre, RS, Brazil.

Telephone: +5551 33083183; fax: +5551 33083121.

E-mail: [rafael.roesler@pq.cnpq.br](mailto:rafael.roesler@pq.cnpq.br).

**Abstract:**

Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most aggressive and lethal primary brain tumor and present some of the greatest challenges in the management of cancer. Despite current multimodality treatment efforts, the prognosis for GBM patients remains poor and the median survival after diagnosis is about 14 months. New therapeutic approaches are being tested in patients, such as histone deacetylase inhibitors (HDACi) either alone or in combination with other therapies. Here, we investigated the effect of a histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate (NaB), combined with EGFR inhibitor, tyrphostin (AG1478), in GBM cell lines. We found that both, AG1478 and NaB reduce GMB cell viability of A-172 and U-87 cells. The combined treatment with NaB plus AG1478 was more effective in reducing cell viability and proliferation in a short and long term compared to single treatment, but only in U-87 cells. This additive effect on cell growth was not explained by differences in cell cycle arrest, as NaB caused an arrest in G0/G1 phase and decreased S phase for both cell lines, AG1478 causes cell cycle arrest in G0/G1 phase and decreased S only in U-87 cells.

**Keywords:** • Glioblastoma multiforme • EGFR • Histone deacetylase • Brain tumor

## Introduction

Malignant gliomas are the most frequent brain tumors in adults, and Glioblastoma Multiforme (GBM-grade IV) is the most aggressive and lethal of all (Ostrom et al., 2015). Despite current multimodality treatment efforts, including a maximum reduction of the tumor mass with surgery, when possible, radiotherapy and chemotherapy with temozolamide, the prognosis for patients with GBM is often very poor and the median survival after diagnosis is about 14 months (Jovčevska, 2013; Sathornsumetee & Rich, 2006). In the course of the last few decades, the discovery of the molecular characteristics like genetic alterations and aberrant signaling pathways has made a substantial contribution to understanding the biology of gliomas (Masui, Cloughesy, & Mischel, 2012). Unfortunately, this was not translated into the improvement of therapeutic outcomes for GBM patients.

The epidermal growth factor receptor (EGFR) is a tyrosine kinase receptor that functions in development and it plays an important role in several types of cancer, such as lung cancer (Tanno, Ohsaki, Nakanishi, Toyoshima, & Kikuchi, 2004) head and neck cancer (Sok, 2006) colorectal cancer (Overman & Hoff, 2007) and gliomas (Smith et al., 2001) (Dong, Wodziak, & Lowe, 2015). In GBM, amplification or expression of a variant mutant EGFRVIII accounts for a more malignant phenotype, increasing the cell proliferation, migration and survival. In addition, around 50% of patients with primary GBMs have the EGFR amplification and/or mutation (Furnari, Cloughesy, Cavenee, & Mischel, 2015; Hayashi et al., 1997). Regardless the alterations in EGFR pathways were first described decades ago, targeted therapy using EGFR directed antibodies or tyrosine kinase inhibitors, such as cetuximab or erlotinib respectively, has not exceeded the benefits of standard treatment. The causes for this include failure of target inhibition, compensatory activation of EGFR independent pathways, or intratumoral heterogeneity of EGFR amplification and/or overexpression (Padfield, Ellis, & Kurian, 2015).

In addition to the different oncogenes mutations, epigenetic regulations also play an important role in Cancer. Changes as hypermethylation of gene promoters, expression of noncoding RNA and histone modification, promotes the development and progression of tumors (Stavrovskaya, Shushanov, & Rybalkina, 2016). Sodium butyrate (NaB) is capable of inducing cell cycle arrest, differentiation, and apoptosis in different types of cancer. In glioma cells, NaB has been shown to decrease proliferation through modulation of cell cycle proteins. NaB acts through the inhibition of deacetylases, thus

leading to hyperacetylation of chromatin components and influences gene expression. Several HDACis are involved in clinical trials as monotherapies and in combination with other anticancer drugs (E. H. Kim et al., 2005). Recently was demonstrated that HDAC inhibition resensitizes erlotinib-resistant, EGFR amplified GBM cell lines to tyrosine kinase inhibitors action, suggesting a potential therapeutic strategy for gliomas (Liffers, Kolbe, Westphal, Lamszus, & Schulte, 2016).

The aim of this study was to evaluate the combined effect of HDAC inhibition and EGFR inhibition in GBM cell lines. We found that combined treatment between HDACi associated with EGFR-target therapy was more effective in reducing cell viability and proliferation in comparison with single treatments.

## **Materials and Methods**

### **Reagents**

Sodium Butyrate, Tyrphostin AG1478 and propidium iodide (PI) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). All culture reagents were purchased from Gibco Life Technologies (Grand Island, NY, USA). The Reverse Transcription System, RNase-free DNase and GoTaq® DNA Polymerase were provided by Promega (Madison, WI, USA) and Trizol by Invitrogen-Life technologies (Carlsbad, CA, USA) Invitrogen-Life technologies (Carlsbad, CA, USA).

### **Cell lines and treatments**

Human A-172 and U-87 GBM cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA) and cultured in 25 cm<sup>3</sup> flasks with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose, contained 1% Penicillin/Streptomycin and 0,1% fungizone, supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and incubated in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

Cells were treated after 24h of seeding with NaB 2mM, AG1478 30 µM for A-172 and 12 µM for U-87 and the combination of both. Vehicle control cells were exposed to ethanol at the same concentration used in AG 1478-treatment.

### **Cell viability and long-term proliferation**

Cell viability was assessed by trypan blue cell counting. A-172 and U-87 cells were seeded at a density of  $3 \times 10^3$  and  $5 \times 10^3$ , respectively and treated for 72 hours. After treatment, the medium was removed and cells detached with 0,25% trypsin/EDTA solution. The number of viable cells was determined by staining them with 0,4% trypan blue and manually counted in a Neubauer chamber under an inverted microscope (Nikon, Japan). Experiments were performed at least 3 three times in triplicates for each treatments and control.

