



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

RAFFAELA SILVESTRE IGNARRO

**Estudo da ação de temozolamida e sulfasalazina sobre
células de glioblastoma humano e de glioma de rato**

Campinas, 2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

RAFFAELA SILVESTRE IGNARRO

**Estudo da ação de temozolamida e sulfasalazina sobre células de
glioblastoma humano e de glioma de rato**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Rogerio
Coorientador: Prof. Dr. Roger Frigério Castilho

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
RAFFAELA SILVESTRE IGNARRO, E
ORIENTADA PELO PROF. DR. FABIO ROGERIO.

Campinas, 2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/02618-1; FAPESP, 2011/50400-0; CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Ig5e Ignarro, Raffaella Silvestre, 1987-
Estudo da ação da temozolamida e sulfasalazina sobre células de glioblastoma humano e de glioma de rato / Raffaella Silvestre Ignarro. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Fabio Rogerio.
Coorientador: Roger Frigério Castilho.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Astrocitoma. 2. Temozolamida. 3. Sulfassalazina. 4. Sobrevivência celular. I. Rogerio, Fabio,1977-. II. Castilho, Roger Frigério,1972-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of temozolomide and sulfasalazine action on human glioblastoma and rat glioma cells

Palavras-chave em inglês:

Astrocytoma
Temozolomide
Sulfasalazine
Cell survival

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Fabio Rogerio [Orientador]
Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Alexandre César Santos de Rezende
Simone Aparecida Teixeira
Fábio Rossi Torres

Data de defesa: 04-03-2016

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 4 de Março de 2016

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Fabio Rogerio (Presidente da Comissão Examinadora)

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Prof. Dr. Alexandre César Santos de Rezende

Dra. Simone Aparecida Teixeira

Dr. Fábio Rossi Torres

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Agradecimentos

A Deus por me dar saúde e serenidade, indispensáveis para a realização deste trabalho.

Aos meus avós e a todos da minha família que estiveram sempre por perto, me apoiando incondicionalmente durante este período de aprendizado profissional.

De maneira especial aos meus pais, Franco Ignarro e Shirlei Silvestre Ignarro que, mesmo morando longe, sempre estiveram presentes e acompanharam todos os meus passos desde o início da vida acadêmica. O incentivo e o amparo nos momentos difíceis foram essenciais para o bom andamento e término desta etapa da minha formação profissional. Certamente abdicaram de muitas coisas para que eu tivesse a oportunidade de ingressar em uma Universidade de qualidade e de desenvolver o presente trabalho. Agradeço à minha irmã Isabella Silvestre Ignarro pela compreensão, amizade e preocupação constante com o andamento da tese. Espero conseguir retribuir à altura todo este amor, carinho e dedicação que sempre tiveram comigo. Amo muito vocês!!

Aos colegas do Laboratório de Bioenergética, Tiago Rezende Figueira, Juliana Ronchi, Marcia Fagian, Roberto Stahl, Juliana Ruas, Estela Busanello, Ana Carolina Marques, Audrey de Moraes, Hanan Chweih, Annelise Francisco, Noelia Lander, Miguel Chiurillo, Mayara Santos Bertolini, Genoefa Dal´Bó, Carlos Benevento, Guilherme Michelini, Silvia Elaine Ferreira Melo e Paolo La Guardia, pela amizade, união, por somar conhecimentos, experiências e por tornar o cotidiano do laboratório, por vezes cansativo, agradável para o desenvolvimento dos experimentos científicos. De maneira especial à Daniela Rodrigues de Melo, que me ensinou com muita paciência e bom humor os primeiros passos no mundo do cultivo celular.

Especialmente à Kézia Moura, Evelyne Figueirôa, Cláudia Navarro, Erika Rodrigues da Silva e Gustavo Facchini pelas intermináveis conversas no bandeirão sobre diversos assuntos e principalmente pelo companheirismo e união nos momentos difíceis. Certamente todos são não apenas colegas de trabalho, mas sim amigos que gostaria de levar para a vida toda.

À técnica do laboratório Edilene de Souza Siqueira Santos que sempre me socorreu quando precisei de ajuda com os experimentos que, na maioria das vezes, eram difíceis de serem realizados sem auxílio. Obrigada Dí!

Ao parceiro de experimentos Gustavo Facchini que sempre esteve disposto a ajudar e com quem discutia a maioria dos resultados, pensando em soluções para resolver os problemas do dia-a-dia. Nos conhecemos a quase 9 anos e estes anos de Doutorado foram importantes para estreitar ainda mais esta amizade. Valeu “*parça*”!

Ao André Schwambach Vieira por realizar as análises computacionais de transcriptoma, sem sua ajuda, esta metodologia provavelmente não faria parte desta tese.

À minha grande amiga Elayne Vieira Dias pela sincera amizade, que só aumentou nestes últimos quatro anos de Doutorado.

Às minhas amigas desde o tempo da graduação Karina Mie Furuzawa e Larissa Yokota Rizzo que mesmo distantes sempre estiveram presentes e me apoiaram nesta caminhada.

Ao meu namorado, e também amigo, Fábio Montico, pelo carinho e por sempre me apoiar e encorajar durante esta longa trajetória. Mesmo não sendo sua área de expertise, sempre esteve disposto a ouvir minhas reclamações, desabafos, dúvidas ou críticas, que não foram poucas. Ao me fazer emocionalmente feliz e realizada, saiba que você estava também me ajudando a cumprir esta etapa profissional com êxito. Te amo!!!

Ao Prof. Dr. Fábio Rogério pela orientação, paciência, solicitude e dedicação durante a execução deste projeto e também durante a redação da tese, relatórios e artigos. Tenho certeza que sua presença me fez crescer muito profissionalmente.

Ao coorientador Prof. Dr. Roger Frigério Castilho por abrir as portas de seu laboratório e proporcionar toda a infra-estrutura necessária para a realização deste projeto. Também por auxiliar na obtenção e discussão dos resultados, bem como na redação do artigo científico.

À Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes responsável pelo Laboratório de Genética Molecular da FCM (UNICAMP) onde foram realizados os experimentos de PCR em Tempo Real. De maneira especial, à aluna de doutorado Simoni Avansini que, prontamente, auxiliou na execução destes experimentos.

À Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira responsável pelo Laboratório de Bioensaios e Transdução de Sinal, do Instituto de Biologia (UNICAMP). As análises de atividade enzimática das metaloproteinases foram realizadas neste laboratório, sob apoio e supervisão da aluna de pós-doutorado Karin Juliane Pelizzaro Rocha.

À Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse, à Prof. Dra. Cláudia Herrera Tambeli e ao Prof. Dr. Alexandre César Santos de Rezende pelas observações, críticas e sugestões no exame de qualificação, que foram de extrema importância para o término da tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado que sem dúvida foi decisiva para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de projeto de auxílio à pesquisa e projeto temático (2011/50400-0; 2013/02618-1) que forneceram boa parte dos recursos financeiros necessários para a realização deste estudo.

Ao Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e Extensão (FAEPEX; 379/13; 554/14; 621/14) que também forneceu recursos financeiros para a compra de materiais de consumo e para contratação de serviços de terceiros.

Minha sincera gratidão.

*“Avalia-se a inteligência de
um indivíduo pela quantidade de
incertezas que ele é capaz de suportar.”*

Immanuel Kant

RESUMO

Gliomas são os tumores cerebrais mais comuns em adultos. Astrocitomas são gliomas derivados de astrócitos. Temozolamida (TMZ) é um agente alquilante do DNA usado para tratamento de astrocitomas de comportamento biológico agressivo. Apesar da melhora do prognóstico, em comparação com os pacientes submetidos apenas à radioterapia, o tratamento com TMZ apresenta eficácia limitada, visto que alguns tumores apresentam resistência a esta droga. Os astrócitos neoplásicos possuem um transportador (sistema X_c^-) na membrana citoplasmática, o qual importa cistina para a síntese do antioxidante glutatona. O sistema X_c^- pode ser inibido farmacologicamente pela sulfasalazina (SAS). No presente estudo, avaliamos abordagem terapêutica que consiste na administração *in vitro* de TMZ associada com SAS em três linhagens de astrocitoma humano (U87MG, A172 e T98G) e uma linhagem de glioma de rato (C6). Os parâmetros avaliados foram viabilidade celular, morte por apoptose, capacidade de proliferação e invasão, expressão gênica, níveis de glutatona total e peroxidação lipídica. As metodologias adotadas foram, respectivamente, ensaio colorimétrico (MTT), reação de TUNEL quantificada por citometria de fluxo, Western Blotting para a proteína PCNA, atividade enzimática de metaloproteinases 2 e 9 (MMP2 e MMP9), PCR em tempo real e transcriptoma, método de reciclagem da glutatona e TBARS. Verificamos que as quatro linhagens não apresentaram alterações significativas de viabilidade após tratamento com TMZ 25 μ M ou 50 μ M por 1, 3 ou 5 dias. Por outro lado, a associação de TMZ 25 μ M com SAS 0.5 mM após 5 dias levou à queda significativa de viabilidade tanto na linhagem U87MG, quanto nas células A172. Em relação à linhagem U87MG, a redução de viabilidade observada após a associação de drogas não se relacionou com indução de apoptose, estresse oxidativo ou alteração de expressão da proteína PCNA. Nossos dados de transcriptoma das células A172 evidenciaram que o tratamento com TMZ 25 μ M por 3 dias, levou ao enriquecimento de vias relacionadas ao ciclo celular. Por sua vez, a exposição à SAS 0.5 mM, pelo mesmo período, levou ao aumento de expressão de genes envolvidos na síntese e utilização da glutatona. Tais achados de expressão gênica foram corroborados por dados funcionais. De fato, verificamos redução da proliferação das células A172 após 5 dias de tratamento com TMZ 25 μ M ou TMZ 25 μ M associada com SAS 0.5 mM. Ainda, a redução de viabilidade das células A172 foi acompanhada de depleção de glutatona após 3 dias de exposição à SAS 0.5 mM isoladamente ou combinada à TMZ 25 μ M. Desta forma, o aumento da expressão de genes relacionados à síntese de glutatona seria um mecanismo celular compensatório para se tentar manter níveis adequados deste antioxidante. Com relação à linhagem T98G, esta se mostrou resistente à maioria dos tratamentos avaliados e não verificamos indução de apoptose, peroxidação lipídica, bem como alterações nos níveis de glutatona após três dias de tratamento com TMZ 25 μ M e/ou SAS 0.5 mM. No que se refere às células C6, sua viabilidade foi intensamente diminuída após administração de SAS 0.5 mM por 1, 3 ou 5 dias. Após 3 dias, verificamos a ocorrência de apoptose no grupo SAS 0.5 mM, fenômeno que provavelmente está envolvido com a redução de viabilidade. Além disso, após 3 dias, a redução de glutatona total observada nos grupos SAS 0.5 mM e TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM se relacionou com o aumento de peroxidação lipídica. Verificamos ainda, e somente para as células C6, que a associação de TMZ 25 μ M com SAS 0.5 mM reduziu a atividade enzimática da MMP9 após 5 dias de tratamento e, portanto, sua capacidade invasiva. Desse modo, nossos resultados evidenciaram que a associação de TMZ com SAS reduziu significativamente a viabilidade de todas as linhagens avaliadas (com exceção da T98G). Estudos posteriores são necessários para se avaliar a segurança e eficácia deste tipo de tratamento *in vivo*.

ABSTRACT

Gliomas are the most common brain tumors in adults. Astrocytomas are gliomas derived from astrocytes. Temozolomide (TMZ) is an alkylating agent of the DNA used for treatment of astrocytomas with aggressive behavior. Despite the improvement of prognosis compared to patients subjected to radiotherapy alone, treatment with TMZ has limited effectiveness, since some tumors are resistant to this drug. Neoplastic astrocytes have a transporter in the cytoplasmic membrane (X_c^- system), which imports cystine for the synthesis of the antioxidant glutathione. The X_c^- system can be inhibited pharmacologically by sulfasalazine (SAS). In the present study, we evaluated an therapeutic approach *in vitro* that consists in TMZ administration associated with SAS in three lineages of human astrocytoma (U87MG, T98G and A172) and a rat glioma cell line (C6). We assessed cell viability, death by apoptosis, proliferation and invasion capacity, differential gene expression, the total glutathione levels and lipid peroxidation. The adopted methodologies were, respectively, colorimetric assay (MTT), TUNEL reaction quantified by flow cytometry, Western blot for PCNA protein, enzymatic activity of metalloproteinases 2 and 9 (MMP2 and MMP9), real time PCR and transcriptome, recycling method of glutathione and TBARS. We found that the four cell lines showed no significant changes in viability after treatment with TMZ 25 μ M or 50 μ M for 1, 3 or 5 days. On the other hand, the combination of 25 μ M TMZ with SAS 0.5 mM after 5 days led to a significant decrease in viability in both U87MG and A172 lineages. Regarding U87MG cells, reduction of viability observed after the drug association was not related to induction of apoptosis, oxidative stress or modification of expression of PCNA protein. Our transcriptome data of A172 cells showed that TMZ treatment with 25 μ M over 3 days led to the enrichment of pathways related to cell cycle. Meanwhile, the SAS 0.5 mM exposure, at the same time, led to increased expression of genes involved in the synthesis and use of glutathione. Such gene expression findings were corroborated by functional data. Indeed, we found reduced proliferation of A172 cells after 5 days of treatment with TMZ 25 μ M alone or associated with SAS 0.5 mM. Furthermore, the reduction of A172 cell viability was accompanied by glutathione depletion after 3 days of exposure to SAS 0.5 mM alone or in combination with TMZ 25 μ M. Thus, increased expression of genes related to glutathione synthesis would be a cellular compensatory mechanism to try to maintain sufficient levels of this antioxidant. Regarding T98G cells, they were resistant to most treatments evaluated and we have not verified induction of apoptosis, lipid peroxidation and changes in glutathione levels after three days of treatment with TMZ 25 μ M and/or SAS 0.5 mM. With respect to C6 lineage, cell viability was strongly decreased after administration of SAS 0.5 mM for 1, 3 or 5 days. After 3 days, we found the occurrence of apoptosis in the group SAS 0.5 mM, a phenomenon that is probably involved with the reduction of viability. Additionally, after 3 days, the reduction of total glutathione observed in SAS 0.5 mM and TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM groups was related to the increase in lipid peroxidation. We also verified, only for C6 cell, that the association of TMZ 25 μ M with SAS 0.5 mM reduced enzymatic activity of MMP9 after 5 days of treatment and, therefore, its invasiveness. In summary, our results show that the combination of TMZ with SAS significantly reduced the viability of all evaluated cell cultures (except T98G). Further studies are necessary to assess safety and efficacy of this type of treatment *in vivo*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A172 - Linhagem comercial de glioblastoma humano

C6 - Linhagem comercial de glioma de rato

EROs - Espécies reativas de oxigênio

GBM - Glioblastoma multiforme

GSSG - Glutathiona oxidada, glutathiona dissulfido

GSH - Glutathiona reduzida

MDA - Malondialdeído

MTT - *3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*

PCNA - *Proliferating cell nuclear antigen* ou Antígeno nuclear de proliferação celular

PCR - *Polymerase Chain Reaction* ou Reação em cadeia da polimerase

SAS - Sulfasalazina

TBARS - *Thiobarbituric acid reactive substances* ou Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TMZ - Quimioterápico temozolamida

TUNEL - *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

T98G - Linhagem comercial de glioblastoma humano

U87MG - Linhagem comercial de glioblastoma humano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	15
2. OBJETIVOS	
2.1. Geral.....	23
2.2. Específicos.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. Linhagens Celulares.....	24
3.2. Grupos experimentais e tratamentos com temozolamida (TMZ) e sulfasalazina (SAS).....	24
3.2.1. Para análise da viabilidade celular após administração de TMZ e/ou SAS.....	24
3.2.2. Para todos os demais protocolos experimentais.....	25
3.3. Avaliação da viabilidade celular: Ensaio colorimétrico (MTT).....	25
3.4. Avaliação de morte celular por citometria de fluxo: Reação de TUNEL.....	26
3.5. Avaliação de expressão gênica: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.....	27
3.6. Análise de expressão gênica: Transcriptoma de células A172 tratadas com temozolamida e/ou sulfasalazina.....	28
3.6.1. Preparo de bibliotecas de cDNA e sequenciamento de alto desempenho.....	28
3.6.2. Análise dos dados de sequenciamento.....	29
3.6.3. Análise estatística do transcriptoma.....	29
3.7. Avaliação da atividade das metaloproteinases 2 e 9.....	30
3.8. Quantificação de glutathiona total.....	30
3.9. Análise de peroxidação lipídica: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	32
3.10. Análise de proliferação celular: Western Blotting para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA).....	34
3.11. Análise estatística.....	35
4. RESULTADOS	
4.1. Análise de viabilidade celular após administração de temozolamida.....	36
4.2. Análise de viabilidade celular após administração de sulfasalazina.....	38
4.2.1. Linhagem U87MG.....	39
4.2.2. Linhagem A172.....	40
4.2.3. Linhagem T98G.....	41
4.2.4. Linhagem C6.....	42

4.3. Análise de viabilidade celular após administração de temozolamida associada com sulfasalazina.....	43
4.3.1. Linhagem U87MG.....	43
4.3.2. Linhagem A172.....	48
4.3.3. Linhagem T98G.....	53
4.3.4. Linhagem C6.....	57
4.4. Concentrações de temozolamida e sulfasalazina nos experimentos posteriores.....	61
4.5. Avaliação de morte celular por citometria de fluxo – Reação de TUNEL.....	62
4.6. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real após administração de temozolamida e/ou sulfasalazina.....	67
4.6.1. Linhagem U87MG.....	67
4.6.2. Linhagem A172.....	67
4.6.3. Linhagem T98G.....	68
4.6.4. Linhagem C6.....	68
4.7. Análise de expressão gênica: Transcriptoma de células A172 tratadas com temozolamida e/ou sulfasalazina.....	73
4.8. Atividade enzimática das metaloproteinases 2 e 9.....	78
4.9. Quantificação da glutathiona total.....	86
4.9.1. Linhagem U87MG.....	86
4.9.2. Linhagem A172.....	87
4.9.3. Linhagem T98G.....	88
4.9.4. Linhagem C6.....	88
4.10. Análise de peroxidação lipídica: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)....	90
4.10.1. Linhagem U87MG.....	90
4.10.2. Linhagem A172.....	91
4.10.3. Linhagem T98G.....	92
4.10.4. Linhagem C6.....	93
4.11. Análise de proliferação celular: Western Blotting para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA).....	94
4.11.1. Linhagens U87MG, T98G e C6.....	94
4.11.2. Linhagem A172.....	97
5. DISCUSSÃO	
5.1. Análise de viabilidade das células de glioma após administração de temozolamida e/ou sulfasalazina.....	98

5.2. Avaliação de morte celular por citometria de fluxo: Reação de TUNEL.....	103
5.3. Análise de expressão gênica: PCR em tempo real nas células de glioma após administração de temozolamida e/ou sulfasalazina.....	107
5.4. Análise de expressão gênica: Transcriptoma de células A172 tratadas com temozolamida e/ou sulfasalazina.....	108
5.5. Análise da atividade enzimática das metaloproteinases após administração de temozolamida e/ou sulfasalazina.....	112
5.6. Quantificação de glutathiona total.....	113
5.7. Análise de peroxidação lipídica: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	116
5.8. Análise de proliferação celular: Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA).....	119
6. CONCLUSÕES	
6.1. Gerais.....	121
6.2. Específicas.....	121
6.2.1. Linhagem U87MG.....	121
6.2.2. Linhagem A172.....	122
6.2.3. Linhagem T98G.....	122
6.2.4. Linhagem C6.....	123
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
ANEXO: Transcriptoma (vias biológicas alteradas).....	134

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Gliomas são os tumores cerebrais mais comuns e correspondem a cerca de 70% das neoplasias primárias do sistema nervoso central (SNC). Estes tumores surgem a partir de células gliais e apresentam ampla variedade de tipos histológicos, os quais podem exibir características que remetem às células de origem, isto é, astrócitos, oligodendrócitos e epêndima. Particularmente, as neoplasias derivadas dos astrócitos são definidas como astrocitomas (Louis et al. 2007a).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os astrocitomas podem ser classificados em quatro graus histológicos (I – IV), os quais guardam relação estreita com o comportamento biológico da lesão, tempo de sobrevida do paciente e resposta à abordagem terapêutica. O astrocitoma pilocítico, ao qual é atribuído grau I, é bem delimitado, de crescimento lento e acomete predominantemente crianças e adultos jovens. Via de regra, a conduta é cirúrgica e o prognóstico, favorável (Louis et al. 2007a). Por sua vez, os astrocitomas graus II, III e IV ocorrem principalmente em adultos e são considerados gliomas difusos, pois se infiltram de forma irrestrita no tecido nervoso tornando impossível sua delimitação precisa. A classificação destes tumores se baseia nos seguintes achados histológicos: atipias nucleares, mitoses, proliferação microvascular e necrose. O astrocitoma grau II (astrocitoma difuso de baixo grau) apresenta apenas um dos achados, sendo o mais comum atipia nuclear. O tumor grau III (astrocitoma anaplásico) exibe dois dos achados microscópicos listados, sendo atipia nuclear e mitoses os mais frequentes. No astrocitoma grau IV (glioblastoma multiforme; GBM), são observados ao menos três dos achados histológicos. Além desta classificação, os astrocitomas difusos podem ser categorizados em baixo (II) ou alto (III e IV) graus, em função do comprometimento lento ou rápido do parênquima cerebral vizinho, respectivamente. A excisão cirúrgica apenas, ainda que não permita a retirada completa da lesão, é a abordagem proposta para os tumores grau II. Os tumores graus III e IV recebem ainda radioterapia e/ou quimioterapia adjuvante. O tempo de sobrevida dos pacientes é inversamente proporcional ao grau histológico dos astrocitomas (Louis et al. 2007a).

