

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS AGUDOS E CRÔNICOS EM
RESPOSTA AO TRATAMENTO COM TEMOZOLOMIDA E SUA COMBINAÇÃO
COM VIMBLASTINA E MEBENDAZOLE EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA**

ANDREW OLIVEIRA SILVA

Professor orientador: Dr. Guido Lenz

Porto alegre, julho de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS AGUDOS E CRÔNICOS EM
RESPOSTA AO TRATAMENTO COM TEMOZOLOMIDA E SUA COMBINAÇÃO
COM VIMBLASTINA E MEBENDAZOLE EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA**

Tese de doutorado submetida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em julho de 2016, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

ANDREW OLIVEIRA SILVA

Professor orientador: Dr. Guido Lenz

Porto alegre, julho de 2016.

Nome: **SILVA, Andrew Oliveira**

Título: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS AGUDOS E CRÔNICOS EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM TEMOZOLOMIDA E SUA COMBINAÇÃO COM VIMBLASTINA E MEBENDAZOLE EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA

Dissertação a ser apresentada no Centro de Biotecnologia (CBiot) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Projeto desenvolvido no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular (Labsinal), sob orientação do professor Guido Lenz, e financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, através do edital Universal, número 458139/2014-9. Aluno contemplado com bolsa de estudos a nível de doutorado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Aprovado em: 1 de julho de 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. **Carlos F. M. Menck** Instituição: Universidade de São Paulo (USP)

Julgamento: Aprovado Assinatura: _____

Prof. Dr. **Fábio Klamt** Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Julgamento: Aprovado Assinatura: _____

Prof. Dr. **Rafael Roesler** Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Julgamento: Aprovado Assinatura: _____

Esta tese é dedicada aos meus pais e minha esposa, que sempre me mostraram a importância de correr atrás dos seus objetivos, e especialmente ao meu filho Vítor, que é a grande inspiração para que eu faça as coisas acontecerem.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino gratuito e de qualidade, pela sua estrutura onde a presente tese foi desenvolvida, e pelo seu excelente corpo docente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular que me deu a oportunidade e todo o suporte científico e burocrático em todos os momentos da execução deste trabalho.

Ao Governo brasileiro, através da Fundação CAPES e do CNPq, que financiou integralmente estes 4 anos dedicados à execução deste trabalho, através de uma bolsa de estudos e da contemplação do Edital Universal 2014.

Ao professor Guido Lenz, que sempre foi um exemplo de profissional, mostrando toda a sua paixão pelo que faz e dedicação para com seus alunos. Agradeço todo o apoio pessoal nos momentos adversos e toda a sua sensibilidade durante todo o último ano do doutorando, quando nasceu meu filho Vítor. Serei eternamente grato pelos últimos 9 anos de convivência e por tudo que pude aprender.

À minha Iniciação Científica Eloísa Dalsin por todo o seu profissionalismo e dedicação em grande parte do trabalho executado. Certamente será uma grande profissional no futuro e terei orgulho de poder ter feito parte da tua formação.

Aos colegas e ex-colegas do LabSinal, pela parceria e união, pelos momentos de compartilhamento de ideias, pelos momentos de descontração e por cada dia de convivência nos últimos 9 anos.

Aos meus amigos e familiares, que sempre me incentivaram e acreditaram no meu potencial e nunca duvidaram que eu poderia alcançar todos os meus objetivos. Um agradecimento especial aos grandes amigos Leonardo Maciel, Leonardo Nascimento e Raffael Kronbauer pela parceria incondicional, pelos momentos de descontração que amenizaram os momentos de tensão do doutorado e por todo o apoio motivacional.

Ao Eduardo Chiela, que sempre foi um grande colega de laboratório durante quase todo o meu tempo de LabSinal, transformou-se em um grande amigo e hoje é praticamente membro da minha família como padrinho do meu filho Vítor. Além de uma pessoa com um coração gigante, é um exemplo de profissional dedicado. Agradeço por todo o suporte científico, emocional e motivacional que sempre me proporcionou. Certamente, a sua amizade foi uma das coisas mais importantes que eu conquistei nestes 9 anos de LabSinal.

À minha esposa Daniela Kuhn, que está ao meu lado desde o meu período de graduação e sempre acreditou em mim, sempre me deu forças para lutar pelos meus objetivos e, certamente, fez de mim uma pessoa melhor, mais dedicada e mais profissional. Agradeço pelo apoio motivacional, por todo o incentivo para que eu sempre corresse atrás dos meus objetivos e, principalmente, para que eu nunca fraquejasse e deixasse as adversidades me vencerem. Muito deste trabalho eu devo especialmente a esta pessoa maravilhosa que, além de tudo que conquistamos juntos, ainda me deu o maior bem que eu poderia ter nesta vida: meu filho Vítor. Agradeço por ser minha esposa, companheira, amiga, incentivadora e por ser mãe do meu filho. Te amo incondicionalmente.

Ao meu pai Thomaz e minha mãe Marinêz, que sempre abriram mão de tudo para a minha felicidade. Espero um dia poder retribuir tudo o que me proporcionaram.

Obrigado pelo exemplo de amor à vida, de dedicação aos filhos, de força para lutar, de perseverança e obrigado por acreditarem em mim. Sou o que sou hoje, em virtude de todo o esforço e dedicação que sempre tiveram para comigo.

Espero, um dia, ser um pai tão bom quanto vocês foram comigo.

E, finalmente, ao meu filho Vítor Kuhn Neto, que nasceu em 2015, em meio ao temido último ano do doutorado. Apesar de não compreender a importância deste momento para a formação profissional de seu pai e de não me incentivar com palavras, agradeço a este pequeno ser pelo simples fato de existir. Cada sorriso, cada gesto e cada momento feliz que posso passar ao teu lado serve de motivação para que eu nunca desista e para que eu sempre lute, cada vez mais, pelos meus objetivos. Obrigado, Filho! PAPAI TE AMA!!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE FIGURAS E TABELA.....	17
APRESENTAÇÃO.....	20
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1 Câncer. Uma doença incurável?.....	24
1.2 Heterogeneidade Tumoral e sua Influência na Resposta aos Tratamentos	27
1.3 Gliomas.....	31
1.3.1 Características Gerais.....	31
1.3.2 Sistema de Classificação dos Gliomas	32
1.3.2.1 Perfil Histopatológico dos Gliomas	32
1.3.2.2 Nível de Malignidade dos Gliomas e sua Classificação em Graus	33
1.3.2.3 Outras Alterações Genéticas e Moleculares na Classificação dos Gliomas.....	39
1.3.2.3.1 Mutações no Gene da Isocitrato Desidrogenase (IDH)	40
1.3.2.3.2 Co-deleção dos Braços Cromossômicos 1p e 19q	42
1.3.2.3.3 Status da O ⁶ -metilguanina DNA metiltransferase (MGMT).....	43
1.3.2.4 Principais Alterações Genéticas Presentes nos Glioblastomas	44
1.3.2.4.1 Via da RTK-RAS-MAPK-PI3KA	46

1.3.2.4.2 Via da proteína p53.....	48
1.3.2.4.3 Via da proteína do Retinoblastoma (RB)	53
1.3.2.5 Um Novo Sistema de Classificação dos Glioblastomas	57
1.3.3 Dados Epidemiológicos dos Gliomas.....	59
1.3.4 Tratamento de Glioblastomas (GBM).....	63
1.3.4.1 Ressecção Cirúrgica de Glioblastomas.....	63
1.3.4.2 Radioterapia (RT) em Glioblastomas.....	65
1.3.4.3 Quimioterapia em Glioblastomas.....	67
1.4 Temozolomida (TMZ): O Quimioterápico de Primeira Linha no Tratamento dos Glioblastomas.....	69
1.4.1 Características Gerais e Sua Descoberta.....	69
1.4.2 Regime de Administração da Temozolomida em Pacientes com Glioblastoma.....	71
1.4.3 Farmacodinâmica da Temozolomida.....	74
1.4.4 Farmacocinética da Temozolomida.....	74
1.4.5 Mecanismo de ação da Temozolomida.....	76
1.4.6 Mecanismos de Resistência Mais Comuns à Temozolomida	81
1.4.7 Estratégias Terapêuticas para Superar a Resistência à Temozolomida	88
1.5 Equívocos Mais Comuns na Pesquisa Básica <i>In vitro</i> de Novas Terapias Antitumorais	94
1.6 Por que Analisar os Efeitos a Longo Prazo?	101
1.7 Fármacos Adjuvantes Associativos à Temozolomida no Tratamento de Glioblastomas	103

1.7.1 Vimblastina (VBL).....	104
1.7.2 Mebendazole (MBZ).....	110
2. OBJETIVO GERAL.....	117
2.1 Objetivos Específicos.....	117
3. CAPÍTULO I – “ <i>A guide for the analysis of long-term population growth in cancer</i> ”.....	119
4. CAPÍTULO II – “ <i>The regrowth kinetic of the surviving population is independent of acute and chronic responses to temozolomide in glioblastoma cell line</i> ”	137
5. CAPÍTULO III – “ <i>Associação de Temozolomida com Vimblastina ou Mebendazole bloqueia cronicamente a proliferação em células de Glioblastoma com sensibilidade aguda à agentes alquilantes</i> ”	170
6. DISCUSSÃO INTEGRADA.....	200
7. CONCLUSÕES GERAIS.....	215
8. PERSPECTIVAS GERAIS.....	217
9. REFERÊNCIAS GERAIS.....	218
10. APÊNDICES.....	259

Lista de Abreviaturas

2-HG – 2-hidroxiglutarato

ABT 888 – *Veliparib PARP-1 Inhibitor*

ABZ – Albendazol

AG 014699 – *Rucaparib PARP-1 Inhibitor*

AIC – 5-aminoimidazole-4-carboxamida

AKT – *Protein Kinase B*

AO – *Acridine Orange*

APAF-1 – *Apoptotic Peptidase Activating Factor 1*

APNG – Alquilpurina-DNA-N-glicosilase

ATCC – *American Tissue Culture Collection*

ATM – *Ataxia-Telangiectasia Mutated*

ATR – *Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein*

AUC – *Area Under Curve*

AVOs – *Acidic Vacuolar Organelles*

BAX – *BCL2-Associated X*

BCL-2 – *B-cell Lymphoma 2*

BCNU – Carmustina

BER – *Base Excision Repair*

BID – *BH3 Interacting-domain Death agonist*

BSI-201 – *Iniparib PARP-1 Inhibitor*

BTCG – *Brain Tumor Cooperative Group*

CBTRUS - *The Central Brain Tumor Registry of the United States*

CCNU – Lomustina

CDK - *Cyclin-Dependent Kinase*

CDK2 – *Cyclin-Dependent Kinase 2*

CDK4 – *Cyclin-Dependent Kinase 4*

CDK6 – *Cyclin-Dependent Kinase 6*

CDKN1A – *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A*

CDKN2A – *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*

cDNA – DNA complementar

CGy – centigray

CHK1 – *Checkpoint Kinase 1*

CHK2 – *Checkpoint kinase 2*

CIC – *Capicua Transcriptional Repressor*

CKI – *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor*

CPD – *Cumulative Population Doubling*

CpG – *5'—C—phosphate—G—3*

CSD – *Cumulative Size Doubling*

DAPI – *4',6-diamidino-2-phenylindole*

DFM – *Drug Free Medium*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – *Dimetilsulfóxido*

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

DR4 – *Death Receptor 4*

DR5 – *Death Receptor 5*

DT – *Doubling Time*

E2F – *E2 Factor*

EC50 – *Effective Concentration 50*

EGF – *Epidermal Growth Factor*

EGFR - *Epidermal Growth Factor Receptor*

EUA – *Estados Unidos da América*

FAS/CD95 – *protein Fas/Cluster of Differentiation 95*

FBS – *Fetal Bovine Serum*

FDA – *Food and Drug Administration*

FN – Final Number

FUBP1 – *Far Upstream element-Binding Protein 1*

G1 – fase *Growth 1*

G2/M – fase *Growth 2 / Mitose*

GBM – Glioblastoma

GFAP – *Glial Fibrillary Acidic Protein*

Gy – Gray

H&E – Hematoxilina e Eosína

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HIF1-A – *Hypoxia Inducible Factor 1-alfa*

i.p – Intraperitoneal

IDH1 – Isocitrato Desidrogenase 1

IN – Initial Number

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IP2 – Inositol 1,4 bifosfato

IPP6 – Image Pro Plus 6

kDa – *kilodalton*

LLCPD – *Lower Limit Cumulative Population Doubling*

m² – metro quadrado

MAPK – *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MBZ – Mebendazolee

MDM-2 – *Murine Doble Minute 2*

MDR – *Multidrug Receptor 1*

mg – miligrama

MGMT – O⁶-metilguanina-DNA Metiltransferase

MIB-1 – *Mindbomb E3 Ubiquitin Protein Ligase 1*

MLH1 – *MutL homolog 1*

mm³ - milímetros cúbicos

MMR – *Mismatch Repair*

MSH2 – *mutS homolog 2*

MSH6 – *mutS homolog 6*

MTIC – metiltriazeno-1-il imidazole-4-carboxamida

mTOR – *mammalian Target Of Rapamycin*

MTV – associação de Mebendazole, Temozolomida e Vimblastina

MTZ – Mitozolomida

MutS α – heterodímero de MSH2 e MSH6

MutS β – heterodímero de MSH2 e MSH3

N³ – posição nitrogênio 3

N⁷ – posição nitrogênio 7

NADPH – Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina

NCI – National Cancer Institute

NF1 – *Neurofibromin 1*

NHGRI – National Human Genome Research Institute

NIH – *National Institute of Health*

NMA – *Nuclear Morphometric Analysis*

O⁶ – posição oxigênio 6

O⁶-BG – O⁶-benzilguanina

O⁶-meG – O⁶-metilguanina

P14ARF – proteína de 14 kDa codificada pelo gene INK4A/ARF

P16INK4a – proteína de 16 kDa codificada pelo gene INK4A

P21 – proteína de 21 kDa

P53 – proteína de 53 kDa

PARP-1 – Poli (ADP)-Ribose Polimerase 1

PBS – *Phosphate-Buffered Saline*

PCV – associação de Procarbazina, Lomustina e Vincristina

PD – *Population Doubling*

PDGF – *Platelet Derived Growth Factor*

PDGFR – *Platelet Derived Growth Factor Receptor*

PDGFRA – *Platelet-Derived Growth Factor Receptor, Alpha Polypeptide*

PI – *Propidium Iodide*

PI3KA – *Phosphatidylinositol 3-kinase A*

PIP3 – *fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato*

pRB – *Proteína do Retinoblastoma*

PTEN – *Phosphatase and Tensin homolog*

PUMA – *p53 Upregulated Modulator of Apoptosis*

PVT – *associação de Cisplatina, Vimblastina e Temozolomida*

rAUC – *relative Area Under Curve*

RendCPD – *Relative end CPD*

RNA – *Ribonucleid Acid*

RPR – *Relative Proliferation Rate*

RT – *Radioterapia*

RTCT – *Relative Time to Cross a Threshold*

RTK – *Receptor Tirosina Cinase*

S – *fase de Síntese*

SD – *Size Doubling*

SNC – *Sistema Nervoso Central*

TAD – *Transactivation Domain*

TCGA – *The Cancer Genome Atlas*

TCT – *Time to Cross a Threshold*

TKR – *Tyrosine Kinase Receptor*

TMZ – *Temozolomida*

TP53 – *Tumor Protein of 53 kDa*

UFRGS – *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*

USA – *United States of America*

USP – Universidade de São Paulo

VBL – Vimblastina

VCR – Vincristina

VDS – Vindesina

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*

VRL – Vinorelbina

WHO – *World Health Organization*

β-Gal – β-galactosidase

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS COMPONENTES DA TESE

Figura 1. Principais alterações celulares e moleculares envolvidas na patogênese do câncer	28
Figura 2. A clonalidade da evolução tumoral.....	29
Figura 3. Alterações genéticas em GBMs ocorrem frequentemente em três principais vias de sinalização	56
Figura 4. Estrutura química da Temozolomida (TMZ) e da Mitozolomida (MTZ).	70
Figura 5. Regime terapêutico padrão de administração de Temozolomida em pacientes com GBM, e suas variações.....	73
Figura 6. Efeitos antitumorais da Temozolomida são dependentes do status de funcionamento dos sistemas de reparo MMR, BER e dos níveis de MGMT.....	80
Figura 7. Estrutura química da Vimblastina (VBL).....	104
Figura 8. Estrutura química do Mebendazole (MBZ).....	111

TABELAS COMPONENTES DA TESE

Tabela1. Classificação dos tipos de Glioma, segundo a Organização Mundial da Saúde	39
---	-----------

FIGURAS COMPONENTES DO ARTIGO PRESENTE NO CAPITULO 1

Figure 1. Basic procedure to perform the Cumulative Population Doubling (CPD) experiment and to plot the outcomes in the CPD graph	124
Figure 2. Procedure to calculate the parameters to evaluate CPD graphs.....	130
Figure 3. <i>in vitro</i> X <i>in vivo</i> CPD evaluation using new proposal parameters.....	132
Figure 4. Unification of independent experiment outcomes using the proposed methodology to evaluate the effectiveness of different drugs in different cells....	134

FIGURAS COMPONENTES DO ARTIGO PRESENTE NO CAPÍTULO 2

Figure 1. Experimental design of Temozolomide treatment in GBM cells.....	142
Figure 2. TMZ caused dose-dependent cell number decrease in GBMs.....	146
Figure 3. <i>In vitro</i> chronic analysis revealed a delayed effect of Temozolomide, a recovery of proliferative capacity of surviving cells and a gradient of chronic cell response.....	149
Figure 4. Integrative analysis of cell mechanisms and chronic effects triggered by Temozolomide.....	153
Figure 5. Scatter plot analysis of the correlation between currently used chronic assays and CPD parameters and among CPD parameters	155

FIGURAS SUPLEMENTARES DO ARTIGO PRESENTE NO CAPÍTULO 2

Supplementary Figure 1. Clonogenic assay of GBM cells treated with TMZ in different concentrations	163
Supplementary Figure 2. TMZ induces G2/M cell cycle arrest in acute TMZ-sensitive GBM cells.....	164
Supplementary Figure 3. Morphology of control cells or cells treated with 50 μ M of TMZ for 5 days (left) and cell cycle distribution of these cells (right).....	165
Supplementary Figure 4. Autophagy measuring through AVOs staining in GBMs	166
Supplementary Figure 5. TMZ induces senescence in TMZ-sensitive cells presenting wild-type p53	167
Supplementary Figure 6. Senescence evaluation through C12FDG.....	168

TABELAS SUPLEMENTARES DO ARTIGO PRESENTE NO CAPÍTULO 2

Supplementary Table 1. Pearson correlation matrix of acute and chronic effects of TMZ 50 μ M in GBM cells with the proposed CPD parameters	169
---	------------

FIGURAS DO ARTIGO PRESENTE NO CAPÍTULO 3

Figura 1. Lomustina, Mebendazole, e Vimblastina apresentam citotoxicidade aguda na maioria das linhagens de Glioblastoma.....	174
Figura 2. Perfil de resposta crônica de linhagens de GBM ao tratamento com TMZ, VBL e MBZ	179
Figura 3. Tratamento combinado de Temozolomida com Vimblastina ou Mebendazole bloqueia a proliferação celular em U87, U343, A172 e U251.....	181
Figura 4. Coquetel MTV reduz expressivamente a proliferação celular em células resistentes à TMZ.....	193

FIGURAS SUPLEMENTARES DO ARTIGO PRESENTE NO CAPÍTULO 3

Figura Suplementar 1. Análise micrográfica dos efeitos morfológicos e populacionais em U87.....	183
Figura Suplementar 2. Análise micrográfica dos efeitos morfológicos e populacionais em U343.....	184
Figura Suplementar 3. Análise micrográfica dos efeitos morfológicos e populacionais em A172.....	185
Figura Suplementar 4. Análise micrográfica dos efeitos morfológicos e populacionais em U251.....	186
Figura Suplementar 5. Análise micrográfica dos efeitos morfológicos e populacionais em C6.....	189
Figura Suplementar 6. Análise micrográfica dos efeitos morfológicos e populacionais em U138.....	190

APRESENTAÇÃO

Esta tese é a representação escrita dos últimos 4 anos de trabalho, onde projetos relacionados à compreensão da biologia tumoral dos Glioblastomas e ao estudo de novas terapias contra este tipo de neoplasia foram desenvolvidos durante minha pós-graduação, a nível de doutorado. A presente tese é composta de um tópico de introdução, onde foi feita uma revisão bibliográfica abordando os principais tópicos relacionados aos trabalhos experimentais que serão apresentados na sequência, incluindo uma abordagem a respeito do modelo tumoral utilizado nos trabalhos desenvolvidos (Glioblastoma) e sobre os agentes farmacológicos investigados (Temozolomida, Vimblastina e Mebendazole). Além disso, este tópico ainda conta com algumas reflexões teóricas que servirão de suporte para uma melhor compreensão dos trabalhos metodológicos, incluindo os principais equívocos cometidos na ciência básica investigativa de novas terapias e os principais motivos para a utilização de ensaios a longo prazo na investigação de novas terapias no câncer. Em seguida, é descrito o objetivo geral da presente dissertação, seguido dos principais objetivos específicos dos trabalhos apresentados. Logo mais, são apresentados dois capítulos, cada um contendo um manuscrito em forma de artigo científico, compostos de uma breve introdução, materiais e métodos, resultados, discussão específica e as principais referências utilizadas em cada um dos trabalhos. O capítulo 1 é composto de um artigo metodológico, recentemente aceito para publicação na revista *“Tumor Biology”*, onde uma nova abordagem para o ensaio *Cumulative Population Doubling* (CPD) é sugerida. Já o capítulo 2 consiste em um artigo experimental, submetido para a revista *“Experimental Cell Research”* e neste momento encontra-se em processo

de resposta aos questionamentos dos revisores, onde foi feita uma caracterização *in vitro* dos principais efeitos agudos e crônicos induzido por doses terapêuticas de Temozolomida em células de Glioblastoma. Cada um dos trabalhos está formatado de acordo com as normas das revistas para as quais estes foram submetidos. Já no capítulo 3, serão mostrados apenas os resultados obtidos na investigação das análises a longo prazo de proliferação celular em resposta ao tratamento isolado com agentes farmacológicos adjuvantes Vimblastina e Mebendazole, e seus efeitos combinados com o quimioterápico Temozolomida, além de uma discussão específica destes resultados.

Ao final, é feita uma discussão integrada dos resultados apresentados nos capítulos 1, 2 e 3, seguidos das principais conclusões e das perspectivas gerais da presente tese. O último tópico trás as referências gerais, utilizadas na introdução, no capítulo 3 e na discussão geral.

RESUMO

Apesar dos progressos na compreensão da biologia dos Glioblastomas (GBM), poucos avanços terapêuticos foram obtidos, desde que a Temozolomida (TMZ) foi implementada, em 2005, como quimioterápico padrão no tratamento de GBMs. Uma das justificativas para o insucesso de novas terapias, pode estar relacionada com a condução equivocada dos experimentos *in vitro*, que utilizam doses exorbitantes dos fármacos e curtos períodos de tempo para avaliar sua eficácia terapêutica, não refletindo a realidade clínica da doença. Desta forma, o objetivo deste trabalho é caracterizar *in vitro* os efeitos da TMZ, mimetizando parâmetros clínicos, como dose plasmática e regime de tratamento em pacientes, e investigar possíveis fármacos de ação adjuvante à TMZ. Primeiramente, uma nova metodologia de análise de ensaios de proliferação celular a longo prazo foi proposta, a fim de quantificar os efeitos antitumorais crônicos de diferentes intervenções *in vitro* e *in vivo*. Em seguida, foram confirmados os principais mecanismos agudos desencadeados por TMZ e constatou-se a conservação do seu efeito antitumoral até uma semana após o fim do período de exposição ao fármaco. Apesar disso, em todas células de GBM testadas, houve a manutenção de subpopulações sobreviventes que readquiriram sua capacidade proliferativa, dentro do período de 28 dias. Aplicando a nova metodologia proposta, constatou-se que nenhum mecanismo ou ensaio utilizado neste trabalho foi capaz de prever o comportamento proliferativo das células sobreviventes, mostrando a importância da análise crônica *in vitro* para avaliar a eficácia terapêutica de um tratamento. Então, o potencial adjuvante de Vimblastina (VBL) e Mebendazole (MBZ) foi testado e ambos causaram redução inicial na população, seguida de um recrescimento das células sobreviventes. Quando combinadas com TMZ, viu-se um completo bloqueio na proliferação durante todo o período analisado, menos em U138 e C6, que apresentaram efeitos semelhantes à utilização isolada de VBL ou MBZ. Já a combinação de MBZ, TMZ e VBL (MTV) reduziu consideravelmente a proliferação de C6 e U138, em 28 dias de análise. Portanto, a análise da proliferação celular *in vitro* a longo prazo, através desta nova abordagem proposta, parece ser uma forma mais adequada de investigar a eficácia terapêutica novos regimes de tratamento, e as combinações entre TMZ, VBL e MBZ parecem representar uma estratégia terapêutica promissora de ser testada em ensaios *in vivo*, como nova sugestão de tratamento para este tipo tumoral.

ABSTRACT

Despite the progress in understanding the biology of glioblastoma (GBM), little therapeutic improvements has been achieved, since the Temozolomide (TMZ) was implemented in 2005 as a standard chemotherapeutic agent in the treatment of GBMs. One of the reasons for the failure of new therapies may be related to the mistaken conduct of *in vitro* experiments, using exorbitant doses of drugs and short periods of time to evaluate their therapeutic efficacy, not matching the clinical reality of the disease. Thus, the objective of this study is to characterize the *in vitro* effects of TMZ, mimicking clinical parameters, such as plasma concentration and the drug schedule regimen in patients, in addition to investigate a possible adjuvant drug to combine with TMZ. First, a new method to analyze long-term *in vitro* and *in vivo* outcomes was proposed in order to quantify the antitumor effects of different interventions. Then, the major acute mechanisms triggered by TMZ were confirmed and its antitumor effects were preserved until one week after the end of drug exposure period. Nevertheless, all tested GBM cells maintained a survival subpopulation after TMZ treatment that recovered its proliferative capacity within 28 days. Through the new proposed methodology, it was concluded that none tested mechanism or assay in this work was able to predict the proliferative behavior of the surviving cells, showing the importance of *in vitro* chronic analysis to evaluate the therapeutic effectiveness of a treatment. After, Vinblastine (VBL) and Mebendazole (MBZ) were tested as a potential adjuvant drug to be used in combination with TMZ and both presented a strong initial decrease in the proliferation, followed by a regrowth of the surviving subpopulation. However, when combined with TMZ, they caused a complete blockade in cell proliferation along the analyzed period (60 days), except in U138 and C6 cell lines, which exhibited similar decrease when VBL or MBZ were used alone. Next, MBZ, TMZ and VBL (MTV) were combined in a single treatment to be tested in C6 and U138 and the cell proliferation was significantly decreased in 28 days for both GBM cell lines. Therefore, analyzing the chronic effects using this new analytical approach seems to be a more suitable way to investigate the therapeutic effectiveness of a new treatment regimen and the combination of TMZ, VBL and MBZ appear to represent a promising therapeutic strategy to be *in vivo* tested, as new suggestion treatment for this tumor type.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER: UMA DOENÇA INCURÁVEL?

Por definição, câncer é um conjunto de doenças que tem como principal característica em comum o crescimento desordenado e incontrolável de células anormais, interrompendo a organização estrutural do parênquima dos mais variados tecidos e órgãos, podendo comprometer, também, suas funções fisiológicas. Na sua forma mais agressiva, esta doença pode se dispersar para diversas partes do corpo, acometendo o bom funcionamento de inúmeros órgãos simultaneamente.

Sua etiologia é caracterizada principalmente pelo acúmulo de alterações genéticas em uma ou em um pequeno grupo de células que se mantêm silenciosas e indetectáveis por, até mesmo, muitos anos. Por este motivo, trata-se de uma doença de difícil diagnóstico nos seus estágios iniciais, assim como nos estágios intermediários, uma vez que, nestas fases da doença, a proliferação celular desordenada é muito lenta e não compromete, de forma brusca e imediata, as funções fisiológicas do tecido acometido sendo, até então, uma doença assintomática. Quando atinge seus estágios mais avançados, onde os primeiros sintomas começam a se manifestar, a doença frequentemente já apresenta um grau de complexidade bastante elevado, reduzindo as chances do seu tratamento. Para muitos tipos de cânceres, o prognóstico de sobrevida dos pacientes após o diagnóstico é bastante baixo, podendo chegar a poucas semanas.

Em razão de toda a problemática relacionada com esta doença avassaladora, um esforço enorme é feito pela comunidade científica, a fim de caracterizar as principais informações genéticas, bioquímicas, moleculares e celulares relacionadas aos variados estágios da biologia tumoral, desde a carcinogênese, até mesmo a progressão tumoral, malignização, metástase, entre outros. Entretanto, a grande maioria dos esforços dos pesquisadores sempre esteve mais concentrada no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento dos diversos tipos de cânceres.

Atualmente, o regime terapêutico padrão para grande parte dos cânceres é composto basicamente de ressecção cirúrgica da massa tumoral, quando possível, seguida de terapias envolvendo a utilização de agentes radioativos para a eliminação das células tumorais remanescentes (radioterapia) e/ou a utilização de fármacos que podem alcançar altos índices de citotoxicidade, principalmente, em células com alta taxa proliferativa (quimioterapia), de forma associativa entre estes ou não. Além disso, algumas estratégias alternativas ao uso desta tríade terapêutica inicial vêm sendo exaustivamente testadas nas últimas décadas, apresentando avanços promissores para determinados tipos tumorais, como a imunoterapia, a terapia alvo-específica e a terapia com células-tronco (Druker, 2001; Cobleigh *et al.*, 2003; Bhere e Shah, 2015).

Entretanto, apesar de inúmeros avanços terem sido conquistados no desenvolvimento de terapias farmacológicas altamente eficientes no combate ou, ao menos, no controle de certos tipos de neoplasias, vários outros tipos de cânceres praticamente não tiveram melhora de prognóstico desde que a quimioterapia foi introduzida. Isto inclui tipos tumorais como o câncer de

pâncreas e os Glioblastomas. Nestes casos, regimes terapêuticos altamente agressivos, constituídos de ressecção cirúrgica da massa tumoral, seguida de radioterapia e quimioterapia combinatória com, até mesmo, mais de um fármaco associado são capazes de acrescentar somente alguns meses na sobrevida mediana dos pacientes (Andren-Sandberg, 2011; Omuro e Deangelis, 2013). O problema não parece estar na atuação direta dos fármacos nos seus alvos terapêuticos nas células tumorais, onde sua eficácia geralmente é detectada através de uma redução considerável e/ou estagnação da massa tumoral residual à ressecção cirúrgica. Entretanto, o problema parece estar caracterizado pela irresponsividade de alguns pequenos grupos de células tumorais, frente à exposição ao regime terapêutico, levando a manutenção destas células malignas após o encerramento do período de tratamento. Estas células remanescentes, conseqüentemente, acabam sendo responsáveis pelo restabelecimento gradativo da massa tumoral, ocasionando um quadro clínico conhecido como recidiva ou recorrência tumoral (Furnari *et al.*, 2007).

Considerando a dificuldade que é imposta no descobrimento de um novo agente terapêutico com propriedades antitumorais, na pesquisa dos seus mecanismos de ação e seus alvos celulares e na comprovação de sua segurança em ensaios clínicos, até que este possa ser usado em pacientes (Grever *et al.*, 1992), é preocupante a informação que nem todos os pacientes serão responsivos a este tratamento. Além disso, baseado nas informações até então descritas, se torna ainda mais dificultoso este processo de desenvolvimento terapêutico quando se sabe que nem todas as células componentes da mesma

massa tumoral responderão da mesma forma a um determinado agente antitumoral.

Esta heterogeneidade de respostas entre as células que compõe uma mesma massa tumoral caracteriza uma das principais problemáticas no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do câncer, pois é considerada uma das principais razões para a manutenção de subpopulações irresponsivas aos tratamentos antineoplásicos, resultando no quadro conhecido como resistência tumoral (Diaz *et al.*, 2012).

1.2 HETEROGENEIDADE TUMORAL E SUA INFLUÊNCIA NA RESPOSTA AOS TRATAMENTOS

Como já foi abordado, uma célula tumoral é o resultado de um somatório de alterações genéticas e epigenéticas que conferem a estas uma vantagem seletiva frente as demais: irresponsividade aos estímulos de morte celular, elevada taxa de proliferação e perpetuação da sua “prole celular”. Estas alterações, à medida que vão sendo acumuladas, vão proporcionando novas taxas de vantagens seletivas, seja ela positiva ou negativa. Esta nova condição celular proporcionada pela manutenção de uma nova alteração genética ou epigenética será perpetuada para as células-filhas que poderão sofrer novas alterações e assim, sucessivamente. Além disso, à medida que há um acúmulo destas alterações nas células, estas vão adquirindo condições de burlar os principais mecanismos de controle da homeostase celular, como evasão de mecanismos de morte celular,

sustentação de sinais proliferativos e bloqueio de sinais supressores de proliferação, entre outras (**Figura 1**).

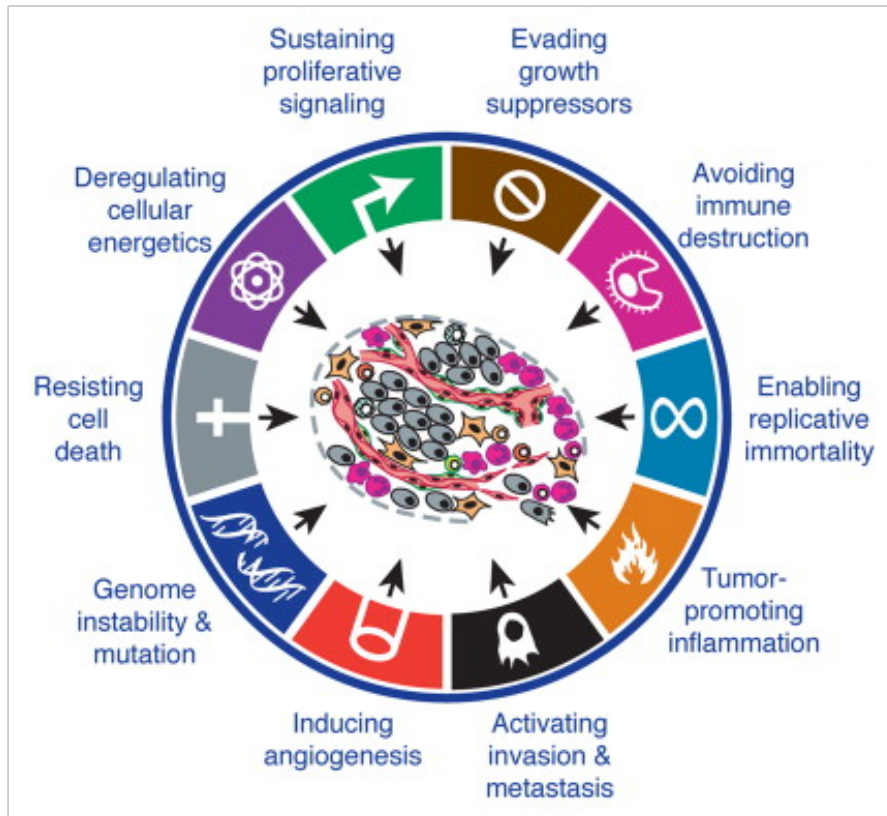


Figura 1 – Principais alterações celulares e moleculares envolvidas na patogênese do câncer. A presença do maior número destas alterações em células transformadas caracteriza o grau de transformação e agressividade do câncer. Ilustração retirada e adaptada do trabalho *“Hallmarks of Cancer: The Next Generation”*, publicado em 2011 na revista *Cell* (Hanahan e Weinberg, 2011).

A **Figura 1** representa os principais mecanismos afetados em células tumorais e que são responsáveis pelo estabelecimento do grau de progressão tumoral e agressividade e, de certa forma, justifica o porquê destas células apresentarem uma vantagem seletiva frente às células normais e adquirirem a capacidade de proliferar indefinidamente.

Outro importante fator abordado, que representa um divisor de águas para o estabelecimento de um alto grau de heterogeneidade intratumoral, é o surgimento da instabilidade genômica, que é resultante de alterações prévias em elementos-chave no controle da integridade do material genético celular, como proteínas sinalizadoras de dano ao DNA ou de reparo ao DNA. Todas estas alterações genéticas acontecem de forma aleatória entre as células tumorais e nem sempre uma mesma alteração acomete todas as células do mesmo tumor. Como consequência desta aleatoriedade de alterações dentre as células tumorais, à medida que estas vão proliferando, há o surgimento de subpopulações tumorais carregando um mesmo conjunto de alterações e, portanto, constituindo um alto grau de heterogeneidade intratumoral (Patel *et al.*, 2014).

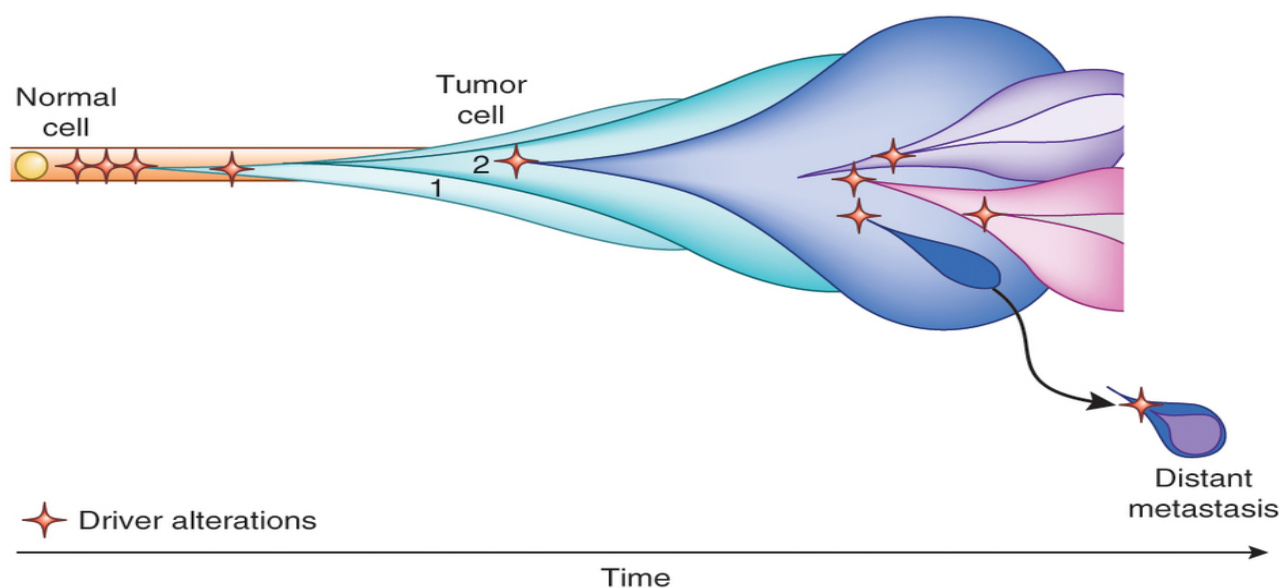


Figura 2: A clonalidade da evolução tumoral. “*Driver Mutations*” é o termo designado para nomear aquele tipo de mutação que é determinante para que a célula acometida pela alteração genética ganhe uma vantagem seletiva sobre as demais, fazendo com que surja uma nova subpopulação dentro da mesma massa tumoral. Estas vantagens seletivas ocorrem ao longo de toda a evolução tumoral e o acúmulo de alterações de maneira singular para cada população ilustrada por cores diferentes na figura, configura o quadro de heterogeneidade intratumoral no momento do diagnóstico da doença. Ilustração retirada do trabalho “*Toward Understanding and Exploiting Tumor Heterogeneity*”, publicado em 2015 na revista *Nature* (Alizadeh *et al.*, 2015).

A **Figura 2** ilustra de forma clara e didática o surgimento de novas subpopulações dentro de uma subpopulação já estabelecida, à medida que uma nova alteração é adquirida. Alterações que conferem desvantagens sob as demais subpopulações são rapidamente eliminadas e até mesmo subpopulações tumorais bem estabelecidas podem sucumbir ao longo do tempo, seja por motivos de adaptação a uma nova condição ambiental, seja pela maior vantagem seletiva das demais subpopulações.

Frente a este quadro, a dificuldade de desenvolver uma nova estratégia terapêutica é enorme, já que se deve levar em consideração não só a heterogeneidade intertumoral, uma vez que há uma variabilidade de respostas terapêuticas em indivíduos diferentes acometidos com um mesmo tipo tumoral, mas também a heterogeneidade intratumoral, que é um dos principais delimitantes para o uso de certos tipos de tratamentos antineoplásicos (Sun e Yu, 2015).

Gliomas apresentam alto grau de heterogeneidade inter e intratumoral e ilustram muito bem toda esta adversidade de estabelecer um tratamento altamente eficaz para eliminação total da massa tumoral (Parker *et al.*, 2016). Portanto, conhecer de forma mais detalhada a biologia tumoral desta neoplasia e o perfil de resposta, frente aos tratamentos disponíveis, podem ajudar a tentar compreender o porquê do insucesso das terapias utilizadas até o momento e ajudar na projeção de novas abordagens terapêuticas.

1.3 GLIOMAS

1.3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

Gliomas são as principais neoplasias primárias que surgem no parênquima do sistema nervoso central (SNC) que, por definição, referem-se a todo e qualquer tumor que possui características histológicas similares às células neurogliais sadias. Estes representam cerca de 80% de todos os tumores malignos do SNC (Ostrom *et al.*, 2013) e caracterizam-se por serem amplamente heterogêneos, tanto em relação ao seu perfil genotípico e fenotípico celular, quanto a sua apresentação clínica, além de apresentar diversos níveis de malignidade. Em decorrência destas variabilidades genéticas, morfológicas e clínicas, surgiu-se a necessidade da criação de um extenso esquema de estratificação para determinar, de forma mais precisa, o subtipo de Glioma com o qual os pacientes eram acometidos, com o objetivo principal de obter um melhor diagnóstico quanto a sua evolução e agressividade, e para que pudesse ser administrado o regime terapêutico mais adequado nos pacientes. Com isso, o sistema clínico padrão de classificação dos Gliomas leva em consideração as seguintes características: o perfil histopatológico dos Gliomas, o grau de malignidade (ambos baseados em análise de cortes histológicos de biópsias) e a localização tumoral no SNC, definido por exames de imagem. Com o avanço das técnicas de biologia molecular ao longo do tempo, um sistema mais detalhado de classificação foi sendo desenvolvido, baseado no perfil de expressão de alguns genes específicos, que são determinantes para uma melhor resposta aos tratamentos disponíveis. Atualmente, com o surgimento de técnicas de

sequenciamento de nova geração, capazes de identificar a expressão de milhares de genes simultaneamente, um novo sistema de classificação baseados em padrões de expressão gênica de amostras de Gliomas vem ganhando força, auxiliando na melhor estratificação deste tipo tumoral, em busca de um diagnóstico mais preciso.

1.3.2 SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO DOS GLIOMAS

1.3.2.1 PERFIL HISTOPATOLOGICO DOS GLIOMAS

Este foi o primeiro sistema de classificação usado para estratificar as ocorrências de Glioma, até então conhecidos apenas como Gliomas difusos, com a finalidade de compreender melhor a patologia da doença e o quadro clínico dos pacientes. Desenvolvido na década de 20, por *Percival Bailey* e *Harvey Cushing*, dois famosos neurocirurgiões americanos, esta metodologia de classificação leva em conta as semelhanças histológicas dos Gliomas com as células gliais sadias (Bailey e Cushing, 1926), onde os astrocitomas os oligodendrogliomas e os ependimomas apresentam características morfológicas semelhantes aos astrócitos, oligodendrócitos e às células ependimais, respectivamente (Pollo, 2011). Ainda, um quarto tipo de Glioma apresentando características mistas entre astrócitos e oligodendrócitos foi denominado de oligoastrocitomas. Todos estes subtipos tumorais compartilham inúmeras alterações genéticas, mas também possuem características genotípicas específicas de cada um dos subgrupos citados, que são determinantes na progressão tumoral e na resposta a tratamentos (Louis, 2006; Vitucci *et al.*, 2011).

1.3.2.2 NÍVEL DE MALIGNIDADE DOS GLIOMAS E SUA CLASSIFICAÇÃO EM GRAUS

Em 2007, a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization – WHO*) criou um novo sistema de classificação para os Gliomas que levava em conta não só as características morfológicas de semelhança com células gliais, mas também as características fenotípicas e de comportamento do tumor como um todo, baseado nos resultados das análises da coloração de hematoxilina e eosina (H&E) de biópsias de pacientes (Louis *et al.*, 2007). Através dessas análises, os tumores passaram a ser classificados entre benignos e malignos e a sua malignidade foi, ainda, separada por graus de intensidade. Gliomas benignos são geralmente classificados como tumores de baixo grau que apresentam uma taxa de proliferação bastante reduzida e com possibilidade de total remoção, através de procedimentos cirúrgicos. Já os Gliomas malignos são aqueles que apresentam características peculiares de malignidade como alta taxa de proliferação celular, atipia celular e infiltratividade, impossibilitando a total remoção através de cirurgia. A manutenção de algumas células tumorais resulta na recidiva tumoral, que é determinada como a principal causa de óbito dos pacientes, num período mediano de 12 a 18 meses, após o diagnóstico da doença (Louis *et al.*, 2007; Vitucci *et al.*, 2011).

Já a classificação em graus, além de considerar todas as evidências cirúrgicas abordadas anteriormente, leva em consideração algumas características mais específicas nas análises da coloração H&E de biópsias para

poder estratificar a intensidade de malignidade das amostras tumorais em graus, que variam de I a IV, considerando algumas evidências celulares como atipia nuclear, intensidade da atividade mitótica, presença de proliferação microvascular e de áreas de necrose (Louis *et al.*, 2007; Nakazato, 2008). Além disso, com o avanço tecnológico para detecção de alterações genéticas em larga escala, foi possível identificar uma série de alterações que são mais comuns em cada uma das diferentes graduações dos Gliomas e determinar sua importância no prognóstico terapêutico dos pacientes. Sendo assim, as principais características para a determinação de cada grau dos Gliomas são:

- **Gliomas de grau I** são tumores biologicamente considerados benignos, pois são tipicamente sólidos, com bordas bem definidas, não-infiltrativos e que geralmente podem ser cirurgicamente removidos. Além disso, são mais frequentes em crianças.
- **Gliomas de grau II** abrangem principalmente os tumores de baixa malignidade. Chamados de astrocitomas difusos, oligodendrogliomas ou oligoastrocitomas, de acordo com a classificação de *Bailey e Cushing*, apresentam características como baixa atividade proliferativa, infiltratividade frequente, ausência de bordas definidas no tumor, pleomorfismo celular, atipia nuclear e resultam numa sobrevida média que varia de 3 a 12 anos. A maioria dos astrocitomas difusos são bem diferenciados, normalmente recorrem após a ressecção cirúrgica e, assim como os oligodendrogliomas (El-Hateer *et al.*, 2009), progridem para graus mais elevados ao longo do tempo (Pollo, 2011). Marcação por imuno-histoquímica para detecção da proteína GFAP e MIB-1 permite a confirmação da origem glial dos tumores

de grau II e sua baixa atividade mitótica, respectivamente. Até pouco tempo atrás, os Gliomas de grau II eram considerados tumores resistentes à quimioterapia (Shaw e Wisoff, 2003) e poucos estudos de novas terapias foram desenvolvidos. Entretanto, ensaios clínicos recentes, com pacientes de alto risco, mostraram que houve uma considerável melhora no quadro clínico em relação à sobrevida livre de progressão da doença (Shaw *et al.*, 2012) e também na sobrevida total do paciente (Buckner *et al.*, 2014), quando tratados com um coquetel de quimioterápicos conhecido como PCV (Procarbazina, CCNU e Vincristina) em adjuvância com a radioterapia, em comparação com radioterapia sozinha. Outros estudos mostraram que, tanto PCV, quanto Temozolomida, outro quimioterápico bastante utilizado no tratamento de Gliomas dos mais variados graus (será detalhadamente abordado a seguir), proporcionaram aos pacientes, uma melhora no quadro clínico, estabilizando a progressão tumoral e melhorando os sintomas neurológicos (Pace *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2004; Stege *et al.*, 2005).

- **Gliomas de grau III** (chamados também de astrocitoma anaplásico ou oligodendrogliomas anaplásicos, segundo a classificação *Bailey e Cushing*) apresentam inúmeras evidências histológicas de malignidade, como a presença de alta atividade mitótica (principal característica para definição entre Gliomas de grau II ou III), pleomorfismo celular e atipia nuclear. Os pacientes que são acometidos por tumores com essa graduação são submetidos a ressecção cirúrgica, quando possível, seguida de tratamento adjuvante com radio e quimioterapia. A sobrevida média dos pacientes gira em torno dos 3 anos, após o diagnóstico. Tanto os astrocitomas anaplásicos,

quanto os oligodendrogliomas podem progredir para o grau mais elevado dos Gliomas, a medida que acumulam anormalidades citogenéticas. O ganho do cromossomo 7 ou a perda do cromossomo 10 são dois dos principais indicadores de progressão tumoral para o grau mais maligno (grau IV) (Vigneswaran *et al.*, 2015). Diversos estudos clínicos de fase II sugerem uma certa quimiosensibilidade dos oligodendrogliomas anaplásicos (Cairncross e Macdonald, 1988; Van Den Bent *et al.*, 2003; Mohile *et al.*, 2008). Entretanto, estudos clínicos de fase III mostraram que PCV associado com radioterapia não apresentou melhoras significativas na sobrevida dos pacientes (Cairncross *et al.*, 2006), salvo quando uma nova estratificação dos pacientes foi realizada, considerando o perfil genético e molecular dos tumores (co-deleção dos braços cromossômicos 1p e 19q e metilação do promotor da enzima O⁶-metilguanina DNA metiltransferase (MGMT)) (Cairncross *et al.*, 2013). Em astrocitomas anaplásicos, PCV não apresentou benefícios na sobrevida, quando associado com radioterapia (Medical Research Council Brain Tumor Working, 2001) e apresentou um pequeno aumento na sobrevida quando associado com Carmustina (outro quimioterápico usado no tratamento de tumores cerebrais) (Prados *et al.*, 1999). Já TMZ apresentou uma resposta bastante animadora em estudos clínicos de fase II em oligodendrogliomas anaplásicos (Vogelbaum *et al.*, 2009), mas novos estudos estão sendo conduzidos para comprovar este efeito benéfico. Tanto PCV quanto TMZ, apresentaram atividade antitumoral contra recorrência dos dois subtipos de Gliomas de grau III (Yung *et al.*,

1999; Chinot *et al.*, 2001), mas geralmente sua taxa de resposta é bastante baixa e o período de controle da doença é bastante curto.

- **Gliomas de grau IV**, mais conhecido como Glioblastomas (GBM), representam o principal foco do presente trabalho e são considerados os tumores mais malignos e agressivos do SNC. Caracterizam-se por todas as evidências celulares e clínicas dos tumores de menor grau, além de apresentarem fortes evidências de neoangiogênese e áreas centrais com intensa atividade necrótica. Clinicamente, são praticamente impossíveis de serem totalmente ressecados, são irresponsivos aos inúmeros tratamentos quimioterápicos testados até hoje e, normalmente, recorrem após a terapia (Louis *et al.*, 2007). Como consequência disso, os GBMs apresentam uma alta taxa de letalidade, resultando em um prognóstico de sobrevida mediano que não ultrapassa os 2 anos, após o diagnóstico (Gladson *et al.*, 2010). Ainda, os GBMs podem ser subdivididos em dois subtipos baseados na ausência ou na presença de diagnóstico prévio de tumores de menor grau. GBMs primários constituem o subtipo mais comum e são diagnosticados como tumores *de novo*, sem a progressão a partir de tumores de menor grau. São mais frequentes em pacientes idosos (> 60 anos). GBMs secundários são resultantes da progressão gradual de tumores de menor grau (Gliomas de grau II e III) até os tumores de maior grau (grau IV) e normalmente são encontrados como resultado de recorrência em pacientes jovens. O tempo mediano de progressão de um grau II para o grau IV é de 5 anos, ao passo que do grau III para o IV, é de apenas 2 anos (Le Mercier *et al.*, 2012; Nicolaidis, 2013). Esta progressão pode ser resultado de

alterações induzidas pelo próprio agente quimioterápico, quando os graus II e III são tratados (Johnson *et al.*, 2014). Com base em todos os estudos avaliativos de eficácia terapêutica dos mais variados quimioterápicos em GBM, Temozolomida, até hoje, é o quimioterápico que apresenta os melhores resultados integrados entre atividade antitumoral, efeitos adversos e sobrevida dos pacientes. Entretanto, esta melhora não passa de um acréscimo mediano de 2 meses na sobrevida dos pacientes (Stupp *et al.*, 2005). Ainda, a resposta dos GBM à TMZ parece ser amplamente dependente do status molecular dos tumores em relação à enzima MGMT (Hegi *et al.*, 2005) (maiores detalhes nas sessões subsequentes). Em casos de GBM recorrentes de tratamentos primários com radioterapia combinada com TMZ, inúmeras estratégias terapêuticas, utilizando outros quimioterápicos de forma isolada (Wick *et al.*, 2010) ou combinada (Schmidt *et al.*, 2006), inibidores alvo-específicos (Batchelor *et al.*, 2013) ou anticorpos monoclonais (Vredenburgh *et al.*, 2007) vêm sendo testadas. Entretanto, todas estas estratégias apresentam apenas uma pequena melhora no quadro clínico dos pacientes, sem estender consideravelmente a sobrevida destes. Maiores detalhes sobre mecanismos de ação, alvos-terapêuticos e resultados pré-clínicos e clínicos serão minuciosamente abordados na sessão 1.4 (Temozolomida (TMZ): O Quimioterápico de Primeira Linha no Tratamento de Glioblastomas).

A **Tabela 1** resume as principais informações dos variados subtipos de Gliomas classificados segundo os critérios de *Bailey e Cushing* somado à escala de graus, determinada pela WHO.

Type	Grade	Description	Median survival (years)
Astrocytoma	II	Found diffusely infiltrating into surrounding neural tissue; increased hypercellularity, no mitosis	6-8
Oligodendroglioma	II	Occur in the white matter and cortex of the cerebral hemispheres, low mitotic activity, no necrosis	12
Oligoastrocytoma	II	Diffuse mixed tumor with mixed glial background	3 to >10
Anaplastic-astrocytoma/ oligodendroglioma	III	Highly infiltrating tumors with increased mitotic activity; no necrosis or vascular proliferation	3
Glioblastoma	IV	Infiltrating glial neoplasm with necrosis and micro-vascular proliferation; high rate of mitosis	1 to 2

WHO, World Health Organization.

Tabela 1 – Classificação dos tipos de Glioma, segundo a Organização Mundial da Saúde. Nesta tabela, apenas os subtipos de Gliomas difusos ou malignos são abordados, excluindo a caracterização dos Gliomas de grau I ou benignos. Ilustração retirada do trabalho “*Beyond the World Health Organization grading of infiltrating Gliomas: advances in the molecular genetics of Glioma classification*” publicado em 2015, na revista *Annals of Translational Medicine* (Vigneswaran *et al.*, 2015).

1.3.2.3 OUTRAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS E MOLECULARES NA CLASSIFICAÇÃO DOS GLIOMAS

Apesar dos dois níveis de estratificação detalhados anteriormente, uma enorme variabilidade de respostas a terapias continuou sendo constatada no tratamento de Gliomas. Em razão disso, alterações genéticas e moleculares, relacionadas com mutações e expressão gênica, respectivamente, começaram a ganhar espaço na diferenciação dos mais variados subtipos de Glioma. Incluindo estas alterações nas análises dos dados clínicos, muitos resultados interessantes começaram a surgir, revelando uma melhor eficácia dos tratamentos quando um

determinado perfil genético e molecular é identificado. Com o avanço nas técnicas de sequenciamento de nova geração e de análise de expressão gênica em larga escala, uma série de novas informações foram surgindo e elucidando inúmeras discrepâncias moleculares dentro de um mesmo subtipo tumoral. Por esta razão, algumas alterações mais determinantes passaram a ser consideradas como critérios de seleção para classificar os Gliomas. Dentre elas, estão as alterações no gene da isocitrato desidrogenase (IDH), a co-deleção dos braços cromossômicos 1p e 19q, o status de expressão da enzima *O*⁶-metilguanina DNA metiltransferase (MGMT), dentre outras.

1.3.2.3.1 MUTAÇÕES NO GENE DA ISOCITRATO DESIDROGENASE (IDH)

O estado mutacional do gene IDH tem sido amplamente usado como um marcador de prognóstico nos últimos anos e tem resultado na estratificação de dois grupos geneticamente e clinicamente distintos de Gliomas (Appin e Brat, 2014). Pesquisas recentes têm identificado a mutação neste gene como um dos fatores precursores e cruciais na tumorigênese dos Gliomas, seguidos de alterações genéticas que levam a diferenciação entre tumores com características oligodendrogiais ou astrocíticas (Huse *et al.*, 2014).

A mutação deste gene gera um produto chamado 2-hidroxiglutarato (2-HG) que altera o perfil de metilação do DNA, resultando na alteração do tamanho dos telômeros e na expressão gênica. Ainda, a mutação deste gene provoca a redução dos níveis citoplasmáticos de alfa-cetoglutarato e NADPH que podem,

por sua vez, estabilizar o fator de transcrição induzido por hipóxia 1-alfa (*Hypoxia Inducible factor 1-alfa* (HIF1-A)), permitindo a adaptação metabólica das células tumorais a ambientes de hipóxia e privação de nutrientes, facilitando a proliferação celular (Thompson, 2009; Jansen *et al.*, 2010; Kloosterhof *et al.*, 2011).

Controversamente, os Gliomas mutantes para o gene IDH possuem um comportamento menos agressivo e um melhor prognóstico, quando comparado com os tumores com IDH íntegro, independentemente do seu grau e de outras variáveis, servindo, assim, como um fator prognóstico totalmente independente (Yan *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2014). Ainda, a presença de IDH íntegro pode representar um dos fatores aceleradores da progressão tumoral para os graus mais elevados (Theeler *et al.*, 2012) e, uma vez mantido na sua forma funcional, principalmente nos graus III e IV, resulta na aquisição de outras anormalidades citogenéticas como a amplificação do gene EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) e deleção do gene da PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*). O primeiro é um gene que codifica um receptor transmembrana envolvido na ativação das vias de sinalização de proliferação celular e o segundo codifica uma proteína que regula negativamente a via de sinalização da AKT/PKB, uma via também envolvida na proliferação celular (Guan *et al.*, 2014; Neill e Fisher, 2014). Estas duas aberrações citogenéticas são resultantes do ganho do cromossomo 7 e a perda do 10, respectivamente, como um dos fatores determinantes na progressão do grau III para o grau IV, como previamente descrito. Com isso, a presença de mutações em IDH é associada a um valor preditivo positivo para uma melhor sobrevida total e uma melhor sobrevida livre de progressão da doença

(Zou *et al.*, 2013). Este gene encontra-se mutado em 12% dos GBMs (Louis *et al.*, 2007) e em cerca de 70% dos Gliomas de grau II e III (Kurian *et al.*, 2013).

Portanto, o uso deste marcador prognóstico tem colaborado para constatar a eficácia de novas estratégias terapêuticas e seu status parece ser determinante na escolha do tratamento mais adequado para cada paciente.

1.3.2.3.2 CO-DELEÇÃO DOS BRAÇOS CROMOSSÔMICOS 1p E 19q

A completa perda do braço curto do cromossomo 1, simultaneamente à perda do braço longo do cromossomo 19, constitui um fator prognóstico impactante na classificação dos Gliomas. A co-deleção destas duas porções cromossômicas é vista em cerca de 90% dos oligodendrogliomas (Weller *et al.*, 2013). A perda de 1p e 19q representa um mecanismo de inativação dos genes CIC e FUBP1, os quais constantemente aparecem mutados, simultaneamente, com IDH. Deste modo, associado à classificação histológica, a co-deleção de 1p e 19q e a mutação em IDH podem ser usadas como um fator confirmatório da definição do perfil de oligodendrogliomas (Jiang *et al.*, 2013).

Tumores histologicamente classificados como oligodendrogliomas e que carregam esta co-deleção tendem a responder melhor a quimioterapia (Boots-Sprenger *et al.*, 2013), possuem um melhor prognóstico em Gliomas

de baixo grau e apresentam melhores resultados em terapias associativas de radiação e quimioterápicos (Masui *et al.*, 2012; Weller *et al.*, 2013).

1.3.2.3.3 STATUS DE O⁶-METILGUANINA-DNA METILTRANSFERASE (MGMT)

Esta enzima de reparo ao DNA é considerada um dos fatores-chave para avaliação prognóstica dos efeitos quimioterápicos em Gliomas dos mais diversos graus. Devido a sua grande importância, uma sessão inteiramente exclusiva será dedicada para abordarmos suas principais características, mecanismos de ação e suas influências no tratamento e na manutenção de células resistentes em Gliomas. Entretanto, considerando sua importância na estratificação dos variados tipos de Glioma, temos que abordá-la previamente nesta sessão das classificações moleculares dos Gliomas.