For evaluation of a long-term cellular proliferation after 72 hours of treatment, cells were seeded in 24-wells plate at a density of  $10^4$  and  $2 \times 10^4$  per well, for U-87 and A-172 cells, respectively. After 3 days, cells were trypsinized, counted using a hemocytometer and replated in a treatment-free medium. The cumulative population doublings was calculated any 3 days during 12 days of experiment to determine the proliferation potential of GBM cell lines after the treatments with NaB and AG1478 alone or in combination. The doubling time was calculated using the formule PD:  $\text{Ln (FN) - Ln (IN) / Ln (2)}$ , where IN (Initial Number) is the number of cell plating in the first time and in every passage and FN (Final number) is the number of cells obtained in every counting (Silva, Felipe, Villodre, Lopez, & Lenz, 2016).

### **Colony formation assay**

Cells were cultured in 96 wells plate and treated for 3 days at different determined concentrations. Then, they were passaged and replated with 2 mL of free-treatment medium at density of 250 cells for A-172 and 100 cells for U-87 into 6-wells plate. Medium was replaced every 3 days. After ending of experiment (7 days for A-172 and 13 days for U-87), the complete medium was removed, cells were fixed with 1 mL of ethanol 70% V/V and counterstained with 0, 1 % crystal violet. For analysis, the colony number and the colony size were assessed using the plugin colony area for imageJ software (Guzmán, Bagga, Kaur, Westermarck, & Abankwa, 2014).

## Cell cycle analysis

Cells were seeded at a density of  $1,5 \times 10^4$  and  $3 \times 10^4$  for A-172 and U-87, respectively into 24 cells plates and treated like previously described. After 24 hours, cells were trypsinized, centrifugated and washed twice with PBS. For performing the experiment, the pellet was then resuspended in a sodium citrate solution with 50ug/mL of propidium iodide and 0,1% of Triton X-100. Samples were incubated in darkness on ice for at least 15 minutes. Marked cells were analyzed by flow cytometer (Attune® Applied Biosystems).

## RT-PCR

Total RNA was extracted from cells using Trizol reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. 500 ng of cDNA was converted from mRNAs with the use of the Reverse Transcription System Kit and and PCR performed using primers specific for any gene of interest (Table 1).

PCR conditions for experiments were 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 μM for each primer, 0.2 mM dNTPs, 1.25 GoTaq® DNA Polymerase, and 1 μl cDNA template. All assays were carried out in a total volume of 15 μl using 35 cycles for amplification that consisted of 1 min at 94 °C, denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 56 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 60 s, followed by a final extension at 72 °C for 5 min. The products were electrophoresed through 2 % agarose gels containing ethidium bromide and visualized with ultraviolet light. The fragments length was confirmed using a 50 pb DNA ladder.

---

**Table 1 should be included here**

---

## Statistical Analysis

Three independent experiments were made for any global experiment. All data were expressed as mean ± standar error of the mean (S.E.M.) and analyzed performing an

Analysis of Variance (ANOVA), followed by Tukey post hoc test for multiple comparisons using the GraphPad Prism software (San Diego, USA). A P value of <0.05 was considered statistically significant.

## **Results:**

### **Combined inhibition of EGFR and HDACs additively inhibit cell viability**

In order to assess the effects of HDAC inhibition to improve the effects of EGFR inhibition in GBM cell lines, we treated U-87 and A-172 cells with NaB and AG1478 or in combination for 72 hours and was analyzed cell viability (Figure 1). We found that both, AG1478 and NaB reduces GMB cell viability of A-172 and U-87 cells. A-172 was more sensitive with 2mM of NaB than U-87. On the other hand, A-172 cells were less sensitive to AG1478 in comparison with U-87 cells (Figure 1A and 1B). The combined treatment with NaB plus AG1478 was more effective in reducing cell viability compared to single treatment, but only in U-87 cells.

---

**Figure 1 should be included here**

---

### **The HDACi NaB enhances EGFR induced effects on cell proliferation**

To assess the effect of HDACi and EGFR inhibition alone or in combination on cell proliferation, we measured the cumulative population doubling in A-172 and U-87 cell lines. The treatments alone significantly reduced cell proliferation (Figure 2). Notably, by day 6 (Day 3 without treatment), the combination of NaB with AG1478 induced a more pronounced effect in U-87 cells in comparison with NaB or AG1478 alone (Figure 2B). Individual treatments tend to stabilize when compared with control, whereas the combination of them delayed at day 6, resulting in insufficient cells for replating. Overall, the results suggest that combining EGFR inhibition with an epigenetic modulator can increase treatment efficacy in U-87 cells



---

**Figure 2 should be included here**

---

**NaB and AG1478 alone or combined not reduce the colony-forming capability in GBM cell lines.**

In order to examine the cell survival treatment-free, 250 A-172 cells (Figure 3 A and B), treated for 72h previously, were replated and allowed to form colonies for 7 days. NaB 2mM was capable to reduce the colony number in 35%, AG 30uM in 9% and combined treatment in 29%, without significant reduction in the size of colonies.

For U-87, 100 cells previously treated were replated and allowed to form colonies for 3 days (Figure 3 C and D). No significant reduction in colony number and colony size was observed. The result suggests that colony formation capability and survival was not affected by the treatments in the tested concentration.

---

**Figure 3 should be included here**

---

**Effects of AG1478 and NaB alone or in combination in the cell cycle**

We performed a cell cycle analysis at 24 h by staining the nucleus with PI. After analysis, we found that in A-172 cell line, NaB at concentration of 2mM increase the G0/G1 arrest in 17% and reduce the S (of 15% to 5,5%) and G2 phase. In the nother hand, AG1478 do not affect the cell cycle at the showed dose (Figure 4A). Combined treatment showed similar decrease in S phase.

For U-87, the analysis showed that all treatments produce G0/G1 arrest, being that it was greatest in the AG1478 treatment. Cells without treatments shown, the percentage of nucleus in that stage was 55%, in NaB: 64%, in AG1478: 76% and in the combined

treatment with NaB+AG was 69%. It was also observed a reduction of the S phase in the treatment with AG1478.