GBM é o tumor cerebral primário mais frequente, correspondendo a aproximadamente 70% dos astrocitomas e 15% de todas as neoplasias intra-cranianas. Cerca de 90% dos GBMs são classificados como primários. Tais lesões acometem principalmente idosos (média de 62 anos), tem rápida evolução e não apresentam evidências clínicas ou histopatológicas de lesão precursora. Por outro lado, GBMs secundários acometem indivíduos mais jovens (média de 45 anos) e progridem de forma lenta a partir de astrocitoma difuso de menor grau. Histologicamente indistinguíveis entre si, as duas formas de GBM apresentam prognóstico sombrio. De fato, a natureza infiltrativa e o efeito de massa da lesão determinam diversas complicações neurológicas que contribuem para o

êxito letal da doença, por exemplo edema cerebral, hipertensão intracraniana e hérnias. Particularmente, o edema cerebral decorre de quebra da barreira hematoencefálica (BHE). Em condições fisiológicas, a interação física entre os astrócitos normais e as células endoteliais capilares é a base morfológica da integridade da BHE. A infiltração neoplásica leva à perda desta interação e causa extravasamento de água, eletrólitos e proteínas, que se acumulam no espaço extracelular (Nag et al. 2009). Apesar dos recentes avanços nas áreas de cirurgia, radiação e quimioterapia, os pacientes com GBM primário apresentam sobrevida mediana aproximada de 5 meses e aqueles com a forma secundária, de 8 meses (Ohgaki and Kleihues 2009). Considerando-se todos os glioblastomas, estudos populacionais revelaram que menos que 20% dos pacientes diagnosticados apresentam sobrevida maior que um ano (Louis et al. 2007b).

Dentre as numerosas alterações moleculares verificadas em gliomas, destacam-se: (1) superexpressão de fatores de crescimento e/ou mutação dos respectivos receptores estimulando o crescimento e proliferação celular, (2) perda da regulação de cascatas de transdução de sinais extracelulares favorecendo a proliferação e inibindo a diferenciação e morte celular por apoptose e (3) perda do controle do ciclo celular permitindo proliferação desordenada (McLendon et al. 2006).

Especificamente, sobre a participação de fatores de crescimento e seus receptores na gênese de gliomas, evidenciou-se que o gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (do inglês, epidermal growth factor receptor – *EGFR*) é o mais frequentemente amplificado e superexpresso em GBMs primários, afetando 40-60% destes tumores (Louis et al. 2007b, Yip et al. 2008, Hatanpaa et al. 2010, Riemenschneider et al. 2010). Além disso, níveis protéicos elevados de EGFR ocorrem em cerca de 90% das neoplasias astrocitárias, sugerindo que alterações na transcrição e tradução deste gene também possam participar da gênese tumoral. Em condições fisiológicas, o fator de crescimento epidérmico (do inglês, epidermal growth factor – EGF) liga-se ao domínio extra-celular do EGFR em precursores glioneuronais induzindo dimerização do receptor e alterações conformacionais em seu domínio citoplasmático. Estas últimas desencadeiam a atividade tirosina-quinase deste receptor, levando a fosforilação e ativação de resíduos de tirosina na sua porção citoplasmática e de moléculas de vias de sinalização envolvidas em diferenciação, proliferação e migração celular (Schlegel et al. 1994, Rajan and McKay 1998, Hatanpaa et al. 2010).

Por sua vez, células de glioma são capazes de sintetizar suas próprias moléculas de EGF e aumentar o número de EGFR em sua superfície. Assim, devido ao estabelecimento de uma alça de retroalimentação autócrina positiva, o efeito estimulatório do EGF se intensifica e as células proliferam independentemente de ligantes exógenos (McLendon et al. 2006).

A ligação do EGF ao seu respectivo receptor tirosina-quinase pode ativar diversas vias intracelulares, dentre elas a da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). Esta enzima é recrutada pelo receptor ativado e produz o segundo-mensageiro fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) através da fosforilação do fosfolípide de membrana fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2). O PIP3 recruta a proteína quinase B (PKB), também conhecida como AKT, do citoplasma para a membrana celular, onde é ativada por outras quinases. A AKT ativa retorna ao citoplasma e fosforila diversas proteínas, traduzindo sinais para o crescimento e sobrevivência celular (Endersby and Baker 2008, Knobbe et al. 2008).

A via da PI3K/AKT pode ser inibida pela proteína PTEN (do inglês, phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), uma fosfatase de lipídeos que desfosforila o PIP3 a PIP2 e impede a cascata de sinalização celular desencadeada pela ativação da AKT. Diversos estudos experimentais revelaram a importância da PTEN para o desenvolvimento normal, inclusive do SNC. De fato, a deleção homozigótica do *Pten* é letal ainda no período embrionário. Especificamente, a expressão anômala deste gene está associada com alteração de migração e do controle do crescimento e distribuição celular de neurônios cerebrais e cerebelares, além de defeitos de mielinização (Endersby and Baker 2008, Knobbe et al. 2008).

Ainda, a redução da expressão do *PTEN* está relacionada à predisposição ao surgimento de tumores no SNC, particularmente gliomas de alto grau. A perda do cromossomo 10q, onde se situa o gene *PTEN*, é observada em pelo menos 70% dos GBMs, sendo a alteração genética mais frequente nestes tumores. Tal alteração é mais comum na forma primária (25% dos casos) (Ohgaki et al. 2004). A importância do *Pten* como supressor tumoral foi evidenciada por anormalidades do crescimento, proliferação e migração celulares, além de angiogênese aberrante, após perda induzida deste gene (Davies et al. 1998, Wen et al. 2001, Knobbe et al. 2008). A diminuição da expressão do *PTEN* pode ser decorrente de mutação do gene e/ou do seu promotor, além de silenciamento epigenético (Endersby and Baker 2008). Tal diminuição contribuiria não só com a gênese da neoplasia, mas também com o desenvolvimento e manutenção das características astrocitárias da lesão (Ermoian et al. 2002, Uhrbom et al. 2002, Choe et al. 2003, Hu et al. 2005). A significância prognóstica das alterações do *PTEN* ainda é questão em aberto. Alguns estudos não mostraram correlação da mutação deste gene com sobrevida (Kraus et al. 2000, Smith et al. 2001). No entanto, outros trabalhos evidenciaram a associação da perda da função da PTEN com redução da sobrevida (Raffel et al. 1999, Tada et al. 2001, Homma et al. 2006, Phillips et al. 2006).

O comprometimento funcional da PTEN pode favorecer a oncogênese ao contribuir com a perda da regulação de outras vias de supressão tumoral, como a que envolve a proteína p53 (Endersby and Baker 2008). A p53 atua como fator de transcrição de genes inibidores da

proliferação celular após dano ao DNA, visando a manutenção da estabilidade genômica. Assim, impede-se a progressão do ciclo celular para que seja efetuado o reparo do material genético, evitando-se a propagação de mutações. Caso o reparo não seja possível, a célula entra em processo de morte por apoptose (Vogelstein et al. 2000, Yin and Shen 2008, Vousden and Prives, 2009). Além disso, tem sido considerado que a expressão aumentada do próprio gene *TP53* também seja uma resposta a agressão ao DNA celular (Levidou et al. 2010).

Alterações do gene supressor tumoral *TP53* são freqüentemente encontradas em tumores humanos, inclusive gliomas difusos (Nozaki et al. 1999, Hede et al. 2011). Células com função prejudicada da proteína p53 podem se tornar capazes de propagar aberrações gênicas e levar ao surgimento de neoplasias malignas (Louis et al. 2007). Especificamente, o descontrole do ciclo celular decorrente da perda desta proteína é verificado em aproximadamente 30% dos GBMs, mais comumente na forma secundária (cerca de 67% dos casos) (Kleihues and Ohgaki 1999, Levidou et al. 2010).

A relação funcional entre as proteínas p53 e PTEN é apenas parcialmente conhecida. Sabe-se que a PTEN pode se associar fisicamente com a p53 aumentando a capacidade de ligação desta última ao DNA (Freeman et al. 2003). Além disso, a p53 pode ativar a transcrição do *PTEN* (Stambolic et al. 2001). Um dos possíveis papéis atribuídos à interação entre PTEN e p53 seria a manutenção da integridade do genoma. Ainda que essa função já seja bem conhecida para a p53, é de descoberta relativamente recente para a PTEN. Comparações do espectro de alterações gênicas do *PTEN* e *TP53* em tumores revelaram que as respectivas mutações somáticas são geralmente independentes e mutuamente exclusivas, sugerindo que essas duas proteínas regulariam a estabilidade do genoma e da homeostasia celular de formas distintas e complementares. De fato, a ativação da p53 é processo estimulado por danos ao genoma, sendo, portanto, evento dinâmico e transitório. Por sua vez, a expressão da PTEN é mantida constante e em níveis elevados em células normais, fato que seria necessário para a manutenção do seu papel protetor do genoma (Yin and Shen 2008). As primeiras evidências experimentais deste papel protetor exercido pela PTEN foram verificadas em células com alterações da expressão do *Pten*. Tais alterações associaram-se com defeitos nos pontos de checagem da integridade do DNA durante o ciclo celular ou acúmulo de quebras da dupla-fita do DNA (Puc and Parsons 2005, Puc et al. 2005). Experimentos em células humanas ou murinas evidenciaram interação da PTEN com centrômeros mantendo a integridade e estabilidade dos cromossomos (Shen et al. 2007). Essas observações sugerem que a deficiência da PTEN corroboraria com a oncogênese devido à perda de sua função de manutenção e/ou checagem da estabilidade do DNA.

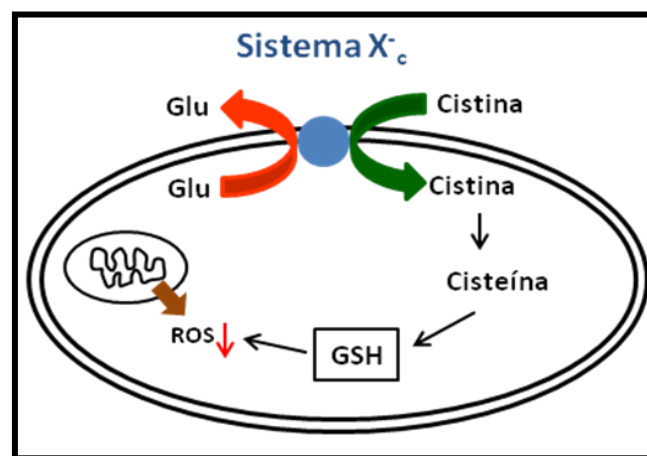
A estabilidade do genoma é necessária para a manutenção da sobrevivência celular. Sendo assim, o dano ao genoma de células tumorais tem sido objetivo de estratégia quimioterápica contra gliomas difusos. De fato, grande parte dos quimioterápicos, são agentes alquilantes do DNA. Dentre estas substâncias, a temozolamida (TMZ) é a mais utilizada no tratamento de gliomas e seu mecanismo de ação consiste em adicionar grupo metil à posição O^6 da base guanina através de ligação covalente. A alquilação de base nitrogenada pode prejudicar a leitura da fita de DNA, a ser replicada pela DNA polimerase, e levar à síntese de material genético anômalo (Weinberg, 2006). Ensaio clínico com a TMZ demonstraram que a sua administração, aliada à radioterapia, possibilitou sobrevivência de 9,8% dos pacientes com glioblastoma, após 5 anos de tratamento. Por outro lado, 1,9% dos pacientes sobreviveram após serem tratados apenas com radioterapia (Stupp et al., 2009). Sendo assim, apesar da melhora do prognóstico em comparação com a radioterapia apenas, o tratamento com TMZ apresenta eficácia limitada, devendo se considerar ainda que alguns tumores apresentam resistência a esta droga (Yoshino et al., 2010).

Além da perda da estabilidade do DNA através da alquilação, estudos recentes têm proposto a possibilidade de aumentar o estresse oxidativo como um mecanismo de indução da morte celular em gliomas (Weinberg, 2006; Chung e Sontheimer 2009). Espécies reativas de oxigênio (EROs), como íon superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, são geradas na sua maior parte pelo metabolismo mitocondrial. Peroxissomos também podem produzir estas espécies, principalmente através da oxidação de lipídeos. Os efeitos deletérios das EROs podem ser reduzidos tanto em condições normais quanto em neoplasias através de sistemas antioxidantes intracelulares (Weinberg, 2006).

A glutatona é um composto antioxidante intracelular que neutraliza EROs, tais como o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos. Tal neutralização ocorre através de uma cascata de reações de detoxificação que envolve enzimas como as glutatona peroxidases, transferases e redutases (Rahman et al. 2006). Em relação à sua estrutura química, a glutatona é um tripeptídeo constituído por glicina, cisteína e ácido glutâmico. O composto cistina, captado pela célula, é convertido a cisteína, sendo essencial para a biossíntese da glutatona (Meister 1988, Weinberg 2006; Sontheimer 2008). Esta molécula pode se apresentar em dois estados: reduzido (GSH) ou oxidado (glutatona dissulfeto, GSSG). Na forma reduzida (GSH), o grupo tiol da cisteína é responsável por sua atividade biológica uma vez que é capaz de doar elétrons a moléculas instáveis como as EROs. Neste processo, a própria glutatona torna-se oxidada formando o composto GSSG. A GSH é regenerada pela ação da enzima glutatona redutase que converte a forma GSSG em GSH. Especificamente, em condições fisiológicas, cerca de 90% do *pool* de glutatona encontra-se na

forma reduzida (GSH) e 10%, na forma oxidada (GSSG). Neste sentido, a diminuição da razão GSH/GSSG indica que a célula encontra-se em estresse oxidativo (Meister 1988, Marí et al. 2009).

Em relação à biossíntese de glutathione, os astrócitos normais, bem como os gliomas, apresentam um complexo protéico transportador na membrana citoplasmática que importa cistina, e libera glutamato para o meio extracelular. Embora este transportador, denominado sistema X_c^- , esteja presente em células gliais normais, ele parece estar super-expresso e apresentar funções específicas em gliomas (Figura abaixo). Nesse sentido, tem sido relatado, que os níveis de glutathione estão aumentados em gliomas. Este fato tornaria tais tumores mais resistentes ao estresse oxidativo e à exposição a certas drogas quimioterápicas (Lyons et al. 2007).



Sistema X_c^- e síntese de glutathione em gliomas. O transportador de membrana definido como sistema X_c^- (em azul) libera glutamato (Glu) do interior do tumor para o tecido cerebral adjacente em troca da captação de cistina, a qual é precursora da glutathione (GSH). A GSH é molécula antioxidante intracelular expressa em níveis elevados em gliomas. Tal molécula reduziria os efeitos deletérios do estresse oxidativo induzido por espécies reativas de oxigênio (EROS) derivadas do metabolismo mitocondrial ou da administração de agentes quimioterápicos (Modificado de Sontheimer 2008).

Além disso, o aminoácido glutamato liberado pelo sistema X_c^- parece ter papel fundamental no crescimento e invasão do tumor. Particularmente, a liberação do glutamato para o meio extracelular favoreceria o crescimento tumoral provocando a morte por excitotoxicidade de neurônios e outras células adjacentes às neoplásicas. Além disso, o glutamato liberado pelas células malignas teria efeito autócrino e parácrino, atuando em receptores AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico) permeáveis ao cálcio (Lyons et al. 2007; Sontheimer 2008). Embora o mecanismo de ação deste íon não seja completamente conhecido, sua entrada através

destes receptores induziria o processo de migração celular ao regular a maquinaria contrátil do citoesqueleto formada por moléculas de actina e miosina (Cooper 2000; Lyons et al. 2007).

Nos últimos anos, a inibição farmacológica do sistema X_c^- pela sulfasalazina (SAS) tem atraído atenção por ser um alvo terapêutico interessante no tratamento de gliomas. A SAS é um fármaco já utilizado no tratamento de doenças inflamatórias intestinais. Especificamente, em relação à administração de SAS em gliomas, verificou-se redução dos níveis intracelulares de glutathiona total nas células da linhagem U87MG. Além disso, verificou-se inibição do crescimento celular e indução de apoptose mediada por caspases em linhagens de glioma C6 e U87-MG, bem como em culturas primárias obtidas de amostras de pacientes (Robe et al. 2004, Chung et al. 2005, Lyons et al. 2007, Sontheimer 2008, Chung e Sontheimer 2009). Ainda, demonstrou-se que a SAS reduziu a capacidade invasiva de linhagens celulares (STTG-1, U251-MG, U87-MG) e de células de cultura primária de GBM humano (Lyons et al. 2007). A capacidade invasiva foi avaliada por ensaio de invasão em matrigel, uma substância que mimetiza a composição química da membrana basal. Além disso, a SAS reduziu os níveis de glutathiona, a capacidade de invasão e crescimento do tumor, quando células humanas de glioblastoma (D54-MG) foram implantadas em camundongos imunodeficientes (Lyons et al. 2007). Até o presente, não há relatos sobre o uso da SAS em portadores de glioma sem tratamento prévio, associada ou não a outros fármacos.

É importante ressaltar que, além da rápida proliferação celular, as propriedades invasivas dos gliomas apresentam grande importância clínica à medida que contribuem para um prognóstico ruim. A causa desse mau prognóstico é, em parte, explicado pela alta capacidade que as células gliais malignas têm de se infiltrarem difusamente no parênquima cerebral normal, dificultando a remoção das células neoplásicas e favorecendo a recorrência do tumor (Rao 2003). Em relação à notável capacidade invasiva das células de glioma, duas proteínas constituintes da subclasse das gelatinases vêm recebendo maior atenção nas últimas décadas: as metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e 9). Especificamente, observaram-se maiores níveis destas enzimas em glioblastomas humanos, em comparação com gliomas de baixo grau e tecido cerebral normal. Tais enzimas são endopeptidases com atividade hidrolítica que degradam componentes da membrana basal e matriz extracelular, tais como colágeno, elastina e proteoglicanos, facilitando a invasão neoplásica do tecido normal adjacente (Chintala et al. 1999, Rao 2003, Gabelloni et al. 2010).

Conforme mencionado, há evidências indicando que a SAS reduz a capacidade de invasão de células de glioma humano tanto em *in vitro* como *in vivo*. O mecanismo de ação provavelmente envolve a inibição da liberação de glutamato através da inibição do sistema X_c^- pela SAS (Lyons et al. 2007, Sontheimer 2008). Por sua vez, há poucos dados na literatura a respeito de possível influência da TMZ sobre a invasão tumoral. Neste contexto, foi observado que o tratamento de

células da linhagem U87MG por 4 ou 9 dias com TMZ aumentou a expressão protéica das MMP-2 e MMP-9 e a atividade enzimática apenas da MMP-2 (Trog et al., 2006). Por outro lado, demonstrou-se que o tratamento da mesma linhagem com TMZ não afeta a capacidade de invasão celular avaliada por ensaio em matrigel (Gabelloni et al. 2010).

Considerando a ausência de dados na literatura descrevendo a associação de SAS e TMZ em neoplasias gliais, investigamos os efeitos da administração conjunta destes fármacos sobre a viabilidade de linhagens celulares de glioblastoma humano (U87MG, A172 e T98G) e de glioma de rato (C6). A linhagem C6 foi investigada, pois tem sido considerada um modelo experimental do GBM (Grobbs et al. 2002). As linhagens celulares humanas são imortalizadas e originaram-se a partir de tumores de pacientes com diagnóstico de glioblastoma.

As quatro linhagens investigadas neste estudo são frequentemente utilizadas na literatura e foram adquiridas da empresa ATCC (*American Type Culture Collection*, www.atcc.org). As células U87MG são descritas como epitelióides. A linhagem A172 apresenta fenótipo glial, isto é, com diversos prolongamentos celulares em arranjo estrelado. As células T98G exibem aspectos morfológicos poligonais (www.atcc.org, Hay et al., 1994). Por sua vez, a linhagem murina C6 apresenta características morfológicas semelhantes a fibroblasto. Esta linhagem foi obtida por volta de 1968 através de injeções múltiplas de N-nitrosometiluréia em ratos (*Rattus norvegicus*). Um dos tumores formados após tais injeções apresentava expressão elevada da proteína S-100, a qual é expressa apenas por tecidos neurais em vertebrados. Desta forma, a linhagem obtida a partir de tais tumores foi classificada como glial (Benda et al., 1968).

Ainda, é sabido que os principais mecanismos de ação atribuídos a TMZ e SAS são distintos, ou seja, alquilação do DNA e inibição da síntese de glutatona, respectivamente. Assim, entendemos que as alterações gênicas desencadeadas pela alquilação do DNA poderiam ser associadas àquelas decorrentes do estresse oxidativo estabelecido pela diminuição dos níveis intracelulares de glutatona, favorecendo a morte celular. A investigação desta administração é particularmente interessante uma vez que as duas drogas são seguras para uso em humanos, pois já são empregadas na prática clínica para tratamento de indivíduos com gliomas (TMZ) e doenças inflamatórias intestinais (SAS). Sendo assim, no presente trabalho, estudamos o efeito de nova abordagem terapêutica experimental com TMZ e SAS sobre células de glioma.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar o efeito da administração isolada ou combinada de sulfasalazina e temozolamida sobre a viabilidade celular de linhagens de glioblastoma humano (U87MG, A172, T98G) e de glioma de rato (C6).

2.2. Específicos

2.2.1. Analisar a ocorrência de morte celular/fragmentação de DNA e a proliferação de células de glioma expostas a temozolamida e/ou sulfasalazina através da técnica de TUNEL e da detecção dos níveis de PCNA, respectivamente.

2.2.2. Investigar a expressão de alguns genes envolvidos com a origem de GBMs primários e secundários *EGFR*, *PTEN* e *TP53* em linhagens celulares de glioblastoma humano e de glioma de rato, através de reação de PCR em tempo real. Especificamente, a expressão destes genes foi estudada após administração isolada ou combinada de temozolamida e sulfasalazina.

2.2.3. Estudar a expressão gênica em larga escala de linhagem celular sensível à temozolamida (A172) após administração de temozolamida e/ou sulfasalazina. Esta abordagem foi realizada para pesquisar vias biológicas alteradas pelos tratamentos e que poderiam corresponder a potenciais alvos terapêuticos eventualmente não detectados através da técnica de PCR em tempo real.