Adiantando algumas informações a respeito da MGMT, esta enzima é responsável pelo reparo de um dos danos gerados pelo tratamento com Temozolomida em Gliomas e por esta razão, sua presença na forma íntegra e funcional é considerada um fator de prognóstico negativo no tratamento de Gliomas com agentes alquilantes. Um estudo mostrou que a metilação do promotor de MGMT foi encontrado em 36% dos Gliomas estudados, resultando no silenciamento do gene (Hegi *et al.*, 2005). Com isso, os danos induzidos por TMZ ou qualquer outro agente alquilante no DNA das células tumorais são mantidos, aumentando a responsividade das células tumorais aos quimioterápicos. Por este motivo, inúmeros ensaios clínicos apontam a metilação

do promotor de MGMT como um marcador prognóstico associado à maior sobrevida dos pacientes (Hegi *et al.*, 2005; Weller *et al.*, 2010; Bady *et al.*, 2012).

Portanto, este conjunto de características moleculares incluindo o perfil genético de IDH, a deleção dos braços curtos do cromossomo 1 e do braço longo do cromossomo 19 e o status de expressão de MGMT, além das alterações secundárias induzidas por estes, são determinantes para uma melhor estratificação principalmente dos Gliomas de grau II e III e também para avaliar a suas progressões até o grau mais agressivo (grau IV). A seguir, veremos o conjunto das principais alterações moleculares que caracterizam o subtipo mais agressivo e objeto do presente trabalho, o Glioblastoma, e como que elas influenciam na resposta aos tratamentos quimioterápicos.

1.3.2.4 PRINCIPAIS ALTERAÇÕES GENÉTICAS PRESENTES NOS GLIOBLASTOMAS (GLIOMA GRAU IV)

Existe um esforço tremendo na tentativa de melhor caracterizar este subtipo tumoral de Gliomas, uma vez que são considerados um dos mais agressivos e malignos, dentre todos os tipos de cânceres. Ao longo do tempo, inúmeros trabalhos vêm trazendo colaborações importantes para identificar as principais alterações genéticas envolvidas na origem deste subtipo mais maligno e na sua irresponsividade aos mais diversos tipos de tratamentos. Como vimos anteriormente na caracterização dos Gliomas de menor grau, os primeiros fatores associados com a malignização e transformação para o grau IV foram a amplificação do gene do receptor de crescimento epidermal (EGFR) (Libermann

et al., 1985) e a perda do gene supressor tumorais PTEN (Li *et al.*, 1997), resultantes das aberrações citogenéticas de ganho do cromossomo 7 e perda do cromossomo 10, respectivamente. Além disso, a constatação da presença de uma ou das duas alterações é usada como fator diagnóstico do grau tumoral e como fator associado à presença de IDH íntegro (Hirose *et al.*, 2013), uma vez que correta funcionalidade deste gene é associada à obtenção das aberrações citogenéticas nos cromossomos 7 e 10, como previamente descrito. Outras importantes alterações genéticas foram amplamente identificadas em amostras de GBM, como a perda da completa funcionalidade do fator de transcrição p53, resultante de mutações em diversos pontos específicos do seu gene (TP53) (James *et al.*, 1989), a deleção do gene de p16, localizado no cromossomo 19 (Van Meir *et al.*, 2010) e a mutação de IDH1 (Smeitink, 2010). Entretanto, mesmo com a identificação e a aplicação destas alterações características dos GBMs como novos requisitos de estratificação deste subtipo tumoral, uma ampla variabilidade de resposta a terapias ainda era constatada e nenhuma melhora na sobrevida dos pacientes havia sido conquistada, utilizando estes quesitos de classificação. Em razão disso, uma caracterização mais minuciosa se fazia necessária, na tentativa de estabelecer um perfil molecular mais amplo para classificar os GBMs.

The Cancer Genome Atlas (TCGA) é um projeto iniciado em 2005 que, através de tecnologias de sequenciamento em larga escala e de análises de genomas, tem como principal objetivo mapear toda e qualquer alteração genética presente em células tumorais. Este é um projeto permanente, coordenado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH - *National Institute of*

Health) em parceria com o Instituto Nacional do Câncer (NCI – *National Cancer Institute*) e com o Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano (NHGRI – *National Human Genome Research Institute*) do mesmo país. Em virtude da alta malignidade e a ausência de avanços no desenvolvimento de tratamentos, os GBMs foram um dos primeiros alvos oncológicos escolhidos pelos coordenadores do projeto para serem mapeados, em busca de respostas em relação a sua oncogênese, malignidade e resistência. E foi graças aos avanços obtidos através deste enorme projeto que se descobriu as três principais vias de sinalização alteradas em GBMs, independente se sua malignização foi obtida *de novo* ou através da progressão de graus menores, explicando a biologia tumoral de mais de 90% destes tumores: a via da RTK-RAS-MAPK-PI3KA, a via da p53 e a via da RB (Cancer Genome Atlas Research, 2008). Falaremos brevemente dos componentes de cada uma delas, do seu funcionamento normal e alterado e da frequência de alterações ocorridas em cada uma delas.

1.3.2.4.1 Via da RTK-RAS-MAPK-PI3KA

Esta via de sinalização é responsável por regular diversos mecanismos celulares como proliferação celular, apoptose, invasão e mobilidade celular, que podem ser críticas e determinantes no processo da tumorigênese. Esta via está sob o controle de uma série de fatores de crescimento, como o *Epidermal Growth Factor* (EGF) e o *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), em conjunto com seus respectivos receptores EGFR E PDGFR chamados de receptores tirosina cinase (*Tyrosine Kinase Receptor* – TKR), localizados na superfície da célula. Uma vez

que estes fatores se ligam em seus receptores, estes recrutam a proteína fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) para a membrana celular que é responsável pela transferência de uma molécula de fosfato para o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (IP2), transformando-o em fosfatidilinositol trifosfato (PIP3). Esta molécula trifosfatada é responsável pela ativação direta e indireta das vias da AKT e da via de mTOR, respectivamente, que regulam principalmente mecanismos de sobrevivência e proliferação celular (Ohgaki e Kleihues, 2007). Outro componente crucial para o funcionamento desta via é a proteína PTEN, uma fosfatase que tem como principal função a defosforilação de PIP3, modulando negativamente a via da AKT/PKB (Li *et al.*, 1997).

As principais alterações nesta via de sinalização estão ligadas a ativação constitutiva desta via, independente da presença dos fatores de crescimento. Um estudo mostra que cerca de dois terços dos GBM primários e cerca de um terço dos secundários apresentam alterações em, pelo menos, um integrante desta via de sinalização (Kita *et al.*, 2007). Isso pode ocorrer através da superexpressão dos ligantes pelas próprias células tumorais, resultando em um processo de retroalimentação positiva, ou pela superexpressão dos receptores tirosina cinase. Pode ocorrer, ainda, a mutação dos receptores TKR em regiões cruciais para a transdução do sinal externo para o interior da célula, tornando-os constitutivamente ativos, mesmo na ausência do ligante (Van Meir *et al.*, 2010). Outra alteração normalmente encontrada em GBM é a ativação constitutiva de transdutores de sinais desta cascata de sinalização através de mutações ou a perda de função de proteínas que regulam negativamente a ativação desta via, como é o caso da proteína PTEN (Wang *et al.*, 1997), anteriormente citada.

Alterações em EGFR acometem cerca de 40% dos GBM, sendo a amplificação do gene a alteração mais comum. Ainda, GBM primários apresentam mais este tipo de alteração do que os GBM provenientes da malignização de graus menores (Ohgaki e Kleihues, 2007). Já a deleção de PTEN é vista em quase 80% dos GBMs (Vigneswaran *et al.*, 2015) e quase que exclusivamente em GBMs primários (Tohma *et al.*, 1998), evidenciando que mutações neste gene, assim como em EGFR, são muito importantes no processo de malignização de novo em Gliomas.

1.3.2.4.2 VIA DA PROTEÍNA p53

A via da p53 é uma das vias de sinalização que se encontra mais mutadas durante o processo de tumorigênese dos cânceres. A proteína p53 é um dos mais conhecidos supressores tumorais que responde aos danos no DNA e a diversos estresses genotóxicos e citotóxicos, induzindo, principalmente parada no ciclo celular e apoptose, mas também modulando mecanismos como senescência celular, reparo do DNA, diferenciação celular, neovascularização, dentre outros (Bogler *et al.*, 1995; Agarwal *et al.*, 1998; Higashimoto *et al.*, 2000; Rich e Bigner, 2004; Carnero *et al.*, 2008). Esta proteína é um importante fator de transcrição que regula a expressão de mais de 2.500 genes, onde grande parte deles está envolvida nos processos de tumorigênese, progressão tumoral e invasão tumoral (Huang *et al.*, 2007; Huse e Holland, 2010).

A p53 é uma proteína que possui um tempo de meia vida bastante curto e, em situações de homeostase celular, ela é mantida em baixos níveis proteicos,

em razão de um constante processo de síntese e degradação. Quando a célula sofre algum tipo de estresse como, por exemplo, algum dano ao DNA, os mecanismos de poliubiquitinação e consequente degradação desta proteína são inibidos, gerando um acúmulo de p53 na célula. Em seguida, ocorre a translocação desta proteína para o núcleo, onde atuará como fator de transcrição de inúmeros genes que expressam proteínas responsáveis pelo restabelecimento da homeostase celular ou eliminação desta, caso os danos sejam irreparáveis (Riley *et al.*, 2008). Ainda no núcleo, esta proteína atua como repressora da expressão de uma série de outros genes, através da sua ligação em sítios específicos contidos na região reguladora destes genes chamados RE (*responsive elements*), com o mesmo objetivo de restabelecer a homeostase celular (Bourdon *et al.*, 1997). Outras funções ainda são atribuídas a esta proteína, independentemente da sua atividade como fator de transcrição, incluindo a sinalização para realocação de receptores de morte celular do golgi para a superfície celular (Bennett *et al.*, 1998) e a interação direta com membros indutores de apoptose da família BCL-2, como a proteína BAX, influenciando no desencadeamento da via intrínseca, ou via mitocondrial, da apoptose (Chipuk *et al.*, 2004).

Na modulação do processo de progressão do ciclo celular, o mais bem caracterizado alvo transcricional de p53 é o gene CDKN1A, o qual codifica a proteína inibidora de cinase dependente de ciclina (CKI), chamada p21 (El-Deiry *et al.*, 1993). Quando um estresse genotóxico é gerado, causado normalmente por quebras na molécula de DNA ou mau pareamento de bases, cinases de reconhecimento do dano, como ATM e ATR, são ativadas e desencadeiam a via

ATM/ATR – Chk1/2 – p53. Então, p53 é ativado, através de um perfil fosforilativo específico provocado por Chk1/2, que faz com que esta ative a expressão de p21 que, por sua vez, inibirá os complexos proteicos formados por ciclinas e cinases dependentes de ciclinas, mais especificamente CDK4/ciclina D1 e CDK2/ciclina E, impedindo que estes complexos fosforilem a proteína do Retinoblastoma (Rb). Em um estado hipofosforilado, a proteína Rb mantém-se acoplada à proteína E2F, impedindo que esta atue como fator de transcrição de proteínas fundamentais para a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular, resultando em uma parada na progressão do ciclo celular, fornecendo tempo para que os danos no material genético sejam corrigidos e não se acumulem, o que, potencialmente, resultaria em um processo oncogênico. Esta parada é mantida até que o sinal de estresse seja cessado (Pellegata *et al.*, 1996; Lakin e Jackson, 1999).

Entretanto, a manutenção do sinal de estresse genotóxico é interpretada como uma incapacidade da célula de corrigir o dano causador deste sinal. Isto provoca um perfil fosforilativo em p53 distinto do anterior causado por uma série de cinases sinalizadoras da manutenção do dano no DNA, que faz com que p53 desencadeie a ativação de outros mecanismos de resposta ao estresse genotóxicos, como a apoptose e a senescência. A ativação do processo da apoptose está diretamente ligada à indução da expressão de receptores de morte celular, como Fas/CD95, DR4 e DR5 (Wu *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005), e da modulação positiva de genes da família BCL-2, tais como Bax, Puma, Noxa e Bid, os quais são direta ou indiretamente responsáveis pela permeabilização da membrana das mitocôndrias (Nakajima e Tanaka, 2007), resultando na liberação de fatores cruciais para o desencadeamento do processo

apoptótico como o citocromo C e APAF-1 (Kannan *et al.*, 2001; Tobiume, 2005). Outra forma de modulação da apoptose provocada por p53 é através da modulação negativa de genes que transcrevem proteínas que inibem o processo apoptótico, como a proteína survivina, que é responsável pelo bloqueio da ativação da enzima proteolítica pró-caspase 3, na sua forma ativada caspase-3 (Fischer *et al.*, 2015).

Outro fator importante desta via é a proteína MDM-2 que é alvo transcrricional positivo de p53 e tem como principal função regular os níveis da própria p53 (Kubbutat *et al.*, 1997) e sua atividade transcrricional (Chen *et al.*, 1995). Atuando como um importante modulador negativo desta via, MDM-2 inibe a atividade transcrricional de p53 ligando-se diretamente em um domínio localizado na porção N-terminal da proteína chamado de domínio de transativação (*TAD domain*), impedindo sua interação direta com o DNA (Momand *et al.*, 1992). Além disso, MDM-2 atua como uma E3 ubiquitina ligase, transferindo diversas moléculas de ubiquitina para resíduos de lisina localizados na porção C-terminal de p53, mais especificamente em uma região chamada de sitio de poliubiquitinação. O acúmulo de moléculas de ubiquitina na região C-terminal de p53 configura um sinal de degradação via proteassoma, causando uma redução nos níveis de p53 no citoplasma (Haupt *et al.*, 1997). Sendo assim, o aumento nos níveis de p53 gera um sistema de retroalimentação negativa proteassoma-dependente através da proteína MDM-2, uma vez que o acúmulo de p53 aumenta os níveis da proteína MDM-2, que provoca a modulação negativa de p53 através da sua poliubiquitinação e posterior degradação via proteassoma, na ausência de estímulos estabilizantes de p53 (Picksley e Lane, 1993; Zauberman *et al.*, 1995).

Um destes estímulos estabilizantes de p53 se dá pela ação de outro modulador desta via de sinalização, que é a proteína p14ARF. Codificada por um processo alternativo do mesmo gene que transcreve a proteína p16, chamado CDKN2A. Esta proteína também é caracterizada como uma supressora tumoral, uma vez que é responsável pelo bloqueio das funções inibitórias de MDM-2. P14ARF liga-se diretamente a MDM-2 e bloqueia suas ações, tanto de interrupção física da atividade transcricional de p53, quanto da poliubiquitinação de p53 para sua posterior degradação (Stott *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998). Já p16INK4a é responsável principalmente pela modulação negativa e direta da atividade de CDK4 e CDK6, impedindo a progressão no ciclo celular (Pomerantz *et al.*, 1998).

Alterações em p53 são encontradas em aproximadamente 50% das neoplasias humanas e representam um fator fundamental na tumorigênese e, principalmente, na progressão tumoral de Gliomas (Royds e Iacopetta, 2006; Sauvageot *et al.*, 2007). Cerca de 35% dos GBMs apresentam p53 deletada em homozigose, através da perda do braço curto do cromossomo 17, onde o seu gene está localizado. Nos casos de alterações genéticas que levam a perda de funcionalidade da proteína, 90% delas ocorrem no sítio de ligação ao DNA. Entretanto, cerca de 70% dos GBMs expressam p53 na sua forma íntegra e funcional. Nestes casos, o correto funcionamento da via da p53 é afetado por alterações em outros componentes como MDM-2 e p14ARF (Van Meir *et al.*, 2010).

1.3.2.4.3 VIA DA PROTEÍNA DO RETINOBLASTOMA (RB)

A via da proteína do Retinoblastoma (pRb), como é conhecida, tem como seus integrantes-chave a própria proteína Rb, a proteína cinase dependente de ciclina 4 (CDK4), a ciclina D1, P16INK4A e o fator de transcrição E2F (Ohgaki e Kleihues, 2009). Através da interação entre estes integrantes, esta via tem como função principal a regulação direta da etapa inicial do ciclo celular, mecanismo responsável pela proliferação celular. Estudos mostram que esta via também está envolvida na indução do processo de morte celular por apoptose (Wu e Levine, 1994; Nevins, 2001).

Codificada pelo gene RB, a proteína supressora tumoral do retinoblastoma (pRB) desempenha um papel fundamental na regulação do mecanismo de progressão do ciclo celular. Nas células não proliferativas, pRB encontra-se num estado hipofosforilado e diretamente associado com o fator de transcrição E2F, impedindo que esta proteína seja translocada para o núcleo e desempenhe sua função transcricional. O estímulo proliferativo é o sinal para a formação do complexo ciclina D/CDK4 CDK6, que transferem grupamentos fosfatos para a proteína Rb em resíduos de aminoácidos específicos, através da atividade cinásica das CDKs, tornando-a hiperfosforilada. Esta hiperfosforilação de pRB ainda é completada por um segundo complexo protéico formado pelas proteínas ciclina E e CDK2. Este estado hiperfosforilado de pRB provoca um impedimento alostérico de manutenção da interação com o fator de transcrição E2F, em razão das alterações de conformação e carga provocadas pela presença de inúmeros resíduos de fosfatos na sua estrutura. Com isso, ocorre o desacoplamento de pRb do fator de transcrição E2F, possibilitando que esta transcreva os genes

envolvidos principalmente na síntese de DNA, permitindo que haja a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Nevins, 2001; Sanson *et al.*, 2004; Maher *et al.*, 2006).

Codificada pelo gene INK4A, a proteína supressora tumoral p16INK4A, também conhecida como proteína inibidora de cinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A) é um dos principais elementos desta via, pois regula negativamente a progressão do ciclo celular. Sua atuação ocorre através da interação direta com a proteína CDK4, impedindo alostericamente a sua interação com ciclina D, impedindo a formação do complexo ciclina D/CDK4/6. Como resultado, não há a hiperfosforilação da proteína Rb e o complexo Rb/E2F é mantido, impedindo a transcrição de genes envolvidos na progressão do ciclo celular de G1 para a fase S, mantendo a célula em um estado não-proliferativo ou quiescente (Sherr e Roberts, 1999; Ohtani *et al.*, 2004; Sanson *et al.*, 2004).

Alterações no gene da RB estão fortemente envolvidas com a malignização de astrocitomas e estão presentes em 20% dos Gliomas de alto grau (James *et al.*, 1988; Henson *et al.*, 1994). Assim como a perda completa da expressão de RB é amplamente vista em GBMs, em maior frequência em primários (43%) do que secundários (14%) (Nakamura *et al.*, 2001). Além disso, a amplificação gênica das CDKs está presente em cerca de 15% dos Gliomas de alto grau e da inativação das proteínas inibidoras de cinases dependentes de ciclinas (CKIs) também são geralmente encontradas em GBMS (Lam *et al.*, 2000). P16INK4A encontra-se inativado em cerca de 90% dos GBMs (Olopade *et al.*, 1992). Sendo assim, todas as alterações presentes na via de RB causam um descontrole funcional da etapa de iniciação do processo de proliferação celular, podendo

resultar na ausência de controle negativo de indução da via, na intensificação do sinal proliferativo ou até mesmo na ativação constitutiva do ciclo celular. Um estudo mostrou que em 78% dos casos de GBMs havia a presença de pelo menos uma alteração nesta via, evidenciando a sua importância no processo de tumorigênese e progressão tumoral (Cancer Genome Atlas Research, 2008).

De uma maneira geral, dentre as 3 vias de sinalização apresentadas, a via da RB desempenha a função mais efetora na regulação do mecanismo do ciclo celular, responsável pelo controle da proliferação das células e é através dos integrantes desta via que as demais vias se interligam (**Figura 3**). Alterações nas vias das RTKs e na via de p53 irão modular diretamente o funcionamento da via da RB. Sendo assim, a taxa de alterações genéticas médias encontradas em GBMs que influenciam diretamente no funcionamento da via de RB é: cerca de 36% no receptor de EGF, 14% em CDK4 e 46% no locus CDKN2A/CDKN2B, responsável pela expressão das proteínas p16 e p15, respectivamente (Rao *et al.*, 2010).

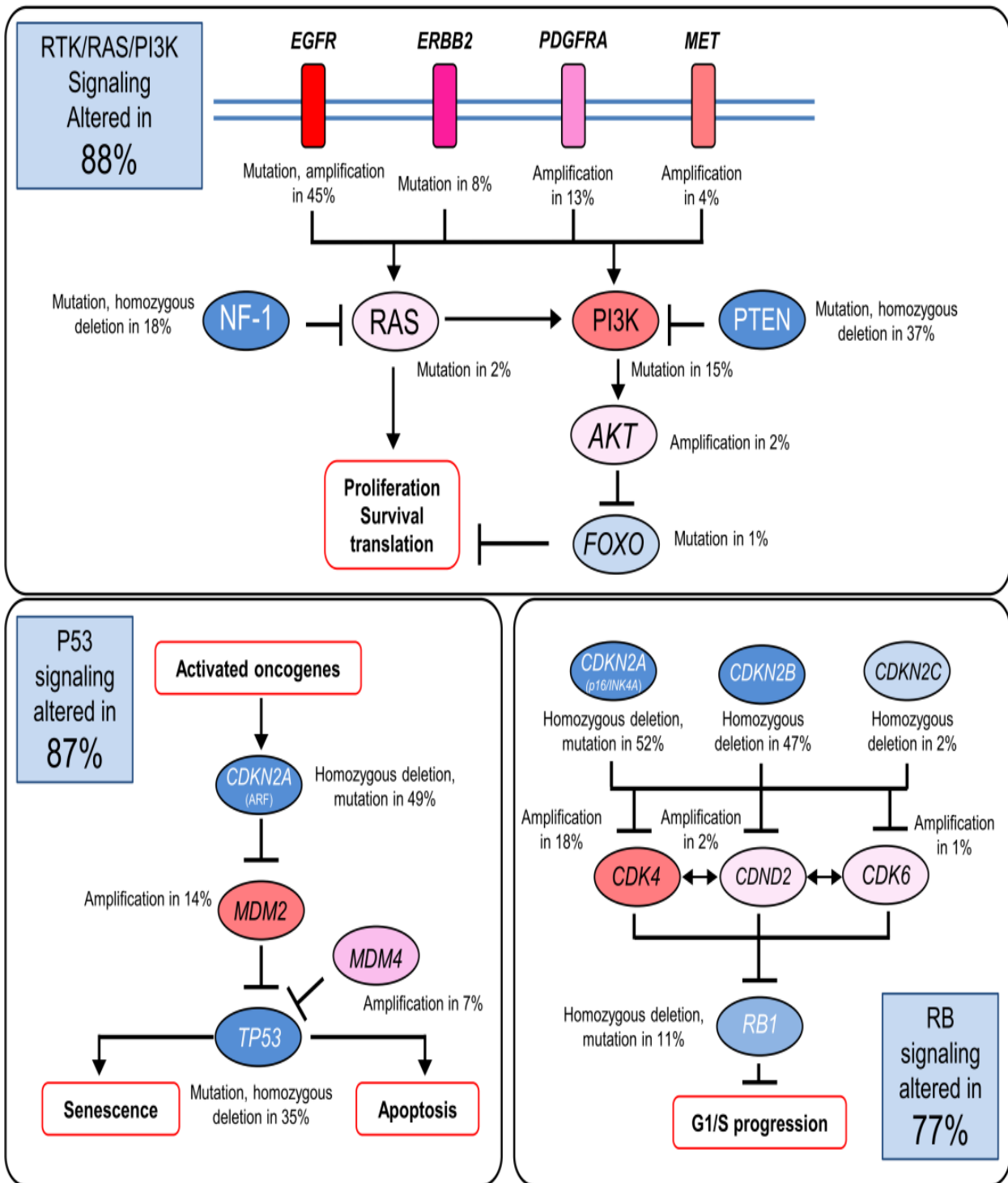


Figura 3 – Alterações genéticas em GBMs ocorrem frequentemente em três principais vias de sinalização. Alterações encontradas na via das RTK, na via da p53 ou na via da proteína RB explicam mais de 90% dos casos da tumorigênese e progressão tumoral dos GBMs. Ilustração retirada do capítulo 19 “Chemotherapeutic Agent from Glioma” de autoria de Shinji Kohsaka e Shinaya Tanaka, publicado no livro “Clinical Management and Evolving Novel Therapeutic Strategies for Patients with Brain Tumors” em 2013 (Kohsaka e Tanaka, 2013)

1.3.2.5 UM NOVO SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO DOS GLIOBLASTOMAS

Com base nas primeiras alterações genéticas amplamente associadas ao grau IV dos Gliomas, como é o caso de EGFR (Hayashi *et al.*, 1997), desde 2003, muitos trabalhos têm surgido, tentando associar o perfil de expressão gênica de uma ou de um pequeno grupo destas alterações aos dados de sobrevida dos pacientes ou ao seu perfil de resposta à terapias, a fim de caracterizar um novo subtipo tumoral dentro do grupo dos GBMs que seja mais ou menos susceptível a determinado tratamento (Mischel *et al.*, 2003).

De certa forma, a intenção de estratificar os GBMs em subgrupos de tumores com características mais definidas era extremamente válida e considerável. Entretanto, a quantidade de amostras possíveis de serem analisadas com as tecnologias da época não fornecia um grau de confiança suficiente para realizar estes tipos de associações. Além disso, o número de alterações que era investigado para a subdivisão dos GBMs em subtipos mais homogêneos era extremamente baixo, levando em consideração a heterogeneidade genética deste tipo tumoral. Até que, em 2005, com o surgimento do projeto TCGA, houve um acréscimo gigantesco de informações em relação ao perfil genético alterado dos GBMs, tanto no número de amostras analisadas, quanto no número de alterações genéticas catalogadas. Então, em 2006 surge o primeiro trabalho trazendo um esboço do que seria a nova estratificação dos Gliomas de alto grau (grau III e IV), levando em consideração

não só as características moleculares, mas também a idade e o quadro clínico dos pacientes e a resposta à terapia de cada um dos tumores analisados, classificando-os em proneural, proliferativo e mesenquimal (Phillips *et al.*, 2006). Mais tarde, em 2010, surge uma nova versão deste sistema de classificação, utilizando um conjunto de amostras diferentes e uma metodologia diferente de análise que estratificou os GBMs em 4 subtipos, levando em consideração, principalmente o perfil de PDGFRA, IDH, EGFR e NF1: proneural, neural, clássico e mesenquimal (Verhaak *et al.*, 2010). No ano seguinte, Huse e colaboradores analisaram os trabalhos de 2006 (Phillips *et al.*) e o de 2010 (Verhaak *et al.*) e, através de um estudo de validação cruzada, mostrou que apenas as assinaturas dos subgrupos proneural e mesenquimal eram concordantes dos dois estudos e sugeriu, portanto, uma terceira classificação, subdividindo os GBMs apenas em proneural, mesenquimal e outros, tornando-se uma classificação de consenso geral (Huse *et al.*, 2011).

Assim, o subgrupo proneural representa cerca de 10% de todos os GBMs e é caracterizado como um GBM secundário, apresentando alta expressão de genes envolvidos na neurogênese e está associado a melhores prognóstico clínicos, acometendo, principalmente, pacientes jovens. Molecularmente, 54% das amostras possuem o gene TP53 mutado, a maioria apresenta mutações no gene IDH1 e apenas este subtipo apresenta mutação e expressão anormal de PDGFRA, mas com expressão normal de EGFR/PTEN. Entretanto, curiosamente, pacientes com GBM do subtipo neural que receberam tratamentos altamente agressivos, sobrevivem menos do que os pacientes que não receberam tratamentos agressivos.

Por outro lado, o subgrupo mesenquimal apresenta alta expressão de genes envolvidos na angiogênese, motilidade celular, matriz extracelular e adesão celular. Molecularmente, 37% das ocorrências testadas possuem mutações no gene supressor tumoral NF1 e frequentes mutações em PTEN e p53 são vistas nesse subtipo tumoral. Este subgrupo acomete principalmente pessoas idosas e está associado a um pior prognóstico clínico, porém pacientes que recebem tratamentos altamente agressivos aumentam significativamente sua sobrevida. Os outros dois subtipos da estratificação de *Verhaak e col.*, o neural e o clássico, constituem a maioria dos GBMs e estão associados com a perda de PTEN e amplificação de EGFR.

Sendo assim, apesar das inúmeras etapas de estratificação mostradas nesta sessão, pouco foi transformado em avanços terapêuticos para os pacientes o número de ocorrências e de mortes causadas pelo subtipo mais agressivo de Glioma ainda permanece alto, como veremos na sessão a seguir.

1.3.3 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS GLIOMAS

De acordo com os últimos dados publicados pelo *The Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS)*, os quais foram reunidos no artigo científico denominado “*CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012*” de autoria de *Quinn T. Ostrom e col.*, publicado na revista *Neuro Oncology* em 2015 (*Ostrom et al., 2015*):

> Nos Estados Unidos, o GBM é o terceiro tipo tumoral mais comum do SNC e o mais frequente dentre os tumores malignos, representando cerca de 81% dentre todos os tumores diagnosticados.

> Dentre os tumores primários, os GBMs representam 15,1% de todos os tumores diagnosticados do SNC e 46,1% dentre os tumores primários malignos.

> Cerca de 22 mil novos casos de Gliomas foram registrados nos anos de 2011 e 2012, nos EUA.

> Cerca de 12 mil novos casos de GBM para o ano de 2015 e mais 12 mil para o ano de 2016 foram previstos nos EUA, sendo, de forma avassaladora, o tumor do SNC com maior número de casos previstos dentre todos os tumores malignos (~60% dos tumores malignos diagnosticados nos anos de 2015 e 2016 serão GBMs). Curiosamente, a segunda maior previsão dentre os tumores malignos é de 1300 casos de Gliomas malignos de classificação indefinida para cada um dos anos, representando cerca de 6% dos Gliomas malignos previstos.

> Dentre todos os tumores do SNC, os GBMs são pouco frequentes em crianças até 14 anos (menos de 4%), mas altamente frequentes em adultos com mais de 40 anos (66%), onde a incidência aumenta com a idade, apresentando altas taxas na faixa dos 75 a 84 anos (dados ajustados à incidência de tumores cerebrais diagnosticados em cada faixa etária).

> GBMs são 1,6 vezes mais frequentes em homens do que mulheres e cerca de 2 vezes mais frequentes em brancos do que negros.

> Em relação ao tempo de vida dos pacientes, os GBMs possuem uma taxa de sobrevida maior que 1 ano de 37,2%, maior que 2 anos de 15,2% e maior que 5 anos de 5,1% dos casos apenas, chegando a 2,6% para uma sobrevida acima de 10 anos (porcentagens obtidas a partir da análise de mais de 33 mil casos de GBM registrados entre os anos de 1995 até 2012). Quando a amostra de pacientes é estratificada de acordo com a idade, as taxas de sobrevida média se elevam consideravelmente, quando o diagnóstico do câncer é feito em indivíduos abaixo dos 45 anos (1 ano = 62,4%; 2 anos = 35,3%; 5 anos = 17,8%; 10 anos = 11,7%).

No Brasil, os GBMs não configuram entre os tipos de cânceres mais prevalentes e a falta de dados não permite que seja feita uma análise epidemiológica mais apurada. Segundo o documento *“Incidência de câncer no Brasil: Estimativa para 2016”* divulgado na página eletrônica do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (www.inca.gov.br), uma avaliação preditiva da incidência única para todos os cânceres do sistema nervoso central para o ano de 2016, aponta para 5,5 novos casos para homens e 4,68 novos casos para mulheres, a cada 100 mil habitantes, correspondendo a 1,85% e 1,6% de todos os cânceres esperados para ambos os sexos no ano de 2016, respectivamente (dados disponíveis no site www.inca.gov.br/estimativa/2016). Ainda, dados estimados apontam São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná como os estados com maior incidência prevista de diagnóstico de câncer no SNC no ano de 2016 (22,2%, 11,4% e 9,9% dos novos casos de cânceres no SNC, respectivamente).

O número de casos de GBM diagnosticados no mundo vem crescendo de maneira alarmante a cada ano, passando de 5,85 novos casos por ano em 1975 para 7,4 novos casos por ano, a cada 100.000 habitantes no ano de 2015. Entretanto, não se sabe se esse dado crescente é resultado de uma maior exposição à fatores de risco para o surgimento da neoplasia ou se é em decorrência do avanço tecnológico que permite cada vez mais precisamente que a doença seja diagnosticada. Independente do motivo pelo qual novos casos são diagnosticados, estes pacientes têm que ser tratados e os elevados custos gastos com o regime terapêutico tradicional para o tratamento deste tipo de neoplasia é extremamente dispendioso. Nos Estados Unidos, estima-se que, antes mesmo do paciente receber o tratamento quimioterápico mais indicado para o seu subtipo tumoral (ou seja, desconsiderando os valores exorbitantes dos inúmeros fármacos disponíveis para o tratamento de câncer) os gastos somente com a cirurgia e o tratamento com radioterapia gire em torno de 50 a 100 mil dólares. O mesmo estudo ainda mostrou que o tratamento com TMZ, o quimioterápico de primeira escolha para o tratamento dos GBMs, no seu regime terapêutico tradicional custa em torno de 5 mil dólares. Se este valor for multiplicado pelo acréscimo médio de quatro meses na expectativa de vida após a cirurgia dos pacientes tratados com TMZ, soma-se mais 20 mil dólares por paciente (Dinnes *et al.*, 2001).

Portanto, através deste e de inúmeros outros estudos que avaliam a epidemiologia crescente dos tumores do SNC e que avaliam os gastos resultantes do tratamento de pacientes acometido por GBM em qualquer parte do mundo, é possível concluir que esta neoplasia é um grande problema de saúde pública e necessita de uma atenção especial de todos os profissionais da saúde, na

tentativa de encontrar respostas, tanto para o aumento constante da incidência, quanto para a irresponsividade aos inúmeros tratamentos aos quais são submetidos.

1.3.4 TRATAMENTO DE GLIOBLASTOMA (GBM)

O tratamento de GBM, e dos demais subtipos de Gliomas, consiste em uma das mais delicadas terapias das mais variadas neoplasias existentes, pois implica na interferência da estrutura parenquimal de um dos tecidos mais importantes e frágeis do corpo humano, que é o tecido do sistema nervoso central (SNC). Além disso, lembrando das características mais comuns dos GBMs, estes tumores são extremamente infiltrativos e isso configura um grave problema para que haja a completa remoção desta massa tumoral através de procedimento cirúrgico. Então, estratégias adjuvantes são utilizadas para garantir a melhor eficácia na eliminação da massa tumoral, como a utilização de radiação focalizada na área tumoral e a utilização de tratamentos farmacológicos com potencial antitumoral, afetando as células remanescentes aos processos precedentes. Com isso, configura-se como estratégia terapêutica padrão dos Gliomas, a ressecção cirúrgica, seguida de radioterapia e quimioterapia. A seguir, trataremos cada um dos componentes deste tripé terapêutico.

1.3.4.1 RESSECÇÃO CIRÚRGICA DE GLIOBLASTOMAS

A utilização de processos cirúrgicos como a primeira abordagem terapêutica para o tratamento de GBM e dos demais tipos de Glioma é acompanhada de inúmeras ressalvas, uma vez que se trata de um procedimento extremamente agressivo, que pode causar danos irreparáveis ao paciente. Sendo assim, considerações como o grau de infiltratividade tumoral, a região na qual a massa tumoral se encontra, extensão da área afetada e idade do paciente são alguns pontos que devem ser levados em consideração para decidir sobre a possibilidade de realizar, ou não, esse tipo de abordagem. Recentes dados clínicos têm demonstrado a importância de uma ressecção cirúrgica altamente agressiva no tratamento de qualquer tipo de Glioma. Especificamente falando dos GBMs, viu-se que o aumento no volume da extensão de ressecção do tecido acometido implicou diretamente no aumento da sobrevida dos pacientes (Keles *et al.*, 1999; Lacroix *et al.*, 2001; Stummer *et al.*, 2006; Sanai *et al.*, 2011). Com isso, o primeiro objetivo da cirurgia de GBMs é ressecar o maior volume possível, reduzindo a morbidade do paciente.

Graças aos avanços tecnológicos, hoje em dia é possível realizar um mapeamento completo das regiões cerebrais para que nenhuma função primordial do paciente seja afetada pela ressecção cirúrgica. Magnetoencefalografia, mapeamento cerebral por ressonância magnética nuclear, estimulação magnética transcranial e estimulação cortical direta são alguns dos exames usados para estipular a correta e precisa localização da massa tumoral e, também, para avaliar a possibilidade de realização do processo cirúrgico.

Sendo assim, é fundamental que haja uma avaliação minuciosa da possibilidade de ressecção cirúrgica da massa tumoral, abrangendo a maior área

possível, considerando seus benefícios na sobrevida dos pacientes. Entretanto, o planejamento deste procedimento deve ser realizado com cautela para que não seja afetada nenhuma região vital e que o paciente possa ter uma vida minimamente confortável após a cirurgia.

1.3.4.2 RADIOTERAPIA (RT) EM GLIOBLASTOMA

A radioterapia tem sido usada como procedimento adjuvante padrão no tratamento de Glioblastoma e permanece como sendo o principal procedimento a ser escolhido para tratar aqueles GBMs avaliados como irressectáveis. Existem inúmeras evidências na literatura que mostram o benefício da RT como terapia adjuvante à ressecção cirúrgica, à quimioterapia ou, até mesmo, de forma isolada, como primeira linha de tratamento (Walker e Hurwitz, 1970; Walker *et al.*, 1976; Sheline, 1977; Walker *et al.*, 1978).

O primeiro grande estudo que sugeriu vantagens na inclusão da RT pós-cirurgia na sobrevivência de paciente acometidos com Gliomas foi realizado em 1966 pelo Instituto de Neurologia de Montreal, onde os pacientes recebiam uma dose média de 5.000 a 6.000 cGy de RT (Uihlein *et al.*, 1966). A interpretação dos resultados destes e de outros estudos da época era bastante complicada de ser realizada, em razão da natureza não randomizada destas pesquisas, da inconsistência na classificação dos GBMs e da variabilidade de doses de RT usadas nos pacientes. Entretanto, os benefícios na sobrevida de grande parte dos pacientes que recebiam RT pós-cirúrgico era evidente.

Então, na década de 70, o Grupo Cooperativo de Tumores Cerebrais (*Brain Tumor Cooperative Group - BTCCG*) iniciou os primeiros estudos randomizados na tentativa de comprovar os benefícios da RT pós-cirúrgica e incluir esta estratégia adjuvante no regime terapêutico padrão dos GBMs, inclusive usando em adjuvância com quimioterapia (Walker *et al.*, 1976; Walker e Strike, 1976; Walker *et al.*, 1978; Walker *et al.*, 1980). Mais tarde, este mesmo grupo realizou uma série de estudos randomizados e controlados para descobrir os efeitos das mais variadas doses de RT aplicadas no tratamento de Gliomas (Walker *et al.*, 1979) e o tamanho da região em que deveria ser focalizado o tratamento radioterápico. Então se definiu que a maior dose que apresentava resultados significativos na melhora da sobrevida dos pacientes era a dose de 6.000 centigrays (cGy) ou 60 grays (Gy) (Salazar *et al.*, 1979) e a área de aplicação da RT foi determinada como toda a área tumoral e mais 3 cm de margem geométrica ao redor do tumor (Ramsey e Brand, 1973; Schryver *et al.*, 1976), uma vez que um estudo posterior confirmou que, dentre os 35 pacientes de GBM analisados, 90% das recorrências do tumor ocorriam dentro de uma margem de 2 cm do sítio primário (Hochberg e Pruitt, 1980).

Assim, estabeleceram-se todos os padrões para a inclusão da RT como terapia adjuvante à ressecção cirúrgica dos GBMs, comprovando seus benefícios no aumento da sobrevida dos pacientes. Atualmente, o regime estabelecido em guias de práticas clínicas sugere a aplicação de doses diárias de 2 Gy de RT, 5 vezes por semana, até atingir o limite máximo de dosagem estabelecido de 60 Gy (Leibel *et al.*, 1994; Buatti *et al.*, 2008). Estudos mais atuais mostram que o

benefício da inclusão de RT no regime terapêutico dos GBMs é de um aumento de 3 a 12 meses na sobrevida dos pacientes (Stupp *et al.*, 2005).

A responsividade dos GBMs à RT é bastante variável, podendo o tumor entrar em fase de remissão, acompanhada, frequentemente, de uma estabilização ou até mesmo redução dos déficits neurológicos, bem como da redução da massa tumoral. Entretanto, este tempo de remissão é bastante curto, não passando de mais de um ano, onde a doença normalmente recorre, resultando no aparecimento de uma massa tumoral muitas vezes maior que do tumor primário e de uma piora avassaladora do quadro clínico do paciente (Hochberg e Pruitt, 1980; Halperin e Burger, 1985).

1.3.4.3 QUIMIOTERAPIA EM GLIOBLASTOMAS

Embora nenhum regime terapêutico para GBMs, utilizando quimioterapia, tenha alcançado resultados a ponto de diagnosticar a cura da doença, muitos estudos sugerem que mais de 25% dos pacientes tratados com algum tipo de quimioterapia obtém um aumento considerável na sua sobrevida. Um estudo de meta-análise mostrou que 6-10% dos pacientes com GBM aumentam sua sobrevida em mais de um ano, após tratamento quimioterápico (Fine *et al.*, 1993; Stewart, 2002).

Historicamente, poucos quimioterápicos têm surgido como alternativa terapêutica para o tratamento de GBMs. Isso se dá em razão de dois principais motivos: a ineficácia terapêutica apresentada em testes pré-clínicos ou clínicos e

pela incapacidade de muitos quimioterápicos em atravessar a barreira hematoencefálica, tornando extremamente restritas as opções farmacológicas para o tratamento de GBMs. Apesar destas intercorrências, alguns fármacos com ação antitumoral têm sido testados e mostraram resultados positivos na sobrevivência dos pacientes com GBM. Dentre eles, os mais conhecidos e utilizados na clínica são: BCNU, o CCNU e a Temozolomida.

BCNU ou Carmustina é uma nitrosuréia altamente lipossolúvel que possui ação bifuncional, atuando como um agente alquilante ciclo celular inespecífico, induzindo ligações cruzadas nas moléculas de DNA e RNA e inibindo o funcionamento de diversas enzimas através de carbamoilação. O acúmulo destes danos na molécula de DNA desencadeia o processo de morte celular. Aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos para uso em GBMs desde 2002, BCNU é administrado aos pacientes sob a forma de pastilhas (*Gliadel*®), uma matriz biodegradável que é inserida na cavidade cirúrgica para liberação local do fármaco e ação nas possíveis células remanescentes. Entretanto, apenas um modesto aumento na sobrevivência mediana dos pacientes foi observado (em torno de 2 meses) e uma série de efeitos adversos foram associados como, redução do volume de líquido cefalorraquidiano, aumento da pressão intracranial e edema (Westphal *et al.*, 2006; Gutenberg *et al.*, 2013).

Outro quimioterápico usado no tratamento dos GBMs foi a Lomustina ou CCNU. Este fármaco também é uma nitrosuréia com ação semelhante ao BCNU, mas que normalmente é usado como fármaco integrante de um coquetel de quimioterápicos que é composto também por Procarbazina e Vincristina (Shapiro e Young, 1976). Esta terapia combinatória denominada de PCV, em razão das

iniciais dos fármacos que o compõe, foi usado por algum tempo como terapia de escolha para GBMs, mas o grande número de efeitos adversos fez com que caísse em desuso (Postma *et al.*, 1998) e, hoje em dia, estudos avaliam seu potencial contra GBMs recorrentes do tratamento com Temozolomida e sugerem o seu uso apenas no caso de ausência de outras alternativas (Boiardi, 2001; Schmidt *et al.*, 2006; Kuhnhenh *et al.*, 2012).

Atualmente, o quimioterápico de escolha para o tratamento de GBMs é a Temozolomida. Aprovado desde 2005 pelo FDA, este quimioterápico normalmente é usado como tratamento adjuvante a RT e tem mostrado os melhores resultados entre os quimioterápicos disponíveis, com um aumento de até 4 meses na sobrevida mediana dos pacientes. Em razão da sua importância e sua quase que exclusividade para o tratamento do tipo tumoral estudado no presente trabalho, será dedicada uma sessão exclusiva para tratarmos das principais informações deste quimioterápico.

1.4 TEMOZOLOMIDA (TMZ): O QUIMIOTERÁPICO DE PRIMEIRA LINHA NO TRATAMENTO DOS GLIOBLASTOMAS

1.4.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS E SUA DESCOBERTA

Temozolomida (TMZ) é um antineoplásico, quimicamente classificado como uma imidazotetrazinona, composto por um anel imidazole, fusionado com um anel tetrazinona contendo uma cadeia de três átomos de nitrogênios adjacentes (**Figura 4**). Este fármaco foi desenvolvido no final da década de 70, pelo químico

Malcolm Stevens e seu aluno Robert Stone na Universidade de Aston (Birmingham/Inglaterra) como resultado de um programa de pesquisa de novas moléculas com atividade antitumoral. Suas pesquisas eram baseadas na comprovação da atividade antineoplásica dos triazenos, moléculas contendo uma cadeia linear formada por 3 átomos de nitrogênio. A partir daí, uma série de compostos foram sintetizados e viu-se que dois deles apresentavam atividade antitumoral: a azolastone (posteriormente chamada de mitozolomida) e a Temozolomida (Stevens *et al.*, 1979).

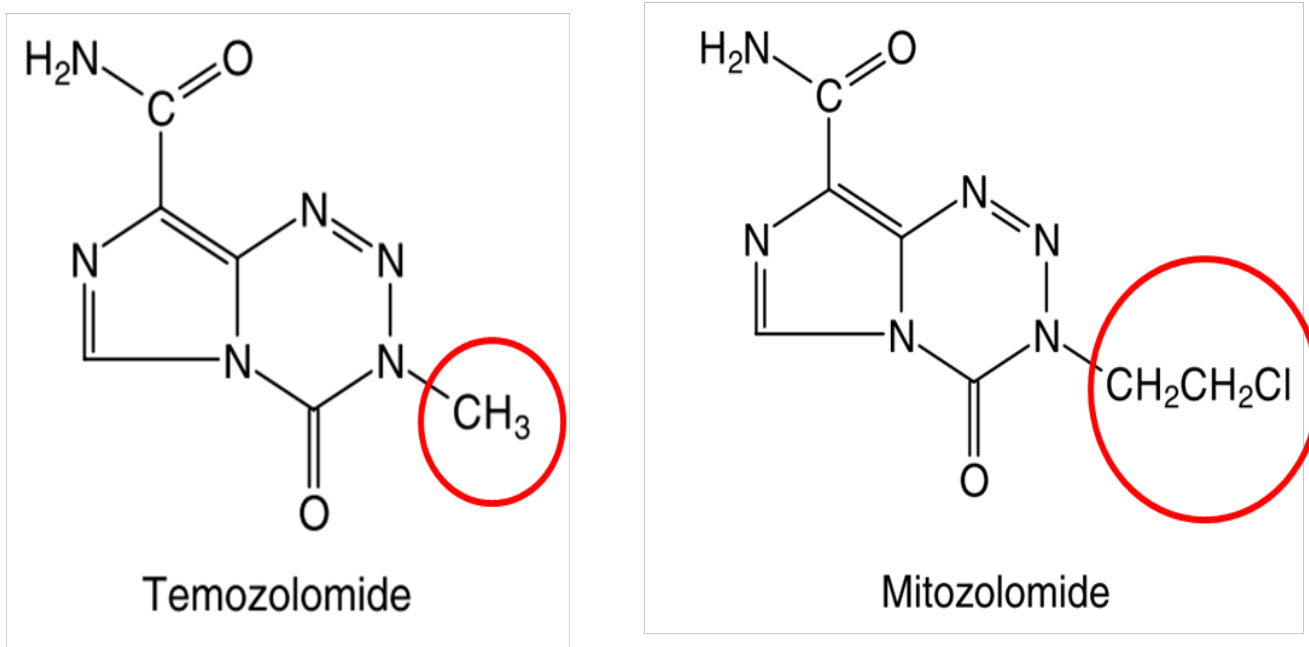


Figura 4 – Estrutura química da Temozolomida (TMZ) e da Mitozolomida (MTZ). Suas estruturas são compostas por uma base química formada de um anel imidazole, fusionado com um anel tetrazinona, contendo uma cadeia de três átomos de nitrogênios adjacentes. A única diferença entre as duas moléculas é a presença de um grupamento metil na TMZ e um grupamento cloroetil em MTZ (circulados em vermelho). Ilustração retirada e adaptada do trabalho “Antitumor imidazotetrazines. 1. Synthesis and chemistry of 8-carbamoyl-3-(2-chloroethyl)imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one, a novel broad-spectrum antitumor agent.”, publicado no ano de 1984 por Stevens MFG e col. no periódico *J Med Chem* (Stevens *et al.*, 1984).

A mitozolomida (MTZ) foi testada em ensaios clínicos de fase I, onde foi constatada alta toxicidade em humanos (trombocitopenia profunda), como resultado de cross-links no DNA causados pelo fármaco (Newlands *et al.*, 1985). Então, em uma tentativa de salvar o programa de busca por moléculas com atividades antitumorais, a Temozolomida foi incluída em ensaios clínicos de fase I e, surpreendentemente, os resultados foram positivos e animadores (Newlands *et al.*, 1992). A única diferença estrutural entre as duas moléculas era a presença de um grupamento cloroetil na mitozolomida, que havia sido substituído por um grupamento metil na Temozolomida, tornando-a menos ativa, mas sem a possibilidade de gerar cross-links no DNA. Desde modo, a Temozolomida foi progredindo nos ensaios clínicos e em 1999 foi liberado pelo FDA para o uso como terapia primária de astrocitomas infiltrativos e como tratamento experimental para GBMs (Yung *et al.*, 1999). Em 2005, Temozolomida se tornou o quimioterápico de primeira escolha para ser usado no tratamento de GBMs, em adjuvância a RT, baseado não só nos seus resultados clínicos relacionados à sobrevida dos pacientes, mas também pela sua menor toxicidade e melhora em diversos aspectos relacionados à sua qualidade de vida (Mason e Cairncross, 2005; Stupp *et al.*, 2005).

1.4.2 REGIME DE ADMINISTRAÇÃO DA TEMOZOLOMIDA EM PACIENTES COM GLIOBLASTOMA

Após a ressecção cirúrgica da massa tumoral (quando possível), os pacientes de GBM são imediatamente tratados com radioterapia concomitante à

administração de TMZ na dose de 75 mg/m²/dia, durante 6 semanas. Após este período inicial de terapia intensa, os pacientes são submetidos a um tratamento de manutenção, utilizando até 1 g/m² de Temozolomida dividido em doses diárias (entre 150 e 200 mg/m²/dia) durante 5 dias, seguido de 23 dias de recuperação, fechando um ciclo de tratamento de 28 dias (chamado simplesmente de 1-5/28). Então, caso o paciente não apresente nenhum efeito colateral drástico, este ciclo é repetido novamente por cerca de 6 vezes, finalizando o tratamento quimioterápico de manutenção após cerca de 6 meses. Havendo a manutenção constante de algum efeito colateral, a dosagem utilizada pode ser reduzida para até 100 mg/m²/dia (Stupp *et al.*, 2005; Mirimanoff *et al.*, 2006). A partir deste regime convencional de tratamento, muitos outros regimes vêm sendo sugeridos e testados, com o objetivo de melhorar a sobrevida dos pacientes. Dentre eles, os mais comuns estão apresentados na **Figura 5** e seus resultados específicos podem ser consultados no trabalho publicado “*Temozolomide Dosing Regimens for Glioma Patients*” (Strik *et al.*, 2012).

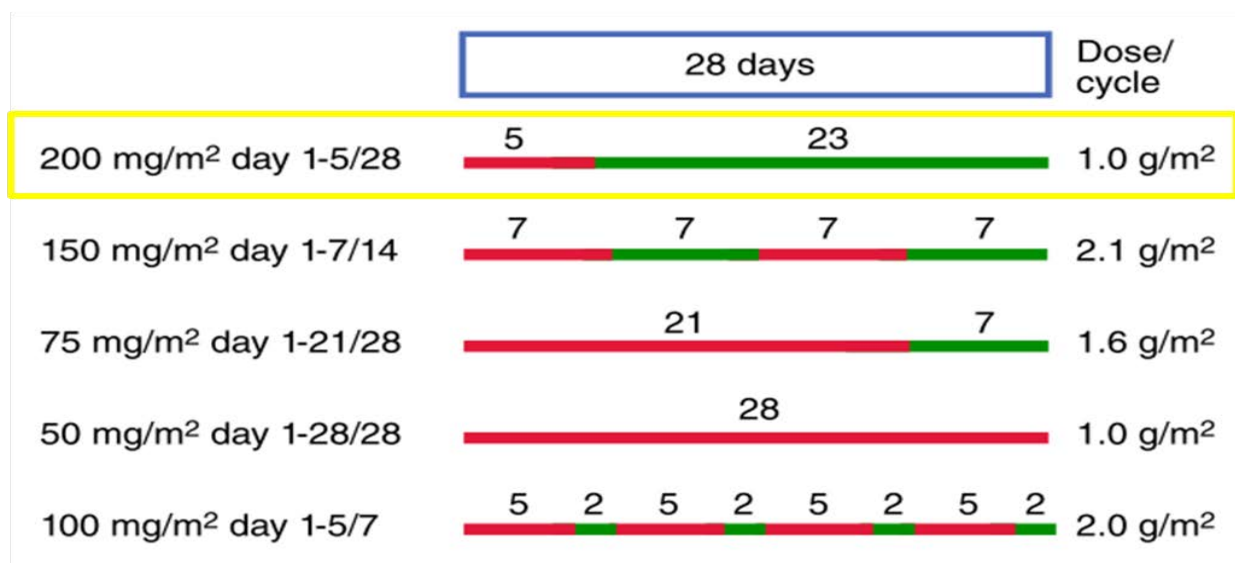


Figura 5 – Regime terapêutico padrão de administração de Temozolomida em pacientes com GBM, e suas variações. O regime destacado pelo quadro amarelo é considerado o regime terapêutico padrão chamado regime 1-5/28, onde o paciente recebe o tratamento nos 5 primeiros dias (representado pela barra vermelha) e permanece por um período de 23 dias sem ser exposto ao tratamento (representado pela barra verde), totalizando um ciclo de 28 dias. Os demais regimes de tratamento alternativos seguem o mesmo padrão de cores para definir os dias de exposição ao quimioterápico e os dias de interrupção da exposição ao fármaco. À esquerda está indicada a dose diária de cada um dos regimes terapêuticos e à direita está indicada a quantidade máxima do fármaco por cada ciclo que o paciente é exposto. Ilustração retirada e adaptada do trabalho “*Temozolomide Dosing Regimens for Glioma Patients*”, publicado em 2012 por Strik HM e col. no periódico *Curr Neurol Neurosci Rep* (Strik et al., 2012).

Entretanto, apesar de alguns destes regimes alternativos administrarem até 2 g/m² por ciclo nos pacientes, nenhum deles se mostrou mais eficaz que o regime de tratamento convencional, ora devido ao aumento dos efeitos colaterais, em virtude das altas doses (Gilbert et al., 2013), ora devido à baixa eficácia do uso contínuo de doses muito baixas (Tuettenberg et al., 2005; Perry et al., 2008).

1.4.3 FARMACODINÂMICA DA TEMOZOLOMIDA

Temozolomida é um fármaco que não necessita de metabolização hepática para ser ativado. Apesar de ser uma pró-droga, estudos de estabilidade química desta molécula revelaram que a ativação da Temozolomida ocorre espontaneamente, quando exposta a um pH fisiológico (em torno de pH 7). Esta ativação acontece imediatamente após a absorção hepática, onde a molécula de TMZ sofre um ataque nucleofílico pela água no carbonil da posição C⁴ do anel tetrazinona, que resulta na perda de uma molécula de dióxido de carbono e na formação de um composto intermediário, chamado metiltriazeno-1-il imidazole-4-carboxamida (MITC). Este composto intermediário é rapidamente degradado em uma molécula inativa derivada do ácido carboxílico (5-aminoimidazole-4-carboxamida ou simplesmente AIC) e uma segunda molécula altamente reativa chamada cátion metildiazônio. Este sim é o agente metilante ativo que desempenha todos os efeitos conhecidos da TMZ, uma vez que se mostra suscetível a ataques nucleofílicos por doadores de elétrons, causando a transferência do grupamento metil para nucleotídeos específicos do DNA (Denny *et al.*, 1994).

1.4.4 FARMACOCINÉTICA DA TEMOZOLOMIDA

Dados de biodisponibilidade de TMZ têm sido coletados de um grande número de estudos clínicos de fase I em pacientes com Gliomas avançados, que apresentam função renal e hepática normal (Newlands *et al.*, 1992; Dhodapkar *et al.*, 1997; Reid *et al.*, 1997; Estlin *et al.*, 1998; Brada *et al.*, 1999). Administrando

de forma oral, utilizando-se da dosagem máxima tolerada (200 mg/m²/Day), viu-se que TMZ teve 100% de biodisponibilidade, quando comparado com 1 hora de administração intravenosa, devido ao seu caráter lipofílico e estável em ambientes ácidos (Newlands *et al.*, 1992).

Além disso, TMZ possui uma rápida absorção a partir do trato gastrointestinal, atingindo seu pico de concentração plasmática em cerca de 1 hora (Newlands *et al.*, 1992; Dhodapkar *et al.*, 1997; Baker *et al.*, 1999; Brada *et al.*, 1999; Hammond *et al.*, 1999). Tanto a concentração plasmática máxima atingida e a área sob a curva (AUC – *Area Under Curve*) aumentaram linearmente com o aumento da dose, considerando um regime de TMZ de 50 a 200 mg/m²/dia (Newlands *et al.*, 1992; Dhodapkar *et al.*, 1997). Utilizando a dosagem máxima, viu-se que, nem TMZ, nem o produto de sua hidrólise acumularam no plasma após múltiplas administrações (Reid *et al.*, 1997; Brada *et al.*, 1999; Hammond *et al.*, 1999) e nem durante uma exposição contínua por 7 semanas utilizando doses mais baixas (Brock *et al.*, 1998). Através de tomografia por emissão de pósitrons e usando TMZ marcada com ¹¹C, viu-se também que TMZ cruza a barreira hematoencefálica através de difusão passiva e penetra o tecido cerebral (Galldiks *et al.*, 2006).

Após a absorção, a TMZ é eliminada através de 3 processos distintos: excreção renal da droga inalterada ou de seus produtos de degradação, por biotransformação hepática e a principal delas que é a hidrólise pH dependente no composto MTIC, que dará origem ao composto ativo. Sua eliminação ocorre independentemente da dose administrada (entre 50 e 200 mg/m²/dia) (Dhodapkar *et al.*, 1997) e sua concentração plasmática declina com um tempo de meia vida

médio de 1,8 horas (Newlands *et al.*, 1992; Dhodapkar *et al.*, 1997; Baker *et al.*, 1999; Hammond *et al.*, 1999). Entretanto, este declínio é resultante da transformação da pró-droga no seu composto ativo que efetivamente causará danos nas células.

A partir de diversos estudos clínicos, a concentração plasmática máxima atingida após a administração do fármaco foi de 50 μM a 70 μM no dia 1 de administração e 60 μM a 80 μM no dia 5 (último dia de administração de TMZ) (Dhodapkar *et al.*, 1997; Brada *et al.*, 1999; Hammond *et al.*, 1999), sendo, então, entre 50 μM a 80 μM a sua faixa terapêutica (Strik *et al.*, 2012).

1.4.5 MECANISMO DE AÇÃO DA TEMOZOLOMIDA

As posições mais suscetíveis à metilação causada pelo cátion metildiazônio nos nucleotídeos são o oxigênio 6 (O^6) [5% dos adutos] e o nitrogênio 7 (N^7) [70% dos adutos] dos resíduos de guanina, as posições N^1 e N^3 da adenina e a posição N^3 da citosina [25% dos adutos] (Denny *et al.*, 1994; Newlands *et al.*, 1997). Embora representem a grande maioria dos adutos ao DNA gerados pelo composto ativo metildiazônio (cerca de 95% dos adutos), as metilações causadas nos átomos de nitrogênio nos nucleotídeos adenina e citosina são rapidamente reconhecidas e reparadas por um dos sistemas de reparo ao DNA, chamado reparo por excisão de bases (*Base Excision Repair – BER*). A metilação na posição N^7 da guanina não parece ser intensamente citotóxica, mas o acúmulo de metilações na posição N^3 da adenina pode ser letal para as células, se não reparado (Horton e Wilson, 2007).

Em contrapartida, apesar de representar a menor frequência de adutos gerados por TMZ no DNA das células (em torno de 5%), as metilações na posição O^6 dos resíduos de guanina (O^6 -meG) são as principais responsáveis pelo efeito citotóxico nas células alvo, resultando em alterações altamente tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (Tisdale, 1987; Baer *et al.*, 1993). Uma vez não reparadas, os resíduos de O^6 -meG passam a não mais parear com resíduos de citosina durante a replicação do DNA, e sim com resíduos de timina, em virtude da indisponibilidade do átomo de hidrogênio para o estabelecimento da terceira ponte de hidrogênio que configura o seu pareamento com a citosina. Foi mostrado também que o resíduo de O^6 -meG pode parear com citosina e provocar sua deaminação para produzir timina, resultando no pareamento errôneo O^6 -meG/timina (Williams e Shaw, 1987). Este mal pareamento de O^6 -meG com timina é reconhecido por um segundo sistema de reparo ao DNA da célula chamado de reparo de mal pareamento (*Mismatch repair – MMR*), que provoca a remoção do resíduo de timina da fita recém-sintetizada durante a replicação do DNA. Entretanto, o resíduo de O^6 -meG permanece em uma das fitas moldes e um novo resíduo de timina será inserido na posição de pareamento com O^6 -meG e novamente será removido. Então, ciclos fúteis de excisão e reinserção de timinas nas posições danificadas pelas metilações nas guaninas resultam em quebras persistentes na molécula de DNA, causando um colapso na forquilha de replicação (Mojas *et al.*, 2007).

