

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Franciele Cristina Kipper

Novas abordagens terapêuticas para glioblastoma  
baseadas no ensaio de resposta a terapias em culturas  
derivadas de pacientes

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Franciele Cristina Kipper

Novas abordagens terapêuticas para glioblastoma  
baseadas no ensaio de resposta a terapias em culturas  
derivadas de pacientes

Orientador: Guido Lenz

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular do Centro de  
Biotecnologia da UFRGS como requisito  
parcial para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências.

Porto Alegre  
Julho de 2017

## AGRADECIMENTOS

Essa tese foi construída e é dedicada a todos os paciente e famílias que colaboraram doando biopsias para a pesquisa. Muito obrigada pelo entendimento e colaboração em um momento tão difícil. À equipe de neurocirurgia do Hospital São Lucas que facilitou e tornou possível o acesso a esses pacientes e as biópsias, meus sinceros agradecimentos.

Esses nove anos de trabalho no Laboratório de Sinalização Celular foram de grande crescimento pessoal e profissional. Agradeço ao meu orientador Guido Lenz que partilhou o entusiasmo na realização desse projeto e me acompanhou por quase uma década. Tenho certeza que o amor que eu tinha pela ciência só cresceu ao longo desses anos de trabalho pois tu é um grande exemplo de cientista. Obrigada pela paciência, por todos os conselhos e por nos preparar para todas as situações que precisaremos enfrentar, tanto científicas quanto burocráticas.

Aos demais membros que passaram pelo laboratório ao longo desses anos, obrigada por tornarem os dias melhores e partilharem conhecimento. Obrigada aos alunos de iniciação científica que me ajudaram a desenvolver os experimentos: Rafael e Louise, por me mostrarem na prática que alguns conhecimentos só são aprendidos quando repassados. Agradeço também às pessoas que me permitiram colaborar em seus projetos durante esse período: Marina, Emilly, Aline, Isabele, Michele, Mardja, Andrew. Obrigada aos membros do Labsinal que serviram como exemplo profissional e pessoal: Alessandras, Patrícia e José por todos os conselhos.

Agradeço a todas as outras pessoas que passaram pela minha vida durante a minha formação acadêmica com palavras de ajuda, carinho e suporte. Alguns desses exemplos de vida foram fundamentais para me manter no foco e me fazer continuar.

Agradeço ao programa de pós-graduação pela excelente formação educacional e pelo aporte técnico que ofereceu nos últimos 6 anos e aos programas de fomento do Cnpq e FAPERGS. Ao primeiro pela bolsa de doutorado e o segundo pelo financiamento para a realização desse projeto.

Por fim, agradeço a minha família pelo suporte ao longo dos anos e por ter plantado em mim a semente do conhecimento. Muito obrigado por todo o amor, o incentivo e por acreditarem nos meus sonhos. Vocês são o principal pilar e o maior exemplo para o meu crescimento, sem os quais nada disso seria possível.

*“No folclore da ciência, costuma-se contar a história do momento da descoberta: a aceleração do pulso, a luminosidade espectral de fatos rotineiros, o segundo de excitação, de paralisação total, em que as observações se cristalizam e formam padrões, como peças de um caleidoscópio. A maçã cai da macieira. O homem levanta-se da banheira; a escorregadia equação se equilibra. Mas há outro momento de descoberta — sua antítese — que raramente é registrado: a descoberta do fracasso. É um momento que o cientista costuma enfrentar sozinho. A tomografia computadorizada de um paciente mostra o reaparecimento de um linfoma.*

*Uma célula, que foi morta por uma droga, começa a voltar”*

*“Se a “verdade” de cada câncer está impressa em seu comportamento, como capturar essa misteriosa qualidade? Como podemos cientistas fazer a transição crucial entre simplesmente visualizar o câncer e conhecer seu potencial maligno, suas vulnerabilidades, seu padrão de difusão — seu futuro?”*

*Siddhartha Mukherjee em O Imperador de Todos Os Males - Uma Biografia do Câncer*



## RESUMO

Gliomas são tumores do sistema nervoso central caracterizados por alta invasibilidade e mortalidade. Inúmeros esforços foram feitos nas últimas décadas para melhorar a sobrevida dos pacientes, porém o último marco no tratamento se deu pela implementação da temozolomida (TMZ) combinada a ressecção cirúrgica e a radioterapia (RTX) em 2005. O projeto do atlas do genoma humano do câncer (TCGA) sequenciou tumores de mais de 500 pacientes com diagnóstico de glioblastoma (GBM) e categorizou os tumores em quatro subtipos moleculares, baseados na expressão, mutações e deleções de genes. Essas alterações genéticas já foram correlacionadas à melhora na sobrevida e à sensibilidade a terapia, porém, até o momento estudos prospectivos falham em direcionar o tratamento dos pacientes baseados nas características moleculares. Em busca de melhorar o entendimento sobre a correlação entre a sensibilidade a terapia *in vitro* e características genotípicas e fenotípicas, nós realizamos culturas primárias de células derivadas de tumores do sistema nervoso central de 23 pacientes (24 biopsias diferentes). As células foram crescidas em DMEM/F12 suplementado com soro fetal bovino e expostas aos tratamentos em doses e tempos semelhantes aos encontrados na clínica. Foram realizadas análises de viabilidade celular sete dias após o início do tratamento para 11 culturas primárias, ou as culturas foram tratadas por cinco dias em combinação, ou não, com RTX (sem RTX: 16 culturas; com RTX: 9 culturas) seguidos de sete dias em meio livre de droga, ao fim dos quais as células remanescentes foram contadas. A radioterapia e fármacos que agem sobre o citoesqueleto (vincristina, vimblastina, paclitaxel e mebendazole) sozinhos foram os tratamentos mais eficientes em reduzir a população celular. Uma segunda rodada de tratamento com TMZ, paclitaxel e a combinação de procarbazona, CCNU e vincristina (PCV) sugere que a resistência não é estável, e sucessivas exposições ao mesmo, ou a um fármaco diferente, podem ter seus efeitos somados na diminuição do crescimento populacional ou na massa tumoral final. Ao administrar PCV e paclitaxel nas células em cultura observamos um aumento nos níveis de autofagia que correlaciona com o declínio da população. Combinações desses fármacos com concentrações plasmáticas de um bloqueador da autofagia (cloroquina) não são capazes de alterar o crescimento populacional. Resultados de análises do banco disponibilizado pelo TCGA mostram que alguns pacientes não apresentam aumento na sobrevida após tratamento com TMZ, e que essa falha no tratamento correlaciona com a baixa expressão de alguns genes nos seus tumores, por exemplo, aqueles com baixa expressão de FGFR3 e AKT2. As culturas primárias e linhagens celulares com menor expressão desses genes foram sensíveis *in vitro* a combinação de TMZ com dois fármacos que agem sobre o citoesqueleto: vimblastina e mebendazole (TVM). Essa associação retarda o crescimento de linhagens e culturas primárias resistentes a TMZ, além de induzir parada no ciclo celular, senescência e aumento da expressão de Notch3. Devido a falha na terapia padrão, ao baixo custo e aos resultados promissores essa associação de TVM poderia ser testada em pacientes cujos tumores apresentam baixos níveis de AKT2 e FGFR3.

## ABSTRACT

Gliomas are tumors of the central nervous system with high invasiveness and mortality. Efforts have been done in last decades to improve patients overall survival, but the last treatment gain was given by the introduction of temozolomide (TMZ) combined with surgical resection and radiotherapy (RTX), in 2005. The cancer genome atlas (TCGA) consortium sequenced tumors from 500 patients with glioblastoma diagnosis and clustered tumors into four molecular subtypes, based on gene expression, mutations and deletions. These genetic alterations are associated with improved overall survival and sensitivity to therapy, but up to date, prospective studies have failed to address patients' treatment based on molecular characteristics. In order to better understand the correlation among sensitivity *in vitro* and genotypic and phenotypic characteristics, we performed patient-derived cell cultures of central nervous system tumors from 23 patients (24 biopsies). Cells were grown in DMEM/F12 supplemented with fetal bovine serum and treated at doses and times similar to those administered in patients. Cell viability analyses were performed seven days after start of treatment for 11 cultures or cultures were treated for five days plus RTX (without RTX: in 16 cultures; with RTX: in 9 cultures) followed by seven day in drug-free medium, at the end, the remaining amount of cells were counted. RTX and drugs acting on cytoskeleton (vincristine, vinblastine, paclitaxel and mebendazole) alone were the most efficient treatments to reduce the population. A second round of treatment with TMZ, paclitaxel and the combination of procarbazine, CCNU and vincristine (PCV) suggests that the resistance is not stable, and repeated exposures to the same, or to another drug, could have additional effects in population or tumor mass reduction. PCV and paclitaxel treated cells showed an increase in autophagy levels correlated with reduction in population. Combining these drugs with plasmatic concentrations of an autophagy inhibitor (chloroquine) did not change population growth. Results from TCGA databank showed that some patients did not benefit in overall survival after TMZ treatment and this correlates with expression of some genes, for example, those harboring tumors with FGFR3 and AKT2 low expression. Patient-derived cultures and cell lines with low expression of these genes were sensitive *in vitro* to the combination of TMZ with two drugs that act on cytoskeleton: vinblastine and mebendazole (TVM). This association slowed the growth of patient-derived and cell lines tolerant to TMZ, besides inducing cell cycle arrest, senescence and increased Notch3 expression. In the case of failure of standard therapy, low cost and promising results, TVM association could be tested in patients harboring FGFR3<sup>Low</sup>/AKT2<sup>Low</sup> tumors.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Classificação histológica dos gliomas. ....	14
Figura 2 Principais vias alteradas em GBM. ....	16
Figura 3 Principais alterações moleculares que permitem a classificação em subtipos.....	18
Figura 4 Fotomicrografias representativas das culturas primárias utilizadas.....	60
Figura 5 Viabilidade celular após o tratamento com os quimioterápicos.....	64
Figura 6 Sensibilidade a quimio e radioterapia.. ....	65
Figura 7 Correlação entre porcentagem de viabilidade celular e contagens.....	68
Figura 8 Crescimento populacional cumulativo após tratamento e retratamento.. ....	71
Figura 9 Análise da Expressão Gênica Basal.....	73
Figura 10 Gráficos de sobrevida de pacientes que receberam tratamento com TMZ, com dados do TCGA e segregando pela mediana de expressão, e correspondência entre os níveis de expressão do mesmo gene nas culturas primárias e a sensibilidade aos diferentes quimioterápicos.....	74
Figura 11 Correlação entre a expressão de P2RX7 e a sensibilidade a radioterapia e/ou ATP	76
Figura 12 Análise de expressão gênica basal (U) ou induzida/selecionada com cinco dias de tratamento com TMZ 30 $\mu$ M (T). ....	77
Figura 13 Marcação com Laranja de Acridina após tratamento com os fármacos.....	79
Figura 14 Correlação entre aumento de autofagia e sensibilidade aos quimioterápicos.....	81
Figura 15 Comparação entre a indução de autofagia e indução e bloqueio com cloroquina .	84
Figura 16 Comparativo entre sensibilidade aos quimioterápicos e mecanismos celulares.....	86
Figura 17 Crescimento cumulativo após o tratamento, seguidos por replaqueamento e segunda rodada de tratamento .....	87
Figura 18 Esquema representado a recorrência dos gliomas após a ressecção cirúrgica e tratamento com quimio e radioterapia. ....	107

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quimioterápicos com uso em GBM utilizados para tratamentos in vitro.....	37
Tabela 2: Velocidade de crescimento das culturas primárias comparando com linhagens celulares comerciais após 13 dias. CPD: Crescimento populacional diário. ....	60
Tabela 3 Primers utilizados para análise da expressão gênica, o primeiro grupo contendo 13 genes corresponde aos genes analisados para caracterização das linhagens e o segundo grupo (Notch3, Prominina e CDKN2A) representa os genes analisados apenas para o artigo publicado. Em ambos os casos GUSB foi utilizado como normalizador.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS

A172: Linhagem celular comercial derivada de glioblastoma humano

ABZ: Albendazol

AO: Laranja de Acridina (*Acridine Orange*)

ASCO: Sociedade Americana de Oncologia Clínica (*American Society of Clinical Oncology*)

BCNU: Carmustina

BER: Reparo por Excisão de Base (*Base Excision Repair*)

C6: Linhagem celular comercial derivada de glioblastoma de rato

CCNU: Lomustina

CDKN: Inibidor de Ciclina Dependente de Cinase (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor*)

CMF: Meio sem Cálcio e Magnésio (*Calcium-Magnesium Free Medium*)

CPD: Crescimento Populacional Cumulativo (*Cumulative Population Doubling*)

CPPD: Cisplatina

CQ: Cloroquina

CRSA: Ensaio de Sensibilidade a Droga (*Chemoresistance Drug Response Assay*)

CSC: Célula-Tronco Tumoral (*Cancer Stem Cell*)

DiSC: Marcação Diferencial de Toxicidade (*Differential Staining Toxicity*)

DMEM: Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO: Dimetilsulfóxido

EGFR: Receptor do Fator de Crescimento Endotelial (*Endothelial Growth Factor Receptor*)

FBS: Soro Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*)

FDA: Agência reguladora de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration*)

FGFR: Receptor do Fator de Crescimento de Fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor Receptor*)

GBM: Glioblastoma

G-CIMP: Fenótipo de ilhas CpG metiladas (*CpG Island Methylator Phenotype*)

Gy: Gray

HDRA: Ensaio de Sensibilidade em Organotípica (*Histoculture Drug Response Assay*)

HIF: Fator induzido por hipóxia (Hypoxia-Inducible Fator)

HSL: Hospital São Lucas

HTCA: Ensaio de Formação de Colônias de Tumores Humanos (*Human Tumor Cloning Assay*)

HUVEC: Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*)

IDH1/2: Isocitrato Desidrogenase

INCA: Instituto Nacional do Câncer

KM: Kaplan-Meier

MBZ: Mebendazole

MDR1: Gene de Resistência a Múltiplas Drogas

MGMT: O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA metiltransferase

MMR: Reparo por mau pareamento (*Mismatch Repair*)

MSI1: Musashi-1

MTIC: 3-metil-(triazen-1-il)imidazol-4-carboxamida

mTOR: Mammalian Target of Rapamycin

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium

NEFL: Gene que codifica para a proteína leve de neurofilamentos

NF1: Gene que codifica para Neurofibromina 1

OS: Sobrevida total (*Overall Survival*)

PCD: Morte Celular Programada (*Programmed Cell Death*)

PCV: associação de Procarbazina, Lomustina e Vincristina

PCZ: Procarbazina

PDGFR: Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (*Platelet Derived Growth Factor Receptor*)

PDX: Cultura xenográfica derivada de paciente (*Patient Derived Xenograft*)

PFS: Tempo de Progressão Livre de Doença (*Progression Free Survival*)

PTEN: Proteína homóloga a fosfatase e tensina (*Phosphatase and Tensin Homolog*)

PTX: Paclitaxel

PUCRS: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

R/GFIR: Razão entre a intensidade da fluorescência vermelha e da fluorescência verde (*Red-to-Green Fluorescence Intensity Ratio*)

RB: Gene que codifica para a proteína Rb (Retinoblastoma)

RendCPD: CPD Relativo ao final do experimento (*Relative end CPD*)

RISC: Células com Características Tronco Iniciadoras da Recorrência (*Recurrence-Initiating Stem-Like Cancer*)

RPR: Taxa de Proliferação Relativa (*Relative Proliferation Rate*)

RTX: Radioterapia

RTK: Receptor Tirosina Cinase

SASP: fenótipo secretório associado a senescência (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*)

SNC: Sistema Nervoso Central

TCGA: Catálogo Genômico dos Cânceres (*The Cancer Genome Atlas*)

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TIC: Célula Iniciadora de Tumor (*Tumor Initiating Cell*)

TMZ: Temozolomida

TTF: dispositivo portátil, não invasivo, que fornece campos elétricos alternados de frequência intermediária e baixa intensidade (*Tumor Treating Fields*)

U138, U251, U343, U87: Linhagens comerciais derivadas de glioblastoma humano

TVM: associação de Temozolomida, Vinblastina e Mebendazol

VBL: Vimblastina

VC: Vincristina

VEGFR: Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*)

VP16: Etoposídeo

VPA: Ácido Valpróico

WHO: Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1. Capítulo I – Glioblastoma multiforme .....	14
1.1.1. Principais alterações genéticas .....	16
1.1.2. Tratamento.....	26
1.1.2.1. Nitrosuréias .....	27
1.1.2.2. Derivados da vinca .....	29
1.1.2.3. Temozolomida.....	29
1.1.2.4. Inibidores da topoisomerase.....	31
1.1.2.5. Outros agentes alquilantes .....	32
1.1.2.6. Outros agentes anti-microtúbulos .....	33
1.1.3. Novas abordagens terapêuticas.....	34
1.1.3.1. Mebendazole.....	34
1.1.4. Tratamentos de segunda linha/recorrência.....	36
1.1.4.1. Anticorpos monoclonais.....	36
1.1.5. Farmacogenômica .....	39
1.1.6. Resistência à terapia .....	40
1.1.6.1. Mecanismos moleculares de resistência.....	40
1.1.1.1. Mecanismos celulares de resistência.....	41
1.2. Capítulo II – ensaios de predição à resposta <i>in vitro</i> .....	43
1.2.1. História da terapia personalizada em câncer.....	43
1.2.2. Ensaios de sensibilidade <i>in vitro</i> .....	45
1.2.3. Tipos de ensaios celulares de predição mais utilizados .....	47
1.2.3.1. CRSA .....	47
1.2.3.2. Ensaio clonogênico (HTCA).....	47
1.2.3.3. HDRA .....	49
1.2.3.4. Outros métodos de predição <i>in vitro</i> .....	50
1.2.3.5. Ensaio na cápsula subrenal .....	51

1.2.3.6. PDX .....	51
1.2.4. Dificuldades em implantação na clínica .....	52
2. HIPÓTESE.....	54
3. OBJETIVO.....	55
3.1. Geral .....	55
3.2. Específico.....	55
4. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS GERAIS .....	56
4.1. Aspectos éticos envolvidos na obtenção das biópsias.....	56
4.2. Estabelecimento das culturas primárias .....	56
4.2.1. Materiais e métodos para obtenção das culturas.....	56
4.2.2. Resultados do estabelecimento das culturas.....	57
4.3. Análise da sensibilidade .....	60
4.3.1. Materiais e métodos para análise de viabilidade.....	60
4.3.2. Resultados de viabilidade celular.....	61
4.3.3. Materiais e métodos para contagem do número de células .....	61
4.3.4. Resultados do número remanescente após tratamento .....	64
4.3.5. Resultados gerais da análise de sensibilidade.....	67
4.3.6. Materiais e métodos para análise da sensibilidade ao retratamento .....	68
4.3.7. Resultados do retratamento .....	69
4.4. Análise da expressão gênica.....	71
4.4.1. Materiais e métodos para expressão basal a nível de mRNA .....	71
4.4.2. Resultados da expressão gênica basal .....	72
4.4.3. Materiais e métodos para expressão induzida de mRNA .....	76
4.4.4. Resultados da expressão induzida de mRNA .....	77
4.5. Análises de autofagia e senescência .....	78
4.5.1. Materiais e métodos para análises de autofagia .....	78
4.5.2. Resultados das marcação com laranja de acridina .....	78
4.5.3. Correlação entre autofagia e morte.....	80



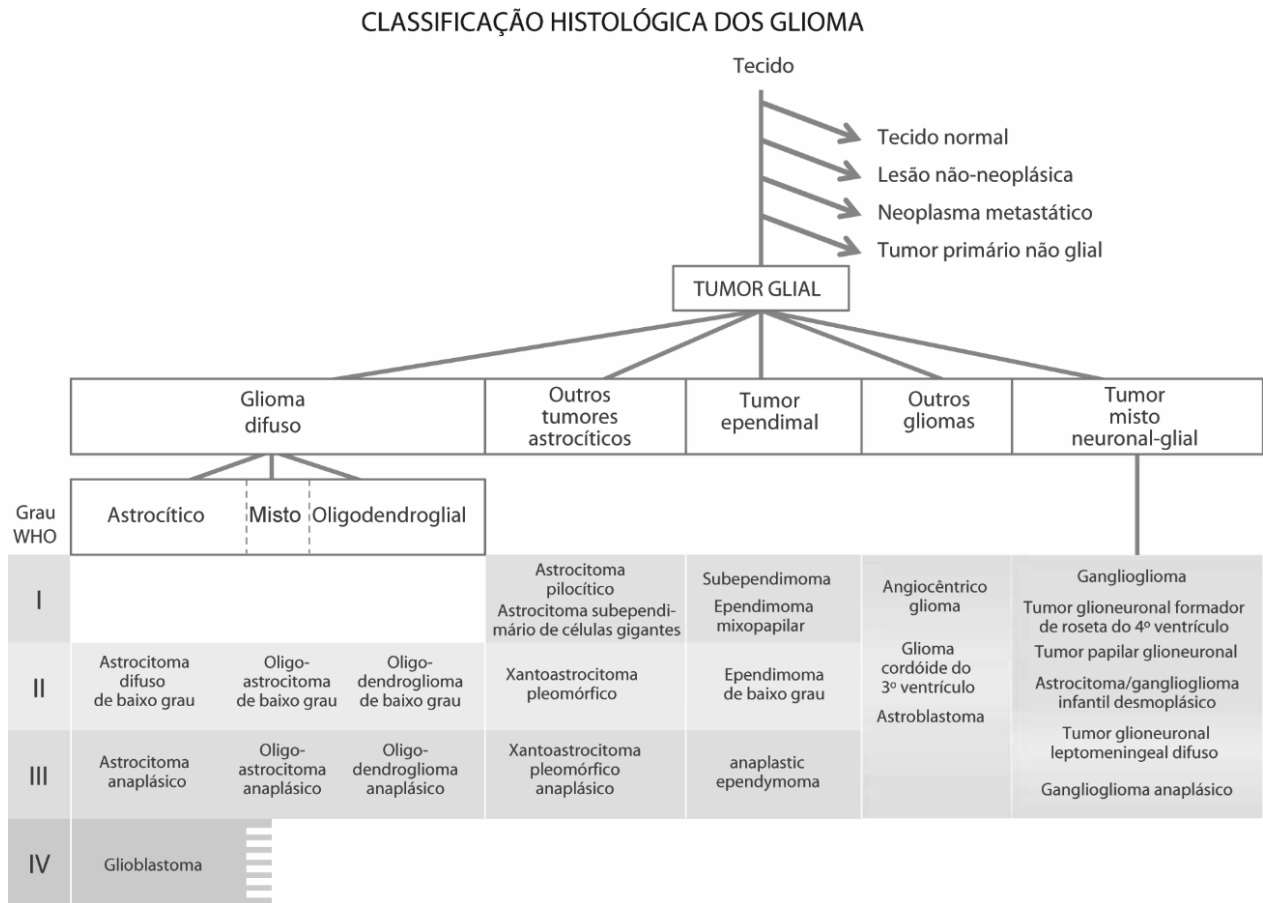
4.5.4. Materiais e métodos para o bloqueio da autofagia .....	81
4.5.5. Resultados do bloqueio da autofagia .....	82
4.5.6. Materiais e métodos para análises de senescência .....	83
4.5.7. Resultados das análises morfométricas nucleares.....	85
4.5.8. Materiais e métodos para análise de sensibilidade após bloqueio de autofagia	87
4.5.9. Resultados populacionais do bloqueio de autofagia .....	87
4.6. Resultados gerais.....	88
5. ARTIGO CIENTÍFICO .....	89
6. DISCUSSÃO .....	101
7. CONCLUSÕES.....	114
8. PERSPECTIVAS .....	115
9. REFERÊNCIAS.....	116
10. GLOSSÁRIO .....	126
Anexo I – Parecer Consubstanciado do CEP .....	128
Anexo II – Termo de Consentimento.....	132
Anexo III - Dados clínicos das biópsias .....	136
Anexo IV - Currículo.....	139

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1.CAPÍTULO I – GLIOBLASTOMA MULTIFORME

O termo glioma compreende todos os tumores que apresentam na sua origem células gliais (do grego “glue” = cola), incluindo astrocitoma de grau I, II (astrocitoma propriamente dito), III (astrocitoma anaplásico) e IV (glioblastoma multiforme ou GBM), oligodendrogliomas, ependimomas e gliomas mistos (Veliz *et al.*, 2015). A Figura 1 representa a classificação após reformulação da nova diretriz da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, WHO) para classificação desses tumores feita em 2016.

Figura 1 Classificação histológica dos gliomas. Adaptado de Perry, 2016



A taxa de incidência anual, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) de tumores no sistema nervoso central (SNC) no Brasil é de 5,5 novos casos para cada 100 mil homens e 4,7 novos casos para cada 100 mil mulheres (ISBN 978-85-7318-283-5). Gliomas representam o tipo histológico mais frequente (40 – 60%) dos tumores primários nesta localização, sendo mais comum em adultos. Entre 12 – 15% dos casos

de tumores malignos intracraniais são diagnosticados como GBM, sendo esse grau o mais comum e respondendo por mais da metade (50 – 60%) dos gliomas. Embora a incidência seja baixa, o prognóstico é pior que qualquer outro tumor do SNC, sendo que apenas 5% dos pacientes ultrapassam 5 anos de sobrevida após o diagnóstico (Veliz *et al.*, 2015).

A célula de origem para esses tumores ainda é contraditória, algumas teorias postulam que células tronco-tumorais e progenitores neurais podem sofrer eventos de transformação maligna e até mesmo que pode haver de-diferenciação de células maduras, como astrócitos e oligodendrócitos, para dar origem a esses tumores (Jiang *et al.*, 2017). Normalmente GBM se iniciam de novo, embora 10% tenham uma história clínica prévia de astrocitoma de menor grau, sendo esses denominados de GBM secundário; essa classificação de primário ou secundário também apresenta relação com diferente expressão gênica e sintomas (Van Meir *et al.*, 2010).

Gliomas se caracterizam por serem tumores altamente proliferativos e invasivos, com vascularização abundante e aberrante que se mostram extremamente resistentes aos regimes tradicionais de quimio e radioterapia tornando-os de difícil remoção completa (Veliz *et al.*, 2015). O diagnóstico histológico é baseado principalmente em atipias nucleares e de atividade mitótica. De acordo com a definição histológica atual da WHO, os tumores com atipias citológicas isoladas (por exemplo astrocitomas difusos) são considerados grau II, aqueles que também apresentam anaplasias e atividade mitótica (por exemplo astrocitomas anaplásicos) são considerados de grau III e os tumores que também apresenta proliferação microvascular e/ou necrose são considerados de grau IV. Radiologicamente esse tumor apresenta-se como uma massa com aumentos parciais de contraste devido a rupturas na barreira hematoencefálica e no grau IV observam-se áreas de proliferação e/ou necrose (Van Meir *et al.*, 2010). Extensivas áreas de calcificação são encontradas com mais frequência em tumores oligodendrogliais do que em astrocíticos (Perry e Wesseling, 2016). GBMs apresentam contornos irregulares e zonas periféricas com forte contraste cercado por uma área escura, hipodensa e necrótica e uma área sem aumento de contraste que se estende para fora dessa área de aumento de contraste (Van Meir *et al.*, 2010). A ressonância magnética é atualmente o padrão ouro de imagem para avaliação radiológica e muitas vezes é o substituto para a macroscopia, especialmente em pequenas biópsias (Perry e Wesseling, 2016).

Por muitas décadas o diagnóstico baseado na classificação histológica foi útil o suficiente para avaliação do prognóstico e manejo da terapia, contudo é aceito atualmente que informações moleculares permitem uma classificação mais robusta, tanto que a classificação da WHO de 2016 integra achados histológicos e moleculares na definição de gliomas (Louis *et al.*, 2016). Até o momento não existe nenhum fármaco aprovado para terapia personalizada desse tipo tumoral pelo FDA (Ene e Holland, 2015).

### 1.1.1.Principais alterações genéticas

Gliomas podem ser considerados molecularmente como uma doença heterogênea, pois apresentam variações tanto intra quanto intertumoral, além de apresentar contínua modificação molecular ao longo do tempo. Nenhuma única mutação explica sua a tumorigênese, sendo a diversidade molecular uma das explicações para a resistência a terapia (Weathers e Gilbert, 2016).

A partir de 2016 a WHO passou a combinar a classificação molecular à histológica para melhor classificar esses tumores, por exemplo, hoje existe a classificação GBM IDH selvagem ou GBM IDH mutado (Perry e Wesseling, 2016).

O conhecimento a nível molecular desses tumores se desenvolveu lentamente ao longo das últimas décadas. Em 1984 foram identificadas cópias extra do cromossomo 7 nesse tipo tumoral, e mais tarde mostrou-se que o oncogene mais importante dessa porção era EGFR. Alguns anos depois, em 1989, outras análises cariotípicas demonstraram a perda de heterozigidade nos cromossomos 9, 10 e 17, sendo que nesse último identificou-se um dos genes *driver* para as alterações cromossomais: TP53. Quatro anos após, demonstrou-se que a perda no cromossomo 9 continha a região codificante CDKN2A para as proteínas p16 e Arf, uma inibidora da progressão do ciclo celular. Quase oito anos depois identificou-se

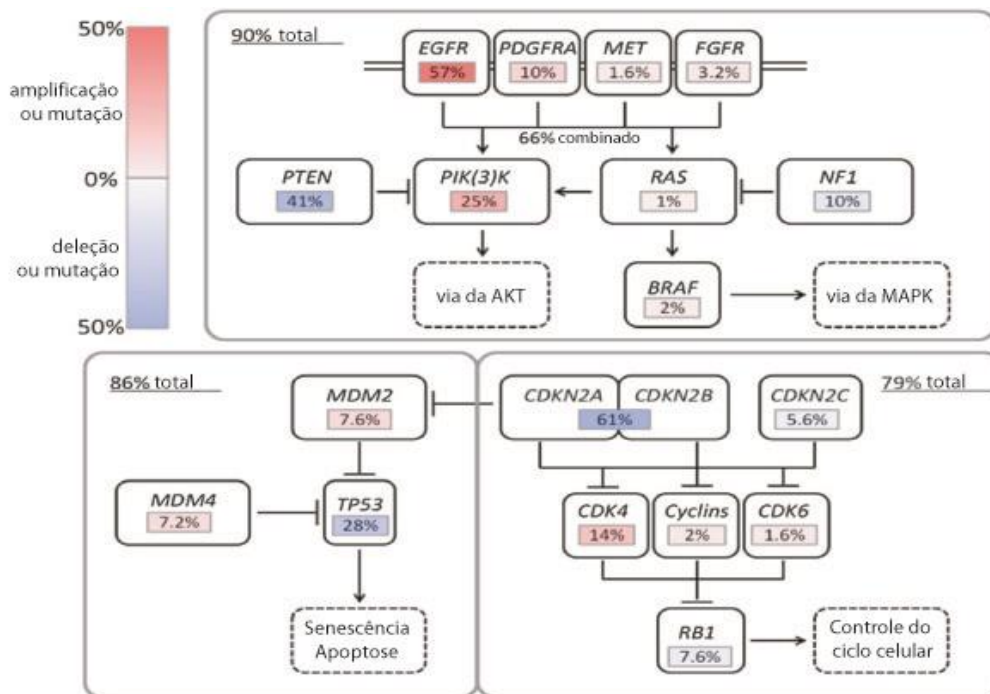


Figura 2 Principais vias alteradas em GBM. Adaptado de Weathers e Gilbert, 2016.

que o principal supressor tumoral deletado no cromossomo 10 era PTEN, um regulador negativo da via de proliferação e sinalização PI3K/Akt. A última grande descoberta genética nesses tumores foi a presença de IDH1 e IDH2 mutados em tumores de baixo grau e GBM secundários, sugerindo que esse gene além de perder a capacidade de converter isocitrato em  $\alpha$ -cetogluturato, após mutação também poderia funcionar como oncogene, por ativar vias do fator induzível por hipóxia (HIF) e ganhar função na conversão de  $\alpha$ -cetogluturato em 2-hidroxiglutarato (Van Meir *et al.*, 2010). A Figura 2 ilustra as principais alterações genéticas em GBMs em nível de mutações, ampliações e deleções.

Nos últimos anos, enormes esforços para o entendimento molecular desses tumores foram feitos, e GBM foi selecionado como um dos três primeiros cânceres a serem sequenciados pelo projeto do “Atlas do Genoma do Câncer” (The Cancer Genome Atlas, TCGA) do Instituto Nacional de Saúde (National Institutes of Health’s, NIH) dos Estados Unidos, sendo hoje, um dos tumores com melhor entendimento a nível molecular. Esses esforços resultaram na identificação de fatores moleculares de prognóstico e de vulnerabilidade, que podem ser alvo no desenvolvimento de novos tratamentos e no entendimento dos fatores envolvidos com a gliomagenese (Weathers e Gilbert, 2016).

Os esforços do projeto TCGA resultaram inicialmente em uma publicação sobre alterações relevantes em três vias de sinalização centrais: p53, Retinoblastoma (Rb) e Receptores Tirosina Cinase (RTK) (Cancer Genome Atlas Research, 2008) e esforços subsequentes foram feitos para ligar essas alterações a subtipos moleculares e epigenéticos. A classificação inicial foi feita em quatro subtipos com características moleculares distintas: clássico, mesenquimal, proneural e neural (Verhaak *et al.*, 2010; Brennan *et al.*, 2013; Veliz *et al.*, 2015). As diferentes alterações genéticas de cada subtipo estão associadas a diferentes respostas a terapia, foi demonstrado maior impacto do tratamento nos portadores do tipo clássico, visto que alterações em p53 são incomuns nesse grupo, enquanto o menor impacto acontece nos tumores com característica proneural. A variação na resposta de acordo com essa classificação aponta para um futuro no qual diferentes abordagens terapêuticas deveriam ser baseadas no subtipo prevalente (Ene e Holland, 2015; Weathers e Gilbert, 2016).

Embora tenha havido grandes reviravoltas sobre a relevância dessa classificação e seu impacto no tratamento na última década, a maioria dos autores consultados ainda considera seu conhecimento válido, portanto as principais alterações genéticas encontradas em cada subtipo estão mostradas na Figura 3. Essa classificação, embora seja um dos grandes avanços para esse tipo de tumor, não pode ser vista como divisão absoluta e rígida, uma vez que mosaicismos e mudanças de classe já foram observadas sob influência do microambiente tumoral (Veliz *et al.*, 2015). Os resultados encontrados por Patel e colaboradores revelam que os subtipos moleculares são em parte estados de variação fenotípica;

demonstram que *in vivo* os tumores apresentam um espectro de estados troncos e de diferenciação, ou seja uma capacidade de proliferação variada além de expressão oscilante de marcadores de quiescência, o que poderia confundir a quimioterapia baseada em alterações genéticas por esta não recapitular a diversidade transcricional de tumores individuais. Ainda, demonstraram que um mesmo tumor varia a ponto de que diferentes porções apresentam características de diferentes subtipos (Patel *et al.*, 2014) o que poderia explicar a resposta parcial seguida de resistência a quimioterapia.

Para fins práticos, uma vez que a classificação da WHO aponta que deve-se levar em consideração algumas dessas alterações na hora de conceder o diagnóstico, adotaremos nesta tese essa classificação em subtipos e faremos um breve relato da função de cada um dos genes cujas alterações ajudam a categorizar nos subgrupos. A maioria desses genes já foi associada com sobrevida ou mecanismo de resistência a alguma quimioterápico, e alguns aparecem na Figura 2 e/ou na Figura 3.

Segundo essa categorização, os GBMs majoritariamente clássicos apresentam amplificações no

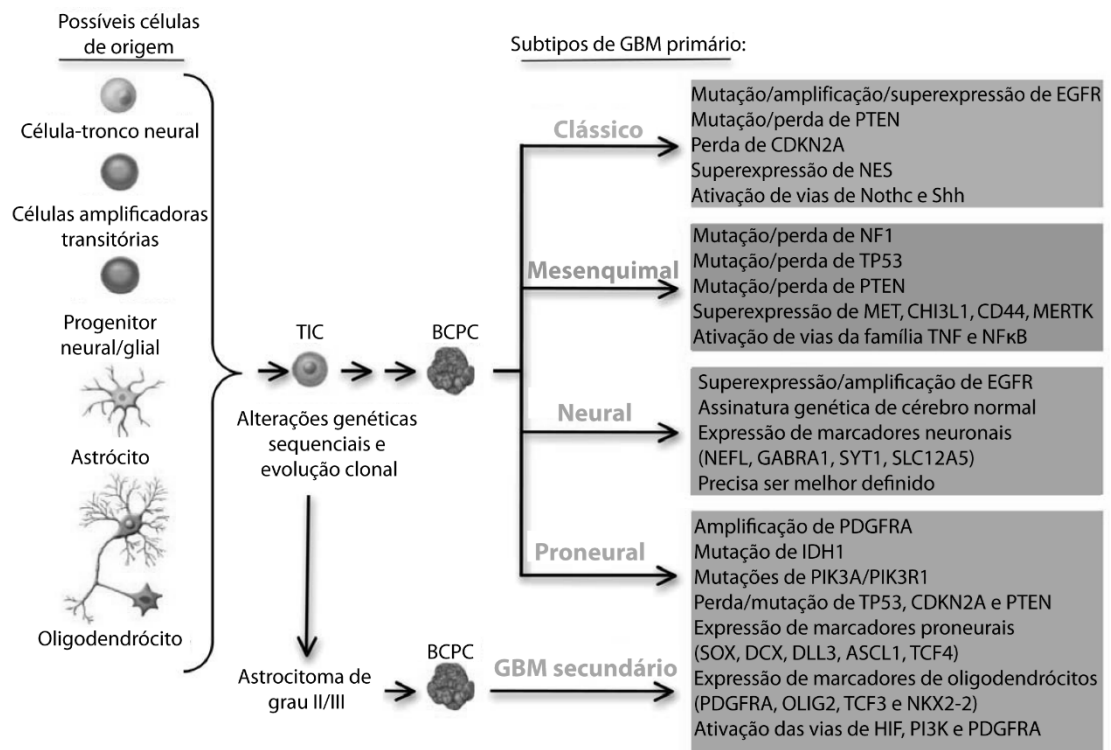


Figura 3 Principais alterações moleculares que permitem a classificação em subtipos. Adaptado de Van Meir, 2010. TIC: Tumor Initiating Cell, BCPC: Brain Cancer-Propagating Cells

cromossomo 7, deleção no cromossomo 10 e da porção 9p21.3, amplificação e mutação do gene que codifica para EGFR, e deleção do locus de PTEN e CDKN2A. Além disso, apresentam aumentada expressão de precursores neurais e marcadores de células-tronco (Nestina), e aumento em vias de sinalização como Notch (NOTCH3, JAG1 e LFNG) e Sonic hedgehog (SMO, GAS1 e GLI2). O subtipo mesenquimal apresenta

um perfil de expressão associado ao tecido mesenquimal e a angiogênese, com alta frequência de mutações/deleções que levam a inativação no gene que codifica para NF1, TP53 e PTEN, além de alta expressão dos genes CHI3L1/YKL40, MET, de marcadores astrocíticos (CD44 e MERTK) e dos genes envolvidos nas vias de sinalização de TNF e NFκB. Essas alterações sugerem que pode ser sensível a quimioterapias mais agressivas com resposta potencializada com inibidores de Ras, PI3K e angiogênese. Um subtipo apresenta-se similar ao tecido normal, onde não foram observadas anormalidades moleculares relevantes, apenas ativação de marcadores neuronais (NEFL, GABRA, SYT1 e SLC12A5), sugerindo que deriva de células com um fenótipo bastante diferenciado, sendo denominado neural. A classe mais estudada talvez seja a proneural, que apresenta perfil de expressão semelhante ao visto no desenvolvimento neuronal, incluindo altos níveis de expressão de marcadores de oligodendrócitos (PDGFRA, OLIG2, TCF3 e NKX2-2) e de desenvolvimento proneural (SOX, DCX, DLL3, ASCL1 e TCF4) além de ilhas CpG metiladas que conferem um fenótipo G-CIMP (metilações que inativam e silenciam regiões cromossômicas, normalmente nos promotores de genes de reparo e de supressores tumorais, variáveis entre os diferentes cânceres, que alteram o metiloma (Hughes *et al.*, 2013)). Geralmente está associado a mutações no gene que codifica para p53, PI3KCA/PIK3R1, IDH1 e 2, compartilhando assim marcas de expressão de LGG e GBMs secundários; ampliações do cromossomo 7 e perda do cromossomo 10, embora significantes, são menos frequentes que no subtipo clássico. Essas alterações fazem deste último subtipo o mais responsivo a inibidores de vias de sinalização de HIF, PI3K e PDGFRA, e, de maneira geral, os pacientes portadores de tumores com essa característica já possuem uma sobrevida média maior que os portadores de tumores com características majoritárias de outros subtipos (Van Meir *et al.*, 2010; Verhaak *et al.*, 2010).

Após o agrupamento feito por Verhaak, em 2010, o TCGA continuou coletando amostras e uma nova publicação de 2013, com mais 342 amostras, atualizou alguns conhecimentos sobre a biologia desses tumores. Nesse período houve melhora da plataforma para análise de metilações e re-análise de algumas amostras anteriores. Uma clusterização hierárquica do perfil de metilação do DNA estratificou 396 casos em seis classes, incluindo G-CIMP que é enriquecida no subtipo proneural (Brennan *et al.*, 2013). Esse estudo sugere uma divisão no subgrupo proneural, visto que uma parcela desses tumores porta mutações em IDH1 e 2 condizentes com fenótipo G-CIMP e outro apresenta-se hipometilado, com predominância de IDH1 selvagem e amplificação de PDGFRA (Brennan *et al.*, 2013). Essa classificação também demonstrou que o aumento da sobrevida existente no subtipo proneural é conferido pelo status de G-CIMP, uma vez que tanto nesse subtipo quanto no mesenquimal o fenótipo hipometilado apresenta-se menos favorável (Brennan *et al.*, 2013)

Muitas dessas alterações genéticas, além de marcadores para a divisão em grupos, já foram associadas à falha na quimioterapia, através de uma série de mecanismos diversos, como mudanças na ativação/inativação de metabólitos, aumento de proteínas e/ou de atividade de enzimas de reparo, alteração de alvos dos quimioterápicos (Page e Takimoto, 2008). Dentre essas podemos destacar algumas mais estudadas e citadas na literatura: alta expressão de MDR1 e MGMT, mutações em receptores tirosina cinase (como EGFR), alterações em p53, etc.

Receptores tirosina cinase (RTK) como EGFR, PDGFR, VEGFR e FGFR contribuem para o crescimento através da ativação de vias de proliferação RAS/ERK ou PI3K/AKT. Pelo menos um RTK foi encontrado alterado em 67% dos GBMs (Brennan *et al.*, 2013). Entre os RTKs amplificações e mutações em um deles, EGFR, parecem ser as anomalias mais frequentes, detectadas em 40 – 50% dos pacientes (Figura 2), normalmente classificados no subtipo clássico. Uma mutação específica, denominada EGFR tipo III (ou EGFRVIII) é a mais frequente (~50% dos tumores com amplificação neste gene) deixando a proteína inapta a realizar a ligação e desencadear o sinal. Em GBM, diferente de tumores pulmonares, por exemplo, inibidores de tirosina cinase parecem ser menos eficientes e uma versão não mutada do receptor é necessária para o desfecho oncogênico de EGFRVIII, envolvendo transativação de RTKs. A amplificação ou mutação ativadora nesse receptor, combinada a perda de PTEN mantém a via PI3K superativa em aproximadamente 90% dos GBMs promovendo o crescimento, sobrevivência (Veliz *et al.*, 2015), invasão, motilidade, angiogênese e inibição da apoptose (Van Meir *et al.*, 2010). Essa proteína mutante tornou-se um alvo atrativo para terapias por criar um epítipo específico de tumores, porém, nem inibidores como gefitinibe e erlotinibe, nem anticorpos monoclonais como cetuximabe provaram efetividade em aumentar o tempo de sobrevida livre de progressão (PFS) em GBM (Van Meir *et al.*, 2010).

VEGF é um RTK fundamental para angiogênese. Após os dados do TCGA demonstrarem seu aumento em gliomas, rapidamente um anticorpo monoclonal humanizado foi aprovado pelo FDA para uso em GBM recorrente com base em taxas de resposta radiológica e baixa toxicidade, o Bevacizumabe (Van Meir *et al.*, 2010). Seu uso e eficácia serão discutidos com mais detalhes na seção sobre novos tratamentos.

Receptores de PDGF dos subtipos  $\alpha$  e  $\beta$  e os ligantes A e B também são superexpressos em alguns gliomas malignos, especialmente no subtipo proneural, criando sinalizações autócrinas e parácrinas que promovem a proliferação celular. Essa amplificação está associada a alterações em EGFR em 42% dos casos (Brennan *et al.*, 2013). Já foram feitos estudos com um inibidor desse receptor, o mesilato de imatinibe, demonstrando significativa atividade *in vitro* e em modelos ortotópicos, mas inefetividade em gerar resposta ou prolongar o PFS em estudos clínicos (Van Meir *et al.*, 2010). A expressão forçada desse gene,



em cérebro de animais com deleção do gene endógeno, leva a formação de tumores que mimetizam gliomas de baixo e alto grau, similares ao subtipo proneural (Ene e Holland, 2015).

Receptores de FGF têm papel fundamental na embriogênese desde a gastrulação até a organogênese e diferentes tecidos expressam diferentes isoformas desse receptor (Holzmann *et al.*, 2012). Em aproximadamente 3% dos GBMs a porção tirosina cinase do FGFR1 ou do FGFR3 pode estar fusionada ao domínio codificante do *transforming acidic coiled-coil* do TACC1 ou TACC3 respectivamente. Essa proteína quimérica possui atividade oncogênica quando introduzida em astrócitos e se localiza nos pólos do fuso mitótico, onde é constitutivamente ativada e capaz de induzir defeitos na segregação cromossomal. Os animais que possuem tumores com células iniciadoras portadoras dessa fusão se beneficiaram com o tratamento com inibidores de FGFR, indicando que o grupo de pacientes portadores dessa mutação também pode ter maiores benefícios com essa terapia (Singh *et al.*, 2012). Há expressão aumentada de FGFR3 nos subtipos clássico e neural (Wang *et al.*, 2016). Além dos gliomas, já foi demonstrado que na linhagem de adenoma de cólon LT97 há aumento da expressão desse gene na forma IIIb dentro de uma subpopulação com maior capacidade proliferativa que também expressa CD44 (Holzmann *et al.*, 2012). Em linhagens de rhabdomyosarcoma FGFR3 já foi identificado em células iniciadoras do tumor (Tumor Initiating Cells, TICs), sendo que uma população positiva para esse marcador pode ser utilizada para a propagação seriada em animais, indicando que, além de ser um marcador, esse gene também medeia vias de sinalização para a manutenção do estado tronco e de proliferação (Hirotzu *et al.*, 2009). Nesse mesmo câncer, FGFR3 foi reportado sendo co-expresso com CD133, outro marcador de TIC, sendo que a subpopulação duplamente marcada, quando separada, possui a habilidade de formar colônias *in vitro* que são mais resistentes a quimioterápicos como a vincristina (Pressey *et al.*, 2013).

CD133 é reconhecido como importante marcador para identificação de células tronco-tumorais. Muitos estudos demonstram que células CD133+ são extremamente quimioresistentes e em células com características tronco de melanoma sua presença foi associada à resistência ao taxol. Em linhagens de glioma U251 e U87 a expressão é muito baixa e em células U138 CD133+ há aumento da expressão de genes de resistência a múltiplas drogas, como ABCB1 e ABCC4 (Wang *et al.*, 2015). Essa proteína é codificada pelo gene prominina 1, localizado no cromossomo 4p15.32.

Em alguns casos, vias de sinalização intracelular aos RTKs podem estar constitutivamente ativadas, tanto por mutações no receptor e nas proteínas alvo que levam a constante ativação, como ocorre para a via de PI3K, quanto por perda ou inativação de reguladores negativos, como PTEN. Essa alteração, embora justifique a resistência aos inibidores de RTK, por si não é suficiente para induzir a formação de tumores, necessitando de outras alterações, como nas vias de Rb e p53, monitores diretos do ciclo celular (Van Meir

*et al.*, 2010). Quase 80% dos tumores portam alterações que afetam a via da Rb, seja diretamente com deleção/mutação em RB1, por amplificação de CDK4/6 ou por deleção de CDKN2A (Brennan *et al.*, 2013).

Um inibidor de RTK utilizado em estudo clínico, Foretinibe, também inibe a fosforilação de receptores TAM (Tiro3, Axl e MerTK), especialmente MerTK, bloqueando a ativação *downstream* de AKT e ERK em linhagens de GBM adulto e pediátrico. Esse bloqueio impede assim a sobrevivência, proliferação, migração e invasão de colágeno *in vitro* do glioma. Em GBM há co-expressão de dois desses receptores (Axl e MerTK), embora mutações não tenham sido relatadas (Knubel *et al.*, 2014). MerTK é superexpresso e potencialmente ativo em uma variedade de cânceres, indicando que pode conferir uma vantagem ao tumor. Em GBM sua expressão correlaciona com a de Nestina (NES) e Sox2, indicando possível relação com o estado de indiferenciação, e seu silenciamento leva a apoptose e a autofagia, diminui a formação de colônias, aumenta a quimiossensibilidade, altera a morfologia e diminui a migração (Cummings *et al.*, 2013)

A via de p53 está desregulada em 85% dos tumores, através de mutações em TP53, amplificação de MDM1/2/4 e/ou deleção de CDKN2A. Alterações em TP53 são mutuamente excludentes de amplificações na família de MDM e CDKN2A. p53 ativa a transcrição de p21, um bloqueador do ciclo na fase G1 que se liga a família de ciclinas D. A ligação ciclinas - cinases dependentes de ciclina regula a entrada e progressão no ciclo por induzir inativação de Rb. A proteína Rb previne a entrada na fase S por inativar a família de fatores de transcrição E2F, críticos para o início da replicação. Embora p53 e Rb sejam peças centrais nessa maquinaria e mutações inevitavelmente gerem defeitos na via, alterações nas demais proteínas citadas podem ter efeito indireto nesse desbalanço (Van Meir *et al.*, 2010).

A presença de p21 tem sido utilizada para considerar a presença de p53 selvagem ativa. De fato, em células normais, p21 mantém funções anti-proliferativas, mediando a senescência de maneira dependente e independente de p53. Estudos mais recentes indicam que p21 também pode ser um fator oncogênico em células sem p53 (Georgakilas *et al.*, 2017).

Células de diversos tipos tumorais com senescência induzida por vários estímulos apresentam aumento de Notch3, que é necessário para a indução da expressão de p21 e concretização do fenótipo senescente, além disso, a diminuição na expressão de qualquer uma dessas duas proteínas leva a senescência na população, enquanto que a restauração em células deficientes leva a diminuição na proliferação celular (Cui *et al.*, 2013). Em câncer de mama, a superexpressão de Notch3 leva a uma parada na fase G0/G1 com aumento de Cdh1 e acúmulo de p27<sup>Kip</sup> (Chen, C. F. *et al.*, 2016). Juntos, esses estudos sugerem que Notch3 correlaciona com a progressão no ciclo celular.