---

**Figure 4 should be included here**

---

**AG1478 decreased the expression of STAT3 and TUBB3**

We examined the expression of the EGFR, the transcriptional factor STAT3 and a neural marker TUBB3. U-87 cells treated with AG1478 do not expressed detectable levels of EGFR, STAT3 and TUBB3 markers. We do not find differences in the treatment with AG1478 alone or in combination with NaB. Besides that, the markers analyzed were not altered by treatment with NaB alone.

---

**Figure 5 should be included here**

---

## **Discussion:**

The present study demonstrates that the cell viability and proliferation of GBM cells can be effectively inhibited by combined treatment targeting EGFR and HDACs. The combination of NaB with the EGFR inhibitor, typhostin AG1478, was more effective than both drugs alone to reduce proliferation in U-87 after 72 hours of cell culture and those effects are maintained in a long term without treatments. This additive effect on reduction of cell growth was not explained by differences in cell cycle arrest. However, drug treatments alone also induced arrest in G0/G1 phase in U-87 cells, but only NaB was able to induce the similar effect in A-172 cells.

Receptor tyrosine kinases and HDACs play some crucial roles in numerous biological processes. Many selective inhibitors of EGFR are important therapeutics against solid tumor cancers. By inducing histone hyperacetylation, HDACi can cause cell cycle arrest, differentiation and apoptosis in the tumor (Thurn, Thomas, Moore, & Munster, 2011). It is known that o HDAC inhibitor, sodium butyrate, can cause cell cycle arrest, differentiation and diminution of proliferation in glioma cells (Engelhard, Duncan, Kim, Criswell, & Van Eldik, 2001; Ito, Nobuyuki; Sawa, Hiroki; Nagane, Motoo; Noguchi, Akio; Hara, Mitsuhiro; Saito, 2001). The role of EGFR is likewise well established in glioma, and the EGFR is amplified and continuously activated in some cases of in glioblastoma, increasing the aggressiveness and malignancy (Gan, Kaye, & Luwor, 2009; Huang, Xu, & White, 2009).

However, both HDACi and EGFR inhibitors as monotherapies often have clinical limitations (Uecker et al., 2010). The current HDACis have serious boundaries, including ineffectively low concentration in solid tumours and cardiac cytotoxicity, which is hindering their progress in the clinic (Gryder, Sodji, & Oyelere, 2012). One of the major reasons for the inefficacy of EGFR target treatments is the intratumoral heterogeneity and the fact that different cellular functions can respond diversely to EGFR inhibition (Liffers et al., 2016). Therefore, combined treatment using specific receptor tyrosine kinase-targeted therapies in conjunction with HDACi presents a novel mechanism for suppressing tumor growth (Chou, Wu, Huang, & Chen, 2011; Zhang et al., 2015). Several tyrosine kinase pathway inhibitors have been clinically evaluated with HDACi (Thurn et al., 2011). Combined therapies with HDACi and EGFR

inhibitors have been described in glioma, and was recently demonstrated that the proliferation of cells with resistance to EGFR can be resensitized by interference with HDACi. HDACi is also effectively reduced cell expansion of GBM cell lines irrespective of their EGFR status, and generally exerted additive inhibition of proliferation in combination with erlotinib (Liffers et al., 2016).

Treatment with AG1478 alone or combined with NaB has decreased the expression of STAT3, and could possibly be related to the inhibition of proliferation in U-87 cells because of the existent correlation between EGFR and STAT3 and the expression of STAT 3 with the status of HDAC7 (Peixoto et al., 2016). NaB acts in the class IIA of HDAC, including the type HDAC 7. Patients with HDAC 7 and STAT3 expression have shown poor clinical outcome.

In summary, our results in agreement with other studies provide evidence that combined treatments of EGFR inhibitor and HDACi may be more effective in reducing GBM growth than drugs alone. However, the clinical usefulness of a combined HDAC/EGFR targeted approach has to be further determined in glioblastoma.

## References

- Adamopoulou, E., & Naumann, U. (2013). HDAC inhibitors and their potential applications to glioblastoma therapy. *Oncoimmunology*, 2(8), e25219. <https://doi.org/10.4161/onci.25219>
- Ahmed, R., Oborski, M. J., Hwang, M., Lieberman, F. S., & Mountz, J. M. (2014). Malignant gliomas: Current perspectives in diagnosis, treatment, and early response assessment using advanced quantitative imaging methods. *Cancer Management and Research*, 6(1), 149–170. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S54726>
- Appert-Collin, A., Hubert, P., Crémel, G., & Bennisroune, A. (2015). Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 283. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00283>
- Bansal, K., Liang, M. L., & Rutka, J. T. (2006). Molecular Biology of Human Gliomas. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 5(3), 185–194. <https://doi.org/10.1177/153303460600500302>
- Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A. F., & Delattre, J.-Y. (2003). Primary brain tumours in adults. *The Lancet*, 361(9354), 323–331. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12328-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12328-8)
- Berezowska, S., & Schlegel, J. (2011). Targeting ErbB receptors in high-grade glioma. *Current Pharmaceutical Design*, 17(23), 2468–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21827413>
- Bojko, A., Cierniak, A., Adamczyk, A., & Ligeza, J. (2015). Modulatory Effects of Curcumin and Tyrphostins (AG494 and AG1478) on Growth Regulation and Viability of LN229 Human Brain Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*, 67(7), 1170–1182. <https://doi.org/10.1080/01635581.2015.1073764>
- Cao, L., & During, M. J. (2012). What is the brain-cancer connection? *Annual Review of Neuroscience*, 35, 331–45. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150546>
- Carlsson, S. K., Brothers, S. P., & Wahlestedt, C. (2014). Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO Molecular Medicine*, 6(11), 1359–70. <https://doi.org/10.15252/emmm.201302627>
- Chou, C.-W., Wu, M.-S., Huang, W.-C., & Chen, C.-C. (2011). HDAC inhibition decreases the expression of EGFR in colorectal cancer cells. *PloS One*, 6(3), e18087. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018087>