Estas inúmeras quebras na molécula do DNA levam ao desencadeamento de uma série de cascatas de sinalização que sinalizam, num primeiro momento, para que haja uma parada no processo de proliferação desta célula com o DNA

danificado. Esta parada é crucial para que haja tempo suficiente para que todas as lesões no DNA sejam reparadas pelos mais variados sistemas de reparo ao DNA que as células possuem. Esta parada ocorre mais especificamente na fase G2/M do segundo ciclo celular após o tratamento com TMZ (Zhukovskaya *et al.*, 1994; Cejka *et al.*, 2003; Roos *et al.*, 2004), através de uma cascata de sinalização da via de ATR/CHK1 (Stojic *et al.*, 2004), abordada anteriormente. Caso essa parada perpetue por muito tempo e o dano não seja corrigido, uma série de processos celulares são desencadeados visando à eliminação desta célula danificada, dentre eles os processos de morte celular programada ou apoptose (D'atri *et al.*, 1998) e do processo de parada irreversível na proliferação celular, chamado de senescência (Gunther *et al.*, 2003). A decisão celular entre o desencadeamento de apoptose ou senescência na célula afetada é altamente dependente do perfil de sinalização celular que é desencadeado pelas lesões ao DNA e por quais componentes moleculares estão momentaneamente sendo expressas da célula-alvo. Sabe-se que a decisão entre o desencadeamento entre um mecanismo e outro é dependente do perfil de expressão da proteína p53 nas células danificadas (Mhaidat *et al.*, 2007).

Por outro lado, todos estes efeitos citotóxicos, gerados pelo tratamento com TMZ, podem ser evitados por outro componente do sistema celular de reparo ao DNA, chamado O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase ou simplesmente MGMT. Esta é uma proteína relativamente pequena (22 kDa) de localização citoplasmática e nuclear que, em resposta a presença de alquilações na molécula de DNA, rapidamente se desloca em maior quantidade para o núcleo da célula para desempenhar sua principal função (Lim e Li, 1996). Como mostra a definição

da sigla, MGMT é uma enzima de reparo responsável pela remoção dos adutos na posição O^6 dos resíduos de guanina, através de uma reação estequiométrica e auto-inativante, onde o grupamento alquil da guanina é removido e transferido para uma cisteína presente no seu próprio sítio ativo (cis 145), assim reparando o DNA e inativando MGMT (Pegg *et al.*, 1995). Por este motivo, esta proteína é chamada de enzima suicida, pois a metilação transferida para o seu sítio ativo a torna inativa e é reconhecida como um sinal de degradação da proteína via proteassoma (Srivenugopal *et al.*, 1996; Kyrtopoulos *et al.*, 1997). Entretanto, MGMT é responsável não só pela remoção de grupamentos metil inseridos na posição O^6 da guanina, mas também pela remoção de outros grupamentos alquil nesta mesma posição, como grupamentos etil, cloroetil, hidroxietil, n-propil, n-butil, e até mesmo moléculas cíclicas mais volumosas como grupamentos benzil e piridiloxobutil, mas com eficiência reduzida a medida que o tamanho da molécula aumenta (Pegg, 2000; Coulter *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2008).

Portanto, como mostrado na **Figura 6**, a eficiência da TMZ como um tratamento antitumoral é altamente dependente de 3 fatores: do correto funcionamento do sistema de reparo MMR, para o reconhecimento do mal pareamento e sinalização para gerar todo o efeito citotóxico resultante da exposição à TMZ; do mal funcionamento do sistema BER de reparo, que levaria a manutenção de mais 95% dos adutos gerados pela exposição a TMZ, causando uma maior citotoxicidade na célula-alvo; e da ausência ou inatividade da proteína MGMT, já que esta é responsável pela correção de todos os adutos responsáveis pela maioria dos efeitos citotóxicos gerados pelo quimioterápico e, uma vez

inativa, estes danos serão mantidos, resultando na posterior eliminação da célula-alvo.

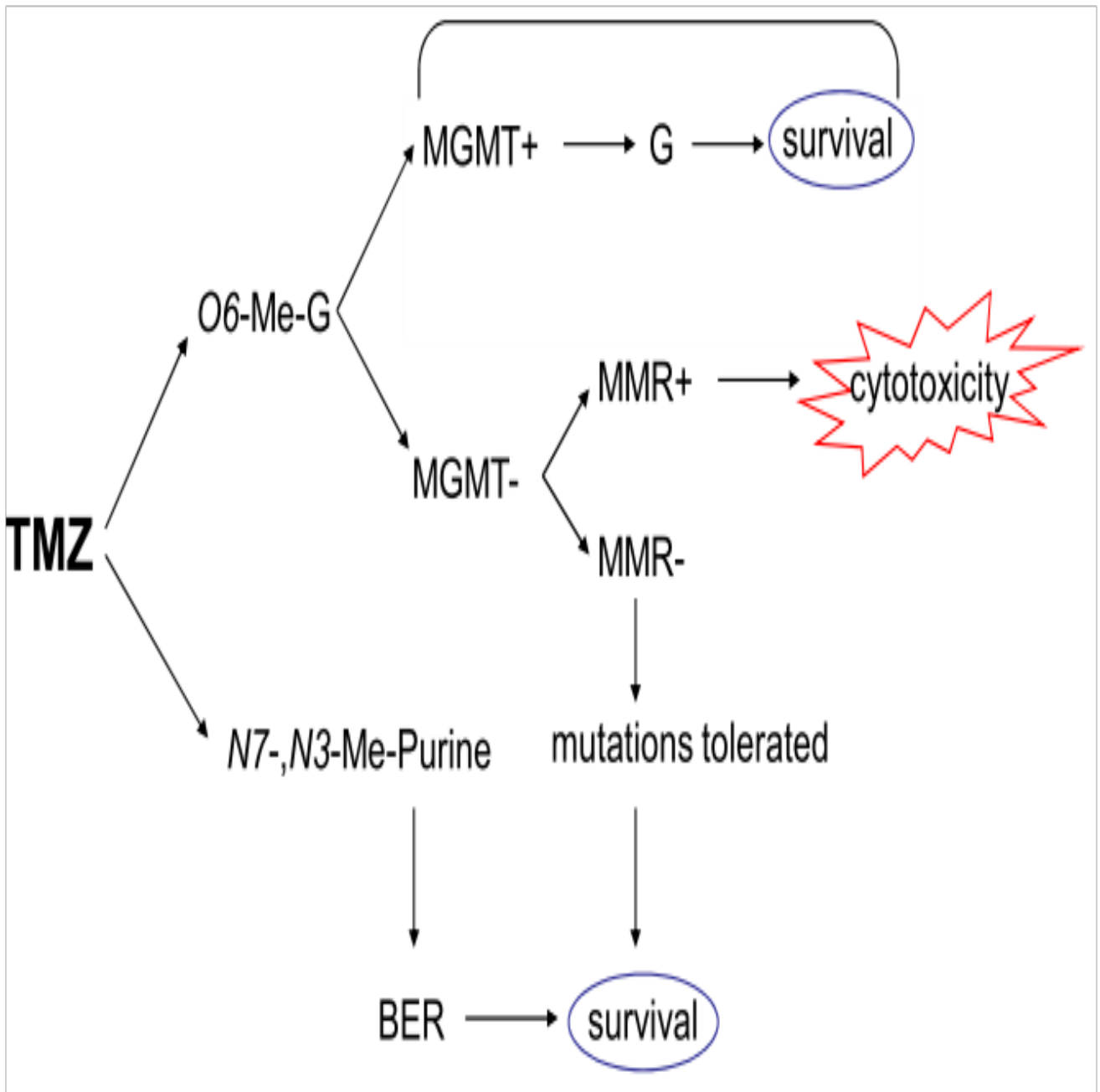


Figura 6 – Efeitos antitumorais de Temozolomida são dependentes do status de funcionamento dos sistemas de reparo MMR, BER e dos níveis de MGMT. Ilustração retirada do trabalho “*Temozolomide: Mechanism of Action, Repair and Resistance*” publicado em 2012 por Zhang e col. no periódico *Current Molecular Pharmacology* (Zhang et al., 2012).

1.4.6 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA MAIS COMUNS À TEMOZOLOMIDA

No parágrafo anterior vimos o funcionamento de TMZ como quimioterápico é altamente dependente do correto funcionamento de 3 diferentes mecanismos de reparo ao DNA. Deste modo, alterações genéticas que afetem a funcionalidade dos componentes moleculares de qualquer um desses 3 mecanismos representam as principais rotas de fuga das células tumorais aos efeitos produzidos por TMZ.

O reparo direto do aduto O^6 -meG através da enzima MGMT é considerado a principal reação das células tumorais, principalmente dos GBMs, aos efeitos danosos produzidos pelo tratamento com TMZ, mas também protege as células sadias de possíveis alterações genéticas induzidas por agentes mutagênicos ou genotóxicos. Esta enzima depende unicamente da sua atividade para realizar a remoção dos adutos no DNA, inexistindo a necessidade da presença de outras proteínas ou cofatores para que esta funcione. Seus níveis proteicos em células sadias são bastante variáveis, com altas taxas de expressão no tecido hepático e baixa expressão em tecidos como o hematopoiético e cerebral (Kaina e Christmann, 2002; Margison *et al.*, 2003). Já nos tecidos tumorais, essa variabilidade de expressão é ainda maior, onde altíssimos níveis proteicos de MGMT são encontrados em cânceres de mama, ovário e pulmão, e de um modo geral, baixos níveis em Gliomas, carcinomas de pâncreas e melanomas (Kaina *et al.*, 2007).

Cerca de 60 a 85% das amostras de Glioma possuem perda do cromossomo 10, onde o gene da proteína MGMT está localizado, justificando, assim, a baixa expressão em Gliomas (Rohhion *et al.*, 1999). Além disso, outras alterações como fosforilação da proteína e mutações também provocam a perda da funcionalidade de MGMT (Bacolod *et al.*, 2004). Mas a alteração que mais parece afetar a sua expressão e, por consequência, sua funcionalidade, é a hipermetilação das ilhas CpG localizadas em seu promotor, bloqueando o correto reconhecimento e a ligação dos fatores de transcrição na sua região promotora, impedindo que esta proteína seja expressa (Esteller e Herman, 2004; Esteller, 2005). Hipermetilação do promotor de MGMT é encontrada em até 70% dos Gliomas de alto grau (Blanc *et al.*, 2004; Stupp *et al.*, 2006). Outro estudo mostrou que a variação na expressão de MGMT em Gliomas varia em até 300 vezes (Silber *et al.*, 1999) e seus níveis de expressão e de atividade estão altamente correlacionados com o nível de resistência a agentes alquilantes, tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (Gerson, 2002; 2004).

Um estudo mostrou que aumentando *in vitro* a expressão de MGMT exógeno em células de GBM com baixíssima expressão ou expressão nula desta proteína aumentou de 5 a 13 vezes o nível de resistência, em relação aos seus controles, mostrando a atuação direta desta enzima na modulação dos efeitos gerados pelos agentes alquilantes (Zhang *et al.*, 2010). Já evidências clínicas mostraram que pacientes que possuíam hipermetilação do promotor de MGMT respondiam melhor aos tratamentos com BCNU e TMZ, dois agentes alquilantes (Hegi *et al.*, 2004; Hegi *et al.*, 2005; Hegi *et al.*, 2008). Entretanto, a citotoxicidade dos agentes alquilantes está diretamente relacionada ao nível de expressão de

MGMT, uma vez que, mesmo células com baixa expressão de MGMT podem sofrer com os efeitos de agentes alquilantes, pois para cada aduto corrigido, uma molécula de MGMT é eliminada via proteassoma, como visto anteriormente. Para que uma célula seja completamente resistente, MGMT tem de estar altamente expressa na célula, não permitindo que seus níveis sejam reduzidos ao ponto dos agentes alquilantes conseguirem gerar o acúmulo de lesões no DNA. Nestas células resistentes à TMZ pela superexpressão de MGMT, as lesões O⁶-meG são rapidamente corrigidas, reduzindo, conseqüentemente, também os níveis expressos da proteína, que são rapidamente restabelecidos pelos altos níveis transcricionais desta proteína. Já nas células que possuem níveis baixos de expressão de MGMT ou até mesmo não expressam tal proteína, as lesões resultantes do tratamento com agentes alquilantes são corrigidas, num primeiro momento (no caso das que não expressam MGMT esses danos não são corrigidos), mas os níveis da enzima de reparo não são reconstituídos em nível de eliminar todas as alquilações no DNA e o acúmulo de lesões acontece de forma mais rápida do que o restabelecimento dos níveis da enzima, resultando em um aumento gradativo de citotoxicidade (Tisdale, 1987; Baer *et al.*, 1993; Middlemas *et al.*, 2000). Por todos estes motivos, o status de hipermetilação do promotor, a ausência de expressão ou a perda de funcionalidade de MGMT nas células tumorais são considerados marcadores preditivos de resposta à agentes alquilantes.

Um segundo mecanismo de resistência à TMZ diz respeito ao correto funcionamento do sistema de reparo MMR, que é responsável por reconhecer o mal pareamento e tentar repará-lo. Caso não seja possível, moléculas

sinalizadoras desencadeiam uma cascata de sinalização que leva a célula a provocar uma parada no ciclo celular, a fim de que este dano seja corrigido, ou sinaliza para que haja a eliminação desta célula, caso o acúmulo de danos seja tão grande que não possa ser reparado. Para que este sistema de reparo funcione, é necessário que os maus pareamentos sejam reconhecidos pelo complexo MutS α (formado pelo heterodímero MSH2 e MSH6) ou pelo complexo MutS β (formado pelo heterodímero MSH2 e MSH6). Após o reconhecimento, estes dois complexos são responsáveis pela reparação do dano gerado pelo mau pareamento apenas na fita recém-sintetizada, mantendo o aduto metil no resíduo de guanina. Isso resulta nos ciclos fúteis de reparo que provocam inúmeras quebras no DNA. Desta forma, se qualquer alteração presente em algum desses componentes de reconhecimento do dano gerado por TMZ estiver alterado nas células tumorais, o tratamento com agentes alquilantes, neste caso, apenas resultará num acúmulo considerável de lesões no DNA que não será reconhecido e, muito menos, reparado pelo sistema de reparo MMR, permitindo com que essa célula permaneça viva, sem desencadear todo o processo de reparo ou eliminação da célula lesada. Pior que isso, esta célula com inúmeras lesões poderá, até mesmo, proliferar e segregar as alterações genéticas induzidas pelo tratamento quimioterápico, podendo resultar, na pior das hipóteses, num aumento da malignidade tumoral induzida pelo acúmulo de novas alterações genéticas.

O sistema de reparo MMR é de suma importância na resposta a tratamentos em diversos tipos tumorais, uma vez que qualquer defeito em algum de seus componentes pode resultar na aquisição de resistência à agentes alquilantes, independente da expressão de MGMT (Johannessen *et al.*, 2008). A deficiência

no sistema MMR de reparo está associada a diversos tipos tumorais como câncer colorretal, mama, próstata, dentre outros (Peltomaki, 2003; Gologan e Sepulveda, 2005). Um estudo mostrou em 60 linhagens tumorais que a ausência da expressão da proteína MHL1, responsável pela formação de um dos componentes de reconhecimento dos danos induzidos por TMZ, estava sempre associada a resistência ao agente alquilante (Taverna *et al.*, 2000). Além disso, mostrou-se também que células com MMR defeituoso apresentavam resistência a indução de apoptose induzida por TMZ (D'atri *et al.*, 1998).

Hipermetilação de promotor e mutações causadoras de perda de funcionalidade são as principais alterações genéticas encontradas nos componentes de MMR (Grady *et al.*, 2001; Hunter *et al.*, 2006; Cahill *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011). Interessantemente, mutações em MSH6 foram encontradas em cerca de 25% dos GBMs recorrentes após o tratamento com agentes alquilantes, mas não em GBMs não tratados ou recorrentes de radioterapia (Cahill *et al.*, 2007; Cancer Genome Atlas Research, 2008; Yip *et al.*, 2009), sugerindo que as lesões no DNA causadas pelo agente alquilante podem não ser corrigidas e afetar exatamente as proteínas envolvidas no reconhecimento de novas alterações genéticas, tornando as células ainda mais irresponsivas aos agentes alquilantes. A restauração dos níveis de MSH6 em células defectivas para essa proteína recupera o fenótipo de quimiosensibilidade a agentes alquilantes (Yip *et al.*, 2009). Recentemente, um estudo utilizando a base de dados do TCGA mostrou que as mutações ocorridas em componentes do sistema MMR em GBMs recorrentes aconteciam em tumores com a presença de hipermetilação no promotor de MGMT, sugerindo que esses tumores recorrentes possam ser o

resultado de uma sensibilidade primária, causada pela ausência da expressão de MGMT, onde uma subpopulação foi capaz de escapar dos efeitos da quimioterapia, através do mau funcionamento do sistema MMR, e ser selecionada como resistente (Cancer Genome Atlas Research, 2008). Outros estudos corroboram com esta sugestão mostrando uma significativa redução na expressão de vários componentes do sistema MMR em GBMs recorrentes, quando comparados com os tumores primários correspondentes, indicando que outros mecanismos além das mutações somáticas estão envolvidos no comprometimento do correto funcionamento do sistema MMR (Stark *et al.*, 2010; Felsberg *et al.*, 2011). Todas estas informações levam a crer que as células capazes de resistir ao tratamento com agentes alquilantes carregam uma série de alterações capazes de torná-las ainda mais irresponsivas a estes fármacos, colocando em dúvida o real benefício do uso desta classe de quimioterápicos no tratamento dos GBMs e deixando cada vez mais claro que o uso da Temozolomida em GBMs é feito em caráter paliativo e não curativo.

O terceiro mecanismo mais comum de resistência em GBMs está ligado a outro sistema de reparo de excisão de bases (BER) (Trivedi *et al.*, 2005). Responsável pelo reparo de mais de 95% dos danos gerados pelo tratamento com agentes alquilantes, este sistema é altamente dependente da atividade de uma enzima chamada poli (ADP)-ribose polimerase 1 (PARP-1) que é capaz de reconhecer as lesões induzidas por TMZ e outros agentes alquilantes nas posições N^3 e N^7 das bases púricas. Este reconhecimento passa por uma série de eventos enzimáticos que resultam na eliminação das bases metiladas e a formação de uma lacuna na cadeia de nucleotídeos que é então reconhecida por

PARP-1, sendo assim, uma proteína-chave para a identificação das posições afetadas pelo agente alquilante e posterior correção do dano. PARP-1 é uma proteína que se encontra constitutivamente expressa nas células, mas só é ativada em resposta às lacunas formadas na cadeia de nucleotídeos. Uma vez ativada, ela recruta e ativa uma série de proteínas que formam o complexo BER que é responsável pelo reparo ao dano no DNA (Malanga e Althaus, 2005; Dantzer *et al.*, 2006). Sendo assim, células deficientes em PARP-1 são hipersensíveis a agentes carcinogênicos e a quimioterápicos indutores de dano ao DNA (Lockett *et al.*, 2005). A manutenção dos danos causados por TMZ nas posições N^3 e N^7 das bases púricas em virtude da ausência de atividade de PARP-1 causa um aumento expressivo na citotoxicidade induzida pelo quimioterápico, tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (Tentori, Portarena, *et al.*, 2002; Curtin *et al.*, 2004; Ratnam e Low, 2007). Outros componentes dessa via também apresentam importantes papéis no correto funcionamento de BER, como a enzima alquilpurina-DNA-N-glicosilase (APNG), responsável pela remoção das bases alteradas da cadeia de DNA para posterior reconhecimento por PARP-1 e correção pelo complexo BER. Assim como MGMT, a enzima APNG também pode ser silenciada por hipermetilação do seu promotor em GBMs (Agnihotri *et al.*, 2012) e recentes estudos mostram que os baixos níveis de expressão desta enzima podem prever a sensibilidade dos GBMs ao tratamento com TMZ (Agnihotri *et al.*, 2012). Ainda, os altos níveis de expressão de APNG podem potencialmente explicar os poucos benefícios terapêuticos gerados por um tratamento baseado em radio e quimioterapia com TMZ em um subgrupo de GBMs com hipermetilação no promotor de MGMT (Agnihotri *et al.*, 2012). Em

contraste, os baixos níveis de APNG têm sido fortemente associados com o aumento na sobrevida dos pacientes com GBM que não apresentam metilação no promotor de MGMT, após o tratamento com radioterapia + TMZ, indicando que o comprometimento do correto funcionamento do sistema BER de reparo pode aumentar o prognóstico de sobrevida dos pacientes com GBMs apresentando expressão de MGMT (Agnihotri *et al.*, 2012).

Portanto, de uma forma geral, como demonstrado pela **Figura 6**, o quadro de resistência à TMZ é estabelecido na maioria das vezes através de alterações em um dos 3 processos anteriormente citados. Num primeiro momento, caso MGMT não consiga reparar os danos gerados em resíduos de guanina no DNA, o sistema MMR fará com que os maus pareamentos sejam reconhecidos e, em virtude da impossibilidade de eliminar o aduto no DNA, um processo de eliminação desta célula danificada seja desencadeado. Outro grupo de alterações deve ser reconhecido pela enzima PARP-1 para que seja reparado pelo sistema BER de reparo. Sendo assim, a superexpressão da enzima MGMT, o mal funcionamento do sistema MMR e o correto funcionamento do sistema BER de reparo configura o pior quadro de resistência possível à TMZ em células de GBM.

1.4.7 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA SUPERAR A RESISTÊNCIA À TEMOZOLOMIDA

Como visto anteriormente, a enzima MGMT realiza um papel fundamental na correção dos danos induzidos pelo tratamento com Temozolomida, removendo o aduto mais citotóxico produzido por esta droga, a metilação na posição O⁶ da

guanina. Uma vez superexpressa em GBM, esta enzima colabora para que não haja uma resposta terapêutica satisfatória do tratamento com TMZ em pacientes acometidos por este tipo tumoral. Baseado nessas informações, diversas abordagens terapêuticas têm sido desenvolvidas na tentativa de modular a atividade de MGMT, a fim de melhorar a resposta terapêutica deste quimioterápico (Verbeek *et al.*, 2008). Dentre elas, estão os inibidores de MGMT, chamados *O*⁶-benzilguanina (*O*⁶-BG) e o *O*⁶-(4-bromotenil)guanina (conhecido também como Lomeguatrib), que tem sido usado em testes clínicos com o objetivo de depletar os níveis de MGMT previamente à administração do agente alquilante (Dolan e Pegg, 1997; Sabharwal e Middleton, 2006). *O*⁶-BG age como um pseudosubstrato, se ligando à MGMT e covalentemente transferindo o grupamento benzil para o resíduo de cisteína 145, presente no sítio ativo da enzima, o mesmo resíduo utilizado para fazer o carreamento das alquilações removidas da posição *O*⁶ das guaninas. A ligação covalente do grupamento benzil no sítio ativo de MGMT é irreversível e impossibilita que esta enzima atue removendo as metilações no DNA, uma vez que seu sítio receptor de grupamentos alquil já se encontra bloqueado pelo grupamento benzil, causando a inativação da enzima. A presença deste grupamento benzil no sítio ativo da enzima, além de inativá-la, é reconhecida como um sinal de degradação via proteassoma, da mesma forma que as metilações provenientes dos resíduos de guanina metilados no DNA desempenham este papel, conseqüentemente, reduzindo os níveis celulares desta proteína ativa, até que um novo sinal transcricional restabeleça os níveis alterados de expressão desta enzima nas células tumorais. Além disso, a estrutura molecular do inibidor *O*⁶-BG é bastante

semelhante à estrutura de um resíduo de guanina metilada na posição O^6 , entretanto, não é reconhecida como um nucleotídeo a ser utilizado para a síntese de novas cadeias nucleotídicas e, portanto, não é incorporado ao DNA, reagindo diretamente com MGMT, tanto localizado no citoplasma, quanto no núcleo (Dolan *et al.*, 1990). Desta forma, a utilização de inibidores de MGMT como um pré-tratamento ao uso de TMZ poderia reduzir os níveis de resistência e aumentar os níveis de eficácia terapêutica em pacientes (Middleton *et al.*, 2000). Estudos *in vitro* demonstraram que o pré-tratamento com O^6 -BG aumentou a citotoxicidade não só da TMZ, mas também de outro agente alquilante como a Lomustina (CCNU) (Baer *et al.*, 1993). Em estudos *in vivo* utilizando células com alta expressão de MGMT, viu-se que o pré-tratamento com O^6 -BG aumentou a atividade citotóxica de TMZ e de CCNU. Como já esperado, O^6 -BG não apresentou resultados significativos em células com expressão baixa ou nula da enzima (Liu *et al.*, 1996). Entretanto, outro estudo *in vivo* demonstrou em células de GBM com baixa expressão de MGMT que o pré-tratamento com O^6 -BG reduziu os níveis de MGMT expressos nas células e retardou em até 11 vezes o crescimento tumoral (Wedge e Newlands, 1996).

O Lomeguatrib é outro potente pseudosubstrato de MGMT, que age de forma bastante semelhante à O^6 -BG, transferindo um grupamento químico para a cisteína do sítio ativo da enzima, que neste caso é um grupamento bromotenil, inativando-a. Este inibidor tem mostrado grandes resultados na sensibilização de diversos tipos de tumores a agentes alquilantes causadores de danos na posição O^6 da guanina, como TMZ (Middleton *et al.*, 2000; Middleton *et al.*, 2002). Os resultados dos testes clínicos de fase I, associando este inibidor à TMZ (Ranson

et al., 2006), levaram a testes clínicos de fase II, utilizando 100 pacientes com melanoma metastático, que não apresentaram uma melhora significativa na eficácia do tratamento, em relação à taxa de resposta e o tempo médio de progressão da doença, uma vez que os níveis de MGMT eram restabelecidos 24h após a administração do inibidor (Ranson *et al.*, 2007). Ensaios clínicos posteriores, utilizando novas dosagens e outros regimes terapêuticos de administração do inibidor e do agente alquilante, estabeleceram um regime farmacodinamicamente efetivo, resultando na depleção completa e consistente de MGMT em diversos tipos tumorais, como melanoma, Glioma, câncer de próstata e coloretal (Watson *et al.*, 2009; Watson *et al.*, 2010).

Entretanto, o grande fator limitante para o uso de estratégias terapêuticas associativas de agentes alquilantes e inibidores da enzima MGMT são os efeitos adversos relacionados à mielossupressão, uma vez que as células da medula óssea possuem baixa expressão de MGMT e este tratamento combinatório torna-se extremamente citotóxico para estas células (Hansen e Kelley, 2000). Por outro lado, alguns estudos já estão tentando desenvolver uma terapia protetiva às células hematopoiéticas, através da transferência gênica de um cDNA, contendo um gene mutante da enzima MGMT, codificando uma versão resistente à inativação por estes inibidores (Zielske e Gerson, 2002; Gerson, 2004; Woolford *et al.*, 2006). Um estudo clínico de fase I já se encontra em andamento nos Estados Unidos para testar a eficácia e a segurança deste tipo de estratégia.

Outra estratégia para superar a resistência à TMZ é alterando o funcionamento de outro sistema de reparo que interfere na manutenção dos adutos gerados pelo tratamento com este quimioterápico. O sistema responsável

pela correção da grande maioria das alterações induzidas por TMZ é o sistema BER de reparo, através das correções das alquilações nas posições N^3 da adenina e na posição N^7 da guanina, que representam cerca de 95% das alterações induzidas por TMZ. Na ausência da expressão de MGMT e com o sistema de reparo MMR em pleno funcionamento, estas alterações contribuem muito pouco para a citotoxicidade da TMZ nas células tumorais. Entretanto, uma vez que MGMT encontra-se altamente expressa e consegue reparar as metilações na posição O^6 da guanina ou a manutenção dessas alterações não são reconhecidas pelo sistema MMR de reparo, a manutenção destas metilações nas posições N^3 e N^7 das bases púricas através do mau funcionamento do sistema BER de reparo é fundamental para a citotoxicidade de TMZ (Tentori, Leonetti, *et al.*, 2002; Tentori, Portarena, *et al.*, 2002). Desta forma, uma interferência no reconhecimento desses adutos, na sinalização para a maquinaria BER de reparo ou, até mesmo, em algum dos componentes desta maquinaria poderia auxiliar na potencialização dos efeitos nocivos da TMZ, resultando em uma melhor eficiência no tratamento dos GBMs.

A fim de testar esta hipótese, o principal alvo a ser modulado para que houvesse um mau funcionamento do sistema BER foi a proteína PARP-1, um componente-chave para o correto funcionamento deste mecanismo. Assim, inúmeros inibidores de PARP-1 estão, hoje em dia, sendo testados, quanto a sua eficácia em aumentar a atividade antitumoral de agentes alquilantes, como a TMZ, ou até mesmo como um agente antitumoral único a ser usado no tratamento de tumores defectivos para o sistema de reparo por recombinação homóloga (Plummer, 2006; Plummer e Calvert, 2007; Drew e Plummer, 2009; Sandhu *et al.*,

2010). AG 014699, ABT 888, BSI-201 e o olaparib são os inibidores de PARP-1 mais utilizados em estudos clínicos, hoje em dia, incluindo em GBMs (Annunziata e O'shaughnessy, 2010). Entretanto, nenhum até o momento, apresentou resultados conclusivos, quanto a combinação com TMZ em GBMs.

Em contrapartida a estas abordagens terapêuticas com alvos moleculares mais específicos, onde tratamentos adjuvantes são desenvolvidos para modular algum componente de vias de sinalização que impedem a completa eficácia do tratamento principal, uma série de trabalhos continua avaliando o poder terapêutico de combinações farmacológicas de quimioterápicos que atuam em vias de sinalização distintas, a fim de potencializar os efeitos antitumorais e evitar o surgimento da resistência tumoral. Entretanto, apesar dos inúmeros trabalhos serem apresentados na literatura com excelentes respostas *in vitro* de novas combinações terapêuticas para GBM ou para qualquer outro tipo tumoral, poucos deles são validados em experimentação animal e muito menos em ensaios clínicos com pacientes, onde resultam na aquisição de resistência por parte das células tumorais e, conseqüentemente, levam a recidiva tumoral.

A partir deste quadro, surge uma série de questionamentos sobre a validade e a representatividade da experimentação *in vitro* como um primeiro estágio da pesquisa e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e sobre o porquê de muitas combinações terapêuticas apresentarem excelentes efeitos antitumorais *in vitro* e não se confirmarem em experimentação animal ou pacientes.

1.5 EQUÍVOCOS MAIS COMUNS NA PESQUISA BÁSICA *IN VITRO* DE NOVAS TERAPIAS ANTITUMORAIS.

O Câncer consiste em uma patologia crônica responsável pelo crescimento desordenado das células a partir do acúmulo prévio de diversas alterações genéticas, que conferem a algumas células uma maior capacidade de proliferar. Baseado neste conceito básico da doença, a primeira premissa para estabelecermos os equívocos mais comuns da pesquisa básica do câncer é o tipo de investigação que vai ser realizada *in vitro*. Existe uma distinção bastante clara na pesquisa *in vitro* do câncer entre estudos mecanísticos e estudos terapêuticos.

Entende-se por estudos mecanísticos, todo aquele estudo responsável por demonstrar, caracterizar e comprovar as funções e interações entre componentes moleculares da célula em um determinado processo celular. Desta forma, um determinado processo pode ser induzido com algum fármaco ou molécula específica, utilizando concentrações acima da faixa terapêutica para que aquele processo seja desencadeado, a fim de que seus componentes sejam detalhadamente estudados. Estes estudos ainda podem revelar novas interações, processos celulares paralelos que podem ou não ser afetados pela indução do processo estudado, a modulação do seu desencadeamento para verificar possíveis influências em componentes, entre outros objetivos. Usualmente este tipo de estudo é utilizado para caracterizar os principais mecanismos celulares que são desencadeados, a partir da exposição de um determinado tipo celular a uma determinada intervenção terapêutica. Como exemplo, podemos citar a própria exposição de células de GBM ao quimioterápico Temozolomida que,

muitas vezes, é utilizada com o objetivo de demonstrar os principais efeitos resultantes desta exposição, como parada no ciclo celular, indução de apoptose, autofagia, senescência, etc. O desenvolvimento destes trabalhos mecanísticos baseia-se na aplicação de doses consideráveis do quimioterápico nas células-alvo e os principais efeitos clássicos são investigados em um curto período de tempo. Isso sumariza uma grande parcela dos trabalhos encontrados na literatura, que fazem uso desta estratégia de estudo para mostrar o desencadeamento de vias de sinalização específicas que resultam nos efeitos clássicos dos quimioterápicos.

A grande problemática desses trabalhos está na ideia de que, ao comprovar o desencadeamento de mecanismos celulares específicos, que resultam na eliminação de grande parte das células testadas, esta estratégia terapêutica testada seja imediatamente proposta como uma possível candidata para o tratamento do determinado subtipo tumoral no qual esta foi testada e sugerem a experimentação animal como o próximo estágio para comprovar seu potencial antineoplásico.

Como esperado, muitas delas acabam por não apresentar os mesmos efeitos nos ensaios *in vivo* e são descartadas como opção terapêutica. Neste exemplo, existem inúmeras causas biológicas que justificam o insucesso do avanço de uma determinada terapia em desenvolvimento, dentre elas a biodisponibilidade do fármaco no animal, a interação tumoral com o sistema imune, o microambiente tumoral, dentre outras várias razões que justificam boa parte do insucesso no avanço de novas abordagens terapêuticas. Entretanto, diversas razões metodológicas aplicadas durante o estudo *in vitro* podem justificar

a irrelevância terapêutica nos estudos experimentais em animais e configuram as principais diferenças entre os estudos mecanísticos e os estudos terapêuticos.

Nos estudos mecanísticos, doses acima da faixa terapêutica de um determinado fármaco testado são aplicadas nas células-alvo, a fim de que os mecanismos a serem estudados sejam efetivamente desencadeados. Por outro lado, quando queremos investigar o potencial terapêutico de um determinado fármaco num determinado subtipo tumoral, a dose a ser aplicada nos ensaios *in vitro* deve corresponder às doses possíveis de serem atingidas nos pacientes, respeitando a farmacocinética e a farmacodinâmica da abordagem terapêutica estudada no organismo humano. Para tal, deve-se respeitar o limite máximo do fármaco que é atingido no plasma dos pacientes, quando a dosagem máxima tolerada é administrada. Este dado é encontrado normalmente já em ensaios clínicos de fase I, que controlam, principalmente, a segurança da administração de um determinado fármaco. Desta forma, utilizando ensaios *in vitro*, é possível demonstrar, de uma maneira mais realista, quais os possíveis efeitos do tratamento nas células tumorais e, assim, avaliar seu potencial antineoplásico.

Entretanto, não são apenas as doses utilizadas em experimentação *in vitro* que fogem da realidade clínica dos tratamentos antitumorais. Além de utilizarem doses exorbitantes perto da realidade clínica de biodisponibilidade do fármaco, muitos trabalhos *in vitro* se utilizam de regimes terapêuticos injustificáveis para avaliar os efeitos em células tumorais. A grande maioria dos quimioterápicos já utilizados na clínica possuem regimes terapêuticos de administração bem estabelecidos para uma melhor eficácia terapêutica e muitos trabalhos de pesquisa *in vitro* insistem em utilizar tratamentos agudos de 24h, 48h e 72h para

investigar seus efeitos em células tumorais. Como visto anteriormente, o regime terapêutico padrão de administração de TMZ em pacientes de Glioma é de 5 dias de exposição ao fármaco, seguido de 23 dias de interrupção, fechando um ciclo de 28 dias de tratamento. Baseado nessas informações clínicas, estudos terapêuticos *in vitro*, utilizando-se de TMZ em células de GBM, deveriam seguir o regime de tratamento padrão ou qualquer outro regime previamente testado clinicamente para investigar, os mecanismos moleculares envolvidos no seu efeito, seu potencial terapêutico e da eficácia de possíveis novas estratégias alternativas, permitindo que os resultados obtidos nessa instância de pesquisa possuam uma relevância representativa da realidade.

Outro equívoco comumente observado em pesquisas *in vitro* e que configura uma das principais mensagens reflexivas desta tese de doutorado, é o tempo de análise dos efeitos antitumorais de uma determinada estratégia terapêutica. Uma série de estudos trazem resultados bastante animadores quando investigam novas moléculas ou novas combinações de fármacos para o tratamento de tipos específicos de câncer, dentre eles os GBMs. Contudo, uma análise mais detalhada destes trabalhos revela que grande parte dos potenciais antitumorais de uma determinada estratégia terapêutica está baseada em interpretações de resultados de citotoxicidade aguda, analisadas nos primeiros dias após o início do tratamento (análises em 24h, 48h e 72h são as mais comuns). Supondo que uma terapia combinatória de dois quimioterápicos em GBM, utilizando condições terapêuticas de dose e regime de administração de cada um dos fármacos, seja capaz de atingir 90% de toxicidade nas primeiras 48h, não se pode concluir que esta combinação possui um potencial terapêutico, sem que seja investigado o que

acontecerá com os 10% das células que foram irresponsivas ao tratamento. É possível que estas células sobreviventes tornem-se mais malignas e agressivas, levantando questionamentos sobre um possível uso deste tipo de estratégia terapêutica. É possível, também, que estas células sejam posteriormente eliminadas, fazendo deste tratamento combinatório uma ótima opção para ser testada em experimentos *in vivo*. Somente uma análise mais estendida dos efeitos gerados pela combinação vai desvendar o possível destino das células sobreviventes e o real potencial terapêutico da estratégia estudada. Desta forma, estudos terapêuticos que visam a sugestão de novas estratégias para o tratamento de qualquer tipo tumoral deveriam adotar como regra a realização de análises por longos períodos de tempo para averiguar o efeito do tratamento avaliando, não só o comportamento da subpopulação de células sensíveis, mas também estudar o que acontecerá com aquelas células que foram capazes de sobreviver. No caso do estudo do efeito de TMZ em GBM, o mais racional seria realizar análises a longo prazo baseado no período correspondente a um ciclo de tratamento, ou seja, durante o período onde os pacientes não serão mais expostos a nenhum tipo de tratamento, para verificar *in vitro* o que possivelmente estaria acontecendo durante o período de 28 dias.

Outro exemplo clássico de estudos que cometem estes três principais equívocos são os estudos que investigam a resistência *in vitro* em células tumorais. A maioria destes trabalhos se inicia com a exposição das células tumorais a doses exorbitantes e crescentes do quimioterápico por tempos extremamente prolongados (podendo chegar a muitos meses de exposição) para que haja uma seleção de subpopulações de células resistentes. Então, são feitos

estudos de mecanismos moleculares superativados, expressão ou silenciamento diferencial de proteínas na condição “resistente”, citotoxicidade cruzada com outros fármacos, dentre outras análises. O fato é que este tipo de estudo pode trazer inúmeras informações importantes, mas que, se pensando de maneira racional, as condições experimentais empregadas nas células-alvo são totalmente utópicas, pois é fisiologicamente impossível que uma célula tumoral seja exposta a concentrações extremamente altas e crescentes por um tempo tão extenso. Sendo assim, as mesmas vias de sinalização podem não ser ativadas nas concentrações terapêuticas, proteínas podem não ser expressas, mecanismos podem não ser desencadeados, não condizendo, portanto, com a realidade das células tumorais nos pacientes. De uma maneira geral, grande parte dos resultados apresentados por este tipo de trabalho podem trazer informações que interferem no entendimento correto do funcionamento celular em uma condição de exposição ao tratamento, dificultando, ainda mais, o desenvolvimento de novas terapias.

Existem alguns outros fatores importantes na experimentação *in vitro* que, se fossem levados em consideração, poderiam mimetizar melhor o que acontece na clínica. Contudo, não se podem considerar equívocos, pois muitas vezes requerem um investimento maior de recursos financeiros, que, muitas vezes, não são disponibilizados para este estágio de pesquisa. Dentre eles, o número de células analisadas é um fator determinante para o sucesso terapêutico *in vitro* que, muitas vezes, não se confirma em ensaios *in vivo*. Uma massa tumoral é composta por uma heterogeneidade de bilhões de células e não mais do que 100 mil células são utilizadas em ensaios *in vitro* para determinação da citotoxicidade

de uma nova terapia proposta, representando menos de 0,01% de uma massa tumoral no paciente. Entretanto, não há condições, na maioria dos laboratórios, de realizar experimentos, considerando esta escala de número de células que compõe uma massa tumoral, mas isso deve ser considerado no momento da interpretação dos resultados. Outro fator é a disposição das células em monocamada na grande maioria dos experimentos *in vitro*, ao passo que um tumor possui uma estrutura tridimensional, na qual a disponibilidade do fármaco é afetada. O meio de cultura comercial suplementado com uma formulação desconhecida de fatores estimuladores de crescimento celular representa mais um fator que influencia na discrepância entre os resultados *in vitro* e *in vivo*. Portanto, existe uma série de elementos que justifica a discrepância entre os resultados *in vitro* e *in vivo*, mas cabe ao pesquisador que decidir utilizar a experimentação *in vitro* a responsabilidade de tentar minimizar o efeito de cada um destes elementos. Excetuando estes últimos citados neste parágrafo, os demais são totalmente possíveis de serem considerados no momento do planejamento dos experimentos.

Assim, diferente dos estudos mecanísticos, os estudos terapêuticos devem visar à pesquisa de novas abordagens de tratamento, levando em consideração fatores limitantes impostos pelos padrões clínicos de farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos estudados, como a dosagem plasmática máxima, de regime terapêutico, disponibilizados por ensaios clínicos prévios, e principalmente pelo tempo de análise, que deve ser o mais extenso possível, podendo utilizar o ciclo de tratamento do fármaco analisado como delimitante máximo de tempo de análise. Desta forma, é possível diminuir as divergências

entre os mais variados extratos de pesquisa do desenvolvimento de novas terapias e aproximar os resultados experimentais *in vitro* dos resultados *in vivo* e clínicos.

1.6 POR QUE ANALISAR OS EFEITOS A LONGO PRAZO?

Sabe-se que os GBM possuem uma alta taxa de recorrência nos pacientes e que o tempo necessário para a constatação deste evento é consideravelmente extenso. Entretanto, a grande maioria dos trabalhos desenvolvidos com o objetivo de sugerir uma nova proposta terapêutica no tratamento de GBMs e de outros tipos tumorais persistem em centralizar toda a investigação *in vitro* realizando ensaios agudos de toxicidade e dos mecanismos desencadeados pelo tratamento caracterizando apenas os efeitos, a curto prazo, nas células tumorais. Os possíveis efeitos crônicos do tratamento só serão constatados quando os tratamentos que apresentarem resultados mais promissores de forma aguda *in vitro* forem testados através de ensaios *in vivo*. O resultado deste padrão do ciclo de evolução das pesquisas pré-clínicas resume-se a longos períodos de investigação, uma vez que a chance de possíveis candidatos terapêuticos não apresentarem resultados satisfatórios *in vivo* é muito maior, pois não se caracterizou previamente todos os efeitos gerados pelo tratamento na célula-alvo. Ainda, a falta de estrutura de muitos grupos de pesquisa em poder realizar testes *in vivo* com seus melhores candidatos terapêuticos, o aumento no custeio das pesquisas de caráter terapêutico, visando, principalmente, o custeio da manutenção do biotério para a execução dos ensaios *in vivo*, e talvez a utilização

demasiada de animais para testar novas propostas de tratamento que apresentam potencial terapêutico baseado apenas em resultados agudos *in vitro*, mas sem uma comprovação dos seus efeitos a longo prazo, representam outros fatores que podem ser amenizados com a utilização dos ensaios *in vitro* a longo prazo. Além disso, muitas terapias sugeridas que não possuem um efeito agudo promissor, mas que poderiam apresentar uma atividade antitumoral em uma análise mais prolongada, não são selecionadas para a realização dos testes *in vivo* e passam a ser descartadas, excluindo, assim, um possível tratamento com potencial terapêutico.

Augustine e colaboradores publicaram um dos primeiros trabalhos vistos na literatura trazendo questionamentos sobre a validade dos ensaios agudos *in vitro* para a predição de efeitos a longo prazo *in vivo*. Dentre uma série de resultados interessantes, um deles demonstra que ensaios de toxicidade aguda *in vitro* de TMZ em 26 linhagens de melanoma humano não correlacionam com os efeitos apresentados em ensaios *in vivo*, ao passo que uma análise pontual de toxicidade a longo prazo (12 dias) demonstrou uma correlação positiva (mas não significativa) muito maior com os efeitos apresentados pelos resultados de ensaios *in vivo* (Augustine *et al.*, 2009). A falta de significância nos dados talvez seja justificada pelo fato de que a análise a longo prazo, demonstrada no trabalho citado, seja configurada apenas uma análise pontual em um dia mais distante do início do tratamento. Entretanto, o simples fato de analisar os efeitos cumulativos do fármaco de 12 dias na célula-alvo proporcionou um aumento considerável na correlação com os efeitos alcançados nos ensaios *in vivo*. Talvez se fosse feita uma análise mais estendida ou se os efeitos fossem acompanhados de forma

mais contínua, gerando um perfil de resposta ao longo do tempo, uma significância na correlação com os resultados *in vivo* poderia ser alcançada.

Assim, fica evidente a importância da investigação crônica *in vitro* em estudos visando à sugestão de novas terapias antineoplásicas para que se conheçam todos os efeitos antitumorais do objeto de estudo e todos os possíveis efeitos indesejados nas células remanescentes. Desta forma, se considerarmos todos os limitantes clínicos para investigar os efeitos de um tratamento em ensaios *in vitro* e este apresentar resultados satisfatórios em análises a longo prazo, as chances de insucesso em ensaios *in vivo* tendem a ser reduzidas consideravelmente, uma vez que as diferenças metodológicas e a distância da realidade clínica, desta forma, são diminuídas.

1.7 FÁRMACOS ADJUVANTES ASSOCIATIVOS À TEMOZOLOMIDA NO TRATAMENTO DE GLIOBLASTOMAS

Aplicando os parâmetros clínicos abordados anteriormente, em relação à dose plasmática máxima, regime de tratamento e tempo de análise, uma série de ensaios *in vitro* de proliferação celular a longo prazo foram realizados no decorrer do presente projeto e mais de 10 possíveis candidatos adjuvantes à TMZ foram testados de forma isolada em células de GBM para verificar seu potencial antitumoral. Dentre todos os fármacos testados, 2 deles apresentaram resultados satisfatórios e serão abordados de forma detalhada na introdução para que seja compreendida suas principais características relacionadas ao histórico, mecanismo de ação, uso terapêutico e seu potencial para o tratamento de GBMs.

1.7.1 VIMBLASTINA (VBL)

Produtos naturais derivados de plantas têm um histórico longo e bem-sucedido na descoberta de novas terapias contra o câncer (Mann, 2002). Dentre os principais avanços no isolamento de compostos naturais com potencial antitumoral estão as vincas, alcaloides extraídos a partir da flor de uma planta de nome científico *Catharanthus roseus*, mais conhecida como Vinca, Maria sem vergonha ou Vinca de Madagascar (Rosenthal, 1981). Esta classe de compostos orgânicos foi descoberta na década de 50 pelos cientistas canadenses *Robert Noble e Charles Beer* (Noble *et al.*, 1958) e viu-se, mais tarde, que possuíam propriedades medicinais como atividade hipoglicêmica, a qual teve menos importância comparada com a sua atividade citotóxica (Gidding *et al.*, 1999). Dentre os alcaloides isolados a partir do *Catharantus*, existem 4 deles com propriedades medicinais antitumorais: Vimblastina (VBL), vincristina (VCR), vinorelbina (VRL) e a vindesina (VDS), entretanto apenas VBL, VCR e VRL são aprovadas para o uso clínico pelo FDA nos Estados Unidos. A estrutura química da Vimblastina está ilustrada na **Figura 7**.

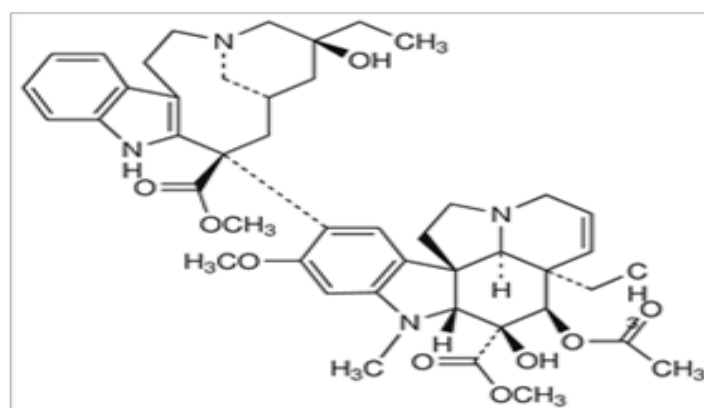


Figura 7 – Estrutura química da Vimblastina (VBL). Figura retirada do endereço eletrônico www.medicinescomplete.com

O principal mecanismo de ação dessa classe de alcaloides está ligado à sua interação com as unidades da proteína tubulina impedindo a sua polimerização e posterior montagem da rede de microtúbulos, importante para a estruturação do fuso mitótico. Esta interação ocorre em sítios específicos presentes nas unidades da tubulina e são separados dos sítios que, normalmente, outros compostos inibidores de microtúbulos se ligam (taxanos, colchicinas e podofilotoxinas) (Downing, 2000). Evidências apontam para a existência de dois sítios de ligação de vincas para cada mol de dímero de tubulina não polimerizada (Correia e Lobert, 2001) e para a existência de 16 a 17 sítios de ligação de alta afinidade nas extremidades do microtúbulo já formado, interrompendo não só a polimerização, mas também o processo de alongamento e encurtamento destes microtúbulos já polimerizados, através da formação de um “cap cinético” nas extremidades dos microtúbulos, suprimindo este mecanismo de modulação do tamanho destas estruturas do citoesqueleto (Jordan *et al.*, 1992). Desta forma, concentrações baixas de alcaloides da vinca agem na dinâmica dos microtúbulos, inibindo a formação e o funcionamento correto do fuso mitótico, o que interfere na progressão no ciclo celular, causando uma parada em metáfase. Por outro lado, concentrações mais altas bloqueiam, estequiometricamente, por completo a polimerização dos microtúbulos, através da ligação destes alcaloides em dímeros de tubulina (Toso *et al.*, 1993). Esta parada no ciclo celular, se muito prolongada, ativa vias de sinalização responsáveis pelo desencadeamento do processo de morte celular programada, resultando na eliminação das células afetadas por apoptose (Wang *et al.*, 1999). Entretanto, alguns efeitos secundários em mecanismos e processos celulares dependentes da rede de microtúbulos acabam

sendo diretamente afetados pelo tratamento com vincas e são vistos mesmo em células não proliferativas, demonstrando o envolvimento de outros efeitos na citotoxicidade destes alcaloides (Kufe *et al.*, 2003). Até mesmo mecanismos independentes dos microtúbulos como síntese de ácidos nucléicos parecem ser afetados pela exposição a estes alcaloides (Wagner e Roizman, 1968).

Desta forma, estes compostos desempenham uma importante função no bloqueio da progressão do ciclo celular e, por isso, são importantes agentes utilizados no tratamento de diversos tipos de cânceres. Trabalhos mostraram que VBL, em concentrações na ordem de picomolar, bloqueia a angiogênese induzida por células malignas, através da inibição da proliferação endotelial, quimiotaxia e estruturação da rede de fibronectina, importantes passos da angiogênese, mas é incapaz de afetar fibroblastos normais ou células tumorais linfoides nestas concentrações (Vacca *et al.*, 1999). Além disso, a combinação de VBL com anticorpos contra o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*) aumenta consideravelmente os efeitos antitumorais em células de neuroblastoma, mesmo em células que apresentam resistência a múltiplas drogas (Klement *et al.*, 2000).

Desde então, VBL e os demais alcaloides da vinca têm sido incluídos em regimes terapêuticos combinatórios no tratamento de alguns subtipos tumorais, com o objetivo de atuar em mecanismos distintos aos dos quimioterápicos principais. Por não apresentarem resistência cruzada, estes agentes antimicrotúbulos são comumente associados a agentes alquilantes do DNA em diversos tipos tumorais, produzindo um efeito quimioterápico potente ao atuar em duas vias distintas na célula-alvo (Hahn *et al.*, 1981; Veronesi *et al.*, 1982;

Comella *et al.*, 1991; Alexandrescu *et al.*, 2006). Entretanto, apenas algumas evidências em Gliomas de baixo grau mostram a utilização isolada de VBL como terapia antineoplásica (Bouffet *et al.*, 2012; Villanueva, 2012). Os principais efeitos colaterais gerados pelo tratamento com VBL resumem-se a alta toxicidade na fração branca das células sanguíneas, náusea, vômito, constipação, dispneia, dor na localização tumoral e febre (Kufe *et al.*, 2003).

Ao contrário da vincristina, um alcaloide semelhante à VBL e que é parte integrante de uma das principais combinações terapêuticas aprovadas para o tratamento de Glioblastomas (PCV – Procarbazina, CCNU e Vincristina), existem poucas evidências na literatura mostrando a utilização da VBL como terapia para tumores cerebrais de baixo grau e quase nenhuma em tumores de alto grau. Estudos clínicos avaliando a utilização deste alcaloide da vinca como terapia de escolha ou adjuvante apenas para o tratamento de Gliomas pediátricos de baixo grau são os únicos registros avaliando o potencial terapêutico desta molécula em neoplasias do SNC (Bouffet *et al.*, 2012; Villanueva, 2012), inexistindo a constatação do uso de VBL como quimioterápico para GBMs. Entretanto, baseado nestes estudos clínicos, sabe-se da capacidade de VBL em atravessar a barreira hematoencefálica, um dos principais entraves no desenvolvimento de terapias para tumores cerebrais.

Uma das causas para a substituição do tratamento de PCV pela Temozolomida em GBM foi a quantidade e a intensidade de efeitos colaterais constatada em pacientes, dentre eles, uma alta taxa de neurotoxicidade (Postma *et al.*, 1998). Uma das principais causas deste efeito deletério em células do SNC é a presença de VCR na composição deste regime terapêutico. Sabe-se que

dentre os alcaloides da vinca, a vincristina é o composto que apresenta os maiores índices de indução de neurotoxicidade periférica, sensorial, motora e autonômica, onde os primeiros efeitos patológicos estão ligados à degeneração axonal e redução no transporte axonal, resultante da desestabilização dos microtúbulos e interferência na sua função transportadora. Já a VBL, tem como principal efeito colateral a indução de neutropenia, caracterizando o principal fator limitante da dosagem desta molécula, mas também apresenta certo nível de neurotoxicidade. Assim, apesar de uma maior afinidade total de VCR pela tubulina, mas não pelos heterodímeros de tubulina (Lobert *et al.*, 1996), as grandes vantagens da utilização de VBL ao invés de VCR no tratamento de neoplasias cerebrais estão relacionadas a um menor efeito citotóxico no tecido nervoso central e periférico, uma melhor farmacocinética, onde VBL pode ser administrado em maiores doses nos pacientes, uma captação levemente maior no tecido cerebral e uma maior depuração hepática de VBL, que evita o surgimento de efeitos colaterais mais drásticos (Kufe *et al.*, 2003). Além disso, um estudo utilizando linhagens celulares murinas de leucemia ainda constatou uma captação 10 vezes maior de VBL pelas células tumorais, uma maior inibição da proliferação celular utilizando doses mais baixas e um grau de resistência 5 vezes menor do que VCR, corroborando para uma melhor avaliação de VBL como antineoplásico, frente a VCR (Rivera-Fillat *et al.*, 1988).

Apesar de alguns estudos clínicos avaliarem o potencial terapêutico da combinação de VBL e Temozolomida, juntamente com outros componentes adjuvantes, no tratamento de pacientes com melanoma metastático avançado (Ron *et al.*, 2006; Linardou *et al.*, 2015), não existe evidências de estudos

avaliando o potencial terapêutico dessa combinação em células de GBMs, nem mesmo do uso isolado de VBL no tratamento do tipo mais agressivo de Glioma. Apenas um trabalho de caráter mecanístico, avaliando a expressão de genes envolvidos na expressão de proteínas responsáveis pela resistência a múltiplas drogas (proteínas MDR) mostrou uma primeira evidência do efeito de VBL em células de GBM (Valera *et al.*, 2009). Entretanto, baseado em evidências geradas a partir de tratamentos extremamente agudos (máximo de 72h), mas utilizando-se de doses dentro dos limites encontrados em resultados clínicos em pacientes, este trabalho, precipitadamente, sugere o uso deste alcaloide no tratamento de tumores cerebrais pediátricos, sem apresentar nenhuma evidência de efeito citotóxico e de modulação na proliferação celular a longo prazo.

O regime de tratamento padrão para o uso de VBL em pacientes com câncer é composto de uma administração intravenosa em bolus de até 6 mg/m² semanalmente. Entretanto, a recomendação aprovada de dosagem semanal inicial é de 2,5 mg/m² em crianças e de 3,5 mg/m² em pacientes adultos, seguido de um incremento gradual semanal de 1,8 mg/m² e 1,25 mg/m², respectivamente, de acordo com a tolerância hematológica. Este incremento deve respeitar a dosagem máxima semanal de 18,5 mg/m² para adultos e 12,5 mg/m² em crianças. Em virtude da constatação de leucopenia severa, é recomendado que VBL seja administrado uma vez por semana nestas doses. Entretanto, um regime terapêutico alternativo de infusão contínua por 5 dias de até 2 mg/m² de VBL tem sido usado. Este alcança uma concentração plasmática biologicamente relevante de aproximadamente 2 nM (Kufe *et al.*, 2003). Por outro lado, dados clínicos do uso de VBL no tratamento de pacientes com câncer de pulmão de não pequenas

células mostram que a administração em bolus de 3 mg/m² de VBL atinge uma concentração plasmática de até 4.8 ng/ml após 10h (em torno de 5 nM) (Links *et al.*, 1999).

1.7.2 MEBENDAZOLE (MBZ)

Mebendazol ou Mebendazole (MBZ) é um benzimidazol de amplo espectro, farmacologicamente classificado no grupo dos antiparasitários, subgrupo dos anti-helmínticos, usado por mais de 30 anos na medicina veterinária para tratar uma variedade de infestações parasitárias. Em 1995, a metil 5-benzolil-1 H-benzimidazol-2-il-carbamato ou, simplesmente, Mebendazole (**Figura 8**) foi aprovado pelo FDA para o uso medicinal em humanos contra uma série de infecções helmínticas gastrointestinais da classe dos nematodos, dentre eles *Ascharis*, *Trichuris*, *Ancylostoma* e *Necator*. Este fármaco atua tanto na forma adulta, quanto larval destes parasitas e possui ação ovicida restrita contra alguns nematoides. A aplicação clínica de MBZ tem sido amplamente documentada com a utilização de múltiplas doses no tratamento de equinococose cística (mais conhecida como doença hidática ou hidatidose) (Munst *et al.*, 1980; Messaritakis *et al.*, 1991; Vutova *et al.*, 1999). Além disso, MBZ tem sido amplamente utilizado no tratamento de infecções parasitárias no SNC e, portanto, apresentando uma capacidade considerável de penetração na barreira hematoencefálica (Erdinçler *et al.*, 1997).

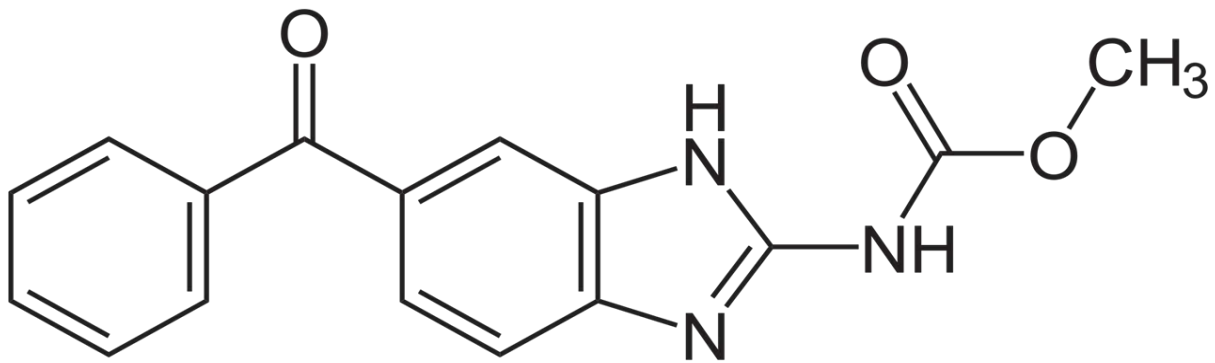


Figura 8 – Estrutura química do Mebendazole (MBZ). Ilustração retirada do endereço eletrônico http://www.uft.edu.br/parasitologia/pt_BR/farmacos/Mebendazole/.

Semelhantemente a VBL, o principal mecanismo de ação atribuído ao MBZ, e aos demais bezimidazois, é se ligar a subunidades de tubulina livres nas células do epitélio intestinal dos vermes parasitas, prevenindo a polimerização dos microtúbulos. Desta forma, há um bloqueio na síntese e na cinética do fuso mitótico, causando uma parada na proliferação celular no tecido intestinal dos vermes parasitas, levando-os a morte (Kohler, 2001; Macdonald *et al.*, 2004). Um estudo mostrou que não há um sítio de ligação à tubulina exclusivo para o MBZ, mas este compartilha o mesmo sítio de ligação com outro agente antimicrotúbulos chamado colchicina (Ravelli *et al.*, 2004).