2.2.4. Analisar o efeito da administração de sulfasalazina e/ou temozolamida sobre a capacidade invasiva de células de glioma. Nesse sentido, estudamos a expressão gênica e a atividade das metaloproteinases 2 e 9 através de PCR em tempo real e de ensaio de zimografia, respectivamente.

2.2.5. Verificar ocorrência de estresse oxidativo após tratamento de linhagens de glioma com sulfasalazina e/ou temozolamida. Para isso, foram avaliados os níveis de glutatona total e a ocorrência de peroxidação de lipídeos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares

Foram utilizadas linhagens celulares de glioblastoma humano (U87MG – American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA; A172 e T98G – doações da Profa. Dra. S. K. N. Marie, Universidade de São Paulo, SP, Brasil) e de glioma de rato (C6 – ATCC, Manassas, VA, USA). A manutenção celular foi realizada com meio DMEM, contendo 2.0 g/L de glicose (cat n° D0460, Vitrocell), suplementado com 10% de soro fetal bovino (cat n° S0011, Vitrocell) e 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina) (cat n° P0403, Vitrocell).

3.2. Grupos experimentais e tratamentos com temozolamida (TMZ) e sulfasalazina (SAS)

3.2.1. Para análise da viabilidade celular após administração de TMZ e/ou SAS

As linhagens celulares de glioblastoma humano (U87MG, A172 e T98G) e de glioma de rato (C6) foram plaqueadas na concentração de 10.000 células/cm². Para o plaqueamento, as células foram descoladas dos frascos de cultura utilizando-se solução de Tripsina-EDTA (cat n° T0012, Vitrocell, 50 µl/cm²) por cerca de 3 minutos. A tripsina foi inativada utilizando-se o meio suplementado. A suspensão celular foi centrifugada (400g, 5 min, 25°C, Baby® I Centrifuge mod 206, FANEM) e a quantidade de células estimada, usando-se a câmara de Neubauer (cat n° 111020, L. OPTIK, Inglaterra). Um dia após o plaqueamento, o meio de cultura suplementado foi substituído por solução de igual volume constituída por meio de cultura suplementado, temozolamida (TMZ; concentrações variando de 1.57 µM a 400 µM; T2577, cat n° 85622-93-1, Sigma; Gabelloni et al., 2010; Barazzuol et al., 2012; Happold et al., 2012) e/ou sulfasalazina (SAS; 0.25 mM a 1 mM, cat n° S0883, Sigma; Robe et al. 2004, Chung e Sontheimer, 2009), por diversos períodos de incubação (mínimo de 16 horas e máximo de 5 dias), conforme indicado nos resultados de cada experimento individualmente. A solução-estoque de TMZ foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO; D2650, cat n° 67-68-5 Sigma; Uzzaman et al., 2007; Gabelloni et al., 2010; Happold et al., 2012; Sun et al., 2012) numa concentração de 50 mM. Esta solução-estoque foi, então, diluída em meio de cultura suplementado de tal forma que a concentração final de DMSO a que as células estivessem expostas não ultrapassasse 0.1%. Para o preparo da solução-estoque de SAS (20 mM), a droga foi solubilizada primeiramente em NaOH 0.2 M, e o pH 7.4 foi ajustado com HCl 0.2 M. A solução-estoque foi então diluída em meio de cultura suplementado

para se obter as concentrações finais de SAS utilizadas nos experimentos. Em paralelo, foram estudados grupos constituídos por células cultivadas apenas em meio de cultura suplementado ou em meio suplementado acrescido do veículo de diluição de cada droga.

3.2.2. Para todos os demais protocolos experimentais

Conforme detalhado nos itens correspondentes a seguir, para os demais experimentos realizados (não de viabilidade celular) com as linhagens U87, A172 e T98G, utilizamos 25 μ M de TMZ associados com 0.50 mM de SAS. Particularmente, para a linhagem C6, a associação empregada foi 25 μ M de TMZ com 0.25 mM ou 0.5 mM de SAS.

3.3. Avaliação da viabilidade celular: Ensaio colorimétrico (MTT)

As células foram plaqueadas na densidade de 10.000 células/cm² e, após cada período de incubação, a viabilidade foi avaliada através do ensaio colorimétrico MTT. Este ensaio é baseado na clivagem do sal tetrazolium (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide - MTT; Sigma), de coloração amarela, por enzimas mitocondriais, como a succinato desidrogenase. Tal clivagem produz o composto solúvel formazan, de coloração azulada. A quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células vivas presentes no momento em que o MTT foi adicionado ao meio de cultura (Tada et al., 1986; Sylvester, 2011). Após cada período de incubação, o meio de cultura foi retirado, 250 μ l de solução de MTT (1 mg/ml em DMEM 2g/L de glicose, sem fenol) foram adicionados a cada poço da placa de 24 poços e as células incubadas por 1,5 hora em estufa a 37°C e 5% CO₂. Em seguida, foram adicionados 250 μ l de solução de SDS ácido (10% SDS, 0,01M HCl) por poço e as células foram incubadas por 24 horas para dissolução dos sais de formazan. A fim de que os valores de absorvância não atingissem valores acima do nível de detecção da leitora de placa, cada poço recebeu, anteriormente às leituras, 500 μ l de uma solução 1:1 contendo meio DMEM 2g/L de glicose, sem fenol e SDS ácido. Após homogeneização com pipeta, 200 μ l de solução de cada poço foram transferidos para uma placa de 96 poços onde foram realizadas as leituras. Os resultados foram obtidos através da leitura da absorvância da solução a 570 nm subtraindo-se o valor da absorvância medido a 650 nm em leitora de placa (PowerWave XS 2, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). As medidas de absorvância dos poços sem células foram consideradas como controles negativos (brancos) do ensaio e subtraídas de cada valor de absorvância obtido nos poços com células.

3.4. Avaliação de morte celular por citometria de fluxo: Reação de TUNEL

As células foram cultivadas na densidade de 10.000 células/cm² e tratadas com TMZ e/ou SAS por três dias. Após a incubação, foram analisadas tanto as células aderidas às placas quanto aquelas possivelmente soltas no meio de cultura. As células aderidas foram descoladas das placas utilizando-se solução de Tripsina-EDTA (cat n° T0012, Vitrocell, 50 µl/cm²) por cerca de 3 minutos. A tripsina foi inativada utilizando-se meio de cultura suplementado. A quantidade de células foi estimada usando-se a câmara de Neubauer (cat n°111020, L.OPTIK, Inglaterra). Então, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% tamponado (pH 7.4) por 10 minutos, utilizando-se a proporção de 1x10⁶ células/ml de paraformaldeído. Após centrifugação (4000 rpm por 5 min., a 25°C), o paraformaldeído foi substituído por etanol 80% e as amostras armazenadas a 4°C até o uso. Para a marcação de células com fragmentação de DNA, utilizou-se 1 ml das células fixadas, segundo recomendações do fabricante (FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Calbiochem, cat n° QIA39). Após centrifugação (4000 rpm por 5 min., a 25°C), o etanol foi removido e as células incubadas por 10-15 minutos com 200 µl de tampão TBS (Tris 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7.6) à temperatura ambiente. A seguir, após nova centrifugação para remoção do TBS, as células foram permeabilizadas com proteinase K (100 µl; 20 µg/ml; em tampão 10 mM Tris pH 8.0) por 5 minutos, à temperatura ambiente. Após centrifugação (4000 rpm por 5 min., a 25°C), a proteinase K foi removida e substituída pelo tampão de equilíbrio (100 µl) por 10 a 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, o tampão de equilíbrio foi substituído por 60 µl da solução de reação (3 µl da enzima TdT e 57 µl dos nucleotídeos conjugados com fluoresceína - FITC), e as amostras incubadas por 120 minutos a 37°C, no escuro. A solução de reação foi removida após centrifugação (4000 rpm por 5 min, temperatura ambiente). As células foram então lavadas com TBS (200 µl) por duas vezes. Em seguida, analisou-se a emissão de fluorescência, em um volume final de 500 µl de TBS, através de citômetro de fluxo equipado com o laser de argônio (488 nm) (FACSCalibur, BD Biosciences; modelo E2866). Paralelamente às amostras, foram preparados um controle negativo e um positivo da reação. O controle negativo foi constituído por células tratadas apenas com o meio de cultura suplementado. Todos os procedimentos anteriores citados foram realizados, exceto adição da enzima TdT, a qual foi substituída por água. Por sua vez, o controle positivo consistiu de células tratadas apenas com meio de cultura suplementado e submetidas à ação da enzima DNase I (1 µg/µl em TBS/1 mM MgSO₄) por 20 min, à temperatura ambiente. O tratamento com DNase I foi realizado imediatamente após o tratamento com proteinase K, sendo mantidos os demais procedimentos descritos acima.

3.5. Avaliação de expressão gênica: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

As células foram cultivadas na densidade de 10.000 células/cm² e tratadas com TMZ e/ou SAS por três dias. Foram utilizados de 6 a 12 poços de placas de 24 poços a fim de se obter a quantidade necessária de RNA para a análise de todos os genes estudados.

A extração de RNA total foi realizada seguindo as recomendações do fabricante (RNeasy MicroKit, Qiagen, cat n° 74004). A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria (em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7.0, Epoch, Take3 Micro-Volume Plates, Biotek). A pureza do RNA foi avaliada através da razão de absorbância 260/280 nm (valores de referência entre 1.9 e 2.1) e 260/230 nm (valores de referência entre 2.0 e 2.2). A razão 260/280 nm fora da faixa de referência, informa contaminação com proteína e fenol. A razão 260/230 é uma medição secundária de pureza do RNA, sendo que valores alterados indicam contaminação com sais, EDTA, fenol, peptídeos e/ou carboidrato (RNeasy® Micro Handbook).

A expressão dos genes envolvidos com a origem de glioblastomas primários e secundários (*EGFR*, *PTEN* e *p53*) e das metaloproteinases 2 e 9 (*MMP2* e *MMP9*) foi quantificada utilizando-se o método de Real-Time PCR. As reações foram realizadas empregando-se o sistema de detecção por fluorescência TaqMan (Applied Biosystems), que é constituído por um par de primers e uma sonda marcada com fluoróforo (FAM). O RNA total foi convertido a cDNA através de reação com a enzima transcriptase reversa, usando-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, cat n° 4368814). Para as reações de transcrição reversa das linhagens humanas (U87, A172 e T98G) foram utilizados 24 µl de RNA total (80 ng/µl) e 24 µl da solução RT master mix. Em seguida, 40 ng de cDNA foram submetidos à reação de amplificação em equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems), de acordo com as especificações do fabricante. Para a linhagem de rato (C6), 100 ng de cDNA foram submetidos à reação de amplificação. Os genes avaliados foram: *EGFR* humano (Entrez Gene ID 1956/NM_005228.3), *egfr* de rato (Entrez Gene ID 24329/NM_031507.1), *PTEN* humano (Entrez Gene ID 5728/NM_000314.4), *pten* de rato (Entrez Gene ID 50557/NM_031606.1), *TP53* humano (Entrez Gene ID 7157/NM_000546.4), *tp53* de rato (Entrez Gene ID 24842/NM_030989.3), *MMP2* humano (Entrez Gene ID 4313/NM_001127891.1), *mmp-2* de rato (Entrez Gene ID 81686/ NM_031054.2), *MMP9* humano (Entrez Gene ID 4318/NM_004994.2) e *mmp-9* de rato (Entrez Gene ID 81687/NM_031055.1).

Como controles endógenos da reação foram usados os genes *TATA box binding protein* (*TBP* humano, Entrez Gene ID 6908/NM_001172085.1; *tbp* de rato, Entrez Gene ID 117526/NM_001004198.1) e *ribosomal protein L13a* (*RPL13A* humano, Entrez Gene ID

23521/NM_012423.2; *rpl13a* de rato, Entrez Gene ID 317646/NM_173340.2) (Kreth et al. 2010). Tais genes servem para normalizar a expressão dos genes de interesse (alvo) nas diferentes amostras e também são marcados com fluoróforo. A razão entre a expressão dos genes de interesse e dos genes de referência indica os níveis relativos de expressão. Os dados de expressão relativa dos genes foram analisados segundo o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittger 2001). Especificamente, para a linhagem C6, ainda que os genes *tbp* e *rpl13a* tenham sido usados como controles endógenos, para a análise comparativa da expressão gênica, utilizamos apenas os dados obtidos com *tbp*, pois o gene *rpl13a* não apresentou boa eficiência de amplificação. Estes genes foram inicialmente escolhidos pois, após análise da literatura, não encontramos referência sobre genes que poderiam ser utilizados como controle endógeno das células C6. Desta forma, por serem células de glioma, empregamos os mesmos genes recomendados para glioma humano (Kreth et al. 2010).

3.6. Análise de expressão gênica: Transcriptoma de células A172 tratadas com temozolamida e/ou sulfasalazina

3.6.1. Preparo de bibliotecas de cDNA e sequenciamento de alto desempenho

As células foram cultivadas na densidade de 10.000 células/cm² e tratadas com temozolamida e/ou sulfasalazina por três dias. Após a incubação, foram analisadas tanto as células aderidas às placas quanto aquelas possivelmente soltas no meio de cultura. As células aderidas foram descoladas das placas utilizando-se solução de Tripsina-EDTA (Vitrocell, cat n° T0012, Campinas, SP, Brazil, 50 µl/cm²) por cerca de 3 minutos. A tripsina foi inativada utilizando-se meio de cultura suplementado. Em seguida, realizou-se a extração e purificação de RNA total de cada amostra através do protocolo fenol clorofórmio utilizando TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, cat n° 15596018, Waltham, MA, USA), conforme instruções do fabricante. Uma quantidade de 400 ng de RNA foi convertido a uma biblioteca de cDNA utilizando-se o kit TruSeq Stranded mRNA LT (Illumina, cat n° 122-2103-RS, San Diego, CA, USA), também conforme as instruções do fabricante.

As bibliotecas produzidas foram quantificadas por qPCR utilizando-se primers específicos para os adaptadores universais Illumina. Para cada biblioteca produzida foi adicionada uma sequência identificadora única para posterior separação das amostras após o sequenciamento. Esta estratégia permitiu que todas as amostras fossem sequenciadas em uma mesma corrida, minimizando possíveis variações nas condições de sequenciamento.

As bibliotecas foram sequenciadas em uma plataforma HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, USA) em modo High Output, produzindo-se sequências de 2x100 nucleotídeos para cada molécula sequenciada.

3.6.2. Análise dos dados de sequenciamento

O alinhamento das sequências produzidas foi realizado utilizando-se o pacote de software TopHat2 (<http://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>) e utilizando como referência o genoma da espécie *Homo sapiens*, montagem UCSC hg19. A porcentagem média de sequências alinhada para o conjunto de dados foi de aproximadamente 90%. Para a análise de expressão de genes conhecidos foram utilizados os pacotes de software HTSeqCount e DESeq2 (<http://www.huber.embl.de/users/anders/HTSeq/doc/overview.html> e <http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>, respectivamente).

3.6.3. Análise estatística do transcriptoma

Com relação ao transcriptoma, o pacote HTSeqCount foi utilizado para realizar a contagem de número de sequências alinhadas a elementos do genoma, tais como genes ou exons, gerando uma tabela de contagem de cada um destes elementos. O pacote DESeq2 permitiu que fossem executados, em ambiente R, diversos processos utilizados na estimativa de expressão diferencial a partir de dados de sequenciamento de alto desempenho. Tais processos incluem: modelagem dos dados utilizando distribuição binomial negativa para normalização entre amostras, redução da contribuição da variabilidade de genes pouco expressos nas estimativas de variância entre as amostras, teste estatístico de hipótese de expressão diferencial utilizando teste de Wald e correção para múltiplos testes utilizando procedimento de Benjamini e Hochberg.

Após processamento dos dados utilizando os pacotes de software mencionados, foram geradas listas de contagem de sequências para cada gene conhecido, sendo encontrado em média 25.300 genes que apresentaram pelo menos 10 sequências alinhadas.

Também foram geradas listas de genes diferencialmente expressos que apresentaram valor de probabilidade de hipótese nula menor que 5% (valor de $p < 0.05$) após correção para múltiplos testes. O conjunto total de expressão gênica de todas as amostras, modelado e normalizado pelo software DESeq2 foi processado utilizando-se método de redução de dimensionalidade PCA.

Devido ao grande volume e complexidade dos dados que foram gerados, o conjunto de genes diferencialmente expressos foi submetido à análise de enriquecimento de vias biológicas utilizando a ferramenta MetaCore® (Thomas-Reuters). Este tipo de análise calcula a probabilidade de um

determinado conjunto de genes diferencialmente expressos estarem envolvidos em uma determinada via biológica.

3.7. Avaliação da atividade das metaloproteinases 2 e 9

Após o tratamento das células, o meio de cultura foi coletado em cada condição experimental e imediatamente congelado (-80°C) até o momento da análise zimográfica (Park et al., 2002; Senft et al., 2011; Machado et al., 2013). Em todos os ensaios, utilizaram-se 60 µg de proteína total. O volume de amostra a ser aplicado no gel foi misturado a 1/6 do volume de tampão de amostra não redutor (Tris-HCl 0.1 M pH 6.8, 30% glicerol, 1% SDS e 0.0012% de azul de bromofenol) e as amostras foram previamente aquecidas em água morna. Neste ensaio, as amostras não podem ser fervidas, pois altas temperaturas desnaturam as MMPs levando a perda de atividade enzimática. A seguir, as amostras foram fracionadas através de eletroforese (SDS-PAGE) em géis de poliacrilamida a 10%, contendo aproximadamente 0.1% de gelatina (Sigma, cat n° G9382). Após a separação das proteínas, os géis foram lavados em solução aquosa contendo 2% de Triton X-100 (cat n° X100, Sigma) para a retirada do SDS e renaturação das enzimas. A seguir, os géis foram incubados por pelo menos 18 horas em tampão de proteólise (Tris-CaCl₂, pH 7.4, 10 mM de Tris (cat n° 0497, AMRESCO) e 5 mM de CaCl₂(2H₂O) (Sigma, cat n° C3881) em estufa a 37°C. Os géis foram, então, corados com solução contendo Coomassie Blue R (Sigma, cat n° B0149) (30% de metanol, 10% de ácido acético e 0.5% de Coomassie Blue R) por volta de uma hora e descorados em água até que as bandas fossem observadas com nitidez. A metaloproteinase 9 (MMP9) apresenta peso molecular aproximado de 92 kDa e a MMP2, de 72 kDa. O padrão de peso molecular utilizado foi Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, cat n° 26634). A análise das bandas foi realizada em triplicada através da densitometria óptica (ImageJ software).

3.8. Quantificação de glutathiona total

A quantidade de glutathiona total (glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG)) foi avaliada através de método colorimétrico enzimático de reciclagem, utilizando *kit* comercial (Cayman Chemical, cat n° 703002). O protocolo proposto pelo fabricante foi adaptado. Especificamente, as células foram plaqueadas em discos de 60 cm² (TPP, cat n° 93100), na densidade de 10.000 células/cm². Após três dias de incubação com as drogas, as células foram descoladas das placas, ainda contendo o meio de cultura, utilizando-se “rubber policeman”. Todo o conteúdo (meio de cultura e células) foi transferido para tubos de 50 ml para centrifugação a 4000g, por 5 min, à temperatura ambiente. Após centrifugação, o meio de cultura foi retirado e o “pellet”

de células ressuspenso em tampão (de 1 a 2 ml) contendo 50 mM de MES pH 6-7 (Sigma, cat n° M8250), 1 mM de EDTA (Sigma, cat n° E5134) e 0.1% de Triton X-100 (Sigma, cat n° T9284). Em seguida, as amostras foram sonicadas (Sonicator 3000, Misonix, New Highway, NY, USA) por 45s (3 ciclos de 15s com intervalo de repouso de 10s entre eles), com potência (*power setting*) entre 0.5 e 1. Logo após, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por cerca de 1 min e mediu-se a concentração de proteína total utilizando o método colorimétrico de Bradford (Sigma, cat n° B6916; Bradford, 1976). As amostras foram centrifugadas a 10000g, por 15 min, 4°C, o sobrenadante foi mantido em gelo e o pellet, descartado. O sobrenadante foi submetido à desproteíntização, utilizando-se igual volume de ácido metafosfórico 10% (Sigma, cat n° 239275). As amostras foram agitadas em vórtex e incubadas por 5 min a temperatura ambiente. Seguiu-se à centrifugação (10000g, 5 min) e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C para medição da glutatona total. Imediatamente antes desta medição, foi adicionado trietanolamina 4M (Sigma, cat n° T58300) às amostras (50 µl por ml de amostra). A adição de trietanolamina eleva o pH da amostra, permitindo a atividade das enzimas envolvidas no processo de reciclagem.

O ensaio colorimétrico enzimático é baseado na reação da GSH com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (composto DTNB ou reagente de Ellman), a qual produz ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (cromóforo amarelo TNB, com máxima absorvância a 412 nm) e o complexo glutatona oxidada-TNB (GSTNB). O complexo GSTNB é reduzido continuamente pela enzima glutatona redutase (GR) em presença de NADPH, formando novamente a GSH. A taxa de formação do TNB, medida em 405-414 nm, é proporcional à quantidade de GSH na amostra. Uma vez que a GR reduz a GSSG formada produzindo 2 GSH, a quantidade de glutatona medida neste protocolo reflete os níveis de glutatona total na amostra (Figura 1). O aumento linear da absorvância a 405 nm em função do tempo foi aferido usando leitora de placa (PowerWave XS 2, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). As reações de concentrações conhecidas de glutatona e dos grupos experimentais foram monitoradas minuto a minuto por meia hora gerando uma reta cuja inclinação é denominada *i-slope*. Construiu-se uma curva padrão com as concentrações conhecidas de glutatona, na qual os valores em µM foram representados no eixo X e o *i-slope* de cada concentração conhecida no eixo Y. Para o cálculo de glutatona das amostras dos grupos experimentais, utilizou-se o valor do *i-slope* das amostras, tomando-se por base a curva padrão acima mencionada ($Y=aX+b$). O resultado foi multiplicado por 2 para compensar a diluição da amostra pelo ácido metafosfórico.