O gene que codifica para NF1 está deletado ou mutado em 10% dos casos, e essa alteração nunca ocorre concomitante a mutações em BRAF (2%) (Brennan *et al.*, 2013). NF1 localiza-se no cromossomo 17q11.2 e codifica para a proteína neurofibromina, um supressor tumoral cuja função principal é regular RAS mas também modula adenilato ciclase. Sua perda geralmente leva a uma atividade aumentada em várias vias pró-tumorais, particularmente na via das MAPK. Recentes análises em larga escala identificaram alterações somáticas desse gene em GBM, geralmente associadas ao subtipo mesenquimal, onde também há aumento de YKL40, CD44 e STAT3. Embora esse subtipo tenha um prognóstico ruim, análises de sobrevida não demonstram diferença entre pacientes com e sem alterações nesse gene (Vizcaino *et al.*, 2015).

CD44 é uma glicoproteína transmembrana que funciona como receptor, codificada pelo gene CD44 altamente conservado localizado no cromossomo 11p13. É utilizada como marcador de estado tronco em muitas células normais e tumorais, sendo que sua expressão já foi associada com a tronquicidade e a resistência ao tratamento em gliomas. Como marcador de células-tronco tumorais (CSC) pode ser utilizado individualmente ou em combinação com CD24, CD133 e CD34 (Yan *et al.*, 2015). A interação entre CD44 e hialuronas ativa a expressão de marcadores de tronquicidade, como Nanog, e MDR1 mediada por Stat-3, podendo também levar a expressão de Bcl-2 e quimioresistência em câncer de mama (Wang *et al.*, 2015).

Fatores nucleares  $\kappa$ B pertencem a uma família de fatores de transcrição que respondem a sinais extracelulares para regular uma gama de processos biológicos como sobrevivência e resposta imune e inflamatória. Essa família inclui proteínas da via NF- $\kappa$ B como RelA/p65, RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 e NF- $\kappa$ B2. Uma dessas proteínas, que está aumentada no subtipo mesenquimal, é RelB e já foi demonstrado *in vitro* que sua perda atenua a sobrevivência, mobilidade e invasão das células. Além disso, essa proteína aumenta a expressão de outros genes marcadores do subtipo mesenquimal, como YKL-40, regula a expressão de Olig2, um marcador de CSC e candidato para marcador de célula de origem, e controla a transição epitélio-mesenquimal. Dados do TCGA revela que a expressão de RelB correlaciona com a progressão tumoral e baixas taxas de sobrevida (Lee *et al.*, 2013).

O gene NEFL codifica para um tipo IV de filamento intermediário que forma heteropolímeros que mantém o calibre neuronal e tem importante papel no transporte intracelular de neurotransmissores dos axônios para os dendritos. Esse gene está localizado no cromossomo 8p21 e é frequentemente alterado em cânceres. A diminuição da expressão devido há hipermetilação já foi associado à resistência a quimioterapia baseada em platina e a reativação leva a sensibilidade com envolvimento da via mTOR. Essa proteína está diminuída em linhagem de GBM humano U87 e U251. Além disso, a superexpressão dessa

proteína leva a diminuição da expressão de ALDH1, CD44, CKIT, KLF4, Nanog, NES e SOX2, enquanto o silenciamento produz efeito oposto. A expressão dessa proteína também leva a diminuição da proliferação e invasão e ao aumento da sensibilidade das células de GBM a temozolomida (TMZ) por regular fatores de resistência e de tronquicidade (Wang *et al.*, 2015).

Outro gene altamente expresso no sistema nervoso central que pode ser utilizado como marcador de células-tronco neuronais e tem sua expressão alterada em GBM é Musashi-1 (MSI1). Sua alta expressão está associada a gliomas de alto grau, com potencial para ser usado como marcador de prognóstico de sobrevida. A diminuição da expressão em células de câncer de cólon promove a regressão do tumor e a apoptose induzida por radiação. Em condições normais MSI1 ativa a via PI3K/AKT e leva à resistência a terapia por bloquear apoptose via AKT/IL6 em glioma (Chen, H. Y. *et al.*, 2016).

A cinase serina-treonina AKT, também chamada de proteína cinase B constitui um nodo central de grande interesse na fisiologia normal e patológica. São conhecidas três isoformas (AKT1, AKT2, AKT3), sendo AKT2 codificada por um gene localizado no cromossomo 19q13.2. Em gliomas humanos a ativação da via PI3K/AKT frequentemente está associada a alterações (mutações e perda de heterozigosidade) em PTEN ou com aumento de expressão de EGFR. Nos gliomas pediátricos de alto grau, a alta expressão de p-AKT está associada com o pobre prognóstico (Chautard *et al.*, 2014). A diminuição da expressão de AKT2 em linhagem U87 inibe a proliferação, induz apoptose e aumenta sensibilidade a teniposídeo, e a diminuição na linhagem U251 torna as células mais sensíveis a TMZ e a apoptose com aumento de caspase-3 e diminuição de Bcl-2, MGMT e MRP1 (Cui *et al.*, 2015).

Na seleção inicial de pacientes para o sequenciamento pelo TCGA, mutações em IDH1 apareceram como infrequentes comparadas a outras publicações, apenas 6% dos pacientes apresentaram a mutação IDH1<sup>R231H</sup>, enquanto nenhum apresentou a mutação R231G e apenas um apresentou a R132C; nenhum paciente apresentou mutação em IDH2. Nessa coorte o padrão de metilação de G-CIMP apareceu em todos os casos com mutação de IDH1<sup>R231H</sup> (Brennan *et al.*, 2013). Com o avanço dos sequenciamentos, melhora na técnica e aumento da amostra, ao final do projeto descobriu-se que essa mutação tem alta frequência, especialmente nos tumores astrocíticos e oligodendrogliais de grau II e III e GBM secundário e acontece em estágios iniciais. Essa mutação está associada com muitos parâmetros, alguns deles clinicamente relevantes, incluindo idade ao diagnóstico, combinação com deleção 1p/19q e ATRX, mutação em TP53, hipermetilação do promotor de MGMT e sobrevida do paciente. Mutações em IDH1 estão associadas a um prognóstico favorável em tumores de grau II. Seu valor como marcador pode ser inferido pelo rápido desenvolvimento e comercialização de anticorpo específico para a versão mutada IDH<sup>R132H</sup> para testes em secções de parafina. Embora a WHO defina como um teste fundamental na

classificação desses tumores, não é feito de rotina na maioria dos hospitais e laboratórios no nosso país; esse teste poderia ajudar no diagnóstico diferencial de oligodendrogliomas de baixo grau e anaplásicos (Brandner e Von Deimling, 2015).

Outra descoberta importante nos tumores de baixo grau foi a co-deleção dos braços cromossômicos 1p e 19q que é consistente entre os casos de oligodendrogliomas clássicos, ainda que demorou-se uma década para entender o valor preditivo e de prognóstico dessa alteração. Os testes, embora possam ser considerados essenciais ainda não fazem parte da rotina, em parte por serem laboriosos, mas também devido ao seu alto custo. Sabe-se que a resposta aos tratamentos de primeira linha para esse tipo tumoral, PCV (combinação de procarbazina, lomustina (CCNU) e vincristina) e TMZ, fortemente correlacionam com a deleção de 1p, enquanto que a resposta aos alquilantes de segunda linha é modesta mesmo em tumores com deleção de 1p/19q. O valor no prognóstico é relevante uma vez que a co-deleção está associada a maior sobrevida e melhor resposta a terapia (sobrevida de 7 anos no grupo com deleção contra 2,8 anos no grupo sem perda) (Brandner e Von Deimling, 2015).

O gene que codifica para MGMT localiza-se no cromossomo 10q26 e codifica para uma proteína de reparo de DNA capaz de reverter metilações da posição O<sup>6</sup> da guanina através de inativação suicida da proteína, com isso minimiza mutações e erros de replicação. Estudos clínicos já demonstraram que pacientes cujo tumor tem o promotor de MGMT metilado, tornando-o inativo, tem maiores chances de resposta frente a agentes alquilantes, pois nesses casos o tumor não é capaz de reparar os danos causados pelos quimioterápicos, o que leva a morte citotóxica das células principalmente por apoptose e resulta em maior tempo de progressão livre de doença e sobrevida total (Weller *et al.*, 2013). Alta atividade de MGMT nas células tumorais leva a um fenótipo resistente pela atenuação do efeito terapêutico dos agentes alquilantes, resultando em falha do tratamento (Hegi *et al.*, 2005).

Em 2005 um estudo clínico com 206 pacientes comparou a eficiência de TMZ (um agente alquilante descrito de maneira mais detalhada a frente) sozinha e combinada a radioterapia. Esse estudo reportou uma sobrevida média dos pacientes, quando apresentavam metilação no promotor de MGMT e eram tratados com a combinação, de 21,7 meses, contra apenas 15,3 meses quando esses pacientes eram tratados apenas com radioterapia. Entre os pacientes que não apresentavam metilação no promotor de MGMT a diferença entre os grupos (tratado com TMZ sozinha ou combinada com radioterapia) foi menor e não significativa. Esse estudo foi um dos pioneiros a demonstrar que pacientes com o promotor de MGMT metilado são capazes de se beneficiar do tratamento com TMZ (Hegi *et al.*, 2005). Quando metilações no promotor de MGMT foram comparadas com a resposta a terapia, esse status só foi capaz de distinguir resposta no subtipo clássico, e não nos demais (Brennan *et al.*, 2013). Metilações em dois

loais CpG específicos no promotor de MGMT são de grande relevância para prever a resposta a outros alquilantes, como no regime terapêutico PCV (Wick *et al.*, 2014).

A glicoproteína-P transmembrana pertence ao cassete de ligação ao ATP (ATP-binding cassette), uma superfamília de proteínas transportadoras de membrana, e é codificada por genes de 3 classes, divididos de acordo com a sua homologia e papel no fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR), sendo MDR1 o único gene humano envolvido na resistência (Santos e Paulo, 2013). A superexpressão do gene MDR1 é o mais notável evento mediador de resistência a quimioterápicos. Essa proteína é uma bomba dependente de energia que remove toxina e metabólitos internos da célula. Tumores com alta expressão de MDR1 são mais resistentes a agentes citotóxicos, principalmente se a expressão antes da quimioterapia já for alta. Entre os agentes citotóxicos que estão sob a resistência mediada por esse gene incluem-se as antraciclina, os alcalóides da vinca, os taxanos e os inibidores de topoisomerase (Page e Takimoto, 2008).

### 1.1.2.Tratamento

Ao longo das décadas o tratamento de gliomas se desenvolveu centrado principalmente em ressecção cirúrgica seguida por radioterapia, geralmente com associação de agentes quimioterápicos. Embora a radiação ionizante per si não tenha evoluído, a habilidade de focalizar o feixe e adaptá-lo ao contorno irregular do tumor, minimizando a dose em estruturas críticas próximas, melhorou consideravelmente com técnicas de baixa intensidade ou guiadas por imagem, sendo esse o tratamento com o maior impacto na sobrevida do paciente (Stieber e Mehta, 2007). Somado a ressecção e a radioterapia, quimioterápicos de várias classes e mecanismos de ação foram testados e utilizados na clínica para o tratamento desses tumores.

Agentes quimioterápicos podem atuar de diferentes maneiras no interior da célula, alguns induzem efeitos citotóxicos durante fase específica do ciclo celular. Antimetabólitos como fluoroacil (5-FU) e metotrexato são mais ativos contra a fase S do ciclo celular, enquanto alcalóides da vinca, epipodofilotoxinas e taxanos são relativamente mais específicos para a fase M. Essas diferenças cinéticas podem ser clinicamente relevantes na terapia de câncer, uma vez que agentes não específicos para o ciclo celular, como os alquilantes e os derivados de platina geralmente têm curvas dose-resposta linear (Malhotra e Perry, 2003). Em contraste, há agentes específicos para o ciclo celular, que geralmente tem um platô na curva dose-resposta, pois apenas a população de células que está passando por determinada fase do ciclo celular no momento será sensível à citotoxicidade induzida pelo quimioterápico. Na clínica,

esses últimos têm calendários de tratamento específico, pois a única maneira de aumentar o número de células afetadas é aumentar o tempo de exposição, já que o aumento da dose não surtirá maiores efeitos (Page e Takimoto, 2008) (Pazdur *et al.*, 2008).

Após administração do quimioterápico a resposta pode ser categorizada entre resposta total, parcial, mínima e progressão. A primeira é alcançada quando há o desaparecimento de todas as evidências da doença sem retorno por um intervalo específico, geralmente considerado de quatro semanas. A resposta parcial é obtida quando há uma redução de pelo menos 50% na soma dos produtos de pelo menos duas medidas dos maiores diâmetros da lesão e essa diminuição é mantida por pelo menos um ciclo da quimioterapia sem aparecimento de nova doença. A resposta mínima é menor que a parcial, sendo que muitas vezes nem chega a ser reportada em estudos clínicos. Progressão é quando há crescimento da doença existente ou aparecimento de uma nova lesão durante o curso do tratamento (Page e Takimoto, 2008).

Para o tratamento em tumores do SNC, a cirurgia ainda é a primeira e mais importante modalidade e vem sendo combinada com radioterapia nas últimas décadas. Diferentes agentes quimioterápicos adjuvantes foram testados, como é o caso da carmustina (BCNU), um agente que foi aprovado pelo FDA como primeira linha para tratamento desses tumores após ensaios clínicos de fase III demonstrarem benefícios no aumento da sobrevida de 11,6 meses no grupo tratado apenas com ressecção e radioterapia para 13,9 meses no grupo com a implantação dos polímeros biodegradáveis impregnados com o fármaco no local da ressecção seguida por radioterapia (Westphal *et al.*, 2003). Dois anos após a publicação, dados de um estudo de fase III com outro agente alquilante, TMZ, comprovaram aumento da sobrevida de 12 para 15 meses (Stupp *et al.*, 2005). Pela forma de administração, somada aos menores efeitos colaterais, a segunda droga tornou-se mais popular, constituindo a terapia padrão para pacientes com GBM juntamente com a ressecção cirúrgica e a radioterapia, seguidos por seis ciclos mensais de TMZ. Porém, não há aporte na literatura comparando os dois regimes terapêuticos (BCNU e TMZ).

#### 1.1.2.1. Nitrosuréias

Nitrosuréias são agentes alquilantes que atuam gerando ligações cruzadas do DNA. São altamente lipossolúveis, o que propicia sua passagem pela barreira hemato-encefálica. Antes da introdução da TMZ, esses agentes, principalmente carmustina e lomustina, eram utilizados em combinação com a radioterapia para a terapia padrão de gliomas. Ainda são utilizadas como segunda linha na terapia desses tumores e

em braços controle de estudos clínicos de novos agentes. Administração de múltiplos agentes com esse mecanismo de ação não é melhor que o uso de um único agente (Carrillo e Munoz, 2012).

A carmustina, ou também chamada BCNU, é uma nitrosuréia, um agente quimicamente instável, que se decompõe rápida e espontaneamente em dois metabólitos com grande reatividade: cloroetil diazohidróxido e isocianato. A natureza lipofílica das nitrosuréias facilita a passagem por membranas celulares, permitindo a rápida penetração na barreira hemato-encefálica e seu uso para o tratamento de uma variedade de tumores cerebrais (Page e Takimoto, 2008). A administração da carmustina é de maneira intravenosa, na concentração de 150 – 200 mg/m<sup>2</sup> a cada 6 – 8 semanas. Uma tentativa de contornar os efeitos colaterais sistêmicos foi o desenvolvimento de pastilhas impregnadas com 3,85% de BCNU colocados diretamente na cavidade deixada após a remoção cirúrgica do tumor, neste caso, o cirurgião adiciona até 8 pastilhas (Page e Takimoto, 2008). Apesar da alta capacidade de ultrapassar a barreira hemato-encefálica, sua efetividade clínica é limitada devido ao pequeno tempo de meia-vida (aproximadamente 20 minutos), a pequena fração da dose sistemicamente administrada que chega ao tumor em concentração efetiva e a toxicidade sistêmica (Westphal *et al.*, 2003).

Um estudo prospectivo feito entre 2005 e 2007 incluiu 22 pacientes com GBM recorrente, que foram submetidos a cirurgia com implantação de wafer de carmustina e tiveram o status de metilação de MGMT correlacionado com os melhores resultados. A PFS e as taxas de sobrevida total (OS) nos pacientes com metilação foram 8,9 e 14,2 meses respectivamente, comparado com 2,7 e 9,2 no grupo de pacientes sem metilação (Weller *et al.*, 2013). Os benefícios clínicos e o perfil de segurança dos wafers variam entre tumor primário e recorrente, sendo que no segundo tipo a gliose pode evitar a difusão da droga pelo parênquima cerebral, diminuindo o acesso a população residual de células tumorais ao fármaco (Westphal *et al.*, 2003).

Lomustina, também denominada CCNU, é um quimioterápico oral altamente lipofílico, insolúvel em água, não-ionizável, que permite sua passagem pela barreira hemato-encefálica para tratamento de GBM. Quando combinada a terapia padrão de TMZ pode funcionar como adjuvante aumentando a sobrevida média (Carrillo e Munoz, 2012). Normalmente é administrada via oral a cada seis semanas na concentração de 130 mg/m<sup>2</sup> ou com dose ajustada dependendo da combinação com outro quimioterápico (Page e Takimoto, 2008).



### 1.1.2.2. Derivados da vinca

Alcalóides da vinca são anti-mitóticos e anti-microtúbulos derivados principalmente da planta *Vinca rosea* utilizados no tratamento de câncer. São uma classe de drogas com citotoxicidade ciclo celular específica que inibem a habilidade da célula se dividir por agir sobre a tubulina, impedindo a polimerização dos microtúbulos durante a fase M do ciclo celular (Pazdur *et al.*, 2008).

Vincristina é administrada por via endovenosa semanalmente na dose de 0,4 – 1,4 mg/m<sup>2</sup>, sendo a dose máxima total de 2 mg/semana e menor em casos de insuficiência hepática (Page e Takimoto, 2008).

A vimblastina é administrada na dose de 4 – 12 mg/m<sup>2</sup> por via intravenosa a cada 1 – 2 semanas, também sendo ajustada em casos de insuficiência hepática (Page e Takimoto, 2008). Embora a penetração na barreira hemato-encefálica não seja grande, uma vez que a concentração no líquido cérebro-espinhal 1 hora após a infusão é de apenas 16% daquela encontrada no plasma, o clearance nesse compartimento parece ser menor e a concentração após 72 horas é 50% daquela encontrada no plasma. O pico relatado é encontrado no plasma de um paciente 25 horas após o início da infusão na concentração de 5 ng/mL (Stewart *et al.*, 1983).

Vimblastina foi demonstrada em um estudo prospectivo de fase II como boa alternativa para o tratamento de glioma de baixo grau recorrente; nesse caso o tratamento semanal, além de barato apresentou baixa toxicidade e pode ser administrado por períodos prolongados. Sendo a sobrevida após 5 anos maior que 90%, com uma toxicidade controlável e majoritariamente hematológica (Bouffet *et al.*, 2012).

Mecanismos de ação adicionais já foram descritos para a vimblastina, como indução da transcrição de p53 e p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (Sato *et al.*, 2007).

### 1.1.2.3. Temozolomida

Temozolomida (TMZ) é uma imidazotetrazinona alquilante do DNA rapidamente absorvida após administração por via oral e hidrolisada, em pH acima de 7, no seu intermediário ativo 3-metil-(triazen-1-il)imidazol-4-carboxamida (MTIC), o qual é naturalmente degradado ao íon metilante diazônio e ao metabólito inativo 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) dentro das células. O principal efeito é a produção de adutos de DNA resultantes da transferência de grupos metil do íon metil diazônio para a posição N7 da guanina (~70% dos adutos), para as posições N1 e N3 da adenina e N3 da citosina (~25% dos adutos), e para a posição O<sup>6</sup> da guanina (~5% dos adutos). Todos os grupamentos metil transferidos aos átomos de nitrogênio são rapidamente reconhecidos e reparados pelo mecanismo de reparo por excisão de base (BER), minimizando assim os efeitos citotóxicos de aproximadamente 95% das lesões. Os

efeitos citotóxicos gerados pelos adutos na posição O<sup>6</sup> da guanina (O<sup>6</sup>-MeG) são reparados por outro sistema, baseado na atividade da O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT). Se a atividade dessa enzima for baixa ou inexistente O<sup>6</sup>-MeG é mantido e pareia erroneamente com a timina durante a replicação do DNA. Esse mal pareamento, pode em último caso, ser reconhecido e reparado pelo sistema de reparo de mal pareamento (Mismatch Repair, MMR) na nova fita de DNA, gerando ciclos fúteis de reparo que podem levar a quebras na dupla fita e conseqüentemente a morte celular programada (Programmed cell death, PCD). Sendo assim, a atividade da TMZ é dependente da baixa atividade de MGMT e BER e atividade proficiente de MMR (Lee, 2016). Além disso, as células precisam passar pela fase S do ciclo celular para que os adutos sejam incorporados e precisa ter correta sinalização apoptótica.

Um dos estudos clínicos mais importantes conduzidos e que marcou o uso desse quimioterápico como padrão ouro para o tratamento de GBM foi conduzido por Stupp e colaboradores em 2005. Esse estudo randomizou 573 pacientes provenientes de 85 centros em dois grupos: um deles recebeu apenas radioterapia fracionada em 2 Gy por dia, 5 dias por semana, por 6 semanas, totalizando 60 Gy; o outro grupo recebeu, além da radioterapia, TMZ diária na concentração de 75 mg/m<sup>2</sup> de superfície corporal durante as 6 semanas de irradiação, e depois mais 6 ciclos de TMZ administrada por 5 dias com pausa de 23 dias sem administração (em um esquema denominado “5 on – 23 off”). Esse estudo clínico demonstrou que adicionar o quimioterápico no tratamento aumenta a sobrevida de 12,1 meses para 14,6 e que a sobrevida após 2 anos no grupo tratado com quimio e radioterapia foi de 26,5% contra apenas 10,4% no grupo tratado apenas com radioterapia (Stupp *et al.*, 2005).

Diferentes ensaios clínicos de fase II mostraram que a toxicidade de regimes de dose densa, independente do cronograma, parece ser igualmente distribuída entre os graus 1 – 4, sendo maior que a toxicidade encontrada no regime padrão 5 on-23 off, principalmente devido a linfocitopenia severa. Além disso, estudos de fase II mostraram que a linfocitopenia em geral acontece principalmente no regime 21 on-7 off (Weller *et al.*, 2013).

Alguns estudos de fase I e II testaram a eficácia e segurança da combinação da TMZ com outros fármacos tais como bevacizumabe, nitrosuréias, interferon, irinotecano, doxorubicina peguilhada, cisplatina, capecitabina e sorafenibe. De maneira geral, esses estudos falharam em demonstrar que a combinação é melhor que a TMZ ou bevacizumabe sozinhos (Weller *et al.*, 2013).

O estudo clínico que demonstrou benefícios do uso da TMZ (Stupp *et al.*, 2005) também coletou dados sobre o status de metilação da região promotora do gene MGMT (cuja função já foi descrita na seção anterior, página 25) e na mesma edição do NEJM, demonstrou-se que a combinação de TMZ e radioterapia tem efeito máximo no grupo de pacientes que apresentavam essa região metilada (Hegi *et*

*al.*, 2005). Esses resultados indicavam que a adição de inibidores dessa enzima poderia beneficiar os pacientes com maior expressão, e conseqüente maior reparo, mas até o momento estudos clínicos falharam em demonstrar essa relação (Warren *et al.*, 2012).

#### 1.1.2.4. Inibidores da topoisomerase

Inibidores da topoisomerase foram amplamente estudados por existir grande similaridade de sequências entre topoisomerasas de eucariotos e procariotos, sendo os achados importantes tanto no ramo da microbiologia quanto da oncologia. Inibidores de topoisomerase eucariótica 1B são divididos entre campotencinas e não-campotencinas devido a sua primeira identificação. Campotencinas agem como inibidores que previnem a re-ligação das fitas de DNA quebradas, estabilizando o complexo DNA-enzima, levando a danos ao DNA e conseqüente indução de morte celular. Pertencem a essa classe produtos naturais, extraídos da planta *Camptotheca acuminata*, e os derivados sintéticos irinotecano e topotecano. Algumas características limitam seu uso, como a insolubilidade em água e a tautomerização para o estado carboxilado inativo em pH fisiológico, além de formação de complexo de clivagem altamente instáveis (Bansal *et al.*, 2017).

Irinotecano (CPT-11) é administrado de maneira intravenosa na concentração de 125 mg/m<sup>2</sup> durante 90 minutos uma vez por semana por quatro semanas, com intervalo de duas semanas; ou na concentração de 350 mg/m<sup>2</sup> a cada 21 dias (Page e Takimoto, 2008). É administrado como uma pró-droga que é altamente metabolizada por enzimas carboxilesterases do fígado ao metabólito ativo 7-etil-10hidroxicamptotencina (SN-38). Anticonvulsivantes, normalmente administrados concomitante no tratamento de gliomas, diminuem a sua biodisponibilidade por competição do metabolismo hepático (Carrillo e Munoz, 2012). Estudo de fase II não encontrou efeito aditivo quando utilizado como adjuvante a TMZ (Quinn *et al.*, 2009). Outro estudo de fase II em combinação com bevacizumabe apresentou um tempo de PFS de 24 meses (Vredenburgh *et al.*, 2007), mas a OS não foi maior do que com administração de bevacizumabe sozinho (Friedman *et al.*, 2009).

Existem ainda inibidores da topoisomerase II, que são classificados como intercalantes (ex: doxorubicina e mitoxantrona) e não intercalantes (ex: etoposídeo e teniposídeo). Antraciclinas como a doxorubicina são inibidores potentes, contudo exibem atividade mielosupressora e cardiotoxicidade como efeitos colaterais (Bansal *et al.*, 2017).

O etoposídeo inibe a topoisomerase do tipo II, estabilizando o complexo DNA-enzima, impedindo a re-ligação do DNA, agindo principalmente em TopoII $\beta$ . É um fármaco que começou a ser utilizado em

estudos clínicos ainda na década de 70 e já foi testado contra muitos tipos de câncer, incluindo pulmão, mama, colorretal, hematológicos, etc (Fulton *et al.*, 1996). Entre a década de 90 e 2010 foi testado como adjuvante nas terapias para gliomas, que confirmaram segurança para esse uso quando administrado de maneira metronômica (em baixas doses constantes), porém o aumento na sobrevida é o mesmo conferido com bevacizumabe sozinho ou em combinação com irinotecano e a toxicidade é maior, desencorajando seu uso (Reardon *et al.*, 2009).

#### 1.1.2.5. Outros agentes alquilantes

Agentes alquilantes tem efeito citotóxico por formarem ligações covalentes com os grupos amino, carboxil, sulfidril e fosfato de moléculas biológicas importantes, principalmente no DNA, RNA e proteínas, sendo o nitrogênio na posição 7 da guanina no DNA particularmente suscetível a alquilação. Esses agentes dependem da proliferação celular para sua atividade, embora não sejam específicos para nenhuma fase do ciclo celular. A resistência a essa classe de agentes deve-se principalmente a eficiência da conjugação com a glutatona ou por melhora nos mecanismos de reparo de dano ao DNA. Embora atuem por diferentes mecanismos de ação, essa classe inclui nitrogênio mostarda, nitrosuréias, complexos derivados de platina, etc (Page e Takimoto, 2008).

Agentes alquilantes platinantes como a cisplatina (CPPD) são formados por um complexo inorgânico contendo um metal pesado com atividade típica de um agente alquilante não dependente da fase do ciclo celular. Esse composto produz ligações cruzadas (*cross-links*) intra e entre fitas de DNA e forma adutos que inibem a síntese de DNA, RNA e proteínas. CPPD é normalmente administrada via intravenosa na concentração de 50 mg/m<sup>2</sup> (ou mais) a cada 3 semanas ou 20 mg/m<sup>2</sup> diariamente por 4 – 5 dias a cada 3 – 4 semanas. Em todos os casos é importante que o paciente receba uma grande hidratação antes e depois a quimioterapia (Page e Takimoto, 2008). Seu uso no tratamento de tumores cerebrais decorre da habilidade de cruzar a barreira hemato-encefálica e já foi amplamente testada como adjuvante para outros agentes. Estudos de fase II em combinação com BCNU e radioterapia mostram aumento da sobrevida média dos pacientes, mas com toxicidade considerável (Carrillo e Munoz, 2012).

Procarbazina (PCZ) é um agente alquilante não clássico que pertence à família da dacarbazina e hexametilamina e contém um grupamento N-metil essencial para a sua atividade. Foi primeiramente sintetizada no final dos anos 50 como inibidor de monoaminaoxidase e só depois sua atividade anticâncer foi descrita. Ao longo dos anos já foi utilizada para o tratamento de diversos cânceres, incluindo linfoma (Hodgkin, não-Hodgkin e nos primários de SNC), tumores cerebrais, mieloma múltiplo, melanoma maligno

e carcinoma pulmonar (Armand *et al.*, 2007). Como agente único é administrada na concentração de 4 – 6 mg/kg/dia via oral até a resposta máxima (Page e Takimoto, 2008). Em combinação, pode ser administrada juntamente com bleomicina, etoposídeo, doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina e prednisona no regime BEACOPP para tratamento de linfoma de Hodgkin ou juntamente com lomustina (CCNU) e vincristina (VC) no regime PCV (PCZ+CCNU+VC) para o tratamento de gliomas (Armand *et al.*, 2007).

O mecanismo de ação da PCZ não é totalmente entendido mas sabe-se que interfere na síntese de DNA, RNA e proteína, provavelmente por inibir a transmetilação dos grupos metila na metionina do t-RNA, levando a perda da função desse RNA e parada da síntese de proteína. Além disso, esse agente pode sofrer auto-oxidação, gerando peróxido de hidrogênio que pode atacar os grupos sulfidril das proteínas diretamente ligadas ao DNA na fase S e G2 do ciclo celular. A resistência ao fármaco provavelmente é mediada pela atividade de MGMT e deficiência de MSH2 (Armand *et al.*, 2007).

O tratamento combinado entre PCZ, CCNU e VC (PCV) foi, e ainda é, utilizado para o tratamento de astrocitoma anaplásico. Alguns estudos demonstraram, nas últimas décadas, que o regime de tratamento PCV não tem grandes efeitos em aumentar a sobrevida do paciente, principalmente quando comparado com os novos regimes adotados, portanto esse regime se tornou uma tendência no tratamento de tumores recorrentes, em especial para gliomas de menor grau (Armand *et al.*, 2007).

#### 1.1.2.6. Outros agentes anti-microtúbulos

Paclitaxel (PTX) é um derivado semissintético com um novo anel de taxano. Diferente dos alcalóides da vinca, os taxanos promovem a montagem e estabilidade dos microtúbulos, bloqueando o ciclo celular na mitose. O PTX é administrado por via intravenosa na concentração de 135 – 175 mg/m<sup>2</sup>, sendo que o tempo de infusão pode demorar entre 3 – 96 horas, a cada três semanas. Também pode ser administrado na concentração de 80 mg/m<sup>2</sup> toda semana (Page e Takimoto, 2008). A resistência aos taxanos normalmente está ligada a superexpressão de  $\beta$ III-tubulina em alguns cânceres epiteliais. Essa isoforma é expressa particularmente por células do SNC e sua expressão em outros tecidos já foi associada a um fenótipo aberrante, mais agressivo e clinicamente não favorável. Em gliomas (incluindo astrocitomas difusos e oligodendrogliomas) a expressão de  $\beta$ III-tubulina é aumentada nos tumores de maior grau (Katsetos *et al.*, 2011).

### 1.1.3. Novas abordagens terapêuticas

Terapias alvo-dirigidas, como por exemplo feita com anticorpos monoclonais, tem se popularizado nos últimos anos para diversos tipos de câncer, gerando um amplo espectro de resultados contra diferentes alvos (Dutoit *et al.*, 2016). Para GBM, um grande número de estudos concentra-se na administração de bevacizumabe, um anticorpo monoclonal humanizado anti-fator de crescimento endotelial vascular (anti-VEGF), que age sobre a angiogênese. Quando combinado com TMZ em pacientes recém diagnosticados, ou seja, como primeira linha de tratamento, não foi capaz de aumentar a sobrevida total dos pacientes; a melhora conferida no tempo de PFS não atingiu os níveis desejados e resultou em alguns efeitos colaterais (Gilbert *et al.*, 2014).

Além dos anticorpos monoclonais, outras abordagens visam atacar o sistema imune, seja pela exposição de células dendríticas a múltiplos sinais ou pela utilização de uma vacina anti-EGFRvIII. Essa última abordagem, denominada Rindopepimute, foi demonstrada satisfatória no estudo ACTIVATE de fase II combinada à TMZ (ACTIVATE II), com uma sobrevida de 21,8 meses (Choi *et al.*, 2009). O estudo de fase III com Rindopepimute foi descontinuado em março de 2016 após a segunda análise parcial demonstrar falha em aumento da sobrevida comparado ao padrão (20,1 vs 20 meses) (Elsamadicy *et al.*, 2017).

Outra estratégia imunológica para o tratamento é a utilização de um anticorpo que inibe o receptor de morte programada 1 de célula T (PD-1) ou o seu ligante (PD-L1), dentro do tumor, essa ligação induz um escape imunológico, tendo um papel crítico sua iniciação e desenvolvimento (Xue *et al.*, 2017). O inibidor de PD-1 (pembrolizumabe) já levou a respostas satisfatórias em pacientes com melanoma avançado, câncer de pulmão de não pequenas células e carcinoma renal (Polivka *et al.*, 2017). Em gliomas, um estudo clínico foi iniciado em 2014, mas ainda não apresenta resultados parciais (NCT02017717).

#### 1.1.3.1. Mebendazole

Bizimidazol é uma classe de moléculas que compreende agentes parasitários como albendazol e mebendazol (MBZ). Esses dois já foram descritos também com atividade anti-tumoral, uma vez que seu mecanismo de ação consiste em bloqueio da formação da cadeia de tubulina. MBZ faz parte de uma lista de fármacos que vem sendo repropostos nos últimos anos com ação sinérgica com outros e capacidade de ultrapassar a barreira hemato-encefálica (Pantziarka *et al.*, 2014).

Normalmente é administrado por via oral em comprimidos mastigáveis na dose de 100 – 200 mg/dia por três dias para tratamento agudo de parasitoses, mas que podem ser ingeridos por longos períodos (3 a 6 meses) em concentrações de 40 – 50 mg/kg/dia, como no caso do tratamento de equinococose cística. Apenas cerca de 20% da dose oral atinge a circulação sistêmica, e quando comparase administração aguda com crônica a concentração plasmática pode dobrar ou triplicar na última forma. Em pacientes em tratamento para hidatidose, uma única ingestão (das 4 administrações diárias) é capaz de gerar um pico plasmático de 0,47  $\mu$ M. De maneira geral, mesmo em longas administrações, é bem tolerado e com poucas reações adversas, que quando acontecem são pontuais em alguns pacientes (Pantziarka *et al.*, 2014).

Em 2002 já foi demonstrado que MBZ induz apoptose de maneira dose e tempo dependente em linhagens de células de pulmão, após parada em G2-M, sem efeito em células normais (HUVEC e fibroblastos WI38). Os mesmos autores confirmaram que esse fármaco é capaz de inibir o crescimento de carcinomas de mama, ovário e cólon e osteosarcomas. Em todos os experimentos, o IC50 utilizado foi inferior a concentração plasmática máxima (Mukhopadhyay *et al.*, 2002). Em linhagens de câncer de pulmão, induz parada em mitose, seguida de apoptose, através de ativação de caspase e liberação de citocromo c, além de aumentar a despolimerização da tubulina (Sasaki *et al.*, 2002). Um estudo em melanomas mostrou que células de melanoma, mas não melanócitos, entram em apoptose após esse bloqueio, sugerindo que, nesse tipo celular, mecanismos de reparo ao dano estão envolvidos principalmente via fosforilação e inativação de Bcl-2 (um mediador chave de dano à microtúbulo) (Doudican *et al.*, 2008) e diminuição de XIAP (Doudican *et al.*, 2013) *in vitro* e *in vivo*.

A descoberta do efeito anti-tumoral de MBZ em GBM aconteceu em partes devido ao acaso em 2011. Após sucessivas falhas no estabelecimento de tumores em colônias de animais tratados para infecções parasitárias com fenbendazole, Bai e colaboradores testaram os efeitos de uma gama de benzimidazoles *in vitro* contra linhagens de GBM; MBZ e albendazol (ABZ) apresentaram os melhores resultados entre eles. MBZ foi utilizado para ensaios *in vivo* e foi demonstrado um aumento de sobrevivência em dois modelos animais testados (gliomas singênicos, com GL261, e xenográficos ortotópicos, utilizando linhagem de GBM humano com neuroesferas semelhantes a células-tronco) (Bai *et al.*, 2011).

Atualmente existem três estudos clínicos de fase I registrados para o tratamento de tumores do sistema nervoso central com esse fármaco: dois deles em combinação com TMZ, sendo um para tratar GBM (NCT01729260) e outro para tumores cerebrais pediátricos recorrentes/progressivos (NCT02644291); e um em combinação com vincristina, carboplatina, irinotecano e bevacizumabe que

inclui gliomas de alto e de baixo grau (NCT01837862). Até o momento nenhum deles apresentava resultados parciais (ClinicalTrials.gov foi acessado em abril de 2017)

### 1.1.4. Tratamentos de segunda linha/recorrência

Após o tratamento de primeira linha, muitos pacientes apresentam recorrência em 7 – 10 meses do início da terapia. Nesse momento, além da ressecção cirúrgica, que pode ser considerada para reduzir os efeitos do volume intracranial e permitir uma nova triagem histológica/molecular, terapias de resgate administradas incluem bevacizumabe, TMZ e outros agentes alquilantes, tais como nitrosuréias e carboplatina.

#### 1.1.4.1. Anticorpos monoclonais

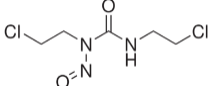
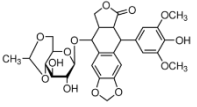
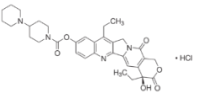
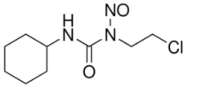
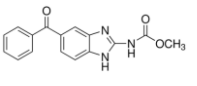
A imunoterapia foi recentemente incorporada na prática clínica: em 2011 com a aprovação do ipilimumab para melanoma metastático. Para gliomas, a imunoterapia apresentou-se promissora mas falhou em gerar resultados comparáveis a outros tumores, sendo que *EGFRvIII* tem sido considerado o alvo ideal, com bons resultados em estudos de fase II, mas requer resultados de fase III (Veliz *et al.*, 2015).

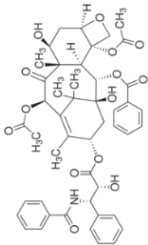
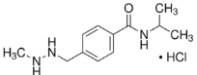
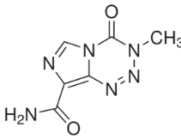
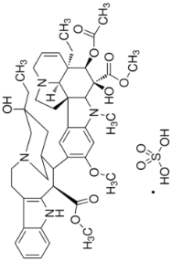
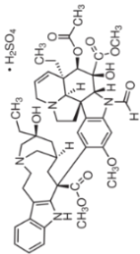
Embora o estudo clínico que incluía bevacizumabe como terapia de primeira linha tenha falhado (Gilbert *et al.*, 2014), diversos países já aprovaram seu uso na recorrência, uma vez que nestes casos estudos de fase II mostraram melhora dos sintomas e resposta radiológica de 30% com aumento no PFS e na sobrevida total (Kreisl *et al.*, 2009; Veliz *et al.*, 2015). Uma meta-análise revisando artigos até agosto de 2016 reportou resultados de oito estudos clínicos randomizados controlados, com mais de dois mil pacientes, sendo que a média do tempo de progressão livre de doença foi maior nos grupos tratados com bevacizumabe do que na terapia padrão, sem diferenças significativas na sobrevida total. Nesses pacientes, a taxa de sobrevida 6 meses após o diagnóstico é maior no grupo tratado com bevacizumabe, mas a taxa aos 36 meses é maior na terapia padrão (Li *et al.*, 2016).

Um resumo das concentrações plasmáticas dos fármacos discutidos até o momento e que foram utilizados para gerar os resultados apresentados nesse trabalho está apresentado na tabela 1. Essa tabela também apresenta o peso molecular, a abreviação nesse trabalho, o nome comercial, estrutura molecular, alvo terapêutico, concentração plasmática atingida em pacientes reportada na literatura e concentrações utilizadas para esse trabalho *in vitro*.



Tabela 1: Quimioterápicos com uso em GBM utilizados para tratamentos in vitro nessa tese

Princípio ativo Nome comercial	Alvo terapêutico	Fórmula química	Concentração plasmática	Concen- trações utilizadas
Carmustina (214,05 g/mol) BCNU, Becenun	Alquilante de DNA		27 ng/mL 4 horas após implantação dos waffers (Bota <i>et al.</i> , 2007), 1 – 10 µg/ml (Garattini e Shore)	5 e 10 µg/mL = 23,36 e 46,73 µM
Cisplatina (300,05 g/mol) – CPPD Platinil	Agente alquilante independente do ciclo celular	$Pt(NH_3)_2Cl_2$	1,5 µg/ml ((Riva <i>et al.</i> , 2000; Urien <i>et al.</i> , 2005)) até 4 µg/ml ((Siegel-Lakhai <i>et al.</i> , 2005) (Watanabe <i>et al.</i> , 2003))	2,5 µg/mL = 8,33 µM e 5,0 µg/mL = 16,66 µM
Etoposídeo (588,56 g/mol) - ETO Vepesid, Evoposdo, Eposido	Inibidor da topoisomerase II dependente da passagem pela fase G2-S		7 - 10,5 µg/mL (Kiya <i>et al.</i> , 1992)) = 11,89 – 17,84 µM	10 e 30 µg/mL = 17 e 50,97 µM
Irinotecano (623,14 g/mol) - IRINO Evoterin, Biotecan, Camptosar	Inibidor de topoisomerase		0,18 µg/mL = 0,29 µM (Chen <i>et al.</i> , 2012); 2,1 µg/mL = 3,37 µM (Horita <i>et al.</i> , 2010); 1,47 µg/mL = 2,36 µM (Younis <i>et al.</i> , 2009)	0,15 e 1,5 µg/mL = 0,24 e 2,4 µM
Lomustina (233,70 g/mol) CCNU, Citostal	Alquilante de DNA, também gera crosslink		9 µg/ml = 38,5 µM (Lee <i>et al.</i> , 1985) ou 1– 2 µg/ml = 4,28 – 8,56 µM (Kastrissios <i>et al.</i> , 1996)	0,9 e 9 µg/mL = 3,85 e 38,5 µM
Mebendazole (295,29 g/mol) – MBZ Mebendazol	Agente anti- microtúbulo (impede a polimerização)		17,5 a 500 ng/mL, sendo a média 69,5 – se for crônico 137,4 (Braithwaite <i>et al.</i> , 1982)	0,5 µg/mL e 5 µg/mL = 16,93 µM

<p>Paclitaxel (853,91 g/mol) – PTX</p> <p>Taxol, Tarvexol, Chemiplac, Evotaxel</p>	<p>Agente anti-microtúbulo (estabiliza e impede a despolimerização)</p>		<p>2,17 – 3,65 µg/mL = 2,54 – 4,28 µM após infusão intravenosa de 135 - 175 mg/m<sup>2</sup> (CID = 44155032); liquor = 45,5 – 162 pg/mL após administração de semanal de 60 mg/m<sup>2</sup> (= 190 pM) (Gelderblom <i>et al.</i>, 2003)</p>	<p>0,1 e 1 µM</p>
<p>Procarbazina (257,76 g/mol) – PCZ</p> <p>Indicab, Neozine</p>	<p>Agente alquilante específico para a fase S do ciclo celular</p>		<p>540 ng/ ml (He <i>et al.</i>, 2004)= 2,1 µM; 692 ng/mL (Preiss <i>et al.</i>, 2006)= 2,7 µM</p>	<p>0,38 e 3,8 µM</p>
<p>Temozolomida (194,15 g/mol) – TMZ</p> <p>Temodal</p>	<p>Alquilante de DNA: metilação na posição N7 da guanina, O3 da adenosina e/ou O6 da guanina</p>		<p>0,10 - 13,99 µg/mL no plasma e 0,16 -1,93 no líquor (Ostermann <i>et al.</i>, 2004); 13,9 µg/mL (Brada <i>et al.</i>, 1999) = 70,56 µM após administração de 200 mg/m<sup>2</sup>, t<sub>½</sub> = 1,8 horas</p>	<p>30, 50 e 100 µM</p>
<p>Vimblastina (909,05 g/mol) – VBL</p> <p>Velban, Vinatin</p>	<p>Anti-microtúbulo que se liga ao fuso mitótico levando a “cristalização”, parada no ciclo e morte, específico da metáfase</p>		<p>2,3 ng/mL após 5 horas do início da infusão, podendo chegar a 5,0 ng/mL 25 horas após o início da infusão (Stewart <i>et al.</i>, 1983)</p>	<p>0,55 µM = 0,5 µg/mL</p>
<p>Vincristina (923,04 g/mol) – VC</p> <p>Oncovin, Vincrisan</p>	<p>Anti-microtúbulo com o mesmo mecanismo da vimblastina mas também com efeito imunossupressor</p>		<p>40,5 ng/ml = 43,88 nM mas rapidamente diminui para 5 ng/ml = 5,42 nM (Groninger <i>et al.</i>, 2005)</p>	<p>50 e 100 ng/mL = 54,17 e 108,34 nM</p>

### 1.1.5. Farmacogenômica

Farmacogenômica é uma área que se apresenta promissora, uma vez que biomarcadores genéticos mostram sucesso como preditores de resposta à droga e de reações adversas. Esses marcadores podem ser utilizados na clínica para a escolha do fármaco de acordo com a genômica do paciente e/ou do tumor, levando a otimização da dose e do quimioterápico (Agundez *et al.*, 2014). A informação gerada por esse tipo de análise pode ser usada na prática clínica de diversas maneiras. A mais conservativa visa estratificar populações de pacientes em grupos que devem ou não receber determinado fármaco. Um passo além disso seria utilizar essas informações como biomarcadores de resposta clínica, com ajuste de dose dependente dos resultados genômicos, monitoramento da resposta à terapia e vigilância da evolução clínica do paciente. Um terceiro passo seria utilizar essa abordagem como substituta para o monitoramento da evolução do paciente, porém alguns autores sugerem que esse passo seria quase surreal (Agundez *et al.*, 2014).

Quando os testes de farmacogenômica são incorporados a rotina deve-se ter em mente que os testes genotípicos são um substituto de um status metabólico ou de uma resposta clínica de um determinado indivíduo, com uma determinada droga, a uma determinada dose, em uma situação particular e que muitas outras variáveis podem influenciar o efeito no paciente, como relações de genótipo-fenótipo, gene-concentração e gene-dose. Deve-se atentar também para a variabilidade étnica, uma vez que testes genotípicos nem sempre estão disponíveis para todas as populações humanas. Incertezas da correlação *in vivo* x *in vitro* também derivam do fato da ocorrência de processos de indução e inibição, que podem modificar a atividade independente do genótipo. Além disso, o fenótipo pode ser alterado por outros fatores, incluindo condições ambientais, progressão da doença, terapia concomitante com outros fármacos, etc (Agundez *et al.*, 2014).

Na última década, estudos conduzidos por Gleeleher e colaboradores encontraram um modelo de predição de sensibilidade a fármacos baseado no sequenciamento do genoma completo, onde a expressão de cada gene contribui pelo menos em parte para a predição final. Segundo resultados desse grupo, a expressão gênica pode substituir a medida de outros fenótipos que são diretamente relevantes para a sensibilidade e capturar tanto aspectos da linhagem parental quanto variações específicas do tumor (Gleeleher *et al.*, 2014).

## 1.1.6. Resistência à terapia

A rapidez com que as células cancerosas se tornam resistentes é surpreendente. Utilizando amostras provenientes de um estudo clínico, um grupo demonstrou que há uma considerável diferença entre as células obtidas antes e depois de quatro ciclos da quimioterapia, refutando a hipótese de que a resistência acontece devido ao crescimento de um clone mutado. Nesse experimento foi mostrado que a quimiosensibilidade é governada pela expressão relativa de mecanismos de sensibilidade e resistência, determinados tanto pela genética quanto por fatores ambientais dos tumores. Inicialmente alguns tumores se apresentam sensíveis ao tratamento, mas uma vez que essas células são eliminadas, as remanescentes podem crescer de maneira a não responder a uma variedade de drogas. Essa resistência extrema pode então ser explicada tanto por mutações quanto por alterações de expressão (não mutacional e não genético) (Cree e Charlton, 2017).

### 1.1.6.1. Mecanismos moleculares de resistência

A rápida resistência adquirida por células tumorais à quimioterapia tem sido um dos maiores empecilhos para o sucesso das terapias anticâncer. Estudos buscando bases moleculares para tal revelaram inúmeros mecanismos envolvidos, tais como efluxo de fármaco, aquisição de mutantes deficientes do alvo para ligação da droga, ou mudança para vias de sobrevivência alternativas. Além disso, estudos sugerem que a resistência pode ser independente de mutações e/ou epigenética, principalmente nos casos em que uma pequena população, denominada inicialmente como células tronco-tumorais (CSC) e mais recentemente como células tumorais tolerantes a droga, apresenta características importantes de resistência, tais como aumento de proteínas envolvidas no efluxo de drogas (Sharma *et al.*, 2010).

Nos tumores, muitas dessas alterações genéticas são silenciosas e não funcionais, sem papel significativo na resposta a terapia, outras são geradas por mutações *driver*, em genes como HER2, EGFR, PIK3CA e análises recentes revelam a coexistência de diferentes subclones geneticamente distintos. Essas observações têm implicações na prescrição de terapias baseadas na tipagem molecular, baseada em uma pequena amostra, indicando a necessidade de uma compreensão maior do perfil oncogênico de eventos *driver* em todo o tumor (Rybinski e Yun, 2016). A coexistência de diversos subclones pode estar ligada a entrada das células em um estado persistente de tolerância à droga no qual há pouco ou nenhum crescimento populacional inicial e após algum tempo (semanas a meses) uma fração resistente ganha a habilidade de crescer mesmo na presença do fármaco e dão origem a uma progênie que é tão sensível à exposição quanto os ancestrais (Sharma *et al.*, 2010).

Embora nem toda resistência esteja associada a mutações, vale ressaltar que os GBMs recorrentes a partir de LGG após o tratamento com agentes alquilantes, como a TMZ, apresentam os níveis de carga mutacional associada a subclonalidade mais elevados, mas com poucos clones. Nesse caso a quantidade de mutações subclonais pode ser diretamente ligada as mutações induzidas pela terapia através da deficiência na maquinaria de reparo por mal pareamento (Mcgranahan e Swanton, 2017).