Apesar da estranha comparação, vermes nematódeos e células tumorais possuem algumas características em comum como a capacidade contínua de proliferação celular, o potencial de modular a resposta imune, a secreção de enzimas proteolíticas para atingir sítios-alvo no organismo, indução de neoangiogênese, superexpressão da proteína 14-3-3 (importante na modulação de mecanismos de proliferação e morte celular) e a capacidade de formar metástases. Desta forma, pode-se pensar que agentes antiparasitários poderiam apresentar propriedades antitumorais relevantes para serem considerados como

estratégias alternativas para o tratamento das mais diversas neoplasias (Sasaki *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2015).

Desta forma, diversos trabalhos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*, avaliando esta capacidade antitumoral dos agentes antiparasitários, têm surgido e muitos deles tem apresentado resultados animadores em cânceres de pulmão, adrenocortical e melanoma (Mukhopadhyay *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 2002; Doudican *et al.*, 2008; Martarelli *et al.*, 2008). Os principais efeitos celulares desencadeados por MBZ em células tumorais foram parada no ciclo celular e posterior indução de apoptose, através da via mitocondrial de indução (Sasaki *et al.*, 2002; Doudican *et al.*, 2008). Um recente trabalho mostrou ainda que doses terapêuticas de MBZ foram capazes de inibir a migração e a invasão de células de câncer gástrico (Pinto *et al.*, 2015). Todas estas informações parecem não ter sido o suficiente para despertar o interesse de muitos pesquisadores em avaliar o potencial antitumoral em GBMs e outros tumores do SNC. Os únicos dois trabalhos que abordam a aplicação deste fármaco em linhagens de tumores cerebrais pertencem a um único grupo liderado pelo pesquisador *Gregory J. Riggins* da *John Hopkins University School of Medicine*. Estes trabalhos trazem resultados muito satisfatórios na sensibilização de linhagens tumorais de GBM aos fármacos MBZ e seu análogo, o Albendazol (ABZ), sendo o MBZ mais efetivo. Entretanto, os efeitos *in vitro* de MBZ na inibição da polimerização dos microtúbulos só foi vista na dose de 1 μ M, não sendo constatada diferença do controle na dose de 100 nM. Ainda, os experimentos *in vivo* não aplicam um regime de tratamento semelhante ao aplicado em pacientes, onde os animais foram tratados por 20 dias seguidos, e nos dias subsequentes, receberam tratamento por 5 dias, seguido de

dois dias de intervalo, durante todo o tempo de análise. Além disso, o único ensaio *in vivo* apresentando resultados com linhagens de GBM humano não mostraram o efeito do tratamento combinado de MBZ e TMZ. Em linhagem de camundongo, a combinação de MBZ e TMZ administrada usando o mesmo regime terapêutico citado anteriormente mostrou um aumento considerável na sobrevida média dos animais, chegando a 72,4%, comparado a 63,3% do MBZ e 41,4% de TMZ (Bai *et al.*, 2011). Desta forma, este trabalho trouxe um primeiro indício do potencial terapêutico de MBZ no tratamento de GBM na sua forma isolada ou combinada com TMZ. Por outro lado, parece que estes resultados foram o suficiente para que ensaios clínicos utilizando a combinação de MBZ e TMZ fossem iniciados. Recentemente os ensaios de fase I foram finalizados, apresentando resultados animadores e por este motivo, os ensaios de fase II já estão em andamento.

Quanto ao regime de administração e posologia de MBZ, os trabalhos presentes na literatura são amplamente divergentes, uma vez que, mesmo em altas doses, este fármaco não possui efeitos colaterais significativos aos pacientes. *Messaritakis e colaboradores* testaram a administração oral de até 6g diárias de MBZ divididas durante as refeições, durante 12 semanas para o tratamento de hidatidose em crianças de 2 a 14 anos, apresentando uma concentração plasmática de quase 400 nM após 2h da primeira administração (*Messaritakis et al.*, 1991). Já *Vutova e colaboradores* mostraram que doses similares (5g diárias para um paciente de 70 kg) podem ser administradas por um período ininterrupto de até 24 meses, sem apresentar efeitos colaterais severos (*Vutova et al.*, 1999). Por outro lado, *Braithwaite e colaboradores* mostraram em

12 pacientes que receberam doses diárias de 10 mg/kg (700 mg para pacientes de 70 kg) que o pico plasmático variou de 60 nM até 1,7 µM após 7h da administração e em pacientes com administração crônica do fármaco a concentração plasmática média foi de 137,4 ng/ml ou 460 nM (Braithwaite *et al.*, 1982). *Münst e colaboradores* mostraram que a administração única de 1,5 g de MBZ em 3 pacientes resultou em uma concentração plasmática de até 134 nM. Em contrapartida, 1 g de MBZ em pacientes submetidos a tratamentos crônicos com o fármaco apresentaram até 500 nM de concentração plasmática (Munst *et al.*, 1980). Baseado nestas evidências, pode-se notar que o uso contínuo de MBZ pode alcançar concentrações plasmáticas na faixa de 400 nM até 1,7 µM. Um dado interessante é que uma mesma concentração deste fármaco, quando administrado em conjunto com uma dieta rica em gordura pode atingir uma concentração plasmática até 10 vezes maior, do que quando administrado na ausência de uma refeição. Isso provavelmente deve ser decorrente da limitada biodisponibilidade e da baixa solubilidade do MBZ, devido ao seu caráter lipofílico (Dayan, 2003). Ainda, coadministração de MBZ e cimetidina, um fármaco antagonista do receptor H₂, que inibe a seletivamente a secreção ácida estomacal e reduz a produção de pepsina, leva a um aumento nos níveis plasmáticos do antiparasitário, devido a inibição da metabolização hepática via citocromo p450 causada pelo fármaco adjuvante (Bekhti e Pirotte, 1987). Uma vez metabolizado, os subprodutos de MBZ não apresentam mais atividade antiparasitária e, provavelmente, nem atividade antitumoral. Estes fatores configuram uma justificativa plausível para explicar as enormes divergências de concentração plasmática encontradas nos estudos da farmacocinética de MBZ.

Algumas alterações genéticas têm sido constatadas a partir da administração do MBZ, resultante do seu principal mecanismo de ação que é atuar na correta estruturação do fuso mitótico. Uma vez abalado, estas estruturas formadas por microtúbulos podem resultar em divisões anômalas e causar aneuploidias e a geração de micronúcleos. O limite de dosagem que não produz nenhum destes tipos de efeitos genéticos é o de 115 ng/ml ou em torno de 390 nM. Entretanto, o comitê de mutagenicidade do governo britânico avaliou o potencial risco dos benzimidazoles, dentre eles o MBZ, e constatou que não há nenhum risco para humanos nem para animais dentro das doses terapêuticas, normalmente administradas, e esta constatação foi posteriormente confirmada por um grupo independente de autoridades científicas no assunto (Aardema *et al.*, 1998).

Recentemente, o grupo de pesquisa do *Gregory Riggins* publicou um segundo artigo abordando a presença de 3 diferentes polimorfos da molécula de MBZ nas composições sólidas do fármaco, de acordo com as suas condições de cristalização, e constatou diferentes níveis de eficiência antitumoral entre elas (Bai *et al.*, 2015). Isso pode representar um fator a mais na pesquisa do seu potencial antineoplásico, uma vez que cada fármaco de diferentes indústrias possui concentrações diferentes de cada um dos polimorfismos, o que poderia dar origem a uma série de discrepâncias quanto aos resultados produzidos por este fármaco.

Portanto, baseado em todas as informações abordadas a respeito do MBZ, é notório o seu potencial como estratégia terapêutica no tratamento de diversos tipos tumorais dentre eles o GBM. A ausência de efeitos colaterais severos, a

possibilidade de alcançar concentrações plasmáticas a nível terapêutico, a ausência de grandes restrições temporais para seu período de administração, a possibilidade de associação com condições que permitem uma elevação de sua concentração plasmática, o extenso histórico de administração em humanos sem registro de contraindicações severas e, principalmente, o baixíssimo custo para a obtenção deste fármaco justificam o investimento de muito esforço científico na busca por maiores esclarecimentos do seu potencial quimioterápico.

2. OBJETIVO GERAL

Caracterizar as respostas agudas e crônicas *in vitro* de concentrações terapêuticas do quimioterápico Temozolomida em células de Glioblastoma, utilizando seus padrões clínicos de administração, e a partir daí, investigar os efeitos antitumorais a longo prazo do tratamento combinatório de Temozolomida com as moléculas estabilizadoras de microtúbulos Vimblastina ou Mebendazole.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Consolidar o uso do ensaio “*Cumulative Population Doubling*” (CPD) como uma ferramenta de análise crônica *in vitro* da proliferação celular.

- Estabelecer o uso de um conjunto de parâmetros nos resultados crônicos do ensaio “*Cumulative Population Doubling*” (CPD) como uma nova forma de avaliar a eficácia de intervenções experimentais, especialmente em estudos de desenvolvimento de novas terapias contra o câncer.

- Caracterizar os efeitos agudos e crônicos *in vitro* das concentrações terapêuticas de Temozolomida em células de Glioblastoma, expondo-as ao mesmo regime clínico de administração do quimioterápico em pacientes.

- Avaliar a eficácia antitumoral global de TMZ em células de Glioblastoma, através da aplicação dos novos parâmetros sugeridos nos resultados crônicos de proliferação celular.

- Avaliar *in vitro* o potencial terapêutico adjuvante de Vimblastina e Mebendazole na sua forma isolada ou combinada com Temozolomida.

- Validar o potencial desta ferramenta utilizando as combinações de Temozolomida, Mebendazole e Vimblastina.

3. CAPÍTULO 1 – “A guide for the analysis of long-term population growth in cancer”

A guide for the analysis of long-term population growth in cancer

Andrew O. Silva¹; Karina B. Felipe⁴; Emilly S. Villodre¹; Patricia L. C. Lopez² and Guido Lenz^{1,3*}

1 – Department of Biophysics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre – Brazil

andrewbiomed@gmail.com; kakabettega@yahoo.com.br; emillyvillodre@gmail.com;

2 - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) – Porto Alegre, RS – Brazil

plopez@hcpa.edu.br;

3 – Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre – Brazil (lenz@ufrgs.br)

4 - Department of Clinical Analysis, Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Curitiba-Brazil

*Corresponding author: Guido Lenz

lenz@ufrgs.br

Building 43431 – Lab. 115 - Department of Biophysics.

Bento Gonçalves avenue, 9500.

Zip code: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

++55 51 3308 7613 ++55 51 3308 7620

Abstract

Although cancer is a chronic disease, most of the *in vitro* experiments to assess the effectiveness of intervention are performed in hours or a few days. Moreover, none of the available methodologies to measure cell proliferation are adapted to provide information about the growth kinetic during and after treatment. Thus, the objective of this work is to provide a guide to assess long-term changes in cell population size to be used mainly in cancer research. Cumulative Population Doubling (CPD) graphs based on cell counting for *in vitro* or tumor volume for *in vivo* assays were used to calculate four parameters: Relative end CPD (RendCPD), to quantify the end point analysis of proliferation; relative Area Under Curve (rAUC), to describe the global chronic effect of a treatment; Relative Time to Cross a Threshold (RTCT), to indicate the delay in cell population recovery produced by a treatment; and Relative Proliferation Rate (RPR), to describe the relative regrowth velocity of the cells that survived after treatment. These parameters describe not only the acute and chronic effects of a treatment, but also the behavior of cells that are not eliminated by the treatment, providing crucial information about the growth kinetic of the surviving population. Moreover, the proposed analysis allowed the grouping of independent CPDs experiments quantified at different time points and even the direct comparison of *in vitro* and *in vivo* experiments. Therefore, this new way to analyze long-term outcomes provides a global view of the effectiveness of an intervention, revealing an important tool for long-term studies.

Keywords: Cumulative Population Doubling, long-term analysis, chronic effects, cell proliferation, cell regrowth, cancer resistance

Introduction

Cancer is a chronic disease whose treatment can take months or even years to be concluded. Notwithstanding, *in vitro* experiments to assess response to therapy are usually performed in a short period of time (hours or few days), and methodological options for longer analysis are limited. Moreover, fundamental information about the long-term dynamics of the tested population are lost, since most available assays to measure the *in vitro* proliferative capacity provide static information about the studied population.

The Cumulative Population Doubling (CPD) assay is a very classic methodology of proliferation analysis that displays the progressive variation in the size of a given population over time. This type of assay has been applied to characterize cell senescence, triggered in bovine endothelial cells [1] or other type of cells [2] or to assess the proliferative potential of stem-cells derived from several sources [3]. Nowadays, CPD is used in cell research and cell banks to define the time needed to double the initial population, i.e. average Doubling Time (DT) [4]. Despite all these applications, the potential of this methodology is not fully explored, especially in the field of tumor biology and drug development.

In relation to cancer research, most attention is focused on the acute effects triggered by a given intervention when applied in cancer cell cultures or in animal models. However less is known about the long-term behavior of the few remaining cells that survive an intervention. An extended *in vitro* follow-up of cells after the exposure to different experimental conditions is not usual, despite efforts to understand the growth dynamic of the cell populations that survive to a specific

therapy. Accordingly, long-term experiments with cancer cell culture better correlate with *in vivo* experiments than short-term experiment [5]. Thus, the description of long-term behavior of surviving cells can represent an important aspect of population dynamics in several fields, especially in cancer therapeutics. Therefore, we propose here a new application for the CPD assay and a more detailed way to assess its results, employing new parameters to quantify the long-term effects of an experimental condition for both *in vitro* and *in vivo* models of chronic diseases, such as cancer.

Material and methods

CPD assay of glioma cells

Human U87-MG, U343 and A172 cells, obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD), were plated at a density of 1.5×10^4 cells per well in a 12-well plate, producing a density of 40 cells/mm² (~ 4% confluence), for 5 days with 50 μ M of Temozolomide (TMZ), 5 nM of Vinblastine (VBL) or 500 nM of Mebendazole (MBZ), and analyzed during 28 days. Cells were counted and analyzed using a GUAVA flow cytometer and GUAVA Cytosoft software, respectively. The handling of cells was always performed between 20% and 80% confluence. The re-seeding of cells was performed using an amount of cells needed to reach at least a 4% confluence.

In vivo glioma model

U87-MG gliomas cells were subcutaneously injected into the right flank of 6 to 8-week-old male Balb/C nude mice. Tumor growth was daily measured with a caliper and volume was estimated by the formula: $(\text{length}^2 \times \text{width}) / 2$. When tumors reached approximately 100 mm^3 , mice were randomized into two treatment groups: temozolomide (10 mg/kg/day, intraperitoneal, i.p.) and control group that received vehicle (i.p.) for 10 days. All mice were anesthetized and killed by overdose with anesthetic after tumors achieved approximately 850 mm^3 of volume. The linear regression was applied to the graph to obtain the estimated Cumulative Size Doubling (CSD) of the control group until the end of the experiment, as shown in Figure 3B, to compare with the growth of the treated group. All procedures followed the NIH Guidelines for Pain and Distress in Laboratory Animals and these procedures were approved by the Ethics Committee and Animal Research of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA - No. 140601). Data from the tumor size to generate the CSD were calculated in the same way as the Cumulative Population Doubling (CPD) calculations.

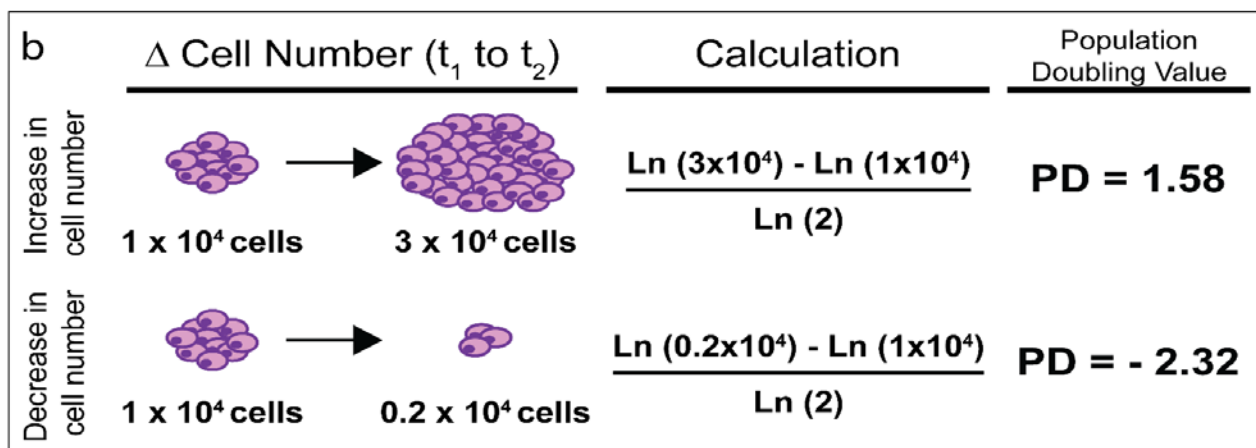
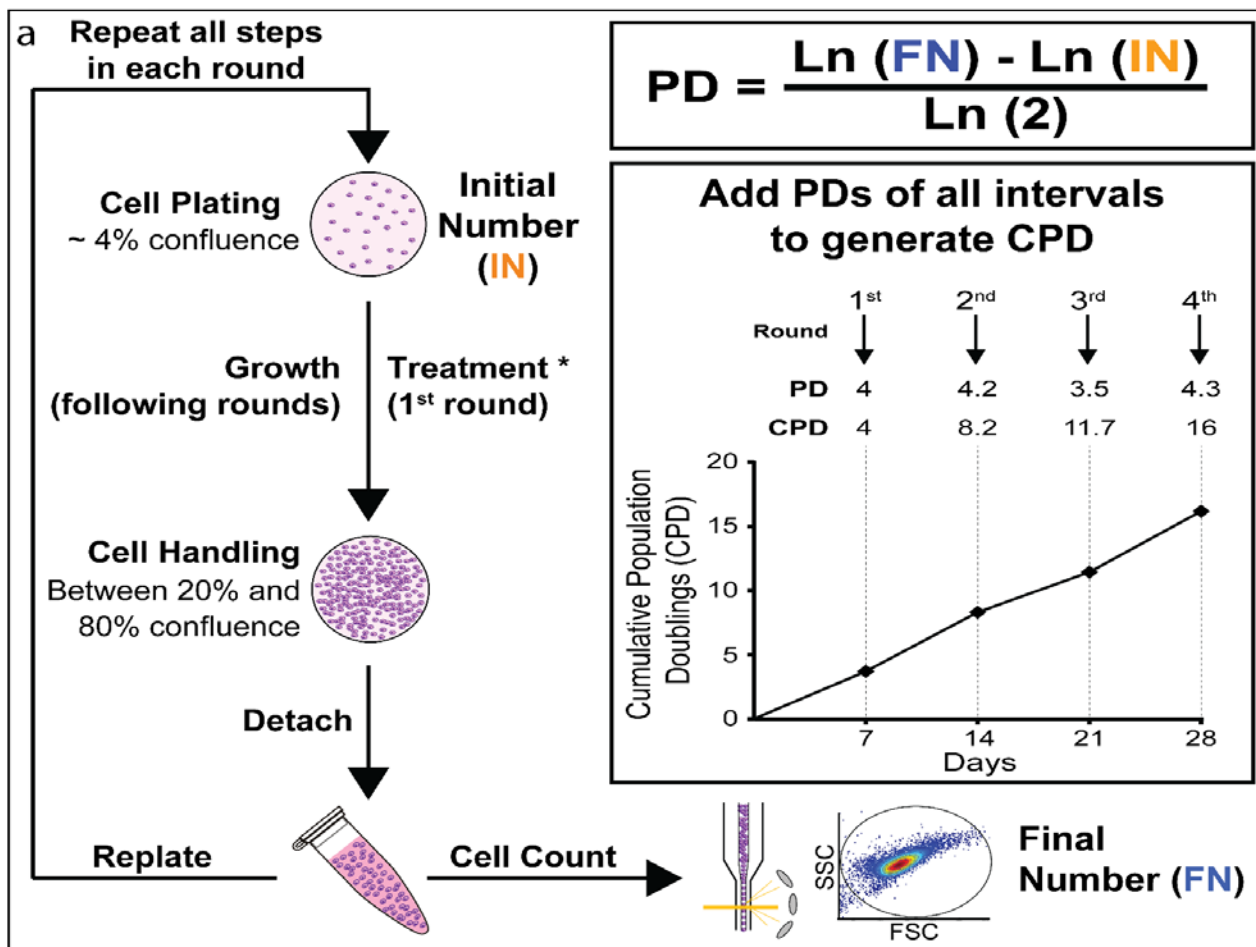


Fig. 1 (a) Basic procedure to perform the Cumulative Population Doubling (CPD) experiment and to plot the outcomes in the CPD graph. * Treatment is normally done in the first round, followed by several rounds without treatment, in order to assess its long-term effects, although treatment can be repeated in the same experiment. The initial number (IN) and final number (FN) originated from the cell plating and the cell counting, respectively, are inserted in the Population Doubling (PD) formula. The sum of successive PDs originates the Cumulative Population Doubling that is plotted in the graph. **(b)** Examples showing increase and decrease in population size, which generate positive and negative PDs, respectively, as shown by the calculation.

Basic protocol for Cumulative Population Doubling (CPD) assay:

1. A defined number of cells were seeded so that confluence was adequate for the planned intervention (See Figure 1);

Comment: Good cell culture quality is essential, since this is a long-term experiment and even minor changes in pH, temperature and other conditions can have a large impact on the final outcome.

2. Cells were exposed to the tested interventions over the chosen period;

Comment: Cell counting during the exposure period should be avoided, since the treatment can affect the cell re-adhesion capacity.

3. Cells were counted at defined time points or, whenever a maximal suggested limit of confluence of 80% was reached .

Comment 1: Treated and untreated groups don't need to be counted at the same days, although a large difference in frequency of counting can add methodological artifacts, due to replating stress;

Comment 2: Avoid counting samples with less than 20% of confluence, allowing a minimal expansion of the population;

Comment 3: Adapt the plating confluence to the proliferation velocity and planned time of analysis, avoiding growth above the suggested limit of confluence.

4. A defined number of cells were re-seeded.

Comment 1: Ideally, the suggestion is to re-seed a similar number of cells plated at the beginning of the experiment. However, small variations in the proportion of replated cells are tolerated to adapt to the time intervals until the next handling.

Comment 2: Replate a minimal amount to produce a confluence higher than ~ 4%, ensuring, thereby, the heterogeneity of the replated cells.

5. Steps 3 and 4 were repeated, whenever necessary, during the whole experiment.

Comment 1: Each interval gives rise to an initial number (IN) and final number (FN) of cells that are applied in the Population Doubling (PD) formula to quantify how many times the population doubles in a given interval. The sum of consecutive Population Doublings (PD) or Size Doublings (SD) produces the Cumulative Population Doubling (CPD) or Cumulative Size Doubling (CSD), respectively;

Comment 2: It is important not to confuse population doubling, which is logarithmic, with fold increase of the cell population, which is not logarithmic – only the former was used in this work.

6. The number of counted and replated cells, for each time interval, was added to the “data input” spreadsheet, in the provided “CPD_table.xlsx” file.

Comment: all CPD or CSD calculation will automatically be performed in the first tab of the provided spreadsheet and a graph will be generated in the “Graph” tab.

7. Graphs and parameters were analyzed in the specific tabs of the excel file.

Results and Discussion

The theoretical basis to interpret long-term CPD results in cancer research

Here we suggested a new application for the Cumulative Population Doubling (CPD) assay on the analysis and interpretation of data from long-term experiments especially in cases where the interventions induce decrease in the population size. For this, we propose four parameters to evaluate the overall effects of an intervention in the size of the initial population and the dynamics of proliferation recovery of the remaining subpopulation (Figure 2). First, the simplest proposed parameter is calculated through a direct relation of the CPDs of the treated and control populations at the end of a relevant time frame to produce the **relative end CPDs (RendCPD)**. A relevant time frame, for example, mimics a standard therapy regimen, which for glioma patients using the chemotherapeutic agent TMZ is composed of five days of treatment followed by 23 days of recovery, totaling a cycle of 28 days [6]. Therefore, here we use 5 days treatment followed by 23 days of analysis and RendCPD was calculated on day 28, representing the final effect of a cycle of treatment. A comparative analysis using RendCPDs of subsequent cycles of treatment can represent a simple way of determining if multiple cycles of exposition using the same intervention, in cells or patients, become more or less effective over time. To obtain the RendCPD, it is important to have the CPD value of the last day of analysis for both treated and control groups. The end CPD can be estimated from the linear regression in case all samples are not analyzed until the last day of the experiment. Moreover, the lower limit CPD

($_{LL}CPD$) value is defined by the smallest value of CPD that can be obtained, which is represented by the theoretical condition of one cell. Zero can not be used since logarithm of zero is not valid. This $_{LL}CPD$ is then subtracted from the two last CPD values of treated and control groups and their ratio produces the $RendCPD$ (Figure 2, box 1).

The **relative Area Under Curve (rAUC)** of treated in relation to control population is an overall description of all effects produced by an intervention on the population size along the analyzed time. To calculate this parameter, it is necessary to calculate the area delimited by the $_{LL}CPD$ and the CPD curve of the treated and control groups. Next, the ratio between treated and control AUCs is used to produce the rAUC (Figure 2, box 2).

In order to better evaluate the dynamics of the populations not eliminated by the interventions, we propose the **Relative Proliferation Rate (RPR)** parameter, representing the ratio of the angular coefficient (a) of treated and untreated groups, obtained through the linear regression ($Y = ax + b$) of their CPD curves (Figure 2, box 3). To calculate the linear regression of both conditions, only the portion of the graph presenting a constant linear CPD growth should be used (Figure 2, green line). If the growth is not linear over the whole period analysed, select only the last interval with the highest angular coefficient calculated from more than two analyzed point (Figure 2, red line), since the idea of the RPR parameter is to assess the maximal proliferation capacity of the cells that survived therapy. RPR is an important parameter to be considered, since it can indicate the selection of a resistant subpopulation whose proliferation velocity can be different from the initial population. Important to stress that the angular coefficient obtained

in the linear regression formula represents the inverse of the well established concept of average Doubling Time (DT), i.e. the time required to double a specific population in number or size.

Lastly, the **Relative Time to Cross a Threshold (RTCT)** indicates the ratio of time needed to cross a CPD threshold of the untreated and treated population, based on their linear regressions (Figure 2, box 4). Through RTCT parameter, it is possible to reveal how much a treatment delays the regrowth of the treated population in relation to the control group, which is a crucial piece of information in cancer therapy, to define, for example, the best interval between cycles of treatment. To choose a relevant threshold to analyze the regrowth lag of the treated group, a specific PD value where both treated and untreated groups have the maximal angular coefficient should be considered.

All calculations to determine the linear regression and selection of thresholds are provided in the “CPD_table.xlsx” spreadsheets. There, we also show an example to illustrate the calculations of the four parameters.

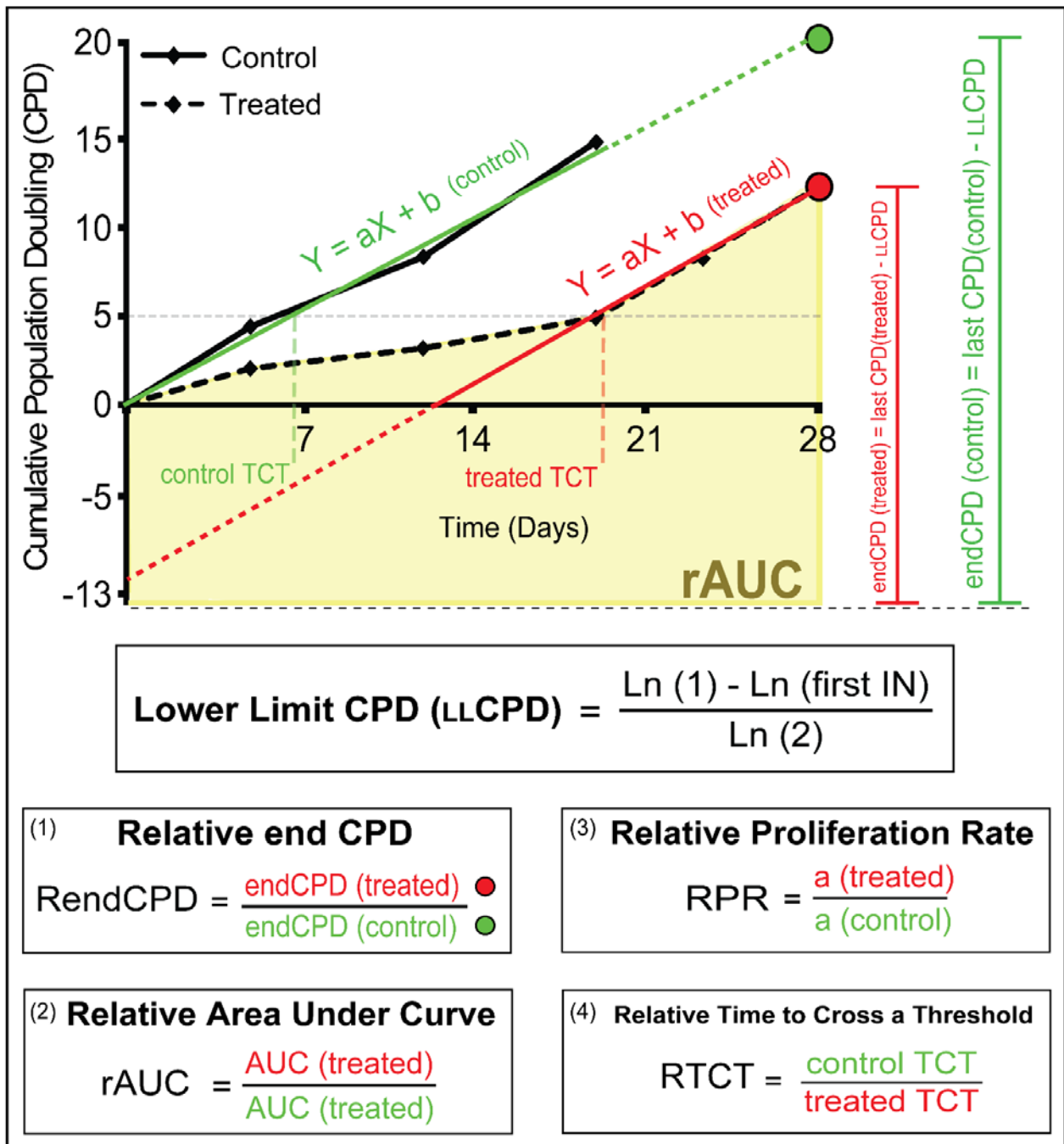


Fig. 2 Procedure to calculate the parameters to evaluate CPD graphs. A hypothetical CPD graph shows a comparison between proliferation profiles of treated and control group. To obtain RendCPD and rAUC, first determine the last CPD values for treated and untreated conditions (red and green circles) and calculate the lower limit CPD (LLCPD). Next, subtract the LLCPD from the last CPDs to obtain the endCPD and obtain the area under the treated (yellow) and control curve. The ratio between treated and control endCPD and AUC values determines RendCPD (box 1) and rAUC (box 2), respectively. To obtain RPR and RTCT, the linear regression of both treated and control groups must to be calculated, using the higher angular coefficients of the last two or more CPD intervals. RPR (box 3) is the ratio of the angular coefficients of treated and control groups. To calculate RTCT, a threshold must to be set on a CPD value where both treated and control conditions present the highest velocity of proliferation. From the linear regression equation of each condition, calculate the Time to Cross the Threshold (TCT) and the ratio between the control and treated TCT determines the RTCT (box 4).

Applications of these parameters

The four parameters were proposed to better quantify and compare the effectiveness of different interventions, to assess the response of different populations to a given treatment as well as different cell types, or even to compare the effects of a specific intervention in *in vitro* and *in vivo* studies. To illustrate some applications of these parameters, we evaluated the *in vitro* (Figure 3A) and *in vivo* (Figure 3B) response of the glioma cell line U87-MG to TMZ treatment, where number of cells and tumor volume were assessed, respectively. Comparing the *in vitro* and *in vivo* conditions, the *in vivo* rAUC and RendCPD parameters were lower than the values obtained from the *in vitro* experiment (Figure 3C), which might be due to the longer treatment of the former (10 days of TMZ) in relation of the latter (5 days of TMZ). RPR was very similar, suggesting that the relative proliferation capacity of the surviving population was not affected by the experimental model.

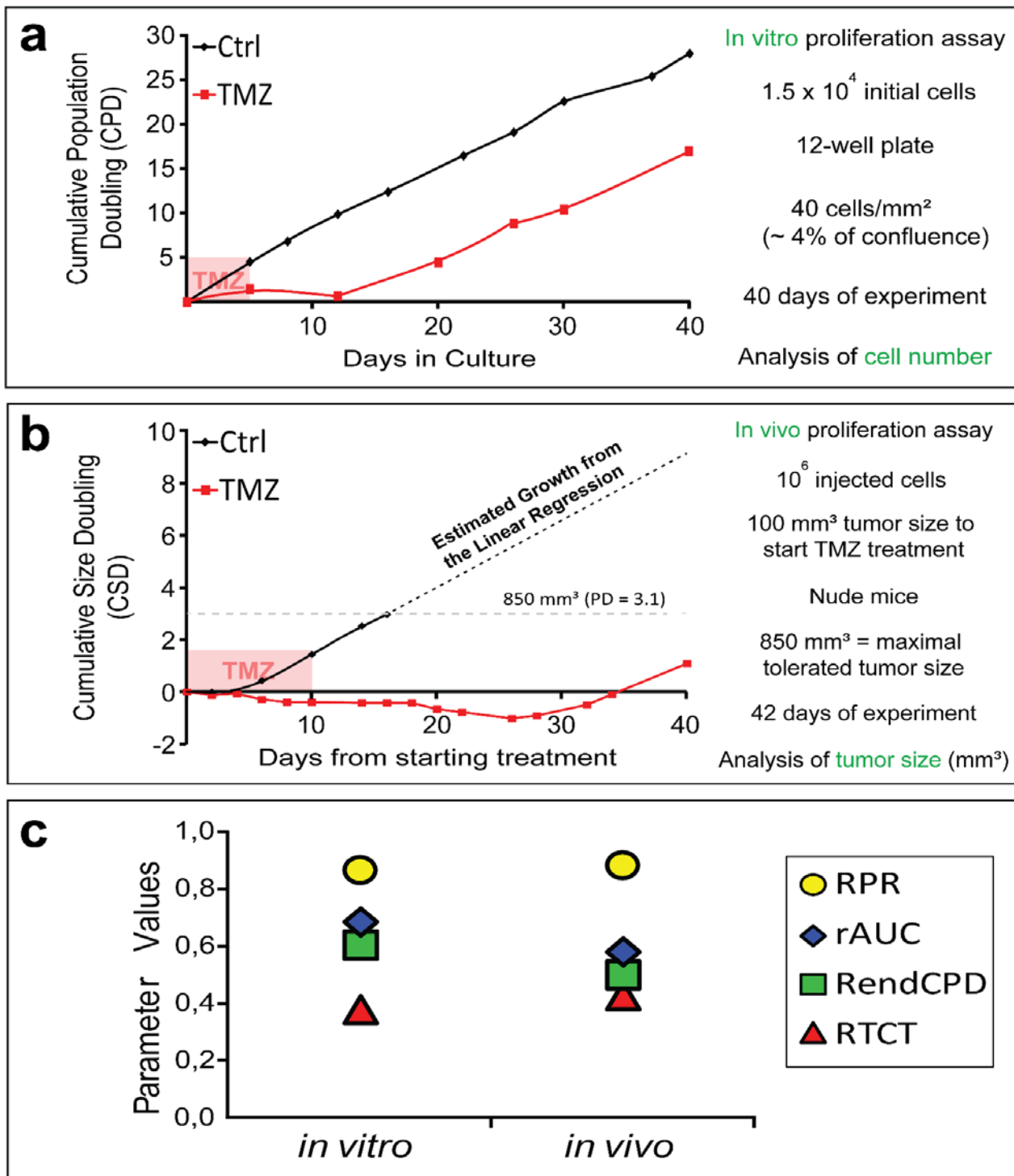


Fig. 3 *In vitro* versus *in vivo* CPD evaluation using the proposed parameters. (a) *in vitro* CPD of U87MG glioma cells treated with clinically relevant doses of chemotherapeutic agent Temozolomide for 5 days (red box) and analyzed through cell counting using flow cytometry in the determined days; (b) *in vivo* CSD of tumor size of U87 Glioma cells subcutaneously injected in nude mice, treated with Temozolomide for 10 days (red box) and analyzed until day 40. The linear regressions were calculated in the constant and progressive increasing phase of treated and control group and the parameters were calculated. (c) CPD parameters for *in vitro* and *in vivo* results.

Next, the *in vitro* long-term effects of three different pharmacological interventions were tested in three different glioma cell lines along 28 days, in three independent experiments for each condition. However, when analyzed at different time points along the experimental period, the growth curves can normally not be integrated in a single result, since averages values can only be calculated from data collected at the same time point (Figure 4 a, b and c, left). The application of the four proposed parameters in each growth curves, performed in different time points, allows an integrated analysis of independent experiments, since all parameters can be independently calculated for each curve (Figure 4, middle). The average and standard deviation convert several information in a single value, generating a single graph for all three independent experiments (Figure 4, right). Therefore, the parameters allow the integrated analysis of experiments performed in different times and with different experimental models as all four parameters are relative to the control group of the same experiment.

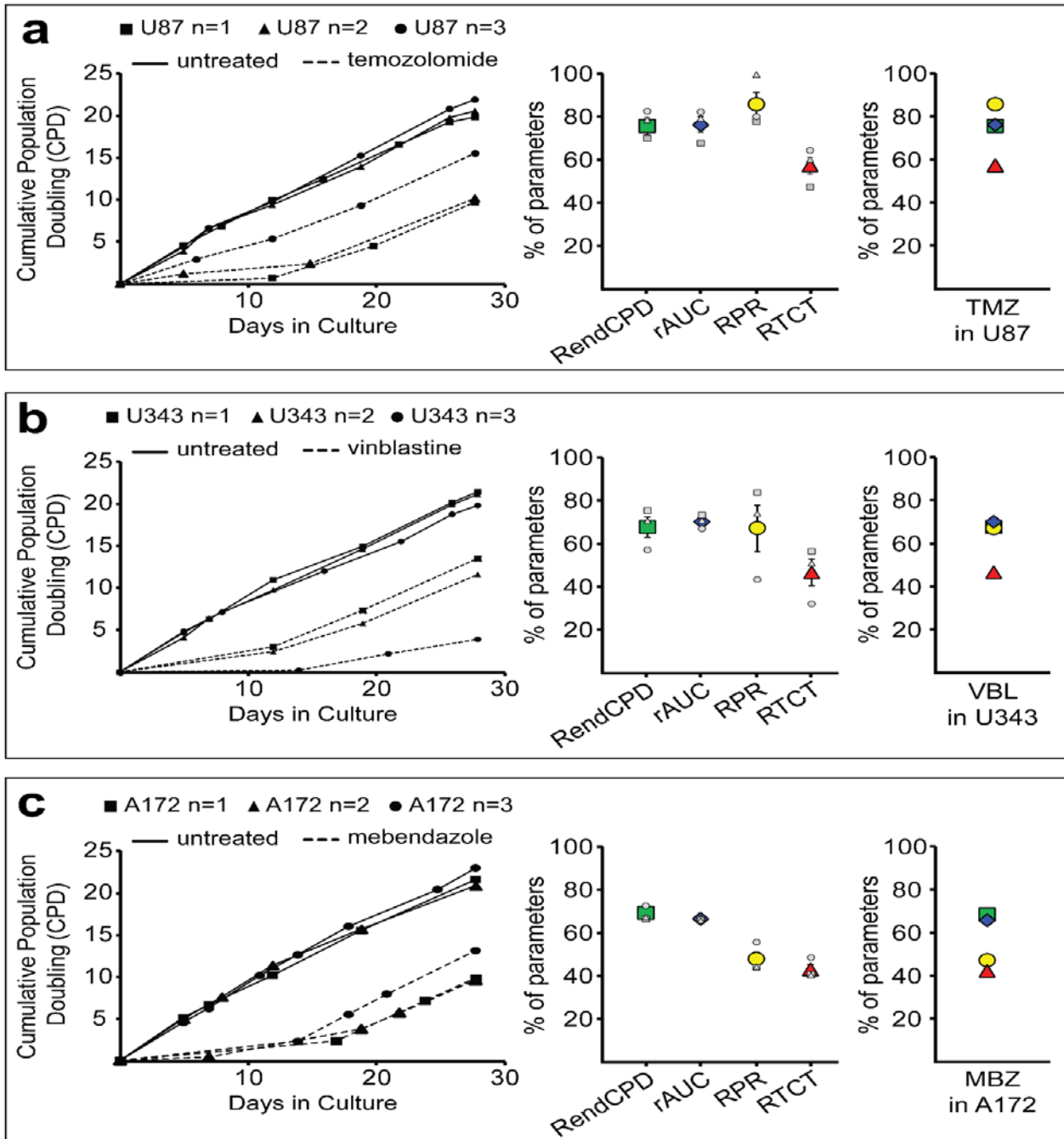


Fig. 4 Unification of independent experiment outcomes using the proposed methodology to evaluate the effectiveness of different drugs in different cells. Three independent experiments were performed for each cell line, evaluating the cell proliferation of 5 days-treated and control cells during 28 days (left graphs). All parameters were calculated for each experiment (triangles, circles and squares in gray color) using the proliferation profile of treated and control groups. The average and standard error were calculated for each parameter (middle graphs). Only the averages of each parameter were plotted in an independent graph to show how different treatments produce different profiles (right graph). (a) U87-MG glioma cells were treated with TMZ, (b) U343 glioma cells were treated with Vinblastine and (c) A172 glioma cells were treated with Mebendazole. (Green square – RendCPD; blue diamond – rAUC; yellow circle – RPR; and red triangle – RTCT).

Conclusion

In this work, we proposed a new way of analyzing CPD data through the four parameters to assess the CPD profiles. With these parameters, it was possible to quantify both short- and long-term effects generated by cancer therapies and these could be applied to any other experimental condition that interfere in the population size. We have shown the potential of the proposed parameters to evaluate and compare *in vitro* and *in vivo* effects and unifying several independent experiments acquired in different times. Potentially, any measurement that reflects cell population size, such as tumor markers, circulating antibody or tumor size based on imaging in cancer patients, could be assessed using this set of proposed parameters. Additionally, the proposed analysis can be applied not only to cancer, but to any population that changes over time (bacteria, fungus, insects, flowers, seeds...), especially in the cases that a large reduction and recovery of the population is observed.

Acknowledgements

Structural support provided by Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) for the *in vivo* experiments. This work was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Universal), 458139/2014-9; Programa de Apoio a Núcleos Emergentes of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (PRONEM/FAPERGS) 11/2072-2; International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology – Brazil (ICGEB BRA) 11/01; and Programa Binacional de Terapia Celular of

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROBITEC/CAPES) 907/2012. AOS, and ESV are recipient of a CAPES fellowship; GL KBF are or were recipient of CNPq fellowships.

Competing Interests

All authors declared no conflict of interest.

References

- 1 Mueller SN, Rosen EM, Levine EM: Cellular senescence in a cloned strain of bovine fetal aortic endothelial cells. *Science* 1980;207:889-891.
- 2 La Rocca PJ, Rafferty KA, Jr.: Kinetics of chick embryo cell types in culture. *Journal of cellular physiology* 1982;113:203-210.
- 3 Bruce SA, Deamond SF, Ts'o PO: *In vitro* senescence of syrian hamster mesenchymal cells of fetal to aged adult origin. Inverse relationship between *in vivo* donor age and *in vitro* proliferative capacity. *Mechanisms of ageing and development* 1986;34:151-173.
- 4 Bard J: *Tissue culture, methods and applications*. Academic Press, 1974.
- 5 Augustine CK, Yoo JS, Potti A, Yoshimoto Y, Zipfel PA, Friedman HS, Nevins JR, Ali-Osman F, Tyler DS: Genomic and molecular profiling predicts response to temozolomide in melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009;15:502-510.
- 6 Strik HM, Marosi C, Kaina B, Neyns B: Temozolomide dosing regimens for glioma patients. *Current neurology and neuroscience reports* 2012;12:286-293.

4. CAPITULO 2 – “The regrowth kinetic of the surviving population is independent of acute and chronic responses to temozolomide in Glioblastoma cell lines”

The regrowth kinetic of the surviving population is independent of acute and chronic responses to temozolomide in Glioblastoma cell line

Andrew Oliveira Silva ^a; Eloisa Dalsin ^a; Giovana Ravizzoni Onzi ^a;
Eduardo Cremonese Filippi-Chiela ^{a,1} and Guido Lenz ^{a,b}

a – Department of Biophysics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS – Brazil

b – Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS – Brazil

andrewbiomed@gmail.com dalsineloisa@gmail.com

eduardochiela@gmail.com gioonzi@gmail.com

Corresponding author: [Guido Lenz \(lenz@ufrgs.br\)](mailto:lenz@ufrgs.br)

Department of Biophysics, Rua Bento Gonçalves, 9500

Prédio 43431 – Lab. 115

91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

++55 51 3308 7613 ++55 51 3308 7620

Abstract

Chemotherapy acts on cancer cells by producing multiple effects on a cell population including cell cycle arrest, necrosis, apoptosis and senescence. However, often a subpopulation of cells survives and the behavior of this population, which is responsible for cancer recurrence, remains obscure. Here we investigated the in vitro short- and long-term responses of six glioblastoma cell types to clinically relevant doses of temozolomide for 5 days followed by 23 days of recovery, mimicking the standard schedule used in glioblastoma patient for this drug. These cells presented different profiles of sensitivity to temozolomide with varying levels of cell cycle arrest, apoptosis, necrosis, autophagy and senescence, followed by a regrowth of the surviving cells. The initial reduction in cell number and the subsequent regrowth was analyzed with four new parameters applied to cumulative population doubling (CPD) curves that describe the overall sensitivity of the population and the characteristic of the regrowth: the relative end point CPD (RendCPD); the relative area under curve (rAUC); the relative time to cross a threshold (RTCT); and the relative proliferation rate (RPR). Surprisingly, the kinetics of regrowth were not predicted by the mechanisms activated after treatment nor by the acute or overall sensitivity. With this study we added new parameters that describe key responses of glioblastoma cell populations to temozolomide treatment. These parameters can also be applied to other cell types and treatments and will help to understand the behavior of the surviving cancer cells after treatment and shed light on studies of cancer resistance and recurrence.

Key words: temozolomide; glioblastoma; cumulative population doubling; chronic analysis; surviving cells.

Introduction

Grade IV astrocytoma (Glioblastoma; GBM) is a classic example of a tumor type whose patients have experienced little improvement in survival prognosis since chemotherapy was introduced as adjuvant therapy to the standard surgery and radiotherapy [1]. Despite highly intense therapeutic regimen including surgical resection, followed by radio and chemotherapy, tumors invariably recur and only few months are added to the patients' life by this treatment [1], leading to a five-year survival rate lower than 5% [2].

Standard GBM chemotherapy employs the alkylating agent temozolomide (TMZ), which acts through the methylation of nucleotide residues in DNA on position *N7* (70%) of guanine, *N3* (9%) of adenine and O^6 of guanine (~6%) [3]. The first two adducts that represent the most frequent changes caused by TMZ, are quickly repaired by the base excision repair (BER) mechanism [4]. On the other hand, methylation of O^6 of guanine is repaired by the specific repair enzyme called O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) [5], which removes the alkyl groups at O^6 - guanine [6], thus directly eliminating this toxic DNA modification. The high expression of this enzyme represents the most common mechanism of resistance to TMZ in GBM cell lines [7]. However, despite the prognostic importance of the methylation status of the MGMT promoter for the response to TMZ, inhibition of MGMT did not significantly increase the survival of recurrent GBM patients treated with TMZ [8].

If not repaired, the methylation on O^6 position leads to a mispairing of O^6 -methylguanine with thymidine and futile cycles of DNA repair, through mismatch

repair system (MMR). This leads to extensive DNA strand breaks and consequent cellular responses, which include an initial cell cycle arrest [9], as an attempt to provide more time to repair the DNA-damages, followed by apoptosis [10] or senescence [9], if the damages are not fully repaired [4]. Other mechanisms can be triggered by TMZ in glioblastoma, such as autophagy [11, 12], which can interfere in the survival of cells to TMZ. Thus, malfunction of MMR repair system represents a crucial mechanism of resistance to alkylating agents, since this mechanism is responsible for detecting and transmitting the damage signal to downstream cell signaling pathways [13].

Despite this set of classical and well described acute effects produced by TMZ in several GBM cell lines, doses of TMZ found in the plasma of patients almost never completely eliminate all cells in culture and no reports in the literature studied in vitro the surviving subpopulation after the TMZ treatment. Moreover, several works describe the acute effects of TMZ in GBM cells using treatment schedules and dosage of TMZ far from clinical reality, limiting the relevance of this data.

Therefore, in this work we assessed several early cellular responses using therapeutically relevant doses of TMZ, in six GBM cell lines, during 5 days and monitored the remaining cells in the absence of drug for additional 23 days, ending one cycle of 28 days of TMZ treatment, representing the most common schedule used in GBM patients [14]. An extended analysis of cell proliferation revealed long lasting effects of TMZ, and interesting kinetics of regrowth of the surviving population.

Material and Methods

Cells and Drugs.

Human GBM cell lines U87-MG, A172, U251-MG, U138-MG and a murine GBM cell line C6 were obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). U343-MG_a was gently provided by Dr. Paulo Roberto Dauria Vieira de Godoy (Department of Genetics, University of São Paulo (USP), Brazil) [15]. All culture material and reagents were purchased from Gibco Laboratories (Grand Island, NY, USA). Cells were cultured in DMEM low glucose supplemented with 10% of Fetal Bovine Serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin and 0.1% amphotericin B at 37°C and 5% CO₂ in a humidified incubator. TMZ was purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Acros Organics, NJ, USA). Cells were treated according to scheme in Figure 1.

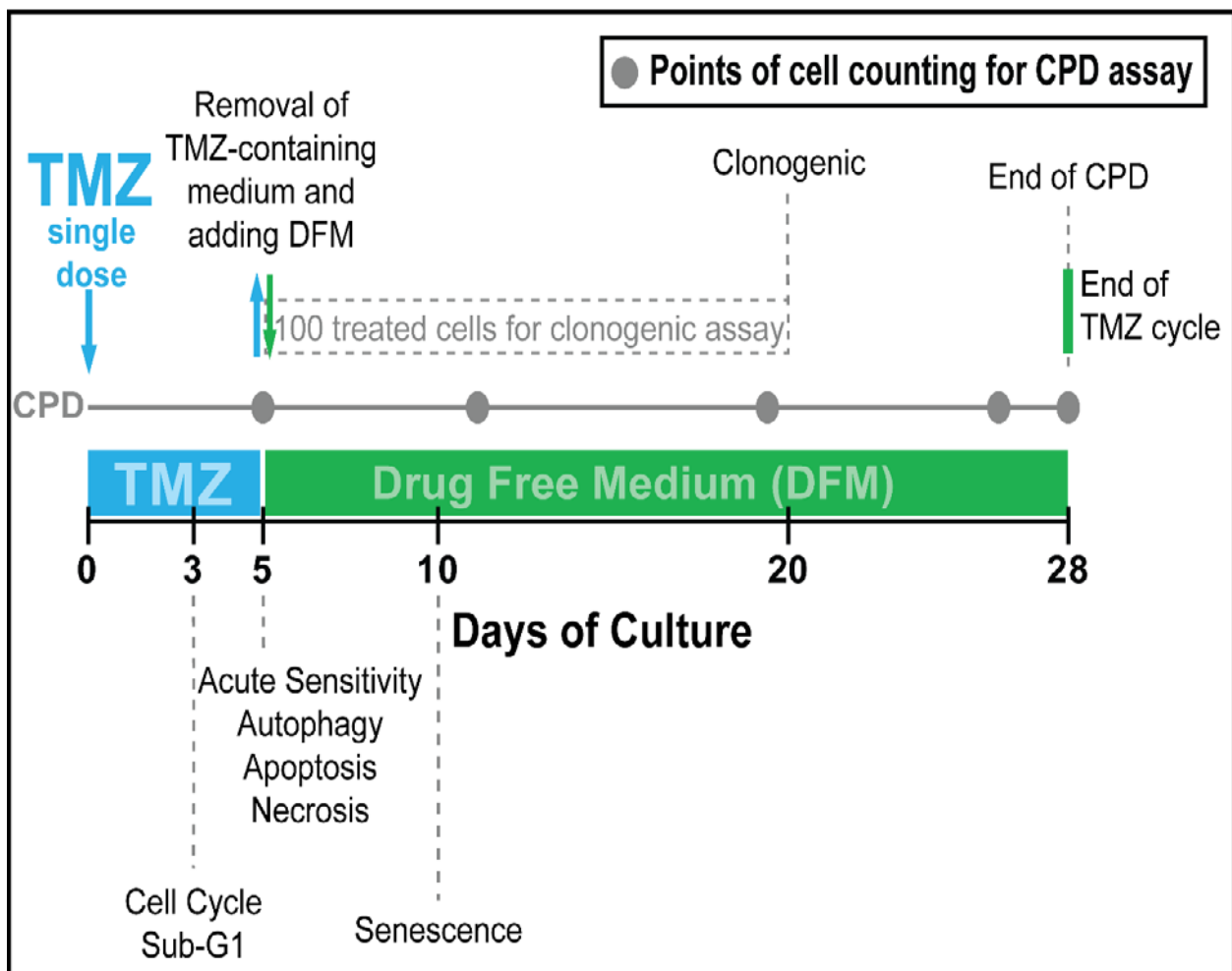


Figure 1 – Experimental design of Temozolomide treatment in GBM cells. Schematic figure representing the *in vitro* GBM treatment regimen established based on standard therapeutic regimen applied in patients with grade IV Glioma (GBM). The timeline shows the specific points when all analysis was performed.

Cell cycle distribution, autophagy and senescence analysis.

For cell cycle distribution analysis, cells were seeded at 4×10^4 cells/well in a 12-well plate and treated with TMZ $50 \mu\text{M}$ for 3 days. After, cells were fixed in ice-cold ethanol 70% (v/v in PBS) for at least 2 hours at -20°C , washed with PBS, and stained with a solution containing $50 \mu\text{g/ml}$ PI, 0.1% Triton X-100 and $50 \mu\text{g/mL}$ RNase for 30 min. Quantification of autophagy levels was done measuring the generation of acidic vacuolar organelles (AVOs), a typical feature of a late

phase autophagy [16], through Acridine Orange (AO) staining. This marker produces a red fluorescence in AVOs (mainly late autophagosomes) and a green fluorescence in the rest of the cell. Cells were incubated with AO (2.7 μ M) for 15 minutes at room temperature and quantified no later than 20 min after start of incubation. The above mentioned methods were analyzed with a GUAVA flow cytometer plus GUAVA Cytosoft software.

SA-beta-gal enzyme activity was measured by seeding 10^4 cells/well in a 12-well plate and the assay was performed at day 10 (Figure 1) as described [17]. Briefly, cells were washed with PBS, fixed with 2% paraformaldehyde for 30 min at room temperature and incubated with fresh SA-beta-gal staining solution (1 mg/mL X-gal (Sigma), 40 mM citric acid/sodium phosphate (pH 6.0), 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 150 mM NaCl, and 2 mM $MgCl_2$) for 8–12 h at 37°C. Cells were then marked with a solution containing 300 nM DAPI and 0.1% triton X-100 (v/v in PBS) for 15 min at room temperature and micrographed.

Nuclear Morphometric Analysis (NMA).

The nuclear morphometric analysis is a technique developed by our group [18] to screen several cell responses to therapy. Nuclei with both large and regular phenotype indicate a senescence state [18]. Cells were seeded and treated as described in SA-beta-gal assay. Five to ten fluorescent micrographs from DAPI stained cells were obtained from each well, followed by quantification of around 500 nuclei using the Software Image Pro Plus 6.0 (IPP6 - Media Cybernetics,

Silver Spring, MD) and the percentage of each nuclear phenotype was determined as described, considering only difference in the nuclear area [18].

Clonogenic Assay.

Cells were treated accordingly to Figure 1, using TMZ doses up to 75 μ M. On day 5, remaining cells were counted by flow cytometry and 100 cells/well of each tested TMZ dose were seeded in a 6-well plate to evaluate the ability of the remaining cells to form colonies after 5 days of TMZ treatment. On day 20, colonies were fixed with methanol, followed by staining with 0.1% of crystal violet. The number of colonies was counted and their highest diameter was measured using Image Pro Plus 6.0 Software. The relative amount of colonies was used in Figure 4 considering the control as 100%. (n=2)

Acute sensitivity and Cumulative Population Doublings (CPD).

Cells were seeded in 24-well plates, treated and analysed as indicated in Figure 1. Human GBM cells were plated at a density of 1.5×10^4 cells/well and murine GBM cells (C6) at density of 0.8×10^4 cell/well and treated. On specific days, a small proportion of cells was used to quantify, by flow cytometry, the amount of remaining cells and a part of the same sample was re-seeded. The acute sensitivity was obtained through the ratio between the absolute amount of cells in the treated group in relation to the control on day 5. EC50 was calculated using excel with ED50 plus v1.0 (INER/México) (n=3). To obtain the population doubling (*PD*) values, the initial and final values of cells in each time interval was plotted in a formula: $PD = (\ln (FN) - \ln (IN)) / \ln 2$, where *FN* (Final Number)

corresponds to the number of cells in the well at time of passage and *IN* (Initial Number) is the number of cells seeded at the previous passage [19, 20]. The cumulative values of PD were plotted in a graph versus days of culture. The analysis of the CPD curves was recently described by our group and more details on how to calculate the Relative end CPD (RendCPD), the relative Area Under Curve (rAUC), the Relative Proliferation Rate (RPR) and the Time to Cross a Threshold (TCT) of each proliferation curve can be obtained in the following reference [20].

Statistical Analysis

The results are presented as a mean value \pm standard deviation. All experiments were performed at least three times, except when informed in the legends. Student's t-test was used to determine the significance of the differences between the treated group and its control. * for $p < 0.05$ and ** for $p < 0.001$ were considered as statistically significant.

Results

The standard schedule of TMZ used in GBM patient is done in multiple cycles of 5 days treatment followed by 23 days of recovery [14]. When TMZ is administered at the highest clinically tolerated dosage (200 mg/m²/day), the maximum plasma concentration achieved is 50-80 μ M [21]. Therefore, using concentrations up to this therapeutically relevant condition, the five-days dose

response curves showed that the analyzed cell types ranged from highly sensitive (U343) to considerably resistant (U138), but in no cell type this condition eliminated all tested cells (Figure 2A). Despite presenting low μM EC50s, even for the more sensitive cells, a considerable proportion of cells survived to five-days treatment using the highest tested dose of TMZ (75 μM) (Figure 2B).

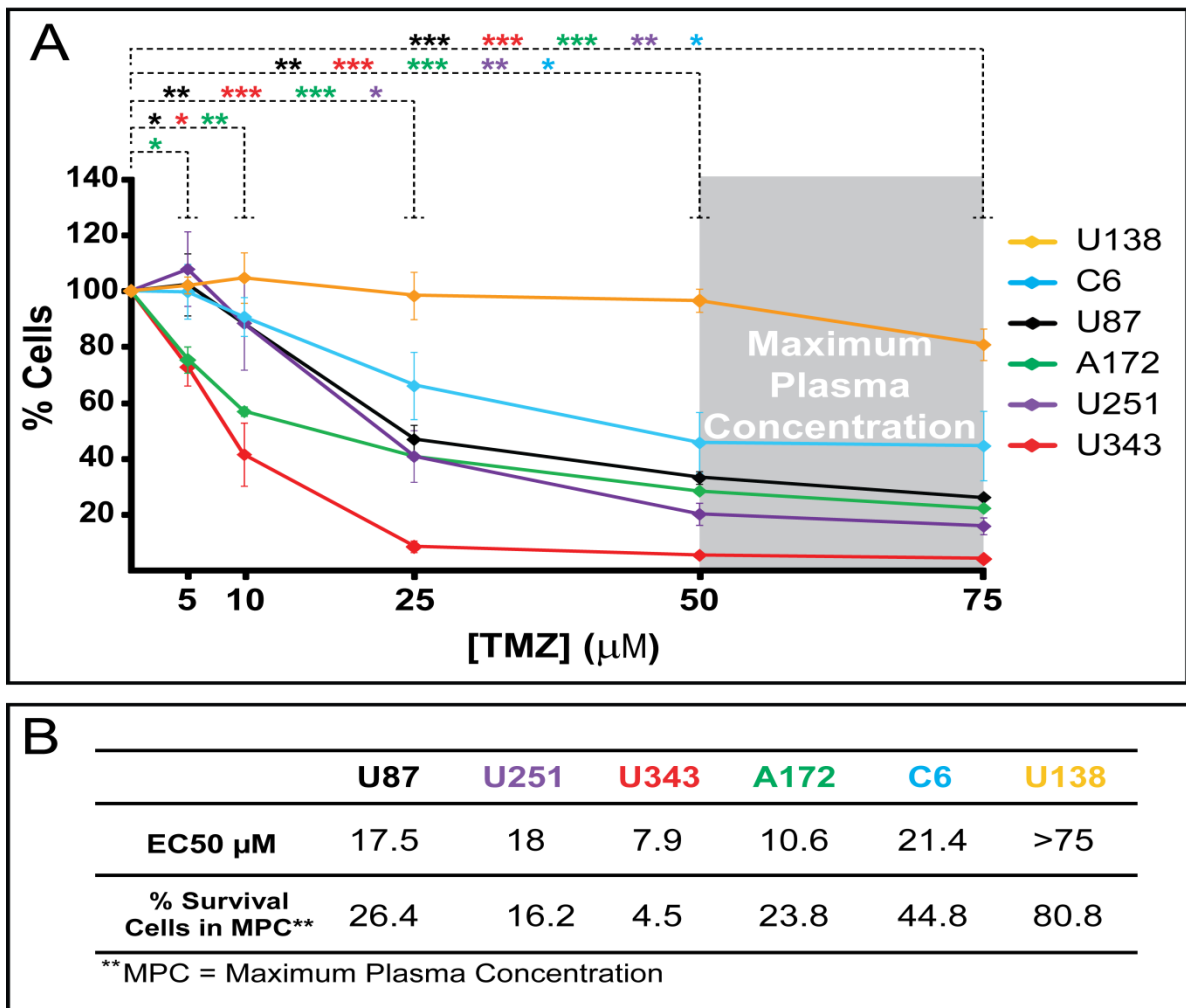


Figure 2 – TMZ caused dose-dependent cell number decrease in GBMs. GBM cells were treated with TMZ at doses 5, 10, 25, 50 and 75 μM for 5 days, as a single administration on day 0. (A) Percentage of viable cells was defined on day 5 after treatment by cell counting using flow cytometry. The grey box represents the range of Maximum Plasma Concentration (MPC) achieved when highest tolerated dosage is administered in patients. Statistical significance is represented by colored asterisks according to the color of each GBM cell. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). (B) Table shows the percentage of surviving cells in MPC condition (75 μM) and half maximal effective concentration (EC50).