- Cummings, J. H. (1981). Short chain fatty acids in the human colon. *Gut*, 22(9), 763–79. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7028579>
- Dong, A., Wodziak, D., & Lowe, A. W. (2015). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling requires a specific endoplasmic reticulum thioredoxin for the post-translational control of receptor presentation to the cell surface. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(13), 8016–27. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.623207>
- Ellis, A. G., Nice, E. C., Weinstock, J., Levitzki, A., Burgess, A. W., & Webster, L. K. (2001). High-performance liquid chromatographic analysis of the tyrphostin AG1478, a specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in mouse plasma. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, 754(1), 193–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11318415>
- Engelhard, H. H., Duncan, H. A., Kim, S., Criswell, P. S., & Van Eldik, L. (2001). Therapeutic effects of sodium butyrate on glioma cells in vitro and in the rat C6 glioma model. *Neurosurgery*, 48(3), 616-24–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11270553>
- Fouse, S. D., & Costello, J. F. (2009). neurological cancers, 1615–1629.
- Furnari, F. B., Cloughesy, T. F., Cavenee, W. K., & Mischel, P. S. (2015). Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma. *Nature Reviews Cancer*, 15(5), 302–310. <https://doi.org/10.1038/nrc3918>
- Gan, H. K., Kaye, A. H., & Luwor, R. B. (2009). The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical Neuroscience*, 16(6), 748–754. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2008.12.005>
- Gryder, B. E., Sodji, Q. H., & Oyelere, A. K. (2012). Targeted cancer therapy: giving histone deacetylase inhibitors all they need to succeed. *Future Medicinal Chemistry*, 4(4), 505–24. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.3>
- Gurney, J. G., & Kadan-Lottick, N. (2001). Brain and other central nervous system tumors: rates, trends, and epidemiology. *Current Opinion in Oncology*, 13(3), 160–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11307058>
- Guzmán, C., Bagga, M., Kaur, A., Westermarck, J., & Abankwa, D. (2014). ColonyArea: An ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. *PLoS ONE*, 9(3), 14–17.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092444>

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harari, P. M. (2004). Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocrine Related Cancer*, *11*(4), 689–708. <https://doi.org/10.1677/erc.1.00600>
- Hattori, N., Hirose, Y., Sasaki, H., Nakae, S., Hayashi, S., Ohba, S., ... Abe, M. (2016). World Health Organization grade II-III astrocytomas consist of genetically distinct tumor lineages. *Cancer Science*, *107*(8), 1159–64. <https://doi.org/10.1111/cas.12969>
- Hayashi, Y., Ueki, K., Waha, A., Wiestler, O. D., Louis, D. N., & von Deimling, A. (1997). Association of EGFR gene amplification and CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion in glioblastoma multiforme. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, *7*(3), 871–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9217972>
- Huang, P. H., Xu, A. M., & White, F. M. (2009). Oncogenic EGFR Signaling Networks in Glioma. *Science Signaling*, *2*(87), re6-re6. <https://doi.org/10.1126/scisignal.287re6>
- Hynes, N. E., & MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, *21*(2), 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.12.010>
- Ilkanizadeh, S., Lau, J., Huang, M., Foster, D. J., Wong, R., Frantz, A., ... Persson, A. I. (2014). Glial progenitors as targets for transformation in glioma. *Advances in Cancer Research*, *121*, 1–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800249-0.00001-9>
- Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva. (2016). *INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva*. <https://doi.org/978-85-7318-283-5>
- Ito, Nobuyuki; Sawa, Hiroki; Nagane, Motoo; Noguchi, Akio; Hara, Mitsuhiro; Saito, I. (2001). Inhibitory Effects of Sodium Butyrate on Proliferation and I... : Neurosurgery. *Neurosurgery*, *49*(2), 430–437. Retrieved from [http://journals.lww.com/neurosurgery/Abstract/2001/08000/Inhibitory\\_Effects\\_of\\_Sodium\\_Butyrate\\_on.31.aspx](http://journals.lww.com/neurosurgery/Abstract/2001/08000/Inhibitory_Effects_of_Sodium_Butyrate_on.31.aspx)
- Jovčevska, I. (2013). Glioma and glioblastoma - how much do we (not) know? (Review). *Molecular and Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.3892/mco.2013.172>

- Joy, A., Ramesh, A., Smirnov, I., Reiser, M., Misra, A., Shapiro, W. R., ... Feuerstein, B. G. (2014). AKT Pathway Genes Define 5 Prognostic Subgroups in Glioblastoma. *PLoS ONE*, 9(7), e100827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100827>
- Katakowski, M., Zheng, X., Jiang, F., Rogers, T., Szalad, A., & Chopp, M. (2010). MiR-146b-5p Suppresses EGFR Expression and Reduces *In Vitro* Migration and Invasion of Glioma. *Cancer Investigation*, 28(10), 1024–1030. <https://doi.org/10.3109/07357907.2010.512596>
- Kim, E. H., Kim, H. S., Kim, S. U., Noh, E. J., Lee, J.-S., & Choi, K. S. (2005). Sodium butyrate sensitizes human glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis through inhibition of Cdc2 and the subsequent downregulation of survivin and XIAP. *Oncogene*, 24(46), 6877–6889. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208851>
- Kim, H.-J., & Bae, S.-C. (2011). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *American Journal of Translational Research*, 3(2), 166–79. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21416059>
- Kondo, Y., Katsushima, K., Ohka, F., Natsume, A., & Shinjo, K. (2014). Epigenetic dysregulation in glioma. *Cancer Science*, 105(4), 363–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24843883>
- Kruh, J. (1982). Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 42(2), 65–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6174854>
- Kumar, S., Tandon, N., & Ramakrishnan, V. (2016). Clinical use and applications of histone deacetylase inhibitors in multiple myeloma. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, 35. <https://doi.org/10.2147/CPAA.S94021>
- Liffers, K., Kolbe, K., Westphal, M., Lamszus, K., & Schulte, A. (2016). Histone Deacetylase Inhibitors Resensitize EGFR/EGFRvIII-Overexpressing, Erlotinib-Resistant Glioblastoma Cells to Tyrosine Kinase Inhibition. *Targeted Oncology*, 11(1), 29–40. <https://doi.org/10.1007/s11523-015-0372-y>
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., ... Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Ma, L., Yan, H., & Zhou, Q. (2014). AG1478 inhibits the migration and invasion of



- cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma cells via the cell cycle regulation by matrix metalloproteinase-9. *Oncology Letters*.  
<https://doi.org/10.3892/ol.2014.2224>
- Mack, S. C., Hubert, C. G., Miller, T. E., Taylor, M. D., & Rich, J. N. (2015). An epigenetic gateway to brain tumor cell identity. *Nature Neuroscience*, *19*(1), 10–19. <https://doi.org/10.1038/nn.4190>
- Masui, K., Cloughesy, T. F., & Mischel, P. S. (2012). Review: molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *38*(3), 271–91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2011.01238.x>
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., ... Barnholtz-Sloan, J. S. (2015). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-Oncology*, *17*(Suppl 4), iv1–iv62. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov189>
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Liao, P., Rouse, C., Chen, Y., Dowling, J., ... Barnholtz-Sloan, J. (2012). CBTRUS Statistical Report Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol*, *14*(suppl 5(February)), 1–57. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou223>
- Overman, M. J., & Hoff, P. M. (2007). EGFR-Targeted Therapies in Colorectal Cancer. *Diseases of the Colon & Rectum*, *50*(8), 1259–1270. <https://doi.org/10.1007/s10350-007-0228-3>
- Padfield, E., Ellis, H. P., & Kurian, K. M. (2015). Current Therapeutic Advances Targeting EGFR and EGFRvIII in Glioblastoma. *Frontiers in Oncology*, *5*, 5. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00005>
- Peixoto, P., Blomme, A., Costanza, B., Ronca, R., Rezzola, S., Palacios, A. P., ... Turtoi, A. (2016). HDAC7 inhibition resets STAT3 tumorigenic activity in human glioblastoma independently of EGFR and PTEN: new opportunities for selected targeted therapies. *Oncogene*, *35*(34), 4481–4494. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.506>
- Prasad, K. N. (1980). Butyric acid: a small fatty acid with diverse biological functions. *Life Sciences*, *27*(15), 1351–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7003281>
- Raizer, J. J. (2005). HER1/EGFR tyrosine kinase inhibitors for the treatment of

- glioblastoma multiforme. *Journal of Neuro-Oncology*, 74(1), 77–86.  
<https://doi.org/10.1007/s11060-005-0603-7>
- Ropero, S., & Esteller, M. (2007). The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Molecular Oncology*, 1(1), 19–25.  
<https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.01.001>
- Sathornsumetee, S., & Rich, J. N. (2006). New treatment strategies for malignant gliomas. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 6(7), 1087–104.  
<https://doi.org/10.1586/14737140.6.7.1087>
- SCHERER, H. J. (1940). THE FORMS OF GROWTH IN GLIOMAS AND THEIR PRACTICAL SIGNIFICANCE. *Brain*, 63(1).
- Schiffer, D., Annovazzi, L., Mazzucco, M., & Mellai, M. (2015). The Microenvironment in Gliomas: Phenotypic Expressions. *Cancers*, 7(4), 2352–9.  
<https://doi.org/10.3390/cancers7040896>
- Sealy, L., & Chalkley, R. (1978). The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell*, 14(1), 115–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/667928>
- Silva, A. O., Felipe, K. B., Villodre, E. S., Lopez, P. L. C., & Lenz, G. (2016). A guide for the analysis of long-term population growth in cancer. *Tumor Biology*, 1–7.  
<https://doi.org/10.1007/s13277-016-5255-z>
- Smith, J. S., Tachibana, I., Passe, S. M., Huntley, B. K., Borell, T. J., Iturria, N., ... Jenkins, R. B. (2001). PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(16), 1246–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11504770>
- Sok, J. C. (2006). Mutant Epidermal Growth Factor Receptor (EGFRvIII) Contributes to Head and Neck Cancer Growth and Resistance to EGFR Targeting. *Clinical Cancer Research*, 12(17), 5064–5073. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0913>
- Stavrovskaya, A. A., Shushanov, S. S., & Rybalkina, E. Y. (2016). Problems of Glioblastoma Multiforme Drug Resistance. *Biochemistry. Biokhimiia*, 81(2), 91–100. <https://doi.org/10.1134/S0006297916020036>
- Stupp, R., Gander, M., Leyvraz, S., & Newlands, E. (2001). Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours. *The Lancet. Oncology*, 2(9), 552–60. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(01\)00489-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(01)00489-2)

- Tanno, S., Ohsaki, Y., Nakanishi, K., Toyoshima, E., & Kikuchi, K. (2004). Small cell lung cancer cells express EGFR and tyrosine phosphorylation of EGFR is inhibited by gefitinib (&quot;Iressa&quot;, ZD1839). *Oncology Reports*, 12(5), 1053–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15492792>
- Tarun, P. B., & Paul, B. J. (2005). *Epidermal Growth Factor* (Vol. 327). New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/159745012X>
- Thurn, K. T., Thomas, S., Moore, A., & Munster, P. N. (2011). Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Future Oncology*, 7(2), 263–283. <https://doi.org/10.2217/fon.11.2>
- Uecker, A., Sicker, M., Beckers, T., Mahboobi, S., Hägerstrand, D., Östman, A., & Böhmer, F.-D. (2010). Chimeric tyrosine kinase-HDAC inhibitors as antiproliferative agents. *Anti-Cancer Drugs*, 21(8), 759–765. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32833ccf25>
- Veliz, I., Loo, Y., Castillo, O., Karachaliou, N., Nigro, O., & Rosell, R. (2015). Advances and challenges in the molecular biology and treatment of glioblastoma-is there any hope for the future? *Annals of Translational Medicine*, 3(1), 7. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.10.06>
- Wang, H.-G., Huang, X.-D., Shen, P., Li, L.-R., Xue, H.-T., & Ji, G.-Z. (2013). Anticancer effects of sodium butyrate on hepatocellular carcinoma cells in vitro. *International Journal of Molecular Medicine*, 31(4), 967–74. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1285>
- WHO | Cancer. (2015). *WHO*.
- Yarden, Y. (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 37 Suppl 4, S3-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11597398>
- Yoon, S., & Eom, G. H. (2016). HDAC and HDAC Inhibitor: From Cancer to Cardiovascular Diseases. *Chonnam Medical Journal*, 52(1), 1. <https://doi.org/10.4068/cmj.2016.52.1.1>
- Zahonero, C., & Sánchez-Gómez, P. (2014). EGFR-dependent mechanisms in glioblastoma: towards a better therapeutic strategy. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 71(18), 3465–88. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1608-1>
- Zhang, L., Zhang, Y., Mehta, A., Boufraqueh, M., Davis, S., Wang, J., ... Kebebew, E. (2015). Dual inhibition of HDAC and EGFR signaling with CUDC-101 induces