#### 1.1.1.1.Mecanismos celulares de resistência

A resistência a terapia é o maior desafio para melhorar o prognóstico do paciente uma vez que tratamentos anticâncer são capazes de eliminar a maioria das células tumorais normais, mas encontram dificuldade contra CSC. Essa população tronco apresenta algumas características celulares que a diferencia do restante da massa tumoral e, com pequena variação de denominação entre os autores, provou-se que está associada a recorrência após o tratamento (Osuka e Van Meir, 2017). A literatura cita alguns principais mecanismos celulares que auxiliam essa evasão, como heterogeneidade, aumento de bombas de efluxo de droga, aumento de reparo no DNA, apoptose e autofagia anormais, além disso pode ocorrer redução de ativação de pró-drogas ou aumento da inativação (Pan *et al.*, 2016; Lei *et al.*, 2017). Um dos motivos para se acreditar em mecanismos não-mutacionais que justificam a resistência encontra-se no fato de que o retratamento é capaz de eliminar uma quantidade significativa de células remanescentes da primeira rodada, como já foi demonstrado em câncer de pulmão de não-pequenas células (NSCLC) tratados com inibidores de EGFR (Sharma *et al.*, 2010).

CSC apresentam aumento de transportadores ABC, que são proteínas de transporte de membrana que bombeiam agentes quimioterápicos para fora da célula. Esse mecanismo de expulsão de drogas superativo permite a distinção e isolamento dessas células por citometria de fluxo; uma vez que CSC expulsam melhor os corantes que outras células, elas não são marcadas, aparecendo nos gráficos em uma região denominada "Side population". Caso a droga invada a célula, ultrapassando o mecanismo de resistência anterior, enzimas intracelulares que inativam fármacos entram em ação, gerando uma segunda frente de resistência. Nas CSC pode ocorrer tanto a diminuição de enzimas que transformariam a pró-droga em droga, quanto aumento das enzimas que transformam o fármaco no seu metabólito inativo (Zhao, 2016).

Quando a droga já entrou na célula e causou lesão, um mecanismo que pode entrar em ação é a autofagia. Esse pode levar a destruição de componentes citoplasmáticos menos importantes, em resposta a pressão mecânica, terapêutica ou de metabólitos, promovendo a sobrevivência da célula. Alguns estudos mostram que inibidores da via de autofagia, como a cloroquina, podem sensibilizar as células a quimioterapia (Yan *et al.*, 2016; Zhao, 2016).

As células que tiveram todos os seus mecanismos de defesa e resistência abordados até agora burlados por algum quimioterápico, podem evitar os danos causados durante a replicação entrando em um estado de dormência ou quiescência. Uma vez que a maioria dos quimioterápicos, e a radioterapia, tem como alvo células em rápida proliferação, a ausência da passagem pela fase S pode evitar a ação de agentes alquilantes, por exemplo, com isso a quantidade de dano ao DNA, que poderia levar a PCD, será menor, mesmo que o aumento nas vias de reparo também exista como um mecanismo adicional em algumas células, especialmente nas CSCs. Estimular a rápida proliferação e inibir vias de reparo pode ajudar a sensibilizar essas células aos quimioterápicos visto que células com o DNA lesado geralmente entram em apoptose. Esse mecanismo de PCD elimina células doentes, envelhecidas ou indesejáveis, contudo, em células tumorais há um desbalanço nessa via de sinalização, que é mais evidente em CSCs. Em resposta a terapia, CSCs podem aumentar sua sinalização pró-sobrevivida ou anti-apoptótica e diminuir a sinalização pró-apoptótica, resistindo ao tratamento (Zhao, 2016).

A transição epitélio-mesenquimal (EMT) também pode ser vista como um mecanismo do qual as células tumorais fazem uso para evadir as terapias convencionais. Nesse escape há modificação de marcadores epiteliais, como E-caderinas e  $\beta$ -cateninas, para marcadores mesenquimais, como vimentina e fibronectina, acionados por vários tipos de fatores de transcrição induzidos por EMT, como Snail, Twist, e KLF8. As células que passam por essa transformação são mais aptas a se dissociar do tumor principal, capazes de migrar, invadir matrizes de membrana basal e envelopes vasculares e cair na circulação sanguínea para gerar metástases a distância. Recentemente essa alteração foi ligada às CSCs (Zhao, 2016).

Embora a autofagia tenha sido relatada acima como um mecanismo de resistência das células tumorais ao tratamento, sabe-se que esse processo celular tem papel duplo, e se acontecer em excesso pode levar as células a morte. Como supressora tumoral, a autofagia pode proteger da acumulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteínas ou organelas danificadas, mantendo a homeostase celular. Porém, uma vez que as mutações *driver* já aconteceram e o tumor estiver se estabelecendo, esse mesmo mecanismo pode protegê-lo de estresse externo e facilitar a sua sobrevivência (Filippi-Chiela *et al.*, 2013; Vessoni *et al.*, 2013). Por exemplo, há inibição de mTORC1 e Ulk1 que resultam na ativação da via autofágica no período hipóxico que antecede a angiogênese. Esse mecanismo também tem papel pró-tumoral participando do efeito Warburg e ajudando o desenvolvimento de metástases por bloquear a morte celular por anoikis. Durante o processo de autofagia, constituintes citoplasmáticos são englobados por uma dupla membrana formando o autofagossomo, esse se funde com o lisossomo dando origem ao autolisossomo, o conteúdo enclausurado é degradado por proteases lisossomais, principalmente

catepsinas. Algumas proteínas têm papel central nesse mecanismo e por isso são consideradas indicadores do fluxo autofágico, como a proteína associada a microtúbulos de cadeia leve 3 (Microtubule-associated proteins (MAPs) 1A/1B light chain 3 (LC3)) e a proteína ligadora de ubiquitina p62 (sequestrossomo 1, p62). LC3-I é lipidada por ATG4 e covalentemente conjugada a membrana externa do autofagossomo tornando-se LC3-II, seu acúmulo representa autofagia inicial. Já p62 direciona agregados de proteínas poliubiquitinadas para o autofagossomo por se ligar a LC3-I, ambas são degradadas conforme o processo acontece. Isso significa que diminuições de p62 indicam estágios tardios da autofagia, enquanto que aumentos indicam inibição e consequente interferência na proliferação por interferência com a via NF- $\kappa$ B ou aumento de ROS. Um exemplo de inibidor dessa via é a cloroquina, um fármaco antimalárico, que previne a maturação do autofagossomo e inibe a degradação lisossomal (Bischof *et al.*, 2017). Um estudo clínico de fase II para avaliar sua eficácia em gliomas, combinada a TMZ e RTX, demonstrou uma sobrevida média de 15,6 meses nos pacientes que receberam também hidroxicloroquina e tiveram a autofagia inibida, porém a dose máxima demonstrou neutropenia e trombocitopenia de grau 3 e 4, enquanto a dose de 600 mg/m<sup>2</sup> não foi capaz de aumentar a sobrevida (Rosenfeld *et al.*, 2014).

## 1.2.CAPÍTULO II – ENSAIOS DE PREDIÇÃO À RESPOSTA *IN VITRO*

### 1.2.1.História da terapia personalizada em câncer

Tumores humanos são sistemas complexos formados por múltiplas classes de células malignas, além de células normais, estroma e linfócitos. Mesmo tumores classificados na mesma classe histológica tem grandes diferenças individuais em relação a espectro de resposta a fármacos (Hoffman, 1993). Além disso, sabe-se que esses tumores apresentam diferenças moleculares e de comportamento biológico, e que essas alterações acontecem tanto entre diferentes pacientes quanto em diferentes áreas do tumor de um mesmo paciente (Volm e Efferth, 2015).

A quimioterapia de tumores malignos atualmente baseia-se apenas em resultados de estudos prospectivos, randomizados, duplo cego de fase III e seus correspondentes protocolos clínicos (*guidelines*), ou seja, em análises de probabilidade de sucesso de determinada escolha. Esse tipo de conduta não leva em consideração a resposta individual de paciente baseado na heterogeneidade dos tumores (Volm e Efferth, 2015). Além disso, o modelo atual de escolha de quimioterapia não leva em consideração que o paciente pode ser submetido a um agente que além de não lhe causar nenhum benefício, ainda pode trazer efeitos colaterais (Von Hoff *et al.*, 1990).

Segundo alguns autores, a quimioterapia para câncer ainda trata diferentes doenças com os mesmos medicamentos, o que explica a falha em muitos pacientes. Para esses autores apenas a terapia baseada na individualidade de cada doença em cada paciente poderia ser resultar no tratamento adequado. Além disso, seria imprescindível saber quais drogas funcionariam apropriadamente quando administradas a um determinado paciente. Apenas com esse conhecimento o oncologista poderia utilizar das suas habilidades para receitar o melhor regime apesar dos efeitos colaterais (Ene e Holland, 2015; Perry e Wesseling, 2016; Weathers e Gilbert, 2016).

A ideia de que oncologistas poderiam aplicar testes *in vitro* para determinar o melhor tratamento, semelhante ao feito por microbiologistas, já é descrita na literatura há mais de 50 anos e relatos de tentativas de desenvolvimento de sistemas de predição *in vitro* se estendem até a década de 40 (Cline, 1969). Eagle chama a atenção em já em 1956 sobre a importância da correta escolha dos meios de cultura: que devem manter o mesmo aporte do tecido de vitaminas, sais minerais, glicose, aminoácidos e fatores de crescimento; e dos fármacos: cuja ativação e inativação do metabólito *in vitro* e *in vivo* devem ser semelhantes (Eagle e Foley, 1956).

Ao longo dos anos, diferentes tipos de teste foram utilizados para predição da resposta individual *in vitro*. Revisando a literatura, desde artigos anteriores a 1980 (Von Hoff e Weisenthal, 1980; Von Hoff, 1990) até 2015 (Volm e Efferth, 2015), podemos observar que há um consenso quanto a capacidade de predição de resistência ao tratamento, mas não de sensibilidade. Ou seja, testes *in vitro* conseguem prever quais fármacos não funcionarão em determinado tumor, mas ainda falham em apontar qual seria a melhor terapia entre todas disponíveis (Cree, 2013).

Nas primeiras décadas houve um grande foco em ensaio clonogênicos e diferentes protocolos foram desenvolvidos e melhorados em vários laboratórios. Porém, até a década de 90, quase 50 anos depois do início, mesmo com todas as melhoras, a relutância dos oncologistas em aceitar esse tipo de abordagem ainda era grande (Cramer e Woltering, 1991).

Em 2004 a ASCO publicou um artigo sistemático contemplando a revisão de 1139 resumos publicados entre 1966 e janeiro de 2004, dos quais, apenas 12 artigos se encaixavam em todos os padrões de ensaios de quimiosensibilidade e quimioresistência *in vitro* (CRSA). Naquele momento, a ASCO não recomendou o uso desse tipo de ensaios para influenciar a conduta do tratamento dos pacientes. Outrossim, recomendou que o oncologista deveria basear-se em resultados de estudos clínicos, status de saúde do paciente, e outras preferências para a conduta de tratamento (Schrag *et al.*, 2004). A revisão contemplou sete tipos diferentes de ensaio que serão descritos de maneira mais detalhada a frente, a citar: HTCA (*Human Tumor Cloning Assay*) CCS (*Capillary Cloning System*), DiSC (*Differential Staining*



*Toxicity*), MTT (*Methyl Thiazolyl-diphenyl-Tetrazolium bromide*), ATP (*Adenosine Triphosphate bioluminescence*), EDR (*Extreme Drug Resistance Assay*), SRCA (*Subrenal Capsule Assay*). Esse artigo gerou intenso debate na literatura, com vários artigos de revisão contestando essa recomendação.

Nessa mesma edição do *Journal of Clinical Oncology*, Samson e colaboradores publicaram uma revisão sistemática da literatura utilizando 11 artigos científicos que contemplavam os mesmos sete diferentes ensaios *in vitro* citados acima. Nesta revisão encontraram uma alta taxa de resposta nas terapias guiadas por testes *in vitro*, mas atribuem essa diferença a vieses experimentais e reiteram o fato de que não há evidências suficientes para dizer se essa abordagem é melhor do que a administração padrão da quimioterapia, outrossim, sugerem que sejam feitos mais ensaios clínicos randomizados (Samson *et al.*, 2004)

Em 2011 houve a publicação de uma nova revisão da literatura feita pela ASCO, contemplando 21 artigos que utilizaram CRSA entre dezembro de 2003 e maio de 2010 (Burstein *et al.*, 2011). Neste segundo momento a revisão da literatura também não conseguiu identificar, entre os estudos, evidências suficientes para suportar o uso de CRSA na prática clínica e a ASCO continua a não recomendar seu uso para a escolha da terapia pelo oncologista, mantendo a posição do *guideline* publicado em 2004.

Em 2015, Volm e colaboradores publicaram uma revisão, sumarizando os resultados da literatura de predição *in vitro* de milhares de pacientes e seus resultados *in vivo*, confirmando que é mais fácil predizer resistência à quimioterapia do que sensibilidade, em outras palavras, Volm mostrou que os testes de sensibilidade *in vitro* são bons para predizer quais quimioterápicos não devem ser administrados ao paciente, mas ainda são falhos em decidir qual deve ser administrado para garantir total regressão do tumor (Volm e Efferth, 2015), reforçando o que já era dito nas décadas anteriores (Cline, 1969; Von Hoff, 1990).

### 1.2.2. Ensaio de sensibilidade *in vitro*

Testes de predição a sensibilidade *in vitro* não são novos na literatura e há registros de experimentos na década de 40 e 50 que tentaram correlacionar os efeitos de antineoplásicos em sistemas *in vitro* com a atividade antitumoral *in vivo* (Von Hoff e Weisenthal, 1980). Porém, uma ampla variação de sensibilidade ao mesmo quimioterápico, considerando tumores com similaridade histológica, já era reportada na antes da década de 80 (Dendy, 1980).

Desde a década de 60 sabe-se que o sucesso dos ensaios de predição *in vitro* dependem de condições mínimas nas quais: as drogas devem ser administradas na sua forma ativa ou o sistema deve

ser capaz de convertê-la na sua forma ativa; o metabolismo das células malignas *in vitro* e *in vivo* deve ser semelhante; deve-se manter a droga por tempo suficiente para que o mecanismo de ação da droga se manifeste; também deve-se ter cuidado para que a amostra utilizada seja representativa do tumor, o que em amostras de tumores líquidos não é um problema tão grande quanto em tumores sólidos (Cline, 1969).

Ainda na década de 70 alguns autores sugeriram que o número de passagens poderia influenciar na sensibilidade aos quimioterápicos e que culturas primárias eram preferíveis a culturas com passagens quando se buscasse determinar a sensibilidade de um paciente em particular (Berry 1975 e Fuskova 1977).

Ainda nos anos 70, Twentyman comprovou o que dados da literatura sugeriam: análises feitas com células tumorais processadas, tratadas e analisadas em curto prazo podem revelar falsos positivos. Ou seja, caso todo o processo seja feito de forma aguda, considerando o preparo desde a ressecção cirúrgica da massa tumoral em uma suspensão de células únicas seguidas de tratamento e medidas de viabilidade, haverá uma fração de células já fragilizadas pelo processamento que serão eliminadas mais facilmente pelo quimioterápico, sugerindo uma (falsa) eficiência do tratamento. O autor nomeou esse fenômeno como *“recovery from potentially lethal damage”* e sugere que esse fenômeno pode justificar algumas diferenças encontradas entre resultados *in vitro* e *in vivo*, pois no segundo caso as células não sofrem injúrias ou estresses prévio capazes de sensibilizá-las à morte (Twentyman, 1978).

Além disso, von Hoff já falava nos anos 80 que deve-se tomar cuidado com a concentração do fármaco e que o teste precisa ser de simples execução, de baixo custo e alta reprodutibilidade, com boa correlação entre os resultados *in vitro* e *in vivo*, sendo o mais importante, que apresente melhor sensibilidade que especificidade (Von Hoff e Weisenthal, 1980). Neste caso, as condições de cultivo das células devem se aproximar das condições do tecido a que pertencem, uma vez que a adição/remoção de fatores de crescimento e hormônios podem afetar a cinética do crescimento celular e deve-se atentar para o fato de que o preparo de suspensões para isolamento das células destrói a arquitetura original e pode manter células não tumorais, levando a mudanças na quimiossensibilidade (Von Hoff e Weisenthal, 1980). Neste contexto, um ponto crítico para a correlação da resposta *in vitro* com o sucesso da terapia *in vitro* refere-se ao uso do quimioterápico, que deve representar a concentração atingida no paciente, a qual deve ser mantida nessa faixa pelo mesmo tempo que é atingida no tumor considerando-se a mesma cinética de crescimento durante a exposição (Von Hoff e Weisenthal, 1980).

## 1.2.3. Tipos de ensaios celulares de predição mais utilizados

### 1.2.3.1. CRSA

Ensaio de quimioressistência e quimiossensibilidade *in vitro* (*In vitro Chemotherapy Sensitivity and Resistance Assays, CSRAs*) podem ser desenvolvidos com diferentes protocolos e ser classificados de diferentes maneiras, sendo que pequenas variações na técnica podem ou não resultar em alterações na sua sigla. Seguiremos a classificação utilizada pela ASCO do artigo de 2004: SRCA, HTCA, CCS, DiSC, MTT, ATP, EDR (Schrag *et al.*, 2004).

Diferentes métodos foram desenvolvidos nos últimos 70 anos para determinar a sensibilidade de células tumorais *in vitro* de maneira que se assemelhe a resposta *in vivo*. Até o momento os autores, embora não tenham chegado em um consenso sobre o melhor método de cultivo e avaliação da resposta, já identificaram cuidados importantes para a correta translação dos resultados. Eagle já chamou a atenção para o correto uso de meios de cultura e fatores de crescimento (Eagle e Foley, 1956). Cline já pontuou que o fármaco precisa ser administrado ao sistema já na forma ativa ou possa ser ativado *in vitro*, e deve ser mantido por tempo e concentração semelhante para que se observem os mesmos efeitos que no paciente; ainda pontuou que para que isso aconteça a amostra retirada do tumor precisa ser significativa (Cline, 1969). Hoffman menciona que células em esferoides apresentam maior resistência ao fármaco que em monocamada, e que esse sistema 3D de cultura se aproximaria mais da realidade encontrada no paciente (Hoffman, 1993).

### 1.2.3.2. Ensaio clonogênico (HTCA)

Em 1977 Hamburger e Salmon publicaram um protocolo para o sistema de formação de esferas clonais (*Human Tumor Clonogenic Assay, HTCA*) *in vitro* a partir de uma biópsia do tumor, esse ensaio tornou-se o mais popular entre os laboratórios nos anos seguintes por permitir o uso de diferentes tipos celulares, desde tumores sólidos até medula óssea (Hamburger e Salmon, 1977).

Nesse protocolo, a massa tumoral proveniente da ressecção cirúrgica é dissociada em uma suspensão de células únicas que é então incubada com fármacos na concentração de 1/10 da plasmática ou 1/10 da área sob a curva dessa concentração por 1 hora. Após esse período o fármaco é removido e as células são cultivadas embebidas em meio de cultura misturado com ágar, adicionadas sobre uma camada prévia de ágar, por pelo menos 10 – 14 dias. Ao final, o número de colônias formadas é contada em um microscópio e os resultados apresentados em porcentagem de diminuição das unidades formadoras de colônias (TCFUs) (Cramer e Woltering, 1991).

A maioria dos estudos com esse tipo de abordagem foi conduzida por Von Hoff, indicando que os testes de HTCA apresentam uma taxa maior de 90% de predição de verdadeiro negativo (resistência ao fármaco) e quase 70% de correlação verdadeiro positivo (sensibilidade ao fármaco), com uma sensibilidade (verdadeiro positivo/verdadeiro positivo + falso negativo) em torno de 80% e uma especificidade (verdadeiro negativo/falso negativo + falso positivo) de 86% (Von Hoff e Weisenthal, 1980; Von Hoff, 1990). Na década de 80 alguns autores reportaram que apenas entre 30 – 70% das amostras testadas puderam ser avaliadas, limitado a utilidade deste tipo de ensaio. Outros autores reportaram que a eficiência poderia ser dependente do tipo de tecido utilizado, e que suspensões celulares funcionariam melhor para tumores hematológicos, enquanto que, para tumores sólidos a arquitetura do tecido parecia ser importante para melhores correlações (Furukawa *et al.*, 1995). Von Hoff nas suas análises encontrou que as melhores correlações em tumores sólidos eram para tumores de ovário, útero, rim, cérebro e mesotelioma (Von Hoff *et al.*, 1990).

Esses resultados podem ser comparados com especificidade do antibiograma, uma vez que em torno de 60% dos pacientes apresentam resposta clínica favorável quando tratados com o antibiótico definido pelos testes *in vitro*; assim como os testes para quimioterápicos, antibiogramas são mais efetivos em prever resistência que sensibilidade, mas diferente dos ensaios com quimioterápicos, estes são amplamente utilizados na clínica (Cramer e Woltering, 1991).

Um dos problemas apontado na década de 90 por diferentes autores, e revisado por Hoffman, nessa metodologia parece ser a formação de coágulos/agregados devido a incorreta homogeneização das células no início do experimento. Esse viés poderia gerar falsos negativos, ou seja, ao final do experimento o pesquisador encontra colônias e acredita que seu fármaco não teve ação e deduz que o paciente seria resistente ao fármaco (Hoffman, 1993).

Diferenças já foram reportadas entre colônias e monocamada celular antes da década de 90, sendo a monocamada muito mais sensível aos quimioterápicos do que as células em esferoides, essa diferença pode ser explicada pela maior concentração de células tronco-tumorais nas esferas e pelo gradiente de pH e oxigênio que podem apresentar, maior semelhança ao tumor *in vitro*. Deve-se manter em mente também que células tronco-tumorais podem estar em estado reversível de não divisão celular ( $G_0$ ) e quando colocadas para formar colônias não se dividem com a mesma velocidade das demais, ou seja, não formam colônias como as demais; sendo assim, talvez as esferas sensíveis sejam formadas por células mais comprometidas com a diferenciação e menos malignas (Hoffman, 1993).

### 1.2.3.3.HDRA

Ensaio de resposta a droga utilizando cultura de tecidos (*Histoculture Drug Response Assay, HDRA*) já foram utilizados há mais de duas décadas para testes de predição de sensibilidade *in vitro* por preservarem a arquitetura e função do tecido. Esses dois fatores, arquitetura e função, podem ajudar a aumentar a taxa de sucesso na realização dos testes, maiores que 90%, enquanto que nos testes de HTCA esse sucesso pode variar de 30 – 70% dependendo do autor (Furukawa *et al.*, 1995). Um dos primeiros ensaios utilizando HDRA foi conduzido por Hoffman que utilizou histocultura sobre um suporte de gel, desenvolvendo uma nova abordagem que permitiu pelo menos 80% de sucesso da cultura.

As principais vantagens desse ensaio, além da manutenção da arquitetura e função já citadas, consistem no uso de resultados morfológicos, como a detecção de proliferação por microscópio de luz polarizada (o que pode inclusive ser semi-automatizado). Além disso a viabilidade das células tumorais e não tumorais pode ser medida em alta resolução através de exclusão/inclusão de corantes fluorescentes e a atividade metabólica medida através da redução de corantes como MTT, bem como análises de imagem e pontos finais não destrutivos (ex: consumo de glicose). Esses fatores fazem com que a taxa de sucesso na realização dos testes seja alta e permitem a testagem de múltiplos agentes em sequência, utilizando pequenos pedaços do tumor, garantindo baixa frequência de falsos negativos e falsos positivos. A manutenção da heterogeneidade de células permite ainda avaliar o comportamento de células do sistema imune infiltradas no tumor. Dependendo de como o ensaio for conduzido, pode demorar entre 3 a 14 dias (Hoffman, 1993).

Furukawa em 1995, utilizando ensaio de HDRA e leitura de MTT como resultado final, reportou uma correlação de sensibilidade *in vitro* e *in vivo* maior de 90%, com 100% de verdadeiros negativos e quase 70% de verdadeiro negativo, 100% de sensibilidade e 90% de especificidade para câncer gástrico e colorretal, ambos em estágio avançado. Em artigo anterior do mesmo grupo, com tumores de cabeça e pescoço, a acurácia foi maior que 70%, o valor preditivo positivo maior que 80% e a sensibilidade maior que 70%, com especificidade de quase 80%. Nesse artigo Furukawa cita autores que mostraram uma correlação de aproximadamente 90% entre ensaios de HDRA com implantes xenográficos em camundongos nude (Furukawa *et al.*, 1995).

#### 1.2.3.4. Outros métodos de predição *in vitro*

DiSC (*Differential Staining Cytotoxicity Assay*): Esse ensaio detecta membranas intactas através da exclusão de corantes, podendo superestimar a viabilidade das células uma vez que células em processo de apoptose mantêm a membrana intacta durante algum período (Samson *et al.*, 2004). Shaw reportou em 1993, um estudo no qual utilizou esse experimento em tecidos tumorais frescos de NSCLC: as células foram incubadas por 4 dias com fármacos nas concentrações de referência, 10x maior e 10x menor que a referência; no quinto dia, células sanguíneas vermelhas de pato foram adicionadas, as amostras foram centrifugadas e coradas com *fast green* e/ou nigrosina e contracoradas com HE. Células vivas são capazes de excluir a marcação com *fast green*. Aos pacientes sem marcação de células neuroendócrinas (coradas com nigrosina) foi administrado o fármaco com maior atividade *in vitro*, neste estudo a sobrevida média em ambos os grupos foi de 6 meses, com um taxa de resposta em torno de 10% para o grupo de terapia guiada por ensaio *in vitro* e em torno de 13% para o grupo tratado com a quimioterapia padrão (Shaw *et al.*, 1993). Cortazar realizou o mesmo protocolo para células de SCLC e observou uma sobrevida média de 38,5 meses nos pacientes tratados de acordo com o fármaco escolhido pelo tratamento *in vitro* comparado com uma sobrevida de apenas 19 meses no grupo tratado com o quimioterápico tradicional; efeitos colaterais não foram reportados (Cortazar *et al.*, 1997) (Samson *et al.*, 2004).

MTT (*Methyl Thiazolyl-diphenyl-Tetrazolium bromide*) e ATP (*Adenosine Triphosphate bioluminescence*): estimam o número de células através da atividade metabólica, podendo gerar viés de comparação entre células metabolicamente mais ou menos ativas (Samson *et al.*, 2004). Kurbacher utilizou suspensões celulares preparadas a partir de biópsias de tecido e efusões malignas de carcinoma de ovário. As células foram tratadas por 5 – 7 dias com seis concentrações diferentes do fármaco. O quimioterápico foi escolhido com base na curva dose-resposta. Nos pacientes tratados com o quimioterápico escolhido com base nos resultados *in vitro*, a sobrevida média foi maior que 22 meses, enquanto no grupo ao qual foi administrado a quimioterapia escolhida de forma tradicional a sobrevida foi de apenas 16 meses. A taxa de resposta no primeiro grupo foi de 64% e no segundo de 37%, sendo a diferença estatisticamente significativa (Kurbacher *et al.*, 1998).

EDR (*Extreme Drug Resistance Assay*): mede a taxa de síntese de DNA, sendo sua atividade boa apenas para excluir fármacos aos quais as células mostram extrema resistência. Loizzi realizou um estudo com suspensões celulares de carcinoma de ovário recorrente, que foram mantidas por cinco dias em *soft* ágar contendo contínua presença ou ausência do fármaco escolhido em uma única concentração, ao final timidina tritiada foi adicionada por pelo menos 24 horas e a radioatividade do homogenato de cada poço foi medida. Os resultados foram avaliados de acordo com a razão de incorporação entre células tratadas

e não tratadas. O paciente recebeu o fármaco que apresentou menor resistência *in vitro*. Não foram observadas diferenças na sobrevida dos pacientes resistentes aos derivados de platina quando comparados os que foram submetidos ao tratamento baseado no ensaio *in vitro* versus os que receberam a quimioterapia tradicional. Porém, no grupo de pacientes sensível à platina, o OR no grupo guiado pelos testes *in vitro* foi de 65% comparado a apenas 35% no outro grupo (Loizzi *et al.*, 2003).

#### 1.2.3.5. Ensaio na cápsula subrenal

Esse método *in vivo* de predição de sensibilidade foi inicialmente desenvolvido devido à necessidade de testes rápidos para o screening de drogas em tumores xenógrafos estabelecidos em camundongos atímicos (*Subrenal Capsule Assay*, SRCA). Depois, foi melhorado para utilizar tumores humanos frescos em um transplante xenógrafo direto (*Patient Derived Xenograft*, PDX), trazendo a possibilidade de utilizá-lo como teste de predição a quimiossensibilidade (Cramer e Woltering, 1991).

O preparo é semelhante ao dos ensaios clonogênicos: o tumor é processado em pedaços de 1 mm<sup>3</sup> e injetados na cápsula subrenal de camundongos imunocomprometidos. O peso corporal inicial e final são medidos, assim como o tamanho inicial e final do tumor. Os animais são expostos aos quimioterápicos do 1º ao 5º dia após a implantação e sacrificados no 6º dia para medida direta da massa tumoral, o que pode ser facilmente realizado uma vez que a cápsula é transparente. A atividade do quimioterápico é reportada de acordo com mudanças no tamanho do tumor. As doses de quimioterápicos escolhidas são adaptadas para o metabolismo acelerado dos camundongos comparado ao de humanos (Cramer e Woltering, 1991).

As vantagens na utilização desse método, se comparado ao ensaio clonogênico, se devem principalmente pela manutenção da heterogeneidade e da arquitetura inicial do tumor. Os resultados de correlação com a clínica não são tão vastos quanto para o ensaio clonogênico, porém há relatos de previsão de sensibilidade maior de 90% e resistência maior de 70% (Cramer e Woltering, 1991).

#### 1.2.3.6. PDX

Nesse modelo as células tumorais derivadas de pacientes são crescidas de forma xenográfica subcutaneamente em camundongos imunocomprometidos (*Patient Derived Xenograft*, PDX) e utilizadas geralmente para o desenvolvimento de estudos pré-clínicos de fármacos (Hidalgo *et al.*, 2014). Embora discutida em sessão separada, podemos dizer que os modelos atuais de PDX são uma versão repaginada dos modelos antigos de SRCA.

Estudos conduzidos na década de 1980, já demonstravam alta correlação entre a resposta clínica a agentes citotóxicos em pacientes adultos com câncer de pulmão, e a resposta aos mesmos agentes em modelos PDX desses mesmos pacientes, demonstrando que essa não é uma técnica nova, mas que provavelmente foi subutilizada para essa finalidade nas últimas décadas. Por outro lado, muitos estudos pré-clínicos de fase II com quimioterápicos clássicos foram conduzidos utilizando essa metodologia (Hidalgo *et al.*, 2014).

Nos últimos anos houve uma renovação no interesse em desenvolver modelos de PDX de diferentes tipos tumorais, e pode-se dizer que atualmente esse é o modelo pré-clínico preferido, tanto pela indústria quanto pela academia, para melhorar o processo de desenvolvimento de fármacos, sendo que, mensalmente aumentam as publicações utilizando essa metodologia para diferentes pesquisas translacionais. Diferentes protocolos e linhagens de camundongo já foram testadas e apresentam diferentes propriedades, a maioria dos laboratórios prefere utilizar injeções subcutâneas em animais NOD/SCID ou NOD/SCID/IL2 $\gamma$  (NSG), mas dependendo do tipo tumoral injeções ortotrópicas também são utilizadas. Por exemplo, NSCLC crescido na cápsula subrenal apresenta taxas de 90% de eficiência de implantação, enquanto que o mesmo tumor quando crescido de forma subcutânea apresenta taxas de implantação menores que 30%; e tumores testiculares só podem ser crescidos de maneira ortotrópica.

Diz-se que esse modelo é capaz de manter características morfológicas do tumor parental, incluindo a estrutura do tecido, como glândulas, produção de mucina, desenvolvimento cístico, etc. A nível de expressão gênica também existe uma boa correlação entre os tumores originais e os gerados por PDX (Hidalgo *et al.*, 2014).

#### 1.2.4. Dificuldades em implantação na clínica

Os testes de predição de sensibilidade *in vitro* não são uma ideia nova na literatura, pois como apresentado, estudos da década de 50 já tentavam estabelecer um protocolo que pudesse ser facilmente executado e com boa correlação clínica. Embora os dados da literatura apresentem relativa consistência e correlação *in vitro* x *in vivo*, é sabido que até o presente momento esses testes não têm valor na clínica, inclusive que a ASCO não recomenda seu uso. Isso pode ser principalmente devido a: 1) falha no crescimento regular dos tumores, 2) controles de qualidade, 3) correspondência na farmacocinética *in vivo* e técnicas do laboratório, 4) exceções teóricas e 5) falta de estudos clínicos bem desenhados (Cramer e Woltering, 1991).



O primeiro ponto se justifica pelo fato de que nem todos os tumores podem ser facilmente cultivados e testados, uma vez que, com todos os avanços na área, ainda há uma parcela de biópsias que não crescerão *in vitro*, e que essa parcela é variável quando se compara o crescimento para ensaios clonogênicos ou em PDX por exemplo (Cramer e Woltering, 1991).

A correspondência entre doses e tempo de exposição de fármacos e a farmacocinética *in vivo* é uma dificuldade reportada desde as primeiras revisões da literatura (Cline, 1969). Quando ensaios *in vitro* são realizados, a cinética de degradação, ativação/inativação hepática e disponibilidade são, de maneira geral, diferentes das encontradas no paciente e nos ensaios *in vivo*. Por exemplo, sabe-se que doses maiores do quimioterápico precisam ser administradas aos camundongos para mimetizar os efeitos em humanos devido a diferença no metabolismo de ambas espécies (Cramer e Woltering, 1991).

Porém, talvez um dos fatores que seja mais difícil de resolver, mesmo com os avanços feitos nos ensaios, seja a limitação teórica de predição de um evento tão raro quanto a quimiosensibilidade. Autores demonstraram que o valor preditivo desses testes é matematicamente limitado pela probabilidade de resposta, então a probabilidade de um resultado positivo ser acurado será baixo independente do teste *per se* (Cramer e Woltering, 1991).

Uma vez que toda quimioterapia se desenvolveu baseada em estudos prospectivos randomizados duplo cego de fase III, o uso de ensaios de quimiosensibilidade associado a estudos clínicos que provem a sua eficiência ainda é limitado na literatura. Poucos grupos de pesquisa conseguem conduzir estudos prospectivos randomizados com quantidade suficiente de pacientes. Talvez um dos estudos mais antigos nesse modelo tenha sido conduzido em 1990, na qual 133 pacientes com câncer metastático avançado foram randomizados entre a escolha clínica de um quimioterápico ou escolha do quimioterápico com melhor efeito nos ensaios clonogênicos, tomando-se cuidado para que sempre fosse administrado apenas um agente. Nesse estudo, a taxa de resposta apresentada para o ensaio clonogênico (21%) foi maior que para a escolha do médico (apenas 3%) tendo diferença significativa entre os grupos, mas apenas para a resposta parcial, sem diferença na sobrevida total entre os grupos (Cramer e Woltering, 1991).

Já foi discutido na literatura também, o fato de que talvez um único tipo de ensaio de sensibilidade *in vitro* não seja ideal para simular todos os tipos tumorais e que talvez, o desenvolvimento de testes deva ser específico para o tipo de tumor que se deseja tratar na clínica (Cramer e Woltering, 1991).

## 2. HIPÓTESE

H<sub>1</sub>: Alterações genômicas e de fenótipo celular pode auxiliar na busca por combinações de terapias para os tumores do sistema nervoso central *in vitro*

### 3. OBJETIVO

#### 3.1. Geral

Estabelecer um protocolo de predição de resposta *in vitro* capaz de ajudar a direcionar a quimioterapia em tumores de sistema nervoso central.

#### 3.2. Específico

- 3.2.1. Realizar culturas de células provenientes de biópsias de tumores do sistema nervoso central.
- 3.2.2. Validar marcadores reconhecidos da literatura e encontrar novos marcadores moleculares de fenótipos de sensibilidade ou resistência.
- 3.2.3. Combinar dados moleculares e farmacológicos para ajudar a racionalizar e personalizar tratamentos disponíveis na clínica.
- 3.2.4. Buscar novas associações de fármacos que possam potencializar o efeito da temozolomida em subgrupos de pacientes baseados nas análises farmacogenômicas.
- 3.2.5. Resgatar moléculas com baixa eficiência no tratamento de pacientes não selecionados para aplica-la em culturas sensíveis *in vitro*.
- 3.2.6. Analisar fenótipos celulares após o tratamento *in vitro* com quimioterápicos.
- 3.2.7. Modular fenômenos celulares para potencializar o efeito dos fármacos *in vitro*.

## 4. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS GERAIS

Nessa seção serão detalhados métodos gerais para a obtenção e manutenção das culturas primárias, bem como o resultado derivado de cada protocolo. Por esta ser uma tese baseada no aprimoramento de metodologias, acreditamos que agrupar essas três seções facilita a leitura e o entendimento, uma vez que alguns resultados serviram de base para o desenvolvimento de novos protocolos.

### 4.1. Aspectos éticos envolvidos na obtenção das biópsias

O presente projeto foi aprovado pelos comitês de ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Números dos Pareceres UFRGS: 384.860 e 420.856, Datas das Relatorias: 05/09/2013 e 03/10/2013) e da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Número do Parecer PUCRS: 429.849, Data da Relatoria: 18/10/2013), conforme consta no Anexo I – Parecer Consubstanciado do CEP da página 128. Anteriormente a essas aprovações, possuíamos colaboração para obtenção de culturas primárias para realização de experimentos-piloto com o Dr. Bernardo Garicochea, aprovado pelo comitê de ética da PUCRS sob o parecer número 07/03562 de 14 de maio de 2007.

Todos os pacientes envolvidos nesse estudo realizaram ressecção cirúrgica pela equipe de neurocirurgia do Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS após diagnóstico por imagem de tumor cerebral – possível glioma. Os pacientes foram informados sobre o estudo e concordaram em participar mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que se encontra no Anexo II – Termo de Consentimento da página 132 desta tese. Informações sobre cada paciente encontram-se no Anexo III.

### 4.2. Estabelecimento das culturas primárias

#### 4.2.1. Materiais e métodos para obtenção das culturas

Porções de tecido com características de gliomas são normalmente aspiradas e descartadas durante a ressecção cirúrgica, nesse estudo, os fragmentos tumorais ressecados foram doados para a realização de testes *in vitro*. O tamanho e quantidade de fragmentos provenientes de cada paciente foi variável e dependeu das condições particulares de cada cirurgia. Após remoção os espécimes foram imediatamente acondicionados em solução salina sem cálcio e magnésio (Calcium-Magnesium Free Buffer, CMF), contendo glicose (1%), suplementado com penicilina (100U/mL)/estreptomicina (100

$\mu\text{g/mL}$ ), Canamicina (25  $\mu\text{g/mL}$ ) e anfotericina B (0,625  $\mu\text{g/mL}$ ) todos comprados da Gibco Laboratories (Grand Island, NY, USA) a temperatura ambiente e transportados para a UFRGS.

O tempo entre a coleta e o processamento foi entre 1 a 3 horas. O tampão escolhido para o transporte auxilia a dissociação mecânica por promover a quelatação dos íons  $\text{Ca}^{+2}$  necessários para adequada adesão entre as células. Dessa maneira, houve apenas maceração e homogeneização do tecido por “up and down” com uma pipeta de vidro tipo Pasteur, até obtenção de suspensões sem grandes agregados celulares. Durante a homogeneização foram realizadas três lavagens, com o mesmo tampão utilizado na coleta, e centrifugações para remoção de boa parte das hemácias. Ao final, as células foram suspensas em meio DMEM/F-12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) comprados da Gibco Laboratories (Grand Island, NY, USA) e mantidas em incubadora úmida a 37°C, com 5% de  $\text{CO}_2$ . O meio de cultura foi substituído por meio fresco duas vezes por semana durante todo o período de manutenção.

#### 4.2.2. Resultados do estabelecimento das culturas

De maneira geral, 24 horas após a coleta e o processamento foi possível observar algumas poucas células aderidas entre a suspensão de hemácia, em quantidade variável dependendo da biópsia (Figura 4). Esse fato não teve relação com a malignidade, uma vez que mesmo na cultura LS04, proveniente de um tumor disembrionário benigno, foi possível observar tais células aderentes. Após uma semana em cultura foram observados agregados aderentes de células, com esse tempo variando de um dia até um mês. O primeiro repique foi feito com tripsina 0,25% (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) quando os frascos de cultura possuíam grandes ilhas proliferativas que, quando dissociadas e homogeneizadas na mesma área, atingiam uma confluência média mínima de 50%. Importante ressaltar que esse comportamento inicial de proliferação não homogênea foi observado em todas as linhagens citadas. Foram realizadas pelo menos duas passagens e o congelamento de um frasco de cada cultura antes do uso para os demais experimentos. Após algumas trocas do meio de cultivo a monocamada aderente apresentava-se livre de hemácias, sendo que as mesmas eram completamente removidas após a primeira passagem.

As duas primeiras biópsias obtidas e armazenadas no nosso banco (LS01 e LS02) não foram utilizadas para experimentos desse projeto, servindo apenas como teste para a manipulação, congelamento e descongelamento.

A Tabela 2 apresenta os dados da velocidade de crescimento de algumas culturas primárias comparadas com duas linhagens celulares comerciais (U87 e M059J). Estão representadas apenas as culturas a partir de LS11 nas quais foi possível realizar o experimento de contagem do número de células

remanescentes, 12 dias após o tratamento, pelo menos duas vezes em duplicatas, plaqueando-se 8000 células/poço. Sendo assim, para as demais culturas pelo menos um dos requisitos não foi atingido na realização do experimento, por exemplo, como a análise final visava % em relação ao controle foram semeadas menos células em todos os poços, e deve-se assumir que a maioria delas tenha crescimento ainda mais fastidioso

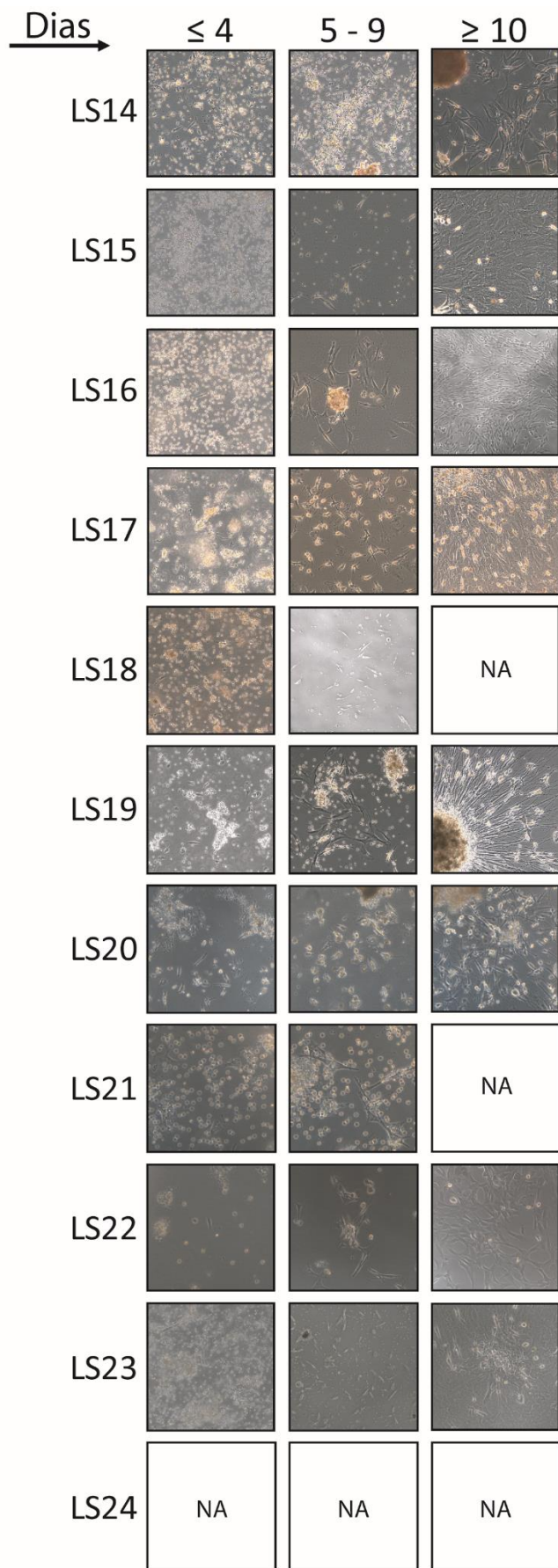
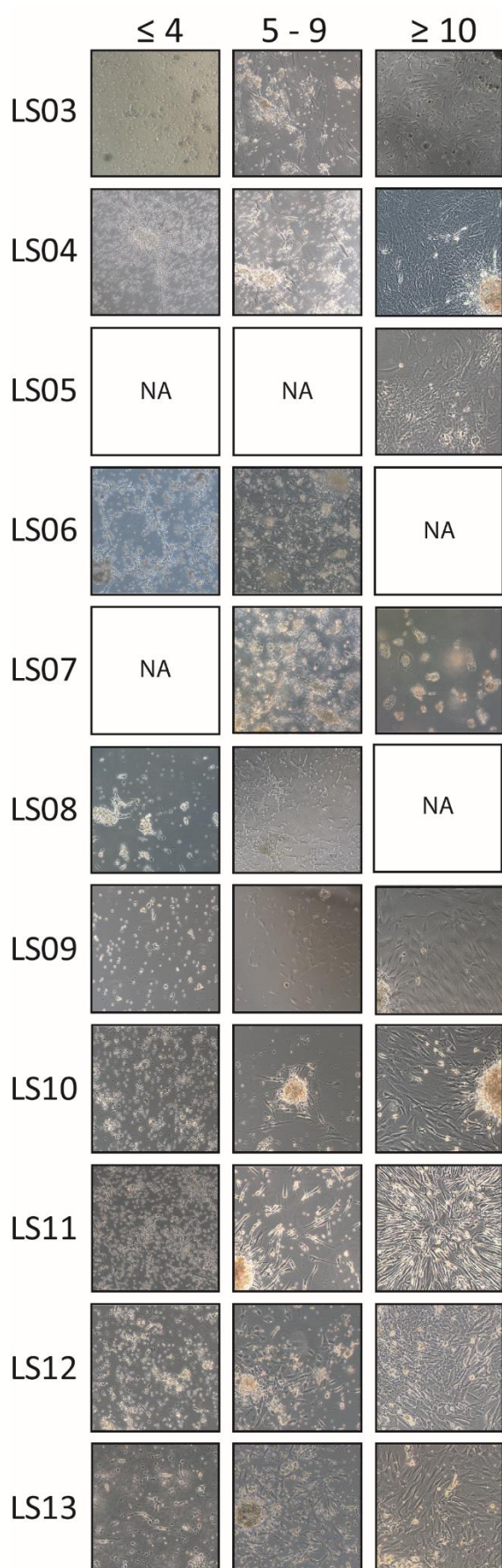


Figura 4 Fotomicrografias representativas de cada uma das 22 culturas primárias utilizadas. Para cada cultura: a 1ª foto representa as primeiras horas (até quatro dias) após o processamento e o acondicionamento em frascos contendo meio DMEM/F12+10% de SFB; a imagem central representa a morfologia entre os primeiros 5 – 9 dias em cultura, enquanto há hemácias e algumas ilhas de células aderentes começam a se formar; a 3ª imagem demonstra a morfologia após 10 dias, quando há a formação de monocamadas e eliminação de praticamente todas as hemácias. Eritrócitos aparecem como pequenos pontos (granulado) ou pequenos agregados brilhantes sobre a monocamada de células aderida. Aumento de 100x. NA: ausência de registros nos tempos estabelecidos

Tabela 2: Velocidade de crescimento das culturas primárias comparando com linhagens celulares comerciais após 13 dias. CPD: Crescimento populacional diário.

Linhagem	CPD diário	Tempo para dobrar a população (dias)	Linhagem	CPD diário	Tempo para dobrar a população (dias)
U87	0,42	2,37	LS17	0,12	8,41
M059J	0,43	2,31	LS20	0,26	3,82
LS11	0,06	17,80	LS23	0,07	15,25
LS12	0,28	3,52	LS24	0,12	8,50
LS16	0,16	6,20			

### 4.3. Análise da sensibilidade

A partir obtenção e estabelecimento da cultura LS03, o primeiro experimento realizado em cada um das demais sempre foi o de sensibilidade aos diferentes quimioterápicos, independente do protocolo seguido: viabilidade celular ou contagem do número remanescente de células.

#### 4.3.1. Materiais e métodos para análise de viabilidade

Nas primeiras 11 culturas testadas (LS03 – LS13) esse experimento foi realizado na forma de análise de viabilidade celular. Nesse protocolo, 1000 células foram semeadas por poço de uma placa de 96 poços juntamente com o quimioterápico (todos adquiridos da Sigma-Aldrich) de escolha, os quais foram mantidos em contato com as células por 7 dias em incubadora a 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>. A concentração administrada dos fármacos variou entre a menor e a maior dose plasmática encontrada na literatura para cada fármaco (conforme dados da Tabela 1, página 37), e estão representadas com o respectivo resultado nos gráficos.

Ao final deste período de 7 dias o meio de cultura foi removido e a monocamada de células incubada com solução de MTT diluída em solução tamponante fosfato-salina (PBS) com glicose (0,78 g/L) por 6 horas, os cristais formados pela redução mitocondrial do MTT em formazan foram eluídos em DMSO para leitura da absorvância em 570 e 630 nm. Os resultados foram expressos sempre em % de absorvância em relação ao controle tratado apenas com o veículo dos quimioterápicos (DMSO, 0,1%). Os demais reagentes para esse experimento foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).



### 4.3.2. Resultados de viabilidade celular

A Figura 5 representa os resultados da viabilidade celular 7 dias após o início do tratamento com fármacos de diferentes mecanismos de ação. Agentes alquilantes apresentaram menor eficiência, sendo que em alguns casos a população tratada com TMZ apresentou um metabolismo maior dos sais de MTT que a população controle. Os resultados mais pronunciados (de diminuição do metabolismo do sal) foram encontrados utilizando fármacos que atuam sobre o citoesqueleto: vincristina, vimblastina, mebendazole e paclitaxel.