In order to evaluate if the TMZ treatment produces cytotoxic or cytostatic effects that outlast their direct contact with the cells, we followed the GBM cells over the period corresponding to one clinical cycle of TMZ treatment. Cumulative population doublings (CPDs) using 15,000 initial cells showed a significant decrease in the cell number for A172, U251, U87 and U343 cells treated with 50 μ M TMZ during the 5 days (Figure 3A and 3B). After drug withdrawal, these cells still decreased their number, indicating a long lasting effect of TMZ. However, after 12 days, a subpopulation of cells recovered the proliferative capacity, which lasted until the end of experiment, even for the most acutely sensitive GBM cell (U343). C6 and U138 GBM cells were almost completely unaffected by this treatment (Figure 3C). The most commonly used assay for the long-term evaluation of the effects of drugs, the clonogenic assay, when performed with 100 cells that were present after the treatment period, indicated an absence of colonies for U87 and U343 to TMZ in doses as low as 25 μ M for 5 days (Supplementary Figure 1). This is probably due to the lower number of cells used for this assay (100 cells) in comparison to the CPD assay, in which started with 15,000 cells.

To better describe the overall profile of cell number along a cycle of TMZ treatment and to evaluate the proliferative behavior of the surviving subpopulation, we recently proposed a set of four parameters to quantitatively summarize the main information provided by Cumulative Population Doubling (CPD) outcomes [20], summarized in Figure 3D and briefly explained below: (1) the **Relative end CPD (RendCPD)** that uses the ratio of the final CPD value of both treated and control group to compare the final effect of a treatment, normally analyzed in the time corresponding to the last day of a cycle of treatment; (2) the **relative Area**

Under the Curve (rAUC), which represents an average of all effects on the size of the population produced by the treatment and quantifies the initial cytotoxic or cytostatic effects, as well as the long-term regrowth of the surviving cells; (3) the **Relative Time to Cross a Threshold (RTCT)** that is used as an indicator of the capacity of a treatment to slow down the regrowth of a treated tumor, which summarizes all the initial antiproliferative effects of treatment together with the regrowth velocity; and (4) the **Relative Proliferation Rate (RPR)** that identifies the capacity of the treatment to alter the proliferation velocity of the cells that regrow, represented by the ratio between the angular coefficients (a) of treated and control groups obtained through their linear regression fits. Important to state that RPR and RTCT are calculated only when a surviving population recovers the proliferative capacity.

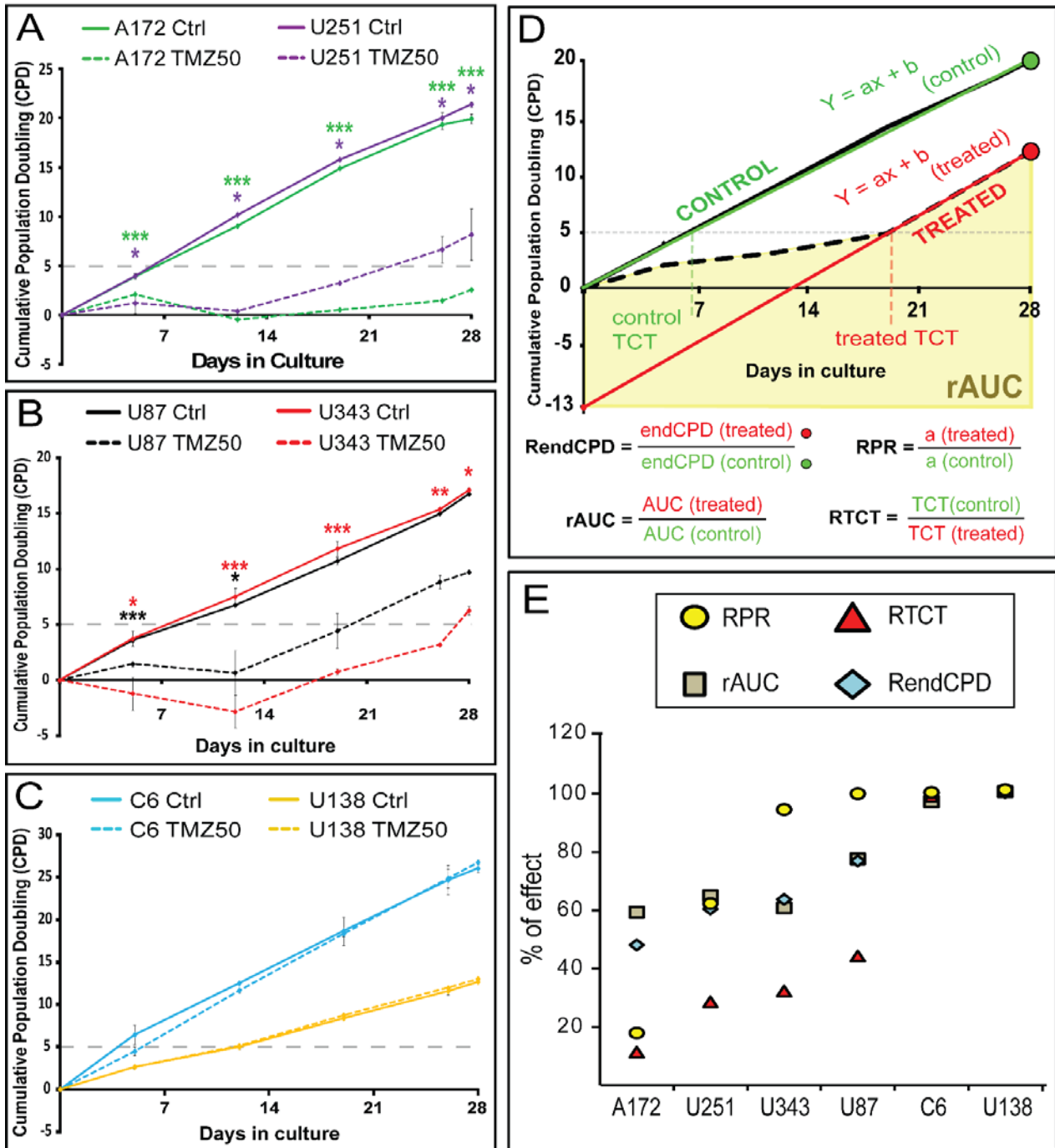


Figure 3 – *In vitro* chronic analysis revealed a delayed effect of Temozolomide, a recovery of proliferative capacity of surviving cells and a gradient of chronic cell response. Cumulative Population Doubling (CPD) Graphs of (A) A172 and U251; (B) U87 and U343; and (C) C6 and U138 showed the proliferation profile along 28 days, where GBM cells were treated and counted according to Fig. 1. (D) Schematic representation of the parameters relative end point CPD (RendCPD), relative Area Under Curve (rAUC), Relative Proliferation Rate (RPR) and Relative Time to Cross a Threshold (RTCT); (E) An effectiveness classification of the 6 GBM cells using the average of the four CPD parameters. Student's t-test Statistical Analysis was applied in the CPD graphs, comparing each point of treated to its control condition (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

In order to compare the long-term outcomes among the tested GBM cells, the four parameters for each cell type were plotted in a single graph and their integrative analysis revealed the existence of a gradient of long-term sensitivity to TMZ (Figure 3E) that was different from the acute sensitivity (Figure 2A). In the most chronically sensitive GBM cell tested (A172), all CPD parameters were strongly reduced. This GBM cell line presented a large initial decrease in PD and the remaining cells grew significantly slower than the untreated counterparts, as illustrated by the low RPR (yellow circle), indicating a prolonged effect of TMZ or a selection of a less proliferative subpopulation. Furthermore, a low RTCT value of A172 indicated a strong delay to reach a specific population size after treatment due to the large initial decrease in cell population and the slow recovery of the surviving subpopulation. Moreover, this combination of acute cytotoxicity with slow regrowth translated in a low rAUC and RendCPD after 28 days.

U343 and U251 have very similar rAUC, RendCPD and RTCT values, but U343 has a much higher RPR than U251. Whereas the surviving subpopulation maintained around 62% of proliferation velocity of the untreated cells in U251, in U343 this velocity was 94%, despite a much higher reduction in cell number in U343 until day 12 when compared to U251. U87 cell had a RPR very close to 100%, but the initial toxicity produced a reduction in the other CPD parameters. C6 and U138 were almost completely resistant to TMZ, which is indicated by all parameters being close to 100%.

Next, we set out to measure the commonly evaluated responses of cancer cells to TMZ 50 μ M. U87, U343 and U251 cells presented a robust G2/M arrest, with the latter also experiencing an increase in the proportion of sub-G1 cells 3

days after treatment (Supplementary Figure 2). After the 5 days of treatment, cell cycle distribution indicated a high proportion of arrest in A172 cells and median and high proportion of sub-G1 cells for U251 and U343 cells, respectively. All cells, except the resistant cell U138, increased the percent of cells above threshold for AVO staining, indicating autophagy induction (Supplementary Figure 4). Senescence was a dominant state of cells five days after the end of TMZ treatment in U87, U343 and A172 cells (47%, 97% and 79%, respectively). All other cell types had no significant increase in nuclei size and no consistent β -gal staining, arguing against senescence induction (Supplementary Figure 5 and 6).

An integrated analysis of these acutely triggered mechanisms with the long-term responses of the GBM cells to TMZ treatment, provided insights into the different responses of these cell types to TMZ (Figure 4). U138 is a well known TMZ-resistant GBM cell line, whose mechanisms of resistance are not completely known [22], which translates into high values for all long-term parameters (Figure 4A, yellow parameters of radar plot). Additionally, it is known that C6 can rapidly induce expression of MGMT when challenged with alkylating agents [23], thus having a partial acute response that includes autophagy induction and a slight acute sensitivity at day 5, but having no long-term effects (Figure 4A, cyan). U343 and U87 GBM cells displayed a similar chronic response but have a distinct profile of acute response, mainly regarding senescence (Figure 4B). U251 has an acute response that was predominated by sub-G1 increase, suggesting apoptosis, whereas A172 presented a senescent response but with similar acute sensitivity. Both have in common a low cell cycle arrest at day 3 and a robust induction of

autophagy. All these acute mechanisms resulted in a similar acute sensitivity (Figure 4C).

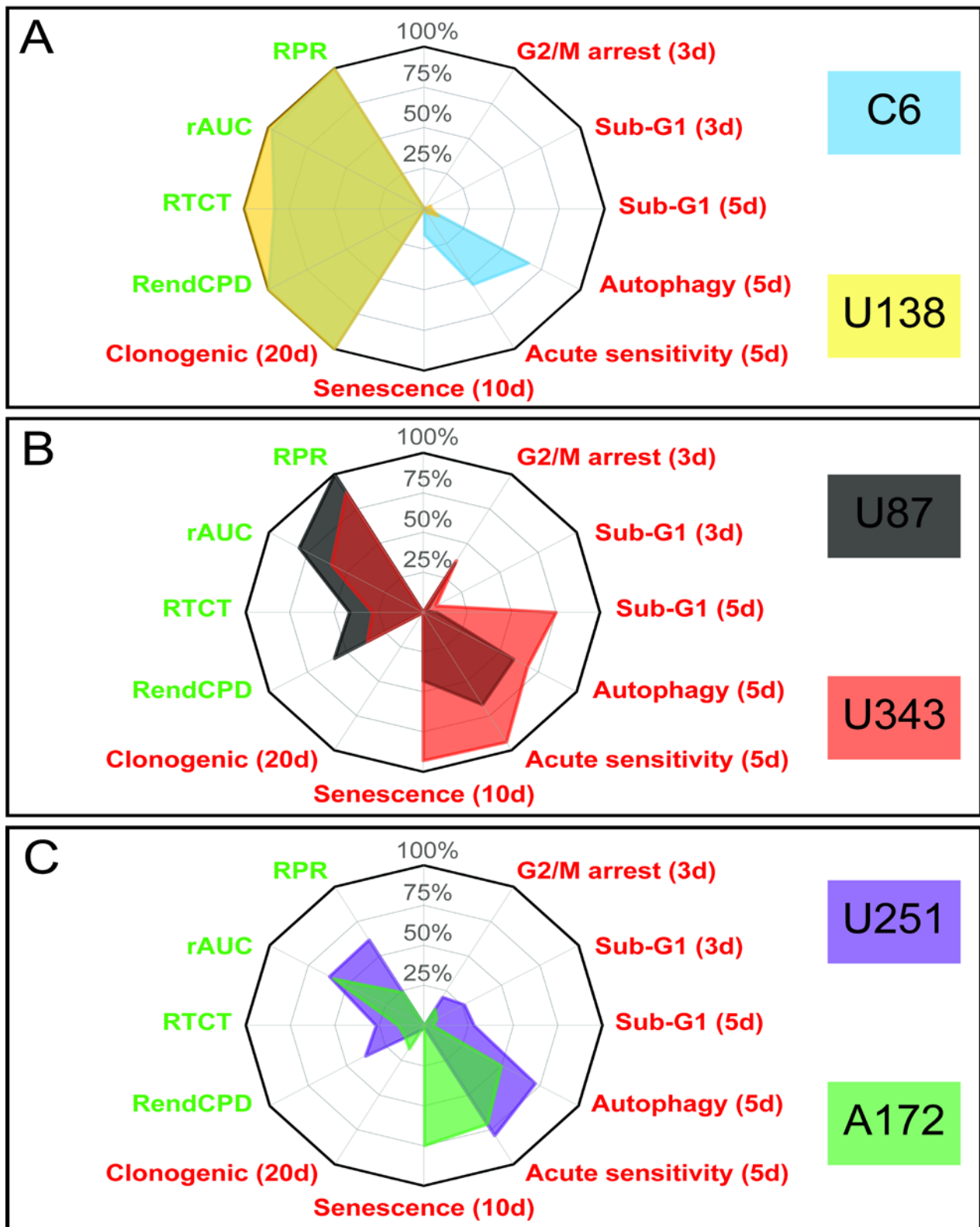


Figure 4 – Integrative analysis of cell mechanisms and chronic effects triggered by Temozolomide. The four CPD parameters are showed in green. Primary data of cell cycle analysis (3 days), Sub-G1 (3 and 5 days), Autophagy (5 days), Acute Sensitivity (5 days), senescence (10 days), clonogenic assay (20 days) (red) are presented in Supplementary Figures 1 to 5. Responses to TMZ 50 µM treatment in (A) C6 and U138; (B) U87 and U343; and (C) U251 and A172. All data is presented in percentage relative to control.

A high positive correlation was found among the CPD parameters that reflect overall sensitivity, i.e. RTCT, rAUC and RendCPD (Figure 5A, upper and Supplementary Table 1) whereas RPR did not significantly correlate with any of the other parameters (Figure 5A, lower and Supplementary Table 1), indicating that neither the acute sensitivity nor the overall sensitivity of a cell type to a treatment does indicate the velocity of regrowth of the surviving subpopulation.

The clonogenic survival assay, one of the most commonly used chronic assays, highly correlated with the RendCPD, rAUC and RTCT parameters, differentiating the cells in highly resistant and sensitive. These correlations evidenced similar capacity to evaluate the efficacy of TMZ of each one of these parameters, when compared with the clonogenic assay (Figure 5B, upper). RPR, as expected, had the smallest correlation with the number of colonies in the clonogenic assay, since RPR measures the velocity of regrowth and not the proportion of cells that survived. Similarly, the acute sensitivity has negative correlation with the overall sensitivity parameters, except with RPR (Figure 5B, lower). This set of results indicates that the four proposed parameters can provide relevant information about the acute and chronic responses of cells to a chemotherapeutic agent, encompassing distinct antitumor effects in a single methodology, providing a more detailed analysis about the behavior of the tested cells along the experienced period.

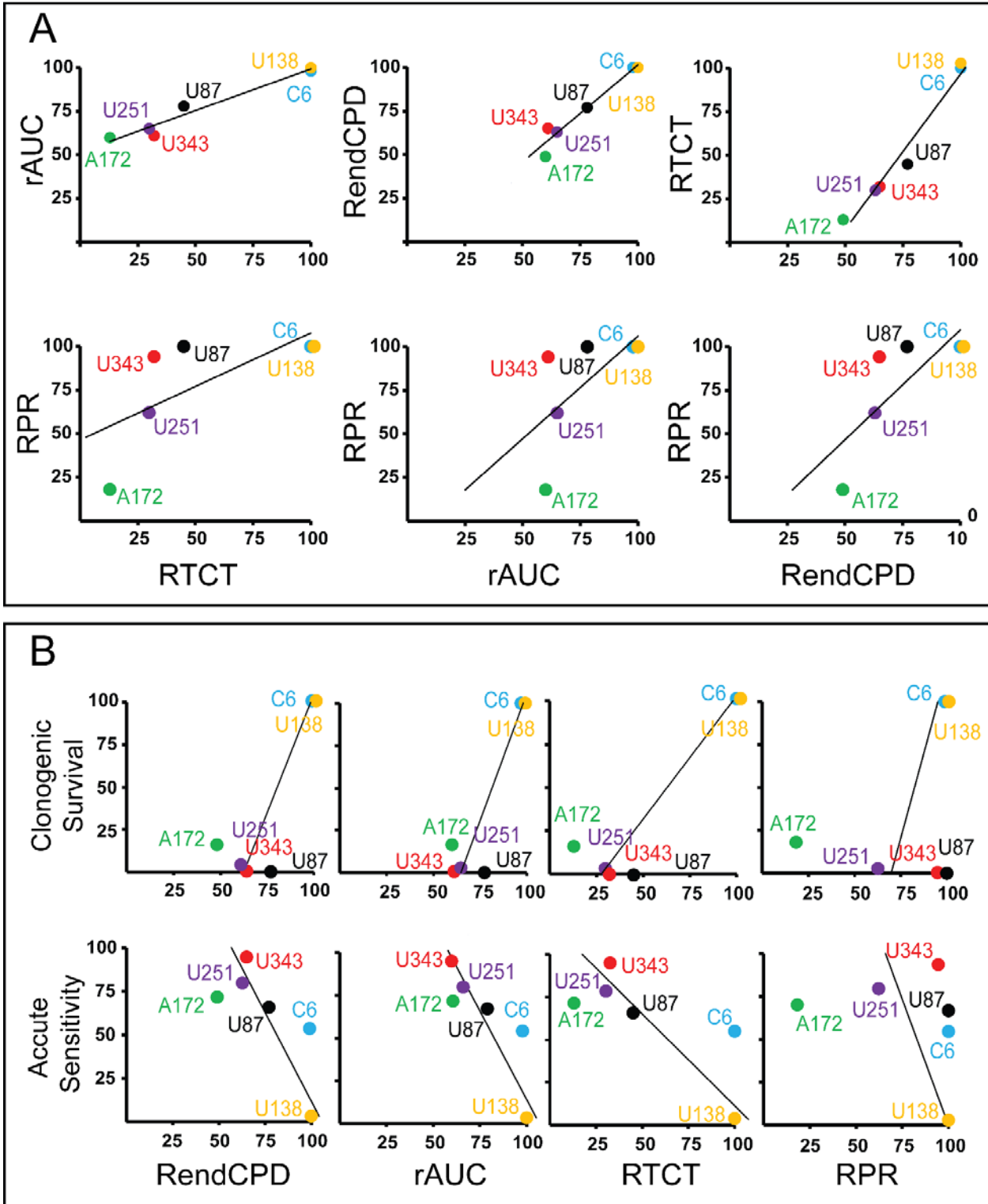


Figure 5 – Scatter plot analysis of the correlation between currently used chronic assays and CPD parameters and among CPD parameters. Each GBM cell was represented by a different color in the graphs. The black line is the linear regression of each set of data. All values of analyzed parameters were represented by percentage. (A) Graphic analysis of the correlations among the CPD parameters. (B) Graphic analysis of the CPD parameters with clonogenic assay (upper line) and acute sensitivity (5 days) (bottom line).

Discussion

Several acute cellular responses to TMZ have been well studied in GBM cell lines, such as cell cycle arrest, senescence and autophagy [24]. Analyzing six commonly used GBM cells, we found a high variability of responses, from irresponsive to highly sensitive. Despite presenting cellular responses that are predominant, such as senescence in U343 cells, in most GBM cell lines, a second or third mechanism was induced in a small fraction of cells, indicating that the response of an entire population of cells is heterogeneous with regard to cellular mechanisms activated by TMZ.

This set of mechanisms characterized the acute part of the responses to TMZ, which were responsible for eliminating up to 95.5% of the cells after 5 days. Surprisingly, the surviving cells continued to die for up to 7 days after the withdrawal of TMZ, except in the resistant C6 and U138 cells, indicating a long lasting toxic effect on this drug. This prolonged effect of TMZ could be mediated by the accumulation of unrepaired O^6 -methylguanine DNA lesion, which can induce apoptosis as a late response, and this chronic effect is dependent of cell proliferation [10].

The effects of TMZ in cancer cells in vitro and in vivo are highly dependent of the expression and activity of some molecular components, such as MGMT and p53 [25, 26]. Confirming this molecular knowledge, U251 that has a mutated p53 gene [27], was the only GBM cell to show an apoptotic response to TMZ and the surviving cells were completely spared from becoming senescent. In contrast, in U87, U343 and A172 GBM cells, which have a wild type p53 phenotype [28-30],

entered early cell cycle arrest followed by senescence induction. This suggests that p53, as was also observed in melanoma cells [31], is not necessary for TMZ-induced apoptosis, but seems to play an important role in inducing senescence in GBM cells [32, 33].

However, TMZ was not able to eliminate all cells in the population and a surviving subpopulation recovered proliferation capacity in all tested GBM cell lines with different dynamics of regrowth. As expected, the set of relative end point CPD (RendCPD), the overall proliferative response along this period (rAUC) and the time when the surviving subpopulation reaches a specific CPD (RTCT) described the overall sensitivity of the population and these parameters are a broad evaluation of the long-term effects of a drug.

An integrative analysis of cellular responses to TMZ showed that the proliferation velocity of the surviving population (RPR) did not correlate with the other CPD parameters nor with other currently used methods to evaluate long term effects of a treatment. This suggests that the capacity of the treatment to cause an alteration in the proliferation velocity of the surviving cells was not affected by its overall short- or long-term sensitivity. Additionally, commonly measured cell mechanisms such as autophagy, cell cycle arrest or senescence did not predict the velocity of growth of the surviving cells.

Therefore, the long-term analysis indicated that the effects of a drug can outlast its presence and that the understanding of the response of GBM cells to TMZ, using therapeutically relevant concentrations and time of exposure, is considerably enhanced by the integrated analysis of short- and long-term effects of this drug. Some types of cancers, such as ovarian cancer, already uses

information from acute sensitivity of tumor cell culture in vitro to help select the therapy with least chances of producing resistance and adding a long-term analysis test could increase the chance of predicting the best therapeutic choice [34, 35]. Additionally, the analysis of CPD curves proposed here improves the evaluation of the behavior of surviving cells after a treatment and all these analysis can potentially be extended to other tumor cells and treatments in order to evaluate both the long- and short-term responses. Thus, this strategy can help to better tailor treatment schedules and combination therapies to increase the chance of therapeutic success and to decrease the chances of recurrence.

Acknowledgements

We thank to Alexandra Vigna and Marcelo Lammers for critical proof reading of the manuscript. This work was supported by CNPq-Universal, 458139/2014-9; FAPERGS/PRONEN 11/2072-2, CAPES/PROBITEC 907/2012. Silva, A.O. is recipient of a CAPES fellowship; Dalsin, E., Chiela E. C. F. and Lenz, G. are or were recipient of CNPq fellowships.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests.

References

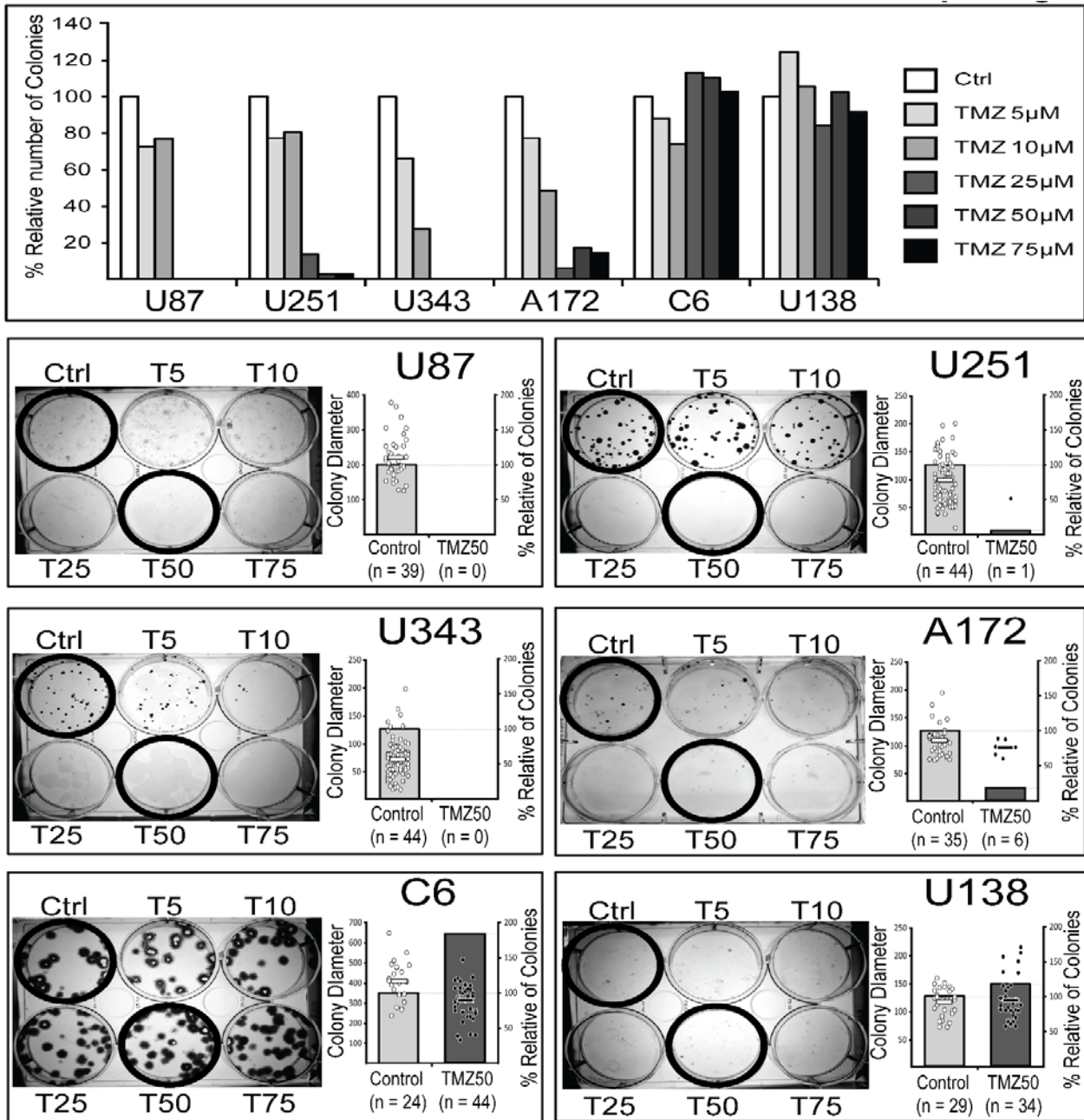
- [1] R. Stupp, W.P. Mason, M.J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M.J. Taphoorn, K. Belanger, A.A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R.C. Janzer, S.K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J.G. Cairncross, E. Eisenhauer, R.O. Mirimanoff, R. European Organisation for, T. Treatment of Cancer Brain, G. Radiotherapy, G. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *The New England journal of medicine* 352 (2005) 987-996.
- [2] Q.T. Ostrom, H. Gittleman, P. Liao, C. Rouse, Y. Chen, J. Dowling, Y. Wolinsky, C. Kruchko, J. Barnholtz-Sloan, CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011, *Neuro-oncology* 16 Suppl 4 (2014) iv1-63.
- [3] T.M. Horton, G. Jenkins, D. Pati, L. Zhang, M.E. Dolan, A. Ribes-Zamora, A.A. Bertuch, S.M. Blaney, S.L. Delaney, M. Hegde, S.L. Berg, Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor ABT-888 potentiates the cytotoxic activity of temozolomide in leukemia cells: influence of mismatch repair status and O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity, *Molecular cancer therapeutics* 8 (2009) 2232-2242.
- [4] J. Zhang, M.F. Stevens, T.D. Bradshaw, Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance, *Current molecular pharmacology* 5 (2012) 102-114.
- [5] M.E. Hegi, A.C. Diserens, T. Gorlia, M.F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J.M. Kros, J.A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J.E. Bromberg, P. Hau, R.O. Mirimanoff, J.G. Cairncross, R.C. Janzer, R. Stupp, MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma, *The New England journal of medicine* 352 (2005) 997-1003.
- [6] C.H. Fan, W.L. Liu, H. Cao, C. Wen, L. Chen, G. Jiang, O6-methylguanine DNA methyltransferase as a promising target for the treatment of temozolomide-resistant gliomas, *Cell death & disease* 4 (2013) e876.
- [7] G. Perazzoli, J. Prados, R. Ortiz, O. Caba, L. Cabeza, M. Berdasco, B. Gonzalez, C. Melguizo, Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression, *PloS one* 10 (2015) e0140131.
- [8] J.A. Quinn, S.X. Jiang, D.A. Reardon, A. Desjardins, J.J. Vredenburgh, J.N. Rich, S. Gururangan, A.H. Friedman, D.D. Bigner, J.H. Sampson, R.E. McLendon, J.E. Herndon, 2nd, A. Walker, H.S. Friedman, Phase II trial of temozolomide plus o6-benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (2009) 1262-1267.

- [9] E.C. Filippi-Chiela, M.P. Thome, M.M. Bueno e Silva, A.L. Pelegrini, P.F. Ledur, B. Garicochea, L.L. Zamin, G. Lenz, Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells, *BMC cancer* 13 (2013) 147.
- [10] W.P. Roos, L.F. Batista, S.C. Naumann, W. Wick, M. Weller, C.F. Menck, B. Kaina, Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine, *Oncogene* 26 (2007) 186-197.
- [11] Y.S. Hori, R. Hosoda, Y. Akiyama, R. Sebori, M. Wanibuchi, T. Mikami, T. Sugino, K. Suzuki, M. Maruyama, M. Tsukamoto, N. Mikuni, Y. Horio, A. Kuno, Chloroquine potentiates temozolomide cytotoxicity by inhibiting mitochondrial autophagy in glioma cells, *Journal of neuro-oncology* 122 (2015) 11-20.
- [12] E.C. Filippi-Chiela, M.M. Bueno e Silva, M.P. Thome, G. Lenz, Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage, *Autophagy* 11 (2015) 1099-1113.
- [13] S. Yip, J. Miao, D.P. Cahill, A.J. Iafrate, K. Aldape, C.L. Nutt, D.N. Louis, MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15 (2009) 4622-4629.
- [14] H.M. Strik, C. Marosi, B. Kaina, B. Neyns, Temozolomide dosing regimens for glioma patients, *Current neurology and neuroscience reports* 12 (2012) 286-293.
- [15] P.R. Godoy, S.S. Mello, D.A. Magalhaes, F.S. Donaires, P. Nicolucci, E.A. Donadi, G.A. Passos, E.T. Sakamoto-Hojo, Ionizing radiation-induced gene expression changes in TP53 proficient and deficient glioblastoma cell lines, *Mutation research* 756 (2013) 46-55.
- [16] D.J. Klionsky, Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy, *Autophagy* 8 (2012) 445-544.
- [17] G.P. Dimri, X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E.E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, et al., A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (1995) 9363-9367.
- [18] E.C. Filippi-Chiela, M.M. Oliveira, B. Jurkovski, S.M. Callegari-Jacques, V.D. da Silva, G. Lenz, Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities, *PLoS One* 7 (2012) e42522.

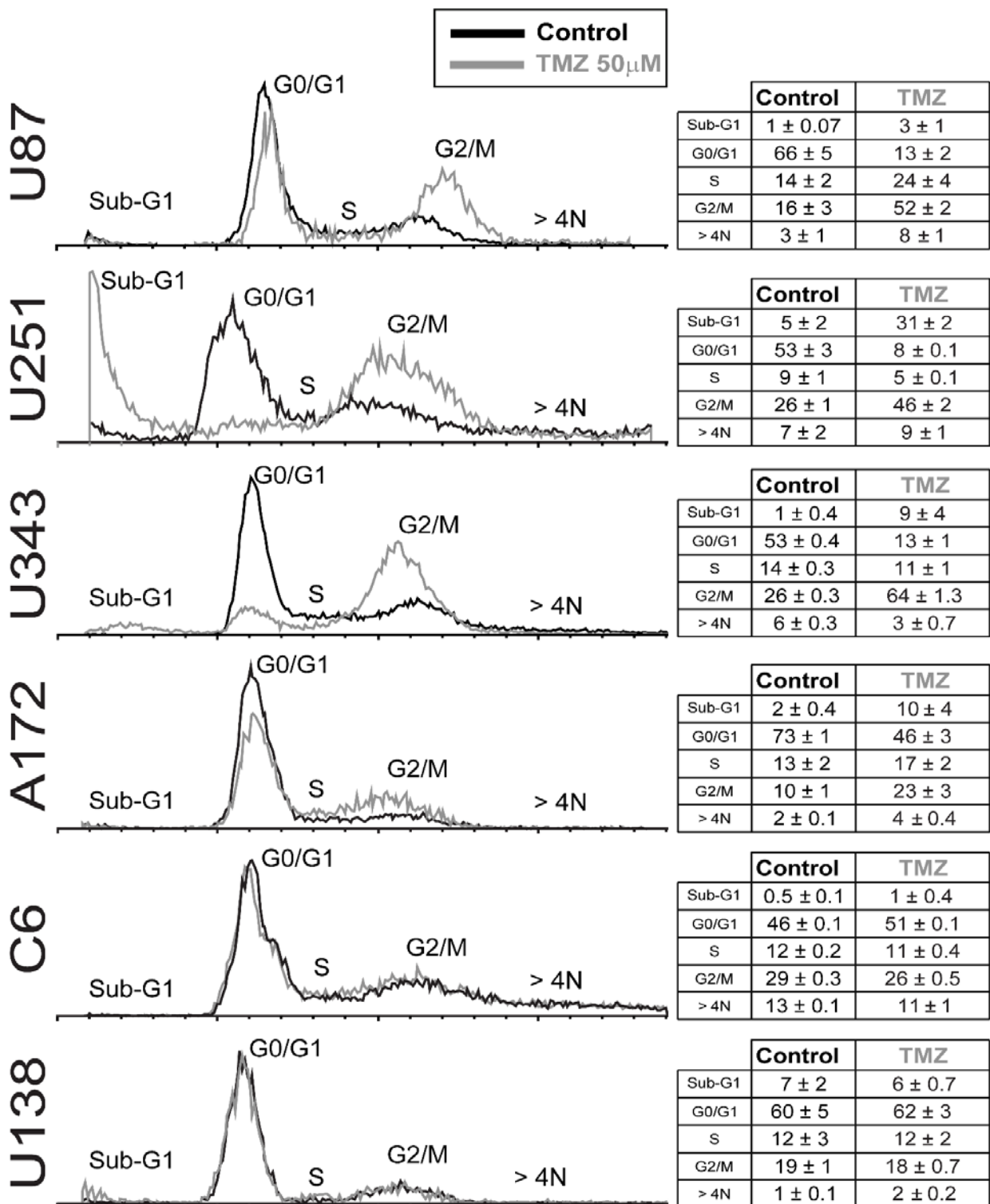
- [19] E.H. Heiss, Y.D. Schilder, V.M. Dirsch, Chronic treatment with resveratrol induces redox stress- and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells, *The Journal of biological chemistry* 282 (2007) 26759-26766.
- [20] A.O. Silva, K.B. Felipe, E.S. Villodre, P.L. Lopez, G. Lenz, A guide for the analysis of long-term population growth in cancer, *Tumour Biol* (2016).
- [21] M.J.M. Darkes, G.L. Plosker, B. Jarvis, Temozolomide: A Review of its Use in the Treatment of Malignant Gliomas, Malignant Melanoma and Other Advanced Cancers, *American Journal of Cancer* 1 (2002) 26.
- [22] A. Yoshino, A. Ogino, K. Yachi, T. Ohta, T. Fukushima, T. Watanabe, Y. Katayama, Y. Okamoto, N. Naruse, E. Sano, K. Tsumoto, Gene expression profiling predicts response to temozolomide in malignant gliomas, *International journal of oncology* 36 (2010) 1367-1377.
- [23] M. Nagane, A. Asai, S. Shibui, K. Nomura, Y. Kuchino, Application of antisense ribonucleic acid complementary to O6-methylguanine-deoxyribonucleic acid methyltransferase messenger ribonucleic acid for therapy of malignant gliomas, *Neurosurgery* 41 (1997) 434-440; discussion 440-431.
- [24] A.V. Knizhnik, W.P. Roos, T. Nikolova, S. Quiros, K.H. Tomaszowski, M. Christmann, B. Kaina, Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage, *PLoS one* 8 (2013) e55665.
- [25] M. Hermisson, A. Klumpp, W. Wick, J. Wischhusen, G. Nagel, W. Roos, B. Kaina, M. Weller, O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells, *Journal of neurochemistry* 96 (2006) 766-776.
- [26] S. Li, T. Jiang, G. Li, Z. Wang, Impact of p53 status to response of temozolomide in low MGMT expression glioblastomas: preliminary results, *Neurological research* 30 (2008) 567-570.
- [27] C. Gomez-Manzano, J. Fueyo, A.P. Kyritsis, T.J. McDonnell, P.A. Steck, V.A. Levin, W.K. Yung, Characterization of p53 and p21 functional interactions in glioma cells en route to apoptosis, *Journal of the National Cancer Institute* 89 (1997) 1036-1044.
- [28] P.B. Senatus, Y. Li, C. Mandigo, G. Nichols, G. Moise, Y. Mao, M.D. Brown, R.C. Anderson, A.T. Parsa, P.W. Brandt-Rauf, J.N. Bruce, R.L. Fine, Restoration of p53 function for selective Fas-mediated apoptosis in human and rat glioma cells in vitro and in vivo by a p53 COOH-terminal peptide, *Molecular cancer therapeutics* 5 (2006) 20-28.
- [29] R. Mirzayans, B. Andrais, A. Scott, D. Murray, New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy, *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012 (2012) 170325.

- [30] T. Koo, I.K. Choi, M. Kim, J.S. Lee, E. Oh, J. Kim, C.O. Yun, Negative regulation-resistant p53 variant enhances oncolytic adenoviral gene therapy, *Human gene therapy* 23 (2012) 609-622.
- [31] N.M. Mhaidat, X.D. Zhang, J. Allen, K.A. Avery-Kiejda, R.J. Scott, P. Hersey, Temozolomide induces senescence but not apoptosis in human melanoma cells, *British journal of cancer* 97 (2007) 1225-1233.
- [32] Y. Hirose, M.S. Berger, R.O. Pieper, p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells, *Cancer research* 61 (2001) 1957-1963.
- [33] Y. Kong, H. Cui, C. Ramkumar, H. Zhang, Regulation of senescence in cancer and aging, *Journal of aging research* 2011 (2011) 963172.
- [34] K. Brigulova, M. Cervinka, J. Tosner, I. Sedlakova, Chemoresistance testing of human ovarian cancer cells and its in vitro model, *Toxicol In Vitro* 24 (2010) 2108-2115.
- [35] V. Loizzi, J.K. Chan, K. Osann, F. Cappuccini, P.J. DiSaia, M.L. Berman, Survival outcomes in patients with recurrent ovarian cancer who were treated with chemoresistance assay-guided chemotherapy, *Am J Obstet Gynecol* 189 (2003) 1301-1307.

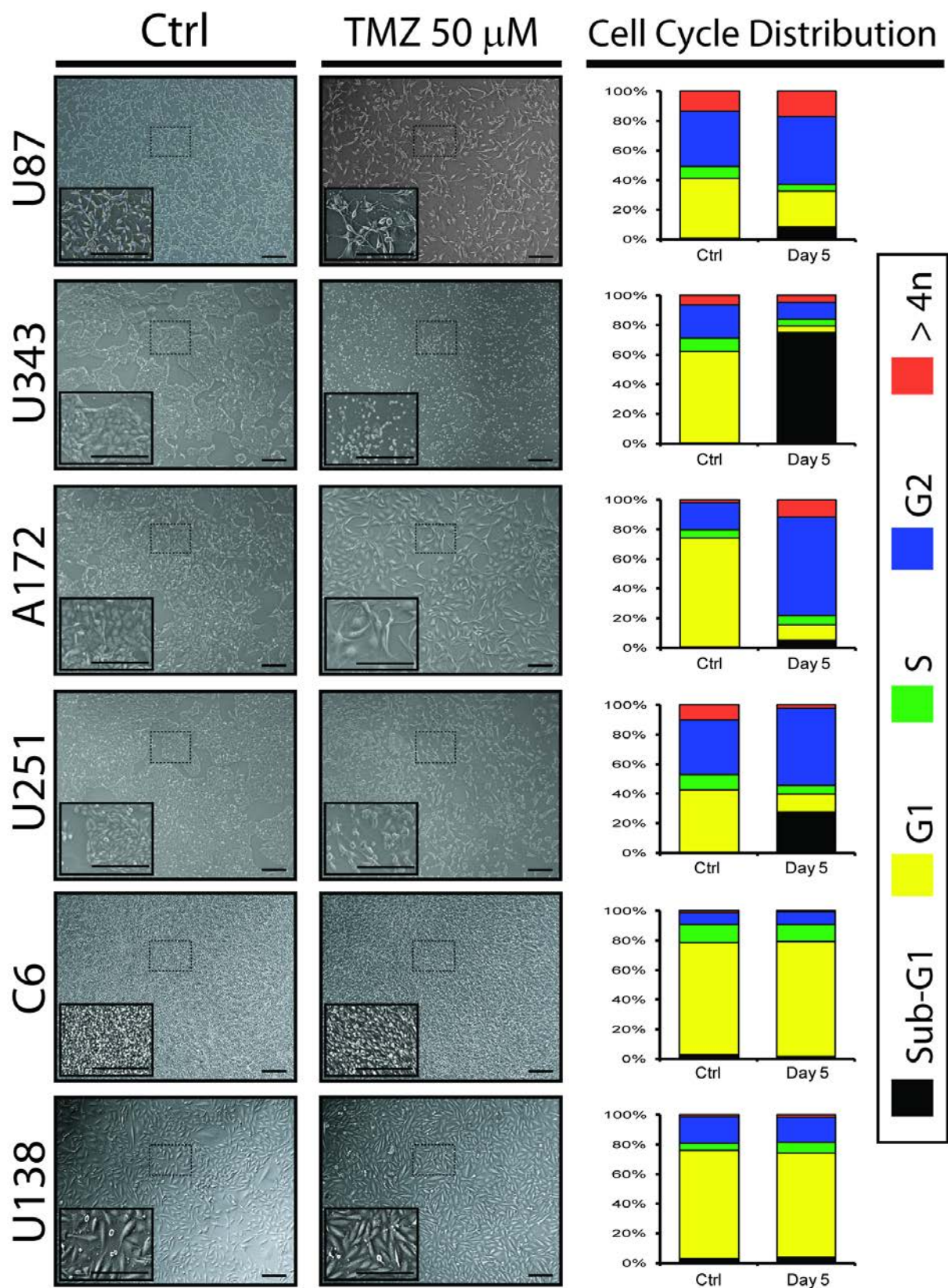
Supplementary Figures



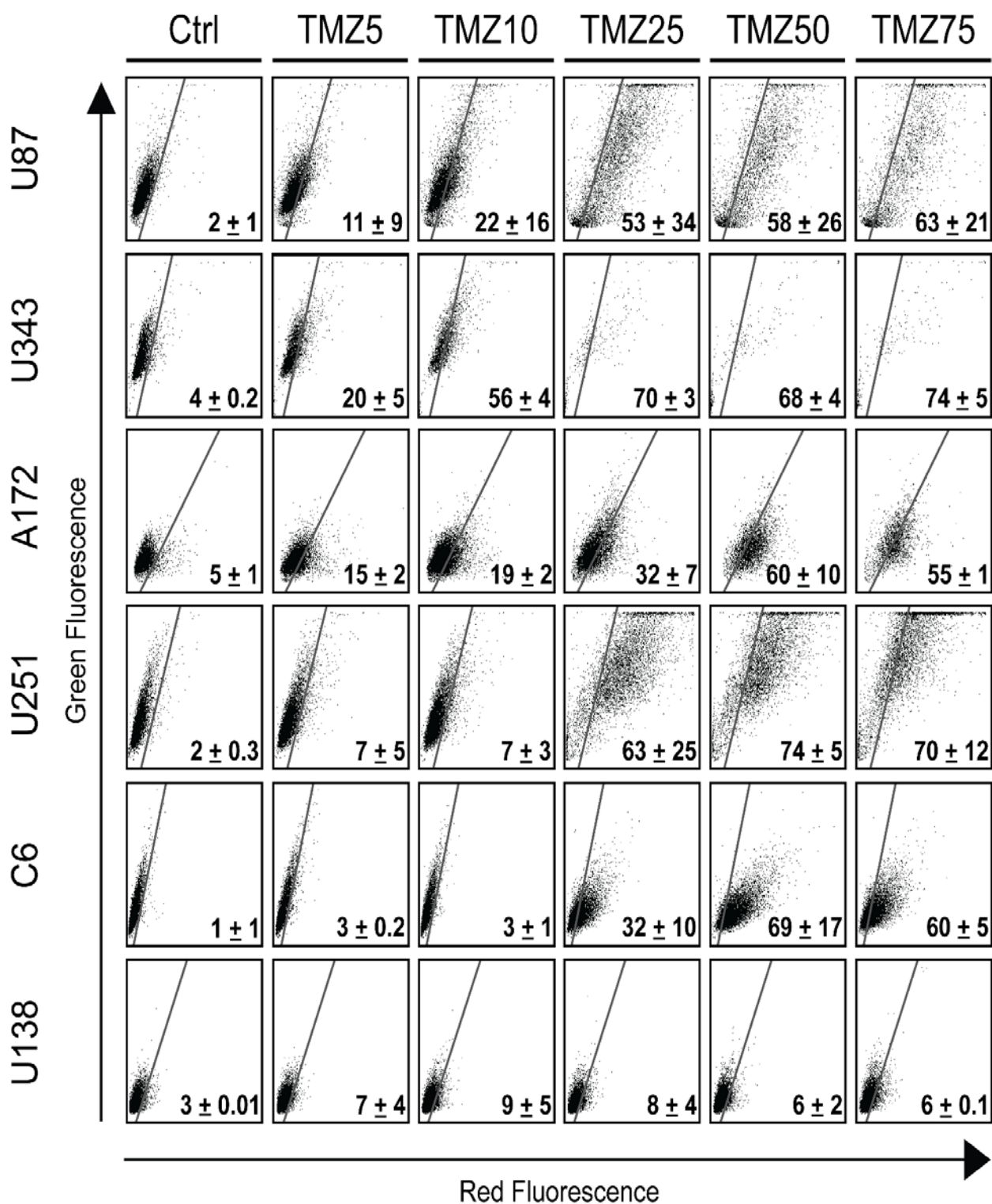
Supplementary Figure 1 – Clonogenic assay of GBM cells treated with TMZ in different concentrations. One hundred cells previously treated with TMZ at doses 5 to 75 μM for 5 days were plated and maintained for more 15 days in drug free medium (DFM). In the end of 20 days, cells were stained and photographed. Upper Graph shows the relative number of colonies of each Glioma cell formed in the specific tested doses. A box for each GBM cell containing a representative image of clonogenic plates in every tested doses on the left side and a graph showing the relative number of colonies formed (right axis) in 50 μM dose. The diameter of colonies (left axis) was measured using Image ProPlus software. White and black circles represent each colony of control and TMZ 50 μM cells, respectively. The number of colonies formed is showed below each bar. (N=2)



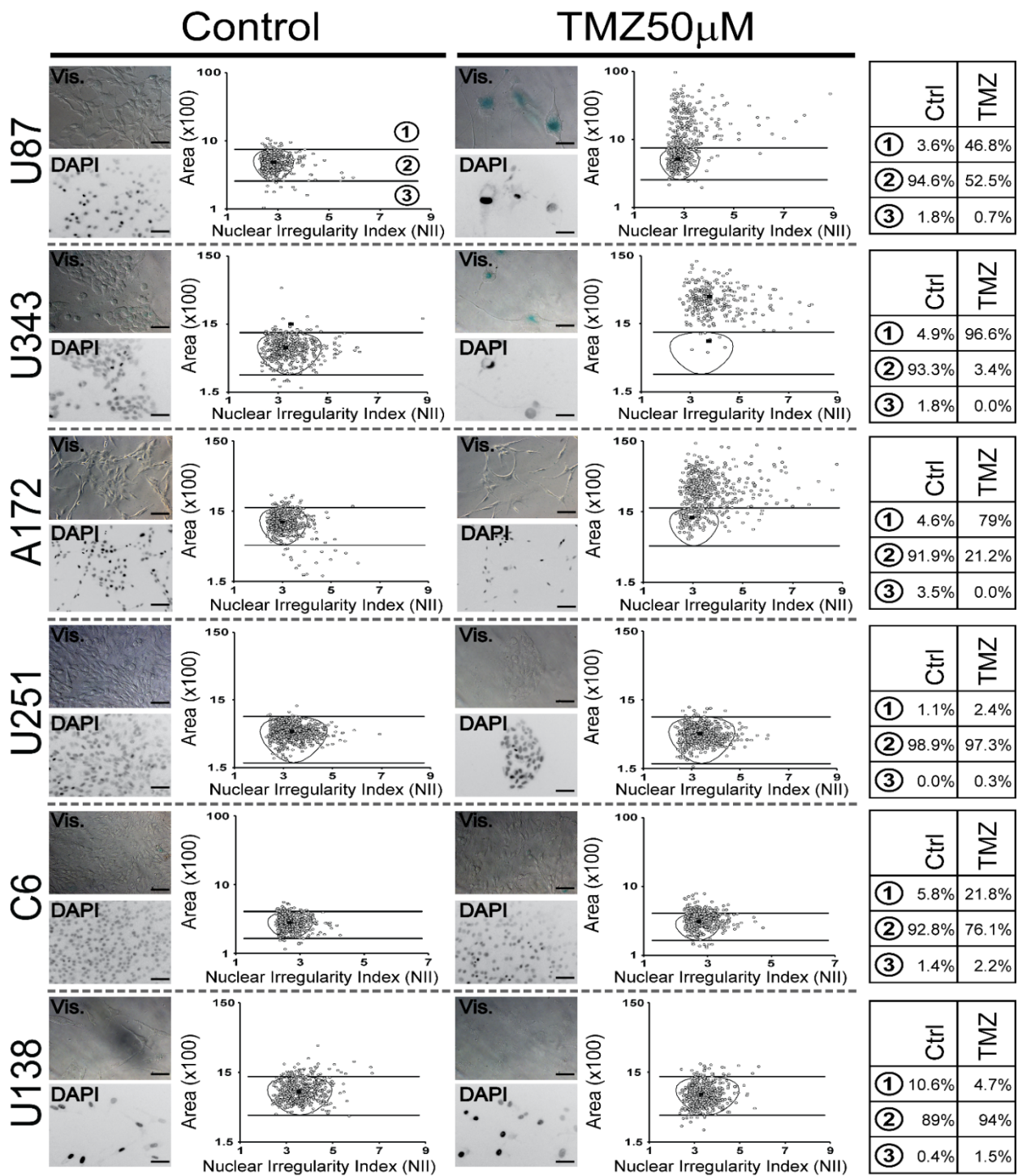
Supplementary Figure 2 - TMZ induces G2/M cell cycle arrest in acute TMZ-sensitive GBM cells. Cells were treated with TMZ 50 μ M for 3 days, with a single administration on day 0. Then, they were fixed and stained with PI. The DNA content was measured using flow cytometry. Cell cycle distribution was represented in histogram graphs (black and gray lines represents control and TMZ treated cells, respectively). Percentage of cells in each cell cycle phase is showed in the right square.



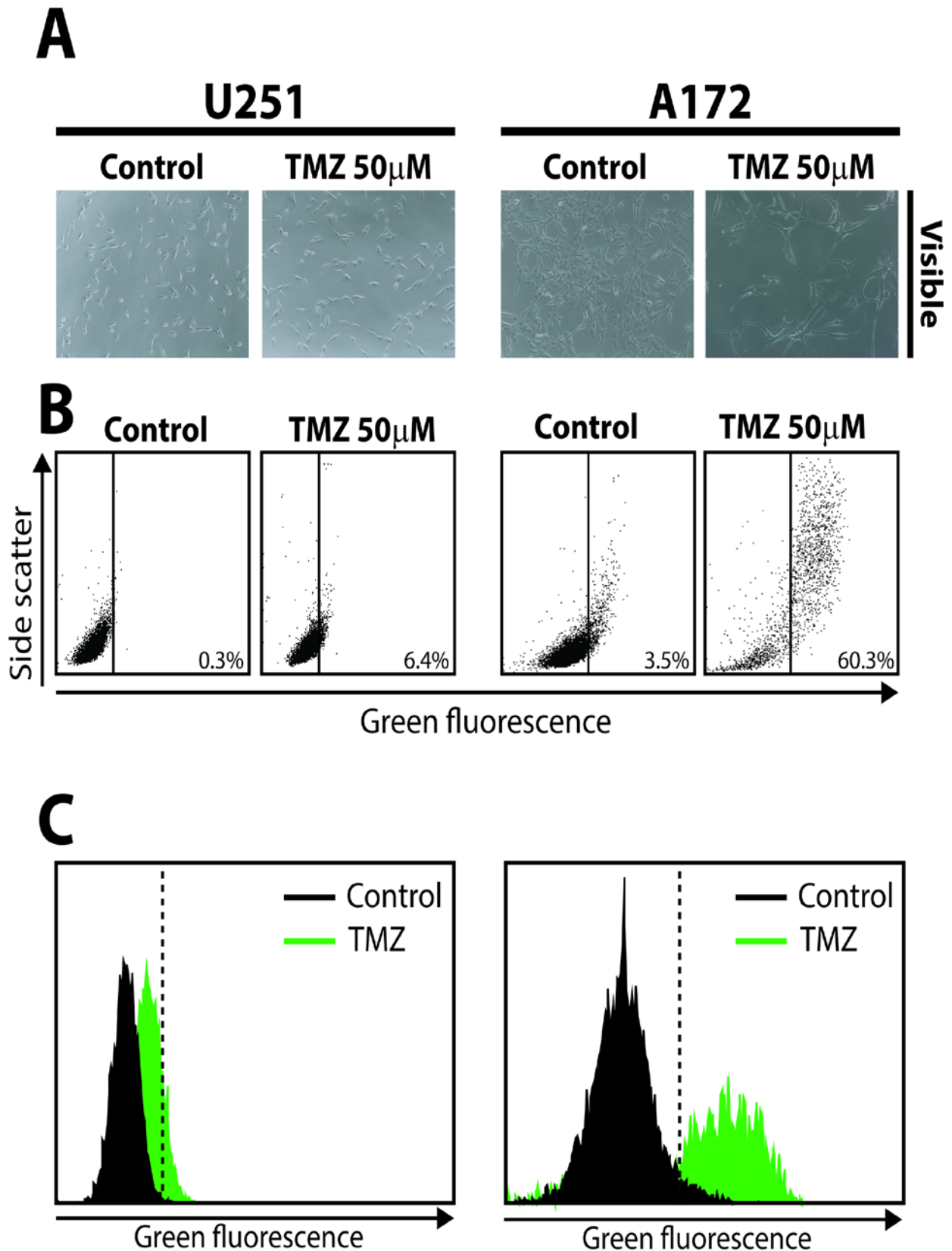
Supplementary Figure 3 – Morphology of control cells or cells treated with 50 μM of TMZ for 5 days (left) and cell cycle distribution of these cells (right).



Supplementary Figure 4 – Autophagy measuring through AVOs staining in GBMs. GBM cells were treated with TMZ at doses 5 to 75 μ M for 5 days, in a single administration on day 0. On day 5, cells were stained with Acridine Orange (AO) and AVO content was analyzed by flow cytometry. Around 5% of positive AO population was defined as basal autophagy induction in control cells treating with drug vehicle only. Representative plots of flow cytometry of each dose effect on GBM cells.



Supplementary Figure 5 – TMZ induces senescence in TMZ-sensitive cells presenting wild-type p53. Cells treated for 5 days with TMZ 50 μ M were maintained in drug free medium (DFM) for more 5 days and stained with β -Galactosidase substrate and DAPI. Representative micrographs of β -Gal assay in visible light (above) and DAPI staining in UV light (below) are in the left and Graphs of Nuclear Area X Nuclear Irregularity Index (NII) of Nuclear Morphometric Analysis (NMA) assay are in the right side. The graph was divided in large (1), normal (2) and small (3), in relation to the nuclear area. Each dot represents an analyzed nucleus. The data of two independent experiments were presented in the same graph.



Supplementary Figure 6. Senescence evaluation through C12FDG. Cells treated for 5 days with TMZ 50 μ M were maintained in drug free medium (DFM) for more 5 days and imaged (A) or stained with the fluorogenic β -Galactosidase substrate C12FDG (5-Dodecanoylamino fluorescein Di- β -D-Galactopyranoside and analysed by flow cytometry (B and C). Values indicate the percentage of events in each condition.

Sup. Table 1. Pearson's correlation coefficient between CPD parameters and currently used methods

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. G2/M Arrest													
2. Sub-G1	0.2												
3. Apoptosis	0.13	0.95**											
4. Necrosis	0.72	0.32	0.21										
5. Autophagy	0.46	0.35	0.43	0.38									
6. Senescence	0.59	-0.19	-0.40	0.64	0.32								
7. Clonogenic	-0.87*	-0.50	-0.36	-0.61	-0.56	-0.56							
8. Acute Sensitivity	0.73	0.41	0.35	0.69	0.89*	0.63	-0.81*						
9. RendCPD	-0.53	-0.54	-0.32	-0.47	-0.49	-0.62	0.85*	-0.74					
10. RTCT	-0.65	-0.53	-0.33	-0.51	-0.52	-0.63	0.92**	-0.78	0.99**				
11. RPR	0.09	-0.43	-0.23	0.06	-0.23	-0.30	0.38	-0.32	0.79	0.69			
12. rAUC	-0.66	-0.57	-0.37	-0.65	-0.56	-0.67	0.90*	-0.83*	0.97**	0.98**	0.64		
13. MGMT	-0.66	-0.29	-0.05	-0.67	-0.43	-0.86*	0.83*	-0.77	0.92**	0.92**	0.59	0.94**	

- Yellow cells correspond to: *. Correlation significant at 0.05 (bilateral); or **. Correlation significant at 0.01 (bilateral)

- Blue number in the Gray Boxes correspond to all correlations with RPR

Supplementary Table 1 – Pearson correlation matrix of acute and chronic effects of TMZ 50 μ M in GBM cells with the proposed CPD parameters. Data analysis was performed in PASW® Statistic 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

5. CAPITULO 3 – “Associação de Temozolomida com Vimblastina ou Mebendazole bloqueia cronicamente a proliferação em células de Glioblastoma com sensibilidade aguda a agentes alquilantes”.

Este capítulo representa uma continuação de um trabalho focado na investigação do potencial antitumoral a longo prazo de intervenções terapêuticas distintas em células de Glioblastoma (GBM), através de ensaios crônicos de proliferação celular *in vitro*. No capítulo anterior, viu-se que Temozolomida (TMZ), ao longo do tempo, foi capaz apenas de retardar a proliferação celular a longo prazo nas linhagens que apresentaram uma sensibilidade aguda ao fármaco. Nas linhagens insensíveis a TMZ, nenhum efeito crônico foi constatado. Neste capítulo, o mesmo perfil investigativo foi usado, mas agora para avaliar o potencial terapêutico de potenciais fármacos adjuvantes, para serem usados de forma alternativa a TMZ ou de forma combinada. Para tal, o mesmo grupo de linhagens de GBM foi utilizado, para que pudesse ser feita uma análise comparativa com os resultados do capítulo 2, e novamente, os parâmetros de avaliação dos resultados obtidos a partir de ensaios crônicos de proliferação celular *in vitro* foram aplicados para avaliar a eficácia terapêutica dos fármacos adjuvantes. A partir de uma triagem inicial, avaliando a citotoxicidade aguda de 12 potenciais agentes terapêuticos, Mebendazole (MBZ) e Vimblastina (VBL) foram selecionados para serem detalhadamente avaliados, quanto ao seu potencial terapêutico de forma isolada ou associados a TMZ no tratamento *in vitro* de

células de GBM, com o objetivo de impedir a reaquisição da capacidade proliferativa constatada no capítulo anterior, com o tratamento isolado de TMZ em algumas linhagens ou sensibilizar aquelas que apresentaram-se totalmente irresponsivas a este quimioterápico. Em virtude deste trabalho não estar totalmente finalizado para publicação, serão mostrados apenas os resultados parciais, sem uma estruturação adequada de manuscrito científico. As metodologias aplicadas no presente capítulo são as mesmas utilizadas no capítulo anterior. Qualquer alteração, será chamada a atenção durante a apresentação dos resultados.