potent suppression of tumor growth and metastasis in anaplastic thyroid cancer. *Oncotarget*, 6(11), 9073–9085. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3268>

**Table 1.** Sequences of PCR primers used in the study.

Gene	Forward primer	Reverse primer	Size, bp
β-actin	GAGACCTTCAACACCCCAG	GCTACAGCTTCACCAGCAG	190
EGFR	CAGTGGCGGGACATAGTCAG	CCCATTGGGACAGCTTGGA T	109
TUBB3	CTCAGGGGCCTTTGGACATC	CAGGCAGTCGCAGTTTTTCAC	160
STAT3	AGTGACCAGGCAGAAGATG C	CACGTACTCCATCGCTGACA	117

EGFR, epithelial growth factor receptor; TUBB3, tubulin-β3; STAT3, signal transducers and activators of transcription

### Legends of Figures

**Fig. 1: Influence of the EGFR inhibitor Tyrphostin AG1478 plus sodium butyrate in the viability of glioblastoma cell lines.** A-172 (A) and U-87 (B) cells were treated with the indicated concentrations alone or combined for 72h. The number of counted viable cells was normalized with the control. Data are represented as means ± SEM and analyzed performing the one-way ANOVA followed by Tukey test for multiple comparisons. \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001, \*\*\*\*P<0,0001. Representative pictures of each treatment at 72h are shown above each graph.

**Fig. 2: The long-term effect of NaB plus AG 1478:** Treatments were done in the first time, 24 hours after plating (day 0) and cells counted on the day 3 of treatment, without replacement of treatments. Population doubling was measured every day of passage. A) A-172 and B) U-87. Data are represented as means ± SEM and analyzed performing the two-way ANOVA followed by Tukey test for multiple comparisons \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001; and \*\*\*\* p < 0.0001 in 3 independent experiments

**Fig. 3: NaB plus AG1478 do not reduce the colony number and the colony size in GBM.** Cells were exposed to NaB 2mM, AG1478 at the corresponding dose and combined treatments for 72h after plating in 6 wells plates. A) A-172 and C) U-87 was maintained in culture without treatments for 7 and 13 days, respectively. After the picture, the colony number and colony size were assessed using the imageJ plugin “Colony Area”. B) and D) are representative pictures of the colony for any treatment after fixation and stain with crystal violet. Data are represented as means  $\pm$  SEM and analyzed performing the two-way ANOVA followed by Tukey test for multiple comparisons. \*P<0.05

**Fig. 4: Cell cycle analysis in GBM cell lines.** Cells were treated for 24 hours at corresponding concentration showed in any graph and the cell cycle assessed by flow cytometry analysis. The cell cycle distribution of DNA content in showed in the graphs below A) A-172 and B) U-87 cell lines. Data represents 3 independent experiments, expressed as mean  $\pm$  SEM percentage of cells in each phase of the cell cycle and analyzed performing the two-way ANOVA followed by Tukey test for multiple comparisons. Significant difference at \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001; and \*\*\*\* p < 0.0001 compared to control cells.

**Fig. 5: Relative mRNA expression of EGFR, STAT3 and  $\beta$ III tubulin (TUBB3) in U87 cell lines.** Cells were treated for 72h previously extraction of RNA (see materials and methods).