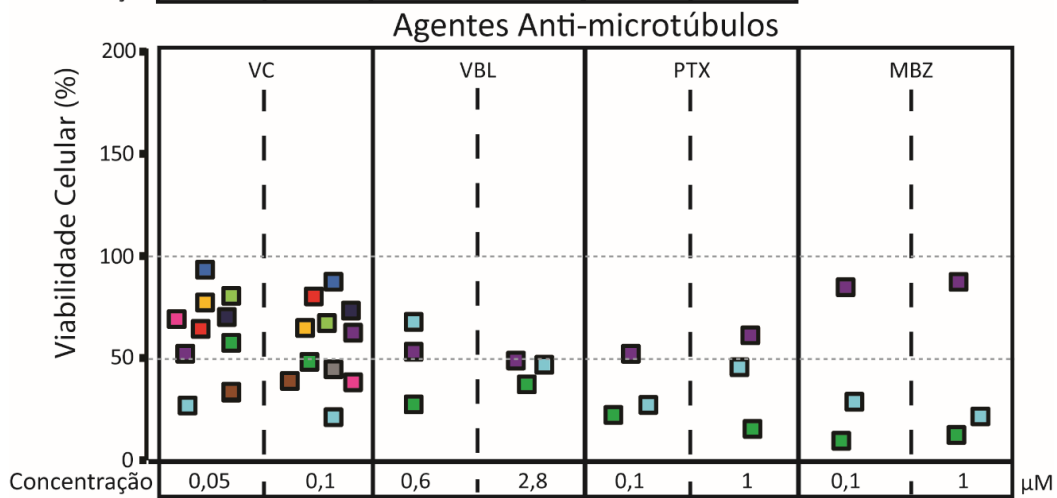
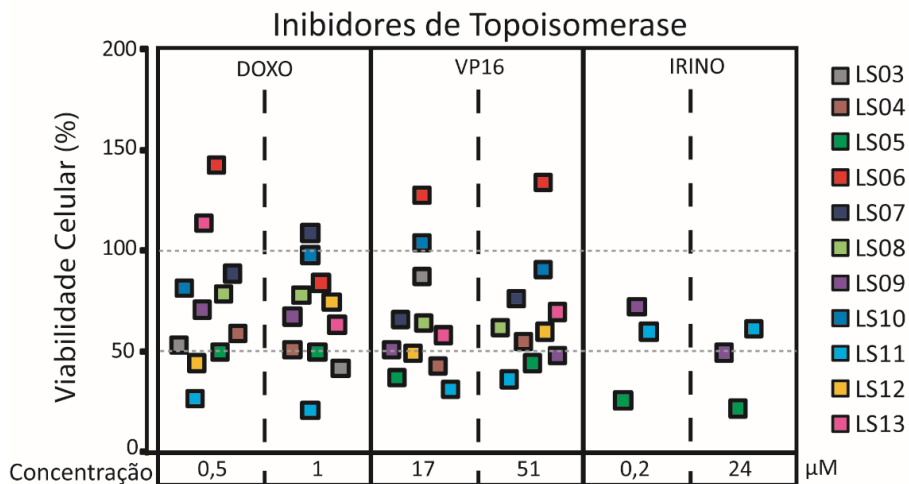
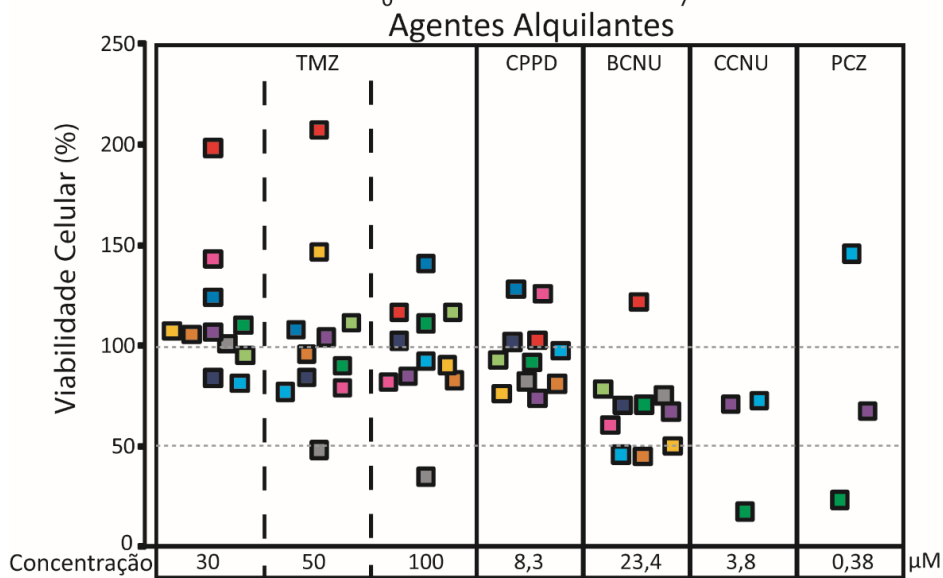
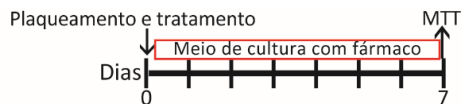
Após o desenvolvimento da técnica de obtenção e a satisfatória expansão das culturas a metodologia aplicada e os quimioterápicos utilizados para a sensibilidade foram revistos. O ensaio de MTT mede a viabilidade mitocondrial, e alguns resultados da literatura apontavam que quimioterápicos como a TMZ poderiam aumentar o metabolismo mitocondrial sem correlação com aumento no número de células. O ensaio de MTT, que parecia mais factível por permitir a realização a partir de um número menor de células e em placas de 96 poços, teve então que ser substituído por outro que demandasse maior quantidade de células por tratamento. Nesse sentido, optamos por utilizar apenas a menor (única) concentração de cada fármaco para os experimentos seguintes.

A revisão mais detalhada da literatura, revelou que já na década de 70 experimentos demonstraram a existência de um fenômeno denominado “*recovery from potentially lethal damage*”, o qual sugere que uma fração de células, já fragilizadas pelo processamento, são eliminadas mais facilmente pelo quimioterápico (Twentyman, 1978). Além disso, na clínica a administração dos tratamentos acontece quando o tumor já está estabelecido, indicando que talvez o estresse gerado pela manipulação imediatamente antes do tratamento pode servir como um viés adicional. Para aproximar nosso protocolo da clínica, no protocolo seguinte as células foram tratadas apenas 24 horas após a manipulação, quando já tivessem formado uma monocamada aderente, e contadas ao final do período em citômetro de fluxo ao invés de realizar medidas indiretas.

### 4.3.3. Materiais e métodos para contagem do número de células

Os experimentos de sensibilidade tiveram seu tempo de análise aumentado para 12 dias. Nesse segundo protocolo as células foram semeadas na densidade de  $8 \times 10^4$  células por poço de uma placa de 48 poços. O tratamento foi administrado em concentração próximo à plasmática (vide Tabela 1, da página 37 da Introdução), diluído em meio de cultura fresco, ~24 horas após a manipulação, quando as células se encontravam em monocamada aderente, e foi mantido por 5 dias sem substituição. Ao final desse período, o meio contendo quimioterápico foi substituído por meio de cultura fresco (DMEM/F12 suplementado

com 10% de FBS), livre de fármaco, que foi mantido em contato com as células por mais 7 dias. Ao final desse período, as células remanescentes foram ressuspensas e contadas em citômetro de fluxo (Guava® easyCyte flow cytometer). Os resultados foram expressos em porcentagem de células em relação ao controle tratado apenas com veículo (DMSO). O protocolo foi adaptado para as biopsias seguintes, e na maneira do possível repetido nas culturas primárias já coletadas (a correlação entre ambos métodos está apresentada na Figura 7).



*Figura 5 Viabilidade celular 7 dias após o tratamento com os quimioterápicos nas concentrações indicadas. A absorbância do controle em 570 e 630 nm ao final do período foi considerada como 100% de viabilidade e os demais tratamentos foram calculados em relação a esse. Cada cor que preenche os quadrados se refere a cultura primária proveniente de um paciente diferente. TMZ = temozolomida, CCPD = cisplatina, BCNU = carmustina, CCNU = lomustina, PCZ = procarbazina, DOXO = doxorubicina, VP16 = etoposídeo, IRINO = irinotecano, VC = vincristina, VBL = vimblastina, PTX = paclitaxel, MBZ = mebendazol.*

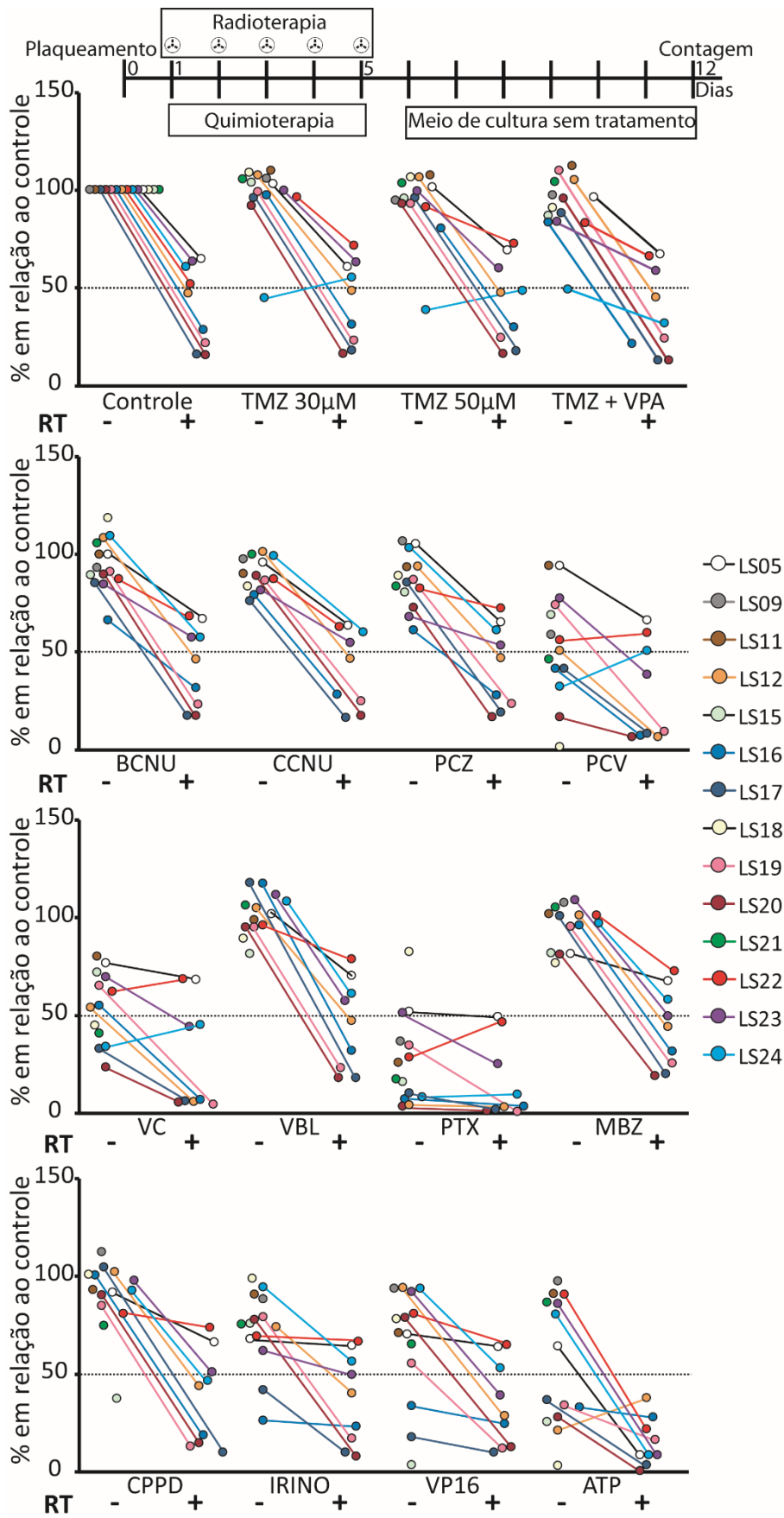
Uma vez estabelecido, o protocolo de sensibilidade a quimioterápicos foi adaptado para a combinação com radioterapia de maneira mais semelhante possível da clínica. Nesse caso, as células foram semeadas e tratadas exatamente como descrito acima, porém foram irradiadas por cinco dias consecutivos, com dose de 2 Gy/dia no equipamento Cobalt Theratron Phoenix (Philips, Eindhoven, The Netherlands) a uma distância de 70 cm, refletindo uma das 6 semanas do tratamento do paciente (Gehring *et al.*, 2012). O meio de cultura foi substituído 24 horas após a última irradiação e as culturas mantidas por 7 dias em meio livre de tratamento. Ao final desse período foram ressuspendidas e contadas em citômetro de fluxo.

#### 4.3.4. Resultados do número remanescente após tratamento

Os resultados foram expressos em porcentagem de células em relação ao controle tratado apenas com o veículo da quimioterapia (DMSO) e são mostrados na coluna da direita de cada tratamento da Figura 6. A porcentagem de células após a irradiação está conectada por linhas à porcentagem de células após administração isolada do fármaco para reforçar a potencialização exercida pela combinação (RT+QT) em todas as culturas analisadas.

TMZ é o fármaco de escolha para o tratamento desses tumores, e conforme descrito acima, administrações diárias atingem um pico de concentração plasmática entre 30 – 70  $\mu\text{M}$ . A única cultura que apresentou redução maior que 50% no número final de células, com esse fármaco isolado, foi LS24, enquanto LS05, LS22 e LS23 não observaram tal redução nem quando TMZ foi administrada em combinação com radioterapia. Em linhas gerais, dois agentes anti-microtúbulo foram os mais efetivos de maneira isolada em diminuir o número de células, sendo vincristina e paclitaxel os agentes isolados com maior efeito na amostragem. Os demais tratamentos tiveram efeito variado entre as culturas.

*Figura 6 Sensibilidade a quimio e radioterapia. As células foram tratadas por cinco dias e mantidas em meio livre de droga por mais sete dias quando foram contadas em citômetro de fluxo. Na combinação de radio e quimioterapia, o fármaco foi adicionado antes da primeira irradiação e mantido em contato durante os cinco dias de administração da irradiação (2 Gy/dia). A porcentagem de células remanescentes em relação ao controle está representada em círculos nos gráficos. As linhas representam as culturas nas quais houve administração de ambas terapias. LS09, LS11, LS15, LS18 e LS21 receberam apenas quimioterápicos e estão representadas na coluna da esquerda de cada fármaco sem conexão com a coluna da direita. RT = radioterapia, TMZ = temozolomida (concentrações indicadas ou 30  $\mu$ M na combinação), VPA = ácido valpróico (10  $\mu$ M), BCNU = carmustina (23,4  $\mu$ M), CCNU = lomustina (38,5  $\mu$ M), PCZ = procarbazina (0,38  $\mu$ M), PCV = PCZ+CCNU+VC, VC = vincristina (54 nM), VBL = vimblastina (550 nM), PTX = paclitaxel (0,1  $\mu$ M), MBZ = mebendazol, CCPD = cisplatina (8,33  $\mu$ M), IRINO = irinotecano (0,24  $\mu$ M), VP16 = etoposídeo (17  $\mu$ M), ATP = adenosina trifosfato (5 mM).*



#### 4.3.5. Resultados gerais da análise de sensibilidade

Dados do nosso grupo mostram que o tratamento com TMZ 100  $\mu$ M por 3h induz o aumento (em torno de 2x) da massa mitocondrial, com ápice 5 dias após uma exposição, seguido de diminuição, mas não normalização em relação ao controle, até o sétimo dia em meio livre de droga, na linhagem U87 (Silva, 2016), indicando que análises de metabolismo celular podem ser influenciadas pelos quimioterápicos e não correlacionar com aumentos ou diminuição no número absoluto de células (Stepanenko e Dmitrenko, 2015). Para as culturas nas quais ambos protocolos que avaliam a sensibilidade foram realizados, os dados foram plotados em um gráfico para cada a cultura derivada de cada paciente. Essa não correlação entre contagens e ensaios de metabolismo pode ser observada na Figura 7, e é totalmente variável entre os fármacos e as culturas analisadas. De maneira geral, podemos dizer que os agentes alquilantes apresentam a maior variação entre os protocolos utilizados, enquanto agentes como a vincristina apresentam boas correlações entre os métodos em diferentes culturas primárias (Figura 7).

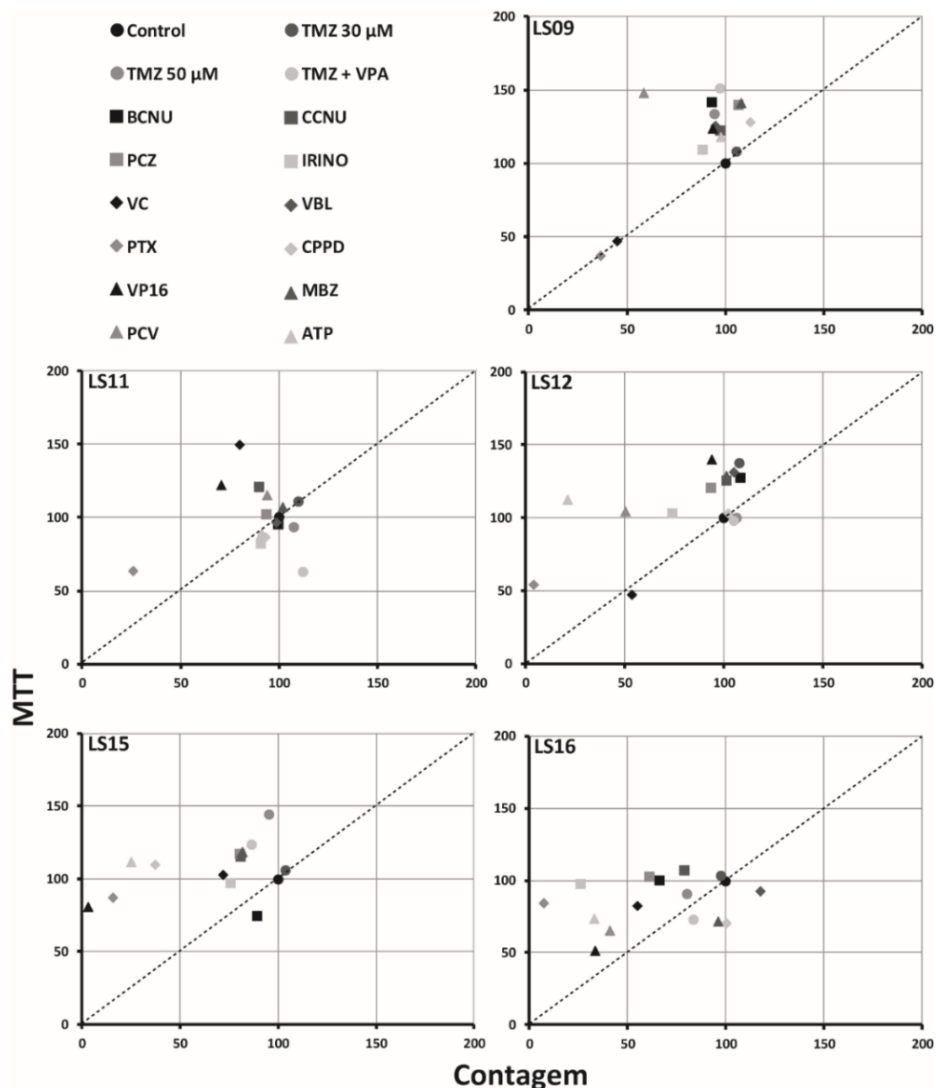


Figura 7 Correlação entre porcentagem de viabilidade celular medida através do metabolismo do MTT sete dias após início (e manutenção) do tratamento e contagens realizadas no décimo segundo dia (após um tratamento de cinco dias seguido de sete dias em meio sem fármaco). Cada gráfico representa uma cultura na qual ambas metodologias foram aplicadas para quinze tratamentos diferentes. Cada símbolo representa um desses tratamentos. TMZ = temozolomida, VPA = ácido valpróico, BCNU = carmustina, CCNU = lomustina, PCZ = procarbazona, IRINO = irinotecano, VC = vincristina, VBL = vimblastina, PTX = paclitaxel, CCPD = cisplatina, VP16 = etoposídeo, MBZ = mebendazol, PCV = PCZ+CCNU+VC, ATP = adenosina trifosfato.

#### 4.3.6. Materiais e métodos para análise da sensibilidade ao retratamento

Para verificar se a proporção de células tolerantes a uma rodada de tratamento pode ser eliminada com sucessivas rodadas ou com outro quimioterápico, realizamos uma segunda rodada de tratamento *in vitro*. Nesse caso, o protocolo descrito acima para análise de sensibilidade foi realizado, porém, após a ressuspensão e contagem no décimo segundo dia, as células tolerantes foram divididas em partes iguais e replaqueadas, após 24 horas foram retratadas com o mesmo fármaco ou outro. Escolhemos para esse experimento, além do tratamento padrão com TMZ, os tratamentos com bons resultados de redução da



população aos 12 dias: Procarbazina, Lomustina (CCNU) e Vincristina (Regime PCV) e Paclitaxel (PTX). Os dados estão representados na forma de crescimento populacional cumulativo, que é a soma do crescimento (PD) ao longo do tempo, calculado utilizando a fórmula:  $PD = (\log NF - \log NI) / \log 2$ , onde NF se refere ao número de células contadas nos pontos escolhidos e NI ao número de células plaqueadas no tempo anterior. Cada uma das flexões das curvas representa o momento em que os tratamentos foram administrados, sendo que a cor inicial de cada tracejado refere-se ao primeiro tratamento e a cor final ao segundo.

#### 4.3.7. Resultados do retratamento

O experimento de contagem, após o tratamento das culturas por cinco dias, seguido de sete dias em meio livre de fármaco reflete, em parte, um ciclo de tratamento na clínica feito com TMZ, porém, o protocolo estabelecido por Stupp em 2005 visa que o estágio de manutenção tenha 6 ciclos, nos quais o paciente recebe o fármaco por 5 dias e deve aguardar 23 dias para receber o tratamento novamente (Stupp *et al.*, 2005). Outros protocolos de intervalos foram testados na clínica, porém os efeitos colaterais, principalmente hematológicos parecem superar os efeitos benéficos. Como pode ser observado nos gráficos, o efeito exercido pela TMZ sobre a proliferação das culturas primárias testadas foi praticamente nulo e melhores resultados foram obtidos com a adição de PCV ou PTX (Figura 8). Nas poucas culturas analisadas não pudemos observar a aquisição de resistência estável ao mesmo fármaco: praticamente a mesma proporção eliminada na primeira rodada de tratamento foi eliminada na segunda; e nem resistência cruzada: parece que o tratamento com um quimioterápico não afetou a resposta na segunda rodada, uma vez que as inclinações da reta no primeiro e no segundo tratamento se assemelharam.

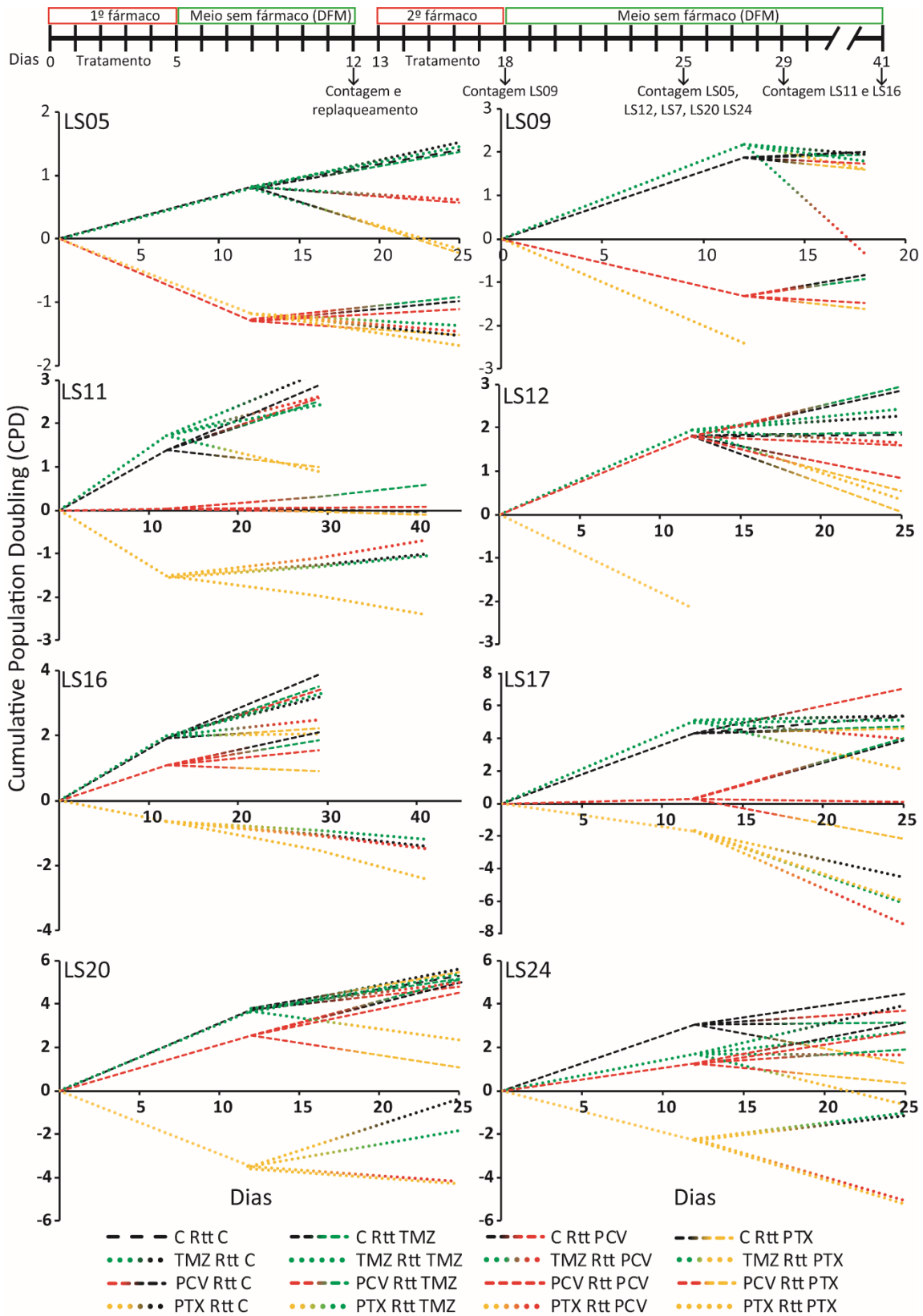


Figura 8 Crescimento populacional cumulativo após tratamento e retratamento. A primeira flexão (do tempo zero até o 12º dia) representa a primeira rodada de tratamento, sendo o a condição controle de crescimento representada em preto e os tratamentos com TMZ em verde, PCV em vermelho e PTX em amarelo. A partir do dia 13 as células foram retratadas com o mesmo fármaco ou de maneira cruzada, sendo que a cor ao final do tracejado indica qual foi a segunda droga utilizada. Em ambos os casos o tratamento foi mantido por 5 dias seguidos de 7 dias em meio livre de droga com contagem em citômetro de fluxo do número de células remanescentes para cálculo do CPD.

A resistência ao primeiro tratamento não parece ser estável (ou genética), sendo possivelmente derivada de um fenótipo oscilante. Alguns autores explicariam essa alteração pela seleção de células tronco tumorais: os tratamentos são capazes de eliminar boa parte da massa tumoral, mas não a população tronco, ou RISC (Recurrence-Initiating Stem-Like Cancer), responsável pela rápida recuperação da massa tumoral perdida após uma rodada de tratamento (Osuka e Van Meir, 2017). Esses resultados reiteram a importância de sucessivas rodadas de terapia.

## 4.4. Análise da expressão gênica

### 4.4.1. Materiais e métodos para expressão basal a nível de mRNA

O padrão de expressão de alguns genes (como descrito na seção 1.1.1, a partir da página 16), pode ajudar a prever resposta aos diferentes quimioterápicos, e até mesmo à radioterapia (Gehring *et al.*, 2015). Além disso, dados do TCGA revelam que o grau de expressão, além das mutações, pode ajudar na separação em subgrupos que correlacionam com o prognóstico do paciente. Para tal, um painel com 13 genes foi desenhado, tendo sua expressão comparada com um normalizador (GUSB) e com a expressão dos mesmos genes em RNA de córtex humano comercial (Total Brain Parietal Cortex RNA, Agilent). A Tabela 3 representa os primers utilizados nesses experimentos e nas demais análises de expressão gênica por qPCR.

GENE	LOCALIZAÇÃO	FRAGMENTO	FOWARD (5'-3')	REVERSE (5'-3')
<b>PDGFRA</b>	4q12	112/190 pb	GTGGGCACGCTCTTTACTCC	ACAGCCTAAGACCAGGAACG
<b>NEFL</b>	8p21.2	178 pb	CAAGCAGAACGCCGACATCA	CTCCTCGCCTTCCAAGATTT
<b>SYT1</b>	12q21.2	109 pb	GCTGACTGTTGTCTTCTGGAGG	CTTCAGCCTCTTACCATTCTGCA
<b>FGFR3</b>	4p16.3	123 pb	CCAAGTGCACACACGACCT	CGGTGGACGTCACGGTAAG
<b>EGFR</b>	7p11.2	129 pb	CACCCTGGTCTGGAAGTACG	GCGATGGACGGGATCTTAGG
<b>AKT2</b>	19q13.2	151 pb	AGTCCATCACAATCACACCCC	GTGATGGCAGCGAGCGTG
<b>NF1</b>	17q11.2	120/150 pb	GCCCTCACAACAACCAACAC	GCCACCAATCCAATGCGGA
<b>CD44</b>	11p13	166/169 pb	CAAGCACAATCCAGGCAACT	TGCATTGGATGGCTGGTATGA
<b>RELB</b>	19q13.32	130 pb	TGTGGTGAGGATCTGCTTCCAG	TCGGCAAATCCGCAGCTCTGAT
<b>P2RX7</b>	12q24.31	197 pb	CTGCAACCTAGACCGTTGGT	CGGTGCCAAAAACCAGGATG
<b>MDR1</b>	7q21.12	122 pb	GAGAGATCCTCACCAAGCGG	ATCATTGGCGAGCCTGGTAG

<b>MERTK</b>	2q13	157 pb	TTGAAGCAGCCCGAAGACTG	TAACGTCTGCTTGGTTCCGA
<b>MGMT</b>	10q26.3	199 pb	ATGGATGTTTGAGCGACACA	ATAGAGCAAGGGCAGCGTTA
<b>NOTCH3</b>	19p13.12	155 pb	CCCTTCCTGCGATCAGGACATC	GGTTGCTCAGGCACTCATCCA
<b>PROMININA</b>	4p15.32	226/256 pb	CTCTATGTGGTACAGCCGC	GTCGCTGGTGCATTTCTCC
<b>CDKN2A</b>	9p21.3	140 pb	GACCAGCATGACAGATTTTC	GAGACTAAGGCAGAAGATG
<b>GUSB</b>	7q11.21	101 pb	GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA

*Tabela 3 Primers utilizados para análise da expressão gênica, o primeiro grupo contendo 13 genes corresponde aos genes analisados para caracterização das linhagens e o segundo grupo (Notch3, Prominina e CDKN2A) representa os genes analisados apenas para o artigo publicado. Em ambos os casos GUSB foi utilizado como normalizador.*

O RNA total de cada cultura foi extraído utilizando a técnica de Trizol-clorofórmio e 5 µg foram utilizadas para síntese do cDNA com a enzima M-MLV (todos reagentes foram comprados da Sigma-Aldrich e o protocolo seguiu as instruções do fabricante). Os experimentos de qPCR foram feitos a partir de 66,66 ng de RNA total/reação e utilização do kit GoTaq® qPCR Master Mix (*Promega*) de acordo com as instruções do fabricante no equipamento Eco Real-Time PCR System (*Illumina*) e nas seguintes condições: 2' 94º; 30" 94º, 15" 60ºC, 15" 72º - 40x. Os resultados da expressão em cada cultura comparada com o córtex normal estão expressos na Figura 9. Em algumas culturas analisadas não foi possível detectar a expressão de alguns genes, como é o caso da U87, onde a expressão de NEFL, FGFR3, RELB, P2RX7 e MDR1 ficaram abaixo do limite de detecção para a concentração de cDNA escolhida.

#### 4.4.2. Resultados da expressão gênica basal

Baseado nos resultados apresentados na Figura 9 podemos observar um comportamento diferenciado de expressão das linhagens comerciais (M059J e U87) comparadas com as culturas primárias. De maneira geral, as células tumorais expressam menos dos marcadores escolhidos que o córtex.

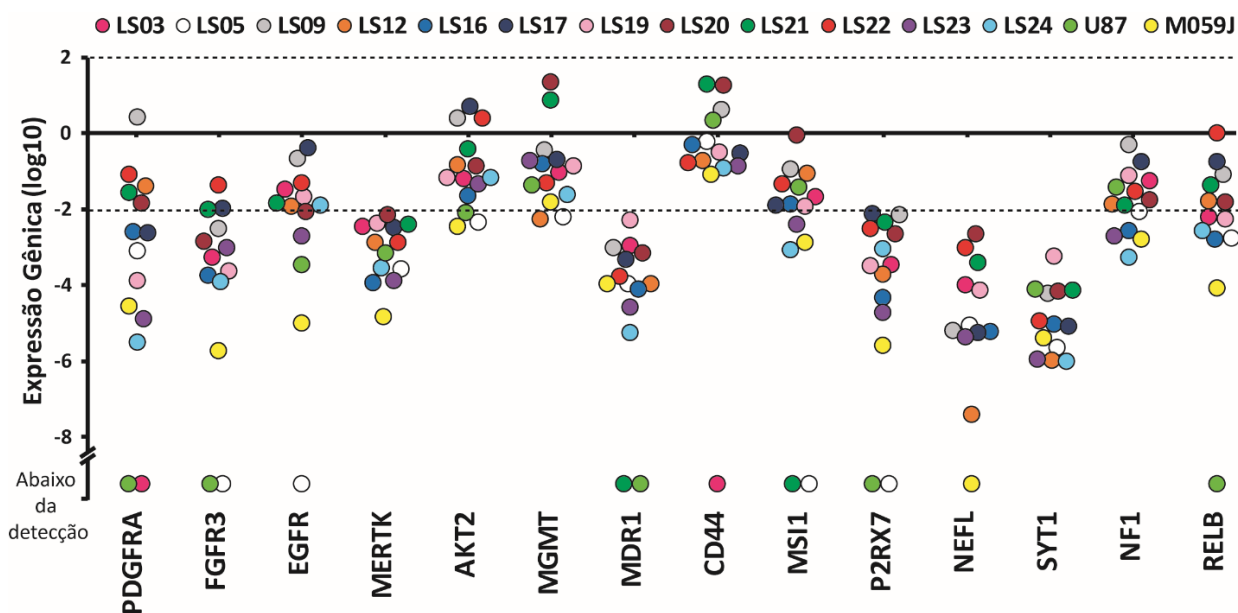


Figura 9 Análise da Expressão Gênica Basal. O mRNA de cada cultura primária e de duas linhagens comerciais foi extraído e o nível de expressão de cada gene comparado ao nível de expressão de mRNA de córtex humano. Amostras na qual não foi possível. n=1 em triplicata

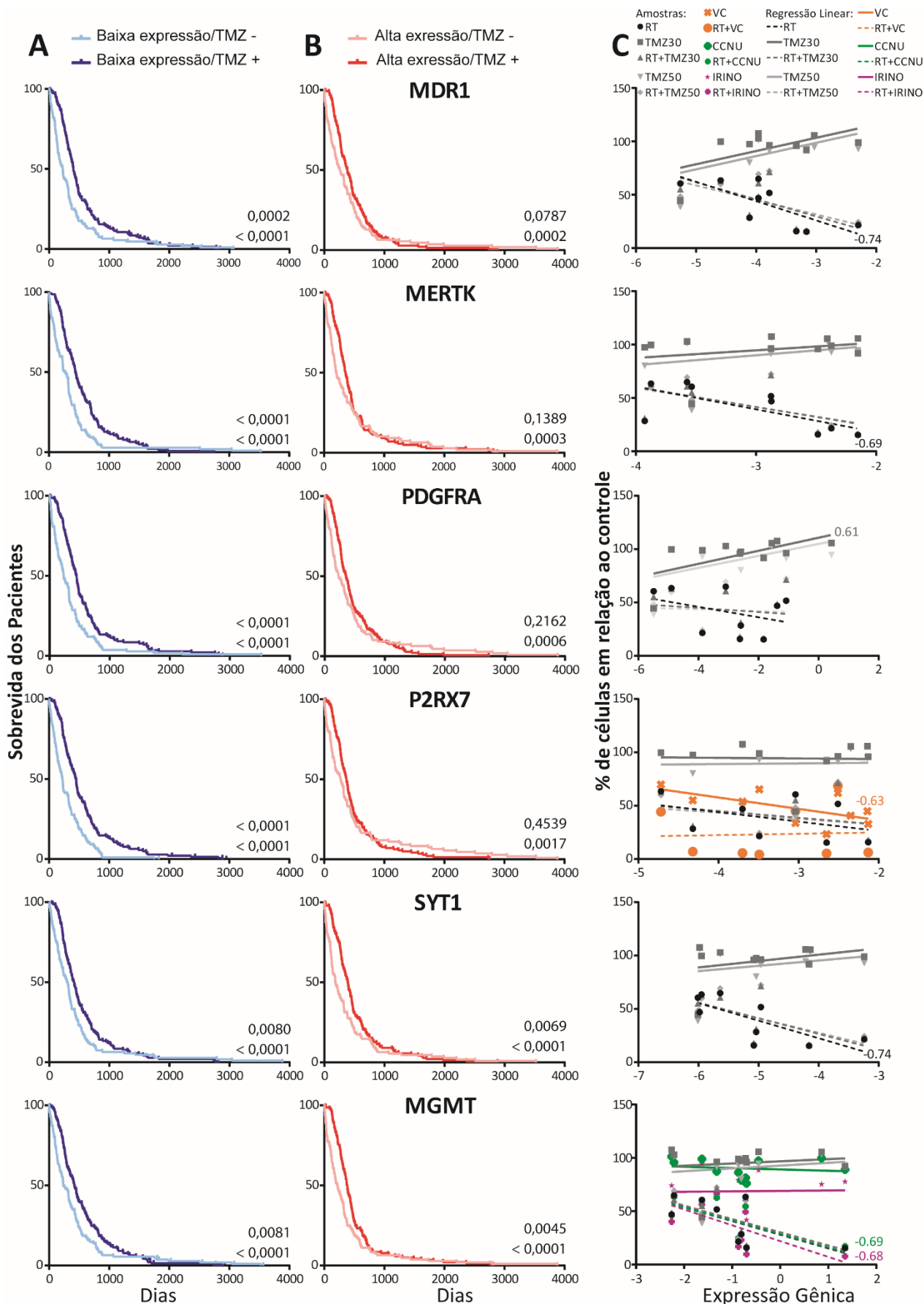
Análises do banco de dados disponibilizado pelo projeto que catalogou mais de 500 GBMs humanos (TCGA) revelam que a expressão gênica pode correlacionar com a sobrevivência dos pacientes. Utilizando esse banco de dados e segregando os pacientes que receberam e não receberam TMZ quanto a expressão de alguns genes, podemos observar o impacto desses no tratamento padrão. No artigo publicado apresentamos as curvas de sobrevivência dos pacientes com baixa e alta expressão (abaixo ou acima da mediana) de FGFR3 e AKT2 no tumor, e como a expressão combinada desses marcadores pode classificar um subgrupo de pacientes que não se beneficia do tratamento padrão na clínica e potencialmente se beneficiaria do TVM (associação de TMZ, VBL e MBZ proposta no artigo).

Além dessa alteração, observamos que os pacientes do TCGA, cujos tumores apresentam alta expressão de MERTK, não tem os mesmos benefícios que os pacientes com baixa expressão desse gene nos tumores, quando tratados com TMZ (Figura 10). Esse dado (ausência de correlação entre expressão desse gene e sensibilidade ao fármaco) também foi encontrado nas culturas primárias testadas *in vitro*. As culturas com maior expressão responderam melhor a radioterapia sozinha e apontam para a nulidade de adicionar o fármaco nesses casos. Juntos, os resultados do TCGA e das nossas culturas primárias, apontam que a expressão de MERTK poderia ser utilizada para desencorajar o uso único da TMZ ou repensar na administração combinada ao inibidor de MERTK Foretinib, ainda em trial clínico (Knubel *et al.*, 2014). Além de MERTK, pacientes com baixa expressão de MDR1 nos tumores também não se beneficiam da terapia

padrão e culturas com baixa expressão desse gene são mais sensíveis a radioterapia sozinha. Quando separamos os pacientes baseados na expressão de PDGFRA dos tumores, observamos que apenas os com baixa expressão se beneficiam do tratamento com TMZ, o mesmo resultado foi encontrado nas culturas, porém, com base apenas na expressão desse gene não poderíamos sugerir uma terapia mais eficaz (Figura 10).

Esse tipo de resultado, precisa ter suas consequências ponderadas: embora a alta expressão de SYT1 e MGMT correlacionem com sensibilidade a radioterapia sozinha e RT+CCNU ou RT+IRINO, respectivamente, dados clínicos indicam que tanto pacientes com baixa quanto pacientes com alta expressão desse gene se beneficiam da TMZ, não levando a necessidade de substituir a terapia padrão por tentativas empíricas de melhorá-la (Figura 10).

*Figura 10 Gráficos de sobrevida de pacientes que receberam, ou não, tratamento com TMZ, utilizando dados do TCGA e segregando pela mediana em A) baixa expressão (tons de azul) ou B) alta expressão (tons de vermelho) de cada gene indicado, para comparar o benefício do tratamento com TMZ. Os valores dentro de cada gráfico de Kaplan Meyer indicam o p-value segundo o teste de Log-rank (Mantel-Cox) e de Gehan-Breslow-Wilcoxon respectivamente. C) apresenta uma correspondência entre os níveis de expressão do mesmo gene nas culturas primárias e a sensibilidade aos diferentes quimioterápicos in vitro. Em C apenas TMZ e os fármacos cujas correlações apresentaram  $p < 0,05$  são mostradas, os números dentro de cada gráfico se referem ao valor de  $r$  e estão na mesma cor do tratamento que representam, a saber: preto = RT (radioterapia), cinza escuro = TMZ30 (temozolomida 30  $\mu$ M), cinza claro = TMZ50 (temozolomida 50  $\mu$ M), laranja = VC (vincristina), verde = CCNU (lomustina), roxo = irino (irinotecano); para cada cor, linhas contínuas referem-se a regressão linear do fármaco sozinho e linhas pontilhadas referem-se a regressão linear do tratamento combinado do fármaco com radioterapia.*



Além desses genes, dados publicados em colaboração com o grupo da Dr. Fernanda Morrone, mostram que o nível de expressão e o silenciamento de P2RX7 correlacionam com a sensibilidade das linhagens de glioma ao ATP e à radioterapia (Gehring *et al.*, 2012; Gehring *et al.*, 2015). Segundo esses resultados, esse receptor purinérgico ativado por ATP responde da mesma maneira ao nucleotídeo e a irradiação: levando a abertura de um poro na membrana celular que leva a morte celular apoptótica. Com base nas culturas primárias analisadas não encontramos essa correlação entre expressão e sensibilidade a radioterapia (Figura 11). É importante lembrar que a capacidade de ativação do receptor e abertura do poro não foi medido nas culturas primárias e que alguns autores sugerem que isso só acontece na presença de P2RX7 acoplado a panexina (cuja expressão não foi mensurada neste trabalho nem nos anteriores), o que poderia explicar o viés encontrado entre as linhagens e as culturas primárias. Nas culturas primárias, podemos observar a correlação entre a expressão de P2RX7 e a sensibilidade a vincristina administrada isoladamente, mas não quando combinada a RT.

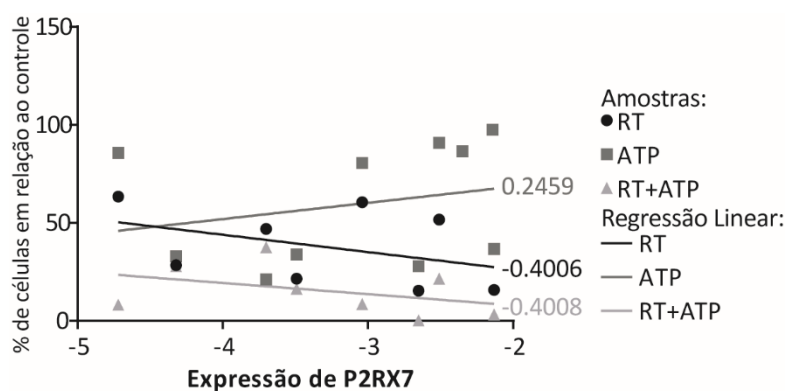


Figura 11 Correlação entre a expressão de P2RX7 e a sensibilidade a radioterapia e/ou ATP *in vitro* nas culturas primárias. Valores de  $r$  estão representados próximo a cada regressão linear, em todos os casos  $p > 0,05$ . RT = radioterapia, ATP = adenosina trifosfato.

#### 4.4.3. Materiais e métodos para expressão induzida de mRNA

Com o intuito de identificar genes que têm sua expressão aumentada, ou marcam células tolerantes a TMZ, a expressão dos mesmos 14 genes citados acima foi analisada após o tratamento. Nesse caso as células foram mantidas por cinco dias com TMZ 30  $\mu$ M, ao fim dos quais foram lisadas com Trizol-clorofórmio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). e seguiram o mesmo protocolo para extração, amplificação e detecção já descrito acima.

A Figura 12 apresenta a variação da expressão entre as diferentes culturas primárias, sendo que, para cada gene, a coluna da esquerda representa o  $\text{Log}_{10}2^{-\Delta\text{CT}}$  (gene alvo-normalizador) na expressão basal



e a coluna da direita nas células tolerantes a TMZ. Quando a expressão basal ou após tratamento não pode ser detectada o resultado está representado fora da escala.

#### 4.4.4. Resultados da expressão induzida de mRNA

Considerando os genes citados, não encontramos correlação entre a sensibilidade a TMZ (% de células remanescentes no 12º dia em relação ao controle) e a variação da expressão que acontece nas células tolerantes ao tratamento ( $\text{Log}_{10}2^{-\Delta\text{CT}_{\text{tratado}}} - \text{Log}_{10}2^{-\Delta\text{CT}_{\text{basal}}}$ ), sugerindo que nenhum desses seria marcador de tolerância, células tronco tumorais e/ou senescência, ou que os mecanismos que levam a resistência nas diferentes culturas primárias são variados.

Mas, quando consideramos apenas as culturas resistentes a TMZ (número de células remanescentes após o tratamento maior que 90% em relação ao controle), aquelas com maior aumento de MGMT depois do tratamento são também as mais resistentes ( $r = 0,63, p < 0,05$ ).

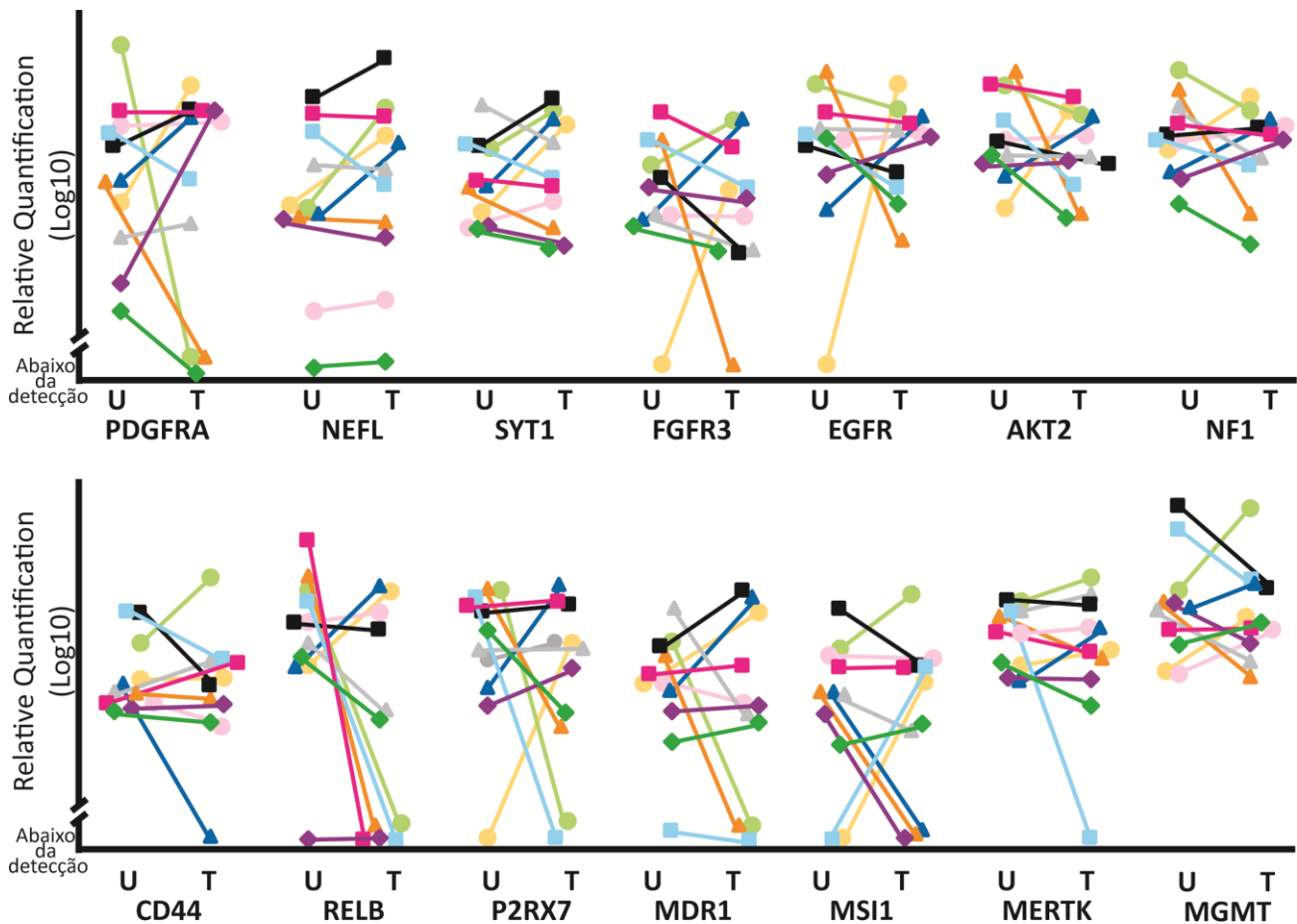


Figura 12 Análise de expressão gênica basal (U) ou induzida/selecionada com cinco dias de tratamento com TMZ 30  $\mu\text{M}$  (T). Valores de  $\text{Log}_{10}\Delta\text{CT}$  em ambas as condições estão representados. Pontos representados no gráfico como abaixo da detecção estão fora da escala e se referem as amostras nas quais não foi possível detectar a expressão nas condições descritas antes e/ou depois do tratamento.  $n=1$  em triplicata

## 4.5. Análises de autofagia e senescência

### 4.5.1. Materiais e métodos para análises de autofagia

A fim de verificar se processos celulares podem estar envolvidos com a resistência à quimioterapia, foi realizada marcação de componentes intracelulares ácidos, que indicam níveis de autofagia 3, 5 e 7 dias após início do tratamento com a terapia padrão para esses tumores (TMZ), além da terapia anteriormente utilizada na clínica, que apresentou bons resultados nos testes de sensibilidade (PCV), e com o fármaco que teve maior eficiência nos testes de sensibilidade *in vitro* (PTX).