RESULTADOS

Evidências clínicas mostram que, após a ressecção cirúrgica de grande parte da massa tumoral em pacientes com GBM, a combinação de radioterapia (pós cirurgia) e quimioterapia contínua com Temozolomida (aplicando o ciclo 5/28) foi capaz de manter indetectável, por muitos meses, a presença de populações de células tumorais remanescentes ao procedimento cirúrgico. Entretanto, poucos meses após o tratamento quimioterápico ter sido finalizado, houve o restabelecimento da massa tumoral remanescente e constatada a recidiva da doença (Galdiks *et al.*, 2010). De uma forma bastante semelhante, no trabalho do capítulo 4, viu-se que doses terapêuticas de TMZ são capazes de reduzir significativamente o número de células num primeiro momento de análise, mas quando ensaios *in vitro* de proliferação celular a longo prazo foram realizados, foi constatada a presença de um grupo de células irresponsivas ao

tratamento em todas as linhagens estudadas, que foram responsáveis pelo reestabelecimento da capacidade proliferativa da população ao longo de um período correspondente a um ciclo de tratamento de TMZ, baseado no mesmo regime de administração aplicado no estudo clínico. Em outras duas linhagens, o tratamento com TMZ apresentou-se totalmente ineficaz, não sendo constatada nenhuma alteração no perfil proliferativo das células tratadas ao longo de 28 dias. Desta forma, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas capazes de bloquear ou, ao menos, retardar a progressão da doença.

Desta forma, motivados pela ineficácia terapêutica apresentada pelo quimioterápico considerado o padrão-ouro no tratamento de GBM, foi iniciada uma investigação na busca de potenciais agentes farmacológicos com potencial antitumoral para serem usados como uma nova terapia de escolha ou que possa ser associada à TMZ, com o objetivo principal de tentar superar a incapacidade deste quimioterápico em eliminar por completo ou, ao menos, para bloquear na sua totalidade a proliferação celular de linhagens de GBM. Assim como foi uma preocupação no trabalho desenvolvido no capítulo anterior, a presente investigação também foi desenvolvida considerando doses capazes de serem atingidas no plasma dos pacientes para cada uma das moléculas utilizadas e o tempo de tratamento e de investigação dos efeitos *in vitro* nas linhagens está baseado no regime terapêutico padrão de administração de TMZ em pacientes com GBM, onde o quimioterápico é administrado por 5 dias, seguido de 23 dias de recuperação, totalizando um ciclo de tratamento de 28 dias (Strik *et al.*, 2012).

Previamente, foi realizada uma triagem de cerca de 12 moléculas, incluindo agentes alquilantes, inibidores de microtúbulos, inibidores alvo-específicos, polifenóis, moduladores epigenéticos, e até mesmo, um anticonvulsivante e um antiparasitário (dados não mostrados). Dentre este conjunto de moléculas, foram definidas como potenciais agentes antitumorais aquelas que apresentassem citotoxicidade aguda (5 dias) maior que 50% na maioria das linhagens de GBM. A partir deste critério, foram selecionados dois fármacos com mecanismos de ação voltados para a modulação da polimerização e despolimerização de microtúbulos: Vimblastina (VBL), Mebendazole (MBZ); e um agente alquilante com ação semelhante à TMZ: a Lomustina (CCNU) (**Figura 1**).

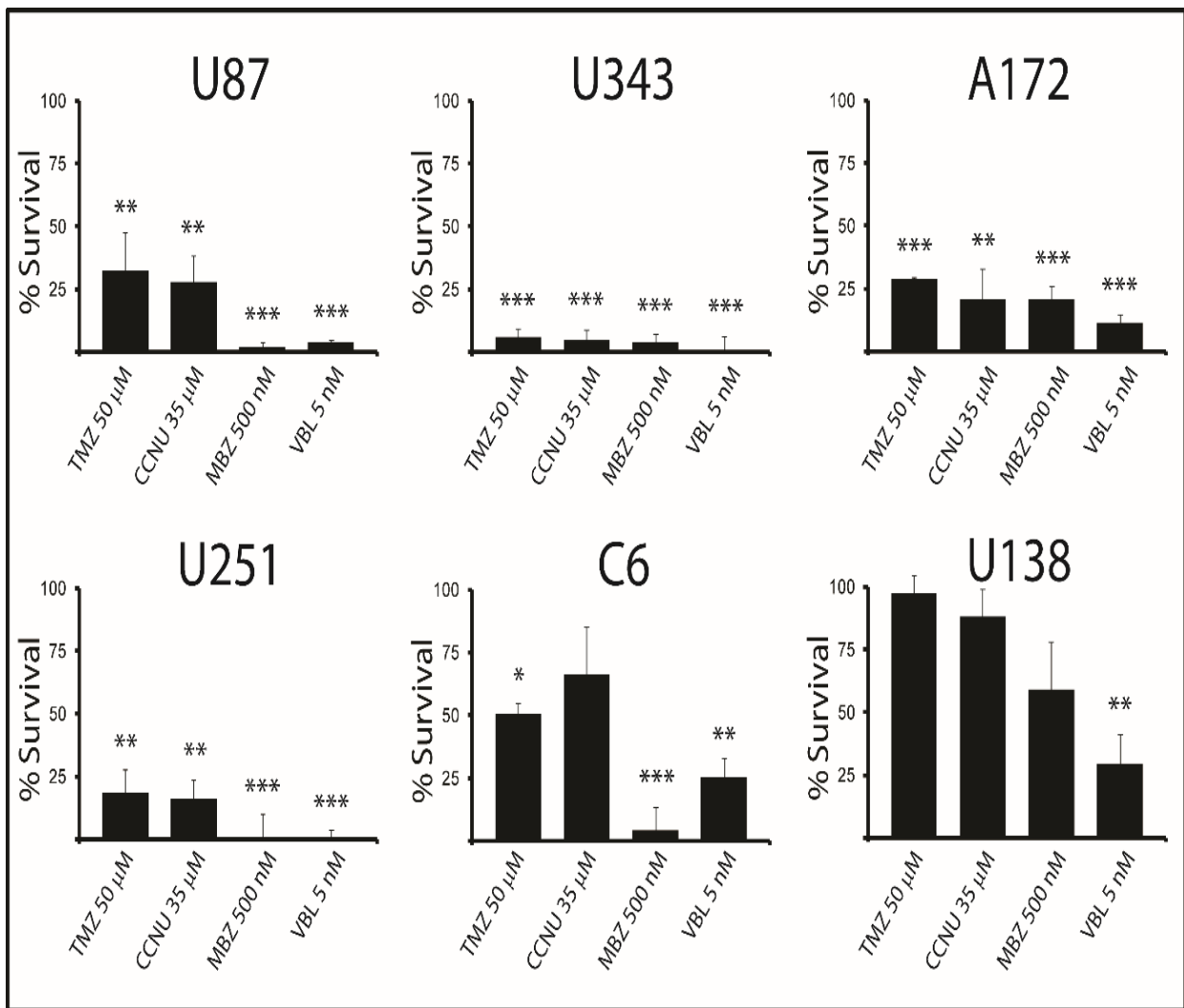


Figura 1: Lomustina, Mebendazole e Vimblastina apresentam citotoxicidade aguda na maioria das linhagens de Glioblastomas. Proporção de células sobreviventes, após à exposição aguda de 5 dias, foi definida para 12 moléculas distintas. A partir dos critérios de seleção previamente definidos, foram selecionadas a Lomustina (CCNU), a Vimblastina (VBL) e Mebendazole (MBZ), nas suas concentrações plasmáticas de 35 µM, 5 nM e 500 nM, respectivamente. Citotoxicidade aguda de Temozolomida (TMZ) foi usada posteriormente como um dos parâmetros de seleção entre as 3 moléculas pré-selecionadas. Teste T de *Student's* foi utilizado para verificar a significância estatística, comparando cada grupo tratado com o seu controle. (* para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$) ($n=3$).

Entretanto, o objetivo principal desta triagem era encontrar moléculas com potencial antitumoral para serem sugeridas como um novo candidato à terapia de escolha ou que pudessem ser associadas à TMZ no tratamento de GBM. Como

visto na **Figura 1**, CCNU apresentou efeitos muito semelhantes a TMZ, sensibilizando o mesmo subgrupo de linhagens de GBM e sendo incapaz de apresentar um grau de citotoxicidade significativo em C6 e U138. Em virtude desta semelhança e, principalmente, pelo fato de não ter apresentado uma melhor sensibilização nas duas linhagens resistentes a TMZ este fármaco foi excluído das análises posteriores. A Lomustina (CCNU), assim como a TMZ, é uma agente alquilante que provoca metilações na posição O^6 dos resíduos de guanina no DNA (Weiss e Issell, 1982) e foi amplamente utilizado no tratamento de tumores do SNC, como parte integrante de um coquetel de fármacos chamado PCV (Procarbazina, Lomustina e Vincristina) (Kim *et al.*, 1996). Muito provavelmente, a semelhança entre os mecanismos de ação de TMZ e CCNU justifique a sensibilidade apresentada pelo mesmo grupo de linhagens de GBM e os mecanismos de reparo responsáveis pela resposta ao tratamento com estes agentes metiladores da posição O^6 da guanina sejam os responsáveis pela semelhança na irresponsividade das linhagens C6 e U138. Este fármaco foi incluído nesta triagem inicial apenas porque existem relatos na literatura de possíveis associações de TMZ com CCNU já sendo estudados em ensaios clínicos de fase I e II para o tratamento de GBMs (Herrlinger *et al.*, 2006; Tafuto *et al.*, 2006).

Por outro lado, doses plasmáticas de VBL e MBZ apresentaram um potencial citotóxico bastante significativo em todas as linhagens de GBM testadas, com exceção de MBZ em U138, onde a sensibilidade média foi de 42% e não apresentou diferença significativa, quando comparado com o controle. Ainda, o efeito citotóxico de ambos os fármacos foi mais intenso do que os efeitos obtidos

com TMZ em todas as linhagens, mas nenhum deles foi capaz de eliminar 100% da população testada em nenhuma das linhagens. Baseado, então, na alta capacidade de sensibilização de linhagens distintas de GBM, nos efeitos mais expressivos que o quimioterápico de escolha para o tratamento desta neoplasia e o fato de apresentarem um mecanismo de ação distinto a TMZ, ambos os fármacos foram selecionados para que fosse feita uma investigação detalhada do seu potencial antitumoral, tanto como terapia isolada, quanto associada à TMZ.

Levando em conta que nenhuma das terapias testadas na **Figura 1** foi capaz de eliminar 100% das células da população inicial estudada em nenhuma das linhagens, nós investigamos, através de um ensaio *in vitro* de proliferação celular a longo prazo, o comportamento desta subpopulação de células remanescentes ao longo de um período de tempo correspondente a um ciclo de tratamento de TMZ na clínica. Como mostrado na **Figura 2**, a população de células sobreviventes ao tratamento com MBZ foi capaz de readquirir sua capacidade proliferativa ao longo de 28 dias de análise nas linhagens U87, U343, A172 e U251 e atingiram sua velocidade máxima de crescimento a partir do intervalo de 10 a 20 dias de análise (linhas azuis dos gráficos da esquerda – **Figura 2**). Já nas células sobreviventes ao tratamento com VBL, também foi constatado a reaquisição da capacidade proliferativa ao longo de 28 dias nas linhagens U87, U343 e A172, mas não na linhagem U251 (linhas verdes dos gráficos da esquerda – **Figura 2**). Uma análise temporalmente mais estendida (análise durante 60 dias) mostrou que há a reaquisição da capacidade proliferativa das células sobreviventes na linhagem U251, mas esta ocorre somente a partir de 40 dias de análise (dados não mostrados). De uma maneira geral, podemos notar

que o recrescimento da população sobrevivente ao tratamento com VBL ocorre de forma mais tardia, quando comparado com MBZ, mas que ambas apresentam efeitos antitumorais consideráveis quando comparados ao controle e, até mesmo, à TMZ. Uma análise mais detalhada dos perfis de resposta a longo prazo dos 3 quimioterápicos testados mostrou que, exceto em U343, o tratamento com VBL se mostrou mais eficaz no tratamento das demais linhagens testadas (comparação entre as médias dos parâmetros), apresentando um melhor efeito antiproliferativo global durante 28 dias, mostrado pelo parâmetro rAUC, e um maior retardo na proliferação das células remanescentes, mostrado pelo parâmetro RTCT. Entretanto, a velocidade de proliferação representada pelo parâmetro RPR se mostrou igual ou maior que as demais drogas. Mesmo em U251 onde o RPR foi zero em 30 dias, quando analisado por 60 dias, a população remanescente tem uma velocidade de proliferação semelhante as demais drogas (dado não mostrado).

Outro ponto interessante de destacar é que, ao analisarmos os efeitos agudos dos fármacos nestas linhagens, não mais do que 30% das células sobreviveram. Entretanto, o RendCPD, que nada mais é do que uma análise pontual, assim como a sensibilidade aguda, mostrou que ao final do experimento as células sobreviventes representavam mais de 50% do controle, na maioria dos casos, mostrando que, nem sempre, a eficácia a longo prazo de um tratamento pode ser representada pelos seus efeitos agudos. Interessantemente, o perfil de resposta a longo prazo de MBZ, representado pela disposição dos parâmetros no gráfico, foi extremamente semelhante entre as 4 linhagens analisadas, sugerindo um possível padrão de resposta antiproliferativa entre essas linhagens. De uma

forma geral, excetuando-se os efeitos de TMZ em U343 e VBL em U251, as demais respostas apresentaram uma eficácia antiproliferativa média em torno de 20 a 40%, não demonstrando uma capacidade terapêutica muito melhor de VBL e MBZ, quando comparadas com TMZ. Se analisarmos individualmente a resposta de cada uma das linhagens, U87 e A172 não apresentaram grandes diferenças entre os fármacos testados, U343 se mostrou mais sensível a TMZ e com sensibilidade semelhante entre VBL e MBZ e U251 apresentou uma sensibilidade a VBL, seguida de MBZ e depois a TMZ.

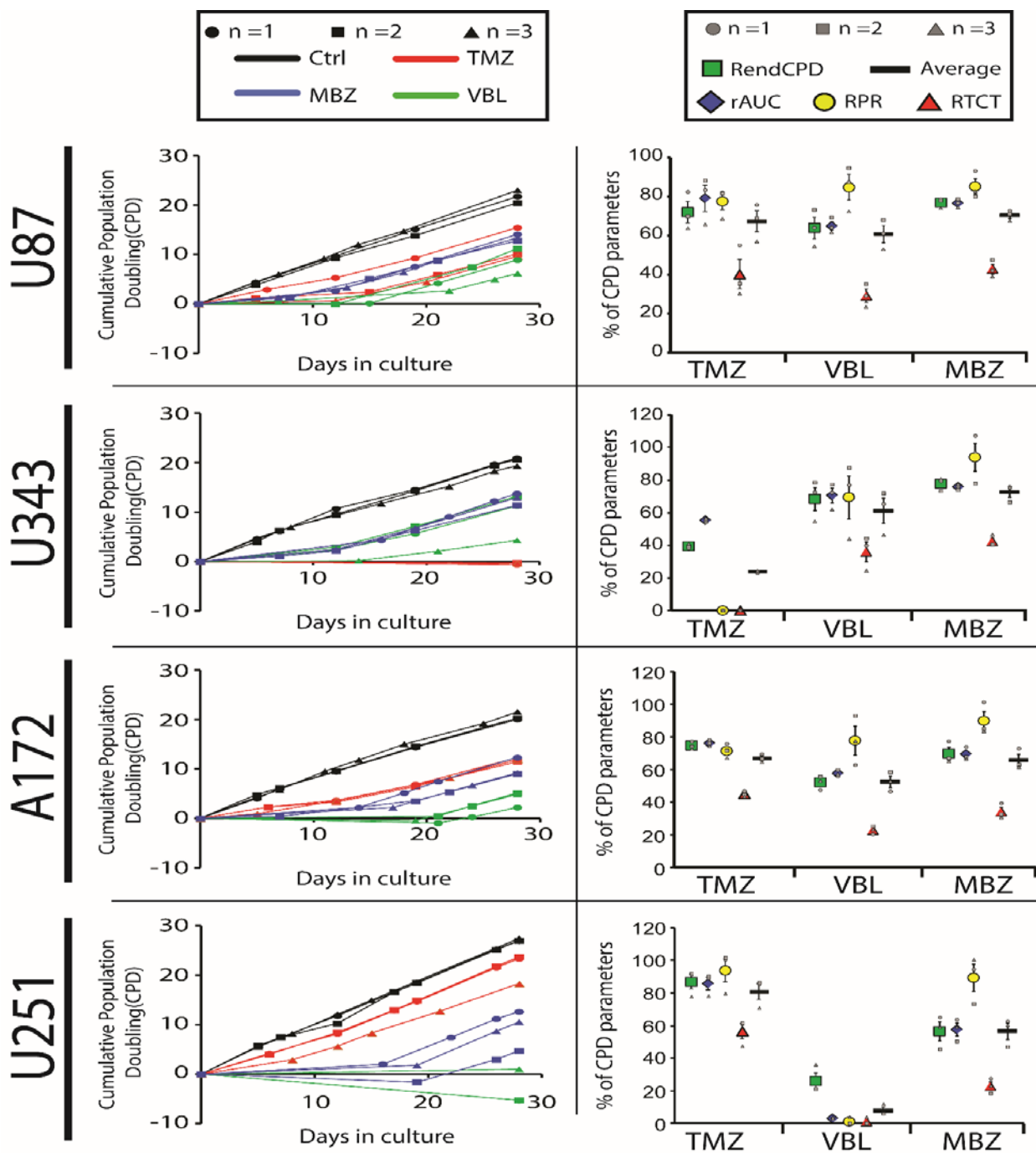
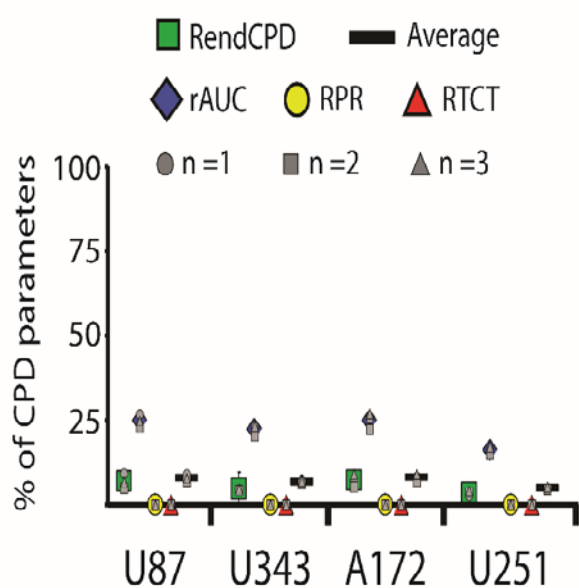
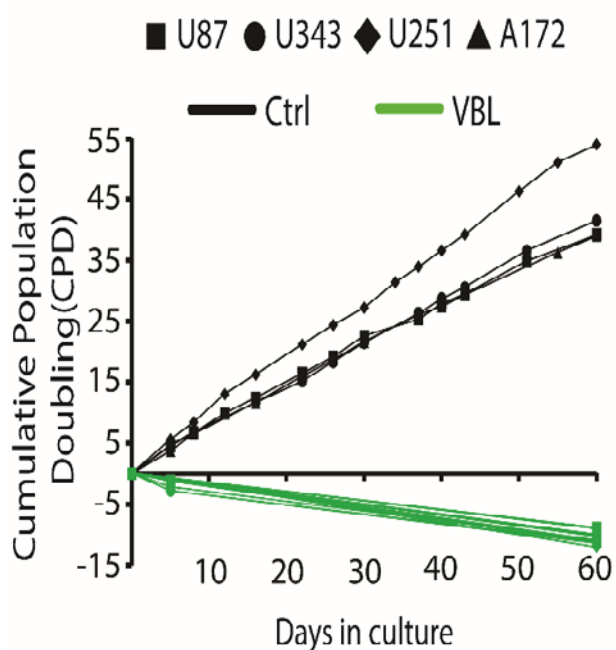


Figura 2 – Perfil de resposta crônica de linhagens de GBM ao tratamento com TMZ, VBL e MBZ. Células foram tratadas por 5 dias com concentrações plasmáticas de TMZ (50 μ M), VBL (5 nM) e MBZ (500 nM). Em seguida, a droga foi removida do meio de cultura e as células sobreviventes foram mantidas em meio livre de drogas por mais 23 dias, totalizando 28 dias de análise (gráficos da esquerda). Análise detalhada dos perfis de proliferação celular a longo prazo foi realizada, calculando o resultado final da proliferação celular em 28 dias (RendCPD), o efeito global do tratamento durante o período de análise (rAUC) a velocidade de proliferação das células sobreviventes (RPR) e o retardo no recrescimento da população decorrente do tratamento (RTCT) (gráficos da direita). A média entre os parâmetros foi usada para classificar a eficácia dos tratamentos. (n=3).

Em virtude da ineficácia dos tratamentos isolados em eliminar na sua totalidade as células testadas, foi investigada a possibilidade de haver um possível efeito combinatório entre fármacos atuantes na modulação do citoesqueleto e o agente alquilante padrão usado no tratamento dos GBM. Para testar esta hipótese, células de GBM foram expostas às combinações de TMZ+VBL ou TMZ+MBZ por um período de 5 dias, seguido de 23 dias em meio livre de drogas. Como visto na **Figura 3**, nenhuma das 4 linhagens testadas sobreviveu às combinações no período de 28 dias de análise. Então, baseado nos resultados prévios do tratamento com VBL de forma isolada na linhagem U251, que apresentou crescimento somente após 40 dias, resolvemos estender o período de análise para 60 dias, correspondendo a um tempo superior a dois ciclos de tratamento com TMZ em pacientes. Nem mesmo durante 60 dias, viu-se a presença de células proliferativas nas análises. Uma análise mais detalhada dos resultados do ensaio de proliferação a longo prazo das combinações, através dos parâmetros de CPD, confirmou uma eficácia representativa das duas combinações nas linhagens U87, U343, A172 e U251.

TMZ 50 mM + VBL 5 nM



TMZ 50 mM + MBZ 500 nM

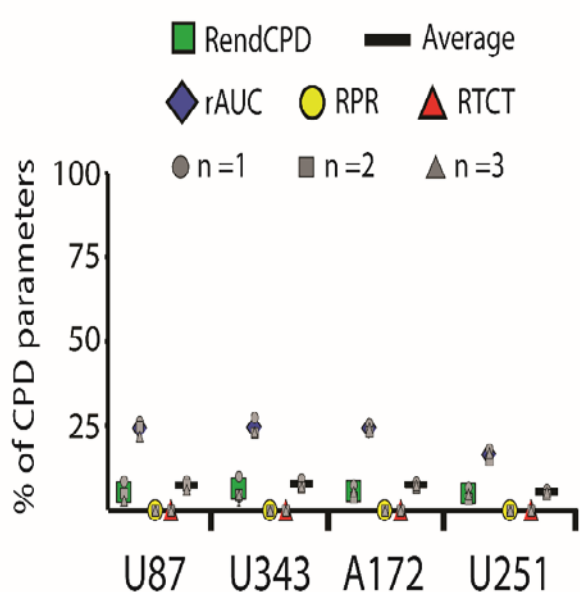
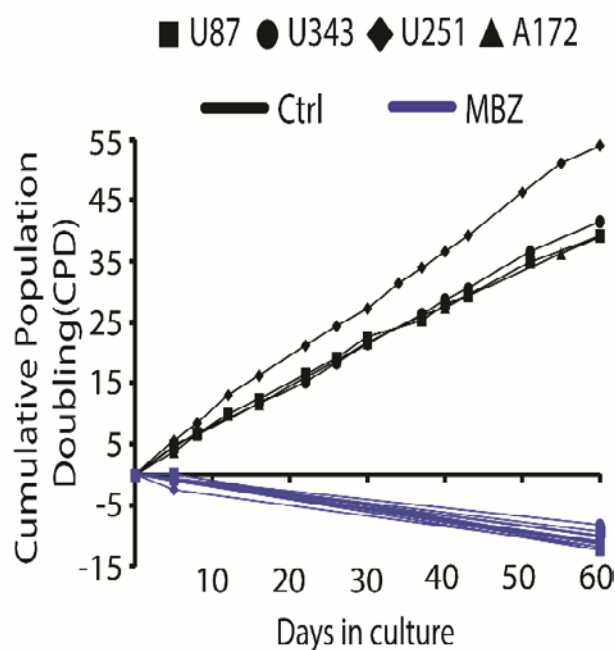


Figura 3 – tratamento combinado de Temozolomida com Vimblastina ou Mebendazole bloqueia a proliferação celular em U87, U343, A172 e U251. Células foram tratadas com as combinações por um período de 5 dias e analisadas por um período adicional de 55 dias de cultura celular na ausência de tratamento. Os controles foram tratados apenas com os veículos de cada uma das drogas (DMSO 0,1%). Os parâmetros de CPD foram aplicados e plotados num gráfico para quantificar os efeitos crônicos de cada uma das combinações. (n=3).

Um acompanhamento fotográfico ao longo de 60 dias de análise revelou a inexistência de populações proliferativas em nenhuma das combinações e em nenhuma das 4 linhagens. Ao final de 60 dias, é possível contatar apenas a presença de células com características morfológicas de células senescentes nas linhagens U87, U343 e A172 em ambas as combinações, sugerindo que o desencadeamento deste mecanismo pode representar uma das formas de bloqueio das células proliferativas dentro destas linhagens (**Figuras suplementares 1, 2, 3 e 4**, respectivamente)

U87 Glioblastoma cell

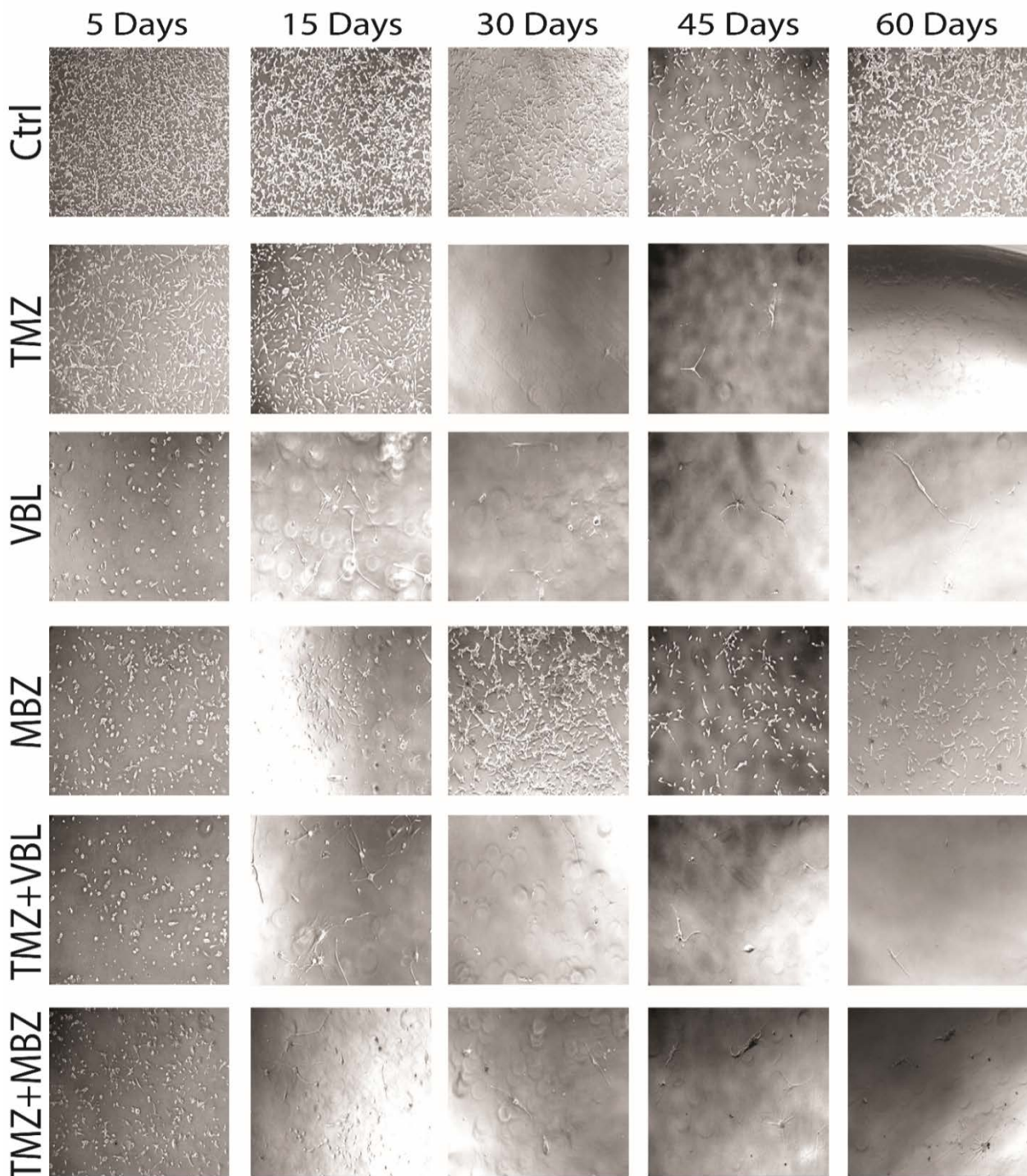


Figura Suplementar 1 – Análise micrográfica dos efeitos morfológicos e populacionais em U87. Células foram fotografadas com um aumento de 10X nos dias determinados e nas condições terapêuticas determinadas. A confluência apresentada em cada uma das fotos não é representativa das quantidades de células presentes nos gráficos de proliferação celular nos determinados períodos. Estas fotos têm como objetivo a comprovação da presença ou ausência de células em cada uma das condições.

U343 Glioblastoma cell

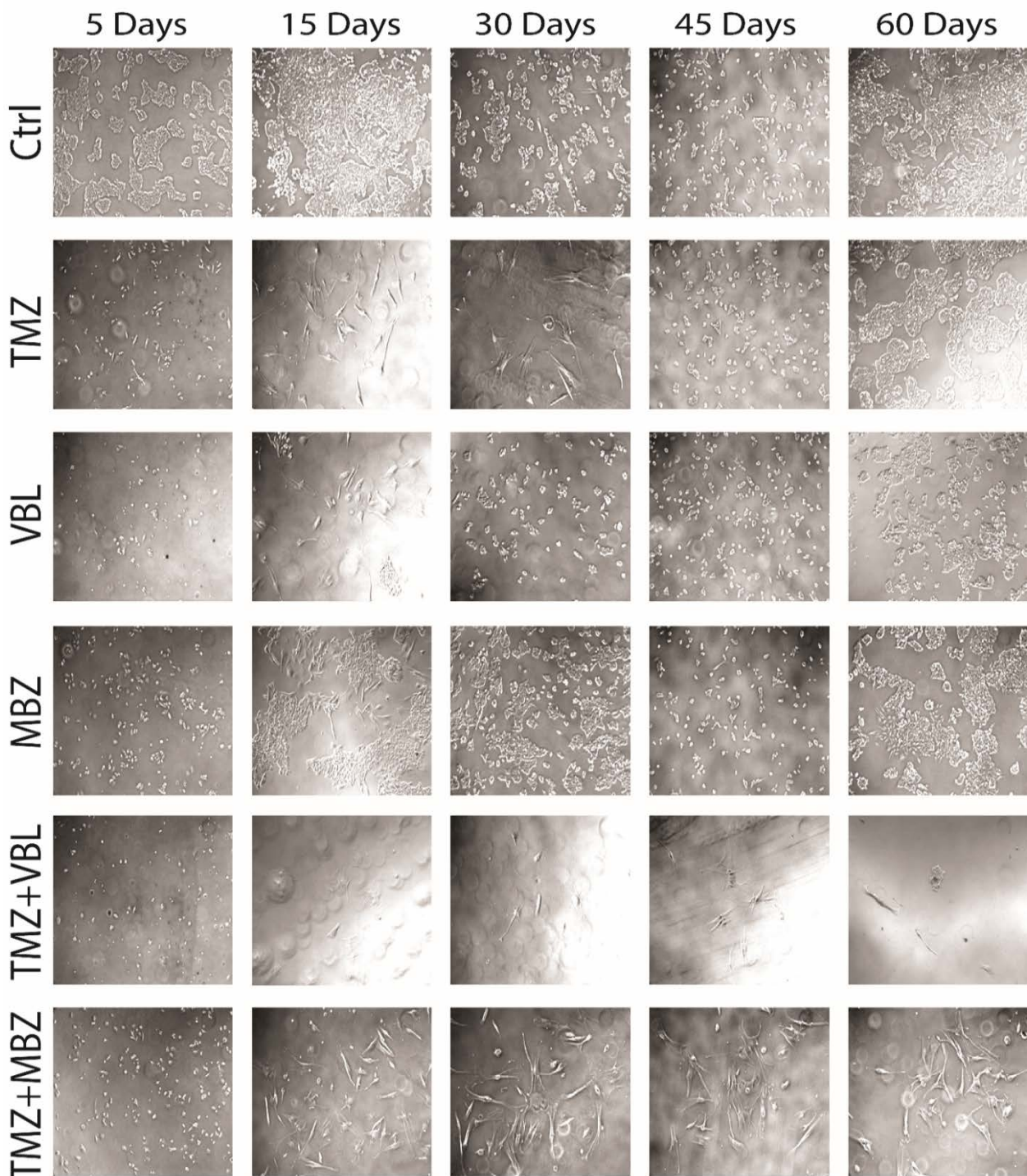


Figura Suplementar 2 – Análise micrográfica dos efeitos morfológicos e populacionais em U343. Células foram fotografadas com um aumento de 10X nos dias determinados e nas condições terapêuticas determinadas. A confluência apresentada em cada uma das fotos não é representativa das quantidades de células presentes nos gráficos de proliferação celular nos determinados períodos. Estas fotos têm como objetivo a comprovação da presença ou ausência de células em cada uma das condições.

A172 Glioblastoma cell

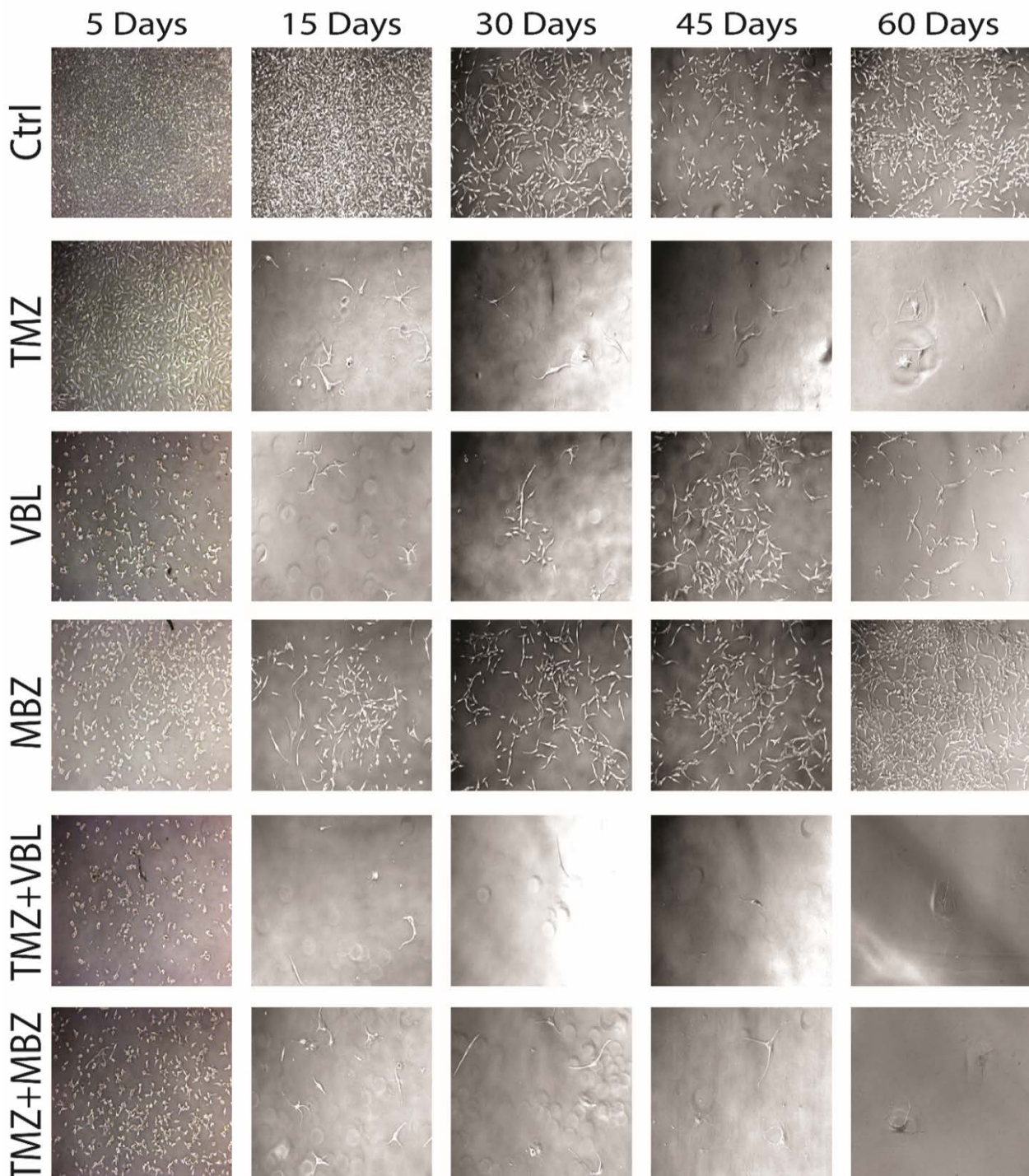


Figura Suplementar 3 – Análise micrográfica dos efeitos morfológicos e populacionais em A172. Células foram fotografadas com um aumento de 10X nos dias determinados e nas condições terapêuticas determinadas. A confluência apresentada em cada uma das fotos não é representativa das quantidades de células presentes nos gráficos de proliferação celular nos determinados períodos. Estas fotos têm como objetivo a comprovação da presença ou ausência de células em cada uma das condições.

U251 Glioblastoma cell

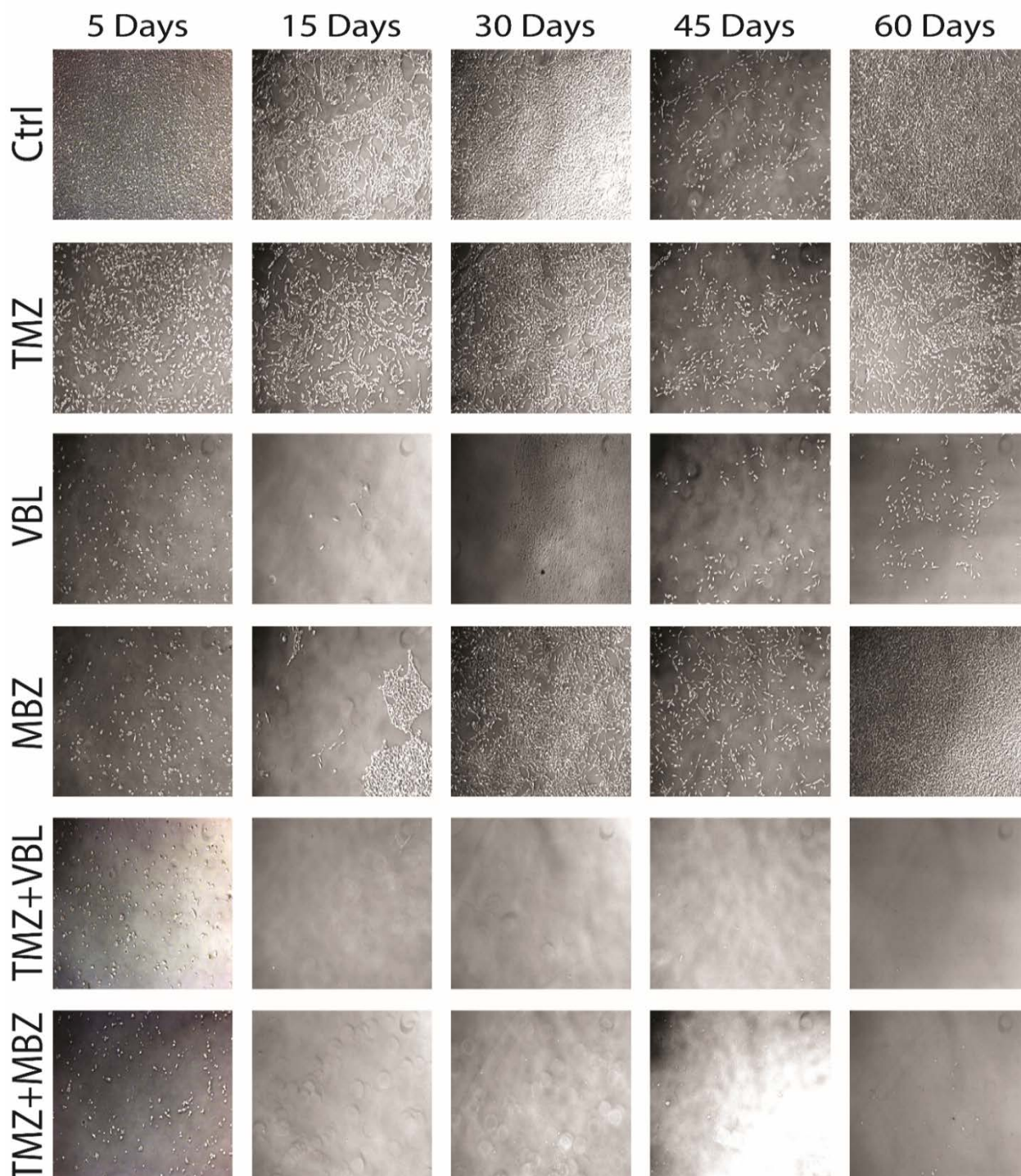


Figura Suplementar 4 – Análise micrográfica dos efeitos morfológicos e populacionais em U251. Células foram fotografadas com um aumento de 10X nos dias determinados e nas condições terapêuticas determinadas. A confluência apresentada em cada uma das fotos não é representativa das quantidades de células presentes nos gráficos de proliferação celular nos determinados períodos. Estas fotos têm como objetivo a comprovação da presença ou ausência de células em cada uma das condições.

Após a confirmação dos efeitos antiproliferativos das combinações TMZ+VBL e TMZ+MBZ através de ensaios de proliferação a longo prazo, análise dos parâmetros de CPD e de análise micrográfica, constatando a ausência de populações proliferativas nas 4 linhagens estudadas, nós investigamos se VBL ou MBZ de forma isolada ou associadas ao quimioterápico TMZ era capazes de eliminar ou, ao menos, retardar a proliferação celular a longo prazo nas linhagens C6 e U138, previamente mostradas como irresponsivas ao tratamento isolado com TMZ. Utilizando os mesmos padrões metodológicos de tratamento por 5 dias e análise em ausência de droga por mais 23 dias, viu-se que os fármacos administrados de formas isoladas desencadeiam um efeito antiproliferativo agudo bastante intenso no período da presença da droga, como visto anteriormente na **Figura 1**.

Uma análise estendida ao longo de 60 dias confirmou que as células sobreviventes mantêm a sua capacidade proliferativa apresentada nos primeiros 28 dias de análise, tanto na linhagem C6, quanto na linhagem U138 (**Figura 4A e 4B**, respectivamente). O mesmo acontece quando VBL e MBZ são associados à TMZ, mostrando perfis de proliferação celular praticamente idênticos aos dos fármacos adjuvantes isolados. Através da aplicação dos parâmetros de CPD surgem alguns detalhes interessantes sobre o perfil de proliferação celular a longo prazo em resposta aos tratamentos combinados (gráficos da direita nas **Figuras 4A e 4B**). É possível notar que tanto em C6, quanto em U138, a eficácia terapêutica de VBL e MBZ, representada pela média dos parâmetros do CPD, girou em torno de 22 a 32 %, ao longo de 30 dias, comparadas com 0% e 3% da TMZ em C6 e U138, respectivamente. De uma forma geral, a associação de TMZ

com os fármacos adjuvantes VBL e MBZ não apresentou uma melhora na eficácia terapêutica em relação as suas aplicações de forma isolada. Preocupantemente, as células sobreviventes à combinação de TMZ com VBL parecem apresentar uma velocidade de proliferação superior em 10% em comparação às células sobreviventes ao tratamento com VBL de forma isolada na linhagem U138.

Entretanto, em C6 a velocidade de proliferação das células sobreviventes à combinação parece ter sido levemente menor à população proveniente do tratamento com VBL de forma isolada. Já nas células remanescentes ao tratamento com MBZ parece que a velocidade de proliferação foi, sutilmente, aumentada em ambas as células, tanto na forma isolada, quanto combinada com TMZ. O mesmo não foi visto no grupo das primeiras 4 linhagens testadas. Para complementar as evidências da irresponsividade das linhagens C6 e U138 aos tratamentos combinados, foi realizado um acompanhamento micrográfico ao longo de 60 dias de todas as condições experimentais testadas. (**Figuras Suplementares 5 e 6**, respectivamente).

C6 Glioblastoma cell

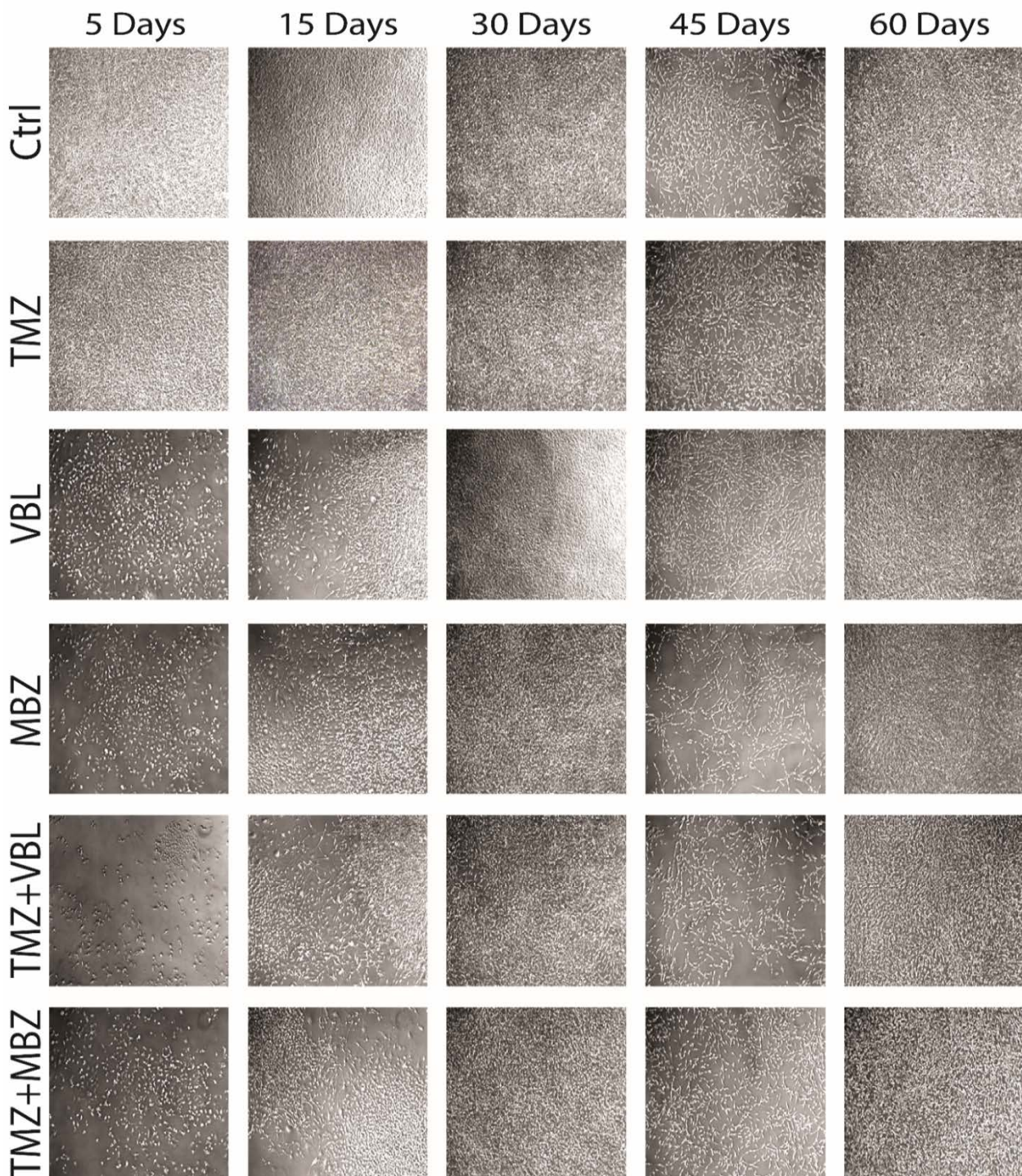


Figura Suplementar 5 – Análise micrográfica dos efeitos morfológicos e populacionais em C6. Células foram fotografadas com um aumento de 10X nos dias determinados e nas condições terapêuticas determinadas. A confluência apresentada em cada uma das fotos não é representativa das quantidades de células presentes nos gráficos de proliferação celular nos determinados períodos. Estas fotos têm como objetivo a comprovação da presença ou ausência de células em cada uma das condições.

U138 Glioblastoma cell

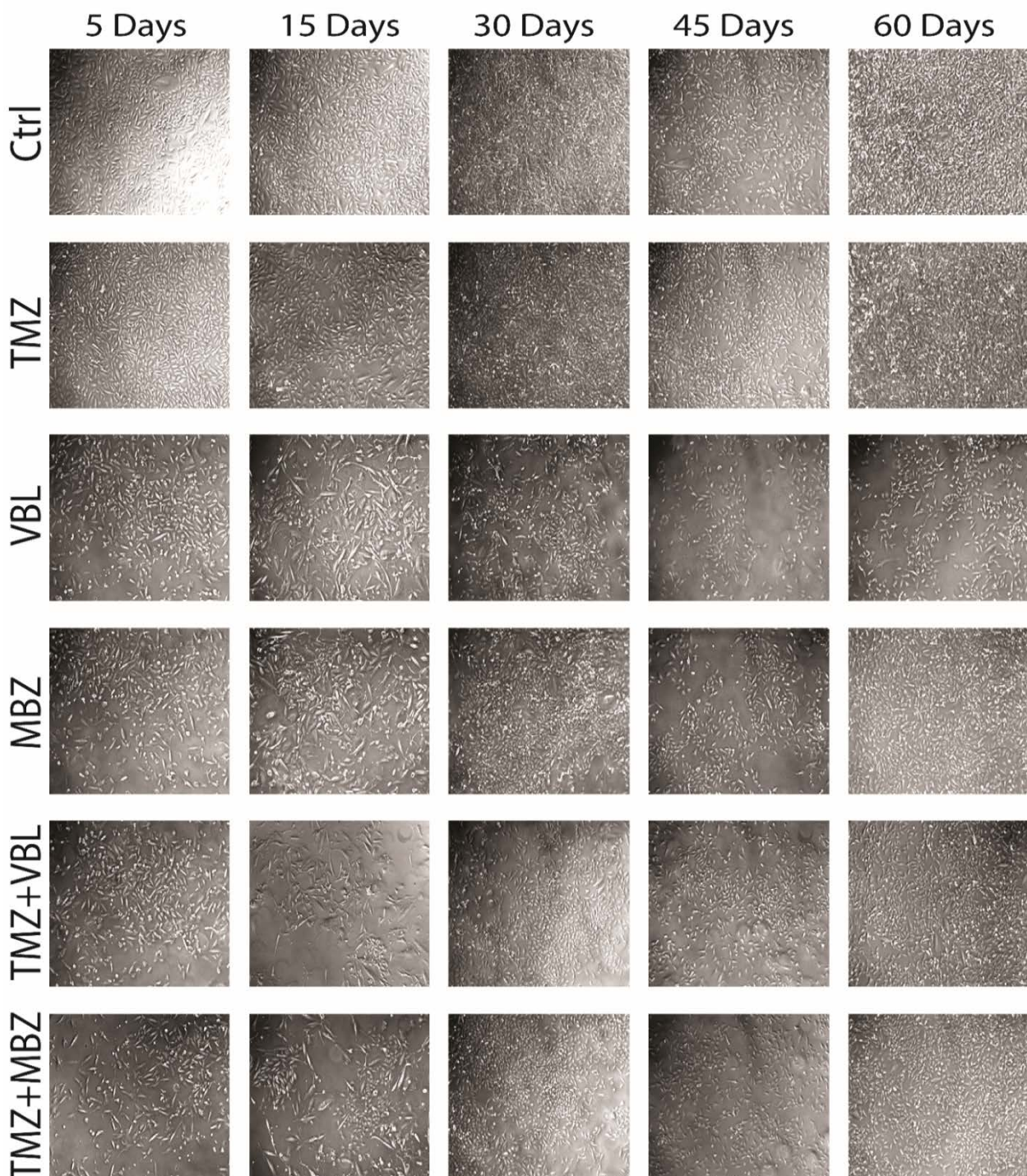


Figura Suplementar 6 – Análise micrográfica dos efeitos morfológicos e populacionais em U87. Células foram fotografadas com um aumento de 10X nos dias determinados e nas condições terapêuticas determinadas. A confluência apresentada em cada uma das fotos não é representativa das quantidades de células presentes nos gráficos de proliferação celular nos determinados períodos. Estas fotos têm como objetivo a comprovação da presença ou ausência de células em cada uma das condições.

Uma das estratégias alternativas ao uso de TMZ no tratamento de GBM recorrentes ainda continua sendo a administração do coquetel PCV (Brada *et al.*, 2010). Este conjunto de quimioterápicos é composto por 2 agentes alquilantes (Procarbazina e Lomustina) e um alcaloide semelhante estruturalmente e funcionalmente a VBL, chamado Vincristina. Baseado nesta ideia, nós elaboramos uma nova versão do coquetel PCV, combinando agora 2 agentes atuantes em microtúbulos (VBL e MBZ) e um agente alquilante (TMZ), formando o coquetel MTV, na tentativa de sensibilizar as linhagens C6 e U138.

Como visto na **Figura 4C**, o tratamento com MTV foi capaz de retardar consideravelmente a proliferação de ambas as células durante um período de 28 dias. Em C6, as células remanescentes readquiriram a capacidade proliferativa por volta dos 20 dias de análise, enquanto que em U138, apesar de constatar a presença de células, não foram observadas a presença de subpopulações proliferativas. Por este motivo, foi realizada uma análise estendida de 60 dias para verificar, tanto se a população crescente em C6 iria se manter proliferativa, quanto para verificar se aquelas células presentes em U138 retornariam a proliferar ao longo do tempo. Então, ficou confirmado que a população que retornara a proliferar na linhagem C6 nos 28 dias de análise manteve sua velocidade de proliferação na análise de 60 dias e constatou-se que as células remanescentes ao final de 28 dias de análise na linhagem U138 recuperaram sua atividade proliferativa a partir do 35º dia de análise, mostrando que, mesmo a combinação dos três fármacos foi incapaz de eliminar 100% das células nas linhagens C6 e U138.

A aplicação dos parâmetros do CPD apenas durante os primeiros 28 dias revelou que o tratamento com MTV apresentou uma eficácia terapêutica em torno de 60%, de acordo com a média dos parâmetros, em comparação com os 22 a 32% dos tratamentos isolados com VBL e MBZ ou das combinações destes com TMZ. Entretanto, mesmo analisando somente os primeiros 28 dias, o tratamento MTV não foi capaz de eliminar todas as células em C6 e U138, mas reduziu a velocidade de proliferação em ambas as linhagens em 65% e 80%, respectivamente. Mesmo considerando a análise estendida de 60 dias para o cálculo dos parâmetros, a velocidade de proliferação celular da população sobrevivente foi reduzida para 68% em C6 e 35% em U138 e a eficácia terapêutica para ambas as linhagens foi superior aos 40% (dados não mostrados). Ainda, o retardo na reaquisição da capacidade proliferativa (RTCT) foi superior aos 70% tanto para C6, quanto para U138.

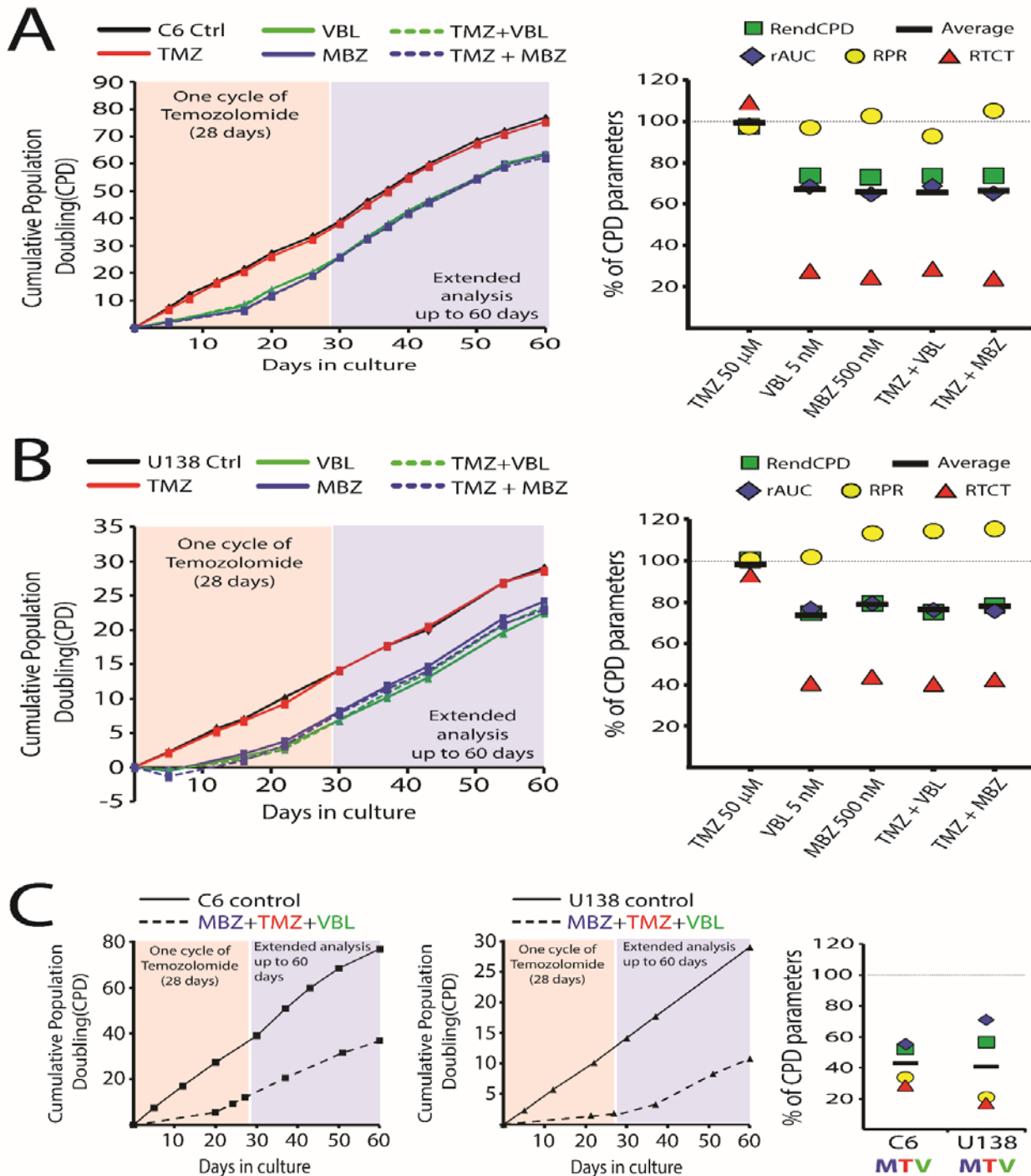


Figura 4 – Coquetel MTV reduz expressivamente a proliferação celular em células resistentes à TMZ. (A) O perfil de proliferação celular da linhagem C6 mostra que, tanto a combinação de VBL com TMZ, quanto MBZ com TMZ, produz o mesmo efeito dos fármacos adjuvantes de forma isolada. (B) O perfil de proliferação celular da linhagem U138 também mostra que, tanto a combinação de VBL com TMZ, quanto MBZ com TMZ, produz o mesmo efeito dos fármacos adjuvantes de forma isolada. (C) coquetel MTV composto por MBZ, TMZ e VBL reduz expressivamente a proliferação celular nas linhagens C6 (esquerda) e U138 (centro). O gráfico da direita mostra quantitativamente os efeitos do tratamento MTV nas duas linhagens.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, vimos o potencial terapêutico de duas moléculas que têm seus mecanismos de ação baseados na interferência do correto funcionamento da polimerização e despolimerização dos microtúbulos. Utilizando-se de doses possíveis de serem atingidas no plasma dos pacientes para VBL (Links *et al.*, 1999) e para MBZ (Munst *et al.*, 1980), estes dois fármacos foram capazes de desencadear altas taxas de citotoxicidade em linhagens de Glioma (acima de 75% de citotoxicidade, exceto em U138).