Em resumo, o cálculo de concentração de glutatona pode ser representado pela fórmula abaixo:

$$\text{Glutaciona total (X)} = [(i\text{-slope dos grupos experimentais} - b)/a] \times 2$$

Os valores de concentração obtidos em μM foram divididos pela concentração de proteína total na amostra (mg/ml) e, então, foi obtido o valor correspondente à quantidade de glutathiona total, a qual foi expressa em nmol de glutathiona por mg de proteína.

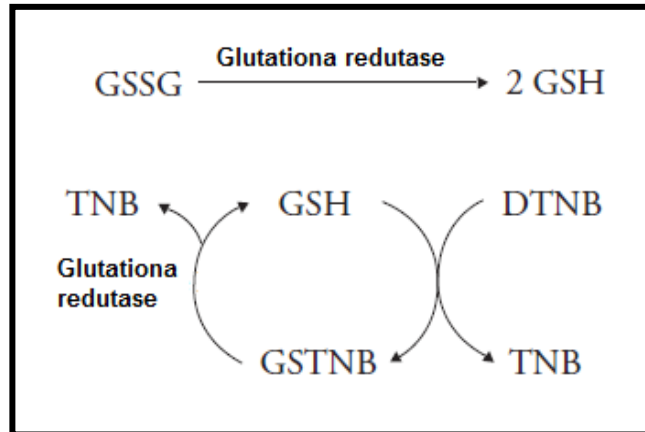


FIGURA 1. Reações químicas que ocorrem durante o método enzimático para quantificação da GSH total e GSSG (Cayman Chemical, <http://www.caymanchem.com/pdfs/703002.pdf>).

3.9. Análise de peroxidação lipídica: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica ocorre naturalmente no ambiente celular. Porém, em situações de injúria sua concentração tende a aumentar. Este aumento pode ser utilizado como indicativo de estresse oxidativo. Peróxidos de lipídeos, derivados de ácidos graxos poliinsaturados, são instáveis e se decompõem formando compostos, os quais incluem aqueles reativos a carbonil, tais como malondialdeído (MDA).

A aferição de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um método utilizado para monitorar a peroxidação lipídica, uma vez que o ácido tiobarbitúrico reage com o MDA. A reação ocorre a alta temperatura e em condições ácidas, sendo que seu produto pode ser detectado fluorimetricamente através de um comprimento de onda de excitação de 530 nm e em comprimento de onda de emissão de 550 nm (Figura 2).

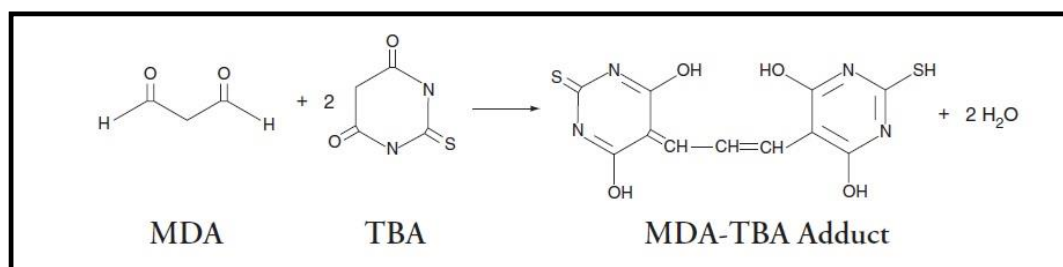


FIGURA 2. Reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com malondialdeído (MDA) levando à formação de produto fluorescente (MDA-TBA) (Adaptado de Cayman Chemical, <https://www.caymanchem.com/pdfs/10009055.pdf>).

No presente estudo, para a quantificação de TBARS utilizou-se protocolo adaptado de Esterbauer & Cheeseman (1990), Castilho et al. (1999) e do *kit* comercial *TBARS Assay kit* (Cayman Chemical, cat n°10009055). Primeiramente, após três dias de exposição aos tratamentos, as células foram descoladas das placas (60 cm²) utilizando *cell scraper* e, juntamente com o meio de cultura, transferidas para tubo falcon seguindo-se de centrifugação (4.000 g por 5 minutos a temperatura ambiente). Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* de células foi ressuspensão em 250 µl de tampão PBS (Vitrocell, cat n°1874). Retirou-se destes 250 µl, uma alíquota para dosagem de proteínas totais por método colorimétrico (Bradford, 1976; Sigma, cat n° B6916). Antes da dosagem, acrescentou-se 0.1% de Triton X100 (Sigma, cat n° T9284) e as amostras foram agitadas em vórtex. Para a realização do método de TBARS propriamente dito, para cada amostra dos grupos experimentais utilizaram-se 200 µl das células ressuspensas em PBS (Vitrocell, cat n° 1874) e acrescentaram-se 200 µl de ácido tiobarbitúrico (1%; Cayman Chemical, cat n° 10009055) preparado em NaOH (50 mM; Sigma, cat n° 221465), 100 µl de ácido fosfórico (20 %; Sigma, cat n° P6560), 20 µl de NaOH (10 M; Sigma, cat n° 221465) e 10 µl de hidroxitolueno butilato (BHT; Sigma, cat n° B1378; 53 mM). Em seguida, as amostras foram fervidas por 15 minutos e, imediatamente após, resfriadas sobre gelo. Adicionaram-se 500 µl de butanol (Sigma, cat n° BT105) seguindo-se de agitação em *vortex* e centrifugação (3.000 g por 5 minutos). Após, 150 µl da fase superior foram transferidos para uma placa escura de 96 poços para leitura de fluorescência (excitação 530 nm e emissão 550 nm, SpectraMax M3, Molecular Devices). Foi utilizado como controle positivo da reação o *tert*-butil hidroperóxido (Linden et al., 2008; 500 µM; Sigma, cat n° 458139) diluído em meio de cultura, por aproximadamente 5 horas, momento no qual foram identificadas alterações morfológicas celulares visíveis ao microscópio óptico.

Para o cálculo do MDA dos grupos experimentais, utilizou-se a equação da reta de uma curva padrão construída com concentrações conhecidas de MDA (Cayman Chemical, cat n° 10009055). O preparo desta curva padrão seguiu os mesmos passos descritos acima para as amostras experimentais.

Na curva padrão de MDA, os valores em μM foram representados no eixo X e as unidades arbitrárias de fluorescência de cada concentração, no eixo Y.

Os valores de concentração obtidos em μM foram divididos pela concentração de proteína total na amostra (mg/ml). Então, foi obtido o valor correspondente à quantidade de MDA, o qual foi expresso em nmol de MDA/mg de proteína. Após a normalização por quantidade de proteína, o grupo de células que recebeu apenas meio de cultura suplementado foi considerado como 100%.

3.10. Análise de proliferação celular: Western Blotting para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)

A análise de proliferação celular foi realizada nas células remanescentes após o último período de tratamento estudado (cinco dias).

Após cinco dias de exposição às drogas, as células foram descoladas das placas (60 cm^2) utilizando *cell scraper* e, juntamente com o meio de cultura, transferidas para tubo falcon seguindo-se de centrifugação (4.000 rpm por 5 minutos a 4°C). Posteriormente, após remoção do meio de cultura do sobrenadante, o *pellet* de células foi resuspenso em tampão de extração contendo 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% de Tween 20, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM vanadato de sódio (Na_3VO_4), 1mM fluoreto de sódio (NaF) e 1% de inibidor de protease (Sigma, cat nº P8340). As células foram, então, lisadas utilizando o método de sonicação em gelo (3 ciclos de 15s; MISONIX, Sonicator®3000, Farmingdale, NY, USA). Após, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 14.000 rpm e 4°C , o pellet descartado e a concentração de proteínas no sobrenadante foi determinada pelo método colorimétrico (Bradford Reagent, Sigma, cat nº B6916, St Louis, MO, USA) (Bradford, 1976). O volume das amostras a ser aplicado no gel de eletroforese foi calculado para que todas possuíssem igual concentração total de proteína. Após a realização do método colorimétrico, as amostras receberam igual volume de tampão (Laemmli, 1970) e foram armazenadas a -80°C .

Para a realização da técnica de Western Blotting, as amostras de proteínas com o tampão Laemmli foram mantidas por 5 minutos em água fervente. Dez microgramas de proteínas totais foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% com SDS. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose ($0.45\ \mu\text{m}$, Bio-Rad Laboratories, cat nº 162-0115, Hercules, CA, USA) a 120 V por 90 minutos (Towbin et al., 1979). Em seguida, a membrana foi corada com solução de Ponceau S (Sigma, cat nº P7170) para se verificar a qualidade da transferência e para confirmação da concentração de proteínas indicada pelo método colorimétrico. O corante foi removido através de lavagem da membrana com NaOH 0.1M por 1 minuto. A membrana foi lavada

rapidamente com PBS Tween (50 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.01% Tween 20) e seus sítios de ligações inespecíficas bloqueados com uma solução de 5% de leite em pó desnatado (0.5 g de leite em pó desnatado em 10 ml de solução de PBS Tween) por 1 hora. Após lavagem com PBS Tween para a remoção da solução de bloqueio, incubou-se a membrana com anticorpo primário anti-PCNA (1:1.000; BD Biosciences, cat n° 610665, Franklin Lakes, NJ, USA) diluído em 10 ml de tampão PBS-Tween contendo 3% albumina do soro bovino, por 12 horas a 4°C. A membrana de nitrocelulose foi lavada por 15 minutos com solução de PBS-Tween e incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:10.000; BD Biosciences, cat n° 554002, Franklin Lakes, NJ, USA) em 10 ml de PBS-Tween + 3% leite desnatado em pó, por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens (5 minutos cada) com PBS-Tween e as bandas imunorreativas foram detectadas através de fotodocumentador (UVITEC Cambridge), utilizando-se kit de quimioluminescência SuperSignal West Pico (Thermo Fisher Scientific, cat n° 34080). A densitometria das bandas foi quantificada utilizando-se o software Image J (version 1.49V). A dosagem de proteínas feita através do método de Bradford foi confirmada pela coloração das proteínas totais das membranas com Ponceau S USBTM. Desta forma, a coloração com Ponceau S permitiu o emprego do valor da densitometria óptica de todas as proteínas detectadas na membrana como um controle interno (Romero-Calvo et al., 2010; Ignarro et al., 2013). O emprego de tal controle interno objetivou a correção de possíveis variações da técnica utilizada para quantificação protéica e/ou durante pipetagens das amostras. Assim, para cada amostra, o valor da densidade óptica da banda correspondente à proteína PCNA foi dividido pelo valor da densidade óptica obtido através da coloração por Ponceau S. Posteriormente a esta normalização pelo controle interno, o valor do grupo de células que recebeu apenas meio de cultura suplementado, foi considerado como 100%.

3.11. Análise estatística

Nas análises de morte celular, PCR em tempo real, glutatona total, peroxidação lipídica e proliferação celular, os grupos experimentais foram comparados entre si em um mesmo período pós-incubação. Utilizou-se o teste estatístico ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni para comparações múltiplas (GraphPad Prism 5). Considerou-se diferença estatisticamente significativa $p < 0.05$.

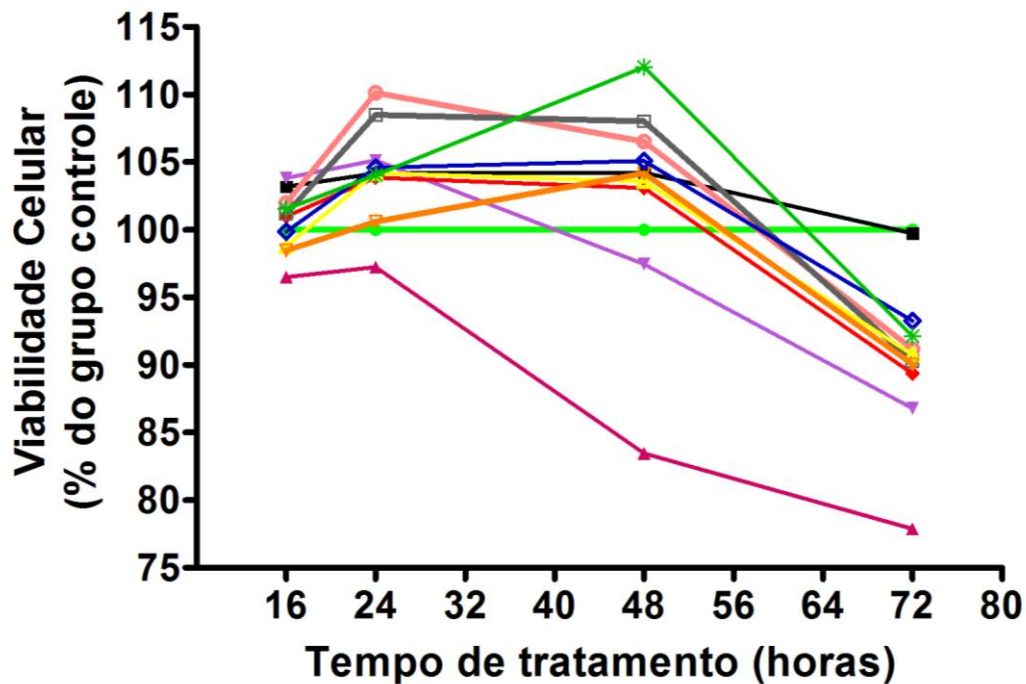
4. RESULTADOS

4.1. Análise de viabilidade celular após administração de temozolamida

A fim de se determinar as concentrações do quimioterápico temozolamida (TMZ) a serem empregadas em combinação com sulfasalazina, foi construída curva dose-resposta com células da linhagem U87MG expostas à TMZ por 16, 24, 48 ou 72 horas. Optou-se por esta linhagem pelo fato de ser reconhecidamente sensível a TMZ e amplamente empregada em diversos protocolos de estudo de células de glioma de alto grau *in vitro*. Além disso, as concentrações testadas (de 1.57 μM a 400 μM) foram definidas levando-se em consideração valores utilizados por outros grupos de pesquisa (Gabelloni et al., 2010; Barazzuol et al., 2012, Happold et al., 2012) e o fato de a concentração final máxima de DMSO no meio de cultura utilizado para o tratamento não ultrapassar 0.1%. Tal concentração final de DMSO foi estabelecida em função de experimentos prévios de outros pesquisadores evidenciarem efeito citotóxico do DMSO em concentrações maiores (Barazzuol et al., 2012; Tentori et al., 2014).

O tratamento com TMZ levou a redução do percentual de células viáveis após 72 horas de exposição. No entanto, após cada período de exposição estudado, não houve diferença significativa na viabilidade celular entre os grupos tratados com TMZ. Além disso, o uso de DMSO como veículo de diluição na concentração de 0.1% não alterou a viabilidade das células neoplásicas, comparado especificamente com o grupo controle tratado apenas com meio de cultura suplementado (Figura 3 e Tabela 1).

Linhagem U87MG



— D+C — DMSO 0.1% — TMZ 1.57 µM — TMZ 3.125 µM — TMZ 6.25 µM — TMZ 12.5 µM
 — TMZ 25 µM — TMZ 50 µM — TMZ 100 µM — TMZ 200 µM — TMZ 400 µM

FIGURA 3. Viabilidade da linhagem de glioblastoma humano U87MG após 16, 24, 48 ou 72 horas de tratamento com temozolamida (TMZ). O tratamento com TMZ diminuiu o percentual de células viáveis após 72 horas de exposição. Porém, após cada tempo de exposição, não houve redução significativa da viabilidade celular entre os diferentes grupos tratados. A viabilidade celular foi avaliada através de teste colorimétrico (redução do composto MTT). Os valores estão expressos como porcentagem de redução de MTT em relação às células expostas apenas a meio de cultura suplementado (100%: controle). D+C: células expostas apenas a meio de cultura suplementado. DMSO 0.1%: células tratadas apenas com veículo de diluição da TMZ diluído em meio de cultura suplementado. Os valores de viabilidade celular apresentados no gráfico representam a média de três experimentos independentes com seis amostras individuais cada um. O erro padrão da média foi omitido do gráfico para facilitar a visualização dos diversos grupos em conjunto. ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni, realizado após cada período de incubação.

VIABILIDADE DA LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA HUMANO U87MG APÓS TRATAMENTO COM TEMOZOLAMIDA

Viabilidade Celular (% do grupo controle)				
Grupos Experimentais	16 horas	Erro padrão	72 horas	Erro padrão
D+C	100.0	0	100.0	0
DMSO 0.1%	103.2	3.75	99.7	2.90
1.57 µM	99.9	5.80	93.3	5.83
3.125 µM	98.5	7.98	90.1	5.16
6.25 µM	101.5	3.13	92.1	1.69
12.5 µM	98.8	12.45	90.8	5.60
25 µM	101.2	9.56	90.3	5.79
50 µM	102.0	10.31	91.2	6.38
100 µM	101.0	9.33	89.4	6.86
200 µM	103.8	9.42	86.8	5.46
400 µM	96.5	8.25	77.9	7.32

TABELA 1. Viabilidade da linhagem de glioblastoma humano U87MG após 16 ou 72 horas de tratamento com temozolamida (TMZ). O tratamento das células U87MG com temozolamida reduziu a viabilidade celular após 72 horas de tratamento, porém não houve diferença estatística entre os grupos tratados. Vide legenda da Figura 1 para informações sobre grupos experimentais e análise estatística.

4.2. Análise de viabilidade celular após administração de sulfasalazina

De maneira análoga ao tratamento com TMZ, avaliamos a viabilidade das células após exposição a diferentes concentrações de sulfasalazina (SAS) por 1, 3 ou 5 dias. Para esta avaliação, utilizamos todas as linhagens celulares devido à menor disponibilidade de dados na literatura sobre o efeito da SAS em células de glioma. As concentrações empregadas (0.25 mM, 0.5 mM e 1 mM) foram baseadas nos estudos de Robe et al. (2004) e Chung e Sontheimer (2009).

Em todas as linhagens, após os três tempos de tratamento avaliados, a viabilidade do grupo composto por células cultivadas apenas em meio suplementado, não diferiu daquela das células expostas ao meio suplementado contendo o veículo de diluição da SAS. Desta forma, os demais grupos experimentais foram sempre comparados estatisticamente com o grupo que recebeu o veículo. Os resultados específicos de cada linhagem celular estão descritos nos próximos itens.

4.2.1. Linhagem U87MG

A concentração de 0.25 mM não apresentou efeito sobre a viabilidade celular após 5 dias de tratamento, em comparação com as células expostas apenas ao meio de cultura ou ao meio contendo veículo de diluição da droga (NaOH 0.2M, HCl 0.2M e água). Por outro lado, a concentração de 0.5 mM de SAS reduziu a viabilidade celular no terceiro e quinto dias de tratamento em 43% e 57%, respectivamente. Por fim, a concentração de 1 mM reduziu a viabilidade celular em 36%, 68% e 90%, após 1, 3 e 5 dias de exposição, respectivamente (Figura 4).

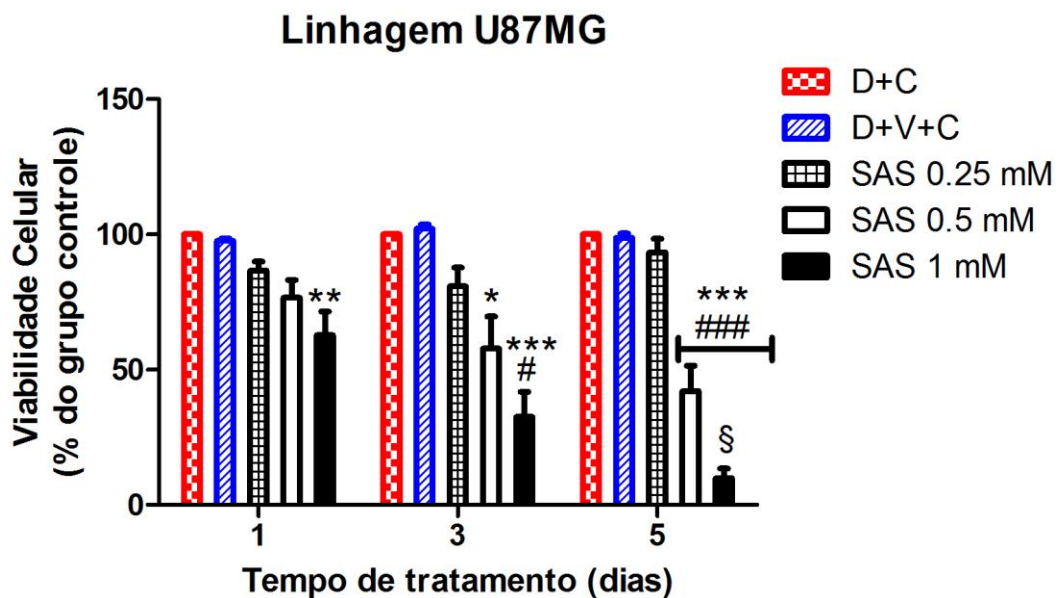


FIGURA 4. Viabilidade da linhagem de glioblastoma humano U87MG após 1, 3 ou 5 dias de tratamento com sulfasalazina (SAS). O tratamento com SAS reduziu a viabilidade celular de maneira dose-dependente. A viabilidade celular foi avaliada pela redução do composto MTT. Valores expressos em porcentagens de redução de MTT em relação às células expostas apenas a meio de cultura suplementado (100%; controle). D+C: células expostas apenas a meio de cultura suplementado; D+V+C: células em meio de cultura contendo o veículo de diluição (NaOH 0.2M, HCl 0.2M e água). Os símbolos *, #, e § indicam diferença em relação aos grupos D+V+C, SAS 0.25 mM e SAS 0.5 mM, respectivamente. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Um, dois e três símbolo(s) indica(m) $p < 0.05$, $p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectivamente. ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni, realizado após cada período de incubação.

4.2.2. Linhagem A172

A concentração de 0.25 mM não alterou a viabilidade celular em nenhum dos tempos estudados. Ao contrário, a concentração de 0.5 mM diminuiu a viabilidade celular após três e cinco dias de tratamento (redução de 36% e 39%, respectivamente). Por sua vez, após um dia de tratamento com 1 mM, observamos redução da viabilidade de 46%, em relação ao grupo veículo. Este efeito se intensificou após três e cinco dias de incubação (redução de 91% e 100%, respectivamente) (Figura 5).