Nos dias pré-determinados, as culturas foram ressuspensas com tripsina 0,25%, que foi inativada com meio de cultura (DMEM/F12 + 10% SFB) contendo laranja de acridina (AO, 1 µg/mL = 2,7 µM, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA). Após 15 minutos, no escuro, em temperatura ambiente, a suspensão celular foi analisada em um citômetro de fluxo para medida da relação entre a marcação vermelho/verde (Red-to-Green Fluorescence Intensity Ratio, R/GFIR), conforme já descrito pelo nosso laboratório (Thome *et al.*, 2016). Esse corante é permeável em células viáveis sendo que o fluoróforo verde pode ser detectado em todo o citoplasma, exceto em ambientes ácidos, nos quais ele é protonado e aprisionado. Nessas vesículas o AO emite fluorescência vermelha. Sendo assim, a relação entre as duas fluorescências indica que a célula foi marcada adequadamente e quanto desse corante foi acidificado pode indicar o nível de autofagia.

### 4.5.2. Resultados das marcação com laranja de acridina

A Figura 13 mostra a porcentagem de células acima de um limiar de R/GFIR (AO+ ou R/GFIR+), considerando-se uma autofagia populacional basal em torno de 4 - 5%. Existe uma ampla variação entre a porcentagem de células positivas entre as culturas primárias, mas de maneira geral, TMZ foi menos eficiente em aumentar o número de células autofágicas. PTX foi o mais eficiente tanto em induzir diminuição da população, quanto em aumentar a quantidade de células R/GFIR+, levando a marcação positiva de mais de 50% das células em algumas culturas. Os resultados obtidos com PCV, tanto de diminuição da população quanto de autofagia, foram heterogêneos, abrindo caminho para combinações alternativas que potencializem ambos efeitos.

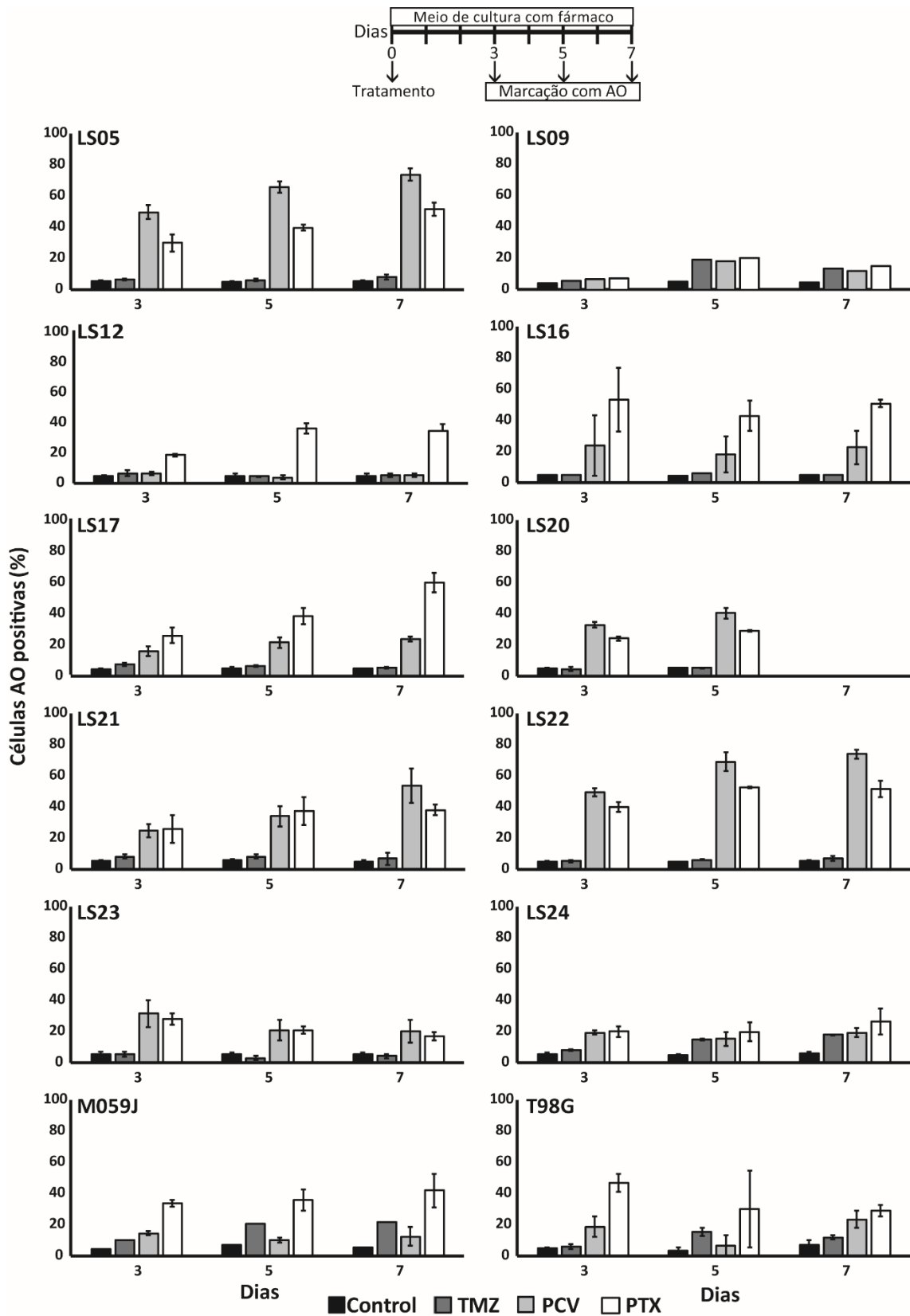


Figura 13 Marcação com Laranja de Acridina após tratamento com os fármacos nos tempos indicados (3, 5 ou 7 dias em contato com o quimioterápico) nas diferentes culturas primárias. São consideradas AO+ as células que atingiram determinado R/GFIR (dupla marcação verde/vermelho). PTX foi o maior indutor de marcação autofágica, enquanto TMZ foi o menor e PCV apresentou níveis variados entre as culturas.

### 4.5.3. Correlação entre autofagia e morte

Além da marcação com AO, uma imunodeteção para proteínas da via da autofagia e da apoptose foi realizado. Cinco dias após os tratamentos citados, as células foram lisadas, quantidades iguais de proteína para cada tratamento foram separadas em gel de acrilamida 12,5%, transferidas para membrana de PVDF e seu conteúdo foi sondado com anticorpos primários (Cell Signaling Technology), marcadores de fluxo autofágico: LC3 (#2775, Anti-LC3B, 1:1000) e p62 (#5114, antiSQSTM1/p62, 1:1000), e morte celular: PARP (#9542, Anti-PARP, 1:1000), incubados *overnight*. A ligação do anticorpo primários aos antígenos foi detectada com a ajuda de um anticorpo secundário anti-rabbit (#7074, 1:2000, incubado por 2h) fusionado a peroxidase, seguidos de incubação com ECL e exposição a filmes de raio-X (Kodak-Xmat), conforme descrito pelo nosso grupo para essas proteínas (Filippi-Chiela *et al.*, 2015; Thome *et al.*, 2016). A marcação da membrana com Comassie Blue foi utilizada para controle de carregamento (LC). Os dados estão representados na Figura 14 e na Figura 15. De maneira geral o número de células ao final do tratamento correlaciona inversamente com o aumento da incorporação de laranja de acridina (R/GFIR+), como pode ser observado na Figura 14, a exceção da LS05 e LS22.

As culturas LS05 e LS12 foram utilizadas em uma triagem de expressão de diferentes proteínas por imunodeteção. Curiosamente não foi possível detectar expressão de p62 por essa técnica na cultura LS05 e o protocolo não pode ser aplicado na LS22 devido ao crescimento mais fastidioso. Esse resultado não foi confirmado por outras técnicas, mas pode explicar o aumento da R/GFIR como uma tentativa fútil de degradação intracelular de organelas e proteínas danificadas após o tratamento. Uma vez que p62 carrega proteínas para a degradação, sua ausência pode levar a formação e fechamento incorreto dos autofagossomos, ou seja, sem que ele esteja carregado adequadamente e depende da função de homólogos dessa proteína, que até onde se tem conhecimento não são capazes de executar as funções da p62 na totalidade (Komatsu *et al.*, 2007; Ichimura *et al.*, 2008).

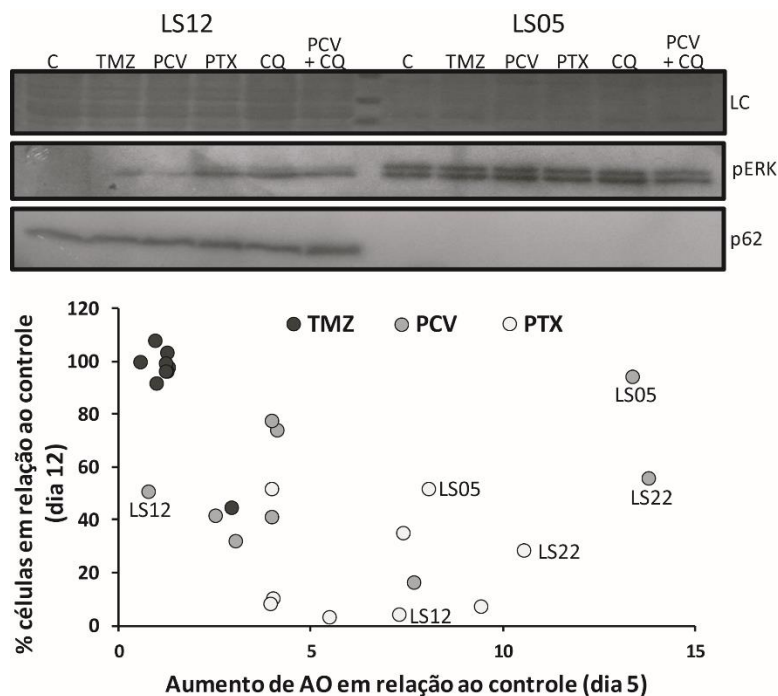


Figura 14 Correlação entre aumento de autofagia e sensibilidade aos quimioterápicos citados. Em destaque a cultura LS12 que apresenta níveis normais de p62 e comporta-se como as demais na correlação entre aumento de morte e aumento de células AO+ e a cultura LS05 que não apresenta p62 e comporta-se de maneira anômala. pERK está representada como controle positivo para imunomarcção na membrana. LS22 também está destacada por diferenciar-se das demais na marcação com AO.

O gene que codifica para p62, denominado SQSTM1, localiza-se no cromossomo 5q35.3, nenhum dos outros genes que foram analisados localizam-se nesse cromossomo, o que poderia sugerir deleção de grandes porções nesse braço. Embora deleções de p62 não sejam frequentemente relatadas na literatura, observações de alterações no número de cópias de SQSTM1 na plataforma UCSC Cancer Browser (disponível em <https://genome-cancer.ucsc.edu/proj/site/hgHeatmap/>, acessado em junho de 2017) sugerem que essa deleção é mais frequente em tumores do subtipo proneural com fenótipo G-CIMP. Esse subtipo caracteriza-se por ser mais comum em adultos jovens e tem bom prognóstico, além disso, o fenótipo G-CIMP é mais comum em tumores de baixo grau, e glioblastomas secundários (Olar e Aldape, 2014), características encontradas no paciente cujo tumor deu origem a cultura LS05 (29 anos ao diagnóstico em 2012 quando foi ressecado pela primeira vez, 30 anos quando houve a ressecção para obtenção da LS05). Para confirmar esse fenótipo nesse tumor precisaríamos realizar sequenciamento desta região e de IDH1/2 (frequentemente mutado nesses casos).

#### 4.5.4. Materiais e métodos para o bloqueio da autofagia

Ao verificar que diferentes culturas primárias induziam diferentes níveis populacionais de autofagia após os tratamentos citados acima, principalmente quando tratadas com PCV, um bloqueador

do fluxo autofágico foi administrado juntamente ou após os fármacos citados, para avaliar seus efeitos no crescimento da população. Cloroquina é um bloqueador clássico, do final dessa via, impedindo a acidificação dos lisossomos (ao nível desejado de pH), e conseqüentemente dos autofagossomos. Resultados de um estudo clínico utilizando esse bloqueador (150 mg/dia, por 12 meses) em combinação com BCNU e radioterapia, após a ressecção cirúrgica em gliomas, revelaram um aumento de 11 para 24 meses na sobrevida. Embora sem diferença na taxa de morte, mostrou-se boa tolerabilidade ao tratamento, sem informar concentração plasmática atingida (Sotelo *et al.*, 2006). Esse fármaco já vem sendo administrado para o tratamento de malária há várias décadas, e medidas em pacientes portadores desse parasita demonstram que após a administração de 10 mg/kg a concentração plasmática varia entre 65 ng/ml (126 nM) e 263 ng/ml (510nM) (Walker *et al.*, 1983), embora haja grande divergência entre os relatos (e dentro de um mesmo relato) e as concentrações plasmáticas sejam mais baixas em pacientes mais jovens (Maitland *et al.*, 1997). Há divergências entre os autores, se concentrações tão baixas seriam capazes de inibir a autofagia, sendo que concentrações comumente usadas *in vitro* variam entre 10 – 30  $\mu$ M (Bristol *et al.*, 2013) até 75  $\mu$ M (Geng *et al.*, 2010). Por não acreditar que resultados *in vitro* com doses tão altas possam ter valor preditivo do que aconteceria no tumor do paciente, optamos por utilizar a concentração de 100 nM e mantê-la em contato com as células pelo mesmo período que o outros quimioterápicos administrados.

O bloqueio causado pela adição de cloroquina (CQ) não pode ter seu efeito avaliado na citometria de fluxo com marcação de laranja de acridina, pois sua adição ocasionou deslocamento geral da população duplamente marcada na citometria de fluxo, sem refletir aumento do fluxo autofágico. Isso acontece porque, embora o mecanismo de ação da CQ seja dependente do bloqueio da acidificação do lisossomo, ainda há aumento de tamanho dos autofagolisossomos suficiente para ocorrer a entrada e protonação do corante, que emite fluorescência vermelha, com aumento ou não do pH em questão (Thome *et al.*, 2016). Para contornar esse viés metodológico, escolhemos o tratamento com maior variação de marcação com AO e morte e combinamos com CQ (PCV+CQ) para análises da lipidação de LC3 e da degradação de p62 pela imunodeteção, no quinto dia de tratamento, conforme já descrito acima. Rapamycin (R0395), BafA1 (B1793), TMZ (T2577), Hoechst 33258 (B1155) and the fluorescent dye Acridine Orange hemi(zinc chloride) salt (A6014) were purchased from.

#### 4.5.5. Resultados do bloqueio da autofagia

Os resultados obtidos com a técnica de imunodeteção, 5 dias após o início do tratamento estão mostrados na Figura 15. A combinação Rapamicina + Bafilocina (compradas da Sigma-Aldrich) foi utilizada

como controle positivo da indução e do bloqueio da autofagia e de clivagem de PARP (cPARP), esperando-se assim aumento da banda em p62, aumento da banda inferior de LC3 (referente a isoforma lipidada) e aumento da banda inferior de PARP (referente a isoforma clivada), com esse tratamento, administrado apenas 24 horas antes da lise das células. Podemos observar ampla variação entre as culturas. Não foi possível realizar a detecção de algumas proteínas em algumas culturas (representadas como retângulos em branco na coluna da direita). De maneira geral o tratamento com TMZ não gerou alterações nas imunomarcações, como era esperado, uma vez que praticamente não diminuiu a população nem teve expressiva marcação com laranja de acridina. PTX e PCV aumentaram os níveis de p62, sugerindo menor degradação de proteínas pelo processo autofágico. As marcações de LC3 foram fracas e dificultam as interpretações. Não podemos concluir em qual passo do fluxo há bloqueio, mas aumentos de incorporação de laranja de acridina (na coluna da esquerda) sugerem que provavelmente houve formação de autofagolisossomos, mas não houve degradação, exceto na LS20, onde não houve aumento de p62. Essa hipótese pode ser reforçada comparando com os resultados após a adição de cloroquina, um bloqueador clássico desse passo final e que apresenta bandas de intensidade semelhante tanto sozinha quando combinada ao tratamento com PCV; e pelo fato de que as bandas de p62 detectadas após o tratamento de PCV+CQ são mais intensas que aquelas encontradas no controle positivo de indução e bloqueio (Bafilo + Rapa).

#### 4.5.6. Materiais e métodos para análises de senescência

Dados da literatura sugerem que há uma relação à nível populacional entre os níveis de autofagia e senescência, sendo que a primeira, de maneira pulsada e controlada, parece ser necessária para o desfecho da segunda (Kang *et al.*, 2015). Dados do nosso grupo, após o seguimento de células individuais marcadas com GFP-LC3, não confirmam esse achado a nível celular. Levando em consideração que os achados de correlação entre morte e autofagia também são populacionais, realizamos a busca de correlação entre autofagia e senescência nesse nível após oito dias de tratamento (cinco dias em contato com o fármaco seguidos de 3 dias em meio livre de droga). No tempo indicado, a monocamada de células foi lavada 1x com PBS, fixada com paraformaldeído 2% por 10 minutos, e os núcleos corados com DAPI 300 nM por 10 minutos. Em torno de 100 núcleos fluorescentes (variando entre 70 nos tratamentos mais agressivos e 150 nos controles) foram fotografados em microscópio invertido Zeiss no aumento de 200x.

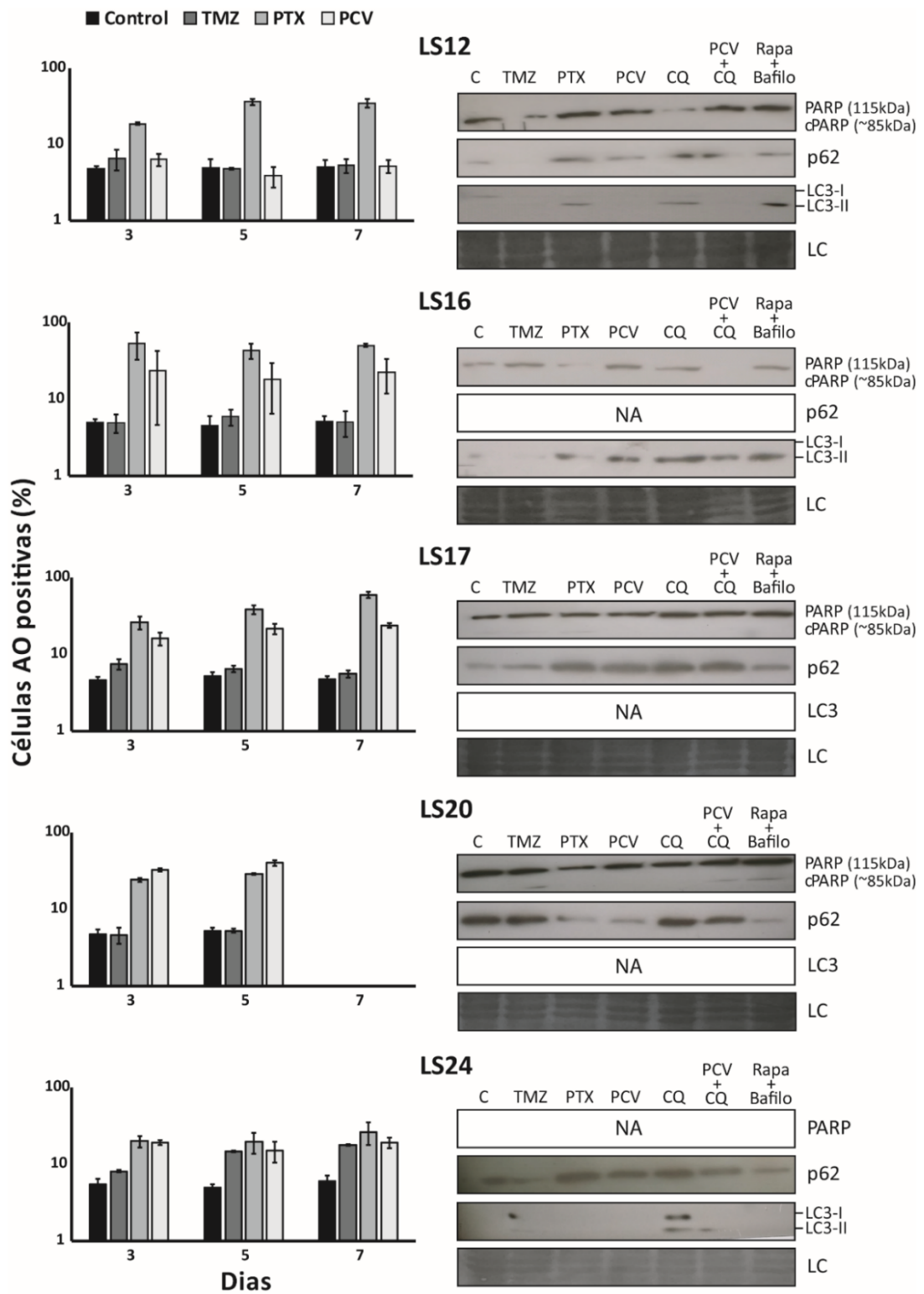


Figura 15 Comparação entre a indução de autofagia (coluna da esquerda) nos tempos indicados para cada tratamento medidos através da incorporação de laranja de acridina e indução e bloqueio com cloroquina (coluna da direita) medidos através do imunocnteuído de p62 e lipidação de LC3. Imunodeteção de PARP clivada correlaciona inversamente com aumentos nos níveis de autofagia, sugerindo que esse pode ser mecanismo de evasão a apoptose. cPARP: PARP clivada



As análises morfométricas nucleares, foram realizadas conforme metodologia descrita pelo nosso grupo (Filippi-Chiela *et al.*, 2012), com o auxílio do software ImageProPlus, utilizando a planilha disponível em <http://www.ufrgs.br/labsinal/NMA/> para categorização dos núcleos. Essa metodologia, além de senescência também qualifica e quantifica os núcleos quanto a catástrofe mitótica (mostrados no gráfico como irregulares) e apoptose.

#### 4.5.7. Resultados das análises morfométricas nucleares

Como podemos observar na Figura 16, o tratamento com TMZ induziu pouca diminuição na população 12 dias após o início do tratamento (5 dias em contato com o fármaco seguidos de 7 dias em meio livre de droga) de quase todas as culturas analisadas, exceto na LS24, e essa baixa eficiência é acompanhada por inefetiva alteração nos parâmetros das culturas LS05, LS12, LS16, LS17 e LS20.

PTX age sobre microtúbulos e impede a correta segregação cromossômica, o que pode levar a catástrofe mitótica (representada nos gráficos como núcleos irregulares) ou senescência. De maneira geral, a resposta não foi homogênea entre as culturas, pois observamos uma alternância entre o aumento de núcleos irregulares e senescentes após esse tratamento. Outro fármaco com resposta variável foi o PCV, o qual já tinha mostrado respostas diferentes dependendo da cultura analisada nos outros parâmetros mostrados acima. PCV induziu, por exemplo, semelhantes porcentagens de células AO+ e de diminuição do número total de células nas culturas LS16, LS17 e LS24 (Figura 13), mas maior porcentagem de senescência apenas na LS17 (Figura 16).

A combinação de PCV + CQ, que teve resposta relativamente homogênea na marcação para p62 (Figura 15) apresentou uma gama de resultados na análise nuclear. CQ sozinha teve efeito praticamente nulo sobre LS05, LS12, LS17, LS20 e LS24. Porém foi capaz de aumentar a porcentagem de células senescentes quando combinada com PCV nas culturas LS05, LS12, LS16 e de núcleos irregulares na LS16 e LS24.

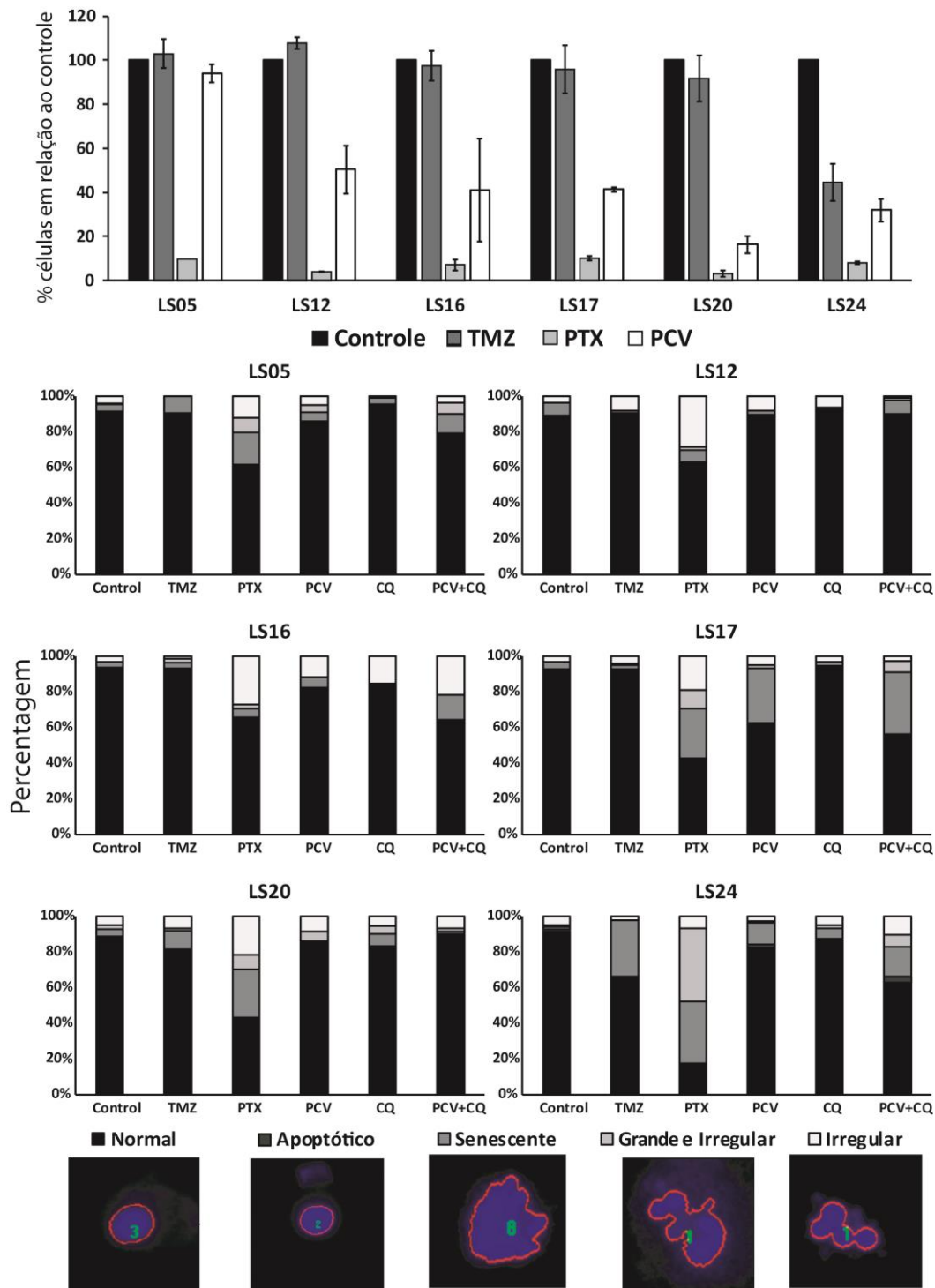


Figura 16 Comparativo entre sensibilidade aos quimioterápicos e mecanismos celulares. Após cinco dias de tratamento as células foram mantidas por mais sete dias em meio livre de droga e a porcentagem total de células em relação ao controle está representada na parte superior. No oitavo dia, uma parte da população teve seus núcleos analisados para categorizar fenômenos que culminam na diminuição do número final de células. Um exemplo de cada categoria de núcleo medido é mostrado. TMZ teve pouco efeito em induzir alterações ao longo do período, exceto na linhagem LS24. Porém PTX aumentou a quantidade de núcleos irregulares, sinônimo de catástrofe mitótica, que pode explicar a diminuição do número final de células. A adição de CQ ao tratamento com PCV levou ao aumento de senescência.

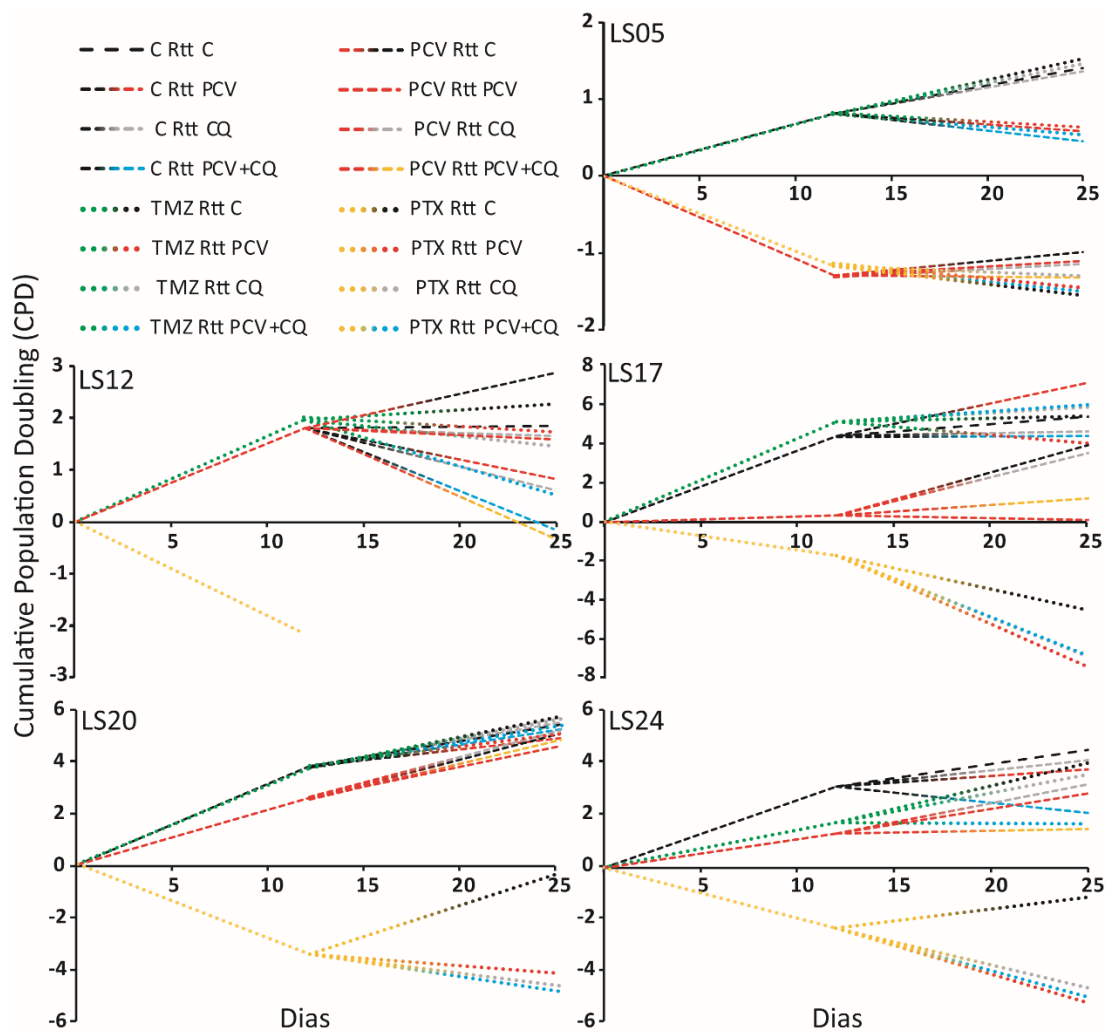
#### 4.5.8. Materiais e métodos para análise de sensibilidade após bloqueio de autofagia

Para saber se esse bloqueio causado pela combinação de CQ a PCV é mais eficiente na redução do número final de células que os dois fármacos isolados, foram realizados experimentos de crescimento populacional cumulativo com o retratamento das culturas. O desenho experimental foi semelhante ao descrito acima (na seção 4.3.6 Materiais e métodos para análise da sensibilidade ao retratamento, da página 68), mas nesse caso as células foram tratadas primeiramente com TMZ, PCV ou PTX e na segunda rodada receberam PCV, CQ ou PCV+CQ. Em ambas as rodadas de tratamento as células permaneceram em contato com o fármaco por cinco dias, seguidos de meio livre de fármaco por mais 7 dias. Doze dias após o início do primeiro tratamento as células foram ressuspensas, uma parte foi contada em citômetro de fluxo e o restante foi dividido em 4 partes iguais, cada uma dessas partes foi tratada, após a adesão das células (~24 horas depois da ressuspensão), com uma das seguintes condições: DMSO, PCV, CQ ou PCV+CQ durante cinco dias. Ao final desse período as culturas permaneceram mais 7 dias em meio livre de droga antes da medida do número final de células.

#### 4.5.9. Resultados populacionais do bloqueio de autofagia

Os resultados dos retratamentos com PCV, CQ e PCV+CQ estão representados na Figura 17 sendo variável entre as culturas. Novamente, os efeitos de diminuição da proliferação causados por PCV são maiores nas culturas que tem maior porcentagem de células AO+. De maneira geral, CQ administrada sozinha após uma rodada de tratamento parece não ter efeito sobre o crescimento do tumor, especialmente quando administrado após TMZ, já a combinação de PCV + CQ na segunda rodada apresenta resultados eficientes, principalmente quando feita após PTX, mas não parecem seguir um padrão de eficiência.

*Figura 17 Crescimento cumulativo após o tratamento por cinco dias com TMZ, PCV ou PTX e contagem no décimo segundo dia (primeira flexão nos gráficos), seguidos por replaqueamento e segunda rodada de tratamento com PCV, CQ ou PCV+CQ (segunda flexão nos gráficos).*



## 4.6. Resultados gerais

Com base nos resultados de análises celulares e de expressão gênica não pudemos encontrar um único padrão ou marcador que pudesse ser generalizado para todas as culturas. Cada uma das linhagens derivadas de pacientes tiveram um comportamento próprio, e de maneira geral, diferente das demais. Um aumento do número amostral, a fim de contemplar a heterogeneidade dos tumores, poderia ajudar a definir padrões de resposta melhores.

Podemos utilizar a LS24 como exemplo, já que foi a única linhagem sensível a TMZ nos testes de contagem do número de células, onde os demais parâmetros analisados após esse tratamento convergem para um forte efeito em todos os níveis, tanto de autofagia, quanto indução de senescência e alterações de expressão de alguns genes, mas cujos resultados não puderam ser confirmados com sugestão de mecanismos gerais de ação que possam ser extrapolados, uma vez que não puderam ser comprovados com outras culturas primárias.

## 5. ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico intitulado “Vinblastine and antihelmintic mebendazole potentiate temozolomide in resistant gliomas” foi publicado no periódico *Investigational New Drugs* (ISSN: 0167-6997 (Print) 1573-0646 (Online)), com fator de impacto: 3.484.

O início desse estudo foi feito pelo dr. Andrew Oliveira Silva, que durante a sua tese de doutorado buscou associações de fármacos capazes de potencializar o efeito da TMZ, em linhagens celulares. Como pode-se observar na Figura suplementar 2 do artigo, a associação de MBZ ou VBL a TMZ foi capaz de eliminar algumas linhagens parcialmente sensíveis a esse último fármaco. Apenas uma linhagem comercial humana (U138) dentre as 5 testadas não pode ser eliminada com a dupla combinação (TV ou TM), levantando a necessidade de uma tripla combinação para retardar o crescimento após tratamento. Nesse artigo, combinando os dados de linhagens celulares com os dados em culturas primárias, mostramos como a tripla associação entre TMZ, VBL e MBZ (TVM) é mais eficiente em potencializar o efeito do tratamento padrão, mesmo em culturas parcialmente resistentes a TMZ.

Os resultados mostraram que a combinação de TVM, em concentração próximo a plasmática de cada fármaco, é capaz de eliminar ou retardar o aumento populacional, induzir parada no ciclo e senescência, sendo esse efeito mais pronunciados em células com baixa expressão de FGFR3 e AKT2. Quando níveis de expressão desses genes (FGFR3/AKT2) foram analisados no banco de dados do TCGA observamos que pacientes cujos tumores tem menor expressão de ambos genes tem uma resposta nula ao tratamento com TMZ. Esses resultados combinados encorajam a seleção desse grupo de pacientes (FGFR3<sup>Low</sup>/AKT2<sup>Low</sup>) para futuros estudos utilizando vimblastina e mebendazole como adjuvantes da TMZ.

## Vinblastine and antihelminthic mebendazole potentiate temozolomide in resistant gliomas

Franciele Cristina Kipper<sup>1,2</sup> · Andrew Oliveira Silva<sup>1,2</sup> · André Luis Marc<sup>3</sup> ·  
Gláucia Confortin<sup>3</sup> · Augusto Valadão Junqueira<sup>3</sup> ·  
Eliseu Paglioli Neto<sup>3</sup> · Guido Lenz<sup>1,2,4</sup> 

Received: 3 July 2017 / Accepted: 15 August 2017  
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

**Summary** Glioblastoma (GBM) is a very aggressive tumor that has not had substantial therapeutic improvement since the introduction of temozolomide (TMZ) in combination with radiotherapy. Combining TMZ with other chemotherapeutic agents is a strategy that could be further explored for GBM. To search for molecular predictors of TMZ resistance, the TCGA (The Cancer Genome Atlas) database was utilized to assess the impact of specific genes on TMZ response. Patients whose tumors expressed low levels of FGFR3 and AKT2 responded poorly to TMZ. Combination treatment of vinblastine (VBL) plus mebendazole (MBZ) with TMZ was more effective in reducing cell number in most cultures when compared to TMZ alone, especially in cells with low expression levels of FGFR3 and AKT2. Cell cycle distribution and nuclear morphometric analysis indicated that the triple combination of TMZ, VBL and MBZ (TVM) was able to induce polyploidy and senescence, in addition to increasing the Notch3 RNA

level in patient-derived gliomas. Thus, this set of data suggests that the triple combination of TMZ, VBL and MBZ may be a considerable therapeutic alternative for the TMZ-tolerant gliomas that harbor low expression of FGFR3/AKT2.

**Keywords** Glioblastoma · Temozolomide · Vinblastine · Mebendazole · Long-term analysis

### Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most common and aggressive adult brain cancer, and in the past decades, all advances in therapeutic development for this tumor have resulted in little improvement in overall survival (OS) and life quality for patients, in part due to the restricted access to several drugs imposed by the blood-brain barrier (BBB). Surgery remains the most effective treatment modality for this cancer, as few chemotherapeutic interventions significantly improve progression-free survival (PFS) and OS [1, 2]. Radiotherapy (RT) is the most accepted adjuvant beneficial therapy [3] and is normally followed by TMZ treatment, which can be orally administered and normally has mild side effects. TMZ combined with RT leads to an OS of 14.6 months versus 12.1 months for RT alone [4]. Since 2005, when it replaced the PCV cocktail, a combination of two alkylating (procarbazine and CCNU) and one anti-microtubule (vincristine) agent, TMZ treatment has been used as the standard chemotherapy to treat GBM patients [5]. Despite the increase in PFS and OS observed from PCV + RT when compared to RT alone, especially for low-grade gliomas (LGG) [6], several studies have shown therapeutic advantages of TMZ compared to PCV [4, 7, 8], such as weaker side effects [9, 10], greater efficacy when associated with RT [11] and greater efficacy in almost all subtypes of glioma patients [4, 11–13].

Franciele Cristina Kipper and Andrew Oliveira Silva contributed equally to this work.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10637-017-0503-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Guido Lenz  
lenz@ufrgs.br

<sup>1</sup> Department of Biophysics, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS 91509-900, Brazil

<sup>2</sup> Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS 91509-900, Brazil

<sup>3</sup> Department of Neurosurgery, São Lucas Hospital, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup> Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43431 Lab 115, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

There are hundreds of clinical trials aimed at identifying TMZ adjuvants or substitutes, including new inhibitors and monoclonal antibodies or even old drugs, part of the so-called repurpose programs [1, 2, 14]. This includes nitrosoureas, vinca-derived alkaloids, taxanes and platinum-based antineoplastic drugs or other agents, such as valproic acid and mebendazole (MBZ) [14–16].

In general, vinca-derived alkaloids interact with tubulin subunits at nanomolar concentrations, blocking polymerization and microtubule assembly, leading to cell cycle arrest and apoptosis [17]. Vinblastine (VBL), a member of this family of molecules, also acts on the cancer microenvironment through an antiangiogenic mechanism [18, 19]. LGG, as well as a broad range of cancers, are treated with VBL [19, 20] with limited side effects and a good therapeutic response [18].

Mebendazole, a benzimidazole-derived drug, is a well-known drug used in helminthic therapy that significantly permeates the BBB, being used to treat cystic echinococcosis and other parasites found in the central nervous system (CNS) [15]. MBZ is an anti-microtubule agent that has been tested in several pre-clinical models of human cancers [15], including GBM [21]. MBZ was tested in three phase I clinical trials: two of them evaluating it in combination with TMZ, one to treat GBM (NCT01729260) and another to treat recurrent/progressive pediatric brain tumors (NCT02644291); a third trial assessed MBZ in combination with vincristine, carboplatin, irinotecan, and bevacizumab, including low and high-grade glioma (NCT01837862). The results of these clinical trials remain unpublished ([ClinicalTrials.gov](http://ClinicalTrials.gov) was accessed in April 2017).

In this study, we show that the combination of TMZ with VBL and MBZ (TVM) reduced the number of cells in GBM cell lines and patient-derived glioma cell cultures, decreased G1 phase subpopulations and led to an accumulation of polyploid cells. TVM treatment also increased the proportion of cells with a senescent phenotype and increased Notch3 RNA expression. Moreover, we observed a correlation between FGFR3 and AKT2 RNA expression and the level of tolerance to TVM treatment. These data can be used to screen for potentially eligible patients to be treated with these drugs.

## Material and methods

### TCGA data

Gene expression and clinical data for GBM were downloaded from <https://genome-cancer.ucsc.edu/> (January 2017). Gene expression subgroups were divided using the median expression value. Patients who received at least one administration of TMZ were considered TMZ+. The impact of gene expression on patient prognosis was evaluated using the Kaplan-Meier (KM) method, and statistical analyses were

performed using GraphPad Prism 6 software. A log-rank test and Gehan-Breslow-Wilcoxon test were performed, and both *p* values are shown. The former equally weights every death, while the latter gives more weight to deaths at early time points.

### Cell culture and drugs

Human GBM cell lines U87, A172, U251, and U138 and murine GBM cell line C6 were obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). U343 cells were generously provided by Dr. Paulo Roberto Dauria Vieira de Godoy (Department of Genetics, University of São Paulo (USP), Brazil) [22]. Cells were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) with low glucose and supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin and 0.1% amphotericin B at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. All culture material and reagents were purchased from Gibco Laboratories (Grand Island, NY, USA).

Patient-derived cell cultures were obtained from patients who submitted to surgical resection at São Lucas Hospital from Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), in accordance with the appropriate guidelines and ethical protocols (Ethical committee approval protocol at UFRGS: 420.856 and at PUCRS: 429.849) and after obtaining informed consent. Tumor samples were classified according to World Health Organization (WHO) criteria (Supplementary Table 1). Immediately after surgery, tumors were placed in a sterile test tube containing CMF glucose buffer supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), kanamycin (25 µg/mL) and amphotericin B (0.63 µg/mL). Tumor samples were transferred to the cell culture laboratory at room temperature. Within 1 to 3 h after collection, tumors were washed, minced, and mechanically dissociated into single cells. Red blood cells were partially eliminated by centrifugation. Tumor cells were cultured in DMEM/F-12 media supplemented with 10% FBS at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator and used only after at least two passages.

TMZ, VBL and MBZ were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Acros Organics, NJ, USA). In patients, an administration of 100–250 mg/m<sup>2</sup> of TMZ leads to a plasmatic concentration of 30–70 µM during 5 days [23]. VBL is clinically administered through intravenous injection or infusion at a concentration of 6 mg/m<sup>2</sup> [18], leading to a plasmatic concentration of 2.3–5.0 ng/mL (~2.5–5.5 nM) [20], and one single administration of MBZ at 10 mg/kg produced a plasmatic concentration from 17.5 to 500 ng/mL (~59.3–1690 nM) [24]. Therefore, concentrations of 50 µM for TMZ, 5 nM for VBL and 500 nM for MBZ were chosen to be used in these studies. Isolated or combined treatments were



added to the culture medium as a single dose at day zero and kept for 5 days, in accordance with the standard schedule of TMZ administration in GBM patients [4]. After the drug exposure period, remaining cells were kept in drug-free medium until the end of experiments.

#### Acute sensitivity and cumulative population doubling (CPD)

Human cell lines were seeded at a density of  $1.5 \times 10^4$  cells/well and C6 cells at a density of  $0.8 \times 10^4$  cells/well in 12-well plates and were then treated and analyzed. On specific days, cells were trypsinized, and a small proportion was used to measure the number of cells by flow cytometry. Another proportion of the same sample was reseeded to evaluate the long-term proliferation profile. This process was repeated whenever the cell culture reached a confluence of 80%. Acute sensitivity was obtained through the ratio between the absolute number of cells in the treated groups in relation to the control on day 5. The long-term proliferation profile was performed through the cumulative population doubling (CPD) assay, where the initial and the final values of cells in each time interval were plotted in a formula:  $PD = (\ln(FN) - \ln(IN)) / \ln 2$ , where FN and IN are the final and the initial number of cells in a given interval, respectively [25]. The sum of successive population doubling (PD) values gave rise to the CPD that was plotted in a graph versus days in culture.

#### Cell cycle analysis

Cells were treated over the course of 5 days as indicated above. On the last day of treatment, supernatants and adherent cells were collected, washed twice with PBS and fixed in cold ethanol 70% v/v for 1 h. Fixed cells were washed with PBS, and DNA content was stained with PSS1 solution (0.0014  $\mu$ L/mL Triton X-100, 20 mg/mL RNase, 12 mg/mL PI diluted in PBS) for 45 min at room temperature. Cell cycle distribution was measured in a GUAVA flow cytometer and analyzed in GUAVA Cytosoft software (Millipore, Billerica, MA).

#### Nuclear morphometric analysis (NMA)

Cells were treated for 5 days and maintained for an additional 3 days in drug-free medium, fixed with paraformaldehyde 4% (v/v) for 30 min at room temperature and stained with 300 nM DAPI in PBS for 30 min. Fluorescent nuclei images were quantified using the software Image-Pro Plus 6.0 (IPP6 - Media Cybernetics, Silver Spring, MD). The percentage of normal, small, large and regular, large and irregular and irregular nuclei were evaluated and classified as previously described [26].

#### Gene expression analysis

Total RNA from GBM cell cultures was extracted using TRIZOL (Sigma-Aldrich), and 5  $\mu$ g were used to prepare cDNA with M-MLV (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's protocol. qPCR was performed in a total reaction volume of 20  $\mu$ L, including 10  $\mu$ L of GoTaq® qPCR Master Mix, 2  $\mu$ L of primers (5  $\mu$ M), and 8  $\mu$ L of cDNA (diluted 1:30 in basal primary cultures and control cortex RNA). The reactions were performed in an Illumina Eco qPCR System and analyzed using the EcoStudy Software. The cycling parameters for PCR were as follows: (1) an initial denaturation step of 2 min at 95 °C; (2) 40 cycles consisting of 10 s at 95 °C, 15 s at 60 °C and 15 s at 70 °C; and (3) 15 s at 70 °C. Gene expression experiments were performed in triplicate, fold changes were calculated considering GUSB as the reference gene, and Total Brain Parietal Cortex RNA (Agilent Technologies, USA) was used as the control condition for basal expression experiments. For gene expression after 5 days of TVM treatment, the same reaction protocols were performed, but DMSO-treated cells were used as the control condition.

#### Statistical analysis

All correlations and linear regressions were performed using GraphPad Prism 6 software. Survival KM were plotted and analyzed in the same program.

## Results

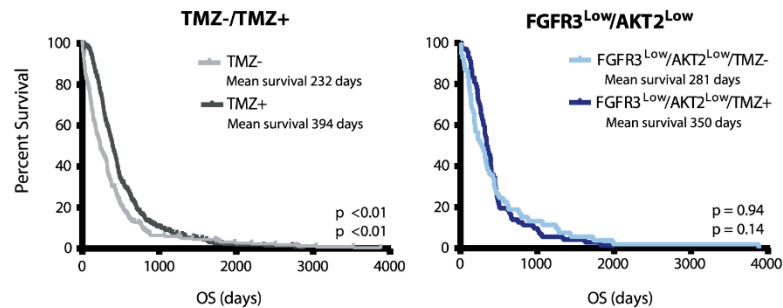
### Genetic profile can predict response to TMZ in GBM patients

We performed TCGA databank analysis to find genes that predict resistance of GBM patients to TMZ. TMZ treatment increased the OS when all patients were considered (Fig. 1, left); however, TMZ had no impact on OS for the 25% of patients whose tumors had expression levels of AKT2 and FGFR3 below the median value (Fig. 1, right). Notwithstanding, in tumors with high expression of either FGFR3 or AKT2, TMZ was effective in increasing patient survival (Supplementary Fig. 1). Individually, none of the other genetic markers analyzed predicted patients' resistance to TMZ (Supplementary Fig. 1).

### TMZ-resistant glioma cells are sensitive to the combination of VBL, MBZ and TMZ

To find pharmacological candidates able to potentiate the effect of TMZ, patient-derived cultures and GBM cell lines were treated with a broad range of chemotherapeutic agents in combination with TMZ. Among these treatments, VBL and MBZ





**Fig. 1** FGFR3 and AKT2 expression affect response to TMZ. Left: Survival of TMZ-treated (TMZ+) and untreated (TMZ-) patients from the TCGA database. Right: Survival of TMZ+ and TMZ- patients with

FGFR3 and AKT2 expression below the median value (Right). *p*-values are indicated for Log-rank (upper) and Gehan-Breslow-Wilcoxon (Lower) test

were previously shown to have acute antitumor properties as single agents against GBM cell lines [18, 20, 21]. Cell lines partially sensitive to TMZ alone were entirely ablated by combining TMZ with VBL (TV) or MBZ (TM) (U87 in Fig. 2a and U251, U343, and A172 in Supplementary Fig. 2). However, when TV and TM double combinations were used in the TMZ-tolerant GBM cell lines U138 and C6 [27], the effects on cell growth were less dramatic, as was the case in most of the patient-derived glioma cultures (Fig. 2a). Therefore, a triple combination of TMZ, VBL and MBZ (TVM) was tested. The CPD assay indicated that TVM treatment was more effective than the double combinations in all cell lines. In patient-derived cultures, TVM was as effective as or more effective than double combinations in 5 out of 6 cultures (Fig. 2a and Supplementary Fig. 2). It is important to mention that the concentrations used for VBL (5 nM) [20] and MBZ (500 nM) [24] are in the range of the plasma concentration found in patients.