Este é um importante alvo de tratamentos quimioterápicos uma vez que estes componentes do citoesqueleto são responsáveis por inúmeros mecanismos envolvidos com as características mais fundamentais das células neoplásicas, como a proliferação descontrolada das células tumorais, motilidade, plasticidade morfológica, migração e invasão (Dumontet e Jordan, 2010). Entretanto, assim como já foi visto no trabalho anterior, que caracterizou os efeitos das doses plasmáticas de TMZ em GBMs e demonstrou a presença de uma subpopulação irresponsiva ao tratamento, em nenhuma linhagem utilizada no presente trabalho foi constatada uma letalidade total resultante do tratamento com VBL ou com MBZ. Nesta linha, existem uma série de trabalhos que apontam para os principais mecanismos envolvidos na resistência de agentes farmacológicos que atuam nos microtúbulos (Kavallaris, 2010). Dentre as principais causas de resistência estão a superexpressão de MDR-1 (*Multi Drug Resistance -1*), uma das proteínas responsáveis pelo efluxo de drogas nas células tumorais, mutações em sítios específicos no gene da tubulina, a unidades básica dos microtúbulos, que

resultam em alterações que impedem a correta ligação dos fármacos a estas proteínas, a presença de polimorfismos em isotipos de tubulina ou falhas na cascata de sinalização para os processos de morte celular desencadeados pelo incorreto funcionamento do citoesqueleto (Dumontet e Jordan, 2010; Kavallaris, 2010). Consequentemente à manutenção de subpopulações sobreviventes aos tratamentos com os agentes atuantes em microtúbulos, foi constatada a reaquisição da capacidade proliferativa destas células na análise a longo prazo.

Outro ponto a ser destacado foi uma resposta levemente mais potente apresentada pelo tratamento com Vimblastina, em comparação com Mebendazole, ambas nas suas concentrações plasmáticas. Isso pode ser explicado pelos mecanismos distintos entre as duas drogas. Sabe-se que VBL se liga na extremidade dos microtúbulos já formados e é responsável por induzir a despolimerização destes. Ainda, VBL bloqueia a associação entre os monômeros de alfa e beta tubulina por se ligar em um sítio localizado na interface de ligação entre os dois monômeros (Gigant *et al.*, 2009). Já o MBZ, não se sabe ao certo seu mecanismo de ação específico de interferência no correto funcionamento dos microtúbulos, mas sabe-se que este fármaco se liga no mesmo sítio no qual se liga a colchicina, outro agente interferente de microtúbulos. Este por sua vez, se liga com alta afinidade à subunidade beta da tubulina, resultando na formação de um dímero de tubulina curvado, impedindo que este adote uma formação alinhada para a montagem dos microtúbulos. Desta forma, a ligação de moléculas neste sítio impede a correta montagem dos microtúbulos (Ravelli *et al.*, 2004).

Portanto, pelo fato da Vimblastina provocar a despolimerização dos microtúbulos já polimerizados e impedir que ocorra a dimerização dos monômeros

alfa e beta tubulina, talvez interfira em uma série de processos vitais para o correto funcionamento da célula e, conseqüentemente, gere uma maior citotoxicidade quando comparada a MBZ que apenas bloqueia a polimerização de novas redes de microtúbulos. Uma das hipóteses é que subpopulações de células menos proliferativas possam ser menos afetadas por MBZ, a medida que estas não necessitam de uma alta atividade polimerizadora de microtúbulos, podendo, assim, resistir a presença deste fármaco.

Por outro lado, esta pequena diferença de mecanismo de ação entre as duas moléculas antimitóticas VBL e MBZ não parecem resultar em grandes discrepâncias de efeitos quando estas são associadas com o agente alquilante TMZ. Viu-se que tanto VBL, quanto MBZ, quando associadas à TMZ, foram eficazes no bloqueio completo da proliferação celular durante 60 dias em um subgrupo de linhagens de GBM. Estas linhagens caracterizam-se não só por apresentarem uma sensibilidade parcial à TMZ (como demonstrado no capítulo 2), mas também por serem compostas por uma subpopulação capaz de sobreviver a este tratamento e capaz de recuperar sua atividade proliferativa. Sendo assim, parece que a associação de VBL ou MBZ ao agente alquilante TMZ produz um efeito combinado, onde uma parcela de células é eliminada pelas metilações e mal pareamentos causados por TMZ e aquelas subpopulações que se viu serem capazes de sobreviver à exposição a este fármaco, são eliminadas ou impedidas de proliferar através do colapso na rede de microtúbulos gerado pela exposição aos fármacos adjuvantes. Inúmeros tratamentos associativos de agentes alquilantes e antimitóticos são utilizados no tratamento de uma série de tumores, incluindo GBMs (Sommer *et al.*, 1985; Azzabi *et al.*, 2005; Alexandrescu

et al., 2006). O próprio coquetel PCV é composto por agentes alquilantes e moduladores de microtúbulos (Prados *et al.*, 1999).

A associação de MBZ com TMZ já havia sido anteriormente sugerida e mostrada com potencial antitumoral em linhagens de GBM de camundongos e na sua forma isolada em uma linhagem humana pelo grupo do pesquisador *Gregory Riggins* (Bai *et al.*, 2011). Neste estudo viu-se que o tratamento com MBZ aumentou a sobrevida de camundongos injetados com células de GBMs de camundongos e de humanos, em comparação com o controle e com TMZ. Além disso, a combinação de MBZ com TMZ mostrou um aumento na sobrevida dos animais injetados com células de GBM de camundongos, em comparação com a TMZ de forma isolada. Entretanto, quando comparado com MBZ de forma isolada, a combinação não apresentou diferença na sobrevida. Sendo assim, mesmo com este primeiro trabalho mostrando um possível potencial antitumoral da TMZ com MBZ, nunca esta combinação havia sido testada em linhagens tumorais humanas e considerando as dosagens e o regime terapêutico padrão para o tratamento de GBM. Por outro lado, não há relatos na literatura associando VBL e TMZ no tratamento de GBM e nem de nenhum outro tipo de câncer, apesar de existir um coquetel utilizado como estratégia alternativa para o tratamento de melanomas avançados, que é composto de Cisplatina, Vimblastina e Temozolomida, chamado de PVT (Atkins *et al.*, 2002; Linardou *et al.*, 2015). Nos estudos clínicos de fase II foi constatada uma boa tolerância a PVT, mas sem uma melhora nos resultados de sobrevida de pacientes com metástase no SNC do melanoma avançado (Atkins *et al.*, 2002).

A ineficácia do efeito combinado de TMZ com VBL ou MBZ nas linhagens C6 e U138 parece ficar por conta da falta de efeito do tratamento com o agente alquilante, uma vez que se viu, previamente, que TMZ não resulta em efeitos significativos a longo prazo nestas linhagens e que o efeito resultante de ambas as combinações é extremamente semelhante aos efeitos das drogas adjuvantes quando usadas de forma isolada. Entretanto, ambos os tratamentos combinados parecem não ter resultado em um aumento da malignidade de ambas as linhagens, apesar da associação de VBL com TMZ ter aumentado levemente a proliferação das células sobreviventes. Mais investigações devem ser realizadas para confirmar este efeito. Desta forma, mesmo que não se tenha conhecimento sobre o perfil de resistência à TMZ nos GBMs a serem tratados, a terapia combinatória de TMZ com VBL ou MBZ parece ser uma estratégia alternativa a ser considerada, uma vez que se mostrou mais eficiente do que o tratamento somente com TMZ.

Baseado no uso cada vez mais corriqueiro de estratégias terapêuticas compostas por inúmeros fármacos, foi testada a eficácia terapêutica da exposição concomitante dos três fármacos TMZ, VBL e MBZ (coquetel MTV) no tratamento, principalmente das linhagens que apresentam resistência ao tratamento com TMZ de forma isolada. O resultado desta tríade terapêutica foi uma ampla redução na proliferação celular *in vitro* a longo prazo, mas sem a eliminação por completo das células estudadas. Esta redução mais expressiva gerada pelo coquetel MTV, provavelmente, deva ser resultado apenas dos mecanismos citotóxicos e citostáticos desencadeados por VBL e MBZ, uma vez que ambos os fármacos, apesar de atuarem em um mesmo alvo-molecular, apresentam mecanismos de

ação distintos (Ravelli *et al.*, 2004; Gigant *et al.*, 2009), o que pode potencializar os efeitos antitumorais uma da outra. TMZ, dificilmente deve ter seus efeitos antitumorais potencializados por alguma dessas duas moléculas, uma vez que se viu que as combinações simples de TMZ com VBL ou MBZ não apresentaram efeitos mais expressivos do que as drogas adjuvantes de forma isolada. Para confirmar a ausência de efeitos de TMZ no coquetel MTV, será necessária a investigação dos efeitos combinados de VBL e MBZ apenas.

CONCLUSÃO

O uso combinado de TMZ com os agentes moduladores de polimerização de microtúbulos VBL e MBZ pode representar uma importante estratégia terapêutica no tratamento de GBM que apresentem uma sensibilidade parcial à TMZ, sendo estes agentes adjuvantes um complemento no bloqueio da proliferação ou na eliminação das células sobreviventes à TMZ. Como estratégia alternativa para aquelas linhagens resistentes ao tratamento com TMZ, o uso do coquetel MTV pode representar uma importante terapia no retardo da proliferação celular destas linhagens. Talvez a aplicação de múltiplos ciclos usando MTV possa resultar em uma redução ainda maior ou até mesmo no bloqueio total da proliferação celular nestas linhagens. Sendo assim, a experimentação animal destas novas sugestões terapêuticas parece configurar o próximo passo na busca da confirmação deste novo tratamento sugerido.

6. DISCUSSÃO INTEGRADA

De uma forma geral, nosso grupo de pesquisa sempre esteve focado na melhor compreensão dos mais diversos mecanismos e vias de sinalização celular, utilizando os Glioblastomas como o principal modelo de estudo. Desta forma, sempre estivemos preocupados em desvendar os principais mecanismos celulares modulados por uma série de moléculas já testadas ou se a inibição de algum componente de uma determinada via de sinalização influencia positivamente ou negativamente na indução de algum processo celular, mas nenhum trabalho, de fato, se preocupou em avaliar alguns componentes-chave para que se fosse desenvolvido um tipo de pesquisa de caráter totalmente terapêutico. Assim, acredito que o grande trunfo alcançado com a presente tese, foi trazer para a pesquisa básica *in vitro* as mesmas preocupações que se tem em pesquisas em modelos animais ou em pesquisas clínicas com o único objetivo de tentar mimetizar ao máximo na experimentação *in vitro* o que acontece no paciente. Além disso, com este trabalho, foi possível despertar a curiosidade do nosso grupo de pesquisa em desvendar, não só os mecanismos responsáveis pela capacidade antitumoral das intervenções estudadas, mas voltar à atenção também para aquela proporção de células remanescentes que foi capaz de sobreviver e entender como estas se comportarão após o tratamento. Desta forma, direcionando o foco para este grupo de célula e tentar entender a sua biologia pode ser uma forma mais adequada de avançar na luta contra esta doença.

O maior problema enfrentado pelos oncologistas no tratamento dos pacientes acometidos pelos mais variados tipos tumorais não se deve ao fato de não existirem terapias boas o suficiente para reduzir drasticamente o volume da massa tumoral, e sim se deve ao fato da grande maioria não apresentar 100% de eficácia. As poucas células remanescentes do tratamento é que são as responsáveis pelo maior e mais temido problema do câncer, que é a resistência tumoral. Além disso, este fenômeno da resistência é extremamente lento e pode levar até anos para ser diagnosticado e por este motivo que o primeiro paradigma que tentamos quebrar é o do tempo de análise. Como visto nos capítulos 2 e 3 da presente tese, a maioria dos resultados não poderiam ser obtidos se não fosse uma análise crônica do comportamento das células de estudo à intervenção terapêutica a qual estas células foram expostas. Não podemos achar que resultados de citotoxicidade com significância estatística em 24h, 48h, ou 72h, representem a descoberta de uma nova estratégia terapêutica a ser usada contra o modelo celular em estudo. Análises agudas são extremamente importantes à nível de compreensão de mecanismos, estudo de vias de sinalização, triagem inicial de efeitos antitumorais de intervenções, mas não para a sugestão de novas terapias. É um desperdício de animais, dinheiro e tempo, deixarmos para testar a eficácia terapêutica crônica de uma intervenção com resultados agudos significativos somente na experimentação *in vivo*.

Através dos dois trabalhos experimentais apresentados, vemos a quantidade de informações que são acrescentadas quando avaliamos cronicamente os efeitos antitumorais de uma determinada intervenção e a quantidade de supostas novas terapias que podem ser descartadas por não apresentarem um potencial

antitumoral efetivo. Obviamente que nenhuma das estratégias sugeridas nesta tese são comprovadamente eficazes no tratamento de pacientes com GBM, mas certamente todas as estratégias previamente eliminadas ou que não apresentaram resultados satisfatórios na experimentação crônica *in vitro* não passarão nem mesmo dos ensaios *in vivo*. Augustine e colaboradores mostraram em seu trabalho a ineficácia de predição dos efeitos crônicos *in vivo* pelos experimentos agudos *in vitro*, mas que aqueles experimentos crônicos *in vitro* apresentaram uma correlação bem maior com os experimentos *in vivo* (Augustine *et al.*, 2009). Apesar da presente tese não estar composta por uma sessão de experimentação animal, com exceção aos resultados obtidos através de uma parceria para a validação da utilidade da nova ferramenta de análise sugerida por nós no capítulo 1, seria fundamental que todas estas investigações de caráter terapêutico fossem confirmadas através de ensaios *in vivo*, a fim de acrescentar uma maior significância terapêutica para as novas sugestões de tratamentos para GBM.

A partir desta premissa de análises crônicas *in vitro*, foi desenvolvida uma nova forma de analisarmos os resultados de proliferação celular a longo prazo, utilizando-se do ensaio Cumulative Population Doubling (CPD), onde somente avaliando os efeitos de uma determinada intervenção de forma estendida temporalmente que poderemos obter informações importantes como a resposta global ao longo do tempo de análise, através do parâmetro rAUC. No trabalho da caracterização dos efeitos antitumorais a longo prazo das doses plasmáticas de TMZ, vimos que este agente quimioterápico foi capaz de reduzir a população celular nos 5 primeiros dias de tratamento e, nos 7 dias posteriores ao fim do

tratamento, ainda se viu um efeito resquicial do tratamento, o qual só pôde ser avaliado a partir de uma análise crônica dos efeitos antitumorais. Também foi constatada a reaquisição da capacidade proliferativa ao longo do tempo em todas as linhagens estudadas, exceto aquelas que nunca foram afetadas pelo tratamento. A maneira mais simples de evidenciar todos estes efeitos é através do cálculo do parâmetro *relative Area Under Curve* (rAUC).

O uso do RTCT como uma forma de calcular o índice de retardo da proliferação resultante do tratamento é um dos parâmetros mais fundamentais no desenvolvimento de novas terapias que não se tem nenhuma informação clínica a respeito. Através dessa medida que é possível sugerir o tempo mínimo necessário para o espaçamento entre os ciclos de tratamento de uma terapia. No capítulo 3, vimos que VBL apresentou uma reaquisição da capacidade proliferativa, na maioria dos casos, após o 20º dia de análise. Desta forma, seria interessante que fosse testado um novo ciclo de tratamento próximo a este dia, evitando a expansão progressiva das células remanescentes previamente ao retratamento.

Caso nenhum dos demais parâmetros tivessem sido criados e sugeridos como uma análise integrada da resposta global de uma intervenção terapêutica, o parâmetro que deveria ser utilizado para substituir a citotoxicidade aguda, amplamente utilizadas nos trabalhos de investigação dos efeitos antitumorais das mais variadas intervenções, seria o RendCPD. Este parâmetro, de forma isolada, demonstra o efeito final de todo o perfil proliferativo desencadeado pela intervenção e representa uma medida de análise que muitas vezes na clínica é a única informação que o oncologista terá antes de submeter o paciente a um novo

ciclo de tratamento. Este parâmetro pode representar uma análise pontual do tamanho tumoral através de uma análise de imagem ou os níveis de um determinado marcador tumoral demonstrado em exames de sangue. Entretanto, se uma análise detalhada e constante dos efeitos crônico do tratamento fossem obtidos também na clínica, seria possível construir um perfil de respostas assim como na análise do CPD.

Todos os parâmetros anteriores são dependentes do tipo de resposta inicial que uma determinada intervenção é capaz de gerar, afetando a análise global dos efeitos antitumorais (rAUC), o tempo de recuperação da capacidade proliferativa (RTCT) e inevitavelmente a análise pontual no final do período de análise (RendCPD). Entretanto a grande importância na execução dos experimentos a longo prazo é verificar o perfil de recrescimento das células remanescentes à intervenção, a qual estas células foram expostas mimetizando *in vitro* o maior dos problemas encontrados na terapia oncológica atualmente, que é a recidiva tumoral. Como mostrado através de uma ampla investigação realizada no capítulo 2 da presente tese, nenhum dos mecanismos analisados, nem mesmo nenhum dos ensaios *in vitro* normalmente executados de forma aguda ou até mesmo de forma crônica, foram capazes de prever o perfil de crescimento das células sobreviventes. Nem mesmo os demais parâmetros analisados no mesmo ensaio de longo prazo onde o parâmetro RPR é analisado são capazes de informar a capacidade proliferativa e a velocidade de proliferação das células irresponsivas ao tratamento ao qual estas foram expostas. Somente RPR é capaz de avaliar, independentemente de qualquer outro efeito, o que acontece com aquela subpopulação de células sobreviventes.

Embora alguns trabalhos determinam que tumores recorrentes apresentem uma maior taxa de proliferação a partir da análise de lâminas de imunohistoquímica incubadas com Ki-67, um marcador de proliferação celular (Staber *et al.*, 2004), nenhuma destas estratégias avalia a cinética de proliferação celular das populações resistentes. Talvez se o volume tumoral fosse constantemente estimado neste estudo e a progressão tumor fosse plotado em um gráfico onde pudesse ser estimado o parâmetro RPR, fosse possível determinar se a velocidade de proliferação do tumor recorrente é ou não maior do que o tumor primário. Entretanto, baseado nos resultados encontrados nos capítulos 2 e 3 da presente tese, dificilmente um tratamento foi capaz de resultar num aumento expressivo na velocidade de proliferação das células sobreviventes. Apesar da ideia de que a exposição de células a um determinado tratamento funcione como uma representação de um processo de seleção natural entre as subpopulações celulares constituintes da massa tumoral primária, onde somente aquelas mais adaptadas à pressão seletiva irão sobreviver (Ding *et al.*, 2012), nenhuma das subpopulações sobreviventes aqui testadas parecem ser constituídas apenas de subpopulações com a capacidade proliferativa mais acentuada que a população inicial. Talvez a seleção de subpopulações com capacidade proliferativa maior seja rapidamente mascarada pelo restabelecimento da heterogeneidade tumoral a medida que a pressão seletiva é removida do meio (Gerlinger e Swanton, 2010) e então ocorre o surgimento de outras subpopulações com proliferação menos acentuada, reduzindo a velocidade média de expansão da população resistente. Isso, muitas vezes, pode ser decorrente de alterações epigenéticas induzidas pela presença da intervenção. A medida que não há mais a presença da pressão

seletiva, estas alterações epigenéticas podem ser revertidas gerando um alto grau de heterogeneidade populacional em um curto espaço de tempo (Brown *et al.*, 2014). Esta pode ser uma das razões pela qual algumas linhagens testadas apresentam grande variabilidade de respostas dentre as repetidas vezes que o experimento é realizado.

Ainda, é importante que fique claro e evidente a grande diferença entre os dois tipos de experimentos a longo prazo que podem ser realizados através do ensaio Cumulative Population Doubling (CPD). No capítulo 2, o objetivo principal da análise *in vitro* a longo prazo era caracterizar a resposta tumoral ao tratamento com TMZ nos dias determinados previamente. Iniciamos com uma investigação ao final do período de tratamento, e em seguida, foi feita uma análise a cada 7 dias para verificar qual seria o perfil de resposta das células que não foram eliminadas nos 5 primeiros dias (dias 12, 19 e 26). Por último, foi feita uma análise no vigésimo oitavo dia para completar o perfil proliferativo ao longo de um período correspondente a um ciclo de tratamento com TMZ dado aos pacientes com GBM. Assim, mesmo nas condições onde o tratamento foi capaz de eliminar quase que por completo as células testadas, foi feita a análise e o replaqueamento de uma porção de células conhecidas para construir este perfil. O grande problema é que ao analisarmos um pequeno número de células em algum dos dias escolhidos, um número pequeno de células será replaqueado também e, desta forma, qualquer alteração para mais ou para menos nesta população replaqueada será quantificada como uma grande alteração na proliferação desta população, uma vez que o método utilizado para definir o perfil proliferativo das células a longo prazo calcula não o número de células obtido em

cada período e sim a quantidade de vezes que a população inicial dobrou ao final de um determinado período. Portanto, a fase mais crítica da escolha de dias determinados para a realização das análises populacionais é quando no dia escolhido temos poucas células para serem analisadas. Após transcorrida essa fase de baixa confluência entre as células analisadas, o restante do ensaio é capaz de identificar com alta precisão o índice de duplicação de uma determinada população.

Por outro lado, no capítulo 3, o mesmo ensaio foi utilizado, mas com um propósito bastante diferente ao abordado no capítulo 2. Desta vez, as células sobreviventes somente foram analisadas quando estas já haviam reestabelecido sua capacidade proliferativa por completo e já era possível identificar a presença de zonas de recrescimento celular. Executando o experimento desta forma, não é possível identificar e quantificar se um determinado tratamento é capaz de produzir algum efeito após o período de exposição da intervenção, uma vez que, a amostra somente voltará a ser analisada quando for detectada a presença de zonas proliferativas. A **Figura complementar 4** mostra um acompanhamento fotográfico ao longo do período de análise, onde no tratamento com MBZ no dia 15 de análise, é possível identificar a presença destas zonas proliferativas que determinam quando uma amostra pode ser analisada ou não. Usando este critério de analisar somente quando da presença de uma quantidade mínima de células, evitamos que ocorra falsos negativos quanto à presença de populações resistentes em um determinado tratamento. Ainda, outra informação que é perdida desta forma é a identificação do menor ponto de inflexão da curva, como definido pelo dia 12 nos experimentos realizados no capítulo 2. Este ponto pode

ser de suma importância, pois identifica o momento onde a população sobrevivente deixa de sofrer os efeitos da intervenção e readquire a capacidade proliferativa. A identificação deste ponto pode ser de suma importância para aqueles trabalhos que desejam sugerir novas estratégias combinatórias a partir da variação de regimes terapêuticos dos fármacos usados. Talvez, este ponto possa representar o tempo máximo onde uma intervenção adjuvante possa ser administrada, pois representa o período inicial onde a população remanescente retorna a proliferar. Ainda, a análise da população sobrevivente somente quando da presença de zonas proliferativas pode afetar os valores obtidos no parâmetro rAUC, uma vez que os efeitos responsáveis pela redução da população inicial estudada não serão devidamente registrados na curva de proliferação, gerando um valor superestimado deste parâmetro nestes casos.

Portanto, assim como em qualquer ensaio, existem diferentes formas de execução e esta deve ser definida de acordo com o objetivo final para o qual o experimento foi empregado. Nesta tese, trouxemos a aplicação de duas diferentes formas de análise *in vitro* a longo prazo utilizando o ensaio do Cumulative Population Doubling (CPD), onde a primeira delas é mais indicada para a construção de um perfil geral da resposta aguda e crônica a uma determinada intervenção e a segunda é mais voltada para a análise do comportamento das células sobreviventes a esta intervenção. De acordo com o tipo de pergunta experimental que temos, a maneira mais adequada de execução do experimento deve ser definida.

Por este motivo que algumas diferenças podem ser vistas no perfil proliferativo a longo prazo da exposição à TMZ no capítulo 2 e o comportamento

das células sobreviventes ao mesmo tratamento no capítulo 3. Um exemplo claro desta diferença é a linhagem U343 tratada com TMZ, onde no capítulo 2 mostrou uma alta taxa proliferativa na porção final do período de análise e no capítulo 3, onde o objetivo era identificar o comportamento das células sobreviventes, não se constatou o crescimento da população. Como caracterizado no capítulo 2, os principais mecanismos desencadeados pelo tratamento com TMZ são altas taxas de morte celular e senescência. Como a senescência é um processo celular onde a célula não é eliminada, podemos notar, até mesmo na **Figura suplementar 2** do capítulo 3, que há a presença de um grande grupo de células senescentes durante todo o período de análise. Nos resultados do capítulo 3, não houve um crescimento da população final em relação à população inicial analisada. Entretanto, a população inicial do experimento era de 15 mil células. Desta forma, seria necessária uma grande expansão da população sobrevivente para que fosse constatado um aumento expressivo na população sobrevivente nos moldes do experimento do capítulo 3. Uma análise mais estendida da proliferação celular de U343 expostas à TMZ revelou que há a expansão da população sobrevivente (dados não mostrados), só que esta acontece em um tempo maior do que o estabelecido para o fim do experimento analisado. Já no capítulo 2, como as análises são feitas em dias determinados, para obter o valor de PD do intervalo 12-19, a presença de um pequeno grupo de células no dia 12 foi comparada com um número mais elevado de células no dia 19, possivelmente resultante do início da reaquisição da capacidade proliferativa da subpopulação sobrevivente, o que acarreta em um alto valor de PD que posteriormente foi acrescido ao PD do intervalo 19-26, onde as células proliferativas possivelmente já apresentavam

uma constância no aumento do número de células. Tudo isso, resultou em um perfil progressivo de expansão da população. Por estes motivos é que deve se ter todo o cuidado para realizar análises comparativas entre os diferentes modos de execução do experimento do CPD.

Outra preocupação do presente trabalho foi em relação às doses dos fármacos utilizados na execução dos experimentos *in vitro*. É bastante comum visualizarmos trabalhos de caráter terapêutico na literatura, fazendo uso de doses exacerbadas para a execução dos experimentos *in vitro*. Até mesmo os trabalhos mecanísticos que tem como foco apenas o estudo de um mecanismo específico em um determinado modelo de célula deveria se adaptar ao uso de doses possíveis de serem atingidas nos pacientes, até porque estes trabalhos servem como base para que os estudos terapêuticos sejam desenvolvidos. Uma vez que estes trabalhos mecanísticos são executados fazendo uso de doses acima do possível de ser alcançado em pacientes, os mecanismos desencadeados por este tratamento podem não representar o que acontece na realidade clínica.

Outro exemplo bastante comum de ser encontrado na literatura é o estudo de resistência a quimioterápicos, onde a obtenção das células resistentes é feita a partir da exposição a doses crescentes de um determinado quimioterápico para que haja a seleção de uma subpopulação sobrevivente e esta, normalmente é mantida na presença de altas doses do fármaco para que não haja a perda do perfil resistente. Qualquer informação obtida a partir destas células deve-se ter um certo grau de cautela, pois estas são frutos de uma situação totalmente hipotética que não corresponde ao que acontece na realidade clínica. Existem inúmeros exemplos na literatura que mostram que diferentes doses ou tempo de

exposição a uma determinada molécula é capaz de desencadear diferentes processos celular. Um exemplo é o 3-MA, um inibidor clássico do mecanismo da autofagia, que quando administrado por longos períodos é capaz de ativar a autofagia ao invés de inibi-la (Wu *et al.*, 2010). O mesmo deve acontecer nestes casos de exposição prolongada ou exposição a concentrações exageradas. Desta forma, tivemos o cuidado de estabelecer um critério para determinar a concentração máxima a ser usada em todos os experimentos *in vitro*. Para tal, buscamos na literatura informações a respeito da maior concentração do fármaco possível de ser atingida no plasma dos pacientes e todos os experimentos foram executados respeitando este limite farmacocinético. Como consequência do estabelecimento deste critério, pouquíssimos trabalhos de pesquisa *in vitro* trazem informações nas concentrações escolhidas para que se possa fazer uma análise comparativa dos efeitos. Por este motivo que refizemos uma caracterização dos principais mecanismos desencadeados por TMZ utilizando uma concentração do fármaco que está dentro da faixa terapêutica. Como esperado, os mecanismos desencadeados, de uma maneira geral, foram os mesmos, mas talvez a intensidade de desencadeamento é que pode influenciar na análise final, principalmente para servir de suporte aos trabalhos de caráter terapêutico.

Dentro desta mesma linha de raciocínio, a escolha do período de exposição das células ao fármaco testado foi decidida com base em informações clínicas de como este é administrado nos pacientes. Assim como as doses, existe uma imensa variedade de regimes de tratamento na experimentação *in vitro* que impossibilita que muitos dados possam ser comparados entre si. Para evitar este

tipo de divergência e para tentar mimetizar o máximo possível os efeitos dos tratamentos escolhidos ao que acontece na realidade clínica, foi escolhido o regime padrão de administração da Temozolomida, o quimioterápico de escolha para o tratamento de pacientes acometidos com Glioblastoma. Assim, tendo a pretensão futura de que estas moléculas adjuvantes possam ser acrescentadas ao regime terapêutico dos pacientes, sem que haja a substituição do fármaco-padrão ouro, que é a Temozolomida, todas as terapias foram administradas nas células de estudo, seguindo o regime terapêutico de TMZ, que é constituído de um período de 5 dias de exposição ao tratamento, seguido de um período de 23 dias de recuperação do paciente, sem que haja a administração de outros tratamentos até que finalize o ciclo de 28 dias (Strik *et al.*, 2012). Existem outros regimes terapêuticos alternativos de administração de TMZ em pacientes com GBM, mas nenhum deles apresentou uma melhora significativa na sobrevida dos pacientes. Sendo assim, definiu-se o regime 5/23 para o tratamento de todas as linhagens com qualquer uma das drogas utilizadas. Este regime é composto por administrações diárias de doses de TMZ durante os 5 primeiros dias. Por este motivo, foi testado o tratamento diário das células com TMZ, em paralelo ao tratamento único no primeiro dia e não foram constatadas diferenças no perfil proliferativo (dados não mostrados). Então, optou-se por uma única administração dos quimioterápicos nas células-alvo no primeiro dia e a permanência deste meio contendo os fármacos até o dia 5, onde então este era substituído por um meio de cultura livre da presença de fármacos. Deste modo, acreditamos que esta seria a melhor maneira de representar o regime terapêutico aplicado em pacientes acometidos pelo mesmo tipo tumoral estudado.

Apesar de ter sido especificamente discutido ao final do capítulo 3, trazemos novamente à tona as diferentes combinações farmacológicas encontradas neste trabalho para que possa ficar evidente a importância destes resultados como um primeiro passo na consolidação de uma nova sugestão terapêutica. É de suma relevância a descoberta de novas associações entre fármacos já bem estabelecidos e descritos na literatura como sendo funcionais e seguros, quando administrados em humanos. Desta forma, todo o processo de ensaios clínicos para avaliar os graus de segurança e tolerabilidade em pacientes podem ser significativamente reduzidos. Além disso, está comprovada a capacidade de cruzamento da barreira hematoencefálica para ambos os fármacos adjuvantes à TMZ (Villanueva, 2012; Bai *et al.*, 2015), o qual é o grande limitante para o uso de uma série de moléculas com potencial terapêutico para Gliomas. Mebendazole é amplamente utilizado para o tratamento de doenças parasitárias cerebrais e Vimblastina é um dos quimioterápicos de escolha para o tratamento de Gliomas pediátricos de baixo grau. Assim, associando uma destas duas moléculas ao tratamento com TMZ, é possível que os tumores cerebrais sejam expostos a ambos os fármacos e respondam de forma semelhante ao apresentado nos experimentos *in vitro*.

Apesar da VBL ter apresentado resultados levemente mais potentes que o MBZ, este último leva uma grande vantagem para ser escolhido entre elas a terapia a ser associada à TMZ, o seu preço. Mebendazole é um fármaco antiparasitário extremamente barato e está demonstrado clinicamente que a administração contínua deste não causa efeitos colaterais severos no paciente. Portanto, seria consideravelmente mais fácil que esta combinação fosse

efetivamente testada em pacientes (após todos os testes precedentes), devido ao baixo custo do fármaco adjuvante, do que a combinação com VBL.

Já a combinação entre os três fármacos testados (coquetel MTV) que apresentou uma redução expressiva na proliferação das células resistentes ao tratamento com TMZ de forma isolada, existe uma chance de que este possa avançar para testes em animais e posteriormente em pacientes, sem que haja maiores complicações quanto a sua toxicidade ou efeitos colaterais, uma vez que existem estudos clínicos para o tratamento de melanomas avançados que associam a Temozolomida com a Vimblastina e mais outras 3 moléculas sem que haja maiores complicações nos pacientes (Atkins *et al.*, 2002; Linardou *et al.*, 2015). Deste modo, considerando que MBZ não apresenta altos níveis de toxicidade, nem mesmo quando administrado durante 24 meses ininterruptos (Vutova *et al.*, 1999), é possível que o coquetel MTV possa, um dia, ser testado em ensaios clínicos sem apresentar maiores complicações.

7. CONCLUSÕES GERAIS

- O uso de critérios clínicos como dose e tempo de exposição à intervenção em ensaios *in vitro* se faz necessário para que haja uma aproximação da pesquisa básica com a pesquisa clínica.
- Em pesquisas básicas *in vitro* de caráter terapêutico, é necessário o uso de experimentos crônicos para avaliar integralmente o potencial terapêutico de uma determinada intervenção.
- O conjunto dos novos parâmetros (RendCPD, rAUC, RPR e RTCT) sugeridos representa uma nova ferramenta para avaliar e quantificar os efeitos antitumorais de intervenções investigadas, tanto em experimentos *in vitro*, quanto *in vivo*.
- O parâmetro RPR, responsável por determinar a velocidade de recrescimento das células, é a única medida capaz de avaliar o comportamento das células remanescentes dentre todos os ensaios utilizados nesta presente tese e este foi incapaz de ser predito por qualquer outra medida de mecanismos desencadeados pelo tratamento com TMZ.
- Ensaios *in vitro* a longo prazo são capazes de mimetizar o comportamento proliferativo da recorrência tumoral em pacientes.
- TMZ nas doses plasmáticas foi incapaz de eliminar por completo as células de qualquer uma das linhagens de Glioblastoma testadas no presente trabalho.
- A combinação de Vimblastina ou Mebendazole com TMZ bloqueia a proliferação celular durante longos períodos em linhagens de GBM com sensibilidade parcial à TMZ.

- Linhagens totalmente resistentes à TMZ são parcialmente afetadas pela combinação de TMZ com VBL ou MBZ, possivelmente decorrente apenas do efeito do fármaco adjuvante
- A combinação de MBZ+TMZ+VBL (MTV) retarda expressivamente a proliferação celular em linhagens resistentes à TMZ, possivelmente em decorrência do efeito combinado de MBZ e VBL, que apesar de serem fármacos moduladores de microtúbulos, atuam em sítios distintos e apresentam mecanismos de ação diferentes.

8. PERSPECTIVAS GERAIS

- Tornar rotineiro o uso dos parâmetros sugeridos como uma nova forma de quantificar a eficácia pré-clínica de novas intervenções.
- Identificar as principais alterações moleculares induzidas por doses terapêuticas de TMZ *in vitro*.
- Investigar os principais motivos pelos quais estas populações sobreviventes são capazes de resistir aos tratamentos.
- Caracterizar molecularmente estas células sobreviventes, em busca de informações terapêuticas relevantes.
- Caracterizar mecanisticamente e molecularmente os processos celulares desencadeados pelas combinações de TMZ com VBM ou MBZ, responsáveis pela completa eliminação das células parcialmente sensíveis a TMZ, e também do coquetel MTV, que foi responsável pela atenuação da velocidade de proliferação das células resistentes a TMZ.
- Investigar o potencial terapêutico destas combinações fazendo o uso de linhagens primárias de GBM, utilizando o mesmo padrão de experimentação *in vitro* a longo prazo.
- Confirmar em animais o potencial terapêutico das novas sugestões terapêuticas combinatórias, avaliando não só a sobrevivência do animal, mas também a cinética de resposta do tumor, a fim de comparar com os resultados obtidos *in vitro*.

9. REFERÊNCIAS

- AARDEMA, M. J. et al. Aneuploidy: a report of an ECETOC task force. **Mutat Res**, v. 410, n. 1, p. 3-79, Feb 1998. ISSN 0027-5107 (Print)
0027-5107 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9587424> >.
- AGARWAL, M. L. et al. The p53 network. **J Biol Chem**, v. 273, n. 1, p. 1-4, Jan 2 1998. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9417035> >.
- AGNIHOTRI, S. et al. Alkylpurine-DNA-N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients. **J Clin Invest**, v. 122, n. 1, p. 253-66, Jan 2012. ISSN 1558-8238 (Electronic)
0021-9738 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22156195> >.
- ALEXANDRESCU, D. T. et al. Mitoxantrone, vinblastine and CCNU: long-term follow-up of patients treated for advanced and poor-prognosis Hodgkin's disease. **Leuk Lymphoma**, v. 47, n. 4, p. 641-56, Apr 2006. ISSN 1042-8194 (Print)
1026-8022 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16690523> >.
- ALIZADEH, A. A. et al. Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. **Nat Med**, v. 21, n. 8, p. 846-53, Aug 2015. ISSN 1546-170X (Electronic)
1078-8956 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26248267> >.
- ANDREN-SANDBERG, A. Pancreatic cancer: chemotherapy and radiotherapy. **N Am J Med Sci**, v. 3, n. 1, p. 1-12, Jan 2011. ISSN 1947-2714 (Electronic)
1947-2714 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22540056> >.
- ANNUNZIATA, C. M.; O'SHAUGHNESSY, J. Poly (ADP-ribose) polymerase as a novel therapeutic target in cancer. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 18, p. 4517-26, Sep 15 2010. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20823142> >.
- APPIN, C. L.; BRAT, D. J. Molecular genetics of gliomas. **Cancer J**, v. 20, n. 1, p. 66-72, Jan-Feb 2014. ISSN 1540-336X (Electronic)
1528-9117 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24445767> >.

- ATKINS, M. B. et al. A phase II pilot trial of concurrent biochemotherapy with cisplatin, vinblastine, temozolomide, interleukin 2, and IFN-alpha 2B in patients with metastatic melanoma. **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 10, p. 3075-81, Oct 2002. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12374674> >.
- AUGUSTINE, C. K. et al. Genomic and molecular profiling predicts response to temozolomide in melanoma. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 2, p. 502-10, Jan 15 2009. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19147755> >.
- AZZABI, A. et al. Phase I study of temozolomide plus paclitaxel in patients with advanced malignant melanoma and associated in vitro investigations. **Br J Cancer**, v. 92, n. 6, p. 1006-12, Mar 28 2005. ISSN 0007-0920 (Print)
0007-0920 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15756276> >.
- BACOLOD, M. D. et al. Brain tumor cell lines resistant to O6-benzylguanine/1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea chemotherapy have O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase mutations. **Mol Cancer Ther**, v. 3, n. 9, p. 1127-35, Sep 2004. ISSN 1535-7163 (Print)
1535-7163 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15367707> >.
- BADY, P. et al. MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencing and outcome, yielding a prediction model for comparisons across datasets, tumor grades, and CIMP-status. **Acta Neuropathol**, v. 124, n. 4, p. 547-60, Oct 2012. ISSN 1432-0533 (Electronic)
0001-6322 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22810491> >.
- BAER, J. C. et al. Depletion of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase correlates with potentiation of temozolomide and CCNU toxicity in human tumour cells. **Br J Cancer**, v. 67, n. 6, p. 1299-302, Jun 1993. ISSN 0007-0920 (Print)
0007-0920 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8512814> >.
- BAI, R. Y. et al. Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. **Neuro Oncol**, v. 13, n. 9, p. 974-82, Sep 2011. ISSN 1523-5866 (Electronic)
1522-8517 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21764822> >.

- BAI, R. Y. et al. Brain Penetration and Efficacy of Different Mebendazole Polymorphs in a Mouse Brain Tumor Model. **Clin Cancer Res**, v. 21, n. 15, p. 3462-70, Aug 1 2015. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25862759> >.
- BAILEY, P.; CUSHING, H. **A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis With a Correlated Study of Prognosis**. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1926.
- BAKER, S. D. et al. Absorption, metabolism, and excretion of 14C-temozolomide following oral administration to patients with advanced cancer. **Clin Cancer Res**, v. 5, n. 2, p. 309-17, Feb 1999. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10037179> >.
- BARD, J. **Tissue culture, methods and applications**. Academic Press, 1974. 120-121.
- BATCHELOR, T. T. et al. Phase III randomized trial comparing the efficacy of cediranib as monotherapy, and in combination with lomustine, versus lomustine alone in patients with recurrent glioblastoma. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 26, p. 3212-8, Sep 10 2013. ISSN 1527-7755 (Electronic)
0732-183X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23940216> >.
- BEKHTI, A.; PIROTTE, J. Cimetidine increases serum mebendazole concentrations. Implications for treatment of hepatic hydatid cysts. **Br J Clin Pharmacol**, v. 24, n. 3, p. 390-2, Sep 1987. ISSN 0306-5251 (Print)
0306-5251 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3663452> >.
- BENNETT, M. et al. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. **Science**, v. 282, n. 5387, p. 290-3, Oct 9 1998. ISSN 0036-8075 (Print)
0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9765154> >.
- BHERE, D.; SHAH, K. Stem Cell-Based Therapies for Cancer. **Adv Cancer Res**, v. 127, p. 159-89, 2015. ISSN 0065-230X (Print)
0065-230X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26093900> >.
- BLANC, J. L. et al. Correlation of clinical features and methylation status of MGMT gene promoter in glioblastomas. **J Neurooncol**, v. 68, n. 3, p. 275-83, Jul 2004. ISSN 0167-594X (Print)
0167-594X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15332332> >.

- BOGLER, O. et al. The p53 gene and its role in human brain tumors. **Glia**, v. 15, n. 3, p. 308-27, Nov 1995. ISSN 0894-1491 (Print)
0894-1491 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8586466> >.
- BOIARDI, A. PCV chemotherapy for recurrent glioblastoma multiforme. **Neurology**, v. 56, n. 12, p. 1782, Jun 26 2001. ISSN 0028-3878 (Print)
0028-3878 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425963> >.
- BOOTS-SPRENGER, S. H. et al. Significance of complete 1p/19q co-deletion, IDH1 mutation and MGMT promoter methylation in gliomas: use with caution. **Mod Pathol**, v. 26, n. 7, p. 922-9, Jul 2013. ISSN 1530-0285 (Electronic)
0893-3952 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23429602> >.
- BOUFFET, E. et al. Phase II study of weekly vinblastine in recurrent or refractory pediatric low-grade glioma. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 12, p. 1358-63, Apr 20 2012. ISSN 1527-7755 (Electronic)
0732-183X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22393086> >.
- BOURDON, J. C. et al. Further characterisation of the p53 responsive element--identification of new candidate genes for trans-activation by p53. **Oncogene**, v. 14, n. 1, p. 85-94, Jan 9 1997. ISSN 0950-9232 (Print)
0950-9232 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9010235> >.
- BRADA, M. et al. Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of temozolomide (SCH 52365) for refractory or relapsing malignancies. **Br J Cancer**, v. 81, n. 6, p. 1022-30, Nov 1999. ISSN 0007-0920 (Print)
0007-0920 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10576660> >.
- BRADA, M. et al. Temozolomide versus procarbazine, lomustine, and vincristine in recurrent high-grade glioma. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 30, p. 4601-8, Oct 20 2010. ISSN 1527-7755 (Electronic)
0732-183X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20855843> >.
- BRAITHWAITE, P. A. et al. Clinical pharmacokinetics of high dose mebendazole in patients treated for cystic hydatid disease. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 22, n. 2, p. 161-9, 1982. ISSN 0031-6970 (Print)
0031-6970 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7094986> >.

- BROCK, C. S. et al. Phase I trial of temozolomide using an extended continuous oral schedule. **Cancer Res**, v. 58, n. 19, p. 4363-7, Oct 1 1998. ISSN 0008-5472 (Print)
0008-5472 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9766665> >.
- BROWN, R. et al. Poised epigenetic states and acquired drug resistance in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 14, n. 11, p. 747-53, Nov 2014. ISSN 1474-1768 (Electronic)
1474-175X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25253389> >.
- BRUCE, S. A.; DEAMOND, S. F.; TS'O, P. O. In vitro senescence of Syrian hamster mesenchymal cells of fetal to aged adult origin. Inverse relationship between in vivo donor age and in vitro proliferative capacity. **Mech Ageing Dev**, v. 34, n. 2, p. 151-73, Apr 1986. ISSN 0047-6374 (Print)
0047-6374 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3724250> >.
- BUATTI, J. et al. Radiation therapy of pathologically confirmed newly diagnosed glioblastoma in adults. **J Neurooncol**, v. 89, n. 3, p. 313-37, Sep 2008. ISSN 0167-594X (Print)
0167-594X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18712283> >.
- BUCKNER, J. C.; PUGH, S. L.; SHAW, E. G. **Phase III study of radiation therapy (RT) with or without procarbazine, CCNU, and vincristine (PCV) in low grade gliomas: RTOG 9802 with Alliance, ECOG, and SWOG. ASCO. USA 2014.**
- CAHILL, D. P. et al. Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 7, p. 2038-45, Apr 1 2007. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17404084> >.
- CAIRNCROSS, G. et al. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 18, p. 2707-14, Jun 20 2006. ISSN 1527-7755 (Electronic)
0732-183X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16782910> >.
- CAIRNCROSS, G. et al. Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 3, p. 337-43, Jan 20 2013. ISSN 1527-7755 (Electronic)

- 0732-183X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23071247> >.
- CAIRNCROSS, J. G.; MACDONALD, D. R. Successful chemotherapy for recurrent malignant oligodendroglioma. **Ann Neurol**, v. 23, n. 4, p. 360-4, Apr 1988. ISSN 0364-5134 (Print)
 0364-5134 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3382171> >.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, N. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1061-8, Oct 23 2008. ISSN 1476-4687 (Electronic)
 0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18772890> >.
- CARNERO, A. et al. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 8, n. 3, p. 187-98, May 2008. ISSN 1873-5576 (Electronic)
 1568-0096 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18473732> >.
- CEJKA, P. et al. Methylation-induced G(2)/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1. **EMBO J**, v. 22, n. 9, p. 2245-54, May 1 2003. ISSN 0261-4189 (Print)
 0261-4189 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12727890> >.
- CHEN, J.; LIN, J.; LEVINE, A. J. Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene. **Mol Med**, v. 1, n. 2, p. 142-52, Jan 1995. ISSN 1076-1551 (Print)
 1076-1551 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8529093> >.
- CHINOT, O. L. et al. Safety and efficacy of temozolomide in patients with recurrent anaplastic oligodendrogliomas after standard radiotherapy and chemotherapy. **J Clin Oncol**, v. 19, n. 9, p. 2449-55, May 1 2001. ISSN 0732-183X (Print)
 0732-183X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11331324> >.
- CHIPUK, J. E. et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. **Science**, v. 303, n. 5660, p. 1010-4, Feb 13 2004. ISSN 1095-9203 (Electronic)
 0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14963330> >.

- COBLEIGH, M. A. et al. A phase I/II dose-escalation trial of bevacizumab in previously treated metastatic breast cancer. **Semin Oncol**, v. 30, n. 5 Suppl 16, p. 117-24, Oct 2003. ISSN 0093-7754 (Print)
0093-7754 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14613032> >.
- COMELLA, G. et al. Combination chemotherapy with vinblastine, BCNU and cisplatin in advanced malignant melanoma. **Tumori**, v. 77, n. 3, p. 216-8, Jun 30 1991. ISSN 0300-8916 (Print)
0300-8916 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1862548> >.
- CORREIA, J. J.; LOBERT, S. Physicochemical aspects of tubulin-interacting antimetabolic drugs. **Curr Pharm Des**, v. 7, n. 13, p. 1213-28, Sep 2001. ISSN 1381-6128 (Print)
1381-6128 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11472263> >.
- COULTER, R. et al. Differences in the rate of repair of O6-alkylguanines in different sequence contexts by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. **Chem Res Toxicol**, v. 20, n. 12, p. 1966-71, Dec 2007. ISSN 0893-228X (Print)
0893-228X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17975884> >.
- CURTIN, N. J. et al. Novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, AG14361, restores sensitivity to temozolomide in mismatch repair-deficient cells. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 3, p. 881-9, Feb 1 2004. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14871963> >.
- D'ATRI, S. et al. Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis. **Mol Pharmacol**, v. 54, n. 2, p. 334-41, Aug 1998. ISSN 0026-895X (Print)
0026-895X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9687575> >.
- DANTZER, F. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair. **Methods Enzymol**, v. 409, p. 493-510, 2006. ISSN 0076-6879 (Print)
0076-6879 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16793420> >.
- DAYAN, A. D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. **Acta Trop**, v. 86, n. 2-3, p. 141-59, May 2003. ISSN 0001-706X (Print)
0001-706X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12745134> >.

- DENNY, B. J. et al. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. **Biochemistry**, v. 33, n. 31, p. 9045-51, Aug 9 1994. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8049205> >.
- DHODAPKAR, M. et al. Phase I trial of temozolomide (NSC 362856) in patients with advanced cancer. **Clin Cancer Res**, v. 3, n. 7, p. 1093-100, Jul 1997. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815788> >.
- DIAZ, L. A., JR. et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. **Nature**, v. 486, n. 7404, p. 537-40, Jun 28 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22722843> >.
- DING, L. et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v. 481, n. 7382, p. 506-10, Jan 26 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22237025> >.
- DINNES, J. et al. The effectiveness and cost-effectiveness of temozolomide for the treatment of recurrent malignant glioma: a rapid and systematic review. **Health Technol Assess**, v. 5, n. 13, p. 1-73, 2001. ISSN 1366-5278 (Print) 1366-5278 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359682> >.
- DOLAN, M. E.; MOSCHEL, R. C.; PEGG, A. E. Depletion of mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity by O6-benzylguanine provides a means to evaluate the role of this protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 14, p. 5368-72, Jul 1990. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2164681> >.
- DOLAN, M. E.; PEGG, A. E. O6-benzylguanine and its role in chemotherapy. **Clin Cancer Res**, v. 3, n. 6, p. 837-47, Jun 1997. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815757> >.
- DOUDICAN, N. et al. Mebendazole induces apoptosis via Bcl-2 inactivation in chemoresistant melanoma cells. **Mol Cancer Res**, v. 6, n. 8, p. 1308-15, Aug 2008. ISSN 1541-7786 (Print) 1541-7786 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18667591> >.

- DOWNING, K. H. Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 16, p. 89-111, 2000. ISSN 1081-0706 (Print)
1081-0706 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11031231> >.
- DREW, Y.; PLUMMER, R. PARP inhibitors in cancer therapy: two modes of attack on the cancer cell widening the clinical applications. **Drug Resist Updat**, v. 12, n. 6, p. 153-6, Dec 2009. ISSN 1532-2084 (Electronic)
1368-7646 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19939726> >.
- DRUKER, B. J. Imatinib: A Viewpoint by Brian J. Druker. **Drugs**, v. 61, n. 12, p. 1775-1776, 2001. ISSN 0012-6667 (Electronic)
0012-6667 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11735629> >.
- DUMONTET, C.; JORDAN, M. A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 10, p. 790-803, Oct 2010. ISSN 1474-1784 (Electronic)
1474-1776 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20885410> >.
- EL-DEIRY, W. S. et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. **Cell**, v. 75, n. 4, p. 817-25, Nov 19 1993. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8242752> >.
- EL-HATEER, H. et al. Low-grade oligodendroglioma: an indolent but incurable disease? Clinical article. **J Neurosurg**, v. 111, n. 2, p. 265-71, Aug 2009. ISSN 0022-3085 (Print)
0022-3085 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19284232> >.
- ERDINCLER, P. et al. The role of mebendazole in the surgical treatment of central nervous system hydatid disease. **Br J Neurosurg**, v. 11, n. 2, p. 116-20, Apr 1997. ISSN 0268-8697 (Print)
0268-8697 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9155997> >.
- ESTELLER, M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 45, p. 629-56, 2005. ISSN 0362-1642 (Print)
0362-1642 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15822191> >.

- ESTELLER, M.; HERMAN, J. G. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. **Oncogene**, v. 23, n. 1, p. 1-8, Jan 8 2004. ISSN 0950-9232 (Print)
0950-9232 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14712205> >.
- ESTLIN, E. J. et al. Phase I study of temozolomide in paediatric patients with advanced cancer. United Kingdom Children's Cancer Study Group. **Br J Cancer**, v. 78, n. 5, p. 652-61, Sep 1998. ISSN 0007-0920 (Print)
0007-0920 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9744506> >.
- FANG, Q. et al. Repair of O6-G-alkyl-O6-G interstrand cross-links by human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. **Biochemistry**, v. 47, n. 41, p. 10892-903, Oct 14 2008. ISSN 1520-4995 (Electronic)
0006-2960 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18803403> >.
- FELSBURG, J. et al. Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas. **Int J Cancer**, v. 129, n. 3, p. 659-70, Aug 1 2011. ISSN 1097-0215 (Electronic)
0020-7136 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21425258> >.
- FINE, H. A. et al. Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. **Cancer**, v. 71, n. 8, p. 2585-97, Apr 15 1993. ISSN 0008-543X (Print)
0008-543X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8453582> >.
- FISCHER, M. et al. Indirect p53-dependent transcriptional repression of Survivin, CDC25C, and PLK1 genes requires the cyclin-dependent kinase inhibitor p21/CDKN1A and CDE/CHR promoter sites binding the DREAM complex. **Oncotarget**, v. 6, n. 39, p. 41402-17, Dec 8 2015. ISSN 1949-2553 (Electronic)
1949-2553 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26595675> >.
- FURNARI, F. B. et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Dev**, v. 21, n. 21, p. 2683-710, Nov 1 2007. ISSN 0890-9369 (Print)
0890-9369 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17974913> >.

- GALLDIKS, N. et al. Use of 11C-methionine PET to monitor the effects of temozolomide chemotherapy in malignant gliomas. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 33, n. 5, p. 516-24, May 2006. ISSN 1619-7070 (Print) 1619-7070 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16450140> >.
- GALLDIKS, N. et al. Patient-tailored, imaging-guided, long-term temozolomide chemotherapy in patients with glioblastoma. **Mol Imaging**, v. 9, n. 1, p. 40-6, Feb 2010. ISSN 1536-0121 (Electronic) 1535-3508 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20128997> >.
- GERLINGER, M.; SWANTON, C. How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. **Br J Cancer**, v. 103, n. 8, p. 1139-43, Oct 12 2010. ISSN 1532-1827 (Electronic) 0007-0920 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20877357> >.
- GERSON, S. L. Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. **J Clin Oncol**, v. 20, n. 9, p. 2388-99, May 1 2002. ISSN 0732-183X (Print) 0732-183X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11981013> >.
- _____. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 4, p. 296-307, Apr 2004. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15057289> >.
- GIDDING, C. E. et al. Vincristine revisited. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 29, n. 3, p. 267-87, Feb 1999. ISSN 1040-8428 (Print) 1040-8428 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10226730> >.
- GIGANT, B. et al. Microtubule-destabilizing agents: structural and mechanistic insights from the interaction of colchicine and vinblastine with tubulin. **Top Curr Chem**, v. 286, p. 259-78, 2009. ISSN 0340-1022 (Print) 0340-1022 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563615> >.
- GILBERT, M. R. et al. Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 32, p. 4085-91, Nov 10 2013. ISSN 1527-7755 (Electronic) 0732-183X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24101040> >.
- GLADSON, C. L.; PRAYSON, R. A.; LIU, W. M. The pathobiology of glioma tumors. **Annu Rev Pathol**, v. 5, p. 33-50, 2010. ISSN 1553-4014 (Electronic)

- 1553-4006 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19737106> >.
- GOLOGAN, A.; SEPULVEDA, A. R. Microsatellite instability and DNA mismatch repair deficiency testing in hereditary and sporadic gastrointestinal cancers. **Clin Lab Med**, v. 25, n. 1, p. 179-96, Mar 2005. ISSN 0272-2712 (Print)
 0272-2712 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15749237> >.
- GRADY, W. M. et al. Detection of aberrantly methylated hMLH1 promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer. **Cancer Res**, v. 61, n. 3, p. 900-2, Feb 1 2001. ISSN 0008-5472 (Print)
 0008-5472 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11221878> >.
- GREVER, M. R.; SCHEPARTZ, S. A.; CHABNER, B. A. The National Cancer Institute: cancer drug discovery and development program. **Semin Oncol**, v. 19, n. 6, p. 622-38, Dec 1992. ISSN 0093-7754 (Print)
 0093-7754 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1462164> >.
- GUAN, X. et al. Molecular subtypes of glioblastoma are relevant to lower grade glioma. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e91216, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)
 1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24614622> >.
- GUNTHER, W. et al. Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids. **Br J Cancer**, v. 88, n. 3, p. 463-9, Feb 10 2003. ISSN 0007-0920 (Print)
 0007-0920 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12569392> >.
- GUTENBERG, A. et al. MGMT promoter methylation status and prognosis of patients with primary or recurrent glioblastoma treated with carmustine wafers. **Br J Neurosurg**, v. 27, n. 6, p. 772-8, Dec 2013. ISSN 1360-046X (Electronic)
 0268-8697 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23662801> >.
- HAHN, R. G.; BEGG, C. B.; DAVIS, T. Phase II study of vinblastine-CCNU, triazine, and dactinomycin in advanced renal cell cancer. **Cancer Treat Rep**, v. 65, n. 7-8, p. 711-13, Jul-Aug 1981. ISSN 0361-5960 (Print)
 0361-5960 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7018680> >.
- HALPERIN, E. C.; BURGER, P. C. Conventional external beam radiotherapy for central nervous system malignancies. **Neurol Clin**, v. 3, n. 4, p. 867-82, Nov 1985. ISSN 0733-8619 (Print)

- 0733-8619 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3001492> >.
- HAMMOND, L. A. et al. Phase I and pharmacokinetic study of temozolomide on a daily-for-5-days schedule in patients with advanced solid malignancies. **J Clin Oncol**, v. 17, n. 8, p. 2604-13, Aug 1999. ISSN 0732-183X (Print)
 0732-183X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10561328> >.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011. ISSN 1097-4172 (Electronic)
 0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> >.
- HANSEN, W. K.; KELLEY, M. R. Review of mammalian DNA repair and translational implications. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 295, n. 1, p. 1-9, Oct 2000. ISSN 0022-3565 (Print)
 0022-3565 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10991953> >.
- HAUPT, Y. et al. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. **Nature**, v. 387, n. 6630, p. 296-9, May 15 1997. ISSN 0028-0836 (Print)
 0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9153395> >.
- HAYASHI, Y. et al. Association of EGFR gene amplification and CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion in glioblastoma multiforme. **Brain Pathol**, v. 7, n. 3, p. 871-5, Jul 1997. ISSN 1015-6305 (Print)
 1015-6305 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9217972> >.
- HEGI, M. E. et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 6, p. 1871-4, Mar 15 2004. ISSN 1078-0432 (Print)
 1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15041700> >.
- HEGI, M. E. et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **N Engl J Med**, v. 352, n. 10, p. 997-1003, Mar 10 2005. ISSN 1533-4406 (Electronic)
 0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15758010> >.
- HEGI, M. E. et al. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 25, p. 4189-99, Sep 1 2008. ISSN 1527-7755 (Electronic)

- 0732-183X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18757334> >.
- HENSON, J. W. et al. The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas. **Ann Neurol**, v. 36, n. 5, p. 714-21, Nov 1994. ISSN 0364-5134 (Print)
0364-5134 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7979217> >.
- HERRLINGER, U. et al. Phase II trial of lomustine plus temozolomide chemotherapy in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma: UKT-03. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 27, p. 4412-7, Sep 20 2006. ISSN 1527-7755 (Electronic)
0732-183X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16983109> >.
- HIGASHIMOTO, Y. et al. Human p53 is phosphorylated on serines 6 and 9 in response to DNA damage-inducing agents. **J Biol Chem**, v. 275, n. 30, p. 23199-203, Jul 28 2000. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10930428> >.
- HIROSE, Y. et al. Subgrouping of gliomas on the basis of genetic profiles. **Brain Tumor Pathol**, v. 30, n. 4, p. 203-8, Oct 2013. ISSN 1861-387X (Electronic)
1433-7398 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23604523> >.
- HOCHBERG, F. H.; PRUITT, A. Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. **Neurology**, v. 30, n. 9, p. 907-11, Sep 1980. ISSN 0028-3878 (Print)
0028-3878 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6252514> >.
- HORTON, J. K.; WILSON, S. H. Hypersensitivity phenotypes associated with genetic and synthetic inhibitor-induced base excision repair deficiency. **DNA Repair (Amst)**, v. 6, n. 4, p. 530-43, Apr 1 2007. ISSN 1568-7864 (Print)
1568-7856 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17113833> >.
- HUANG, P. H. et al. Uncovering therapeutic targets for glioblastoma: a systems biology approach. **Cell Cycle**, v. 6, n. 22, p. 2750-4, Nov 15 2007. ISSN 1551-4005 (Electronic)
1551-4005 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17986864> >.
- HUNTER, C. et al. A hypermutation phenotype and somatic MSH6 mutations in recurrent human malignant gliomas after alkylator chemotherapy. **Cancer Res**, v. 66, n. 8, p. 3987-91, Apr 15 2006. ISSN 0008-5472 (Print)

- 0008-5472 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16618716> >.
- HUSE, J. T.; HOLLAND, E. C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 5, p. 319-31, May 2010. ISSN 1474-1768 (Electronic)
 1474-175X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20414201> >.
- HUSE, J. T.; PHILLIPS, H. S.; BRENNAN, C. W. Molecular subclassification of diffuse gliomas: seeing order in the chaos. **Glia**, v. 59, n. 8, p. 1190-9, Aug 2011. ISSN 1098-1136 (Electronic)
 0894-1491 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21446051> >.
- HUSE, J. T. et al. Where are we now? And where are we going? A report from the Accelerate Brain Cancer Cure (ABC2) low-grade glioma research workshop. **Neuro Oncol**, v. 16, n. 2, p. 173-8, Jan 2014. ISSN 1523-5866 (Electronic)
 1522-8517 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24305708> >.
- JAMES, C. D. et al. Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. **Cancer Res**, v. 48, n. 19, p. 5546-51, Oct 1 1988. ISSN 0008-5472 (Print)
 0008-5472 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2901288> >.
- JAMES, C. D. et al. Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytomas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 8, p. 2858-62, Apr 1989. ISSN 0027-8424 (Print)
 0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2565039> >.
- JANSEN, M.; YIP, S.; LOUIS, D. N. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. **Lancet Neurol**, v. 9, n. 7, p. 717-26, Jul 2010. ISSN 1474-4465 (Electronic)
 1474-4422 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20610347> >.
- JIANG, H. et al. 1p/19q codeletion and IDH1/2 mutation identified a subtype of anaplastic oligoastrocytomas with prognosis as favorable as anaplastic oligodendrogliomas. **Neuro Oncol**, v. 15, n. 6, p. 775-82, Jun 2013. ISSN 1523-5866 (Electronic)
 1522-8517 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23486687> >.
- JOHANNESSEN, T. C.; BJERKVIG, R.; TYSNES, B. B. DNA repair and cancer stem-like cells--potential partners in glioma drug resistance? **Cancer Treat Rev**, v. 34, n. 6, p. 558-67, Oct 2008. ISSN 0305-7372 (Print)

- 0305-7372 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18501520> >.
- JOHNSON, B. E. et al. Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. **Science**, v. 343, n. 6167, p. 189-93, Jan 10 2014. ISSN 1095-9203 (Electronic)
0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24336570> >.
- JORDAN, M. A.; THROWER, D.; WILSON, L. Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. **J Cell Sci**, v. 102 (Pt 3), p. 401-16, Jul 1992. ISSN 0021-9533 (Print)
0021-9533 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1506423> >.
- KAINA, B.; CHRISTMANN, M. DNA repair in resistance to alkylating anticancer drugs. **Int J Clin Pharmacol Ther**, v. 40, n. 8, p. 354-67, Aug 2002. ISSN 0946-1965 (Print)
0946-1965 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12467304> >.
- KAINA, B. et al. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. **DNA Repair (Amst)**, v. 6, n. 8, p. 1079-99, Aug 1 2007. ISSN 1568-7864 (Print)
1568-7856 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17485253> >.
- KANNAN, K. et al. DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. **Oncogene**, v. 20, n. 26, p. 3449-55, Jun 7 2001. ISSN 0950-9232 (Print)
0950-9232 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11423996> >.
- KAVALLARIS, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 3, p. 194-204, Mar 2010. ISSN 1474-1768 (Electronic)
1474-175X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20147901> >.
- KELES, G. E.; ANDERSON, B.; BERGER, M. S. The effect of extent of resection on time to tumor progression and survival in patients with glioblastoma multiforme of the cerebral hemisphere. **Surg Neurol**, v. 52, n. 4, p. 371-9, Oct 1999. ISSN 0090-3019 (Print)
0090-3019 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555843> >.