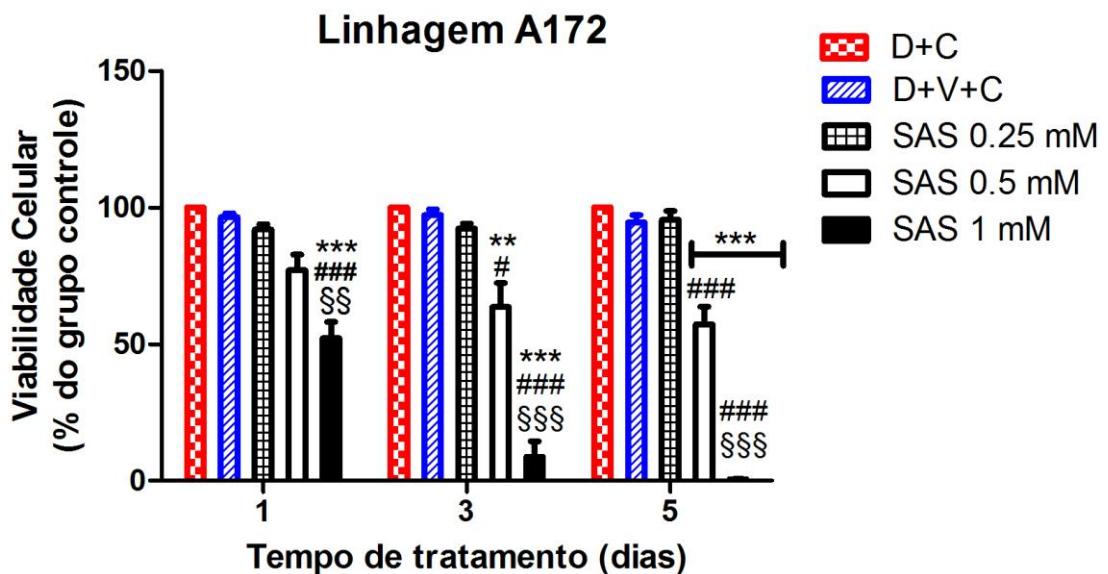


FIGURA 5. Viabilidade da linhagem de glioblastoma humano A172 após 1, 3 ou 5 dias de tratamento com sulfasalazina (SAS). O tratamento com SAS reduziu a viabilidade celular de maneira dose-dependente. A viabilidade celular foi avaliada pela redução do composto MTT. Valores expressos em porcentagens de redução de MTT em relação às células expostas apenas a meio de cultura suplementado (100%; controle). D+C: células expostas apenas a meio de cultura suplementado; D+V+C: células em meio de cultura contendo o veículo de diluição (NaOH 0.2M, HCl 0.2M e água). Os símbolos *, #, e § indicam diferença em relação aos grupos D+V+C, SAS 0.25 mM e SAS 0.5 mM, respectivamente. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Um, dois e três símbolo(s) indica(m) $p < 0.05$, $p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectivamente. ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni, realizado após cada período de incubação.

4.2.3. Linhagem T98G

A concentração de 0.25 mM não modificou a viabilidade celular em nenhum dos períodos avaliados. No entanto, a concentração de 0.5 mM reduziu em 25% a viabilidade após 5 dias de tratamento, em comparação com o grupo veículo. O grupo tratado com 1 mM apresentou diferenças em relação aos demais grupos, nos três tempos estudados. Especificamente, após 1, 3 e 5 dias, causou diminuição de 17%, 63% e 86% da viabilidade, respectivamente, em relação ao grupo veículo (Figura 6).

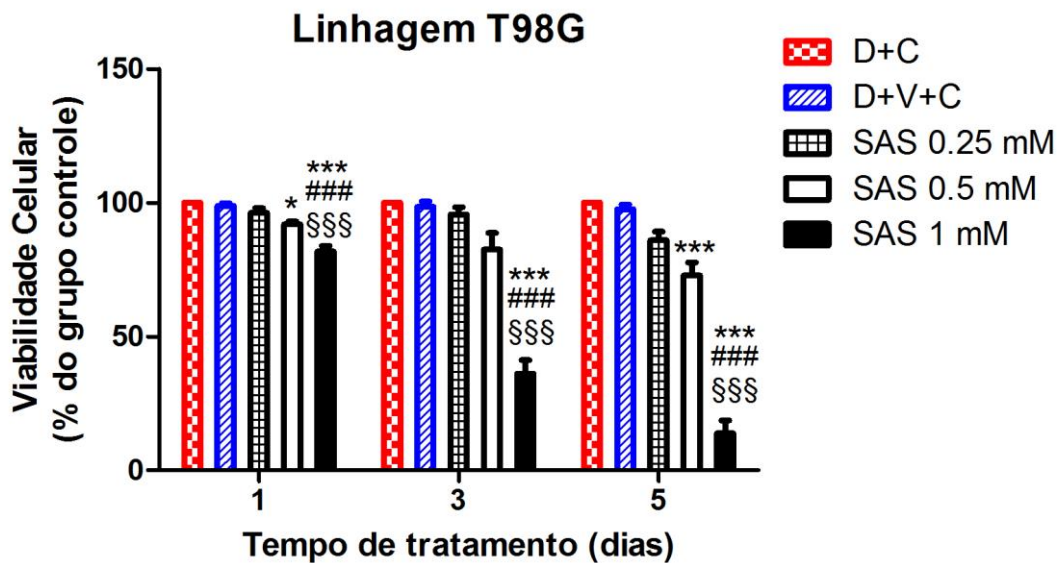


FIGURA 6. Viabilidade da linhagem de glioblastoma humano T98G após 1, 3 ou 5 dias de tratamento com sulfasalazina (SAS). O tratamento com SAS reduziu a viabilidade celular, a qual foi avaliada pela redução do composto MTT. Valores expressos em porcentagens de redução de MTT em relação às células expostas apenas a meio de cultura suplementado (100%; controle). D+C: células expostas apenas a meio de cultura suplementado; D+V+C: células em meio de cultura contendo o veículo de diluição (NaOH 0.2M, HCl 0.2M e água). Símbolos *, #, e § indicam diferença em relação aos grupos D+V+C, SAS 0.25 mM e SAS 0.5 mM, respectivamente. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de seis experimentos independentes realizados em triplicata. Um, dois e três símbolo(s) indica(m) $p < 0.05$, $p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectivamente. ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni, realizado após cada período de incubação.

4.2.4. Linhagem C6

Observamos que esta linhagem foi extremamente sensível às concentrações de 0.5 e 1 mM de SAS nos três intervalos de tempo estudados. De fato, quase não se detectou viabilidade nos grupos que receberam cada um destes tratamentos, em comparação com o grupo veículo ou tratado com 0.25 mM. Com relação à concentração de 0.25 mM, houve discreta redução da viabilidade em comparação ao grupo veículo, após um ou três dias de tratamento (12% e 9.4%, respectivamente). Entretanto, após cinco dias, este efeito não foi verificado, sendo a viabilidade do grupo 0.25 mM similar àquela do veículo (Figura 7).

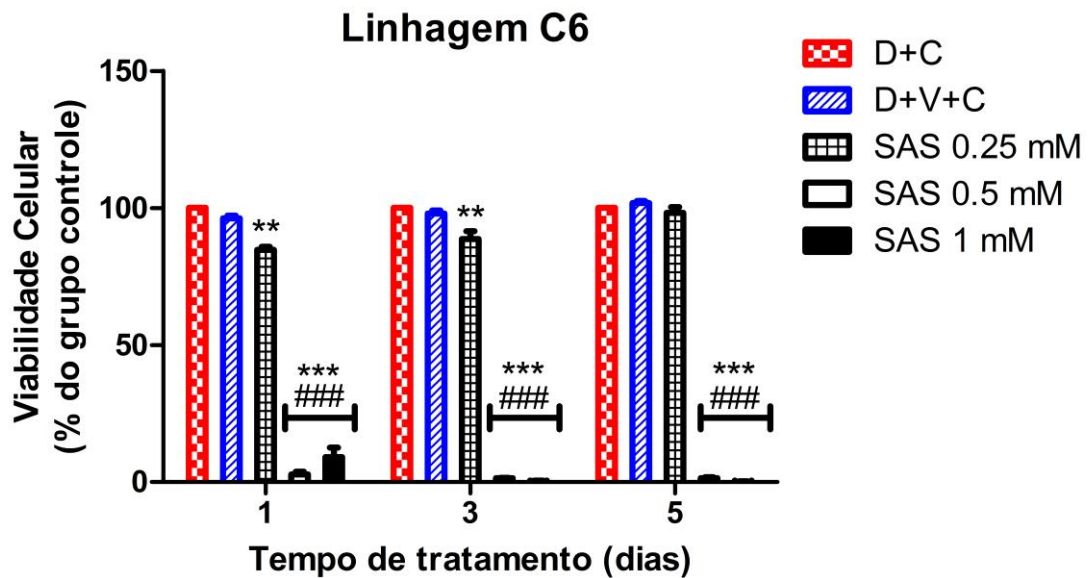


FIGURA 7. Viabilidade da linhagem de glioma de rato C6 após 1, 3 ou 5 dias de tratamento com sulfasalazina (SAS). As células C6 mostraram particular sensibilidade a esta droga, sendo virtualmente impossível detectar a viabilidade das células expostas a 0.5 mM e 1 mM por três ou cinco dias. A viabilidade celular foi avaliada pela redução do composto MTT. Valores expressos em porcentagens de redução de MTT em relação às células expostas apenas a meio de cultura suplementado (100%; controle). D+C: células expostas apenas a meio de cultura suplementado; D+V+C: células em meio de cultura contendo o veículo de diluição (NaOH 0.2M, HCl 0.2M e água). Símbolos * e #, indicam diferença em relação aos grupos D+V+C e SAS 0.25 mM, respectivamente. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Um, dois e três símbolo(s) indica(m) $p < 0.05$, $p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectivamente. ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni, realizado após cada período de incubação.

4.3. Análise de viabilidade celular após administração de temozolamida associada com sulfasalazina

Em função dos resultados apresentados no item 4.1, optamos por utilizar as concentrações de 25 μM e 50 μM de temozolamida (TMZ) nos experimentos em que esta droga foi associada com sulfasalazina (SAS). Além de nossos resultados não terem mostrado diferença entre as concentrações testadas de TMZ, dados da literatura sobre a farmacocinética desta droga no plasma e líquido de pacientes com glioma de alto grau, em tratamento quimioterápico, evidenciaram que as concentrações de 25 μM e 50 μM in vitro correspondem, respectivamente, às concentrações plasmáticas utilizadas nas fases concomitante (à radioterapia; 75 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$) e adjuvante (após cirurgia e radioterapia; 150 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$) (Ostermann et al., 2004; Barazzuol et al., 2012).

Com relação à SAS, cujos resultados da administração são apresentados no item 3.2, definimos as concentrações de 0.25 mM e 0.5 mM para serem usadas em associação com TMZ. Especificamente, consideramos que a concentração de 1.0 mM de SAS poderia dificultar ou impedir a identificação de efeito sinérgico entre as duas drogas. De fato, a viabilidade de todas as linhagens, principalmente A172 e C6, foi sensivelmente reduzida após cinco dias de tratamento com esta última concentração.

A seguir, são apresentados os resultados das concentrações de TMZ e SAS utilizadas em associação nas diferentes linhagens estudadas. Em todas as linhagens, após os três tempos de tratamento avaliados, a viabilidade do grupo composto por células cultivadas apenas em meio suplementado, não diferiu daquela das células expostas ao meio suplementado contendo o veículo de diluição da TMZ (DMSO 0.1%). Desta forma, os demais grupos experimentais foram sempre comparados estatisticamente com o grupo que recebeu tal veículo. Os resultados específicos de cada linhagem celular estão descritos nos próximos itens.

4.3.1. Linhagem U87MG

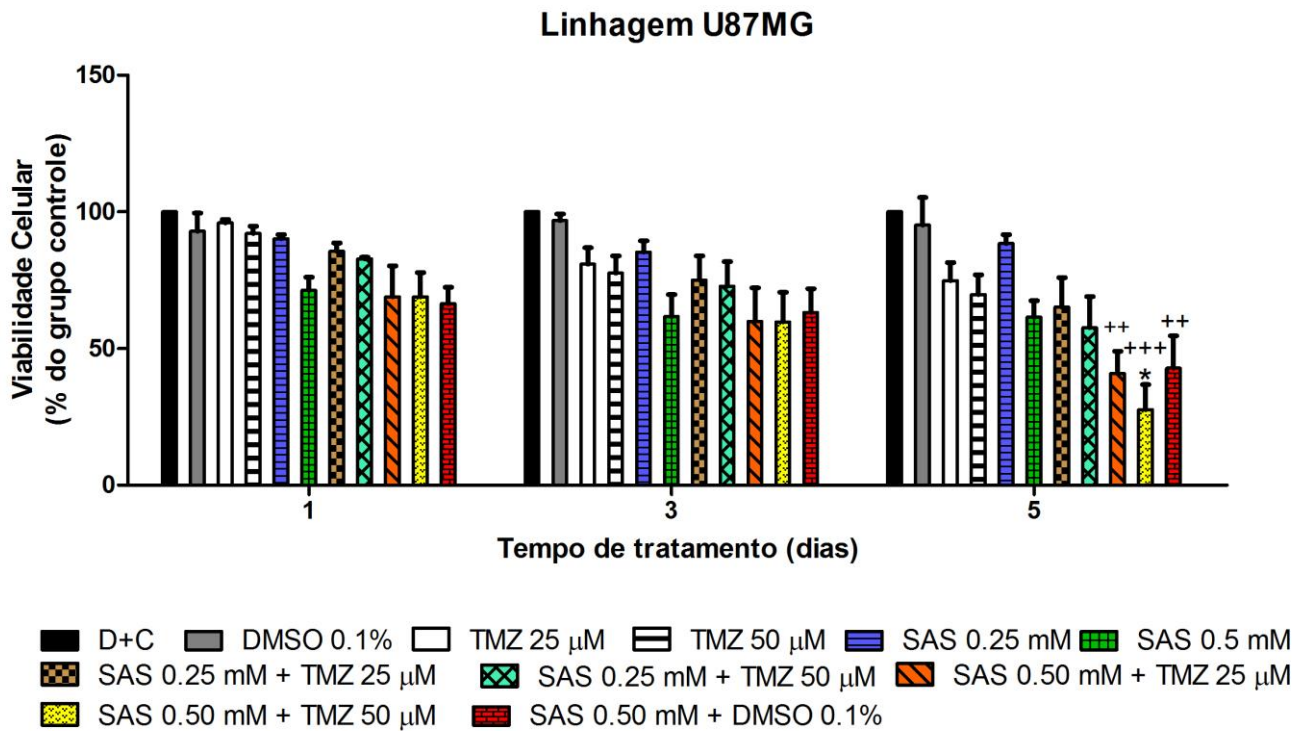
Após um ou três dias de exposição à TMZ e/ou SAS, não foi observada diferença entre todos os grupos experimentais estudados. Por outro lado, após cinco dias de tratamento farmacológico, a associação de TMZ 25 μM com SAS 0.50 mM levou a diminuição de cerca de 57% do crescimento celular em relação ao grupo tratado apenas com DMSO. De maneira semelhante, a adição de TMZ 50 μM a SAS 0.50 mM causou redução de 71% na viabilidade em relação ao grupo veículo.

Uma vez que a TMZ é o quimioterápico padrão utilizado no tratamento de pacientes com gliomas de alto grau, as associações de drogas foram comparadas também em relação a TMZ 25 μM ou TMZ 50 μM administradas isoladamente. Porém, apenas o grupo que recebeu TMZ 50 μM e SAS

0.5 mM demonstrou redução significativa de 63% em relação ao grupo TMZ 25 μ M. Especificamente, não foi detectada diferença entre a diminuição da viabilidade celular determinada pela associação TMZ 25 μ M e SAS 0.50 mM e aquela induzida por TMZ 50 μ M e SAS 0.5 mM (Figura 8).

Finalmente, foi testada possível ação de DMSO 0.1% sobre a viabilidade celular quando associado com SAS. Deste modo, o grupo tratado com SAS 0.5 mM foi comparado com outro que recebeu SAS 0.5 mM e DMSO 0.1%. Porém não foi encontrada diferença estatística nesta comparação (Figura 8).

Ainda que as características morfológicas das células tenham sido avaliadas diariamente, sua documentação foi realizada no quinto dia de tratamento, momento em que foram melhor identificadas as diferenças na densidade e nos aspectos celulares. Os grupos expostos apenas a meio de cultura suplementado, com ou sem DMSO, atingiram alta confluência (ao redor de 100%). As células tratadas com TMZ 25 μ M, SAS 0.5 mM e TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM apresentaram redução da densidade, mais evidente nos dois últimos tratamentos. Nestes, devido ao espaçamento entre as células, foi possível identificar abundantes processos celulares ramificados, com diminuição gradual do calibre no sentido distal (Figura 9).



Linhagem U87MG			
Dia 5	DMSO 0.1% (+)	TMZ 25 µM (*)	TMZ 50 µM
SAS 0.5 mM	ns	ns	ns
TMZ 50 µM + SAS 0.25 mM	ns	ns	ns
TMZ 25 µM + SAS 0.5 mM	57%	ns	ns
TMZ 50 µM + SAS 0.5 mM	71%	63%	ns

FIGURA 8. Viabilidade da linhagem de glioblastoma humano U87MG após 1, 3 ou 5 dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). A viabilidade celular foi avaliada pela redução do composto MTT. Após cada período de incubação, os valores estão expressos como porcentagem de redução de MTT em relação ao grupo que recebeu meio de cultura suplementado (D+C: grupo controle; 100%). DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado com o veículo de diluição da TMZ. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. As diferenças significativas em relação ao grupo DMSO 0.1% são indicadas por +. Em relação ao grupo TMZ 25 µM, a diferença significativa, está indicada por *. Um, dois e três símbolo(s) indica(m) $p < 0.05$, $p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectivamente. ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni. A tabela mostra diminuição da viabilidade celular (%) 5 dias após exposições a SAS e/ou TMZ, quando houve diferença estatística em relação aos grupos DMSO 0.1%, TMZ 25 µM ou TMZ 50 µM. Ns: sem diferença estatística.

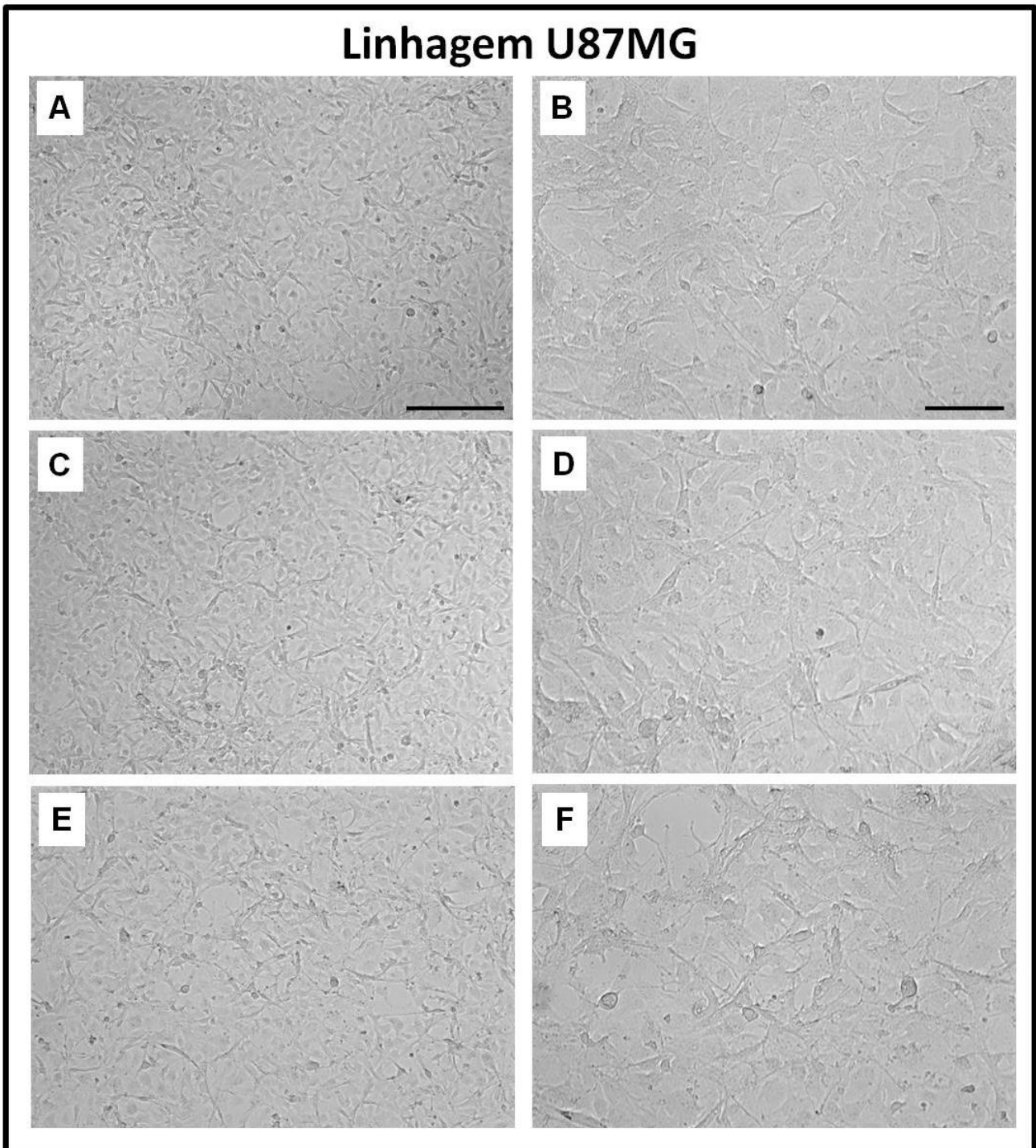


FIGURA 9. Características morfológicas das células de glioblastoma da linhagem U87MG após cinco dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Células expostas a meio de cultura suplementado apenas (A e B) ou contendo DMSO (C e D) apresentam alta confluência. Grupos tratados com TMZ 25 μ M (E e F), SAS 0.5 mM (G e H) ou TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM (I e J). Regiões apresentando menor confluência permitem visualização dos astrócitos neoplásicos em monocamada, exibindo numerosos prolongamentos citoplasmáticos ramificados. As imagens da direita são aumentos daquelas da esquerda. Barras: 250 μ m (A, C, E, G e I) e 100 μ m (B, D, F, H e J).