**Fig. 1**

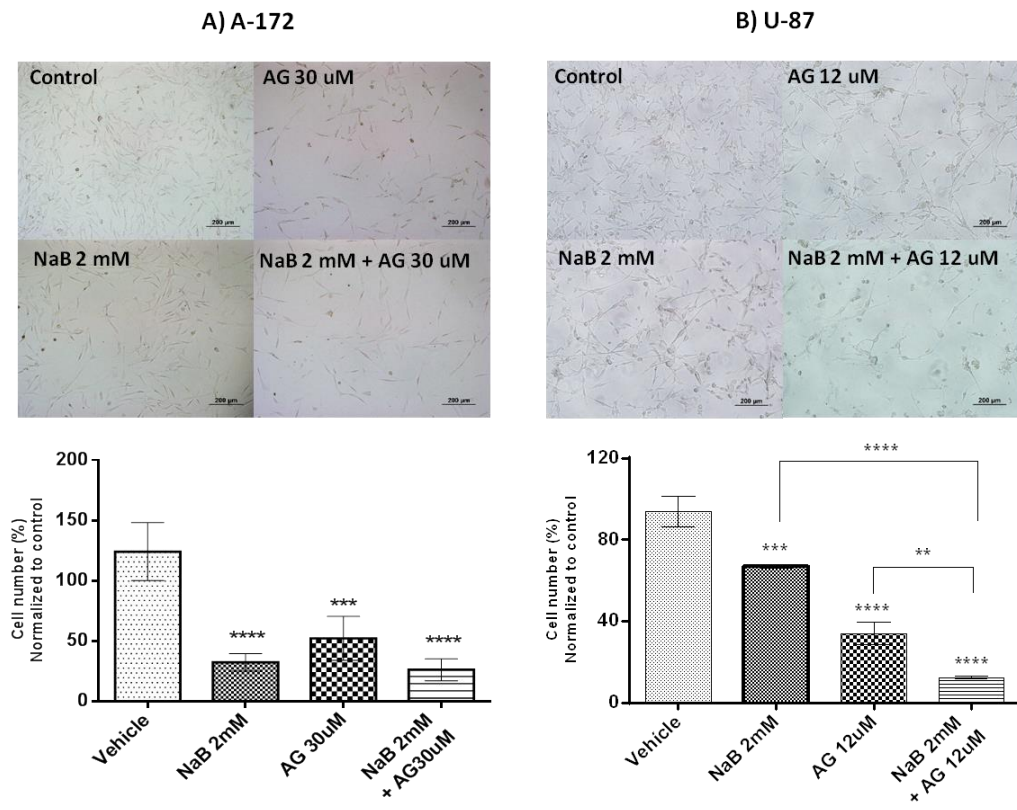
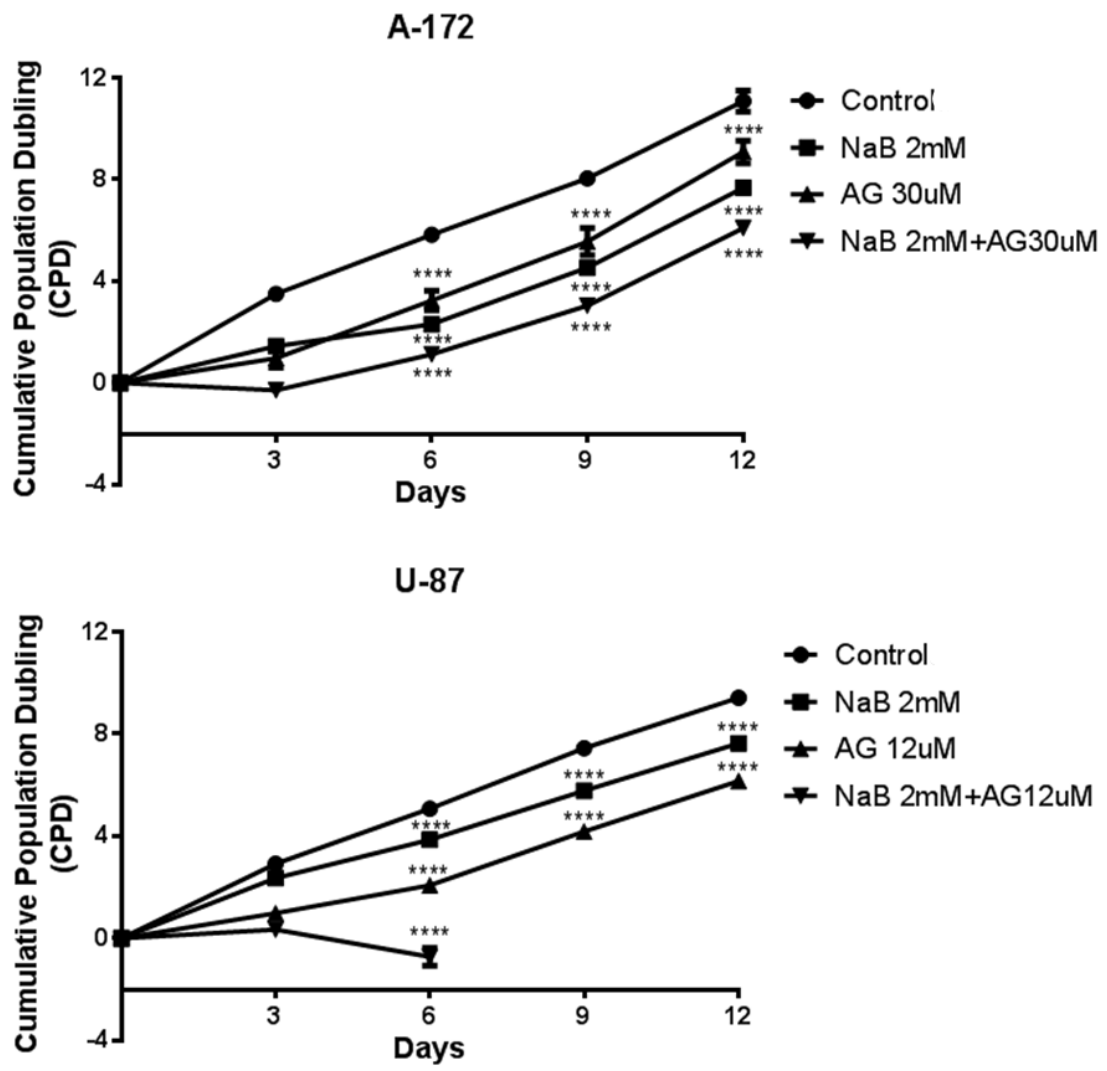
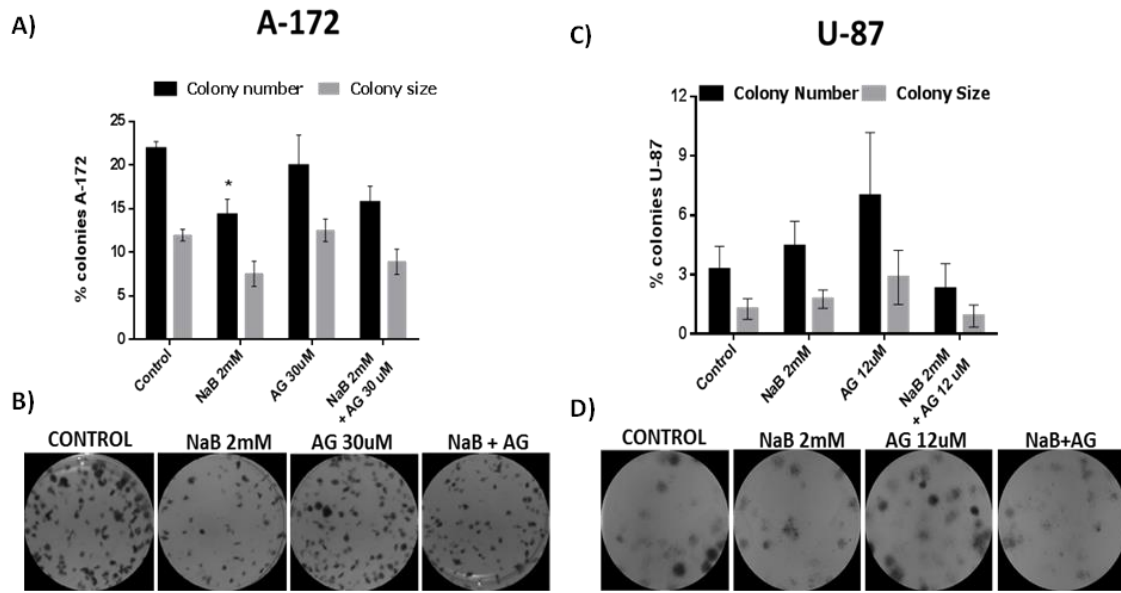