- KIM, L. et al. Procarbazine, lomustine, and vincristine (PCV) chemotherapy for grade III and grade IV oligoastrocytomas. **J Neurosurg**, v. 85, n. 4, p. 602-7, Oct 1996. ISSN 0022-3085 (Print)
0022-3085 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8814163> >.
- KITA, D. et al. PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. **Acta Neuropathol**, v. 113, n. 3, p. 295-302, Mar 2007. ISSN 0001-6322 (Print)
0001-6322 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17235514> >.
- KLEMENT, G. et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. **J Clin Invest**, v. 105, n. 8, p. R15-24, Apr 2000. ISSN 0021-9738 (Print)
0021-9738 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10772661> >.
- KLOOSTERHOF, N. K. et al. Isocitrate dehydrogenase-1 mutations: a fundamentally new understanding of diffuse glioma? **Lancet Oncol**, v. 12, n. 1, p. 83-91, Jan 2011. ISSN 1474-5488 (Electronic)
1474-5488 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20615753> >.
- KOHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. **Int J Parasitol**, v. 31, n. 4, p. 336-45, Apr 2001. ISSN 0020-7519 (Print)
0020-7519 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11400692> >.
- KOHSAKA, S.; TANAKA, S. **Chemotherapeutic Agent from Glioma**. InTech, 2013. 652 ISBN 978-953-51-1058-3.
- KUBBUTAT, M. H.; JONES, S. N.; VOUSDEN, K. H. Regulation of p53 stability by Mdm2. **Nature**, v. 387, n. 6630, p. 299-303, May 15 1997. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9153396> >.
- KUFE, D. W. et al. **Holland-frei Cancer Medicine**. 6th Edition. 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12354/> >.
- KUHNHENN, J. et al. Procarbazine, carmustine, and vincristine (PBV) for chemotherapy pre-treated patients with recurrent glioblastoma: a single-institution analysis. **J Neurooncol**, v. 109, n. 2, p. 433-8, Sep 2012. ISSN 1573-7373 (Electronic)
0167-594X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22744756> >.

- KURIAN, K. M. et al. IDH mutation analysis in gliomas as a diagnostic and prognostic biomarker. **Br J Neurosurg**, v. 27, n. 4, p. 442-5, Aug 2013. ISSN 1360-046X (Electronic)
0268-8697 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23451940> >.
- KYRTOPOULOS, S. A. et al. DNA adducts and the mechanism of carcinogenesis and cytotoxicity of methylating agents of environmental and clinical significance. **Cancer Detect Prev**, v. 21, n. 5, p. 391-405, 1997. ISSN 0361-090X (Print)
0361-090X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9307842> >.
- LA ROCCA, P. J.; RAFFERTY, K. A., JR. Kinetics of chick embryo cell types in culture. **J Cell Physiol**, v. 113, n. 2, p. 203-10, Nov 1982. ISSN 0021-9541 (Print)
0021-9541 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6217212> >.
- LACROIX, M. et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. **J Neurosurg**, v. 95, n. 2, p. 190-8, Aug 2001. ISSN 0022-3085 (Print)
0022-3085 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11780887> >.
- LAKIN, N. D.; JACKSON, S. P. Regulation of p53 in response to DNA damage. **Oncogene**, v. 18, n. 53, p. 7644-55, Dec 13 1999. ISSN 0950-9232 (Print)
0950-9232 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618704> >.
- LAM, P. Y. et al. Expression of p19INK4d, CDK4, CDK6 in glioblastoma multiforme. **Br J Neurosurg**, v. 14, n. 1, p. 28-32, Feb 2000. ISSN 0268-8697 (Print)
0268-8697 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10884881> >.
- LE MERCIER, M. et al. A simplified approach for the molecular classification of glioblastomas. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45475, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23029035> >.
- LEIBEL, S. A.; SCOTT, C. B.; LOEFFLER, J. S. Contemporary approaches to the treatment of malignant gliomas with radiation therapy. **Semin Oncol**, v. 21, n. 2, p. 198-219, Apr 1994. ISSN 0093-7754 (Print)
0093-7754 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8153665> >.

- LI, J. et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. **Science**, v. 275, n. 5308, p. 1943-7, Mar 28 1997. ISSN 0036-8075 (Print)
0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9072974> >.
- LIBERMANN, T. A. et al. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. **Nature**, v. 313, n. 5998, p. 144-7, Jan 10-18 1985. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2981413> >.
- LIM, A.; LI, B. F. The nuclear targeting and nuclear retention properties of a human DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase are both required for its nuclear localization: the possible implications. **EMBO J**, v. 15, n. 15, p. 4050-60, Aug 1 1996. ISSN 0261-4189 (Print)
0261-4189 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8670909> >.
- LIN, N. et al. Prevalence and clinicopathologic characteristics of the molecular subtypes in malignant glioma: a multi-institutional analysis of 941 cases. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94871, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24755548> >.
- LINARDOU, H. et al. Predictive biomarkers to chemotherapy in patients with advanced melanoma receiving the combination of cisplatin--vinblastine--temozolomide (PVT) as first-line treatment: a study of the Hellenic Cooperative Oncology Group (HECOG). **Anticancer Res**, v. 35, n. 2, p. 1105-13, Feb 2015. ISSN 1791-7530 (Electronic)
0250-7005 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25667500> >.
- LINKS, M. et al. Vinblastine pharmacokinetics in patients with non-small cell lung cancer given cisplatin. **Cancer Invest**, v. 17, n. 7, p. 479-85, 1999. ISSN 0735-7907 (Print)
0735-7907 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10518192> >.
- LIU, L.; MARKOWITZ, S.; GERSON, S. L. Mismatch repair mutations override alkyltransferase in conferring resistance to temozolomide but not to 1,3-bis(2-chloroethyl)nitrosourea. **Cancer Res**, v. 56, n. 23, p. 5375-9, Dec 1 1996. ISSN 0008-5472 (Print)
0008-5472 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8968088> >.

- LIU, X. et al. p53 upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site. **Cancer Res**, v. 64, n. 15, p. 5078-83, Aug 1 2004. ISSN 0008-5472 (Print)
0008-5472 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15289308> >.
- LOBERT, S.; VULEVIC, B.; CORREIA, J. J. Interaction of vinca alkaloids with tubulin: a comparison of vinblastine, vincristine, and vinorelbine. **Biochemistry**, v. 35, n. 21, p. 6806-14, May 28 1996. ISSN 0006-2960 (Print)
0006-2960 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8639632> >.
- LOCKETT, K. L.; SNOWHITE, I. V.; HU, J. J. Nucleotide-excision repair and prostate cancer risk. **Cancer Lett**, v. 220, n. 2, p. 125-35, Apr 8 2005. ISSN 0304-3835 (Print)
0304-3835 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15766587> >.
- LOUIS, D. N. Molecular pathology of malignant gliomas. **Annu Rev Pathol**, v. 1, p. 97-117, 2006. ISSN 1553-4006 (Print)
1553-4006 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039109> >.
- LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol**, v. 114, n. 2, p. 97-109, Aug 2007. ISSN 0001-6322 (Print)
0001-6322 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17618441> >.
- MACDONALD, L. M. et al. Characterisation of benzimidazole binding with recombinant tubulin from *Giardia duodenalis*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Cryptosporidium parvum*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 138, n. 1, p. 89-96, Nov 2004. ISSN 0166-6851 (Print)
0166-6851 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15500920> >.
- MAHER, E. A. et al. Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities. **Cancer Res**, v. 66, n. 23, p. 11502-13, Dec 1 2006. ISSN 0008-5472 (Print)
0008-5472 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17114236> >.
- MALANGA, M.; ALTHAUS, F. R. The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network. **Biochem Cell Biol**, v. 83, n. 3, p. 354-64, Jun 2005. ISSN 0829-8211 (Print)

- 0829-8211 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15959561> >.
- MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 2, p. 143-8, Feb 2002. ISSN 1474-175X (Print)
 1474-175X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12635177> >.
- MARGISON, G. P. et al. Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 4, p. 625-35, Apr 2003. ISSN 0143-3334 (Print)
 0143-3334 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12727789> >.
- MARTARELLI, D. et al. Mebendazole inhibits growth of human adrenocortical carcinoma cell lines implanted in nude mice. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 61, n. 5, p. 809-17, Apr 2008. ISSN 0344-5704 (Print)
 0344-5704 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17581752> >.
- MARTIN, L. J.; CHEN, K.; LIU, Z. Adult motor neuron apoptosis is mediated by nitric oxide and Fas death receptor linked by DNA damage and p53 activation. **J Neurosci**, v. 25, n. 27, p. 6449-59, Jul 6 2005. ISSN 1529-2401 (Electronic)
 0270-6474 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16000635> >.
- MASON, W. P.; CAIRNCROSS, J. G. Drug Insight: temozolomide as a treatment for malignant glioma--impact of a recent trial. **Nat Clin Pract Neurol**, v. 1, n. 2, p. 88-95, Dec 2005. ISSN 1745-834X (Print)
 1745-834X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16932504> >.
- MASUI, K.; CLOUGHESY, T. F.; MISCHER, P. S. Review: molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 38, n. 3, p. 271-91, Jun 2012. ISSN 1365-2990 (Electronic)
 0305-1846 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22098029> >.
- MEDICAL RESEARCH COUNCIL BRAIN TUMOR WORKING, P. Randomized trial of procarbazine, lomustine, and vincristine in the adjuvant treatment of high-grade astrocytoma: a Medical Research Council trial. **J Clin Oncol**, v. 19, n. 2, p. 509-18, Jan 15 2001. ISSN 0732-183X (Print)
 0732-183X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11208845> >.

- MESSARITAKIS, J. et al. High mebendazole doses in pulmonary and hepatic hydatid disease. **Arch Dis Child**, v. 66, n. 4, p. 532-3, Apr 1991. ISSN 1468-2044 (Electronic)
0003-9888 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2031617> >.
- MHAIDAT, N. M. et al. Temozolomide induces senescence but not apoptosis in human melanoma cells. **Br J Cancer**, v. 97, n. 9, p. 1225-33, Nov 5 2007. ISSN 0007-0920 (Print)
0007-0920 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17968428> >.
- MIDDLEMAS, D. S. et al. Biochemical correlates of temozolomide sensitivity in pediatric solid tumor xenograft models. **Clin Cancer Res**, v. 6, n. 3, p. 998-1007, Mar 2000. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10741727> >.
- MIDDLETON, M. R. et al. O6-methylguanine formation, repair protein depletion and clinical outcome with a 4 hr schedule of temozolomide in the treatment of advanced melanoma: results of a phase II study. **Int J Cancer**, v. 88, n. 3, p. 469-73, Nov 1 2000. ISSN 0020-7136 (Print)
0020-7136 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11054678> >.
- MIDDLETON, M. R. et al. Effect of O6-(4-bromophenyl)guanine on different temozolomide schedules in a human melanoma xenograft model. **Int J Cancer**, v. 100, n. 5, p. 615-7, Aug 10 2002. ISSN 0020-7136 (Print)
0020-7136 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12124813> >.
- MIRIMANOFF, R. O. et al. Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 16, p. 2563-9, Jun 1 2006. ISSN 1527-7755 (Electronic)
0732-183X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735709> >.
- MISCHEL, P. S. et al. Identification of molecular subtypes of glioblastoma by gene expression profiling. **Oncogene**, v. 22, n. 15, p. 2361-73, Apr 17 2003. ISSN 0950-9232 (Print)
0950-9232 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12700671> >.
- MOHILE, N. A. et al. A phase II study of intensified chemotherapy alone as initial treatment for newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: an interim analysis. **J Neurooncol**, v. 89, n. 2, p. 187-93, Sep 2008. ISSN 0167-594X (Print)

- 0167-594X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18458821> >.
- MOJAS, N.; LOPES, M.; JIRICNY, J. Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. **Genes Dev**, v. 21, n. 24, p. 3342-55, Dec 15 2007. ISSN 0890-9369 (Print)
0890-9369 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18079180> >.
- MOMAND, J. et al. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. **Cell**, v. 69, n. 7, p. 1237-45, Jun 26 1992. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1535557> >.
- MUELLER, S. N.; ROSEN, E. M.; LEVINE, E. M. Cellular senescence in a cloned strain of bovine fetal aortic endothelial cells. **Science**, v. 207, n. 4433, p. 889-91, Feb 22 1980. ISSN 0036-8075 (Print)
0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7355268> >.
- MUKHOPADHYAY, T. et al. Mebendazole elicits a potent antitumor effect on human cancer cell lines both in vitro and in vivo. **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 9, p. 2963-9, Sep 2002. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12231542> >.
- MUNST, G. J.; KARLAGANIS, G.; BIRCHER, J. Plasma concentrations of mebendazole during treatment of echinococcosis: preliminary results. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 17, n. 5, p. 375-8, May 1980. ISSN 0031-6970 (Print)
0031-6970 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7418715> >.
- MURPHY, P. S. et al. Monitoring temozolomide treatment of low-grade glioma with proton magnetic resonance spectroscopy. **Br J Cancer**, v. 90, n. 4, p. 781-6, Feb 23 2004. ISSN 0007-0920 (Print)
0007-0920 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14970853> >.
- NAKAJIMA, W.; TANAKA, N. Synergistic induction of apoptosis by p53-inducible Bcl-2 family proteins Noxa and Puma. **J Nippon Med Sch**, v. 74, n. 2, p. 148-57, Apr 2007. ISSN 1345-4676 (Print)
1345-4676 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17507791> >.

- NAKAMURA, M. et al. Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. **Lab Invest**, v. 81, n. 1, p. 77-82, Jan 2001. ISSN 0023-6837 (Print)
0023-6837 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11204276> >.
- NAKAZATO, Y. [The 4th Edition of WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System published in 2007]. **No Shinkei Geka**, v. 36, n. 6, p. 473-91, Jun 2008. ISSN 0301-2603 (Print)
0301-2603 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18548889> >.
- NEILL, S. G.; FISHER, K. E. Section III: molecular diagnostics in neuro-oncology. **Curr Probl Cancer**, v. 38, n. 5, p. 175-9, Sep-Oct 2014. ISSN 1535-6345 (Electronic)
0147-0272 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25263767> >.
- NEVINS, J. R. The Rb/E2F pathway and cancer. **Hum Mol Genet**, v. 10, n. 7, p. 699-703, Apr 2001. ISSN 0964-6906 (Print)
0964-6906 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257102> >.
- NEWLANDS, E. S. et al. Phase I clinical trial of mitozolomide. **Cancer Treat Rep**, v. 69, n. 7-8, p. 801-5, Jul-Aug 1985. ISSN 0361-5960 (Print)
0361-5960 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4016790> >.
- NEWLANDS, E. S. et al. Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045: M&B 39831: NSC 362856). **Br J Cancer**, v. 65, n. 2, p. 287-91, Feb 1992. ISSN 0007-0920 (Print)
0007-0920 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1739631> >.
- NEWLANDS, E. S. et al. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. **Cancer Treat Rev**, v. 23, n. 1, p. 35-61, Jan 1997. ISSN 0305-7372 (Print)
0305-7372 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9189180> >.
- NICOLAIDIS, S. Personalized medicine in neurosurgery. **Metabolism**, v. 62 Suppl 1, p. S45-8, Jan 2013. ISSN 1532-8600 (Electronic)
0026-0495 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23018147> >.
- NOBLE, R. L.; BEER, C. T.; CUTTS, J. H. Role of chance observations in chemotherapy: Vinca rosea. **Ann N Y Acad Sci**, v. 76, n. 3, p. 882-94, Dec 5 1958. ISSN 0077-8923 (Print)

- 0077-8923 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13627916> >.
- OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **Am J Pathol**, v. 170, n. 5, p. 1445-53, May 2007. ISSN 0002-9440 (Print)
0002-9440 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17456751> >.
- _____. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. **Cancer Sci**, v. 100, n. 12, p. 2235-41, Dec 2009. ISSN 1349-7006 (Electronic)
1347-9032 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19737147> >.
- OHTANI, N. et al. The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. **J Med Invest**, v. 51, n. 3-4, p. 146-53, Aug 2004. ISSN 1343-1420 (Print)
1343-1420 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15460900> >.
- OLOPADE, O. I. et al. Molecular analysis of deletions of the short arm of chromosome 9 in human gliomas. **Cancer Res**, v. 52, n. 9, p. 2523-9, May 1 1992. ISSN 0008-5472 (Print)
0008-5472 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1568221> >.
- OMURO, A.; DEANGELIS, L. M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. **JAMA**, v. 310, n. 17, p. 1842-50, Nov 6 2013. ISSN 1538-3598 (Electronic)
0098-7484 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24193082> >.
- OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. **Neuro Oncol**, v. 15 Suppl 2, p. ii1-56, Nov 2013. ISSN 1523-5866 (Electronic)
1522-8517 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24137015> >.
- 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**, v. 17 Suppl 4, p. iv1-iv62, Oct 2015. ISSN 1523-5866 (Electronic)
1522-8517 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26511214> >.

- PACE, A. et al. Temozolomide chemotherapy for progressive low-grade glioma: clinical benefits and radiological response. **Ann Oncol**, v. 14, n. 12, p. 1722-6, Dec 2003. ISSN 0923-7534 (Print)
0923-7534 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14630675> >.
- PARKER, N. R. et al. Intratumoral heterogeneity identified at the epigenetic, genetic and transcriptional level in glioblastoma. **Sci Rep**, v. 6, p. 22477, 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic)
2045-2322 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26940435> >.
- PATEL, A. P. et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. **Science**, v. 344, n. 6190, p. 1396-401, Jun 20 2014. ISSN 1095-9203 (Electronic)
0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24925914> >.
- PEGG, A. E. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. **Mutat Res**, v. 462, n. 2-3, p. 83-100, Apr 2000. ISSN 0027-5107 (Print)
0027-5107 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10767620> >.
- PEGG, A. E.; DOLAN, M. E.; MOSCHEL, R. C. Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, v. 51, p. 167-223, 1995. ISSN 0079-6603 (Print)
0079-6603 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7659775> >.
- PELLEGATA, N. S. et al. DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 26, p. 15209-14, Dec 24 1996. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8986789> >.
- PELTOMAKI, P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 6, p. 1174-9, Mar 15 2003. ISSN 0732-183X (Print)
0732-183X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12637487> >.
- PERRY, J. R. et al. Temozolomide rechallenge in recurrent malignant glioma by using a continuous temozolomide schedule: the "rescue" approach. **Cancer**, v. 113, n. 8, p. 2152-7, Oct 15 2008. ISSN 0008-543X (Print)
0008-543X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18756530> >.

- PHILLIPS, H. S. et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. **Cancer Cell**, v. 9, n. 3, p. 157-73, Mar 2006. ISSN 1535-6108 (Print)
1535-6108 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16530701> >.
- PICKSLEY, S. M.; LANE, D. P. The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? **Bioessays**, v. 15, n. 10, p. 689-90, Oct 1993. ISSN 0265-9247 (Print)
0265-9247 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7506024> >.
- PINTO, L. C. et al. The anthelmintic drug mebendazole inhibits growth, migration and invasion in gastric cancer cell model. **Toxicol In Vitro**, v. 29, n. 8, p. 2038-44, Dec 2015. ISSN 1879-3177 (Electronic)
0887-2333 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26315676> >.
- PLUMMER, E. R. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in cancer. **Curr Opin Pharmacol**, v. 6, n. 4, p. 364-8, Aug 2006. ISSN 1471-4892 (Print)
1471-4892 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16753340> >.
- PLUMMER, E. R.; CALVERT, H. Targeting poly(ADP-ribose) polymerase: a two-armed strategy for cancer therapy. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 21, p. 6252-6, Nov 1 2007. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17975135> >.
- POLLO, B. Neuropathological diagnosis of brain tumours. **Neurol Sci**, v. 32 Suppl 2, p. S209-11, Nov 2011. ISSN 1590-3478 (Electronic)
1590-1874 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22009244> >.
- POMERANTZ, J. et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 713-23, Mar 20 1998. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529248> >.
- POSTMA, T. J. et al. Neurotoxicity of combination chemotherapy with procarbazine, CCNU and vincristine (PCV) for recurrent glioma. **J Neurooncol**, v. 38, n. 1, p. 69-75, May 1998. ISSN 0167-594X (Print)
0167-594X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9540059> >.

- PRADOS, M. D. et al. Procarbazine, lomustine, and vincristine (PCV) chemotherapy for anaplastic astrocytoma: A retrospective review of radiation therapy oncology group protocols comparing survival with carmustine or PCV adjuvant chemotherapy. **J Clin Oncol**, v. 17, n. 11, p. 3389-95, Nov 1999. ISSN 0732-183X (Print)
0732-183X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10550132> >.
- RAMSEY, R. G.; BRAND, W. N. Radiotherapy of glioblastoma multiforme. **J Neurosurg**, v. 39, n. 2, p. 197-202, Aug 1973. ISSN 0022-3085 (Print)
0022-3085 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4352589> >.
- RANSON, M. et al. Randomized trial of the combination of lomeguatrib and temozolomide compared with temozolomide alone in chemotherapy naive patients with metastatic cutaneous melanoma. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 18, p. 2540-5, Jun 20 2007. ISSN 1527-7755 (Electronic)
0732-183X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17577032> >.
- RANSON, M. et al. Lomeguatrib, a potent inhibitor of O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase: phase I safety, pharmacodynamic, and pharmacokinetic trial and evaluation in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 5, p. 1577-84, Mar 1 2006. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16533784> >.
- RAO, S. K. et al. A survey of glioblastoma genomic amplifications and deletions. **J Neurooncol**, v. 96, n. 2, p. 169-79, Jan 2010. ISSN 1573-7373 (Electronic)
0167-594X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19609742> >.
- RATNAM, K.; LOW, J. A. Current development of clinical inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase in oncology. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 5, p. 1383-8, Mar 1 2007. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17332279> >.
- RAVELLI, R. B. et al. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. **Nature**, v. 428, n. 6979, p. 198-202, Mar 11 2004. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15014504> >.
- REID, J. M. et al. Pharmacokinetics of 3-methyl-(triazen-1-yl)imidazole-4-carboximide following administration of temozolomide to patients with

advanced cancer. **Clin Cancer Res**, v. 3, n. 12 Pt 1, p. 2393-8, Dec 1997. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815639> >.

RICH, J. N.; BIGNER, D. D. Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant glioma. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 5, p. 430-46, May 2004. ISSN 1474-1776 (Print)
1474-1776 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15136790> >.

RILEY, T. et al. Transcriptional control of human p53-regulated genes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 5, p. 402-12, May 2008. ISSN 1471-0080 (Electronic)
1471-0072 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18431400> >.

RIVERA-FILLAT, M. P. et al. Comparative uptake, retention and action of vincristine, vinblastine and vindesine on murine leukaemic lymphoblasts sensitive and resistant to vincristine. **Br J Pharmacol**, v. 93, n. 4, p. 902-8, Apr 1988. ISSN 0007-1188 (Print)
0007-1188 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3390658> >.

ROLHION, C. et al. O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene (MGMT) expression in human glioblastomas in relation to patient characteristics and p53 accumulation. **Int J Cancer**, v. 84, n. 4, p. 416-20, Aug 20 1999. ISSN 0020-7136 (Print)
0020-7136 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10404096> >.

RON, I. G. et al. A biochemotherapy regimen with concurrent administration of cisplatin, vinblastine, temozolomide (Temodal), interferon-alfa and interleukin-2 for metastatic melanoma: a phase II study. **Melanoma Res**, v. 16, n. 1, p. 65-9, Feb 2006. ISSN 0960-8931 (Print)
0960-8931 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16432458> >.

ROOS, W.; BAUMGARTNER, M.; KAINA, B. Apoptosis triggered by DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1. **Oncogene**, v. 23, n. 2, p. 359-67, Jan 15 2004. ISSN 0950-9232 (Print)
0950-9232 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14724564> >.

ROSENTHAL, R. C. Clinical applications of Vinca alkaloids. **J Am Vet Med Assoc**, v. 179, n. 11, p. 1084, 1086, Dec 1 1981. ISSN 0003-1488 (Print)
0003-1488 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6948802> >.

- ROYDS, J. A.; IACOPETTA, B. p53 and disease: when the guardian angel fails. **Cell Death Differ**, v. 13, n. 6, p. 1017-26, Jun 2006. ISSN 1350-9047 (Print) 1350-9047 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16557268> >.
- SABHARWAL, A.; MIDDLETON, M. R. Exploiting the role of O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) in cancer therapy. **Curr Opin Pharmacol**, v. 6, n. 4, p. 355-63, Aug 2006. ISSN 1471-4892 (Print) 1471-4892 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16777483> >.
- SALAZAR, O. M. et al. High dose radiation therapy in the treatment of malignant gliomas: final report. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 5, n. 10, p. 1733-40, Oct 1979. ISSN 0360-3016 (Print) 0360-3016 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/231023> >.
- SANAI, N. et al. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. **J Neurosurg**, v. 115, n. 1, p. 3-8, Jul 2011. ISSN 1933-0693 (Electronic) 0022-3085 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21417701> >.
- SANDHU, S. K.; YAP, T. A.; DE BONO, J. S. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in cancer treatment: a clinical perspective. **Eur J Cancer**, v. 46, n. 1, p. 9-20, Jan 2010. ISSN 1879-0852 (Electronic) 0959-8049 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19926276> >.
- SANSON, M.; THILLET, J.; HOANG-XUAN, K. Molecular changes in gliomas. **Curr Opin Oncol**, v. 16, n. 6, p. 607-13, Nov 2004. ISSN 1040-8746 (Print) 1040-8746 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15627025> >.
- SASAKI, J. et al. The anthelmintic drug mebendazole induces mitotic arrest and apoptosis by depolymerizing tubulin in non-small cell lung cancer cells. **Mol Cancer Ther**, v. 1, n. 13, p. 1201-9, Nov 2002. ISSN 1535-7163 (Print) 1535-7163 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12479701> >.
- SAUVAGEOT, C. M.; KESARI, S.; STILES, C. D. Molecular pathogenesis of adult brain tumors and the role of stem cells. **Neurol Clin**, v. 25, n. 4, p. 891-924, vii, Nov 2007. ISSN 0733-8619 (Print) 0733-8619 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17964020> >.

- SCHMIDT, F. et al. PCV chemotherapy for recurrent glioblastoma. **Neurology**, v. 66, n. 4, p. 587-9, Feb 28 2006. ISSN 1526-632X (Electronic) 0028-3878 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16505319> >.
- SCHRYVER, A. D. et al. Localized shaped field radiotherapy of malignant glioblastoma multiforme. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 1, n. 7-8, p. 713-6, Jul-Aug 1976. ISSN 0360-3016 (Print) 0360-3016 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/185173> >.
- SHAPIRO, W. R.; YOUNG, D. F. Chemotherapy of malignant glioma with CCNU alone and CCNU combined with vincristine sulfate and procarbazine hydrochloride. **Trans Am Neurol Assoc**, v. 101, p. 217-20, 1976. ISSN 0065-9479 (Print) 0065-9479 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1028239> >.
- SHAW, E. G. et al. Randomized trial of radiation therapy plus procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy for supratentorial adult low-grade glioma: initial results of RTOG 9802. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 25, p. 3065-70, Sep 1 2012. ISSN 1527-7755 (Electronic) 0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22851558> >.
- SHAW, E. G.; WISOFF, J. H. Prospective clinical trials of intracranial low-grade glioma in adults and children. **Neuro Oncol**, v. 5, n. 3, p. 153-60, Jul 2003. ISSN 1522-8517 (Print) 1522-8517 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12816721> >.
- SHELINE, G. E. Radiation therapy of brain tumors. **Cancer**, v. 39, n. 2 Suppl, p. 873-81, Feb 1977. ISSN 0008-543X (Print) 0008-543X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/837351> >.
- SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev**, v. 13, n. 12, p. 1501-12, Jun 15 1999. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10385618> >.
- SILBER, J. R. et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase-deficient phenotype in human gliomas: frequency and time to tumor progression after alkylating agent-based chemotherapy. **Clin Cancer Res**, v. 5, n. 4, p. 807-14, Apr 1999. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10213216> >.

- SMEITINK, J. Metabolism, gliomas, and IDH1. **N Engl J Med**, v. 362, n. 12, p. 1144-5, Mar 25 2010. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20335593> >.
- SOMMER, H. H.; FOSSA, S. D.; LIEN, H. H. Combination chemotherapy of advanced renal cell cancer with CCNU and vinblastine. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 14, n. 3, p. 277-8, 1985. ISSN 0344-5704 (Print)
0344-5704 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3995687> >.
- SRIVENUGOPAL, K. S. et al. Ubiquitination-dependent proteolysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O6-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. **Biochemistry**, v. 35, n. 4, p. 1328-34, Jan 30 1996. ISSN 0006-2960 (Print)
0006-2960 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8573590> >.
- STABER, P. B. et al. Common alterations in gene expression and increased proliferation in recurrent acute myeloid leukemia. **Oncogene**, v. 23, n. 4, p. 894-904, Jan 29 2004. ISSN 0950-9232 (Print)
0950-9232 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749762> >.
- STARK, A. M. et al. The expression of mismatch repair proteins MLH1, MSH2 and MSH6 correlates with the Ki67 proliferation index and survival in patients with recurrent glioblastoma. **Neurol Res**, v. 32, n. 8, p. 816-20, Oct 2010. ISSN 1743-1328 (Electronic)
0161-6412 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20223108> >.
- STEGE, E. M. et al. Successful treatment of low-grade oligodendroglial tumors with a chemotherapy regimen of procarbazine, lomustine, and vincristine. **Cancer**, v. 103, n. 4, p. 802-9, Feb 15 2005. ISSN 0008-543X (Print)
0008-543X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15637687> >.
- STEVENS, M. F.; GESCHER, A.; TURNBULL, C. P. Antitumour activity, biomimetic oxidation and metabolism of heterocyclic triazenes. **Biochem Pharmacol**, v. 28, n. 6, p. 769-76, Mar 15 1979. ISSN 0006-2952 (Print)
0006-2952 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/454476> >.
- STEVENS, M. F. et al. Antitumor imidazotetrazines. 1. Synthesis and chemistry of 8-carbamoyl-3-(2-chloroethyl)imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3 H)-one , a

novel broad-spectrum antitumor agent. **J Med Chem**, v. 27, n. 2, p. 196-201, Feb 1984. ISSN 0022-2623 (Print)
0022-2623 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6694168> >.

STEWART, L. A. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. **Lancet**, v. 359, n. 9311, p. 1011-8, Mar 23 2002. ISSN 0140-6736 (Print)
0140-6736 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11937180> >.

STOJIC, L.; BRUN, R.; JIRICNY, J. Mismatch repair and DNA damage signalling. **DNA Repair (Amst)**, v. 3, n. 8-9, p. 1091-101, Aug-Sep 2004. ISSN 1568-7864 (Print)
1568-7856 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15279797> >.

STOTT, F. J. et al. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. **EMBO J**, v. 17, n. 17, p. 5001-14, Sep 1 1998. ISSN 0261-4189 (Print)
0261-4189 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9724636> >.

STRIK, H. M. et al. Temozolomide dosing regimens for glioma patients. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 12, n. 3, p. 286-93, Jun 2012. ISSN 1534-6293 (Electronic)
1528-4042 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22437507> >.

STUMMER, W. et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. **Lancet Oncol**, v. 7, n. 5, p. 392-401, May 2006. ISSN 1470-2045 (Print)
1470-2045 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16648043> >.

STUPP, R. et al. Changing paradigms--an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. **Oncologist**, v. 11, n. 2, p. 165-80, Feb 2006. ISSN 1083-7159 (Print)
1083-7159 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476837> >.

STUPP, R. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med**, v. 352, n. 10, p. 987-96, Mar 10 2005. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15758009> >.

- SUN, X. X.; YU, Q. Intra-tumor heterogeneity of cancer cells and its implications for cancer treatment. **Acta Pharmacol Sin**, v. 36, n. 10, p. 1219-27, Oct 2015. ISSN 1745-7254 (Electronic)
1671-4083 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26388155> >.
- TAFUTO, S. et al. Phase I study of temozolomide and lomustine in the treatment of high grade malignant glioma. **Front Biosci**, v. 11, p. 502-5, 2006. ISSN 1093-9946 (Print)
1093-4715 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16146748> >.
- TAVERNA, P. et al. Characterization of MLH1 and MSH2 DNA mismatch repair proteins in cell lines of the NCI anticancer drug screen. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 46, n. 6, p. 507-16, 2000. ISSN 0344-5704 (Print)
0344-5704 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11138465> >.
- TENTORI, L. et al. Combined treatment with temozolomide and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor enhances survival of mice bearing hematologic malignancy at the central nervous system site. **Blood**, v. 99, n. 6, p. 2241-4, Mar 15 2002. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11877304> >.
- TENTORI, L. et al. Apoptotic and genotoxic effects of a methyl sulfonate ester that selectively generates N3-methyladenine and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in normal peripheral blood lymphocytes. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 49, n. 3, p. 217-24, Mar 2002. ISSN 0344-5704 (Print)
0344-5704 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11935214> >.
- THEELER, B. J. et al. Moving toward molecular classification of diffuse gliomas in adults. **Neurology**, v. 79, n. 18, p. 1917-26, Oct 30 2012. ISSN 1526-632X (Electronic)
0028-3878 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23109653> >.
- THOMPSON, C. B. Metabolic enzymes as oncogenes or tumor suppressors. **N Engl J Med**, v. 360, n. 8, p. 813-5, Feb 19 2009. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19228626> >.
- TISDALE, M. J. Antitumor imidazotetrazines--XV. Role of guanine O6 alkylation in the mechanism of cytotoxicity of imidazotetrazinones. **Biochem Pharmacol**, v. 36, n. 4, p. 457-62, Feb 15 1987. ISSN 0006-2952 (Print)

- 0006-2952 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3470008> >.
- TOBIUME, K. Involvement of Bcl-2 family proteins in p53-induced apoptosis. **J Nippon Med Sch**, v. 72, n. 4, p. 192-3, Aug 2005. ISSN 1345-4676 (Print)
 1345-4676 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16113488> >.
- TOHMA, Y. et al. PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 57, n. 7, p. 684-9, Jul 1998. ISSN 0022-3069 (Print)
 0022-3069 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9690672> >.
- TOSO, R. J. et al. Kinetic stabilization of microtubule dynamic instability in vitro by vinblastine. **Biochemistry**, v. 32, n. 5, p. 1285-93, Feb 9 1993. ISSN 0006-2960 (Print)
 0006-2960 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8448138> >.
- TRIVEDI, R. N. et al. The role of base excision repair in the sensitivity and resistance to temozolomide-mediated cell death. **Cancer Res**, v. 65, n. 14, p. 6394-400, Jul 15 2005. ISSN 0008-5472 (Print)
 0008-5472 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16024643> >.
- TUETTENBERG, J. et al. Continuous low-dose chemotherapy plus inhibition of cyclooxygenase-2 as an antiangiogenic therapy of glioblastoma multiforme. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 131, n. 1, p. 31-40, Jan 2005. ISSN 0171-5216 (Print)
 0171-5216 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15565458> >.
- UIHLEIN, A. et al. Comparison of surgery and surgery plus irradiation in the treatment of supratentorial gliomas. **Acta Radiol Ther Phys Biol**, v. 5, p. 67-78, 1966. ISSN 0567-8064 (Print)
 0567-8064 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5954310> >.
- VACCA, A. et al. Antiangiogenesis is produced by nontoxic doses of vinblastine. **Blood**, v. 94, n. 12, p. 4143-55, Dec 15 1999. ISSN 0006-4971 (Print)
 0006-4971 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10590059> >.
- VALERA, E. T. et al. Pediatric glioblastoma cell line shows different patterns of expression of transmembrane ABC transporters after in vitro exposure to vinblastine. **Childs Nerv Syst**, v. 25, n. 1, p. 39-45, Jan 2009. ISSN 1433-0350 (Electronic)

- 0256-7040 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18946672> >.
- VAN DEN BENT, M. J. et al. Phase II study of first-line chemotherapy with temozolomide in recurrent oligodendroglial tumors: the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group Study 26971. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 13, p. 2525-8, Jul 1 2003. ISSN 0732-183X (Print)
 0732-183X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12829671> >.
- VAN MEIR, E. G. et al. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. **CA Cancer J Clin**, v. 60, n. 3, p. 166-93, May-Jun 2010. ISSN 1542-4863 (Electronic)
 0007-9235 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20445000> >.
- VERBEEK, B. et al. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. **Br Med Bull**, v. 85, p. 17-33, 2008. ISSN 1471-8391 (Electronic)
 0007-1420 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18245773> >.
- VERHAAK, R. G. et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 98-110, Jan 19 2010. ISSN 1878-3686 (Electronic)
 1535-6108 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20129251> >.
- VERONESI, A. et al. Third-line chemotherapy with mitomycin, vinblastine, and carmustine (BCNU) in refractory breast carcinoma: a pilot study. **Cancer Treat Rep**, v. 66, n. 3, p. 559-61, Mar 1982. ISSN 0361-5960 (Print)
 0361-5960 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7060044> >.
- VIGNESWARAN, K.; NEILL, S.; HADJIPANAYIS, C. G. Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification. **Ann Transl Med**, v. 3, n. 7, p. 95, May 2015. ISSN 2305-5839 (Print)
 2305-5839 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26015937> >.
- VILLANUEVA, M. T. Pediatric oncology: Vinblastine in low-grade glioma. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 9, n. 5, p. 248, May 2012. ISSN 1759-4782 (Electronic)
 1759-4774 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22430858> >.

- VITUCCI, M.; HAYES, D. N.; MILLER, C. R. Gene expression profiling of gliomas: merging genomic and histopathological classification for personalised therapy. **Br J Cancer**, v. 104, n. 4, p. 545-53, Feb 15 2011. ISSN 1532-1827 (Electronic)
0007-0920 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21119666> >.
- VOGELBAUM, M. A. et al. Phase II trial of preirradiation and concurrent temozolomide in patients with newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and mixed anaplastic oligoastrocytomas: RTOG BR0131. **Neuro Oncol**, v. 11, n. 2, p. 167-75, Apr 2009. ISSN 1522-8517 (Print)
1522-8517 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18779504> >.
- VREDENBURGH, J. J. et al. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 30, p. 4722-9, Oct 20 2007. ISSN 1527-7755 (Electronic)
0732-183X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17947719> >.
- VUTOVA, K. et al. Effect of mebendazole on human cystic echinococcosis: the role of dosage and treatment duration. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 93, n. 4, p. 357-65, Jun 1999. ISSN 0003-4983 (Print)
0003-4983 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10656037> >.
- WAGNER, E. K.; ROIZMAN, B. Effect of the Vinca alkaloids on RNA synthesis in human cells in vitro. **Science**, v. 162, n. 3853, p. 569-70, Nov 1 1968. ISSN 0036-8075 (Print)
0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5706939> >.
- WALKER, M. D. et al. Evaluation of mithramycin in the treatment of anaplastic gliomas. **J Neurosurg**, v. 44, n. 6, p. 655-67, Jun 1976. ISSN 0022-3085 (Print)
0022-3085 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/178838> >.
- WALKER, M. D. et al. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. **J Neurosurg**, v. 49, n. 3, p. 333-43, Sep 1978. ISSN 0022-3085 (Print)
0022-3085 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/355604> >.
- WALKER, M. D. et al. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. **N Engl J Med**, v. 303, n. 23, p. 1323-9, Dec 4 1980. ISSN 0028-4793 (Print)

- 0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7001230> >.
- WALKER, M. D.; HURWITZ, B. S. BCNU (1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea; NSC-409962) in the treatment of malignant brain tumor--a preliminary report. **Cancer Chemother Rep**, v. 54, n. 4, p. 263-71, Aug 1970. ISSN 0069-0112 (Print)
- 0069-0112 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4946011> >.
- WALKER, M. D.; STRIKE, T. A. Evaluation of methyl CCNU, BCNU and Radiotherapy in Treatment of Malignant Glioma. **Proceedings of the American Association for Cancer Research** v. MAR, p. 163 - 163, 1976.
- WALKER, M. D.; STRIKE, T. A.; SHELINE, G. E. An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 5, n. 10, p. 1725-31, Oct 1979. ISSN 0360-3016 (Print)
- 0360-3016 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/231022> >.
- WANG, L. G. et al. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 44, n. 5, p. 355-61, 1999. ISSN 0344-5704 (Print)
- 0344-5704 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10501907> >.
- WANG, S. I. et al. Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme. **Cancer Res**, v. 57, n. 19, p. 4183-6, Oct 1 1997. ISSN 0008-5472 (Print)
- 0008-5472 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9331071> >.
- WATSON, A. J. et al. O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase depletion and DNA damage in patients with melanoma treated with temozolomide alone or with lomeguatrib. **Br J Cancer**, v. 100, n. 8, p. 1250-6, Apr 21 2009. ISSN 1532-1827 (Electronic)
- 0007-0920 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19367283> >.
- WATSON, A. J. et al. Tumor O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase inactivation by oral lomeguatrib. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 2, p. 743-9, Jan 15 2010. ISSN 1078-0432 (Print)
- 1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20068091> >.
- WEDGE, S. R.; NEWLANDS, E. S. O6-benzylguanine enhances the sensitivity of a glioma xenograft with low O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity to temozolomide and BCNU. **Br J Cancer**, v. 73, n. 9, p. 1049-52, May 1996. ISSN 0007-0920 (Print)

- 0007-0920 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8624262> >.
- WEISS, R. B.; ISSELL, B. F. The nitrosoureas: carmustine (BCNU) and lomustine (CCNU). **Cancer Treat Rev**, v. 9, n. 4, p. 313-30, Dec 1982. ISSN 0305-7372 (Print)
 0305-7372 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6762924> >.
- WELLER, M. et al. Molecular neuro-oncology in clinical practice: a new horizon. **Lancet Oncol**, v. 14, n. 9, p. e370-9, Aug 2013. ISSN 1474-5488 (Electronic)
 1470-2045 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23896276> >.
- WELLER, M. et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? **Nat Rev Neurol**, v. 6, n. 1, p. 39-51, Jan 2010. ISSN 1759-4766 (Electronic)
 1759-4758 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19997073> >.
- WESTPHAL, M. et al. Gliadel wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial. **Acta Neurochir (Wien)**, v. 148, n. 3, p. 269-75; discussion 275, Mar 2006. ISSN 0001-6268 (Print)
 0001-6268 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16482400> >.
- WICK, W. et al. Phase III study of enzastaurin compared with lomustine in the treatment of recurrent intracranial glioblastoma. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 7, p. 1168-74, Mar 1 2010. ISSN 1527-7755 (Electronic)
 0732-183X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20124186> >.
- WILLIAMS, L. D.; SHAW, B. R. Protonated base pairs explain the ambiguous pairing properties of O6-methylguanine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 7, p. 1779-83, Apr 1987. ISSN 0027-8424 (Print)
 0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3470757> >.
- WOOLFORD, L. B. et al. The P140K mutant of human O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) confers resistance in vitro and in vivo to temozolomide in combination with the novel MGMT inactivator O(6)-(4-bromophenyl)guanine. **J Gene Med**, v. 8, n. 1, p. 29-34, Jan 2006. ISSN 1099-498X (Print)
 1099-498X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16075413> >.
- WU, G. S.; KIM, K.; EL-DEIRY, W. S. KILLER/DR5, a novel DNA-damage inducible death receptor gene, links the p53-tumor suppressor to caspase

- activation and apoptotic death. **Adv Exp Med Biol**, v. 465, p. 143-51, 2000. ISSN 0065-2598 (Print)
0065-2598 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10810622> >.
- WU, X.; LEVINE, A. J. p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 9, p. 3602-6, Apr 26 1994. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8170954> >.
- WU, Y. T. et al. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. **J Biol Chem**, v. 285, n. 14, p. 10850-61, Apr 2 2010. ISSN 1083-351X (Electronic)
0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20123989> >.
- YAN, H. et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **N Engl J Med**, v. 360, n. 8, p. 765-73, Feb 19 2009. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19228619> >.
- YE, T. et al. The anthelmintic drug niclosamide induces apoptosis, impairs metastasis and reduces immunosuppressive cells in breast cancer model. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e85887, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24416452> >.
- YIP, S. et al. MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 14, p. 4622-9, Jul 15 2009. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19584161> >.
- YUNG, W. K. et al. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal Brain Tumor Group. **J Clin Oncol**, v. 17, n. 9, p. 2762-71, Sep 1999. ISSN 0732-183X (Print)
0732-183X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10561351> >.
- ZAUBERMAN, A. et al. A functional p53-responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene. **Nucleic Acids Res**, v. 23, n. 14, p. 2584-92, Jul 25 1995. ISSN 0305-1048 (Print)
0305-1048 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7651818> >.

- ZHANG, J.; STEVENS, M. F.; BRADSHAW, T. D. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. **Curr Mol Pharmacol**, v. 5, n. 1, p. 102-14, Jan 2012. ISSN 1874-4702 (Electronic)
1874-4672 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22122467> >.
- ZHANG, J. et al. Certain imidazotetrazines escape O6-methylguanine-DNA methyltransferase and mismatch repair. **Oncology**, v. 80, n. 3-4, p. 195-207, 2011. ISSN 1423-0232 (Electronic)
0030-2414 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21720182> >.
- ZHANG, J. et al. Acquired resistance to temozolomide in glioma cell lines: molecular mechanisms and potential translational applications. **Oncology**, v. 78, n. 2, p. 103-14, 2010. ISSN 1423-0232 (Electronic)
0030-2414 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20357518> >.
- ZHANG, Y.; XIONG, Y.; YARBROUGH, W. G. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 725-34, Mar 20 1998. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529249> >.
- ZHUKOVSKAYA, N. et al. DNA replication arrest and tolerance to DNA methylation damage. **Carcinogenesis**, v. 15, n. 10, p. 2189-94, Oct 1994. ISSN 0143-3334 (Print)
0143-3334 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7955052> >.
- ZIELSKE, S. P.; GERSON, S. L. Lentiviral transduction of P140K MGMT into human CD34(+) hematopoietic progenitors at low multiplicity of infection confers significant resistance to BG/BCNU and allows selection in vitro. **Mol Ther**, v. 5, n. 4, p. 381-7, Apr 2002. ISSN 1525-0016 (Print)
1525-0016 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11945064> >.
- ZOU, P. et al. IDH1/IDH2 mutations define the prognosis and molecular profiles of patients with gliomas: a meta-analysis. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68782, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23894344> >.

10. APÊNDICES

Correspondência de confirmação de aceite do manuscrito do capítulo 1 da presente tese.

----- Mensagem original -----

De: Editorial Office Tumor Biology <em@editorialmanager.com>

Data: 27/05/16 04:35 (GMT-03:00)

Para: Guido Lenz <lenz@ufrgs.br>

Assunto: Your Submission TUBI-D-16-01182R1

Dear Dr Lenz,

We are pleased to inform you that your manuscript, "A guide for the analysis of long-term population growth in cancer", has been accepted for publication in Tumor Biology.

You will receive an e-mail from Springer in due course with regards to the following items:

1. Offprints
2. Colour figures
3. Open Choice
4. Transfer of Copyright

Please remember to quote the manuscript number, TUBI-D-16-01182R1, whenever inquiring about your manuscript.

With best regards,

Torgny Ingemar Stigbrand, Ph.D., MD., Prof
Editor in Chief

Correspondência de confirmação de aceite do manuscrito do capítulo 2 da presente tese.

----- Mensagem encaminhada -----

Assunto: ECR-16-130R1: Final Decision

Data: 22 Sep 2016 12:42:54 +0100

De: Experimental Cell Research <ecr@elsevier.com>

Para: lenz@ufrgs.br, gulenz@gmail.com

Ms. No.: ECR-16-130R1

Title: The regrowth kinetic of the surviving population is independent of acute and chronic responses to temozolomide in glioblastoma cell lines

Corresponding Author: Dr. Guido Lenz

Authors: Andrew O Silva, Master's degree; Eloísa Dalsin, Graduation; Giovana R Onzi, Msc; Eduardo C Filippi-Chiela, PhD;

Dear Dr. Lenz,

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in Experimental Cell Research.

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department and work will begin on creation of the proof. If we need any additional information to create the proof, we will let you know. If not, you will be contacted again in the next few days with a request to approve the proof and to complete a number of online forms that are required for publication.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Thank you for submitting your work to Experimental Cell Research.

Yours Sincerely,

Urban Lendahl, PhD

Editor-in-Chief

Experimental Cell Research

Currículo Vitae resumido

Silva, AO.

1. DADOS PESSOAIS

NOME: Andrew Oliveira Silva

Local e data de nascimento: Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil – 23/08/1986

Endereço: Rua Porto Seguro, 28 – Bairro Vila Ipiranga – Porto Alegre

Telefone: (51) 92385801 ou (51) 34075166

Email: andrewbiomed@gmail.com

2. FORMAÇÃO: Bacharelado em Biomedicina (UFRGS – 2006/2009); mestrado em biologia celular e molecular (UFRGS 2010/2012); Curso “*Cell Culture as Alternative Model for Animal Experimentation*” (10º Congresso Internacional de Biologia Celular (SBBC) – Rio de Janeiro/RJ – julho 2012); Curso “*Tópicos Teórico-Prático em Neurociências*” (Faculdade de Medicina/PUCRS – Porto Alegre/RS – julho 2010); Curso de Extensão sobre Células-Tronco: Biologia e Aplicações Clínicas (Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA) – Porto Alegre/RS – agosto 2007); Curso de Qualificação e Gestão Ambiental (Colégio Luterano São Paulo – Porto Alegre/RS – outubro e novembro de 2003); Curso de Inglês nível básico, pré-intermediário e intermediário (Yazigi Internexus – Porto Alegre/RS – março de 2009 até julho de 2012).

3. ESTÁGIOS

- **Aluno de doutorado**

Período: 03/2012 – 03/2016

Instituição: Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular - Departamento de Biofísica – UFRGS

Financiamento: Bolsa Capes

Orientador: Dr. Guido Lenz

Atividades: desenvolvimento de projeto de pesquisa baseado na compreensão dos mecanismos de resistência a quimioterápicos em câncer de cérebro, incluindo atividades como cultura de células humanas e de rato, técnicas de biologia celular, molecular e manipulação gênica em geral, citometria de fluxo avançada, pesquisa bibliográfica na área, técnicas em bioinformática básica, produção de linhagens celulares geneticamente transformadas, produção de meios de cultura e demais reagentes de uso em cultura de células, orientação de alunos de iniciação científica, ministração de aulas e palestras na área, organização e coordenação de cursos na área, desenvolvimento e coordenação de projetos de pesquisa na área.

- **Aluno de mestrado**

Período: 03/2010 – 03/2011

Instituição: Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular - Departamento de Biofísica – UFRGS

Financiamento: Bolsa Capes

Orientador: Dr. Guido Lenz

Atividades: desenvolvimento de um projeto de pesquisa baseado em busca de terapia molecular para o tratamento de câncer de cérebro, incluindo atividades como cultura de células humanas e de rato, técnicas de biologia celular, molecular e manipulação gênica em geral, citometria de fluxo avançada, pesquisa bibliográfica na área, técnicas em bioinformática básica, produção de linhagens celulares geneticamente transformadas, produção de meios de cultura e demais reagentes de uso em cultura de células, orientação de alunos de iniciação científica, ministração de aulas e palestras na área, organização e coordenação de cursos na área.

- **Aluno de iniciação científica**

Período: 03/2007 – 03/2009

Instituição: Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular - Departamento de Biofísica – UFRGS

Financiamento: Bolsa CNPq

Orientador: Dr. Guido Lenz

Atividades: desenvolvimento de todas as atividades de um laboratório de pesquisa científica em biologia celular e molecular do câncer como cultura de células humanas, técnicas de biologia celular em geral, técnicas de biologia molecular em geral, técnicas de manipulação gênica em geral, preparo de meios de cultura, auxílio na elaboração de projetos de pesquisa, pesquisa bibliográfica na área, técnicas de bioinformática básica e citometria de fluxo.

- **Aluno de iniciação científica**

Período: 03/2007 – 03/2009

Instituição: Laboratório de Microbiologia 166 - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – UFRGS

Financiamento: atividade voluntária

Orientador: Dra. Gertrudes Corção

Atividades: desenvolvimento de todas as atividades de um laboratório de pesquisa em microbiologia como isolamento de cepas bacterianas, preparação de meios de cultura, técnicas de biologia molecular para identificação de cepas bacterianas, técnicas bioquímicas para identificação de cepas bacterianas, coloração de gram e microscopia.

4. DISTINÇÕES

- Palestrante no 10º Congresso Internacional de Biologia Celular (SBBC) – Rio de Janeiro/RJ – julho 2012
- membro da comissão organizadora de edições da Semanas Acadêmicas da Biomedicina da UFRGS.
- membro da comissão organizadora de todas as edições do Curso de Sinalização Celular no Câncer, organizada pelo Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular
- membro da comissão organizadora e monitor de 2 edições da atividade voluntária “Curso de Férias”, promovida pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS.
- representante discente no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS no período de 2015 e 2016.
- co-orientação dos trabalhos de conclusão de curso de bacharelado em biomedicina das alunas Michelle Oliveira Hütten e Eloísa Dalsin.
- segundo colocado no processo seletivo para mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS no ano de 2010.
- primeiro colocado no processo seletivo para o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS no ano de 2012.

5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

1. ONZI, GIOVANA RAVIZZONI; LEDUR, PÍTIA FLORES; HAINZENREDER, LUANA DIMER; BERTONI, ANA PAULA SANTIN; **SILVA, ANDREW OLIVEIRA**; LENZ, GUIDO; WINK, MÁRCIA ROSÂNGELA
Analysis of the safety of mesenchymal stromal cells secretome for glioblastoma treatment. *Cytotherapy* (Oxford). , v.18, p.828 - 837, 2016.
2. LOPEZ, PATRICIA L.C.; FILIPPI-CHIELA, EDUARDO C.; **SILVA, ANDREW O.**;

CORDERO, ELVIRA A.A.; GARCIA-SANTOS, DANIEL; PELEGRINI, ALESSANDRA L.; REDER, GLEICE M.; BARBIERI, NICOLLE L.; LENZ, GUIDO
Sensitization of Glioma Cells by X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein Knockdown. *Oncology*. , v.83, p.75 - 82, 2012.

3. PERES, ALESSANDRA; LERIAS, ALINE GRIMALDI; DE AGUIAR, ANA KARINE KRAMER; **SILVA, ANDREW OLIVEIRA**; COSTA, CAROLINE BORGES; BEMFICA, CLAUDIA; DE VARGAS, DAIANI MACHADO; ANDRADE, DIEIME DE SOUZA; ENGELKE, DOUGLAS SENNA; PIRES, ELISA NICOLOSO SIMÕES; FURTADO, GABRIEL VASAT; ERPEN, GUSTAVO LUIZ; DE NARDIN, JANAÍNA; OTTON, LETÍCIA MUNER; TORTORELLI, LUCAS SILVA; DA ROSA, PRISCILA MACHADO; CHIES, JOSÉ ARTUR BOGO

As time goes by - Would CD4+ T cells depletion induce early immunosenescence in HIV infected patients?. *Medical Hypotheses*. , v.74, p.208 - 209, 2010.

6. ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

1. **SILVA, A. O.**; FELIPE, K. B.; Villodre E.S.; Lopez P.L.C.; Lenz G.
A guide for the analysis of long-term population growth in cancer. *Tumor Biology*. , 2016.

7. RESUMOS E TRABALHOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS

1. SILVA, A. O.; HUTTEN, M.; LOPEZ, P. L. C.; LENZ, G.
KNOCKDOWN OF XIAP COOPERATES WITH THE OVEREXPRESSION OF P53 IN REDUCING CELL PROLIFERATION AND ENHANCING. In: 10th International Congresso n Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro/RJ.

Program of 10th International Congresso n Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012

2. Vargas J. E.; SUHRE, T.; CHIELA, E. C. F.; **SILVA, A. O.**; Lenz G.
Senescência celular induzida pelo tratamento combinado de resveratrol e quercetina com butirato de sódio em glioblastomas In: XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2012, Águas de Lindóia.

Fesbe 2012. , 2012.

3. SILVA, A. O.; TAMAJUSUKU, A. S. K.; Lopez P.L.C.; Lenz G.
Avaliação da superexpressão do gene pró-apoptótico p53 na linhagem de glioma U87 silenciada pra XIAP ou SURVIVINA In: XXI Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2009, Porto alegre.

CD ROM de resumos do XXI Salão de Iniciação Científica - 2009. , 2009.

4. Vargas J. E.; SILVA, A. O.; CANEDO, A. D.; CAMASSOLA M.; Lenz G.; Lopez P.L.C.

Creation of Lentiviral Vector Series for Stable and Regulated Transduction In:

XXXVIII Annual Meeting of SBBq, 2009, Águas de Lindóia - SP.

Program of XXXVIII Annual Meeting of SBBq. , 2009.

5. Lopez P.L.C.; SILVA, A. O.; Lenz G.; CHIELA, E. C. F.; ZAMIN, L. L.; Vargas J. E.

RNA Interference of the caspase inhibitors XIAP and Survivin modulate apoptosis in glioma In: XXXVIII Annual Meeting of SBBq, 2009, Águas de Lindóia - SP.

program of XXXVIII annual Meeting of SBBq. , 2009.

6. SILVA, A. O.; Lopez P.L.C.; LEDUR, P. F.; Lenz G.

Avaliação do Silenciamento do Gene da XIAP por RNA de Interferência em Linhagens de Gliomas U87 In: XX Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2008, Porto Alegre.

CD ROM de resumos do XX salão de iniciação Científica - UFRGS. , 2008.

7. LEDUR, P. F.; Lopez P.L.C.; Villodre E.S.; SILVA, A. O.; CAMASSOLA M.; NARDI N.; Lenz G.

Apoptosis modulation in gliomas by RNA interference and transgene expression using Lentiviral vector In: VIII São Paulo Research Conferences, 2007, São Paulo.

VIII São Paulo Research Conferences. , 2007.

8. SILVA, A. O.; Lopez P.L.C.; LEDUR, P. F.; Lenz G.

Avaliação do Silenciamento do Gene de Survivina por RNAi em Linhagens de Gliomas U87 In: Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2007, Porto Alegre.

CD-ROM de resumos do XIX salão de iniciação Científica - UFRGS. , 2007.