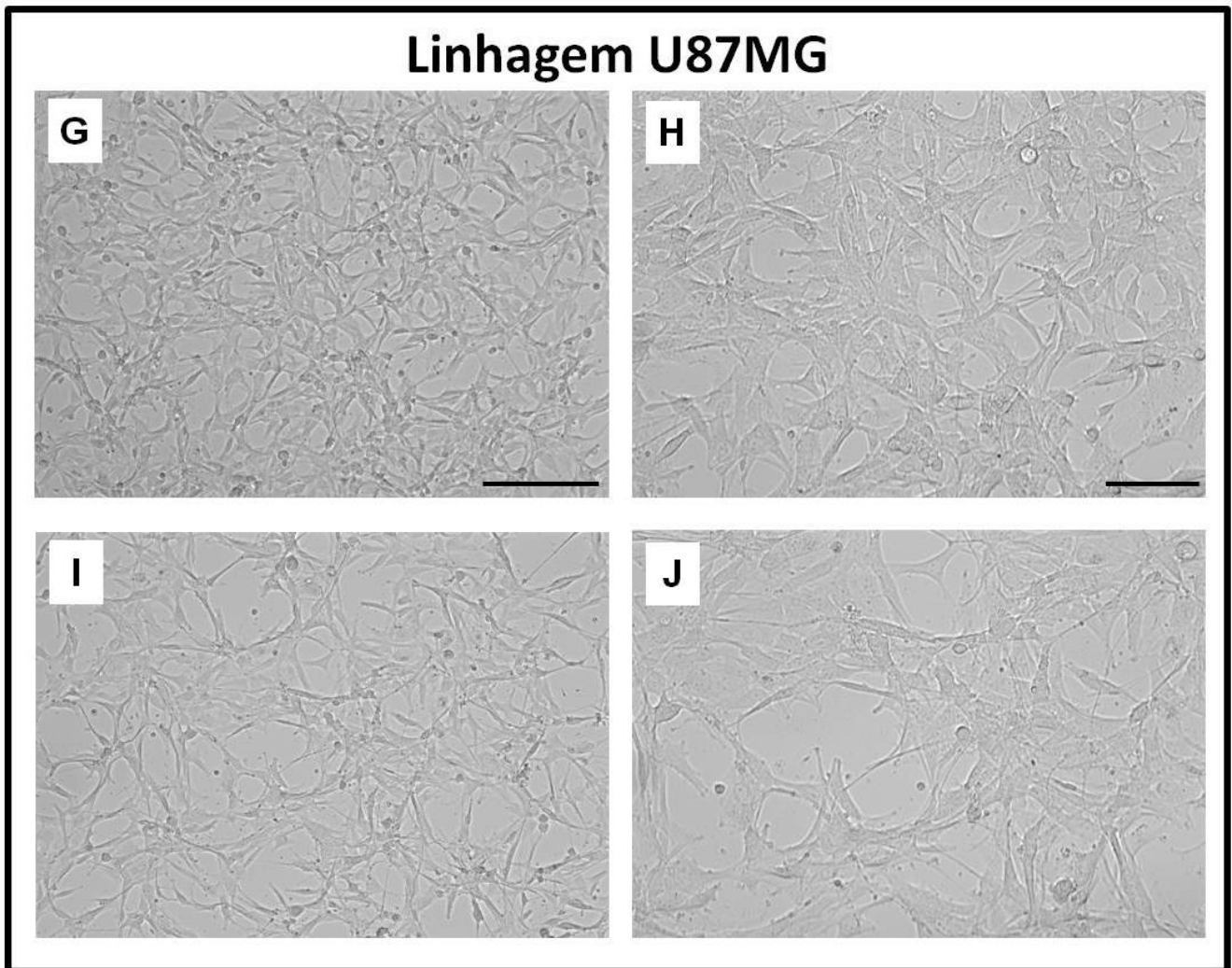


FIGURA 9. Continuação. Características morfológicas das células de glioblastoma da linhagem U87MG após cinco dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Células expostas a meio de cultura suplementado apenas (A e B) ou contendo DMSO (C e D) apresentam alta confluência. Grupos tratados com TMZ 25 μ M (E e F), SAS 0.5 mM (G e H) ou TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM (I e J). Regiões apresentando menor confluência permitem visualização dos astrócitos neoplásicos em monocamada, exibindo numerosos prolongamentos citoplasmáticos ramificados. As imagens da direita são aumentos daquelas da esquerda. Barras: 250 μ m (A, C, E, G e I) e 100 μ m (B, D, F, H e J).

4.3.2. Linhagem A172

Após 24 horas de tratamento, a TMZ não alterou a viabilidade celular. Porém, a associação de TMZ 50 μM com SAS 0.5 mM reduziu a viabilidade celular em 48%, em relação ao grupo veículo (DMSO 0.1%). O efeito de diminuição da viabilidade deste grupo se intensificou nos tempos de 3 e 5 dias de tratamento, atingindo 59% e 76%, respectivamente (Figura 10).

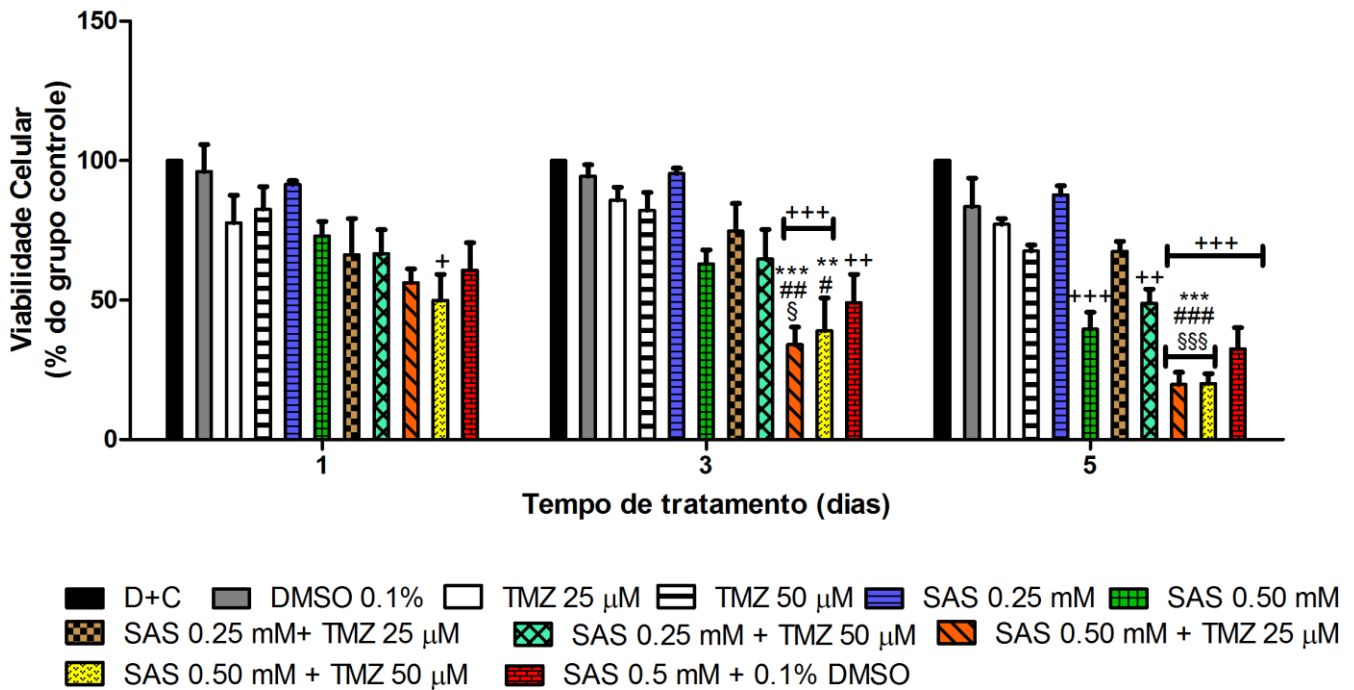
Após três dias de tratamento, ainda que a administração de TMZ nas concentrações de 25 ou 50 μM não tenha alterado a viabilidade celular, verificamos que a adição de 0.5 mM de SAS à TMZ 25 μM levou à redução de 64% em relação ao grupo veículo. Além disso, a adição de 0.5 mM de SAS à TMZ 50 μM causou efeito semelhante: diminuição de 59%. Além da já mencionada comparação de todos os grupos com relação àquele que recebeu apenas veículo da TMZ em meio suplementado, as associações de drogas foram comparadas também com TMZ 25 μM ou TMZ 50 μM . Após três dias de incubação, a associação de TMZ 25 μM com SAS 0.5 mM e aquela de TMZ 50 μM com SAS 0.5 mM reduziram a viabilidade celular tanto em relação a TMZ 25 μM quanto em relação a TMZ 50 μM , em porcentagens variando de 53 a 60% (Figura 10). Finalmente, as associações de drogas foram comparadas entre si. As condições que apresentaram diferença estatística são mostradas na Figura 10.

Após cinco dias de tratamento, a administração isolada de SAS 0.5 mM reduziu significativamente a viabilidade celular em 53% em relação ao grupo veículo (DMSO 0.1%). Já a TMZ nas concentrações de 25 μM ou 50 μM continuou a não provocar alterações significativas na viabilidade. Todas as associações, com exceção de TMZ 25 μM em conjunto com SAS 0.25 mM, reduziram significativamente o crescimento celular em relação ao grupo veículo em porcentagens que variaram de 41 a 76%. Além disso, em comparação com TMZ nas concentrações de 25 μM ou 50 μM , as associações de TMZ 25 μM com SAS 0.5 mM e de TMZ 50 μM com SAS 0.5 mM diminuíram a viabilidade celular em cerca de 70% (Figura 10).

As comparações significativas entre os grupos compostos por associação de drogas estão mostradas na Figura 10. Especificamente, após cinco dias, os grupos que receberam TMZ 25 μM com SAS 0.50 mM ou TMZ 50 μM com SAS 0.50 mM exibiram redução de cerca de 71% na viabilidade, em relação ao grupo que recebeu a associação TMZ 25 μM com SAS 0.25 mM. Porém, os grupos tratados com TMZ 25 μM e SAS 0.50 mM ou com TMZ 50 μM e SAS 0.50 mM não diferiram estatisticamente entre si. É importante ressaltar que nos três períodos analisados, não houve diferença com relação à viabilidade dos grupos que receberam SAS 0.5 mM ou SAS 0.5 mM em meio suplementado contendo DMSO 0.1%. Tal fato mostra que não houve efeito do veículo de diluição da TMZ quando associado à SAS.

Sobre as características morfológicas após cinco dias de tratamento, observamos que os grupos que receberam apenas meio de cultura suplementado, contendo ou não DMSO, apresentaram alta confluência (cerca de 100%). Particularmente, não foram identificados espaços livres entre as células e, em algumas regiões da placa, notou-se crescimento em mais de uma camada. Por sua vez, o grupo tratado com TMZ 25 μ M apresentou densidade celular menor em relação aos dois primeiros grupos. Os tratamentos com SAS 0.5 mM e TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM levaram a redução ainda maior da densidade celular, em relação aos demais grupos. Especificamente, nos grupos em que se observou menor densidade celular, foi possível avaliar melhor as características morfológicas das células residuais. Particularmente, estas apresentaram formato estrelado, com grande número de prolongamentos citoplasmáticos ramificados e afilados (Figura 11).

Linhagem A172



Linhagem A172				
Dia 1	DMSO 0.1% (+)	TMZ 25 µM (*)	TMZ 50 µM (#)	TMZ 25 µM + SAS 0.25 mM (§)
TMZ 50 µM + SAS 0.5 mM	48%	ns	ns	ns
Dia 3				
TMZ 25 µM + SAS 0.5 mM	64%	60%	59%	54%
TMZ 50 µM + SAS 0.5 mM	59%	55%	53%	ns
Dia 5				
SAS 0.5 mM	53%	ns	ns	ns
TMZ 50 µM + SAS 0.25 mM	41%	ns	ns	ns
TMZ 25 µM + SAS 0.5 mM	76%	74%	71%	71%
TMZ 50 µM + SAS 0.5 mM	76%	74%	71%	71%

FIGURA 10. Viabilidade da linhagem de glioblastoma humano A172 após 1, 3 ou 5 dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). A viabilidade celular foi avaliada pela redução do composto MTT. Após cada período de incubação, os valores estão expressos como porcentagem de redução de MTT em relação ao grupo que recebeu meio de cultura suplementado (D+C: grupo controle; 100%). DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado com o veículo de diluição da TMZ. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. As diferenças significativas em relação ao grupo DMSO 0.1% são indicadas por +. Em relação aos grupos TMZ 25 µM e TMZ 50 µM, as diferenças significativas, estão indicadas por * e #, respectivamente. O símbolo § indica diferença em relação ao grupo TMZ 25 µM + SAS 0.25 mM. Um, dois e três símbolo(s) indica(m) $p < 0.05$, $p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectivamente. ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni. A tabela mostra diminuição da viabilidade celular (%) 1, 3 ou 5 dias após exposições a SAS e/ou TMZ, quando houve diferença estatística em relação aos grupos DMSO 0.1%, TMZ 25 µM, TMZ 50 µM ou TMZ 25 µM + SAS 0.25 mM. Ns: sem diferença estatística.

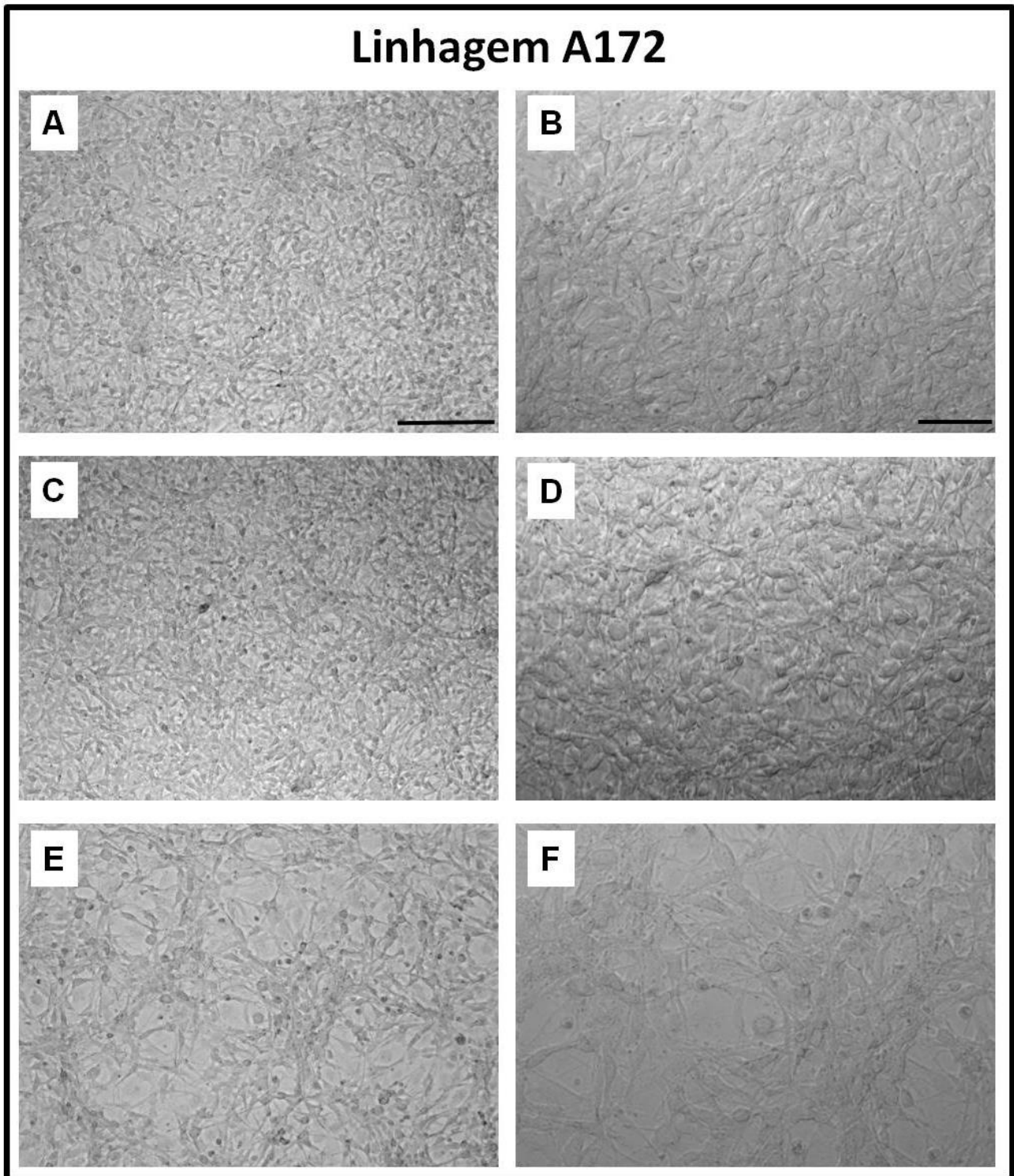


FIGURA 11. Características morfológicas das células de glioblastoma da linhagem A172 após cinco dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Células expostas a meio de cultura suplementado apenas (A e B) ou contendo DMSO (C e D) apresentam alta confluência. Grupos tratados com TMZ 25 μ M (E e F), SAS 0.5 mM (G e H) ou TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM (I e J). Áreas com menor confluência evidenciam aspecto estrelado das células, lembrando a origem astrocitária da neoplasia. As imagens da direita são aumentos daquelas da esquerda. Barras: 250 μ m (A, C, E, G e I) e 100 μ m (B, D, F, H e J).

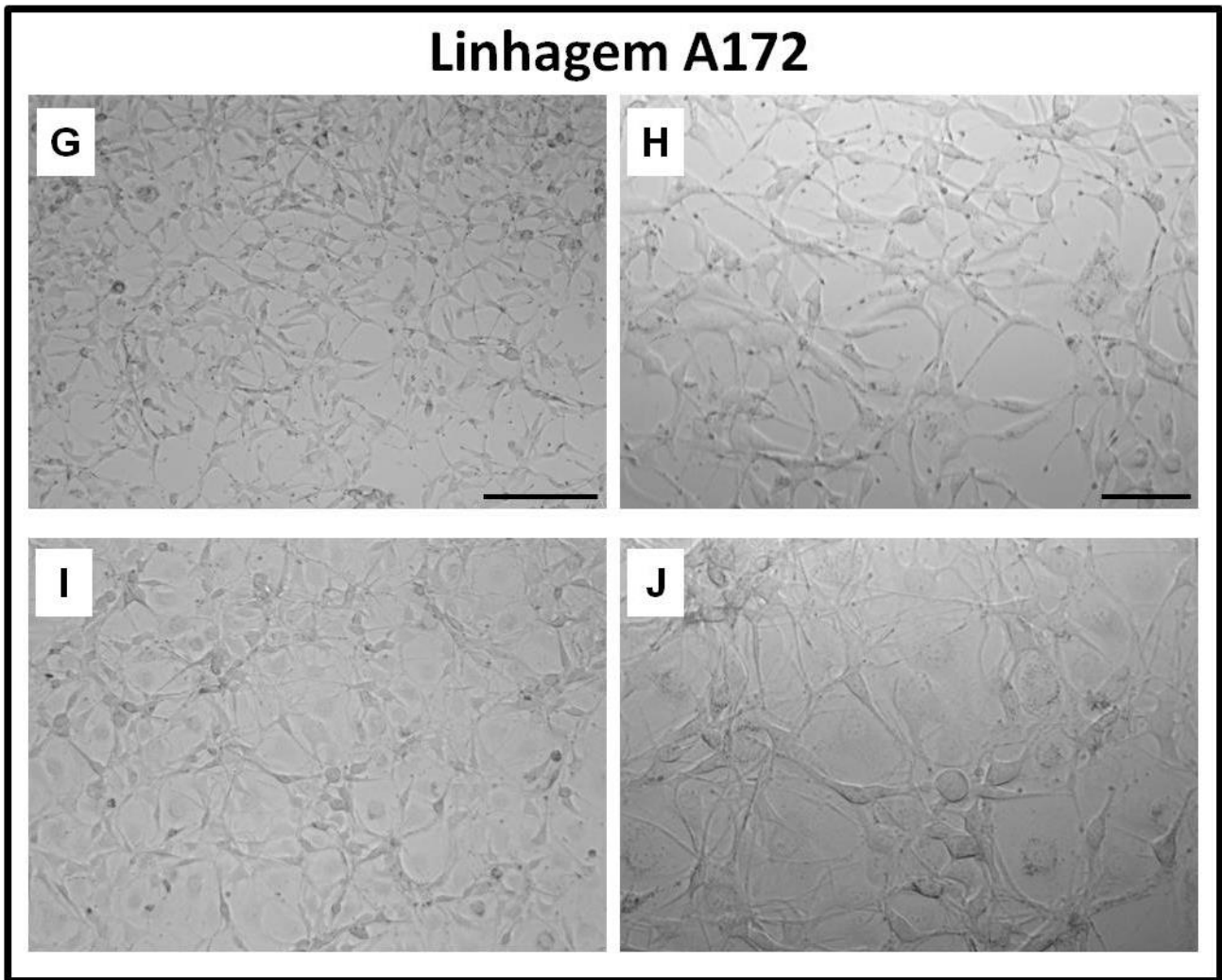


FIGURA 11. Continuação. Características morfológicas das células de glioblastoma da linhagem A172 após cinco dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Células expostas a meio de cultura suplementado apenas (A e B) ou contendo DMSO (C e D) apresentam alta confluência. Grupos tratados com TMZ 25 μM (E e F), SAS 0.5 mM (G e H) ou TMZ 25 μM + SAS 0.5 mM (I e J). Áreas com menor confluência evidenciam aspecto estrelado das células, lembrando a origem astrocitária da neoplasia. As imagens da direita são aumentos daquelas da esquerda. Barras: 250 μm (A, C, E, G e I) e 100 μm (B, D, F, H e J).