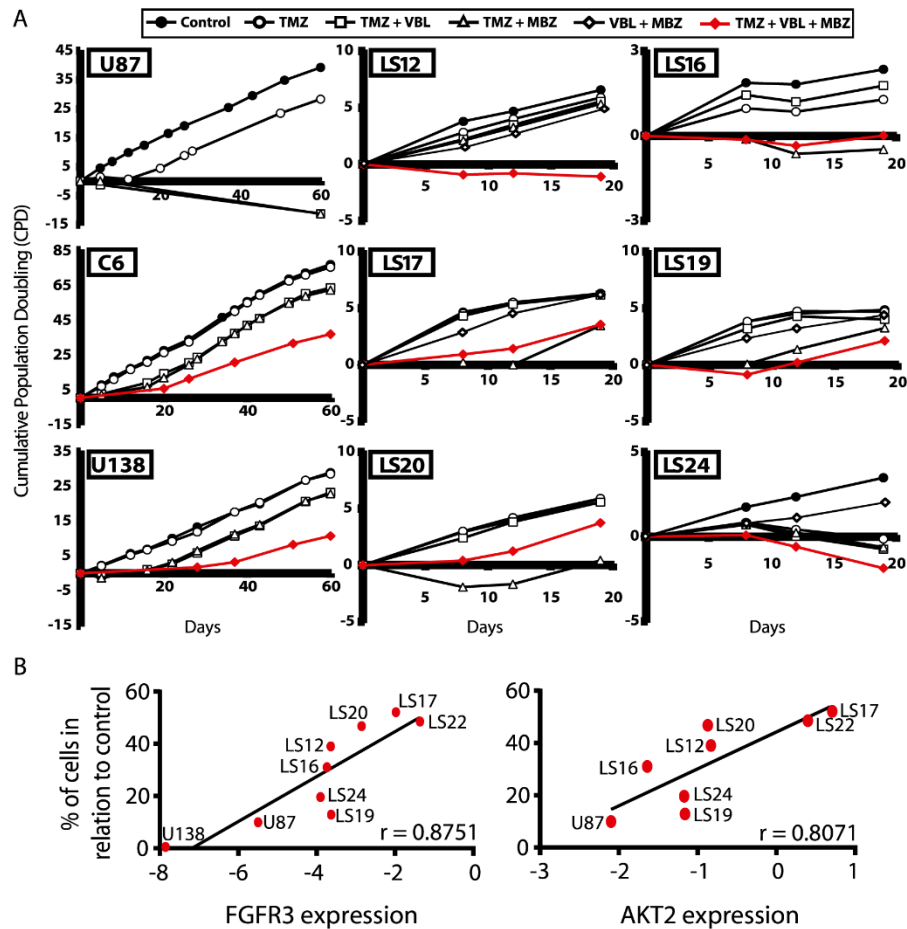
Drug tolerance analysis in patient-derived cultures is not a readily translatable strategy to select patients for specific therapeutic options, as patient-derived cultures are not routine in cancer patient management. However, gene expression analysis from tumor biopsies can be performed in the clinic. Therefore, RNA expression levels were assessed in cell cultures for the same set of genes used in the TCGA databank analysis in order to assist in predicting tumor tolerance to TMZ and to elect the best candidate drugs for adjuvant therapy. Basal expression of FGFR3 ( $r = 0.88, p = 0.002$ ) and AKT2 ( $r = 0.81, p = 0.015$ ) in the cultures (normalized to normal cortex RNA purchased from Agilent) strongly correlated with *in vitro* TVM response, i.e., cultures with high expression of these genes were less sensitive to TVM (Fig. 2b), suggesting that patients whose tumors harbor low expression of these genes could benefit from the TVM combination. Considering other genes, MDR1, MERTK, PDGFRA and P2RX7 expression levels did not separate TMZ responders from non-responders (Supplementary Fig. 1)

and did not correlate with sensitivity to TVM treatment (Supplementary Fig. 3).

#### TVM induces cell cycle arrest, polyploidy and senescence in patient-derived glioma cell cultures

TVM treatment markedly increased polyploidy in LS12 and LS17 lines and led to an increase in G2/M phase in LS24 after 5 days (Fig. 3a). After 8 days, TVM also greatly increased the proportion of cells with large and regular nuclei, a morphological indicator of senescence, in all tested patient-derived cultures (Fig. 3b). LS24 also presented a small increase in other morphological features, such as nuclear irregularity and nuclear condensation (Fig. 3b), indicative of mitotic catastrophe and apoptosis, respectively, which could explain the late decrease in CPD compared to other tested patient-derived cultures (Fig. 2a). Cell cycle distribution and nuclear morphology in LS20 were mildly affected by TVM treatment, in agreement with the small effects observed in the cell proliferation assay (Fig. 2a).

Gene expression changes between treated and untreated cells were quite variable among the analyzed patient-derived cultures. Only Notch3, a gene associated with senescence induction [28], presented high expression in the surviving cell subpopulation when compared to untreated cells (Fig. 3c), in agreement with the morphological phenotype of senescence (Fig. 3b). CDKN1A (p21<sup>WAF1/CIP1</sup>), a cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) that increases in cell cycle arrest and senescence [29], was increased only in LS17 and LS20 cell cultures. When TVM tolerant subpopulations were compared to untreated populations, EGFR and FGFR3, tyrosine kinase receptors, were unaffected and upregulated, respectively, in LS12, LS17 and LS20 cultures, which also presented an unaltered or an increased expression of stem cell markers such as Musashi (MSI1), CD133 and CD44. LS24, the most sensitive patient-derived culture to TVM treatment, presented unaltered



**Fig. 2** Effect of VBL and/or MBZ plus TMZ in long-term analysis in GBM cell lines and patient-derived cell cultures. A) Long-term analysis in six patient-derived GBM cultures and three cell lines treated with TMZ (50  $\mu$ M), VBL (5 nM) and/or MBZ (500 nM) for 5 days, followed by

14 days in drug-free medium. B) Basal expression of FGFR3 or AKT2 in cell lines and patient-derived cell cultures (normalized with RNA expression from adult cortex from Agilent) correlates with the % of remaining cells after TVM treatment

or decreased expression for almost all tested genes, with the exception of Notch3 (Fig. 3c).

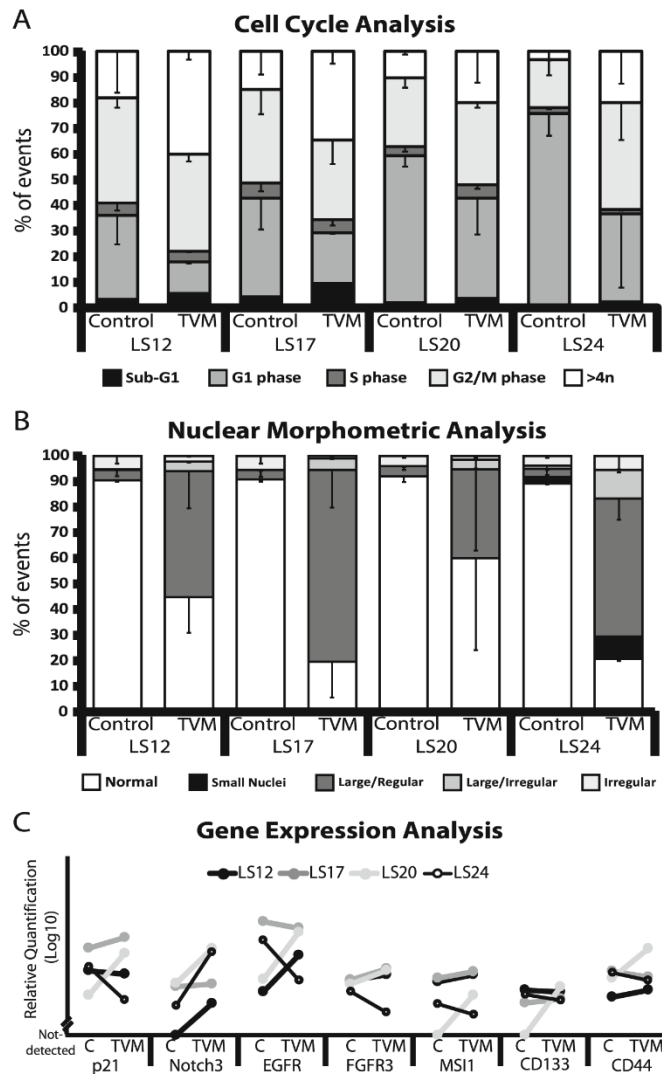
## Discussion

TMZ chemotherapy became quickly accepted as a component of standard therapy for GBM malignancy due to its easy administration schedule and weak side effects, despite a rather small improvement in the overall survival of patients [4]. Resistance to TMZ has a strong association with the status of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) protein expression, but clinical trials designed to inhibit the

activity of this protein have failed to improve the antitumor effects of TMZ [3, 30]. Here, we show that plasmatic relevant doses of VBL and MBZ potentiate the effects of TMZ in glioma cell lines and patient-derived cultures, over periods that are related to the treatment schedules used in the clinic.

In general, VBL and MBZ improved TMZ-induced reduction in the number of cells, and this benefit can be observed over a period of 30 days, even in the TMZ-tolerant cell lines and patient-derived cultures. Previously, it was shown that TMZ and VBL combination, at similar doses to those used in this work, was synergistic on cell damage induction, clonogenicity reduction and cell cycle arrest in glioma neurospheres through a mechanism involving TMZ-induced

**Fig. 3** Polyploidy and senescence phenotypes in primary cultures treated with TVM. **A)** Cell cycle distribution of cells treated with TVM for 5 days. The results are shown as the mean  $\pm$  SD. **B)** Nuclear Morphology of cells after 5 days of treatment plus 3 days in drug-free medium. The results are shown as the mean  $\pm$  SD. **C)** mRNA expression using qPCR of senescent (p21, Notch3), proliferative (EGFR, FGFR3) and stemness (MSH1, CD133, CD44) markers of non-treated cells and cells treated for 5 days with TVM



VBL accumulation inside the cell [31]. The combination of TMZ and VBL was highly effective in four of the six tested GBM cell lines, only failing in the TMZ-tolerant GBM cell lines (C6 and U138). Similarly, all patient-derived cell cultures presenting high tolerance to TMZ were unaffected by combination with VBL, paving the way for testing the inclusion of a third drug.

Despite sharing a target molecule with VBL, MBZ binds to the colchicine-binding site on microtubules, which differs from the vinblastine-binding sites on the same protein [32]. This could explain the differing

responses observed primarily in patient-derived cultures in response to TMZ + VBL and TMZ + MBZ combinations. MBZ is part of the Repurposing Drugs in Oncology (ReDO) project [15] due to its mild side effects, easy administration [15] and its promising results in melanoma [33] and glioma [21] animal models. None of these studies, however, combined in vitro TMZ with MBZ. We showed that MBZ potentiated the effect of TMZ alone in ten of twelve tested glioma cultures. A triple combination of MBZ with TMZ + VBL was highly effective in chronically stabilizing or decreasing the cell number in

most TMZ-tolerant GBM cells (except in LS16 and in LS20). Flubendazole, another benzimidazole, was shown to potentiate the effects of VBL by blocking P-glycoprotein resistance in leukemia and myeloma [34], indicating that MBZ and VBL could produce additive antitumor effects. A PCV cocktail was the main GBM treatment option before TMZ was introduced in the clinic [11]. Comparing the components of PCV with the proposed triple combination (TVM), VBL has fewer side effects than vincristine [35]. In addition, some evidence suggests that vincristine is not able to cross the BBB [36]. MBZ and TMZ are also well tolerated by patients, supporting the possibility of combining these two drugs with VBL.

Treatment of glioma cultures derived from patients allowed a molecular analysis of the subpopulation of cells that tolerated the TVM treatment, based on alteration in the expression of a small set of genes related to tolerance. Four primary cultures exhibited different responses to therapy, and all tested cultures showed an increase in Notch3 expression after TVM treatment. Notch3 is considered a senescence marker [28] because it induces expression of E-cadherin and p21 [37], leading to cell cycle arrest and posterior senescence triggering in fibroblasts exposed to oxidative stress or DNA damage [28, 38]. In our experiments, p21 expression did not increase in all tested cultures after TVM treatment, suggesting that the mechanism of senescence induction may differ among cultures. Moreover, EGFR and other cancer stem cell markers were increased in the cell culture that was less responsive to TVM treatment (LS20) compared to the most sensitive cell culture (LS24), suggesting that stemness may play a role in TVM tolerance in some, but not all, cultures.

FGFR3 and AKT2 expression levels were correlated with TVM sensitivity, with cultures exhibiting high basal expression being more tolerant to treatment than cells presenting low basal expression of these two genes. TCGA databank analysis indicated that expression levels of FGFR3 and AKT2 could predict the response to TMZ, since patients whose tumors had high expression of FGFR3 or AKT2 responded better to TMZ than those harboring tumors with low expression of these genes. Tumor cultures with low expression of FGFR3 and AKT2 were especially sensitive to TVM. Therefore, a compilation of data from cell culture and databank analysis suggests that the profile of a concomitant low expression of FGFR3 and AKT2 could be utilized to select GBM candidates who may be more responsive to TVM combination treatment.

**Acknowledgments** We thank Giovana R. Onzi for critical reading of the manuscript and Dr. Márcia Wink from Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA) for making her laboratory available to perform some experiments.

**Funding** This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Universal 458,139/2014-9) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS (PPSUS 1210-2551/13-1 and PRONEX 16/2551). FCK and GL are or were recipients of fellowships from CNPq, AOS is a recipient of a fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors indicate no potential conflicts of interest.

**Ethical approval** All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

**Informed consent** All patients participated in clinical studies approved by the Federal University of Rio Grande do Sul and Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul Institutional Review Board. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

#### References

- Bai RY, Staedtke V, Riggins GJ (2011) Molecular targeting of glioblastoma: drug discovery and therapies. *Trends Mol Med* 17(6): 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.01.011>
- Kang JH, Adamson C (2015) Novel chemotherapeutics and other therapies for treating high-grade glioma. *Expert Opin Investig Drugs* 24(10):1361–1379. <https://doi.org/10.1517/13543784.2015.1048332>
- Veliz I, Loo Y, Castillo O, Karachaliou N, Nigro O, Rosell R (2015) Advances and challenges in the molecular biology and treatment of glioblastoma—is there any hope for the future? *Ann Transl Med* 3(1): 7. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.10.06>
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO, European Organisation for R, Treatment of Cancer Brain T, Radiotherapy G, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials G (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352 (10):987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
- Gutin PH, Wilson CB, Kumar AR, Boldrey EB, Levin V, Powell M, Enot KJ (1975) Phase II study of procarbazine, CCNU, and vincristine combination chemotherapy in the treatment of malignant brain tumors. *Cancer* 35(5):1398–1404
- Buckner JC, Shaw EG, Pugh SL, Chakravarti A, Gilbert MR, Barger GR, Coons S, Ricci P, Bullard D, Brown PD, Stelzer K, Brachman D, Suh JH, Schultz CJ, Bahary JP, Fisher BJ, Kim H, Murtha AD, Bell EH, Won M, Mehta MP, Curran WJ Jr (2016) Radiation plus Procarbazine, CCNU, and vincristine in low-grade glioma. *N Engl J Med* 374(14):1344–1355. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1500925>
- Cairncross G, Wang M, Shaw E, Jenkins R, Brachman D, Buckner J, Fink K, Souhami L, Laperriere N, Curran W, Mehta M (2013) Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-

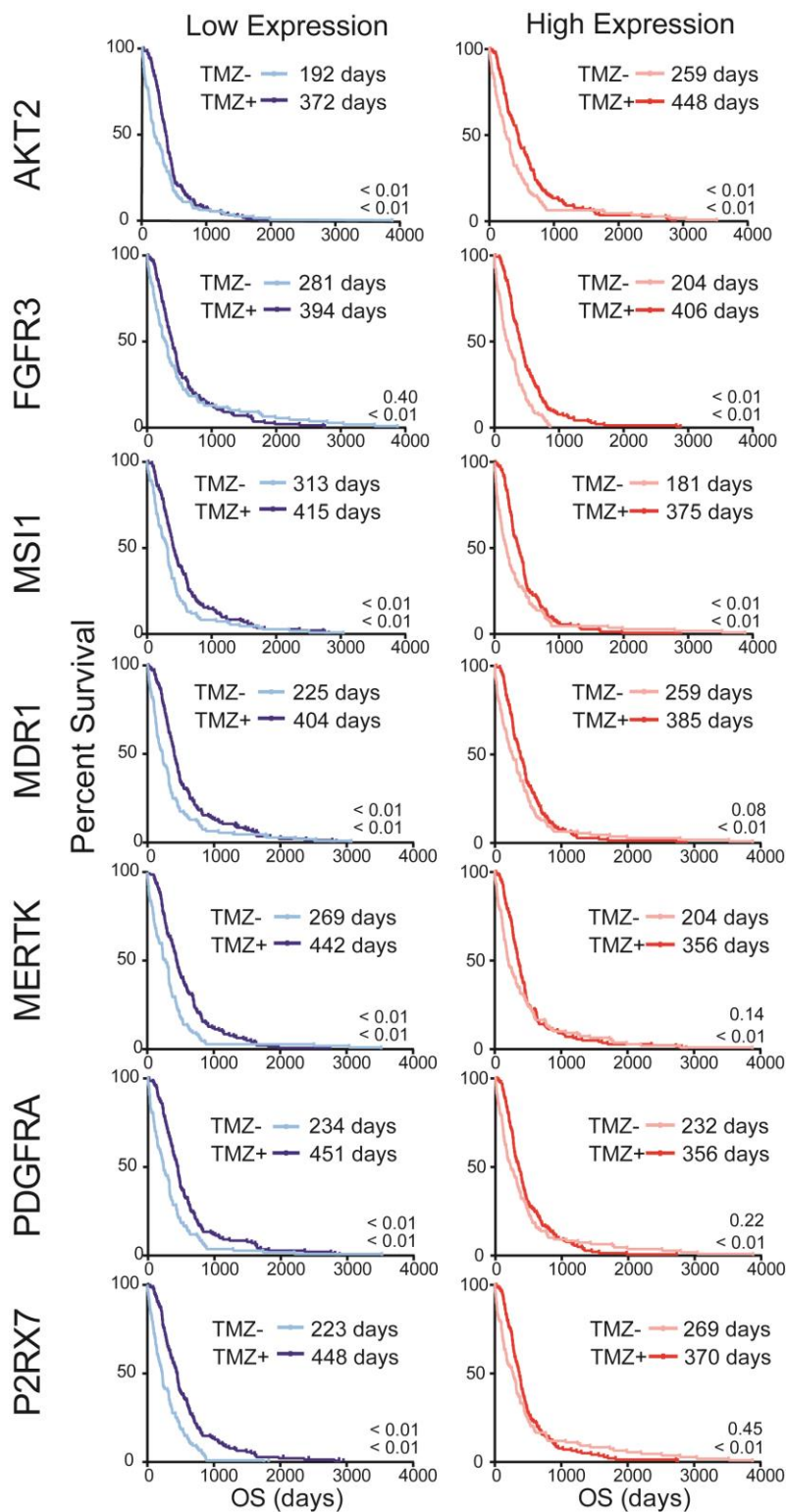
### Supplementary Table

**Sup Table 1** Clinical data available from patients whose tumors originated primary cultures.

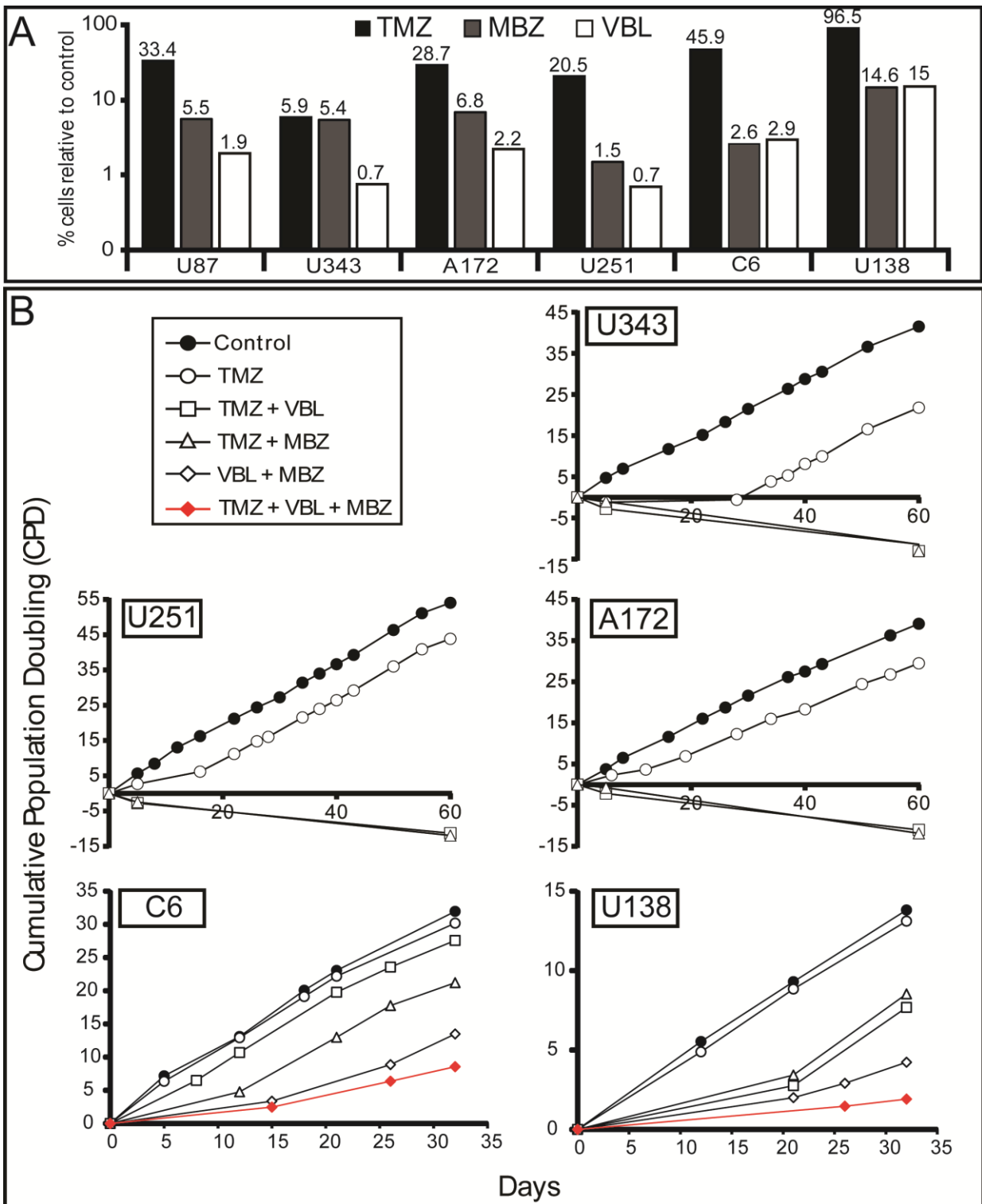
	<b>Gender</b>	<b>Age at Dx</b>	<b>Glioma Classification</b>	<b>Overall Survival</b>	<b>Surgery</b>	<b>Qtx</b>	<b>Rtx</b>
<b>LS12</b>	F	44.8	GBM GIV	277	GTR	TMZ 120 mg 4 months	TRUE
<b>LS16</b>	M	29.6	Fibrilar astrocytoma GII	+1211	GTR	FALSE	FALSE
<b>LS17</b>	M	39.4	Gemistocytic astrocytoma GII	418,0	NTR	FALSE	TRUE
<b>LS19</b>	F	53.3	Anaplastic astrocytoma GIII	+1277	STR	FALSE	TRUE
<b>LS20</b>	M	60.8	GBM GIV	+148	STR	FALSE	TRUE
<b>LS24</b>	M	52.0	GBM GIV	+378	GTR	FALSE	TRUE

Tumor samples were classified by a pathologist according to World Health Organization (WHO) criteria. The table also includes sex and age of the patient at diagnosis (Age at Dx), overall survival (days), type of surgery and treatments that the patients received after biopsy. M: male, F: female. GBM: glioblastoma; GII: grade II; GIII: grade III; GIV: grade IV. GTR: Gross Total Resection, complete resection of the preoperative fluid-attenuated inversion recovery signal abnormality; NTR: Near Total Resection, <3-mm thin residual fluid-attenuated inversion recovery signal abnormality around the rim of the resection cavity only; STR: SubTotal Resection, residual nodular fluid-attenuated inversion recovery signal abnormality. TRUE: patient received indicated treatment; FALSE: patient did not receive indicated treatment

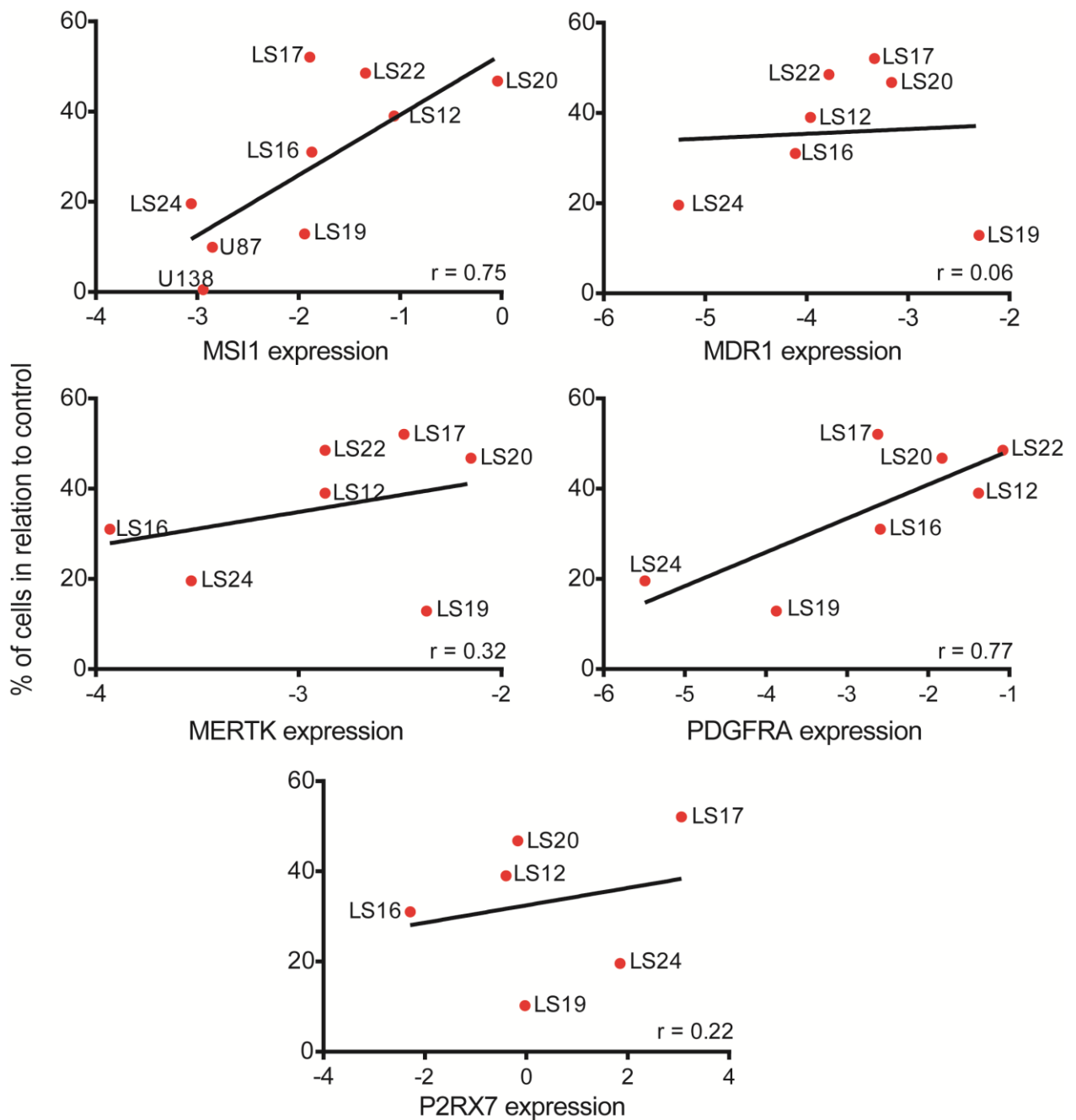




**Sup Fig. 1** Overall survival of patients who received (TMZ+) or did not receive TMZ (TMZ-) according to the expression of the indicated genes from the TCGA databank on TMZ resistance. Numbers indicate the median OS for each group.



**Sup Fig. 2** Acute and chronic sensitivity of GBM cell lines to TMZ, VBL or MBZ. A) Percentage of cells remaining 5 days after the beginning of the treatment in relation to control. B) Cumulative population doubling (CPD) profiles of GBM cells treated for 5 days with TMZ (50  $\mu$ M), VBL (5 nM) and/or MBZ (500 nM). Symbols represent the day when the cells were counted and reseeded.



**Sup Fig. 3** Expression of MSI1, MDR1, MERTK, PDGFRA and P2RX7 in patient-derived cultures and cell lines (normalized with RNA expression from adult cortex purchased from Agilent) was correlated with the % of cells after TVM treatment.



## 6. DISCUSSÃO

Avanços na quimioterapia para o câncer vêm sendo feitos nos últimos anos, impulsionados em parte pela academia e em parte pela indústria. Nos últimos 15 anos houve aprovação de mais de 80 fármacos anticâncer, contudo, essa revolução veio acompanhada de um enorme aumento no custo, que ultrapassaram 300% ao longo do período. Entre esses novos tratamentos, anticorpos monoclonais (mAbs) e inibidores de tirosina quinase (TKIs) trouxeram avanços dramáticos após a sua introdução, e hoje mais de 10 mAbs e mais de 20 TKIs foram aprovados pelo FDA, os quais trouxeram ao mesmo tempo grandes benefícios e despesas. Embora esse impasse seja reconhecido, praticamente não há consenso entre pacientes, médicos e sistemas de saúde sobre como manejá-lo (Savage, 2017). Além do alto custo, alguns desses medicamentos recém aprovados pelo FDA também apresentam grandes efeitos colaterais, que nem sempre são proporcionais ao aumento na sobrevivência do paciente.

Em países da Europa Ocidental (como França, Alemanha e Reino Unido) e também na Austrália e no Canadá uma entidade sancionada pelo governo determina a importância e o uso de uma nova opção terapêutica, decidindo se o medicamento deve ser comprado para a farmacopeia do país. Ambos levam em consideração eficácia, toxicidade e preço, no contexto de prevalência da doença, necessidade médica e alternativas terapêuticas (Schnipper *et al.*, 2015). Nos Estados Unidos, para ajudar médicos e pacientes a escolher o melhor tratamento baseado no custo x benefício, a ASCO desenvolveu um *score* de benefício líquido do tratamento na saúde do paciente (Net Health Benefit, NHB). Esse *score* leva em consideração a opinião do paciente e permite que ele pondere os limites de toxicidade e custo desejáveis, entre outros fatores, para calcular as reais vantagens de determinada terapia sobre sua sobrevivência, e com isso encorajar ou suspender a administração. Esse tipo de abordagem para o tratamento ainda está em desenvolvimento e precisa de ajustes antes de se transformar em um *software* de amplo acesso, mas pode ser visto como um marco para o entendimento entre as necessidades do médico-paciente e a disponibilidade de pagamento pelos sistemas de saúde (Schnipper *et al.*, 2016). No Brasil, nenhum desses fatores é levado em consideração para a compra, dependendo apenas da aprovação para uso no país, naquela indicação, pela ANVISA.

As abordagens de racionalização da terapia citadas acima, contudo, não levam em consideração a eficácia do medicamento para cada paciente baseada na individualidade. As predições são elaboradas com base em estudos clínicos de fase III e representam a média de resposta da população analisada. Embora seja um avanço na racionalização para médicos e pacientes, fármacos como a TMZ, que foram rapidamente difundidos no mercado, em parte devido a sua fácil administração e aos poucos efeitos

colaterais, podem ter seu uso indicado em tumores que já apresentam resistência a ela. Estudos clínicos já demonstraram que pacientes portadores de metilações na região promotora do gene MGMT são os que mais se beneficiam desse tratamento (Hegi *et al.*, 2005), sugerindo que esse tipo de teste poderia ajudar a decisão médica. Nenhuma das recomendações citadas acima leva as abordagens moleculares para eficácia em consideração e tratar um paciente resistente é oneroso para o sistema de saúde e para o paciente. Nesse sentido, testes de predição a sensibilidade, que a princípio poderiam ser vistos, pelos gestores, apenas como um custo a mais ao tratamento, poderiam ser vantajosos, uma vez que, embora aumentem o custo para alguns pacientes, evitam que o fármaco seja comprado e administrado sem efeito antitumoral e/ou gerando apenas efeitos colaterais.

A plataforma [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) tem pelo menos 350 estudos clínicos anticâncer de fase I e II cadastrados em andamento ([https://clinicaltrials.gov/ct2/search/browse?brwse=intr\\_cat\\_ANeo](https://clinicaltrials.gov/ct2/search/browse?brwse=intr_cat_ANeo)) e devido a limites de custo (tanto por parte do paciente como consumidor, quanto da indústria como investidora) apenas alguns chegarão a estudos de fase III. E mesmo assim, alguns desses não chegarão a clínica por não aumentarem a sobrevida ou porque seus benefícios não compensam seus custos. Esses gargalos têm implicações importantes, em parte porque alguns dos fármacos podem ter sido úteis apenas em subgrupos de indivíduos e acabaram sendo abandonados ao longo dos testes mesmo antes dos estudos de fase III, ou porque o efeito avaliado foi diluído na população como um todo. Isso significa dizer que uma abordagem mais eficiente é necessária para o desenvolvimento e o processo de implementação de fármacos, que busque determinar quais deles são mais benéficos para o indivíduo e assegurar que terapias individualizadas estejam disponíveis. Uma maneira de personalizar essa implantação é através do uso de marcadores de predição a sensibilidade, que são geralmente específicos para cada agente por refletirem o desarranjo molecular necessário para que a droga exerça seu efeito (Amin e Bathe, 2016). Um exemplo interessante vem de um estudo apresentado no NEJM: pacientes portadores de mutações em K-ras não se beneficiam do tratamento feito com cetuximabe, um anticorpo monoclonal anti-EGFR, que melhora a OS e o PFS em câncer colorretal não responsivo a quimioterapia nos pacientes com K-ras intacta (Karapetis *et al.*, 2008).

Os resultados apresentados no manuscrito “Vinblastine and antihelminthic mebendazole potentiate temozolomide in resistant gliomas” derivam de um esforço para otimizar o tratamento de gliomas com fármacos que já estão disponíveis no mercado, com poucos efeitos colaterais, baixo custo e potencial de aumentar a sobrevida em um grupo específico de pacientes no qual o quimioterápico padrão não é eficaz. Essa estratégia tem importância relevante dentro do contexto custo x benefício, especialmente dentro das disponibilidades do sistema de saúde brasileiro. A terapia com TMZ tem um

custo mensal elevado (mais de R\$ 5 mil/mês), enquanto os adjuvantes propostos aumentariam esse custo em torno de 10%. Considerando as análises demonstradas baseadas nos dados do TCGA, de que pacientes com baixa expressão de FGFR3 e AKT2 não apresentam aumento na sobrevida média quando tratados apenas com TMZ e de que culturas com esse perfil de expressão respondem melhor ao TVM, os adjuvantes propostos poderiam melhorar a qualidade de vida desses pacientes, por não submetê-los a um tratamento que não traz benefícios (TMZ sozinha), ou até mesmo por melhorar a sobrevida total. Até onde temos conhecimento, esse foi o primeiro artigo que mostrou que essa combinação de marcadores define um grupo resistente a TMZ. Embora a triagem para a expressão desses genes (FGFR3 e AKT2) não seja feita na clínica, poderia ser implementada e padronizada. Para que a combinação de VBL e MBZ com TMZ possa ser usada no tratamento dos pacientes no futuro, um estudo de fase I/II precisaria ser aplicado visando tanto a toxicidade combinada dos fármacos quanto a correta testagem e seleção dos pacientes não responsivos a TMZ (FGFR3<sup>Low</sup>/AKT2<sup>Low</sup>).

Estudos clínicos baseados em marcadores preditivos ajudaram a reduzir a taxa de falha dos tratamentos por identificar quais pacientes poderiam se beneficiar dos mesmos. Contudo, o grau de sucesso dessa estratégia é menor que o esperado para os dias atuais, pois, além da heterogeneidade inicial, que confere uma resistência primária a alguns clones, após a terapia pode-se observar a seleção ou até mesmo indução de resistência secundária em algumas células. Tumores são doenças heterogêneas, tornando o acesso a sua total diversidade praticamente impossível e inseguro, além disso, biópsias em múltiplos locais não garantem a detecção de todas as alterações subclonais (Turajlic e Swanton, 2017). Essa variação torna difícil a utilização de testes baseados em uma (ou múltiplas) biópsia ressecada, pois pode não representar a heterogeneidade e a malignidade do tumor original. Em 1990, von Hoff já apontava que testes *in vitro* tem alto poder de predição de resistência mas não de sensibilidade (Von Hoff, 1990). Ao longo dos anos grandes esforços foram feitos para melhorar tanto as condições de cultura, pois postulava-se que apenas os clones mais aptos ao crescimento *in vitro* eram selecionados e testados; quanto o tipo de teste utilizado, pois para alguns autores testes agudos induziam ao erro por não levar conta o recrescimento da população. Mais de 20 anos depois começamos a entender que talvez o grande “calcanhar de Aquiles” da incapacidade de predição da sensibilidade seja menos dependente das condições *in vitro* e seja fortemente influenciado pela amostragem utilizada.

Para dificultar ainda mais a terapia baseada em marcadores moleculares, GBMs não apresentam nenhuma mutação considerada *driver*, como acontece em outros cânceres, por exemplo o cromossomo Filadélfia encontrado em leucemia mieloide crônica, que resulta de uma translocação dos braços longos do cromossomo 9 e 22, e gera uma proteína de fusão BCR-ABL, uma tirosina cinase constitutivamente

ativada que pode ser inibida com imatinibe. De fato, imatinibe revolucionou o tratamento desse câncer e emergiu como um exemplo na busca por terapia alvo (Weathers e Gilbert, 2016). Nos GBM, mesmo a alteração genética mais frequente, amplificação de EGFR, é vista em menos de 50% dos pacientes. Embora os resultados dos inibidores desse receptor tenham sido promissores em câncer de pulmão EGFR-mutado, em GBM os resultados com erlotinibe e gefitinibe foram frustrantes, provavelmente devido à perda de resposta causada pela redundância das alterações na via de sinalização e pela heterogeneidade tumoral (Brandes *et al.*, 2008). Alguns autores sugerem que para esse tipo tumoral estudos clínicos envolvendo terapias alvo devam ser suspensas até que alguma alteração *driver* seja identificada, ou até que seja possível contornar as redundâncias de alterações genéticas na mesma via de sinalização, pois do contrário haverá resistência de parte da massa tumoral (Weathers e Gilbert, 2016).

Apesar dessa heterogeneidade, Howard e colaboradores demonstraram que um ensaio de quimiosensibilidade *in vitro*, denominado ChemOID, que identifica a melhor terapia contra o tumor como um todo e contra CSC, é promissor para individualizar o tratamento desses tumores. Embora o trabalho dos autores não tenha mudado o curso da quimioterapia dos pacientes analisados, que continuou sendo feito com ressecção seguida de quimio e radioterapia, uma porção do tumor foi crescida em meio de cultura suplementado com soro fetal bovino e outra em protocolo para enriquecimento de CSC, ambas foram tratadas com um amplo painel de quimioterápicos e tiveram sua viabilidade medida. As células provenientes dos tumores dos pacientes também foram crescidas em flancos de camundongos imunodeficientes, que foram tratados com TMZ e algumas opções despontaram nos ensaios *in vitro* como o mais e o menos promissor. Esses experimentos com uma pequena biopsia correlacionaram de maneira importante com a sobrevida: embora em um dos casos a TMZ tivesse efeito em reduzir consideravelmente a quantidade total de células, não foi efetiva em reduzir a viabilidade da cultura enriquecida em CSC e, tanto no modelo animal quanto no paciente, houve um período de regressão seguido por uma recorrência que resultou em OS baixa, com recorrência depois de 12 meses. Em outro paciente, no qual TMZ foi efetiva em reduzir tanto a quantidade total quanto a porcentagem de CSC, o tratamento com Temodar (nome comercial da TMZ) foi o mais efetivo no modelo animal e gerou uma PFS > 40 meses no paciente (Howard *et al.*, 2017). Embora os autores não digam depois de quanto tempo de tratamento as análises *in vitro* foram feitas, esse artigo demonstra que esses ensaios podem ter capacidade de predição e auxiliar no prognóstico, mesmo com dificuldades na amostragem. Porém, de acordo com suposições anteriores da literatura, os experimentos que correlacionaram com a resposta do paciente não derivaram de medidas únicas de redução da massa tumoral como um todo. Experimentos que analisam a proporção de células tronco tumorais ou experimentos a longo prazo que levam em conta a recorrência após tratamento agudo

devem ser considerados. Embora no artigo acima não tenha sido descrito o tempo de análise após o tratamento, os gráficos de crescimento *in vivo* representam claramente a importância de múltiplos pontos de análise. Poucos artigos da literatura fazem essa observação do crescimento populacional após tratamento *in vitro*, sendo mais comuns medidas sequenciais apenas nas injeções subcutâneas, com isso, informações sobre a heterogeneidade e possibilidade de seleção clonal são perdidas, explicando, em parte, o número de falsos positivos nesses testes descritos por von Hoff em 1990 (Von Hoff, 1990).

Em 2008, Li e colaboradores demonstraram que linhagens celulares derivadas de gliomas são pouco representativas das alterações cromossômicas e da expressão gênica desses tumores. Ao compararem as 5 linhagens (A172, Hs683, T98G, U251 e U87) mais comumente utilizadas com 83 seções de gliomas primários, demonstraram que as linhagens citadas, se pareciam mais com linhagens estabelecidas de outros sítios tumorais do que com as seções não crescidas *in vitro* ou *in vivo* de gliomas (Li *et al.*, 2008). Quando observamos os nossos dados *in vitro*, esses resultados são preocupantes, uma vez que paralelo aos testes utilizando culturas primárias, também fizemos os mesmos experimentos em linhagens comerciais. Por exemplo, a baixa sensibilidade a TMZ nas culturas primárias nos surpreendeu, a ponto de validarmos todos os experimentos, realizando os mesmos protocolos em pelo menos uma linhagem celular comercial para ter certeza de que nossos fármacos estavam em boas condições e concentrações. Além disso, nos testes de sensibilidade após radioterapia, mostrados na Figura 6 (página 65), os resultados da eficiência não puderam ser quantificados em M059J, uma vez que 12 dias após os tratamentos não pudemos observar células nos poços, e mantendo a placa de cultura por mais de um mês, análises microscópicas não revelaram recorrência a partir de células remanescentes que poderiam ter sido despercebidas em uma primeira observação. O artigo publicado com essa tese pode ajudar a comprovar essas evidências, uma vez que a dupla combinação TV ou TM é suficiente para eliminar 4 das 6 linhagens celulares testadas, mas não é suficiente para eliminar *in vitro* a população de nenhuma das 6 culturas primárias testadas.

O conhecimento sobre heterogeneidade e evolução clonal dentro dos tumores evoluiu muito nos últimos 5 – 10 anos, em paralelo, o sequenciamento de nova geração e de células tumorais circulantes sofreu grandes avanços. Osuka e Van Meir ilustraram a heterogeneidade clonal e seu papel na recorrência do tumor após a ressecção seguida de quimio/radioterapia para gliomas. Normalmente o clone responsável pela recorrência não faz parte da progênie linear do clone dominante no tumor primário, não se sabe exatamente se é porque este é removido durante a ressecção ou eliminado pela terapia, ou porque que as células responsáveis pela recorrência são mais invasivas e encontram-se mais infiltradas (Osuka e Van Meir, 2017). Essa ilustração, mostrada na Figura 18, aponta para o fato de que, independente das

melhoras nas condições de cultura e de análise, a incapacidade da amostragem total pode mascarar o resultado final, uma vez que a terapia baseada em testes de predição é baseada nos clones dominantes na amostragem, explicando a maioria dos falsos resultados de sensibilidade dos testes de predição *in vitro*. Esse problema metodológico pode ser acentuado em gliomas, que são tumores altamente infiltrantes do sistema nervoso central, onde pensar em biópsia total é mais difícil, para não dizer impossível, quando comparamos com outros tumores encapsulados que podem ser removidos na sua totalidade. Além disso, Patel e colaboradores sequenciaram células únicas dentro de GBM e encontraram uma variabilidade de expressão tanto de fatores de expressão quanto de sinalização oncogênica, proliferativa, imune e de hipóxia; demonstraram ainda que os subtipos, como classificados pelo TCGA, pertencem a variações de expressão entre células de um mesmo paciente (Patel *et al.*, 2014) ressaltando o problema da heterogeneidade intratumoral. Uma das maneiras para ajudar a contornar problemas de heterogeneidade e presença de células tronco tumorais nos ensaios *in vitro* é observar o crescimento das células por longos períodos após a administração do fármaco. A maioria dos experimentos relatados na literatura, como o ensaio padronizado por Howard (exemplo citado acima), realiza medidas em tempos únicos após a administração da droga *in vitro*, com isso, dados sobre a cinética de crescimento populacional que poderiam indicar recorrência são perdidos. Esse fator é importante pois nesse mesmo artigo o autor apresenta gráficos de crescimento *in vivo*, mostrando que implantes xenográficos (PDX) com células de dois pacientes diferentes apresentam respostas em tempos variados aos fármacos testados e dependendo do *endpoint* pré-determinado uma ou outra seria escolhida para tratar o paciente na clínica (Howard *et al.*, 2017).

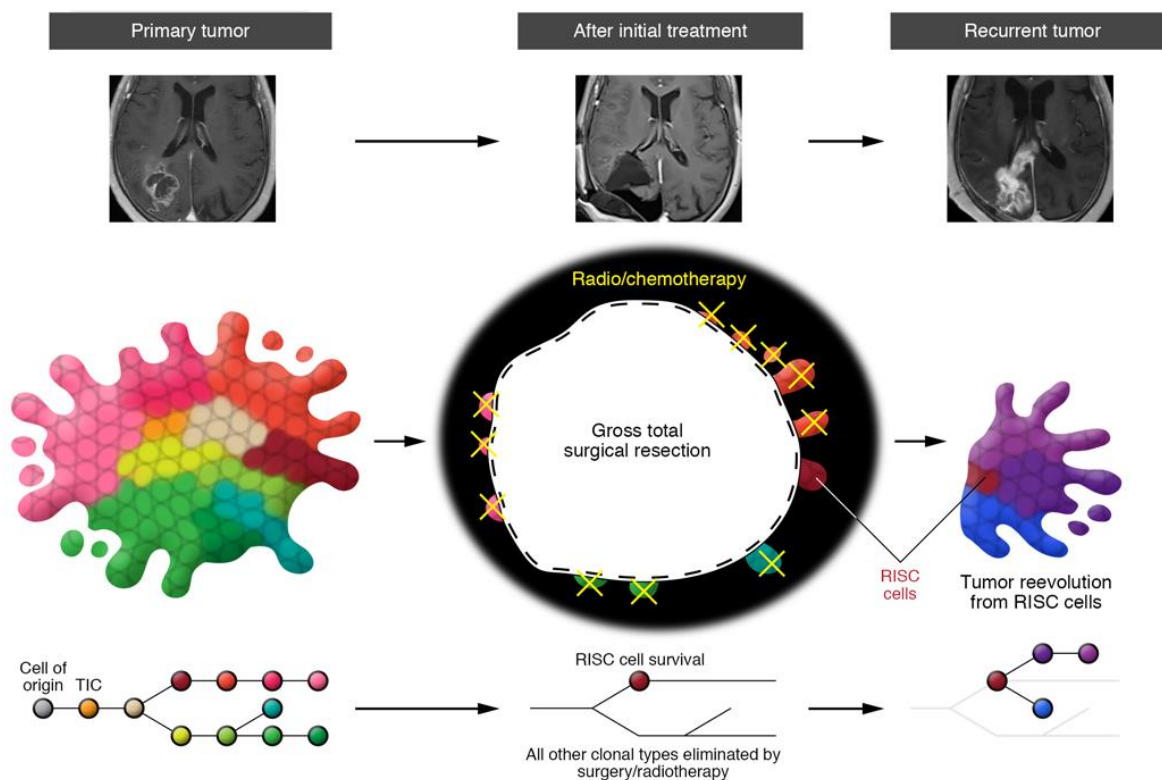


Figura 18 Esquema representado a recorrência dos gliomas após a ressecção cirúrgica e tratamento com quimio e radioterapia. Adaptado de Osuka e Van Meir, 2017.

No artigo publicado (página **Erro! Indicador não definido.**), as curvas de crescimento populacional cumulativo evidenciam isso (Figura 2, principal e suplementar do manuscrito) e análises até o 8º dia nem sempre refletem a totalidade dos fatos. Por exemplo, ao comparar as curvas de crescimento após tratamento com TVM para LS19 e LS24: no primeiro ponto de análise o efeito é semelhante na diminuição do número de células, porém com o passar do tempo na primeira há recrescimento e na segunda há contínua diminuição do número total. Parâmetros para calcular essa variação foram publicados pelo nosso grupo de pesquisa e podem auxiliar a compreensão das curvas de crescimento (Silva *et al.*, 2016). A taxa de proliferação relativa (Relative Proliferation Rate, RPR) que mede a velocidade de proliferação da população testada, obtida através do coeficiente angular de proliferação da população tratada dividida pelo coeficiente da população controle, e o tempo relativo para cruzar um limiar (Relative Time to Cross a Threshold, RTCT), calculado pela relação entre o tempo necessário para chegar ao CPD = 5 nos grupos controle e tratado, indicando se há retardo na proliferação causado pelo tratamento, deixa clara a diferença entre os efeitos do tratamento entre ambas as culturas primárias analisadas uma vez que na LS24 tanto o RPR quanto o RTCT são diminuídos a zero, enquanto na LS19 há retrato do atraso no recrescimento (dados não mostrados no manuscrito).

As análises a longo prazo descritas acima também levantam outras falhas dos experimentos de predição *in vitro*: poucos autores categorizam a “qualidade” das células restantes após o tratamento, e quando o fazem, geralmente, avaliam proporção de células tronco tumorais. Esse conceito de tronquicidade e pluripotencialidade já foi bastante debatido na última década, e foi descrito com diferentes nomenclaturas por diversos grupos de pesquisa, mas ainda não há consenso absoluto sobre terminologia nem sobre os marcadores moleculares necessários para identificá-las (Lee *et al.*, 2008). Fato é que, dificilmente na busca de marcadores de sensibilidade analisam-se outros mecanismos celulares acontecendo a longo prazo, como por exemplo a indução de autofagia, poliploidia, parada irreversível no ciclo celular (senescência) e catástrofe mitótica. Todos esses mecanismos já foram descritos como importantes na atividade antitumoral e foram analisados após os tratamentos para a construção dos resultados dessa tese, sendo os três últimos citados no artigo publicado.