Fig. 2



**Fig. 3**



**Fig. 4**

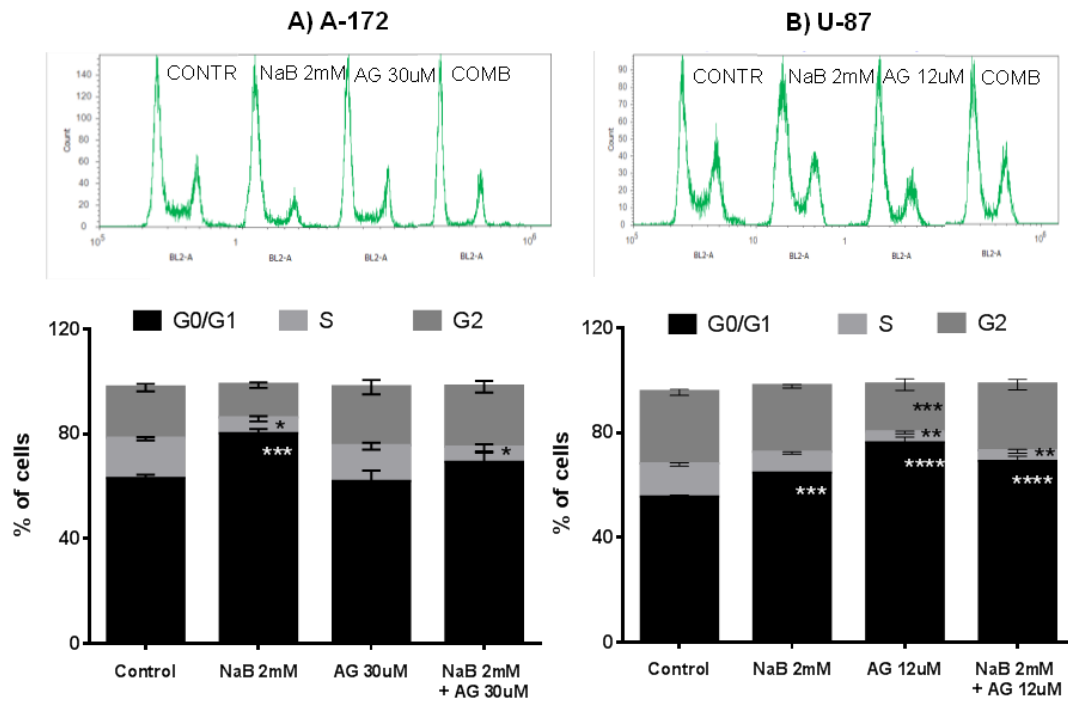
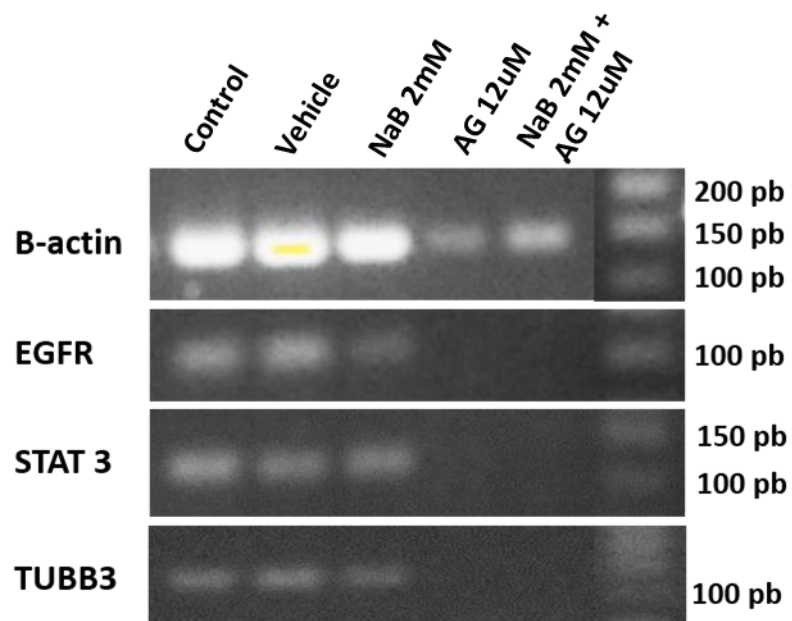




Fig. 5



## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi realizado com o objetivo avaliar *in vitro* a interação entre a epigenética e a via de sinalização por EGFR, através da utilização de inibidores específicos. Já está descrito na literatura que a expressão do receptor EGFR está envolvida na progressão dos gliomas difusos, devido à sua capacidade de aumentar suas características malignas. Além disso, as modificações epigenéticas como a deacetilação das histonas possuem um papel fundamental na expressão gênica.

Nossos resultados demonstram, pela primeira vez, que o tratamento combinado com uma pequena molécula Tyrophostin e o ácido graxo natural butirato de sódio é capaz de inibir a proliferação na linhagem U-87 de GBM, sendo esta diminuição mais pronunciada quando comparada ao tratamento com as monoterapias. Após a retirada do tratamento, tal efeito combinado foi mantido *in vitro*.

Devido a isso, mais estudos devem ser feitos com o propósito de esclarecer a interação existente entre os dois inibidores utilizados.