4.3.3. Linhagem T98G

A linhagem de glioblastoma humano T98G se mostrou resistente ao tratamento com TMZ e SAS, isoladas ou em associação, durante todo o período estudado. Assim como a análise de viabilidade celular das outras linhagens, todos os grupos experimentais foram comparados em relação ao grupo veículo do respectivo tempo de incubação. Além disso, as associações de drogas foram comparadas em relação à TMZ 25 μM , à TMZ 50 μM e entre si. Porém, nenhuma destas comparações apresentou diferença estatística (Figura 12).

Após cinco dias de incubação, não foram observadas diferenças morfológicas entre os grupos experimentais, sendo a confluência celular ao redor de 100%. Em específico, apenas nas placas das células que receberam SAS 0.5 mM foram identificados raros espaços vazios, irregularmente distribuídos pela superfície. Diferentemente das linhagens U87MG e A172, as células T98G apresentaram formato poligonal, dispuseram-se uma adjacente a outra, em monocamada, e não foram identificados prolongamentos citoplasmáticos (Figura 13).

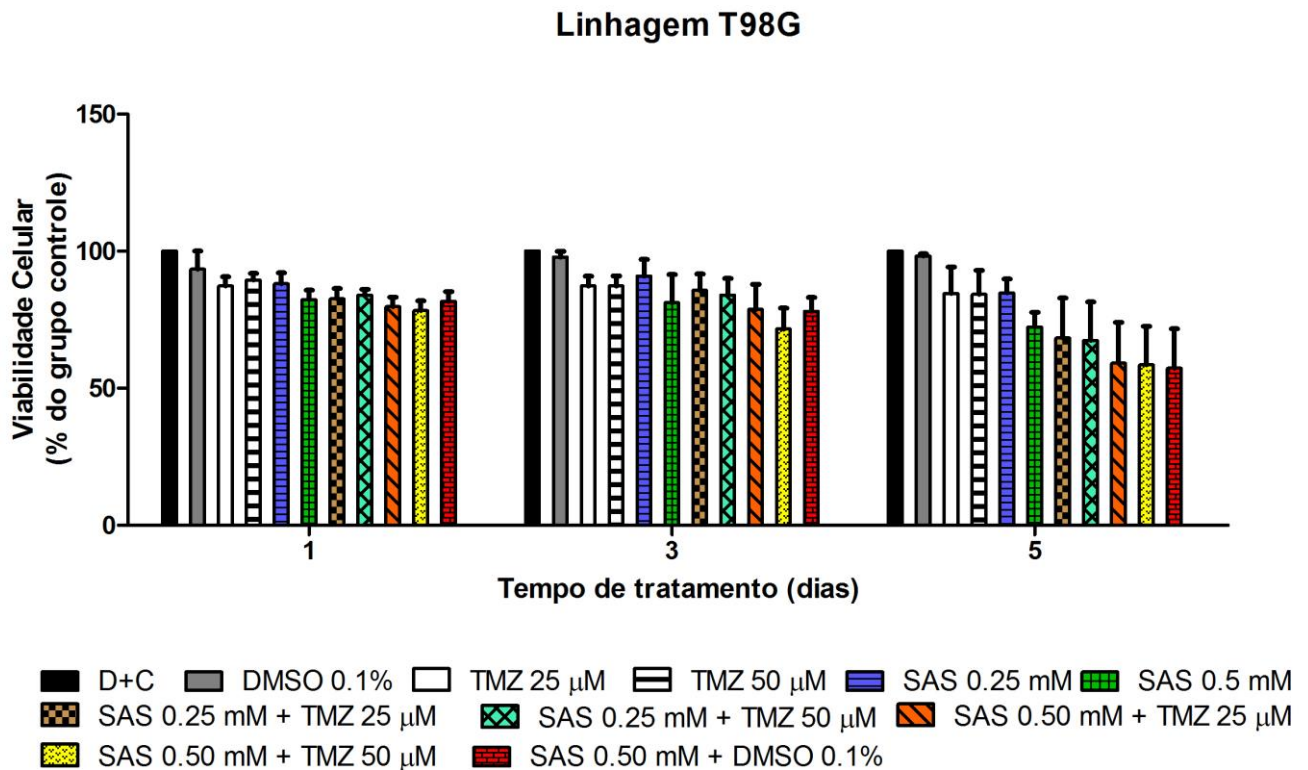


FIGURA 12. Viabilidade da linhagem de glioblastoma humano T98G após 1, 3 ou 5 dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). A viabilidade celular foi avaliada pela redução do composto MTT. Após cada período de incubação, os valores estão expressos como porcentagem de redução de MTT em relação ao grupo que recebeu meio de cultura suplementado (D+C: grupo controle; 100%). DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado com o veículo de diluição da TMZ. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. Em cada período analisado, não foi observada diferença entre os grupos (ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni).

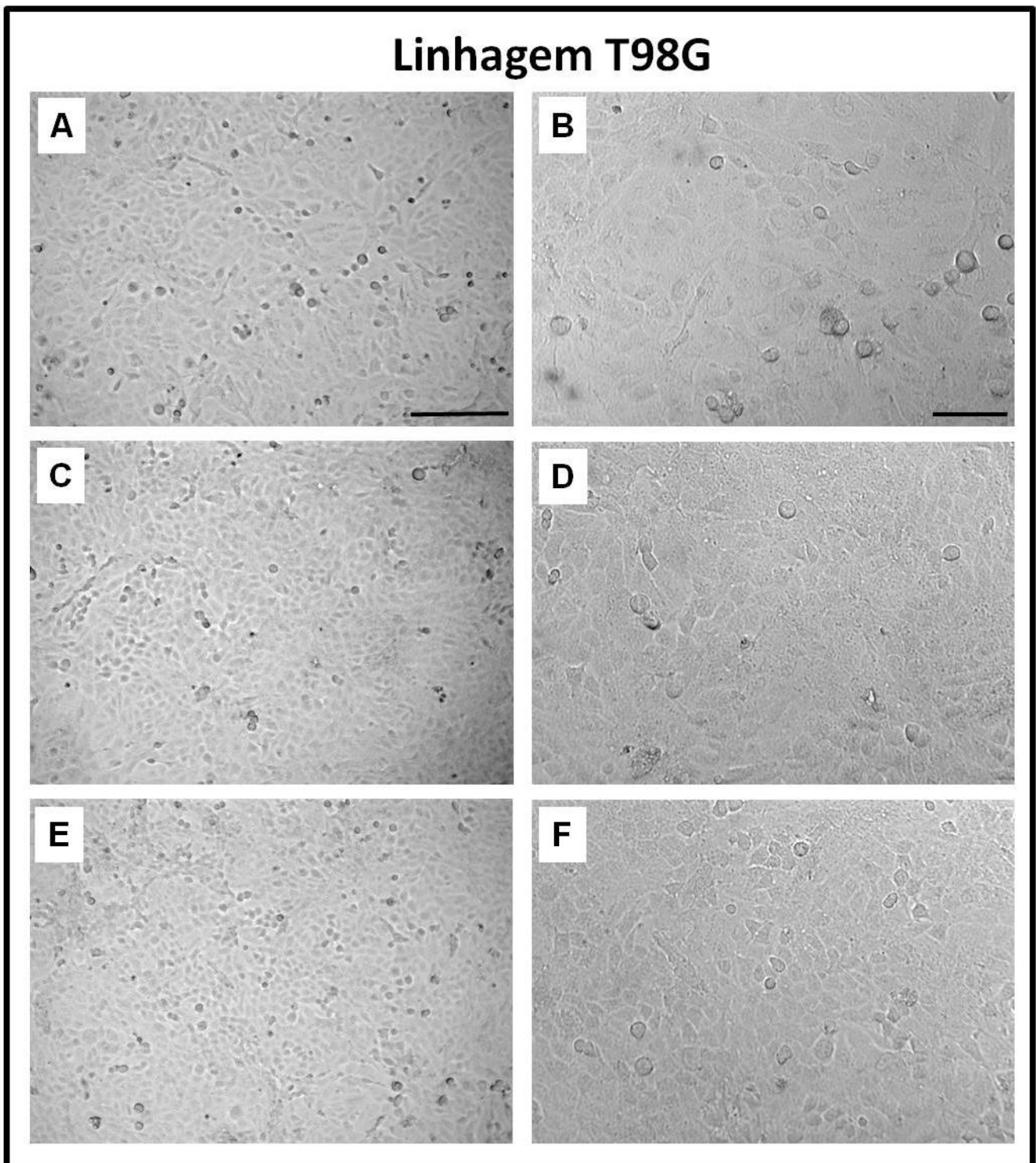


FIGURA 13. Características morfológicas das células de glioblastoma da linhagem T98G após cinco dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Células expostas a meio de cultura suplementado apenas (A e B) ou contendo DMSO (C e D), bem como células tratadas (TMZ 25 μ M (E e F), SAS 0.5 mM (G e H) ou TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM (I e J)), apresentam alta confluência e características morfológicas semelhantes, com formato poligonal em monocamada. As imagens da direita são aumentos daquelas da esquerda. Barras: 250 μ m (A, C, E, G e I) e 100 μ m (B, D, F, H e J).

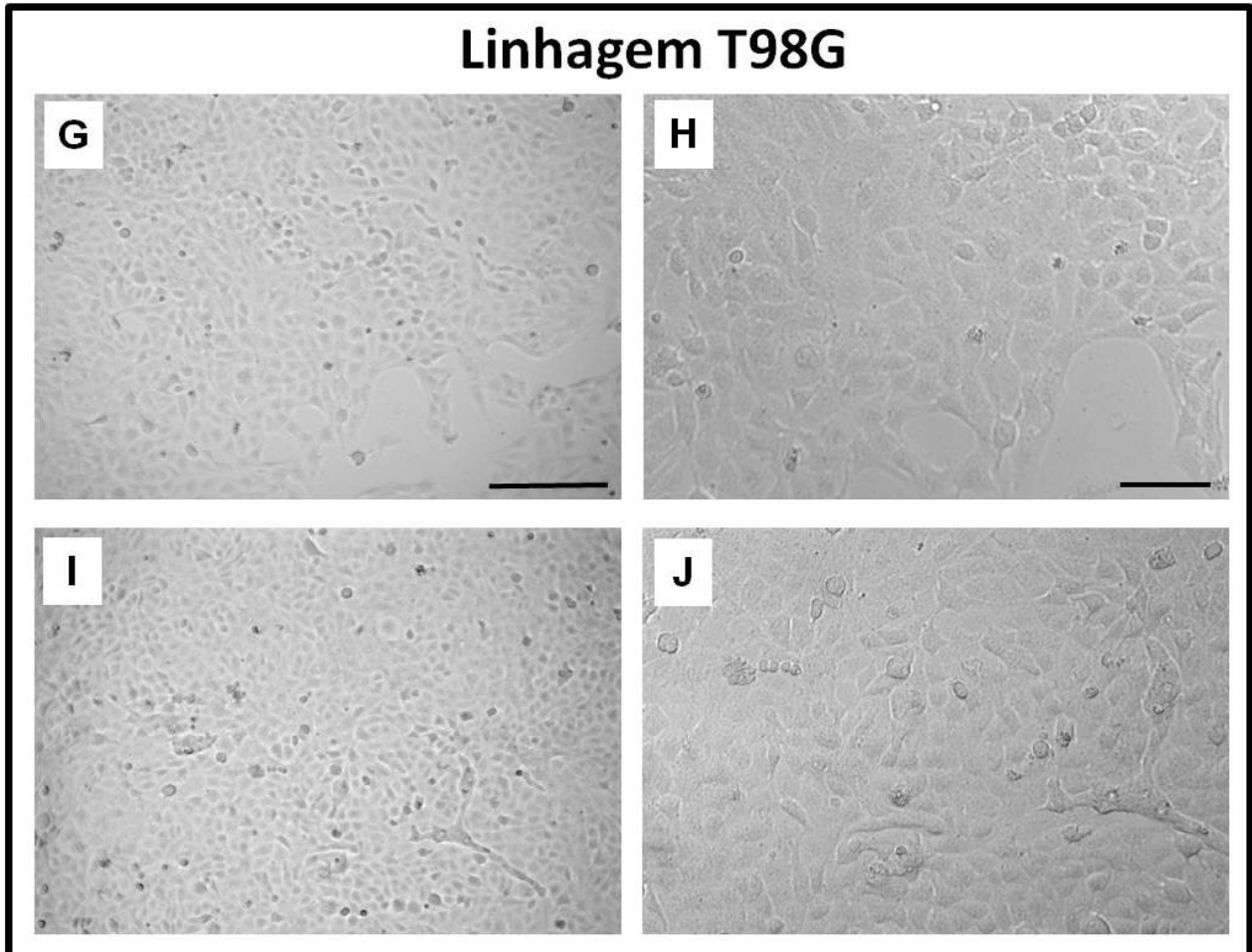


FIGURA 13. Continuação. Características morfológicas das células de glioblastoma da linhagem T98G após cinco dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Células expostas a meio de cultura suplementado apenas (A e B) ou contendo DMSO (C e D), bem como células tratadas (TMZ 25 μ M (E e F), SAS 0.5 mM (G e H) ou TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM (I e J)), apresentam alta confluência e características morfológicas semelhantes, com formato poligonal em monocamada. As imagens da direita são aumentos daquelas da esquerda. Barras: 250 μ m (A, C, E, G e I) e 100 μ m (B, D, F, H e J).

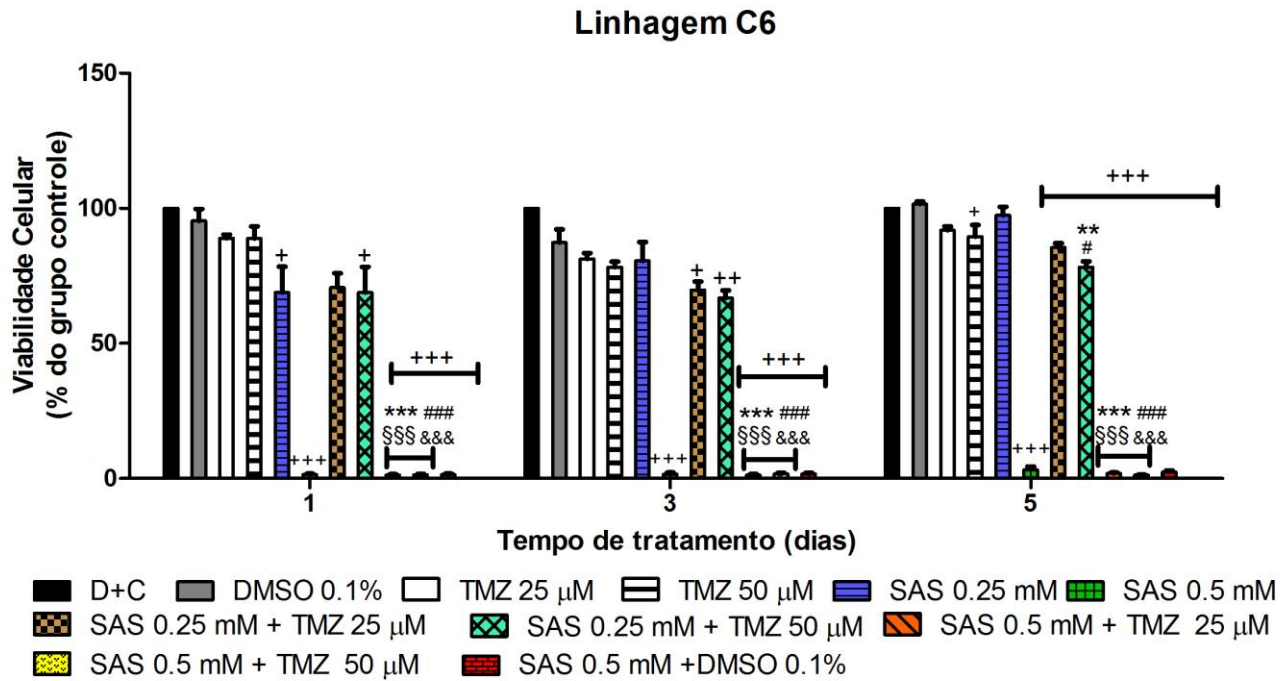
4.3.4. Linhagem C6

As células de glioma de rato não tiveram sua viabilidade alterada pelas duas concentrações de TMZ estudadas isoladamente, após o primeiro e o terceiro dia de exposição. Apenas depois do quinto dia de tratamento com TMZ 50 μ M, observou-se diminuição significativa, porém discreta (12%), da viabilidade, em relação ao grupo tratado com meio suplementado contendo o veículo de diluição da TMZ (Figura 14).

Sobre a administração de SAS, a concentração de 0.25 mM reduziu a viabilidade celular em 28% após o primeiro dia de exposição, em relação ao grupo veículo (DMSO 0.1%). No entanto, este efeito não se manteve nos demais períodos avaliados. Diferente das linhagens humanas, as células C6 se mostraram altamente sensíveis à incubação com SAS 0.5 mM. Especificamente, após um, três ou cinco dias de exposição, observou-se redução de cerca de 100% da viabilidade, em comparação com as células que receberam meio suplementado e DMSO 0.1% (Figura 14).

Em todo os períodos avaliados, também houve intensa redução da viabilidade das células submetidas às associações TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM e TMZ 50 μ M + SAS 0.5 mM, em relação aos grupos TMZ 25 μ M, TMZ 50 μ M, TMZ 25 μ M + SAS 0.25 mM e TMZ 50 μ M + SAS 0.25 mM (Figura 14). É importante observar ainda que, no terceiro dia de tratamento, as associações TMZ 25 μ M + SAS 0.25 mM e TMZ 50 μ M + SAS 0.25 mM apresentaram efeito de cerca de 20% de redução da viabilidade celular, em relação ao grupo DMSO 0.1%. Este efeito se manteve após cinco dias de incubação. Além da comparação de todos os grupos com aquele que recebeu meio suplementado e DMSO 0.1%, as associações de drogas foram comparadas com as administrações de TMZ isolada, após um mesmo período de tratamento. Especificamente, após cinco dias, o grupo TMZ 50 μ M + SAS 0.25 mM comparado com TMZ 25 μ M e TMZ 50 μ M, reduziu a viabilidade em 15 e 13%, respectivamente. A viabilidade celular do grupo SAS 0.5 mM e aquela do SAS 0.5 mM + DMSO 0.1% foram semelhantes entre si, em todos os tempos analisados (Figura 14).

Com relação às características morfológicas, as células que receberam meio de cultura suplementado, com ou sem DMSO, apresentaram distribuição semelhante aos grupos tratados com TMZ 25 μ M ou SAS 0.25 mM, todos com alta confluência. Por sua vez, o grupo exposto a TMZ 25 μ M e SAS 0.25 mM apresentou apenas discreta redução da densidade celular. Nas áreas de menor densidade, quando identificáveis, os prolongamentos celulares eram finos e alongados, por vezes com ramificações gradualmente mais distais e finas. Finalmente, o grupo tratado com SAS 0.5 mM apresentou inibição praticamente total do crescimento celular, com relação às demais condições experimentais. Em particular, as células apresentaram prolongamentos citoplasmáticos mais curtos, menos ramificados e com espessura fina e irregular, aspectos compatíveis com processo degenerativo em curso (Figura 15).



Linhagem C6					
Dia 1	DMSO 0.1% (+)	TMZ 25 μM (*)	TMZ 50 μM (#)	TMZ 25 μM + SAS 0.25 mM (§)	TMZ 50 μM + SAS 0.25 mM (&)
SAS 0.25 mM	28%	ns	ns	ns	ns
TMZ 50 μ M + SAS 0.25 mM	28%	ns	ns	ns	na
Dia 3					
TMZ 25 μ M + SAS 0.25 mM	20%	ns	ns	na	ns
TMZ 50 μ M + SAS 0.25 mM	23%	ns	ns	ns	na
Dia 5					
TMZ 50 μ M	12%	ns	na	ns	ns
TMZ 25 μ M + SAS 0.25 mM	16%	ns	ns	na	ns
TMZ 50 μ M + SAS 0.25 mM	23%	15%	13%	ns	na

FIGURA 14. Viabilidade da linhagem de glioma de rato C6 após 1, 3 ou 5 dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). A viabilidade celular foi avaliada pela redução do composto MTT. Após cada período de incubação, os valores estão expressos como porcentagem de redução de MTT em relação ao grupo que recebeu meio de cultura suplementado apenas (D+C: grupo controle; 100%). O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. A ordem do gráfico de barras é a mesma apresentada na legenda. As diferenças significativas em relação ao grupo veículo DMSO 0.1% são indicadas por +. Em relação aos grupos TMZ 25 μ M e TMZ 50 μ M, as diferenças significativas, estão indicadas por * e #, respectivamente. O símbolo § indica diferença em relação ao grupo TMZ 25 μ M + SAS 0.25 mM. O símbolo & indica diferença em relação ao grupo TMZ 50 μ M + SAS 0.25 mM. Um, dois e três símbolo(s) indica(m) $p < 0.05$, $p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectivamente. ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni. A tabela mostra diminuição da viabilidade celular (%) 1, 3 ou 5 dias após exposições a SAS e/ou TMZ, quando houve diferença estatística em relação aos grupos DMSO 0.1%, TMZ 25 μ M, TMZ 50 μ M, TMZ 25 μ M + SAS 0.25 mM ou TMZ 50 μ M + SAS 0.25 mM. ns: sem diferença estatística; na: não avaliado.