Alcalóides derivados da vinca interagem com subunidades da tubulina bloqueando a polimerização e montagem correta dos microtúbulos, levando a parada no ciclo celular, com acúmulo em G2/M e até mesmo em G1 (Sato *et al.*, 2007). Por outro lado, drogas como os taxanos e o mebendazol aumentam a polimerização dos microtúbulos, promovendo as fases de nucleação e alongação reduzindo a quantidade de tubulina livre (Jordan, 2002). Essa incorreta polimerização dos microtúbulos pode levar a segregação errônea dos cromossomos, gerando células poliploides, que podem trilhar dois caminhos: morte celular ou parada irreversível (Singh *et al.*, 2010). Nessa situação a célula com defeito na sua divisão pode morrer por catástrofe mitótica, um mecanismo de morte celular acoplado as falhas na mitose que geralmente diferencia-se da apoptose que acontece na interfase por envolver distúrbios na permeabilidade da membrana mitocondrial, liberação de citocromo c e fatores indutores de apoptose (Apoptosis Inducing Factor, AIF) (Kisurina-Evgen'eva *et al.*, 2006). O tratamento com a combinação de TMZ, VBL e MBZ levou a uma diminuição de células na fase G1 e aumento na população poliploide na maioria das linhagens utilizadas (Figura 3a do artigo publicado) cinco dias após início da administração dos tratamentos. Esse aumento na porcentagem de células poliploides coincidiu com aumento no número de células com núcleos grandes e regulares, indicativos de senescência, no oitavo dia (5 dias de tratamento seguidos de 3 dias sem droga) e pequena proporção de núcleos grandes e irregulares característicos da catástrofe mitótica (Figura 3b do artigo publicado). Sugerindo que o tratamento com TVM além de eliminar células, como pode ser observado nos gráficos de crescimento populacional cumulativo, também induz outros mecanismos celulares que “inativam” a população restante, como é o caso da senescência, definida como uma parada irreversível no ciclo celular (Singh *et al.*, 2010). Combinadas, as curvas de crescimento populacional cumulativo e seus parâmetros de RPR e RTCT, a análise morfométrica nuclear e a distribuição



no ciclo celular após o tratamento desenham um painel qualitativo após a terapia que aproxima os resultados *in vitro* com os resultados *in vivo*. Juntos esses experimentos indicam que embora seja vantajoso tratar as culturas LS12, LS17 e LS24 com TVM, os mesmos efeitos não podem ser esperados na LS20. Nessa última, a redução no número total de células foi menos expressiva e a população tolerante parece não ter sofrido nenhuma alteração, enquanto, por exemplo na LS17 houve maior morte e a maioria das células tolerantes não voltará a proliferar.

Embora o fenótipo senescente seja considerado por alguns dos autores citados acima como um estágio de morte a nível de expansão tumoral, uma vez que a célula nesse estado não se dividirá mais e não persistirá por longo período, outros autores chamam a atenção para o fenótipo secretório dessa população. Por isso, tratamentos que induzam a senescência podem atuar tanto suprimindo o tumor quanto de maneira pró-carcinogênica (Coppe *et al.*, 2010). Em câncer de mama já foi demonstrado que tumores xenográficos desenvolvem uma vascularização mais densa quando há células tumorais senescentes, ao contrário de quando essas são substituídas por fibroblastos proliferativos nos implantes (Coppe *et al.*, 2006).

Outro fator que dificulta a identificação e caracterização de senescência sendo pró ou anti-tumoral diz respeito a alguns marcadores. Por exemplo, nas nossas análises de expressão gênica encontramos maior expressão de Notch3 na população de células tolerantes ao tratamento com TVM, esse fato pode ser justificado por duas hipóteses principais: houve seleção de células senescentes que expressam mais Notch3 e há dados na literatura corroborando este fato (Cui *et al.*, 2013) ou houve seleção de células tronco-tumorais, que segundo muitos autores também expressam Notch3 (Teodorczyk e Schmidt, 2014). Ambas situações são antagonicas e para solucionar-las *in vitro* seria necessário acompanhar a expressão ao longo do tempo e realizar co-marcação individual entre Notch3 e marcadores de células tronco tumorais, como CD133, e de senescência, como  $\beta$ -galactosidase. Não encontramos na literatura essa dupla marcação, porém, alguns estudos pré-clínicos demonstram que bloqueando Notch3 através de inibidores de  $\gamma$ -secretase aumenta-se a latência e a sobrevida dos pacientes (Gilbert *et al.*, 2010). Na clínica, estudos de fase I e II já foram conduzidos com inibidores de  $\gamma$ -secretase em gliomas e outros tipos tumorais, mas resultados de eficiência em fase III ainda não estão disponíveis.

Se o papel da senescência na biologia tumoral é dúbio na literatura, sua relação com a autofagia, outro mecanismo celular de ação dupla é ainda mais complexo. Alguns estudos populacionais indicam que o processo de autofagia está aumentado durante o processo de senescência. As vesículas autofágicas são transportadas pelos microtúbulos para se fundirem com os lisossomos para degradação e renovação dos componentes intracelulares. Drogas antimetabólicas interrompem a formação dos microtúbulos, resultando

no acúmulo das vesículas e inibição da fusão com lisossomos, o que pode ser visto como aumento de compartimentos ácidos e da proteína p62 no interior da célula (Van Vuuren *et al.*, 2015). Recentemente, Kang e colaboradores demonstraram que o fator de transcrição GATA4, que normalmente é degradado mediado por p62 na autofagia seletiva é mantido durante a senescência e ativa vias iniciadoras do fenótipo secretório (Senescence-Associated Secretory Phenotype, SASP). Além disso, demonstraram que a deleção de p62 ou inibição transiente da autofagia leva ao acúmulo de GATA4 e consequente indução de senescência, porém se houver um bloqueio prolongado o desfecho não é o mesmo (Kang *et al.*, 2015). Fatores do SASP podem reforçar a parada senescente de maneira autócrina e parácrina, estimular células adjacentes pré-malignas e malignas a proliferar e formar tumores ou podem estimular o sistema imune para suprimir a tumorigênese; podem ainda promover a inflamação crônica. No SNC, a autofagia é crucial para a iniciação e crescimento dos gliomas, uma vez que células gliais com esse processo inibido não são aptas a manter uma sinalização correta de crescimento sob condições restritivas de fatores e entram em senescência (Gammoh *et al.*, 2016). Um trabalho do nosso grupo, com linhagem celular de glioma, demonstrou que a nível de células únicas essa relação coordenada não é observada e a relação individual entre autofagia e senescência é heterogênea (Filippi-Chiela *et al.*, 2015).

Uma das maneiras mais simples e fáceis de triagem de autofagia é marcar organelas ácidas dentro das células com laranja de acridina, um corante supravital que emite fluorescência verde e pode ser protonado e aprisionado nessas organelas vesiculares, onde emite fluorescência vermelha (como por exemplo em lisossomos e autolisossomos) (Thome *et al.*, 2016). Apesar de fácil de utilizar esse corante é inespecífico, uma vez que há aumento de organelas ácidas (massa lisossomal) em outros processos celulares, como por exemplo na senescência. Essa marcação cruzada entre os processos pode confundir ainda mais os achados referentes a um mecanismo ou outro levando a necessidade de técnicas adicionais para comprová-los (Kurz *et al.*, 2000). A senescência pode ser comprovada pela atividade da  $\beta$ -galactosidase, uma enzima aumentada nesse processo, ou mais recentemente por análises morfométricas nucleares (NMA) utilizando uma metodologia descrita pelo nosso grupo (Filippi-Chiela *et al.*, 2012). Já a autofagia pode ser comprovada por imunodeteção da degradação da proteína carreadora p62 e para a lipidação de LC3 ou por agregação de GFP-LC3 na membrana dos autofagossomos (Thome *et al.*, 2016). Nos resultados apresentados nessa tese, devido ao crescimento fastidioso das culturas primárias, optamos por estratégias que utilizassem pequeno número de células, sendo a senescência medida apenas por NMA, que tem boa correlação com a atividade da  $\beta$ -galactosidase. Já para autofagia, tentamos sem sucesso transduzir uma das culturas (LS06) com um vetor lentiviral contendo a proteína fluorescente LC3, porém

menos de uma semana depois as células morreram, provavelmente devido a seleção com puromicina, impossibilitando o uso desse método.

Quimioterápicos anti-mitóticos, como o paclitaxel por exemplo, podem ativar a PCD influenciada pela autofagia, levando a ativação de caspase regulada por membros da família Bcl-2, uma proteína relacionada tanto a processos de autofagia quanto apoptose. Em células mitóticas, PTX bloqueia a ativação de Vsp34, um iniciador da formação do autofagossomo. Já em células não mitóticas, esse fármaco pode bloquear o movimento e a maturação de autofagossomos para autofagolisossomo, havendo sugestões de que esse acúmulo seria o responsável pela sensibilidade, uma vez que, o bloqueio da formação dos autofagossomos diminui a morte celular induzida pelo PTX (Veldhoen *et al.*, 2013). Embora outros autores mostraram que vimblastina, um outro agente inibidor de microtúbulos e mitose, cause um aumento no número de autofagossomo e isso resultaria em aumento de autofagia, esse fato é questionado por Veldhoen e colaboradores, que sugerem que essa classe de agentes permite a formação, mas não maturação dos autofagossomos, sem degradação de organelas, e seriam na verdade bloqueadores das fases finais do fluxo autofágico.

Uma vez que os resultados obtidos e apresentados com incorporação de laranja de acridina possam gerar interpretações duvidosas quanto a especificidade da marcação, decidimos combinar os quimioterápicos com um bloqueador do fluxo normal da autofagia, pois nos interessava saber se bloqueando o possível mecanismo envolvido na tolerância das células havia diminuição da população remanescente. Nesse caso utilizamos cloroquina, que é uma base fraca capaz de alcalinizar os lisossomos e impedir a fase final da autofagia. Esse fármaco é administrado há décadas na clínica para o tratamento de malária, e atinge concentrações plasmáticas nanomolares variadas, que dependem de vários fatores, entre eles da idade do paciente. E, se utilizada por longos períodos, pode gerar acúmulo e neuropatia. *In vitro* ela ou seu análogo, hidroxicloroquina, são utilizados como bloqueadores clássicos da autofagia, embora tenham falhado em aumentar a sobrevida em estudos clínicos combinados à quimioterapia. Os autores justificam essa falha principalmente devido a divergência entre as concentrações *in vitro* para inibir autofagia, que varia entre 10 – 30  $\mu\text{M}$ , chegando a 75  $\mu\text{M}$  em alguns trabalhos, e as concentrações abaixo de 1  $\mu\text{M}$  atingidas nos pacientes (Rosenfeld *et al.*, 2014). Para contornar essa diferença, optamos por utilizar a concentração próxima a plasmática (100 nM) e manter o tratamento em contato com as células por 5 dias. Nessas condições a adição desse fármaco não diminuiu o crescimento populacional das culturas primárias testadas quando administrada sozinha, nem potencializou o efeito quando combinada com PCV de maneira que justifique seu uso na clínica, corroborando a ineficiência encontrada nos estudos clínicos.

Embora os múltiplos papéis da autofagia e sua modulação no câncer ainda precisem ser elucidados, sua importância nesse processo parece indiscutível, genes supressores e oncogenes estão envolvidos na sua regulação, ligando esse processo ao desenvolvimento e progressão tumoral; já foi mostrado que esse processo limita a necrose e inflamação, podendo restringir a invasão e disseminação, além de inibir a formação de metástase (Bhutia *et al.*, 2013). A autofagia, além de participar na indução da senescência também tem interrelação com a apoptose, sendo um mecanismo de proteção das células da PCD. Alguns autores demonstram que o processo autofágico pode sequestrar e degradar organelas danificadas, como as mitocôndrias, impedindo a liberação de citocromo c; outros, sugerem que pode proteger até mesmo da morte celular independente de caspase enquanto puder gerar energia para a célula se recuperar e voltar a crescer. Infelizmente esse processo nem sempre é pró-sobrevivência celular e o termo morte celular autofágica, já foi estabelecido na literatura: se a autofagia acontecer em excesso pode desencadear PCD do tipo II. No SNC, já foi estabelecido que a autofagia apropriada e controlada pode induzir neuroproteção, resgatando os neurônios da apoptose, por exemplo, ao degradar mitocôndrias danificadas na fase de reperfusão pós-isquemia, ou ao reduzir a translocação de Bax para a mitocôndria e a liberação de citocromo c para o citosol em hemorragia da subaracnóide (Wu *et al.*, 2015). No processo antitumoral, a autofagia pode levar a liberação de debris celulares acumulados na forma de proteínas mal dobradas e organelas lesadas e aumentar os níveis de p62 em resposta ao estresse metabólico, o qual poderia aumentar a produção de ROS e gerar danos no DNA e instabilidade cromossômica caso não corrigido (Bhutia *et al.*, 2013).

A execução de imunodeteção para verificar fluxo autofágico e morte celular tornaram-se técnicas laboriosas quando se fala em técnicas que utilizam o menor número de células possível, uma vez que quantidades de proteína suficiente para repetir e confirmar os experimentos com culturas primárias são de difícil obtenção. Conseguimos realizar imunodeteção para verificar degradação de p62, mas outras proteínas de menor peso molecular, como LC3, não puderam ser sondadas com a mesma eficiência, deixando o resultado incompleto e, por vezes, inconclusivo. Possivelmente esses problemas tiveram relação com as quantidades totais de proteína, menores que normalmente se utiliza nesse protocolo, ou com a afinidade de ligação do antígeno-anticorpo e amplificação do sinal. A imuno-fluorescência para essa proteína também gerou resultados inconclusivos, uma vez que não foi possível definir se a marcação pontilhada era devido a agregação em volta de autofagossomos ou simples dispersão citoplasmática (Klionsky *et al.*, 2016).

A Tabela 2 da página 60 ilustra quão lento é o crescimento dessas culturas comparadas com as linhagens celulares: enquanto U87 e M059J demoram menos de três dias para duplicar a população, em

algumas culturas primárias esse tempo pode ser maior que uma e até duas semana. Quando se observam os resultados da tabela dentro do contexto, levando em consideração que essas que estão representadas foram aquelas nas quais obtivemos quantidade suficientes para repetir os experimentos de contagem do número de células 12 dias após o início do tratamento, pelo menos duas vezes em duplicata, sem necessidade de ajustes do número inicial de células (ou seja, nessas linhagens foi possível obter 8000 células por poço pelo menos duas vezes para 16 tratamentos diferentes), precisamos atentar para o fato de que as demais culturas crescem de maneira mais lenta. Condições para melhorar o crescimento foram testadas, como por exemplo ao invés de utilizar DMEM/F12 suplementado com 10 % de SFB utilizamos meio de cultura neurobasal, suplementado com a mesma quantidade de soro, ou com EGF/FGF ou com PDGF-aa. Nenhuma dessas três outras condições resultou na expansão da cultura após um período maior que um mês nas últimas biópsias obtidas.

## 7. CONCLUSÕES

Células provenientes de tumores do sistema nervoso central podem ser facilmente cultivadas em meio DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB. Essas culturas crescem por longos períodos, embora necessitem de tempo para dobrar a população maior que linhagens comerciais do mesmo tumor.

As culturas primárias derivadas de tumores de sistema nervoso central de pacientes são mais sensíveis a cinco doses de radioterapia do que do quimioterápico padrão. A sensibilidade *in vitro* a TMZ, em concentrações próximas a plasmática, em culturas primárias é menor do que a de linhagens comerciais (como U87).

Ensaio de viabilidade celular que utilizam como base metabolismo mitocondrial não são adequados para medir o efeito de agentes alquilantes. Testes que levam em consideração cinéticas de crescimento ou qualidade das células remanescentes, embora mais fastidiosos têm maior potencial translacional.

A administração de CQ em concentrações próximo a plasmática sozinha não tem efeito na diminuição do crescimento de células tumorais, nem potencializa o efeito do PCV para a maioria das linhagens testadas, corroborando sua falha em estudos clínicos.

É possível predizer grupos de pacientes nos quais a TMZ não terá efeito com base na análise da expressão de alguns genes utilizando a base de dados do TCGA. Alguns desses marcadores ainda não foram testados na clínica e implementá-los poderia trazer benefícios aos pacientes.

Testes clínicos de fase I/II com a combinação de TMZ, VBL e MBZ para testar a toxicidade e correlação de resposta com os marcadores moleculares FGFR3/AKT2 poderiam ser aplicados para GBM, uma vez que esses fármacos são aprovados pela ANVISA e estão disponíveis no SUS.

## 8. PERSPECTIVAS

Realizar qPCR para p62 no DNA da cultura LS05 para verificar deleção gênica.

Repetir análises de WB para LC3 nas amostras cujo sinal não pode ser claramente identificado.

Realizar experimentos pré-clínicos *in vivo* com a combinação TVM para avaliar efetividade a longo prazo e toxicidade.

## 9. REFERÊNCIAS

- AGUNDEZ, J. A.; ESGUEVILLAS, G.; AMO, G.; GARCIA-MARTIN, E. Clinical practice guidelines for translating pharmacogenomic knowledge to bedside. Focus on anticancer drugs. **Front Pharmacol**, v. 5, p. 188, 2014. 10.3389/fphar.2014.00188
- AMIN, S.; BATHE, O. F. Response biomarkers: re-envisioning the approach to tailoring drug therapy for cancer. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 850, 2016. 10.1186/s12885-016-2886-9
- ARMAND, J. P.; RIBRAG, V.; HARROUSSEAU, J. L.; ABREY, L. Reappraisal of the use of procarbazine in the treatment of lymphomas and brain tumors. **Ther Clin Risk Manag**, v. 3, n. 2, p. 213-24, 2007.
- BAI, R. Y.; STAEDTKE, V.; APRHYS, C. M.; GALLIA, G. L.; RIGGINS, G. J. Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. **Neuro Oncol**, v. 13, n. 9, p. 974-82, 2011. 10.1093/neuonc/nor077
- BANSAL, S.; BAJAJ, P.; PANDEY, S.; TANDON, V. Topoisomerases: Resistance versus Sensitivity, How Far We Can Go? **Med Res Rev**, v. 37, n. 2, p. 404-438, 2017. 10.1002/med.21417
- BHUTIA, S. K.; MUKHOPADHYAY, S.; SINHA, N.; DAS, D. N.; PANDA, P. K.; PATRA, S. K.; MAITI, T. K.; MANDAL, M.; DENT, P.; WANG, X. Y. *et al.* Autophagy: cancer's friend or foe? **Adv Cancer Res**, v. 118, p. 61-95, 2013. 10.1016/B978-0-12-407173-5.00003-0
- BISCHOF, J.; WESTHOFF, M. A.; WAGNER, J. E.; HALATSCH, M. E.; TRENTMANN, S.; KNIPPSCHILD, U.; WIRTZ, C. R.; BURSTER, T. Cancer stem cells: The potential role of autophagy, proteolysis, and cathepsins in glioblastoma stem cells. **Tumour Biol**, v. 39, n. 3, p. 1010428317692227, 2017. 10.1177/1010428317692227
- BOTA, D. A.; DESJARDINS, A.; QUINN, J. A.; AFFRONTI, M. L.; FRIEDMAN, H. S. Interstitial chemotherapy with biodegradable BCNU (Gliadel) wafers in the treatment of malignant gliomas. **Ther Clin Risk Manag**, v. 3, n. 5, p. 707-15, 2007.
- BOUFFET, E.; JAKACKI, R.; GOLDMAN, S.; HARGRAVE, D.; HAWKINS, C.; SHROFF, M.; HUKIN, J.; BARTELS, U.; FOREMAN, N.; KELLIE, S. *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, 2012. 10.1200/JCO.2011.34.5843
- BRADA, M.; JUDSON, I.; BEALE, P.; MOORE, S.; REIDENBERG, P.; STATKEVICH, P.; DUGAN, M.; BATRA, V.; CUTLER, D. 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, 1999. 10.1038/sj.bjc.6690802
- BRAITHWAITE, P. A.; ROBERTS, M. S.; ALLAN, R. J.; WATSON, T. R. 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.
- BRANDES, A. A.; FRANCESCHI, E.; TOSONI, A.; HEGI, M. E.; STUPP, R. Epidermal growth factor receptor inhibitors in neuro-oncology: hopes and disappointments. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 4, p. 957-60, 2008. 10.1158/1078-0432.CCR-07-1810
- BRANDNER, S.; VON DEIMLING, A. Diagnostic, prognostic and predictive relevance of molecular markers in gliomas. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 41, n. 6, p. 694-720, 2015. 10.1111/nan.12246
- BRENNAN, C. W.; VERHAAK, R. G.; MCKENNA, A.; CAMPOS, B.; NOUSHMEHR, H.; SALAMA, S. R.; ZHENG, S.; CHAKRAVARTY, D.; SANBORN, J. Z.; BERMAN, S. H. *et al.* The somatic genomic landscape of glioblastoma. **Cell**, v. 155, n. 2, p. 462-77, 2013. 10.1016/j.cell.2013.09.034
- BRISTOL, M. L.; EMERY, S. M.; MAYCOTTE, P.; THORBURN, A.; CHAKRADEO, S.; GEWIRTZ, D. A. Autophagy inhibition for chemosensitization and radiosensitization in cancer: do the preclinical data support this therapeutic strategy? **J Pharmacol Exp Ther**, v. 344, n. 3, p. 544-52, 2013. 10.1124/jpet.112.199802
- BURSTEIN, H. J.; MANGU, P. B.; SOMERFIELD, M. R.; SCHRAG, D.; SAMSON, D.; HOLT, L.; ZELMAN, D.; AJANI, J. A.; AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL, O. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline



update on the use of chemotherapy sensitivity and resistance assays. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 24, p. 3328-30, 2011. 10.1200/JCO.2011.36.0354

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, N. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1061-8, 2008. 10.1038/nature07385

CARRILLO, J. A.; MUNOZ, C. A. Alternative chemotherapeutic agents: nitrosoureas, cisplatin, irinotecan. **Neurosurg Clin N Am**, v. 23, n. 2, p. 297-306, ix, 2012. 10.1016/j.nec.2012.01.005

CHAUTARD, E.; OUEDRAOGO, Z. G.; BIAU, J.; VERRELLE, P. Role of Akt in human malignant glioma: from oncogenesis to tumor aggressiveness. **J Neurooncol**, v. 117, n. 2, p. 205-15, 2014. 10.1007/s11060-014-1382-9

CHEN, C. F.; DOU, X. W.; LIANG, Y. K.; LIN, H. Y.; BAI, J. W.; ZHANG, X. X.; WEI, X. L.; LI, Y. C.; ZHANG, G. J. Notch3 overexpression causes arrest of cell cycle progression by inducing Cdh1 expression in human breast cancer cells. **Cell Cycle**, v. 15, n. 3, p. 432-40, 2016. 10.1080/15384101.2015.1127474

CHEN, H. Y.; LIN, L. T.; WANG, M. L.; LEE, S. H.; TSAI, M. L.; TSAI, C. C.; LIU, W. H.; CHEN, T. C.; YANG, Y. P.; LEE, Y. Y. *et al.* Musashi-1 regulates AKT-derived IL-6 autocrinal/paracrinal malignancy and chemoresistance in glioblastoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, p. 42485-42501, 2016. 10.18632/oncotarget.9890

CHEN, X.; PEER, C. J.; ALFARO, R.; TIAN, T.; SPENCER, S. D.; FIGG, W. D. Quantification of irinotecan, SN38, and SN38G in human and porcine plasma by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to hepatic chemoembolization. **J Pharm Biomed Anal**, v. 62, p. 140-8, 2012. 10.1016/j.jpba.2012.01.008

CHOI, B. D.; ARCHER, G. E.; MITCHELL, D. A.; HEIMBERGER, A. B.; MCLENDON, R. E.; BIGNER, D. D.; SAMPSON, J. H. EGFRvIII-targeted vaccination therapy of malignant glioma. **Brain Pathol**, v. 19, n. 4, p. 713-23, 2009. 10.1111/j.1750-3639.2009.00318.x

CLINE, M. J. In vitro test systems for anti-cancer drugs. **N Engl J Med**, v. 280, n. 17, p. 955, 1969. 10.1056/NEJM196904242801712

COPPE, J. P.; DESPREZ, P. Y.; KRTOLICA, A.; CAMPISI, J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. **Annu Rev Pathol**, v. 5, p. 99-118, 2010. 10.1146/annurev-pathol-121808-102144

COPPE, J. P.; KAUSER, K.; CAMPISI, J.; BEAUSEJOUR, C. M. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. **J Biol Chem**, v. 281, n. 40, p. 29568-74, 2006. 10.1074/jbc.M603307200

CORTAZAR, P.; GAZDAR, A. F.; WOODS, E.; RUSSELL, E.; STEINBERG, S. M.; WILLIAMS, J.; IHDE, D. C.; JOHNSON, B. E. Survival of patients with limited-stage small cell lung cancer treated with individualized chemotherapy selected by in vitro drug sensitivity testing. **Clin Cancer Res**, v. 3, n. 5, p. 741-7, 1997.

CRAMER, A. B.; WOLTERING, E. A. Chemosensitivity testing: a critical review. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 28, n. 5-6, p. 405-13, 1991. 10.3109/10408369109106871

CREE, I. A. Designing personalised cancer treatments. **J Control Release**, v. 172, n. 2, p. 405-9, 2013. 10.1016/j.jconrel.2013.07.007

CREE, I. A.; CHARLTON, P. Molecular chess? Hallmarks of anti-cancer drug resistance. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 10, 2017. 10.1186/s12885-016-2999-1

CUI, H.; KONG, Y.; XU, M.; ZHANG, H. Notch3 functions as a tumor suppressor by controlling cellular senescence. **Cancer Res**, v. 73, n. 11, p. 3451-9, 2013. 10.1158/0008-5472.CAN-12-3902

CUI, Y.; LIN, J.; ZUO, J.; ZHANG, L.; DONG, Y.; HU, G.; LUO, C.; CHEN, J.; LU, Y. AKT2-knockdown suppressed viability with enhanced apoptosis, and attenuated chemoresistance to temozolomide of human glioblastoma cells in vitro and in vivo. **Onco Targets Ther**, v. 8, p. 1681-90, 2015. 10.2147/OTT.S83795

CUMMINGS, C. T.; DERYCKERE, D.; EARP, H. S.; GRAHAM, D. K. Molecular pathways: MERTK signaling in cancer. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 19, p. 5275-80, 2013. 10.1158/1078-0432.CCR-12-1451

DENDY, P. P. The use of in vitro methods to predict tumour response to chemotherapy. **Br J Cancer Suppl**, v. 4, p. 195-8, 1980.

DOUDICAN, N.; RODRIGUEZ, A.; OSMAN, I.; ORLOW, S. J. Mebendazole induces apoptosis via Bcl-2 inactivation in chemoresistant melanoma cells. **Mol Cancer Res**, v. 6, n. 8, p. 1308-15, 2008. 10.1158/1541-7786.MCR-07-2159

DOUDICAN, N. A.; BYRON, S. A.; POLLOCK, P. M.; ORLOW, S. J. XIAP downregulation accompanies mebendazole growth inhibition in melanoma xenografts. **Anticancer Drugs**, v. 24, n. 2, p. 181-8, 2013. 10.1097/CAD.0b013e32835a43f1

DUTOIT, V.; MIGLIORINI, D.; DIETRICH, P. Y.; WALKER, P. R. Immunotherapy of Malignant Tumors in the Brain: How Different from Other Sites? **Front Oncol**, v. 6, p. 256, 2016. 10.3389/fonc.2016.00256

EAGLE, H.; FOLEY, G. E. The cytotoxic action of carcinolytic agents in tissue culture. **Am J Med**, v. 21, n. 5, p. 739-49, 1956.

ELSAMADICY, A. A.; CHONGSATHIDKIET, P.; DESAI, R.; WORONIECKA, K.; FARBER, S. H.; FECCI, P. E.; SAMPSON, J. H. Prospect of rindopepimut in the treatment of glioblastoma. **Expert Opin Biol Ther**, v. 17, n. 4, p. 507-513, 2017. 10.1080/14712598.2017.1299705

ENE, C. I.; HOLLAND, E. C. Personalized medicine for gliomas. **Surg Neurol Int**, v. 6, n. Suppl 1, p. S89-95, 2015. 10.4103/2152-7806.151351

FILIPPI-CHIELA, E. C.; BUENO E SILVA, M. M.; THOME, M. P.; LENZ, G. Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. **Autophagy**, v. 11, n. 7, p. 1099-113, 2015. 10.1080/15548627.2015.1009795

FILIPPI-CHIELA, E. C.; OLIVEIRA, M. M.; JURKOVSKI, B.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; DA SILVA, V. D.; LENZ, G. Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e42522, 2012. 10.1371/journal.pone.0042522

FILIPPI-CHIELA, E. C.; THOME, M. P.; BUENO E SILVA, M. M.; PELEGRINI, A. L.; LEDUR, P. F.; GARICOCHEA, B.; ZAMIN, L. L.; LENZ, G. Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells. **BMC Cancer**, v. 13, p. 147, 2013. 10.1186/1471-2407-13-147

FRIEDMAN, H. S.; PRADOS, M. D.; WEN, P. Y.; MIKKELSEN, T.; SCHIFF, D.; ABREY, L. E.; YUNG, W. K.; PALEOLOGOS, N.; NICHOLAS, M. K.; JENSEN, R. *et al.* Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 28, p. 4733-40, 2009. 10.1200/JCO.2008.19.8721

FULTON, D.; URTASUN, R.; FORSYTH, P. Phase II study of prolonged oral therapy with etoposide (VP16) for patients with recurrent malignant glioma. **J Neurooncol**, v. 27, n. 2, p. 149-55, 1996.

FURUKAWA, T.; KUBOTA, T.; HOFFMAN, R. M. Clinical applications of the histoculture drug response assay. **Clin Cancer Res**, v. 1, n. 3, p. 305-11, 1995.

GAMMOH, N.; FRASER, J.; PUENTE, C.; SYRED, H. M.; KANG, H.; OZAWA, T.; LAM, D.; ACOSTA, J. C.; FINCH, A. J.; HOLLAND, E. *et al.* Suppression of autophagy impedes glioblastoma development and induces senescence. **Autophagy**, v. 12, n. 9, p. 1431-9, 2016. 10.1080/15548627.2016.1190053

GARATTINI, S.; SHORE, P. A. **Advances in pharmacology**. New York,: Academic Press.

GEELEHER, P.; COX, N. J.; HUANG, R. S. Clinical drug response can be predicted using baseline gene expression levels and in vitro drug sensitivity in cell lines. **Genome Biol**, v. 15, n. 3, p. R47, 2014. 10.1186/gb-2014-15-3-r47

GEHRING, M. P.; KIPPER, F.; NICOLETTI, N. F.; SPEROTTO, N. D.; ZANIN, R.; TAMAJUSUKU, A. S.; FLORES, D. G.; MEURER, L.; ROESLER, R.; FILHO, A. B. *et al.* P2X7 receptor as predictor gene for glioma radiosensitivity and median survival. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 68, p. 92-100, 2015. 10.1016/j.biocel.2015.09.001

GEHRING, M. P.; PEREIRA, T. C.; ZANIN, R. F.; BORGES, M. C.; BRAGA FILHO, A.; BATTASTINI, A. M.; BOGO, M. R.; LENZ, G.; CAMPOS, M. M.; MORRONE, F. B. P2X7 receptor activation leads to increased cell death

in a radiosensitive human glioma cell line. **Purinergic Signal**, v. 8, n. 4, p. 729-39, 2012. 10.1007/s11302-012-9319-2

GELDERBLOM, H.; BAKER, S. D.; ZHAO, M.; VERWEIJ, J.; SPARREBOOM, A. Distribution of paclitaxel in plasma and cerebrospinal fluid. **Anticancer Drugs**, v. 14, n. 5, p. 365-8, 2003. 10.1097/01.cad.0000070483.94284.87

GENG, Y.; KOHLI, L.; KLOCKE, B. J.; ROTH, K. A. Chloroquine-induced autophagic vacuole accumulation and cell death in glioma cells is p53 independent. **Neuro Oncol**, v. 12, n. 5, p. 473-81, 2010. 10.1093/neuonc/nop048

GEORGAKILAS, A. G.; MARTIN, O. A.; BONNER, W. M. p21: A Two-Faced Genome Guardian. **Trends Mol Med**, v. 23, n. 4, p. 310-319, 2017. 10.1016/j.molmed.2017.02.001

GILBERT, C. A.; DAOU, M. C.; MOSER, R. P.; ROSS, A. H. Gamma-secretase inhibitors enhance temozolomide treatment of human gliomas by inhibiting neurosphere repopulation and xenograft recurrence. **Cancer Res**, v. 70, n. 17, p. 6870-9, 2010. 10.1158/0008-5472.CAN-10-1378

GILBERT, M. R.; DIGNAM, J. J.; ARMSTRONG, T. S.; WEFEL, J. S.; BLUMENTHAL, D. T.; VOGELBAUM, M. A.; COLMAN, H.; CHAKRAVARTI, A.; PUGH, S.; WON, M. *et al.* A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. **N Engl J Med**, v. 370, n. 8, p. 699-708, 2014. 10.1056/NEJMoa1308573

GRONINGER, E.; MEEUWSEN-DE BOER, T.; KOOPMANS, P.; UGES, D.; SLUITER, W.; VEERMAN, A.; KAMPS, W.; DE GRAAF, S. Vincristine pharmacokinetics and response to vincristine monotherapy in an up-front window study of the Dutch Childhood Leukaemia Study Group (DCLSG). **Eur J Cancer**, v. 41, n. 1, p. 98-103, 2005. 10.1016/j.ejca.2004.10.006

HAMBURGER, A.; SALMON, S. E. Primary bioassay of human myeloma stem cells. **J Clin Invest**, v. 60, n. 4, p. 846-54, 1977. 10.1172/JCI108839

HE, X.; BATCHELOR, T. T.; GROSSMAN, S.; SUPKO, J. G.; NEW APPROACHES TO BRAIN TUMOR THERAPY, C. N. S. C. Determination of procarbazine in human plasma by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 799, n. 2, p. 281-91, 2004.

HEGI, M. E.; DISERENS, A. C.; GORLIA, T.; HAMOU, M. F.; DE TRIBOLET, N.; WELLER, M.; KROS, J. M.; HAINFELLNER, J. A.; MASON, W.; MARIANI, L. *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **N Engl J Med**, v. 352, n. 10, p. 997-1003, 2005. 10.1056/NEJMoa043331

HIDALGO, M.; AMANT, F.; BIANKIN, A. V.; BUDINSKA, E.; BYRNE, A. T.; CALDAS, C.; CLARKE, R. B.; DE JONG, S.; JONKERS, J.; MAELANDSMO, G. M. *et al.* Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. **Cancer Discov**, v. 4, n. 9, p. 998-1013, 2014. 10.1158/2159-8290.CD-14-0001

HIROTSU, M.; SETOGUCHI, T.; MATSUNOSHITA, Y.; SASAKI, H.; NAGAO, H.; GAO, H.; SUGIMURA, K.; KOMIYA, S. Tumour formation by single fibroblast growth factor receptor 3-positive rhabdomyosarcoma-initiating cells. **Br J Cancer**, v. 101, n. 12, p. 2030-7, 2009. 10.1038/sj.bjc.6605407

HOFFMAN, R. M. In vitro assays for chemotherapy sensitivity. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 15, n. 2, p. 99-111, 1993.

HOLZMANN, K.; GRUNT, T.; HEINZLE, C.; SAMPL, S.; STEINHOFF, H.; REICHMANN, N.; KLEITER, M.; HAUCK, M.; MARIAN, B. Alternative Splicing of Fibroblast Growth Factor Receptor IgIII Loops in Cancer. **J Nucleic Acids**, v. 2012, p. 950508, 2012. 10.1155/2012/950508

HORITA, Y.; YAMADA, Y.; HIRASHIMA, Y.; KATO, K.; NAKAJIMA, T.; HAMAGUCHI, T.; SHIMADA, Y. Effects of bevacizumab on plasma concentration of irinotecan and its metabolites in advanced colorectal cancer patients receiving FOLFIRI with bevacizumab as second-line chemotherapy. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 65, n. 3, p. 467-71, 2010. 10.1007/s00280-009-1051-4

HOWARD, C. M.; VALLURI, J.; ALBERICO, A.; JULIEN, T.; MAZAGRI, R.; MARSH, R.; ALASTAIR, H.; CORTESE, A.; GRISWOLD, M.; WANG, W. *et al.* Analysis of Chemopredictive Assay for Targeting Cancer Stem Cells in Glioblastoma Patients. **Transl Oncol**, v. 10, n. 2, p. 241-254, 2017. 10.1016/j.tranon.2017.01.008

HUGHES, L. A.; MELOTTE, V.; DE SCHRIJVER, J.; DE MAAT, M.; SMIT, V. T.; BOVEE, J. V.; FRENCH, P. J.; VAN DEN BRANDT, P. A.; SCHOUTEN, L. J.; DE MEYER, T. *et al.* The CpG island methylator phenotype: what's in a name? **Cancer Res**, v. 73, n. 19, p. 5858-68, 2013. 10.1158/0008-5472.CAN-12-4306

ICHIMURA, Y.; KUMANOMIDOU, T.; SOU, Y. S.; MIZUSHIMA, T.; EZAKI, J.; UENO, T.; KOMINAMI, E.; YAMANE, T.; TANAKA, K.; KOMATSU, M. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. **J Biol Chem**, v. 283, n. 33, p. 22847-57, 2008. 10.1074/jbc.M802182200

JIANG, Y.; MARINESCU, V. D.; XIE, Y.; JARVIUS, M.; MATURI, N. P.; HAGLUND, C.; OLOFSSON, S.; LINDBERG, N.; OLOFSSON, T.; LEIJONMARCK, C. *et al.* Glioblastoma Cell Malignancy and Drug Sensitivity Are Affected by the Cell of Origin. **Cell Rep**, v. 18, n. 4, p. 977-990, 2017. 10.1016/j.celrep.2017.01.003

JORDAN, M. A. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. **Curr Med Chem Anticancer Agents**, v. 2, n. 1, p. 1-17, 2002.

KANG, C.; XU, Q.; MARTIN, T. D.; LI, M. Z.; DEMARIA, M.; ARON, L.; LU, T.; YANKNER, B. A.; CAMPISI, J.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. **Science**, v. 349, n. 6255, p. aaa5612, 2015. 10.1126/science.aaa5612

KARAPETIS, C. S.; KHAMBATA-FORD, S.; JONKER, D. J.; O'CALLAGHAN, C. J.; TU, D.; TEBBUTT, N. C.; SIMES, R. J.; CHALCHAL, H.; SHAPIRO, J. D.; ROBITAILLE, S. *et al.* K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. **N Engl J Med**, v. 359, n. 17, p. 1757-65, 2008. 10.1056/NEJMoa0804385

KASTRISSIOS, H.; CHAO, N. J.; BLASCHKE, T. F. Pharmacokinetics of high-dose oral CCNU in bone marrow transplant patients. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 38, n. 5, p. 425-30, 1996. 10.1007/s002800050506

KATSETOS, C. D.; DRABER, P.; KAVALLARIS, M. Targeting betaIII-tubulin in glioblastoma multiforme: from cell biology and histopathology to cancer therapeutics. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 11, n. 8, p. 719-28, 2011.

KISURINA-EVGEN'EVA, O. P.; BRIANTSEVA, S. A.; STIL, A. A.; ONISHCHENKO, G. E. [Antimicrotubule agents can activate different apoptotic pathways]. **Biofizika**, v. 51, n. 5, p. 875-9, 2006.

KIYA, K.; UOZUMI, T.; OGASAWARA, H.; SUGIYAMA, K.; HOTTA, T.; MIKAMI, T.; KURISU, K. Penetration of etoposide into human malignant brain tumors after intravenous and oral administration. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 29, n. 5, p. 339-42, 1992.

KLIONSKY, D. J.; ABDELMOHSEN, K.; ABE, A.; ABEDIN, M. J.; ABELIOVICH, H.; ACEVEDO AROZENA, A.; ADACHI, H.; ADAMS, C. M.; ADAMS, P. D.; ADELI, K. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy**, v. 12, n. 1, p. 1-222, 2016. 10.1080/15548627.2015.1100356

KNUBEL, K. H.; PERNU, B. M.; SUFIT, A.; NELSON, S.; PIERCE, A. M.; KEATING, A. K. MerTK inhibition is a novel therapeutic approach for glioblastoma multiforme. **Oncotarget**, v. 5, n. 5, p. 1338-51, 2014. 10.18632/oncotarget.1793

KOMATSU, M.; WAGURI, S.; KOIKE, M.; SOU, Y. S.; UENO, T.; HARA, T.; MIZUSHIMA, N.; IWATA, J.; EZAKI, J.; MURATA, S. *et al.* Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. **Cell**, v. 131, n. 6, p. 1149-63, 2007. 10.1016/j.cell.2007.10.035

KREISL, T. N.; KIM, L.; MOORE, K.; DUIC, P.; ROYCE, C.; STROUD, I.; GARREN, N.; MACKEY, M.; BUTMAN, J. A.; CAMPHAUSEN, K. *et al.* Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 5, p. 740-5, 2009. 10.1200/JCO.2008.16.3055

KURBACHER, C. M.; CREE, I. A.; BRUCKNER, H. W.; BRENNE, U.; KURBACHER, J. A.; MULLER, K.; ACKERMANN, T.; GILSTER, T. J.; WILHELM, L. M.; ENGEL, H. *et al.* Use of an ex vivo ATP luminescence assay to direct chemotherapy for recurrent ovarian cancer. **Anticancer Drugs**, v. 9, n. 1, p. 51-7, 1998.

KURZ, D. J.; DECARY, S.; HONG, Y.; ERUSALIMSKY, J. D. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. **J Cell Sci**, v. 113 ( Pt 20), p. 3613-22, 2000.

LEE, D. W.; RAMAKRISHNAN, D.; VALENTA, J.; PARNEY, I. F.; BAYLESS, K. J.; SITCHERAN, R. The NF-kappaB RelB protein is an oncogenic driver of mesenchymal glioma. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e57489, 2013. 10.1371/journal.pone.0057489

LEE, F. Y.; WORKMAN, P.; ROBERTS, J. T.; BLEEHEN, N. M. Clinical pharmacokinetics of oral CCNU (lomustine). **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 14, n. 2, p. 125-31, 1985.

LEE, J.; SON, M. J.; WOOLARD, K.; DONIN, N. M.; LI, A.; CHENG, C. H.; KOTLIAROVA, S.; KOTLIAROV, Y.; WALLING, J.; AHN, S. *et al.* Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells. **Cancer Cell**, v. 13, n. 1, p. 69-80, 2008. 10.1016/j.ccr.2007.12.005

LEE, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Genes & Diseases**, v. 3, n. 3, p. 198-210, 2016. 10.1016/j.gendis.2016.04.007

LEI, Y.; ZHANG, D.; YU, J.; DONG, H.; ZHANG, J.; YANG, S. Targeting autophagy in cancer stem cells as an anticancer therapy. **Cancer Lett**, v. 393, p. 33-39, 2017. 10.1016/j.canlet.2017.02.012

LI, A.; WALLING, J.; KOTLIAROV, Y.; CENTER, A.; STEED, M. E.; AHN, S. J.; ROSENBLUM, M.; MIKKELSEN, T.; ZENKLUSEN, J. C.; FINE, H. A. Genomic changes and gene expression profiles reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas. **Mol Cancer Res**, v. 6, n. 1, p. 21-30, 2008. 10.1158/1541-7786.MCR-07-0280

LI, Y.; HOU, M.; LU, G.; CICCONE, N.; WANG, X.; ZHANG, H. The Prognosis of Anti-Angiogenesis Treatments Combined with Standard Therapy for Newly Diagnosed Glioblastoma: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **PLoS One**, v. 11, n. 12, p. e0168264, 2016. 10.1371/journal.pone.0168264

LOZZI, V.; CHAN, J. K.; OSANN, K.; CAPPUCINI, F.; DISAIA, P. J.; BERMAN, M. L. Survival outcomes in patients with recurrent ovarian cancer who were treated with chemoresistance assay-guided chemotherapy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 189, n. 5, p. 1301-7, 2003.

LOUIS, D. N.; PERRY, A.; REIFENBERGER, G.; VON DEIMLING, A.; FIGARELLA-BRANGER, D.; CAVENEE, W. K.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; KLEIHUES, P.; ELLISON, D. W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathol**, v. 131, n. 6, p. 803-20, 2016. 10.1007/s00401-016-1545-1

MAITLAND, K.; WILLIAMS, T. N.; KOTECKA, B. M.; EDSTEIN, M. D.; RIECKMANN, K. H. Plasma chloroquine concentrations in young and older malaria patients treated with chloroquine. **Acta Trop**, v. 66, n. 3, p. 155-61, 1997.

MALHOTRA, V.; PERRY, M. C. Classical chemotherapy: mechanisms, toxicities and the therapeutic window. **Cancer Biol Ther**, v. 2, n. 4 Suppl 1, p. S2-4, 2003.

MCGRANAHAN, N.; SWANTON, C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 613-628, 2017. 10.1016/j.cell.2017.01.018

MUKHOPADHYAY, T.; SASAKI, J.; RAMESH, R.; ROTH, J. A. 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, 2002.

OLAR, A.; ALDAPE, K. D. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. **J Pathol**, v. 232, n. 2, p. 165-77, 2014. 10.1002/path.4282

OSTERMANN, S.; CSAJKA, C.; BUCLIN, T.; LEYVRAZ, S.; LEJEUNE, F.; DECOSTERD, L. A.; STUPP, R. Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 11, p. 3728-36, 2004. 10.1158/1078-0432.CCR-03-0807

OSUKA, S.; VAN MEIR, E. G. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. **J Clin Invest**, v. 127, n. 2, p. 415-426, 2017. 10.1172/JCI89587

PAGE, R.; TAKIMOTO, C. Principles of Chemotherapy. In: PAZDUR, R.; CAMPHAUSEN, K. A., *et al* (Ed.). **Cancer Management: A Multidisciplinary Approach** Cmp United Business Media, 2008. cap. 3, ISBN 9781891483622.

PAN, S. T.; LI, Z. L.; HE, Z. X.; QIU, J. X.; ZHOU, S. F. Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 43, n. 8, p. 723-37, 2016. 10.1111/1440-1681.12581

PANTZIARKA, P.; BOUCHE, G.; MEHEUS, L.; SUKHATME, V.; SUKHATME, V. P. Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-mebendazole as an anti-cancer agent. **Ecancermedicalsecience**, v. 8, p. 443, 2014. 10.3332/ecancer.2014.443

PATEL, A. P.; TIROSH, I.; TROMBETTA, J. J.; SHALEK, A. K.; GILLESPIE, S. M.; WAKIMOTO, H.; CAHILL, D. P.; NAHED, B. V.; CURRY, W. T.; MARTUZA, R. L. *et al.* Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. **Science**, v. 344, n. 6190, p. 1396-401, 2014. 10.1126/science.1254257

PAZDUR, R.; CAMPHAUSEN, K. A.; WAGMAN, L. D.; HOSKINS, W. J. **Cancer Management: A Multidisciplinary Approach**. Cmp United Business Media, 2008. ISBN 9781891483622. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=wbLnPAAACAAJ> >.

PERRY, A.; WESSELING, P. Histologic classification of gliomas. **Handb Clin Neurol**, v. 134, p. 71-95, 2016. 10.1016/B978-0-12-802997-8.00005-0

POLIVKA, J., JR.; POLIVKA, J.; HOLUBEC, L.; KUBIKOVA, T.; PRIBAN, V.; HES, O.; PIVOVARCIKOVA, K.; TRESKOVA, I. Advances in Experimental Targeted Therapy and Immunotherapy for Patients with Glioblastoma Multiforme. **Anticancer Res**, v. 37, n. 1, p. 21-33, 2017. 10.21873/anticancer.11285

PREISS, R.; BAUMANN, F.; REGENTHAL, R.; MATTHIAS, M. Plasma kinetics of procarbazine and azo-procarbazine in humans. **Anticancer Drugs**, v. 17, n. 1, p. 75-80, 2006.

PRESSEY, J. G.; HAAS, M. C.; PRESSEY, C. S.; KELLY, V. M.; PARKER, J. N.; GILLESPIE, G. Y.; FRIEDMAN, G. K. CD133 marks a myogenically primitive subpopulation in rhabdomyosarcoma cell lines that are relatively chemoresistant but sensitive to mutant HSV. **Pediatr Blood Cancer**, v. 60, n. 1, p. 45-52, 2013. 10.1002/pbc.24117

QUINN, J. A.; JIANG, S. X.; REARDON, D. A.; DESJARDINS, A.; VREDENBURGH, J. J.; FRIEDMAN, A. H.; SAMPSON, J. H.; MCLENDON, R. E.; HERNDON, J. E., 2ND; FRIEDMAN, H. S. Phase II trial of temozolomide (TMZ) plus irinotecan (CPT-11) in adults with newly diagnosed glioblastoma multiforme before radiotherapy. **J Neurooncol**, v. 95, n. 3, p. 393-400, 2009. 10.1007/s11060-009-9937-x

REARDON, D. A.; DESJARDINS, A.; VREDENBURGH, J. J.; GURURANGAN, S.; SAMPSON, J. H.; SATHORNSUMETEE, S.; MCLENDON, R. E.; HERNDON, J. E., 2ND; MARCELLO, J. E.; NORFLEET, J. *et al.* Metronomic chemotherapy with daily, oral etoposide plus bevacizumab for recurrent malignant glioma: a phase II study. **Br J Cancer**, v. 101, n. 12, p. 1986-94, 2009. 10.1038/sj.bjc.6605412

RIVA, C.; LAVIEILLE, J. P.; SCHMERBER, S.; CUISNIE, O.; REYT, E. Phase II trial of cisplatin, 5-fluorouracil and folinic acid using a weekly 24-h infusion schedule for locally advanced head and neck cancer: a pharmacokinetic and clinical survey. **Int J Oncol**, v. 17, n. 3, p. 543-9, 2000.

ROSENFELD, M. R.; YE, X.; SUPKO, J. G.; DESIDERI, S.; GROSSMAN, S. A.; BREM, S.; MIKKELSON, T.; WANG, D.; CHANG, Y. C.; HU, J. *et al.* A phase I/II trial of hydroxychloroquine in conjunction with radiation therapy and concurrent and adjuvant temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. **Autophagy**, v. 10, n. 8, p. 1359-68, 2014. 10.4161/auto.28984

RYBINSKI, B.; YUN, K. Addressing intra-tumoral heterogeneity and therapy resistance. **Oncotarget**, v. 7, n. 44, p. 72322-72342, 2016. 10.18632/oncotarget.11875

SAMSON, D. J.; SEIDENFELD, J.; ZIEGLER, K.; ARONSON, N. Chemotherapy sensitivity and resistance assays: a systematic review. **J Clin Oncol**, v. 22, n. 17, p. 3618-30, 2004. 10.1200/JCO.2004.04.077

SANTOS, S. A.; PAULO, A. Small molecule inhibitors of multidrug resistance gene (MDR1) expression: preclinical evaluation and mechanisms of action. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 13, n. 8, p. 814-28, 2013.

SASAKI, J.; RAMESH, R.; CHADA, S.; GOMYO, Y.; ROTH, J. A.; MUKHOPADHYAY, T. 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, 2002.

SATO, H.; SENBA, H.; VIRGONA, N.; FUKUMOTO, K.; ISHIDA, T.; HAGIWARA, H.; NEGISHI, E.; UENO, K.; YAMASAKI, H.; YANO, T. Connexin 32 potentiates vinblastine-induced cytotoxicity in renal cell carcinoma cells. **Mol Carcinog**, v. 46, n. 3, p. 215-24, 2007. 10.1002/mc.20267

SAVAGE, P. Approvals in 2016: cost-benefit challenges of new anticancer agents. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 14, n. 3, p. 133-134, 2017. 10.1038/nrclinonc.2017.12

SCHNIPPER, L. E.; DAVIDSON, N. E.; WOLLINS, D. S.; BLAYNEY, D. W.; DICKER, A. P.; GANZ, P. A.; HOVERMAN, J. R.; LANGDON, R.; LYMAN, G. H.; MEROPOL, N. J. *et al.* Updating the American Society of Clinical Oncology Value Framework: Revisions and Reflections in Response to Comments Received. **J Clin Oncol**, v. 34, n. 24, p. 2925-34, 2016. 10.1200/JCO.2016.68.2518

SCHNIPPER, L. E.; DAVIDSON, N. E.; WOLLINS, D. S.; TYNE, C.; BLAYNEY, D. W.; BLUM, D.; DICKER, A. P.; GANZ, P. A.; HOVERMAN, J. R.; LANGDON, R. *et al.* American Society of Clinical Oncology Statement: A Conceptual Framework to Assess the Value of Cancer Treatment Options. **J Clin Oncol**, v. 33, n. 23, p. 2563-77, 2015. 10.1200/JCO.2015.61.6706

SCHRAG, D.; GAREWAL, H. S.; BURSTEIN, H. J.; SAMSON, D. J.; VON HOFF, D. D.; SOMERFIELD, M. R.; SENSITIVITY, A. W. G. O. C.; RESISTANCE, A. American Society of Clinical Oncology Technology Assessment: chemotherapy sensitivity and resistance assays. **J Clin Oncol**, v. 22, n. 17, p. 3631-8, 2004. 10.1200/JCO.2004.05.065

SHARMA, S. V.; LEE, D. Y.; LI, B.; QUINLAN, M. P.; TAKAHASHI, F.; MAHESWARAN, S.; MCDERMOTT, U.; AZIZIAN, N.; ZOU, L.; FISCHBACH, M. A. *et al.* A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 69-80, 2010. 10.1016/j.cell.2010.02.027

SHAW, G. L.; GAZDAR, A. F.; PHELPS, R.; LINNOILA, R. I.; IHDE, D. C.; JOHNSON, B. E.; OIE, H. K.; PASS, H. I.; STEINBERG, S. M.; GHOSH, B. C. *et al.* Individualized chemotherapy for patients with non-small cell lung cancer determined by prospective identification of neuroendocrine markers and in vitro drug sensitivity testing. **Cancer Res**, v. 53, n. 21, p. 5181-7, 1993.

SIEGEL-LAKHAI, W. S.; CRUL, M.; ZHANG, S.; SPARIDANS, R. W.; PLUIM, D.; HOWES, A.; SOLANKI, B.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. Phase I and pharmacological study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib (Zarnestra, R115777) in combination with gemcitabine and cisplatin in patients with advanced solid tumours. **Br J Cancer**, v. 93, n. 11, p. 1222-9, 2005. 10.1038/sj.bjc.6602850

SILVA, A. O.; FELIPE, K. B.; VILLODRE, E. S.; LOPEZ, P. L.; LENZ, G. A guide for the analysis of long-term population growth in cancer. **Tumour Biol**, v. 37, n. 10, p. 13743-13749, 2016. 10.1007/s13277-016-5255-z

SILVA, M. M. B. **Alterações mitocondriais e reprogramação metabólica em células de glioblastoma após tratamento com temozolomida.** 2016. 71 (MSc). PPGBCM, UFRGS, Porto Alegre.

SINGH, D.; CHAN, J. M.; ZOPPOLI, P.; NIOLA, F.; SULLIVAN, R.; CASTANO, A.; LIU, E. M.; REICHEL, J.; PORRATI, P.; PELLEGGATTA, S. *et al.* Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma. **Science**, v. 337, n. 6099, p. 1231-5, 2012. 10.1126/science.1220834

SINGH, R.; GEORGE, J.; SHUKLA, Y. Role of senescence and mitotic catastrophe in cancer therapy. **Cell Div**, v. 5, p. 4, 2010. 10.1186/1747-1028-5-4

SOTELO, J.; BRICENO, E.; LOPEZ-GONZALEZ, M. A. Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Ann Intern Med**, v. 144, n. 5, p. 337-43, 2006.

STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**, v. 574, n. 2, p. 193-203, 2015. 10.1016/j.gene.2015.08.009

STEWART, D. J.; LU, K.; BENJAMIN, R. S.; LEAVENS, M. E.; LUNA, M.; YAP, H. Y.; LOO, T. L. Concentration of vinblastine in human intracerebral tumor and other tissues. **J Neurooncol**, v. 1, n. 2, p. 139-44, 1983.

STIEBER, V. W.; MEHTA, M. P. Advances in radiation therapy for brain tumors. **Neurol Clin**, v. 25, n. 4, p. 1005-33, ix, 2007. 10.1016/j.ncl.2007.07.005

STUPP, R.; MASON, W. P.; VAN DEN BENT, M. J.; WELLER, M.; FISHER, B.; TAPHOORN, M. J.; BELANGER, K.; BRANDES, A. A.; MAROSI, C.; BOGDAHN, U. *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med**, v. 352, n. 10, p. 987-96, 2005. 10.1056/NEJMoa043330

TEODORCZYK, M.; SCHMIDT, M. H. Notching on Cancer's Door: Notch Signaling in Brain Tumors. **Front Oncol**, v. 4, p. 341, 2014. 10.3389/fonc.2014.00341

THOME, M. P.; FILIPPI-CHIELA, E. C.; VILLODRE, E. S.; MIGLIAVACA, C. B.; ONZI, G. R.; FELIPE, K. B.; LENZ, G. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. **J Cell Sci**, v. 129, n. 24, p. 4622-4632, 2016. 10.1242/jcs.195057

TURAJLIC, S.; SWANTON, C. Implications of cancer evolution for drug development. **Nat Rev Drug Discov**, 2017. 10.1038/nrd.2017.78

TWENTYMAN, P. R. Sensitivity to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and 1-(2-chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea of the EMT6 tumor in vivo as determined by both tumor volume response and in vitro plating assay. **Cancer Res**, v. 38, n. 8, p. 2395-400, 1978.

URIEN, S.; BRAIN, E.; BUGAT, R.; PIVOT, X.; LOCHON, I.; VAN, M. L.; VAUZELLE, F.; LOKIEC, F. Pharmacokinetics of platinum after oral or intravenous cisplatin: a phase 1 study in 32 adult patients. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 55, n. 1, p. 55-60, 2005. 10.1007/s00280-004-0852-8

VAN MEIR, E. G.; HADJIPANAYIS, C. G.; NORDEN, A. D.; SHU, H. K.; WEN, P. Y.; OLSON, J. J. 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, 2010. 10.3322/caac.20069

VAN VUUREN, R. J.; VISAGIE, M. H.; THERON, A. E.; JOUBERT, A. M. Antimitotic drugs in the treatment of cancer. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 76, n. 6, p. 1101-12, 2015. 10.1007/s00280-015-2903-8

VELDHOEN, R. A.; BANMAN, S. L.; HEMMERLING, D. R.; ODSER, R.; SIMMEN, T.; SIMMONDS, A. J.; UNDERHILL, D. A.; GOPING, I. S. The chemotherapeutic agent paclitaxel inhibits autophagy through two distinct mechanisms that regulate apoptosis. **Oncogene**, v. 32, n. 6, p. 736-46, 2013. 10.1038/onc.2012.92

VELIZ, I.; LOO, Y.; CASTILLO, O.; KARACHALIOU, N.; NIGRO, O.; ROSELL, R. Advances and challenges in the molecular biology and treatment of glioblastoma-is there any hope for the future? **Ann Transl Med**, v. 3, n. 1, p. 7, 2015. 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.10.06

VERHAAK, R. G.; HOADLEY, K. A.; PURDOM, E.; WANG, V.; QI, Y.; WILKERSON, M. D.; MILLER, C. R.; DING, L.; GOLUB, T.; MESIROV, J. P. *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 98-110, 2010. 10.1016/j.ccr.2009.12.020

VESSONI, A. T.; FILIPPI-CHIELA, E. C.; MENCK, C. F.; LENZ, G. Autophagy and genomic integrity. **Cell Death Differ**, v. 20, n. 11, p. 1444-54, 2013. 10.1038/cdd.2013.103

VIZCAINO, M. A.; SHAH, S.; EBERHART, C. G.; RODRIGUEZ, F. J. Clinicopathologic implications of NF1 gene alterations in diffuse gliomas. **Hum Pathol**, v. 46, n. 9, p. 1323-30, 2015. 10.1016/j.humpath.2015.05.014

VOLM, M.; EFFERTH, T. Prediction of Cancer Drug Resistance and Implications for Personalized Medicine. **Front Oncol**, v. 5, p. 282, 2015. 10.3389/fonc.2015.00282

VON HOFF, D. D. He's not going to talk about in vitro predictive assays again, is he? **J Natl Cancer Inst**, v. 82, n. 2, p. 96-101, 1990.

VON HOFF, D. D.; SANDBACH, J. F.; CLARK, G. M.; TURNER, J. N.; FORSETH, B. F.; PICCART, M. J.; COLOMBO, N.; MUGGIA, F. M. Selection of cancer chemotherapy for a patient by an in vitro assay versus a clinician. **J Natl Cancer Inst**, v. 82, n. 2, p. 110-6, 1990.

VON HOFF, D. D.; WEISENTHAL, L. In vitro methods to predict for patient response to chemotherapy. **Adv Pharmacol Chemother**, v. 17, p. 133-56, 1980.

VREDENBURGH, J. J.; DESJARDINS, A.; HERNDON, J. E., 2ND; MARCELLO, J.; REARDON, D. A.; QUINN, J. A.; RICH, J. N.; SATHORNSUMETEE, S.; GURURANGAN, S.; SAMPSON, J. *et al.* Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 30, p. 4722-9, 2007. 10.1200/JCO.2007.12.2440

WALKER, O.; DAWODU, A. H.; ADEYOKUNNU, A. A.; SALAKO, L. A.; ALVAN, G. Plasma chloroquine and desethylchloroquine concentrations in children during and after chloroquine treatment for malaria. **Br J Clin Pharmacol**, v. 16, n. 6, p. 701-5, 1983.



WANG, Z.; YANG, J.; XU, G.; WANG, W.; LIU, C.; YANG, H.; YU, Z.; LEI, Q.; XIAO, L.; XIONG, J. *et al.* Targeting miR-381-NEFL axis sensitizes glioblastoma cells to temozolomide by regulating stemness factors and multidrug resistance factors. **Oncotarget**, v. 6, n. 5, p. 3147-64, 2015. 10.18632/oncotarget.3061

WANG, Z.; ZHANG, C.; SUN, L.; LIANG, J.; LIU, X.; LI, G.; YAO, K.; ZHANG, W.; JIANG, T. FGFR3, as a receptor tyrosine kinase, is associated with differentiated biological functions and improved survival of glioma patients. **Oncotarget**, v. 7, n. 51, p. 84587-84593, 2016. 10.18632/oncotarget.13139

WARREN, K. E.; GURURANGAN, S.; GEYER, J. R.; MCLENDON, R. E.; POUSSAINT, T. Y.; WALLACE, D.; BALIS, F. M.; BERG, S. L.; PACKER, R. J.; GOLDMAN, S. *et al.* A phase II study of O6-benzylguanine and temozolomide in pediatric patients with recurrent or progressive high-grade gliomas and brainstem gliomas: a Pediatric Brain Tumor Consortium study. **J Neurooncol**, v. 106, n. 3, p. 643-9, 2012. 10.1007/s11060-011-0709-z

WATANABE, R.; TAKIGUCHI, Y.; MORIYA, T.; ODA, S.; KUROSU, K.; TANABE, N.; TATSUMI, K.; NAGAO, K.; KURIYAMA, T. Feasibility of combination chemotherapy with cisplatin and etoposide for haemodialysis patients with lung cancer. **Br J Cancer**, v. 88, n. 1, p. 25-30, 2003. 10.1038/sj.bjc.6600687

WEATHERS, S. S.; GILBERT, M. R. Toward Personalized Targeted Therapeutics: An Overview. **Neurotherapeutics**, 2016. 10.1007/s13311-016-0496-5

WELLER, M.; CLOUGHESY, T.; PERRY, J. R.; WICK, W. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet? **Neuro Oncol**, v. 15, n. 1, p. 4-27, 2013. 10.1093/neuonc/nos273

WESTPHAL, M.; HILT, D. C.; BORTEY, E.; DELAVAUULT, P.; OLIVARES, R.; WARNKE, P. C.; WHITTLE, I. R.; JAASKELAINEN, J.; RAM, Z. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. **Neuro Oncol**, v. 5, n. 2, p. 79-88, 2003. 10.1215/S1522-8517-02-00023-6

WICK, W.; WELLER, M.; VAN DEN BENT, M.; SANSON, M.; WEILER, M.; VON DEIMLING, A.; PLASS, C.; HEGI, M.; PLATTEN, M.; REIFENBERGER, G. MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment. **Nat Rev Neurol**, v. 10, n. 7, p. 372-85, 2014. 10.1038/nrneurol.2014.100

WU, H. J.; PU, J. L.; KRAFFT, P. R.; ZHANG, J. M.; CHEN, S. The molecular mechanisms between autophagy and apoptosis: potential role in central nervous system disorders. **Cell Mol Neurobiol**, v. 35, n. 1, p. 85-99, 2015. 10.1007/s10571-014-0116-z

XUE, S.; HU, M.; IYER, V.; YU, J. Blocking the PD-1/PD-L1 pathway in glioma: a potential new treatment strategy. **J Hematol Oncol**, v. 10, n. 1, p. 81, 2017. 10.1186/s13045-017-0455-6

YAN, Y.; XU, Z.; DAI, S.; QIAN, L.; SUN, L.; GONG, Z. Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 35, p. 23, 2016. 10.1186/s13046-016-0303-5

YAN, Y.; ZUO, X.; WEI, D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. **Stem Cells Transl Med**, v. 4, n. 9, p. 1033-43, 2015. 10.5966/sctm.2015-0048

YOUNIS, I. R.; MALONE, S.; FRIEDMAN, H. S.; SCHAAF, L. J.; PETROS, W. P. Enterohepatic recirculation model of irinotecan (CPT-11) and metabolite pharmacokinetics in patients with glioma. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 63, n. 3, p. 517-24, 2009. 10.1007/s00280-008-0769-8

ZHAO, J. Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid. **Pharmacol Ther**, v. 160, p. 145-58, 2016. 10.1016/j.pharmthera.2016.02.008

## 10. GLOSSÁRIO

Esse glossário busca ajudar o leitor com conceitos importantes para a interpretação de estudos clínicos.

As informações foram retiradas do “Guia para a Indústria” no endereço eletrônico do FDA, disponíveis em: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm071590.pdf> acessado em 16/12/16.

**Acurácia:** a acurácia de diagnóstico diz respeito a concordância entre o resultado do novo teste e o resultado do teste padrão utilizado anteriormente.

**Doença Residual Mínima (Minimal residual disease, MRD):** Utilizada para testes que utilizam tecnologias supersensíveis, como os que detectam traços de células cancerígenas circulantes. Por utilizar novas tecnologias essa medida demonstra recorrência do tumor antes que seja detectável por metodologias convencionais (como exames de imagem). Estratifica os pacientes pelo risco de melhorar os resultados e reduz o risco de toxicidade a curto e longo prazo.

**Especificidade:** é estimada pela proporção de sujeitos sem a condição testada nos quais o teste é negativo. A especificidade de um ensaio de predição a quimioterapia *in vitro* é dada pela correta identificação dos pacientes no qual o quimioterápico não funcionará se for administrado *in vivo*. Diz respeito a exclusão de terapias potencialmente falhas.

**Hazard Rates or Hazard Ratios:** É uma medida da probabilidade do risco de morte no grupo tratado dividido pelo risco de morte no grupo controle. Esse valor é igual a 1 se o risco de morte nos dois grupos for igual, maior que 1 se o risco for aumentado no grupo tratado e menor que 1 se o tratamento diminuir o risco de morte. Esse valor é dado pela inclinação da curva do Kaplan-Meier.

**Progressão Livre de Doença (Progression-free survival, PFS):** É o tempo entre a randomização até a progressão da doença ou a morte. Requer uma amostra e tempo de seguimento menor que o OS. As medidas, porém, não são tão precisas quanto OS e podem variar entre os estudos clínicos de grupos diferentes, sendo dependente também da frequência e do modo como paciente é monitorado. Também denominado Sobrevida Livre de Doença (Disease-free survival, DFS).

**Sensibilidade:** é estimada como a proporção de sujeitos com a condição alvo que são corretamente diagnosticados pelo novo teste. A sensibilidade de um ensaio preditivo para direcionamento da quimioterapia *in vitro* identifica quais tratamentos foram mais potentes na eliminação de células tumorais com vistas a administrá-lo ao paciente.

Sobrevida Livre de Eventos (Event-free survival, EFS): Tempo desde a randomização até a progressão da doença, morte ou interrupção do tratamento por qualquer razão (ex: toxicidade, preferência do paciente, início de um novo tratamento, etc). Requer uma amostra e tempo de seguimento menor que o OS, podendo ser útil em terapias muito tóxicas. Geralmente não é recomendada por agências reguladoras pois combina eficácia, toxicidade e retirada dos pacientes.

Sobrevida Total (Overall Survival, OS): É contada desde a randomização até a morte por qualquer motivo. É uma medida universalmente aceita por ser direta, precisa e fácil de realizar. Porém pode requerer um grande número de pacientes e longo tempo de seguimento até o evento acontecer com o viés de incluir mortes por motivos não relacionados ao câncer. Com os avanços dos tratamentos é uma medida que está entrando em desuso, em parte por requerer longo tempo de análise e também pelas questões éticas envolvidas, uma vez que a análise não permite a troca do tratamento do paciente mesmo que o estudo em andamento tenha aporte suficiente para tal. Caso o paciente seja cruzado para o tratamento mais eficaz e o estudo seja baseado em intenção de tratar, esse parâmetro considera o tratamento inicial, e desconsidera o fato do paciente ter recebido segunda intervenção.

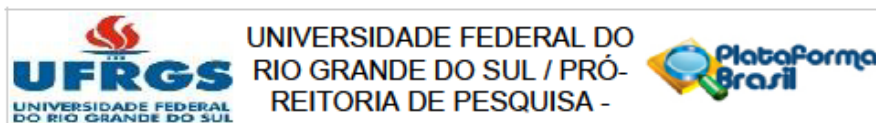
Taxa de Resposta Objetiva (Objective response rate, ORR): Mede a proporção de pacientes com redução no tamanho tumoral com base em um tamanho pré-definido. Pode ser medido em estudos de braço único pois necessita uma pequena população, sendo uma medida fácil e que pode ser comparada entre estudos com um efeito atribuído diretamente à droga e não a história natural da doença. O FDA inclui no ORR pacientes com resposta parcial e resposta total, excluindo doença estável e respostas menores.

Tempo Até a Progressão (Time to progression, TTP): É o tempo desde a randomização até que haja progressão objetiva e mensurável do tumor, não inclui mortes. Requer uma amostra e tempo de seguimento menor que o OS. As medidas, porém, não são tão precisas quanto OS e podem variar entre os estudos clínicos de grupos diferentes.

Valor Preditivo Negativo: diz respeito a proporção de pacientes nos quais o teste teve resultado negativo e de fato não se beneficiam do tratamento na clínica ou não possuem o alvo para terapias dirigidas.

Valor Preditivo Positivo: refere-se aos testes nos quais o resultado de sensibilidade *in vitro* tiveram a mesma resposta de redução da massa tumoral no paciente.

# ANEXO I – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estabelecimento de culturas de tumores do sistema nervoso central para avaliação celular, genética e farmacológica

**Pesquisador:** Guido Lenz

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 18922413.0.0000.5347

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciências Básicas da

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 420.856

**Data da Relatoria:** 03/10/2013

#### **Apresentação do Projeto:**

Refere-se a emenda de solicitação de avaliação pelo CEP-PUCRS.

Gliomas são os tumores mais comuns do sistema nervoso central e com maior taxa de mortalidade, sendo a sobrevida média dos pacientes após o diagnóstico pouco mais de 12 meses. O projeto prevê avaliações farmacológicas, genéticas e celulares de material proveniente de gliomas visando a caracterização destas células em cultura.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Fazer culturas primárias de tumores do sistema nervoso central para realizar avaliações farmacológicas, genéticas e celulares a fim de correlacionar estes dados com a resposta à terapia e sobrevida do paciente. Estabelecer um protocolo capaz de direcionar e/ou prever a eficiência da quimio/radioterapia com base em dados provenientes de culturas de células e amostras do tumor.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Adequadamente apresentados no TCLE.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante, com mérito científico.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O projeto já foi anteriormente aprovado pelo CEP-UFRGS e foi encaminhada emenda com vistas a

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro  
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

Continuação do Parecer: 420.856

avaliação pelo CEP-PUCRS.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O CEP-PUCRS envio a seguinte nota via Plataforma Brasil: Informo que a Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUC/RS não fará sua avaliação como Coparticipante para o projeto Estabelecimento de culturas de tumores do sistema nervoso central para avaliação celular, genética e farmacológica.

Assim, sugere-se a aprovação da emenda enviada com inclusão da PUCRS como coparticipante no projeto.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado, encaminhe-se.

PORTO ALEGRE, 10 de Outubro de 2013

---

**Assinador por:**  
**José Artur Bogo Chies**  
**(Coordenador)**

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Estabelecimento de culturas de tumores do sistema nervoso central para avaliação celular, genética e farmacológica

**Pesquisador:** Guido Lenz

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 18922413.0.0000.5347

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciências Básicas da

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 429.849

**Data da Relatoria:** 18/10/2013

**Apresentação do Projeto:**

O projeto visa a criação de um centro de cultura in vitro e de armazenamento de células de tumores do SNC humanos, com a finalidade de avaliar as características celulares, genéticas e farmacológicas como também o valor preditivo e prognóstico terapêutico. A PUCRS é instituição Co-participante, responsável pela obtenção de amostras a partir do exame anatomopatológico e realização de testes farmacológicos em culturas celulares. Os pacientes também serão avaliados por exames de sangue em relação a evolução da neoplasia.

**Objetivo da Pesquisa:**

Estudar as características celulares, genéticas ( em centro co-participante em SP ), sensibilidade a fármacos , resposta terapêutica através de exames de sangue no pré e pos-operatório dos pacientes. Será feita correlação entre as características culturais e a evolução do paciente.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Risco mínimo de retirada de sangue venoso de rotina no pré e pós-operatório e autorização de utilização do estudo anatomopatológico de rotina.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Importante visando avaliar o prognóstico dos tumores do SNC e a quimioterapia como possível indicação em certos casos.

**Endereço:** Av. Ipiranga, 6681

**Bairro:** CEP: 90.619-900

**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (513)320-3345 **Fax:** (513)320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE  
CATÓLICA DO RIO GRANDE  
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 429.849

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados.

**Recomendações:**

Nada a acrescentar.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

PORTO ALEGRE, 21 de Outubro de 2013

---

**Assinador por:**  
**caio coelho marques**  
**(Coordenador)**

Endereço: Av. Ipiranga, 6681  
Bairro: CEP: 90.619-900  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)320-3345 Fax: (51)320-3345 E-mail: cep@puers.br

## ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: "Estabelecimento de culturas de tumores do sistema nervoso central para avaliação celular, genética e farmacológica"

Investigadores Responsáveis: Franciele Kipper, Professor Dr. Guido Lenz, Dr. André Marc, Dra. Fabiana Spillari Viola, Professor Dr. Jaderson Costa da Costa, Professor Dr. Eliseu Paglioli Neto

Local de realização e endereço: Hospital São Lucas da PUCRS, Avenida Ipiranga, 6690 - POA/RS

#### Prezado paciente:

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa que será conduzido por uma equipe de pesquisadores da PUCRS e da UFRGS. Este estudo tem por objetivo avaliar de que maneira as células dos tumores de pacientes respondem a diferentes medicamentos utilizados para o tratamento de tumores do sistema nervoso, buscando compreender porque alguns pacientes têm uma resposta melhor a um determinado tratamento do que outros.

Caso você concorde em participar do estudo, nós usaremos um pedaço do seu tumor retirado durante a cirurgia, antes que ele seja descartado. As células do pedaço do seu tumor serão crescidas no laboratório e analisadas para descobrir se existem alterações no seu material genético que possam estar relacionadas ao surgimento do mesmo. Esses resultados serão comparados com testes que avaliam os efeitos dos diferentes medicamentos que já estão disponíveis para tratamento deste tumor a fim de buscar uma correlação entre alterações no material genético e eficiência de certas medicações. Além disso, as células obtidas do pedaço do seu tumor serão armazenadas em um banco de células na PUC e na UFRGS para que possam ser utilizadas em estudos futuros. Neste caso, as células só poderão ser utilizadas para novas pesquisas mediante autorização de um comitê de ética em pesquisa. Cabe salientar que os resultados desta pesquisa provavelmente não terão nenhum impacto sobre o seu tratamento e/ou acompanhamento médico imediato, mas podem proporcionar um maior entendimento sobre a doença e auxiliar o desenvolvimento e planejamento de tratamentos futuros.

Não existe um prazo exato ou estipulado para que você tome conhecimento dos resultados do estudo, mas estes lhes serão informados assim que estiverem disponíveis, se este for o seu desejo. Você pode optar por não saber o resultado desta pesquisa. Além disso, estes estudos serão publicados em revistas científicas especializadas.

A sua participação nessa pesquisa é voluntária e você tem total liberdade de concordar ou não com a participação nesta pesquisa. Sua decisão, seja qual for, NÃO prejudicará o seu atendimento médico nesta instituição.

Página 1 de 4

Data:

Rubrica do Participante:



O estudo prevê que um pedaço do tumor retirado durante a cirurgia possa ser utilizado para atender aos objetivos deste projeto de pesquisa, ou de outros projetos de pesquisa relacionados a este propósito. O material coletado durante a cirurgia será suficiente para realizar todos os procedimentos do estudo.

RESPONDA:

1. Com relação a porção do seu tumor que seria descartada após a cirurgia, para este estudo, você (marque com um X):

AUTORIZA a utilização no laboratório para o desenvolvimento do presente projeto;

NÃO AUTORIZA a coleta e a utilização no laboratório e deseja que esta porção seja descartada imediatamente após a cirurgia.

2. Com relação ao armazenamento das células deste tumor, para pesquisas futuras semelhantes a esta, no final deste estudo, você (marque com um X):

AUTORIZA o armazenamento para utilização em estudos futuros que estejam aprovados por uma comissão de ética da PUC ou UFRGS.

NÃO AUTORIZA o armazenamento, solicitando que seja descartado após a conclusão do presente estudo.

3. Durante o estudo também estão previstas três coletas de sangue: uma antes da retirada do tumor, uma imediatamente após a retirada cirúrgica do tumor e outra dois meses após a sua cirurgia (durante uma consulta médica de acompanhamento). Em cada coleta serão retirados 10 mL de sangue, quantidade correspondente a mais ou menos uma colher de sopa. Você (marque com um X):

AUTORIZA essas coletas, ciente de que após a coleta de sangue pode haver uma pequena dor local e até mesmo formação de uma pequena mancha roxa na região.

NÃO AUTORIZA as coletas de sangue.

4. Normalmente após a cirurgia um pedaço do tumor é enviado para a biopsia para identificação da malignidade do mesmo e fica armazenada no hospital. Nesse caso uma porção do tumor que foi enviado para biopsia encontrar-se-á disponível caso você concorde e o estudo necessite fazer uso dela apenas depois que essa biopsia for concluída. Para isso, você (marque com um X):

AUTORIZA que esse material seja utilizado posteriormente sabendo que isso não causa prejuízos ao seu diagnóstico.

NÃO AUTORIZA que a porção armazenada pelo hospital esteja disponível para este estudo.

Durante a pesquisa também é necessária a análise do prontuário médico para confrontar os resultados obtidos no laboratório com os dados clínicos (idade, sexo, doenças prévias), quimioterapia utilizada, exames laboratoriais prévios (bioquímicos e hematológicos), etc. Em NENHUM momento dados pessoais serão divulgados ou a sua identidade revelada a terceiros.

Por meio deste termo, você AUTORIZA que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os seus registros médicos nesta instituição a fim de obter as informações necessárias para a realização desta pesquisa. Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados, mas o seu nome não será revelado.

*Em qualquer momento você é livre para abandonar o estudo por qualquer motivo pessoal.*

Página 2 de 4

Data:

Rubrica do Participante:

**Danos relacionados à pesquisa:**

A doação de uma pequena parte do tumor retirado não acarretará em nenhum dano físico uma vez que essa porção seria descartada após a cirurgia.

A biopsia continuará a ser feita pelo hospital independente de você disponibilizar uma porção restante para a realização do presente projeto ou não.

As coletas de sangue podem gerar dor local e uma pequena mancha roxa ambas momentâneas.

As análises do prontuário médico não violarão a sua privacidade.

**Confidencialidade:**

As amostras dos tumores obtidos para o estudo serão catalogadas na forma de um código com letras e números, em nenhum momento do estudo o seu nome ou outros dados pessoais serão divulgados.

Os prontuários com todos os dados clínicos serão protegidos de acordo com determinações das leis brasileiras, através do Comitê Nacional de Ética (Brasília). Informações obtidas deste estudo poderão ser usadas em relatórios, apresentações e publicações, mas o seu nome não será divulgado em nenhum momento.

**Benefícios potenciais:**

A participação neste estudo poderá não trazer benefício algum para o seu tratamento. Porém, se forem descobertas algumas alterações do seu material genético estas serão comunicadas ao seu oncologista, que poderá utilizar este resultado para tomar decisões importantes sobre o seu tratamento. Entretanto, com base nas conclusões resultados obtidos, espera-se, em longo prazo, obter um maior conhecimento e compreensão a respeito desta doença e ser capaz de direcionar o tratamento de acordo com características peculiares do tumor de cada paciente. Apenas através de estudos como esse poderemos desenvolver um tratamento mais adequado para seus portadores e tentar melhorar a sobrevida dos pacientes.

**Custos e pagamentos:**

Você participará desse estudo de forma totalmente voluntária.

Não haverá custos para sua participação neste estudo. Nem você ou o seu médico serão pagos para fornecer porções do seu tumor e/ou sangue para este estudo. Todas as despesas serão pagas por agências de financiamento à pesquisa.

**Dúvidas:**

Se você tiver qualquer dúvida em relação à esta pesquisa, deve contatar alguns dos pesquisadores responsáveis em horário comercial, no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, através do telefone (51) 3308.7620 ou diretamente a qualquer hora do dia com a pesquisadora Franciele Kipper pelo e-mail franciele.kipper@ufrgs.br ou com o pesquisador Guido Lenz pelo e-mail lenz@ufrgs.br.

Em caso de dúvida em relação ao conteúdo ético desta pesquisa, não hesite em contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS – localizado na Av. Paulo Gama, 110, 2º andar, fone: (51) 3308. 3738, e-mail: etica@propesq.ufrgs.br – ou o Comitê de Ética da PUCRS – localizado na Av. Ipiranga 6690, prédio 60, Sala 314, fone/fax: (51) 3320.3345, e-mail: cep@pucrs.br – ambos em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

**Consentimento do Paciente:**

Fui informado do objetivo, procedimentos, duração do estudo e concordo em participar deste projeto de pesquisa conduzido pelos pesquisadores: Franciele Kipper, Professor Dr. Guido Lenz, Dr. André Marc, Dra. Fabiana Spillari Viola, Professor Dr. Jaderson Costa da Costa, Professor Dr. Eliseu Paglioli Neto.

Um resumo das informações foi passado a mim e sei que estou livre para recusar minha participação neste estudo e posso desistir do meu consentimento a qualquer momento, sem prejuízos ao tratamento médico que receberei. Foi-me dada uma cópia deste consentimento para guardar comigo e este documento me confere todos os direitos e deveres perante o que me foi proposto.

\_\_\_\_\_  
Nome do paciente (em letra de forma)

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente ou responsável

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador (em letra de forma)

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

Caso seja necessário o contato com o paciente no futuro, o mesmo poderá ser feito através dos telefones: ( ) \_\_\_\_\_ ou ( ) \_\_\_\_\_.

Na impossibilidade de contatar o paciente dessa forma, os pesquisadores poderão contatar o familiar \_\_\_\_\_ através do telefone ( ) \_\_\_\_\_, e-mail \_\_\_\_\_ ou endereço \_\_\_\_\_.

## ANEXO III - DADOS CLÍNICOS DAS BIÓPSIAS

Histologia	Data de Nascimento	Sexo	Data do diagnóstico	Data óbito	Sobrevida total (semanas)	Data da Cirurgia	Cirurgia	RTX número	Dados do SETOR de RTX	Radioterapia Período	Agente Quimioterápico	Curso Quimioterapia
LS01AA3 Astrocitoma Anaplásico III	09/02/1973	F	27/09/2011	03/08/2014	148,86	30/09/11, 14/10/2011	GTR	28		19/10/2011 - 26/12/2011	CCNU a cada 6 semanas em 2012	2012 (interrompido por neutropenia febril)
LS02G4 Glioblastoma	05/07/1970	F	30/01/2009	21/05/2013	224,72	04/02/2009, 26/11/2010 10/08/2012	GTR	Após a primeira cirurgia fez 30 sessões de RTX		Março de 2013	Temodal 25/9/12/6///Toposi deo	2011, 6 ciclos(2013)/ma rço 2013
LS03G4 Glioblastoma	24/09/1952	M	24/02/2013	17/06/2013	16,29	28/02/2013	GTR	51		21/03/2013 - 27/05/2013	CCNU a cada 4ou 6 semanas em marco de 2013	2013
LS04DNT DNT	01/07/2011	M	14/01/2013	[não consta no sistema]		14/03/2013	GTR					
LS05AF2 Astrocitoma Fibrilar II	11/10/1982	M	15/05/2012	[vivo - última consulta em 14/06/2017 ]		24/08/2012 ,21/03/2013	PR frontal zona alta perfusão	44		21/05/2013 - 09/07/2013		Não realizada
LS06G4 Glioblastoma	29/03/1936	M	anterior	26/06/2013	72,72	28/3/2013. Houve ressecção em fevereiro de 2012 em outro hospital	Ressecçã o 80% lesão	13	nada no setor	2012-2013	Temodal	Janeiro - fevereiro 2013. Após cirurgia anterior fez temodal e RTX até dezembro 2012
LS07OD2 Oligodendroglioma II	25/12/1976	F	01/10/2012	[viva - RM marcada p/ out/2017]		26/10/2012, 11/04/2013, 04/07/2013	GTR		19/11/2 012- 09/01/2 013	01/11/2012 - 22/01/2013	Temodal	25-26/02/2014. interrompida por leucopenia severa
LS08M4 Meduloblastoma	17/03/2008	M	18/04/2013	[vivo - última consulta em 22/06/17]		18/04/2013	GTR	Muitas sessões, quase diárias		03/05/2013 - 28/06/2013	CCNU + CPPD + vincristina: plano de 8 ciclos	agosto/13 até janeiro/14

LS09G4 Glioblastoma	14/01/1988	M	15/04/2013	20/04/2014	53,00	10/05/2013	Ressecçã o 80%	Muitas sessões	27/05/2 913- 11/07/2 013	16/05/2013 - 21/08/2013	Temodal	Junho e julho / 2013
LS10G4 Glioblastoma (diagnóstico anterior de glioblastoma baixo grau)	24/03/1968	F	17/05/2013	[viva - última RM em 16/05/17]		16/05/2013. Cirurgia prévia em outro serviço +10 anos = astrocitoma anaplásico	Ressecçã o 80%	[não consta no sistema]	[não consta no sistema]	Outro serviço de RTX apenas na ressecção anterior. Em 2001, fez 45 sessões de RTX	Temodal  Temodal	Temodal (outro serviço de radio) apenas na segunda cirurgia
LS11G4 Glioblastoma multifome (evoluído a partir de astrocitoma fibrilar grau II de nov-dez/2011)	23/05/1972	F	09/08/2013	[não consta no sistema]		24/11/2011, 26/12/2011, 09/08/2013	Ressecçã o 80%	[não consta no sistema]	[não consta no sistema]		[não consta no sistema]	
LS12G4 Glioblastoma	24/03/1968	F	01/01/2013	05/10/2013	39,72	11/01/13, 22/08/2013	GTR	Muitas sessões	28/01/2 013- 14/03/2 013	18/01/2013 - 14/03/2013	Temazolomida 120mg	Janeiro - abril / 2013
LS13OD2 Oligodendroglioma II	22/02/1963	M	01/05/2012	[vivo - última consulta em out/2016]		23/08/2013, 06/09/2013	GTR	Não realizada	N/A		Não realizada	
LS14G4 Glioblastoma	05/12/1979	M	02/09/2013	[vivo - última consulta em 29/06/17]		03/09/2013	GTR	Muitas sessões. Novemb ro - dezembr o 2013. Em 2014 fez apenas 3 sessões	08/11/2 013- 20/12/2 013	Novembro/20 13 - abril/2015. Novo ciclo 2015 - 2017	Temodal logo após cirurgia. Novo ciclo: Temodal	
LS15OD2 Oligodendroglioma	25/10/1983	M	13/12/2013	04/09/2015	90,15	17/12/2013	Retirada parcial		25/07/1 4- 02/09/2 014	15/07/14 - 19/9/14	Não realizada	

LS16AF2 Astrocitoma fibrilar II	07/07/1984	M	29/01/2014	[vivo - última consulta em 24/05/17]		27/02/2014	GTR	Não realizada	N/A		Não realizada	
LS17AA2 Astrocitoma grau II gemistocístico	24/08/1974	M	16/01/2014	10/03/2015	59,86	28/02/2014	Ressecção o 80%	Muitas sessões	20/11/2014-09/01/2015	12/11/14-26/01/15	Não realizada	
LS18AA3 Astrocitoma Anaplásico III	09/02/1973	F	27/09/2011	03/08/2014	148,86	30/09/11, 14/10/2011	GTR	28		19/10/2011 - 26/12/2011	CCNU a cada 6 semanas em 2012	2012 (interrompido por neutropenia febril)
LS19ODA3 Oligodendroglioma anaplásico grau III	02/10/1957	F	operada antes (+- 4 anos) e fazia acompanhamento	21/01/2015	50,00	27/4/2014. ja tinha feito cirurgia e rtx antes da nossa coleta	Retirada parcial	Muitas sessões com interrupções	17/09/2010-17/11/2010	04/08/2010 - 19/12/2010	Não realizada	
LS20 Glioblastoma temporal direito	17/12/1954	M	04/09/2015	Vivo até jan/2016 (possibilidade e de óbito domiciliar)		09/09/2015	Retirada parcial		14/10/2015-23/11/2015	09/10/2015 - 04/12/2015	Não realizada	
LS21 Glioblastoma	14/10/1964	M	21/09/2015	26/09/2015	0,86	25/09/2015						
LS22 Astrocitoma Anaplásico da biopsia, outros focos com centros de necrose visível na RMN	20/07/1961	M	24/11/2015	04/04/2016	19,01	01/12/2015	Ressecção o total de apenas de um foco de lesão		13/02/2016-11/02/2016	11/12/2015 - 08/03/2016	Não realizada	
LS23 Astrocitoma grau II gemistocístico	02/10/1991	F	18/12/2015	Viva - controle em maio/2017		14/01/2016 Reoperação 23/06/2016	GTR			13/07/2016 - 23/08/2016	Não realizada	
LS24 Glioblastoma	17/01/1964	M	19/01/2016	Vivo até jan/2017 (possibilidade e de óbito domiciliar)		27/01/2016	GTR	28	07/03/2016-18/04/2016	07/03/2016 - 02/05/2016	Não realizada (desistiu da tentativa via judicial)	

## ANEXO IV - CURRÍCULO

### Informações Pessoais

---

**Nome: Franciele Cristina Kipper**

Nome para citações: KIPPER, F. C.; KIPPER, FRANCIELE C.; KIPPER, F.

Endereço: Rua Saldanha da Gama, 853/417 CEP: 91520-630

Telefone: +55(51) 99849- 8767

Website URL: [www.linkedin.com/in/franciele-kipper-91775274/](http://www.linkedin.com/in/franciele-kipper-91775274/)

Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/0994344001724658>

### Formação Educacional

---

**2013:** Doutorado em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Orientador: Guido Lenz. Financiamento até março/2017: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq).

**2011 – 2013:** Mestrado em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Ano de conclusão: 2013. Orientador: Guido Lenz. Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**2007 – 2010:** Graduação em Biomedicina. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. Orientador: Márcia Rosângela Wink.

### Experiência em Pesquisa

**2007 – 2010:** Iniciação científica. Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular. Trabalho nos projetos “Investigação do papel da NTPDase2 na adesão, proliferação e migração” e “O papel dos receptor P2X7 em células de gliomas”.

Habilidades adquiridas:

- Manipulação de cultura de células
- Análise de expressão gênica: PCR e Western blot
- Citometria de fluxo e cell sorting
- Superexpressão de proteínas recombinantes através de lentivírus

**2011 – 2013:** Estudante de mestrado. Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular. Continuação dos projetos citados acima e colaboração em outros projetos envolvendo o silenciamento de fatores de Yamanaka em gliomas e teratomas.

Habilidades adquiridas:

- Manipulação de DNA (clonagem e transformação de bactérias)
- Expressão de proteínas recombinantes e silenciamento através de diversos vetores
- Implante xenográfico de células de glioma
- Experimentos de adesão e migração
- Microscopia confocal
- Silenciamento (RNAi) e reprogramação carregados por vetores lentivirais

**2013 – 2017:** Estudante de doutorado. Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular. Trabalho no projeto:” Análise de sensibilidade e perfil genético de cultura de células de tumores cerebrais

derivadas de pacientes”. Colaboração em projetos de construção de vetores de expressão de proteínas recombinantes em células mamíferas utilizando sistemas lentivirais.

Habilidades adquiridas:

- Isolamento e cultura primária de células
- Análises de expressão gênica: qPCR and Western blot.
- Análises celulares: autofagia, apoptose, senescência, ciclo celular, crescimento populacional cumulativo
- Colaboração em projetos para construção de vetores de expressão de proteínas recombinantes em células mamíferas (células normais e malignas de cérvix e de cérebro) utilizando sistemas de vetores lentivirais
- Citometria de fluxo e cell sorting
- Gestão de projetos e de compra de materiais

### **Experiência Profissional**

**2010:** Estágio curricular em Análises Clínicas. 500 horas. Unilab Laboratórios. Porto Alegre/RS.

**2010:** Estágio curricular em Microbiologia. 500 horas. Unilab Laboratórios e Laboratório de Patologia e Micologia da Santa Casa. Porto Alegre/RS.

### **Experiência Didática**

**2015:** Atividade orientada de docência na disciplina de Biologia Molecular nos cursos de Farmácia, Biomedicina, Enfermagem (120 horas) da UFCSPA

## **Produção Científica**

---

### **Produção Bibliográfica**

#### **Artigos Publicados em Periódicos Científicos**

1. KIPPER, FC; SILVA, AO; MARC, AL; CONFORTIN, G; JUNQUEIRA, AV; PAGLIOLI-NETO, E; LENZ, G. Vinblastine and antihelminthic mebendazole potentiate temozolomide in resistant gliomas. *Investigational New Drugs*. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10637-017-0503-7>
2. VILLODRE, ES; KIPPER, FC; SILVA, AO; LOPEZ, PLC; LENZ, G. Sublethal Dose of Doxorubicin Potentiates the Effect of Temozolomide in Glioblastoma Cells. *Molecular Neurobiology*. 2017. 10.1007/s12035-017-0611-6
3. VILLODRE, ES; KIPPER, FC; PEREIRA, MB; LENZ, G. Roles of OCT4 in tumorigenesis, cancer therapy resistance and prognosis. *Cancer Treatment Reviews*, v. 51, p. 1-9, 2016.
4. GEHRING, MP; KIPPER, FC; NICOLETTI, NF; SPEROTTO, ND; ZANIN, R; TAMAJUSUKU, ASK; FLORES, DG; MEURER, L; ROESLER, R; FILHO, AB; LENZ, G; CAMPOS, MM; MORRONE, FB. P2X7 receptor as predictor gene for glioma radiosensitivity and median survival. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 68, p. 92-100, 2015.
5. VARGAS, JE; FILIPPI-CHIELA, EC; SUHRE, T; KIPPER, FC; BONATTO, D; LENZ, G. Inhibition of HDAC increases the senescence induced by natural polyphenols in glioma cells. *Biochemistry and Cell Biology (Print)*, v. 92, p. 297-304, 2014.
6. MELLO, PDA; FILIPPI-CHIELA, EC; NASCIMENTO, J; BECKENKAMP, A; SANTANA, DB; KIPPER, FC; CASALI, EA; NEJAR BRUNO, A; PACCEZ, JD; ZERBINI, LF; WINK, MR; LENZ, G; BUFFON, A. Adenosine



Uptake is the Major Effector of Extracellular ATP Toxicity in Human Cervical Cancer Cells. *Molecular Biology of the Cell*, v. 25, p. 2905-2918, 2014.

### **Resumo expandido publicado em anais de congresso**

1. KIPPER, F. C.; Minussi, DC; LENZ, G.; Wink, MR. Investigation of NTPDase-2 role in cell adhesion, proliferation and migration. 2011. Rio de Janeiro. 2nd Meeting of the Brazilian Purine Club, 2011. p. 83.

### **Resumo publicado em anais de congresso**

1. KIPPER, F. C.; MENDONÇA, L. C.; BECKER, R.; CONFORTIN, G.; Ledur, PF; MARC, A.; PAGLIOLI-NETO, E.; VIOLA, F.; MORRONE, F. B.; LENZ, G. . In vitro drug sensitivity and genetic profile analysis from primary culture obtained from brain cancer. In: AACR Annual Meeting, 2015, Filadélfia. Online Proceedings and Itinerary Planner, 2015. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2015-4307

2. KIPPER, F. C.; BECKER, R.; MENDONÇA, L. C.; VANACOR, C.N.; CONFORTIN, G.; MARC, A.; PAGLIOLI-NETO, E.; MORRONE, F. B.; LENZ, G. . Genetic profile analysis and in vitro drug sensibility from primary culture obtained from glioblastoma. In: 46th Brazilian Congress on Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2014, Fortaleza. Programa e Resumos, 2014. p. 46.

3. MELLO, P. A.; CHIELA, E. C. F.; NASCIMENTO, J.; KIPPER, F. C.; BECKENKAMP, A.; SANTANA, D. B.; BRUNO, A. N.; LENZ, G.; BUFFON, A. Reduction in P2X7 receptor expression is a marker of resistance to ATP treatment in human cervical carcinoma cell line. In: AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 2013, Boston. AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 2013.

4. NASCIMENTO, J.; MELLO, P. D. A.; CHIELA, E. C. F.; KIPPER, F. C.; Wink, MR; LENZ, G.; BUFFON, A. . P2X7 Knockdown increases cell viability of human cervical cancer cell lineage after ATP treatment. In: 4th Brazilian Purine Club Meeting, 2013, Canela. 4th Brazilian Purine Club Meeting, 2013.

5. TAMAJUSUKU, A. S. K.; KIPPER, F. C.; CHIELA, E. C. F.; FLORES, D. G.; REDER, G. M.; MEURER, L.; BATTASTINI, A. M. O.; ROESLER, R.; LENZ, G.; Wink, MR. The role of P2X7 receptor in glioma cells. In: AACR International Conference on Molecular targets and cancer therapeutics, 2013, Boston. Molecular targets and cancer therapeutics, 2013.

6. KIPPER, F. C.; Minussi, DC; LENZ, G.; Wink, MR. Investigation of NTPDase-2 role in cell adhesion, proliferation and migration. In: 10th International Congress on Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro. Abstracts from the 10th International Congress in Cell Biology and 16th Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012. p. 22.

7. KIPPER, F. C.; Minussi, DC; LENZ, G.; Wink, MR. Investigation of NTPDase-2 role in cell adhesion, proliferation and migration. In: 3rd Meeting of the Brazilian Purine Club, 2012, Ouro Preto. 3rd Meeting of the Brazilian Purine Club, 2012.

8. GEHRING, M.P.; PEREIRA, T. C. B.; ZANIN, R. F.; KIPPER, F. C.; MOTTER, M. B.; FILHO, A. B.; BATTASTINI, A. M. O.; BOGO, M. R.; LENZ, G.; CAMPOS, M. M.; MORRONE, F. B.. Silencing of P2X7R induces radioresistance on human glioma cell line. In: III Meeting of the Brazilian Purine Club Purinergic Signalling: Structure, Functions and Therapeutic Applications, 2012, Ouro Preto. III

Meeting of the Brazilian Purine Club Purinergic Signalling: Structure, Functions and Therapeutic Applications, 2012.

9. KIPPER, F. C.; TAMAJUSUKU, A. S. K.; BATTASTINI, A. M. O.; LENZ, G.; ROBSON, S.; Wink, MR. Superexpressão de NTPDase2 Diminui a Adesão Celular em Linhagens de Glioma U87. In: XXI Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2009, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2009. v. 18.

10. KIPPER, F. C.; TAMAJUSUKU, A. S. K.; LENZ, G.; BATTASTINI, A. M. O.; ROBSON, S.; Wink, MR. Expression of Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase CD39 Family Members by Glioma Cell Line U87. In: XXXVIII Annual Meeting of SBBq, 2009, Águas de Lindóia. XXXVIII Annual Meeting of SBBq, 2009.

### **Co-orientação de Trabalho de Conclusão de Curso**

Louise Camargo de Mendonça. Análises celulares e de sensibilidade in vitro a temozolomida em culturas primárias derivadas de glioblastoma. 2015. Graduação em Biomedicina na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### **Menção Honrosa e Financiamento**

---

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) bolsista de graduação.
- Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) bolsista de mestrado.
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) bolsista de doutorado.
- Menção honrosa pelo trabalho: "Genetic profile analysis and in vitro drug sensitivity from primary culture obtained from glioblastoma" in 46th Brazilian Congress on Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2014.

### **Referências**

---

Guido Lenz  
Professor Associado  
Departamento de Biofísica  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Av Bento Gonçalves, 9500  
91501-970 - Porto Alegre, RS - Brazil  
Telefone: +55(51) 33087613  
Email: gulenz@gmail.com  
URL da Homepage: www.ufrgs.br/labsinal

Márcia Wink  
Professora Associada  
Departamento de Ciências Fisiológicas  
Fundação Universidade Federal de  
Ciências da Saúde de Porto Alegre  
Rua Sarmento Leite, 245. Sala 304  
90050-170 - Porto Alegre, RS - Brazil  
Telefone: +55(51) 33038762 Ramal: 8762  
Email: marciawink@yahoo.com