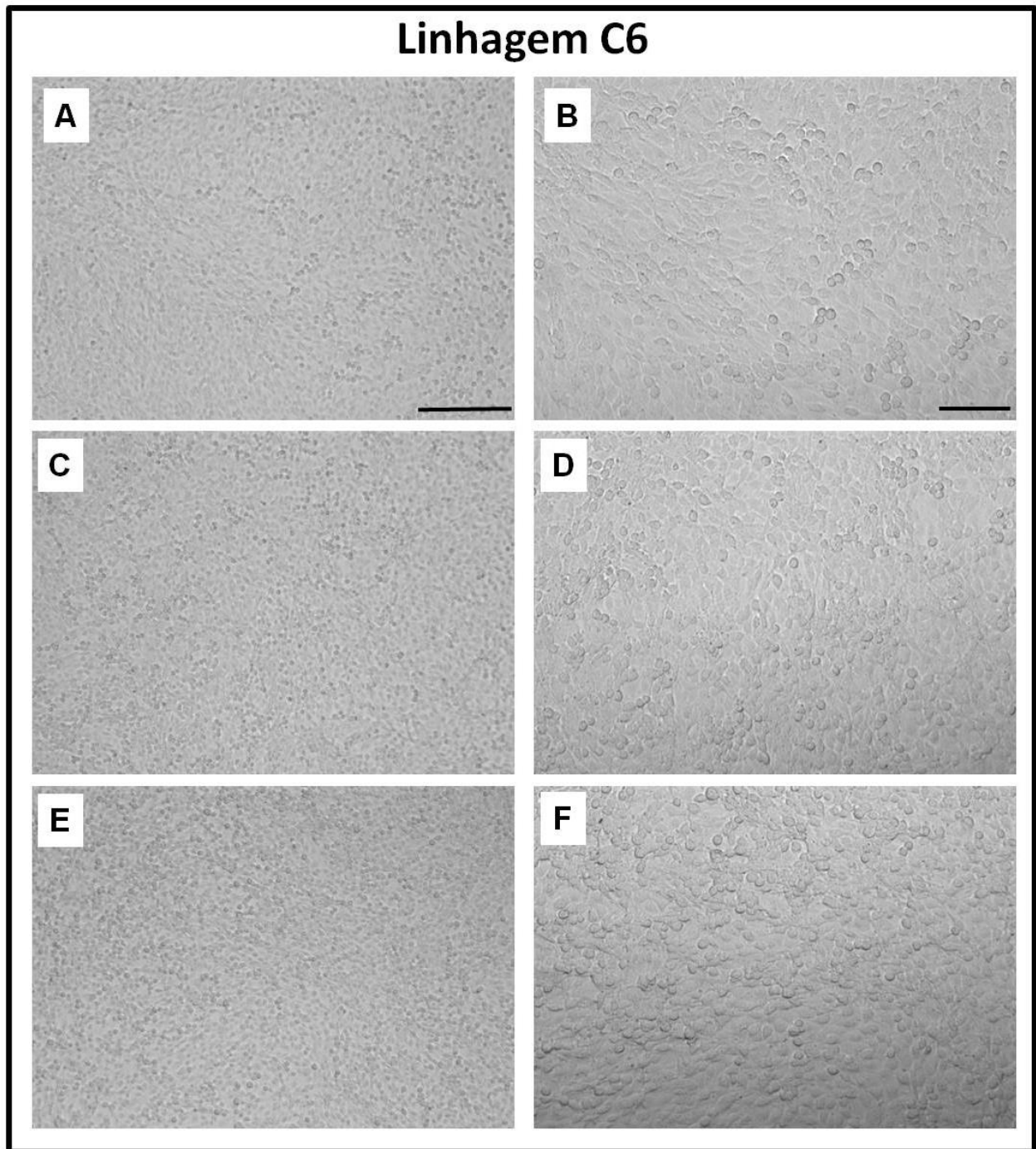


FIGURA 15. Características morfológicas das células de glioma de rato C6 após cinco dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Células expostas a meio de cultura suplementado apenas (A e B) ou contendo DMSO (C e D) apresentam alta confluência. Grupos tratados com TMZ 25 μ M (E e F), SAS 0.25 mM (G e H), TMZ 25 μ M + SAS 0.25 mM (I e J) ou SAS 0.5 mM (K a M). Notar intensa redução da densidade celular após tratamento com SAS 0.5 mM, condição em que os prolongamentos citoplasmáticos se tornam mais finos, irregulares e escassos (setas em M), em comparação com células em maior confluência. As imagens da direita são aumentos daquelas da esquerda. Parte da região delimitada em (L) é mostrada em (M) em aumento maior. Barras: 250 μ m (A, C, E, G, I e K); 100 μ m (B, D, F, H, J e L) e 50 μ m (M).

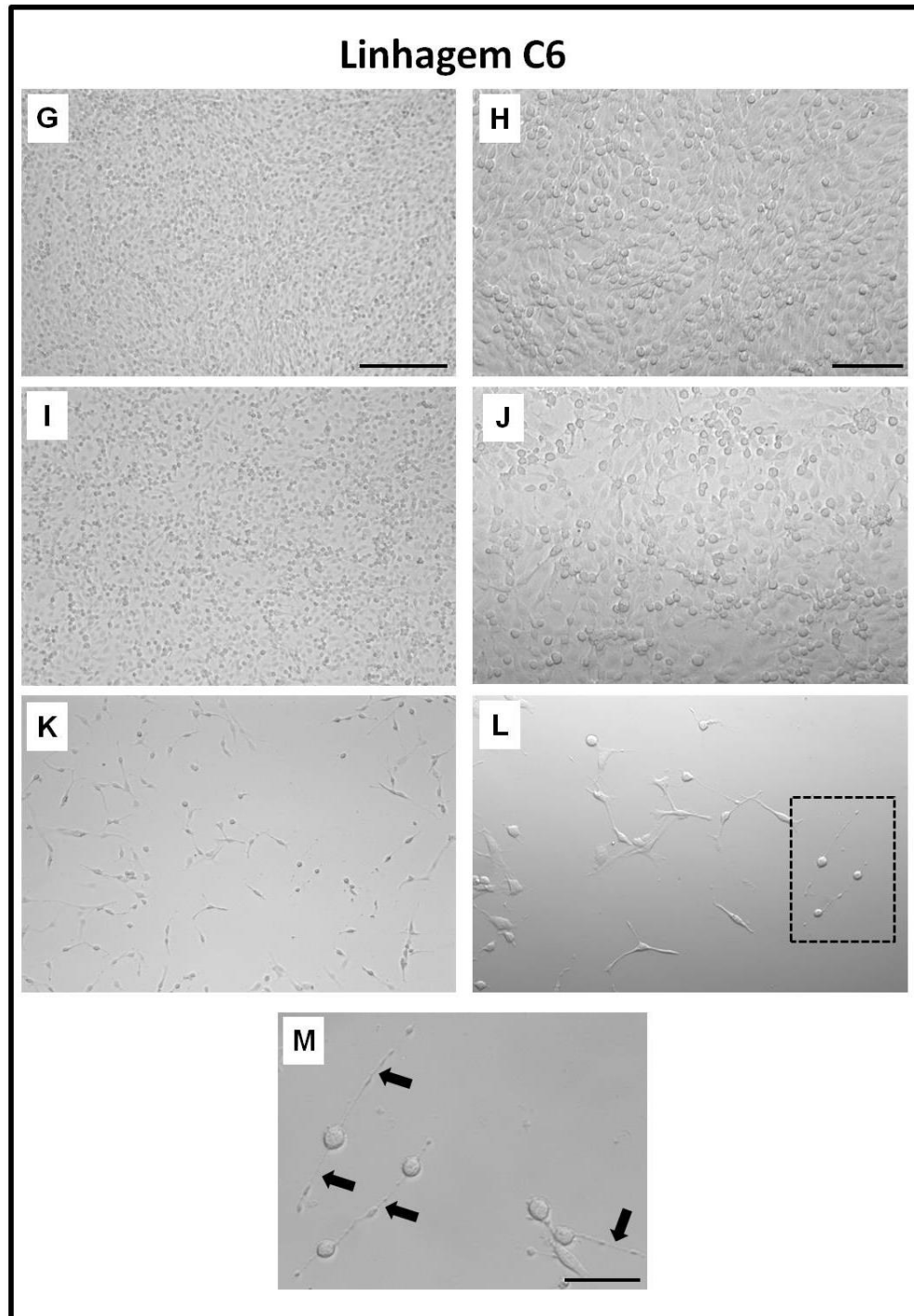


FIGURA 15. Continuação. Características morfológicas das células de glioma de rato C6 após cinco dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Células expostas a meio de cultura suplementado apenas (A e B) ou contendo DMSO (C e D) apresentam alta confluência. Grupos tratados com TMZ 25 μ M (E e F), SAS 0.25 mM (G e H), TMZ 25 μ M + SAS 0.25 mM (I e J) ou SAS 0.5 mM (K a M). Notar intensa redução da densidade celular após tratamento com SAS 0.5 mM, condição em que os prolongamentos citoplasmáticos se tornam mais finos, irregulares e escassos (setas em M), em comparação com células em maior confluência. As imagens da direita são aumentos daquelas da esquerda. Parte da região delimitada em (L) é mostrada em (M) em aumento maior. Barras: 250 μ m (A,C,E,G,I e K); 100 μ m (B,D,F,H,J e L) e 50 μ m (M).

4.4. Concentrações de temozolamida e sulfasalazina nos experimentos posteriores

Com relação à temozolamida (TMZ), conforme apresentado no itens 4.1 e 4.3, não foi observada diferença estatística entre os resultados obtidos com as administrações isoladas de 25 e 50 μM . Por este motivo, nos experimentos realizados após aqueles de viabilidade, optamos pelo uso da concentração de 25 μM associada com a sulfasalazina (SAS). É importante lembrar (vide item 4.3) que a concentração de 25 μM corresponde à concentração de TMZ detectada no plasma de pacientes em tratamento quimioterápico para glioma de alto grau (Ostermann et al., 2004; Barazzuol et al., 2012).

Sobre a escolha da concentração de SAS, consideramos as linhagens humanas em separado daquela de rato. Isto porque, em função dos resultados obtidos no item 4.3, a concentração de 0.5 mM da SAS, associada com 25 μM de TMZ, determinou redução significativa da viabilidade das células U87MG e A172. Além disso, comparando-se as associações 25 μM de TMZ + 0.50 mM de SAS com 50 μM de TMZ + 0.50 mM de SAS, verificamos efeito predominantemente aditivo (e não sinérgico) entre as drogas, principalmente nas linhagens U87MG e A172. Como os grupos compostos pelas células T98G não apresentaram diferença significativa após qualquer forma de administração de droga, estudamos os efeitos da mesma associação utilizada para as outras linhagens humanas. Desta forma, a associação selecionada para o tratamento das células tumorais humanas foi 25 μM de TMZ com 0.50 mM de SAS.

Diferentemente das linhagens humanas, as células neoplásicas de rato (C6) foram extremamente sensíveis à concentração de 0.5 mM de SAS (redução de praticamente 100% da viabilidade, em todos os tempos estudados; vide item 4.3). Por este motivo, não foi possível obter material dos grupos tratados com esta concentração para todos os protocolos de estudo. Especificamente, para o estudo de expressão gênica por PCR em tempo real, apenas a concentração de 0.25 mM de SAS nos permitiu continuar com células viáveis e em quantidade satisfatória para extração de RNA total. Nas outras técnicas realizadas, foram avaliadas as duas concentrações de SAS (0.25 e 0.5 mM) em associação com 25 μM TMZ.

4.5. Avaliação de morte celular por citometria de fluxo: Reação de TUNEL

A ocorrência de morte celular foi avaliada a partir de fragmentação de DNA, detectada através de reação de TUNEL e citometria de fluxo. Em função dos resultados de viabilidade e da observação diária das células, o período avaliado foi o terceiro dia de exposição a temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS), pois consideramos maiores as chances de serem detectadas alterações celulares estruturais. Além disso, devido à surpreendente susceptibilidade da linhagem C6 a SAS 0.5 mM, também foram avaliados grupos tratados com esta concentração de SAS, associada ou não com TMZ 25 µM.

Assim, após três dias de incubação, os tratamentos realizados nas linhagens humanas (U87MG, A172 e T98G) não alteraram significativamente a ocorrência de fragmentação de DNA, em comparação com o grupo que recebeu apenas meio de cultura ou meio de cultura contendo DMSO 0.1% (Figuras 16 a 18). Por outro lado, observou-se aumento significativo de morte no grupo de células C6 tratadas com SAS 0.5 mM, em comparação com os grupos expostos ao meio de cultura suplementado apenas, ao meio contendo o veículo de diluição da TMZ ou a TMZ 25 µM. Especificamente, a exposição a SAS 0.5 mM induziu a fragmentação de DNA em 34.2% das células, ao passo que os grupos tratados apenas com meio de cultura ou meio contendo o veículo de diluição da TMZ apresentaram valores de 1.5% e 3.4%, respectivamente. O grupo de células tratadas com TMZ 25 µM + SAS 0.5 mM apresentou 31% de células em processo de morte. Porém, não foi observada diferença estatística significativa deste grupo em relação aos demais (Figura 19).

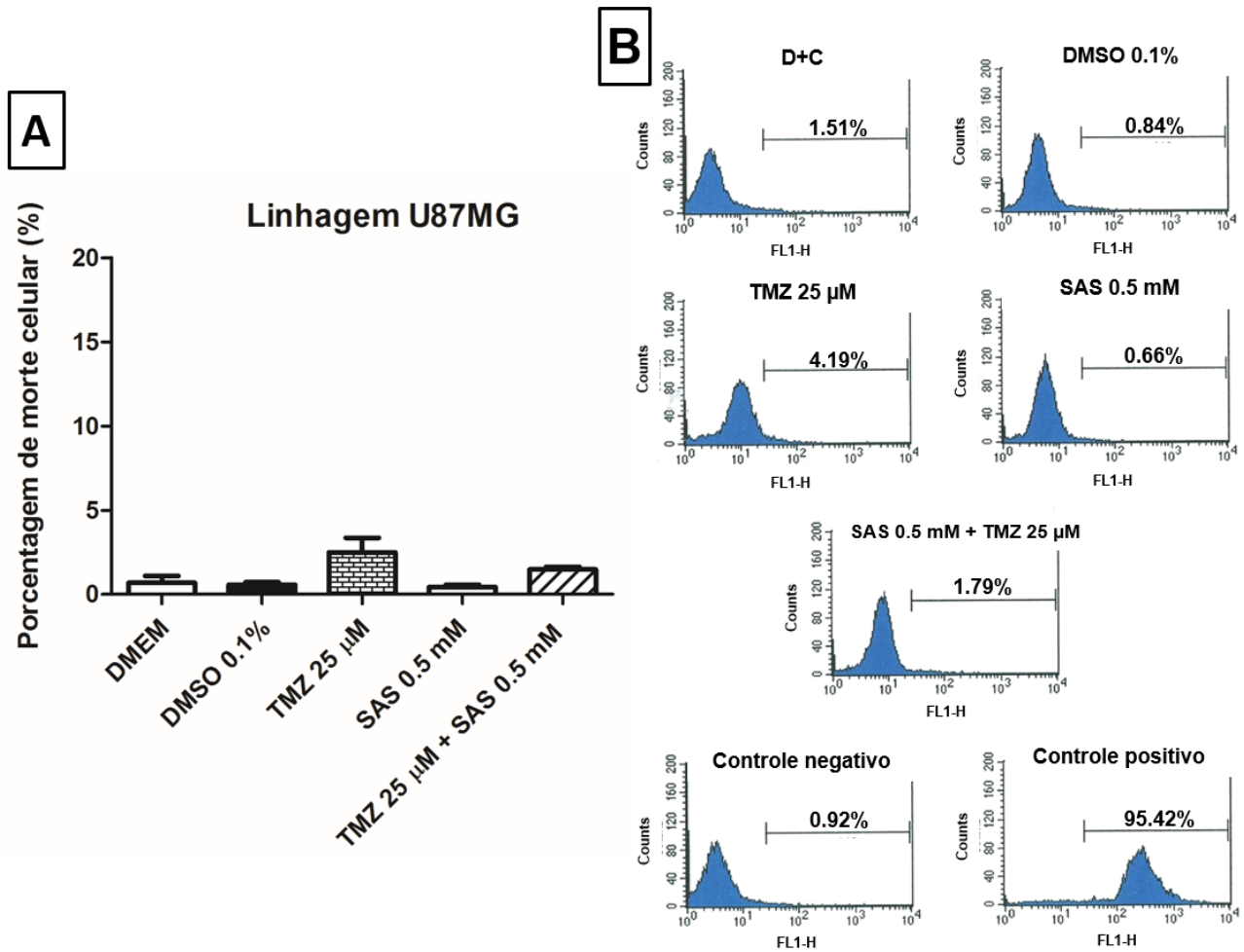


FIGURA 16. Análise de morte celular (fragmentação de DNA) na linhagem de glioblastoma humano U87MG após 3 dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Análise através de reação de TUNEL e citometria de fluxo. O gráfico à esquerda representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. Os histogramas à direita são representativos de um experimento, mostrando a intensidade de fluorescência das células captada pelo filtro FL1-H e o valor de porcentagem de morte (fragmentação de DNA) em cada grupo. D+C: grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado; DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ; Controle negativo: grupo exposto apenas ao meio de cultura suplementado, submetido à ação de DNaseI, porém, sem adição da enzima TdT ao protocolo da reação de TUNEL. Controle positivo: células expostas apenas ao meio de cultura suplementado e submetidas à ação da DNase I. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos estudados (ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

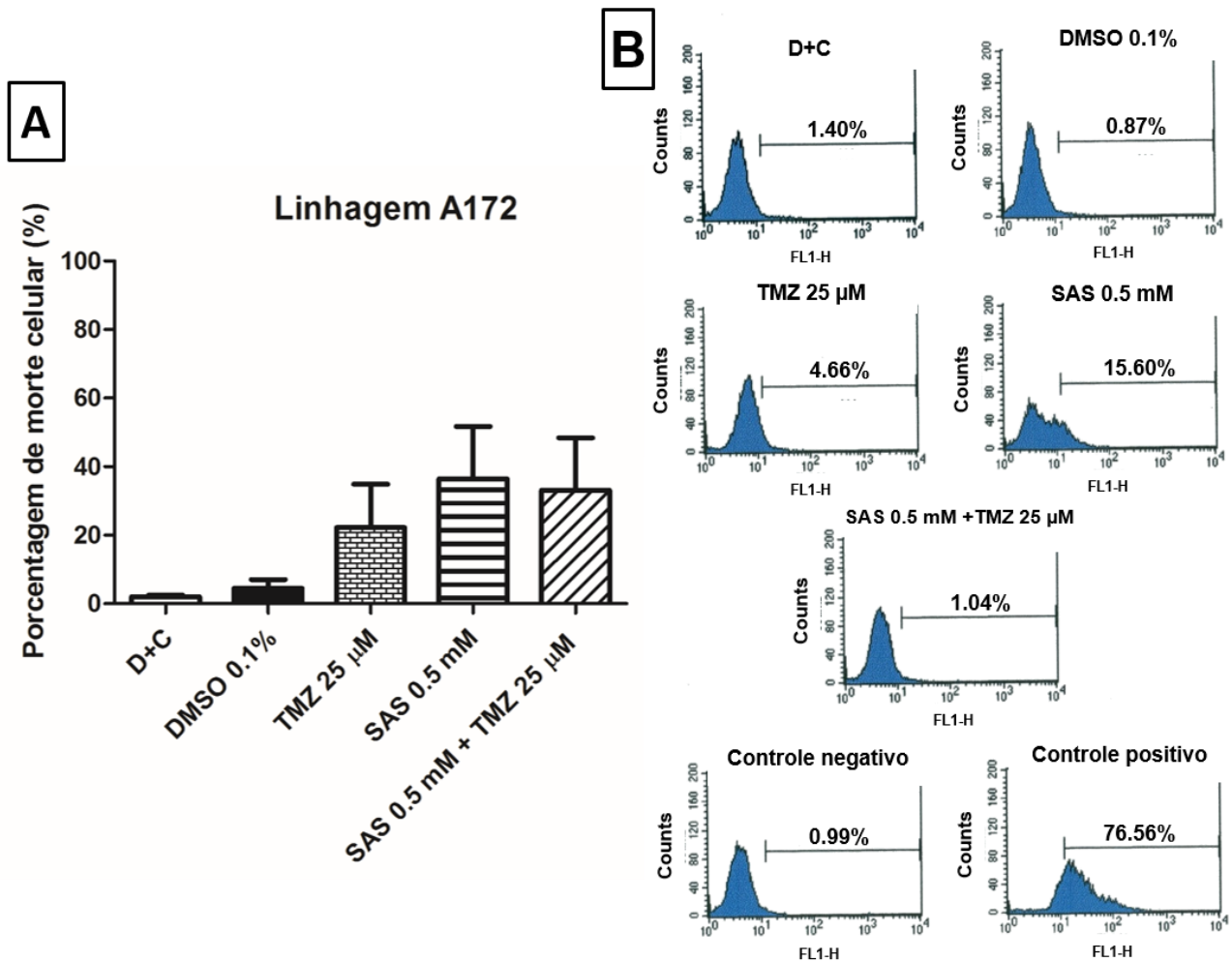


FIGURA 17. Análise de morte celular (fragmentação de DNA) na linhagem de glioblastoma humano A172 após 3 dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Análise através de reação de TUNEL e citometria de fluxo. O gráfico à esquerda representa a média \pm erro padrão da média de seis experimentos independentes. Os histogramas à direita são representativos de um experimento, mostrando a intensidade de fluorescência das células captada pelo filtro FL1-H e o valor de porcentagem de morte (fragmentação de DNA) em cada grupo. D+C: grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado; DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ; Controle negativo: grupo exposto apenas ao meio de cultura suplementado, submetido à ação de DNaseI, porém, sem adição da enzima TdT ao protocolo da reação de TUNEL. Controle positivo: células expostas apenas ao meio de cultura suplementado e submetidas à ação da DNase I. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos estudados (ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

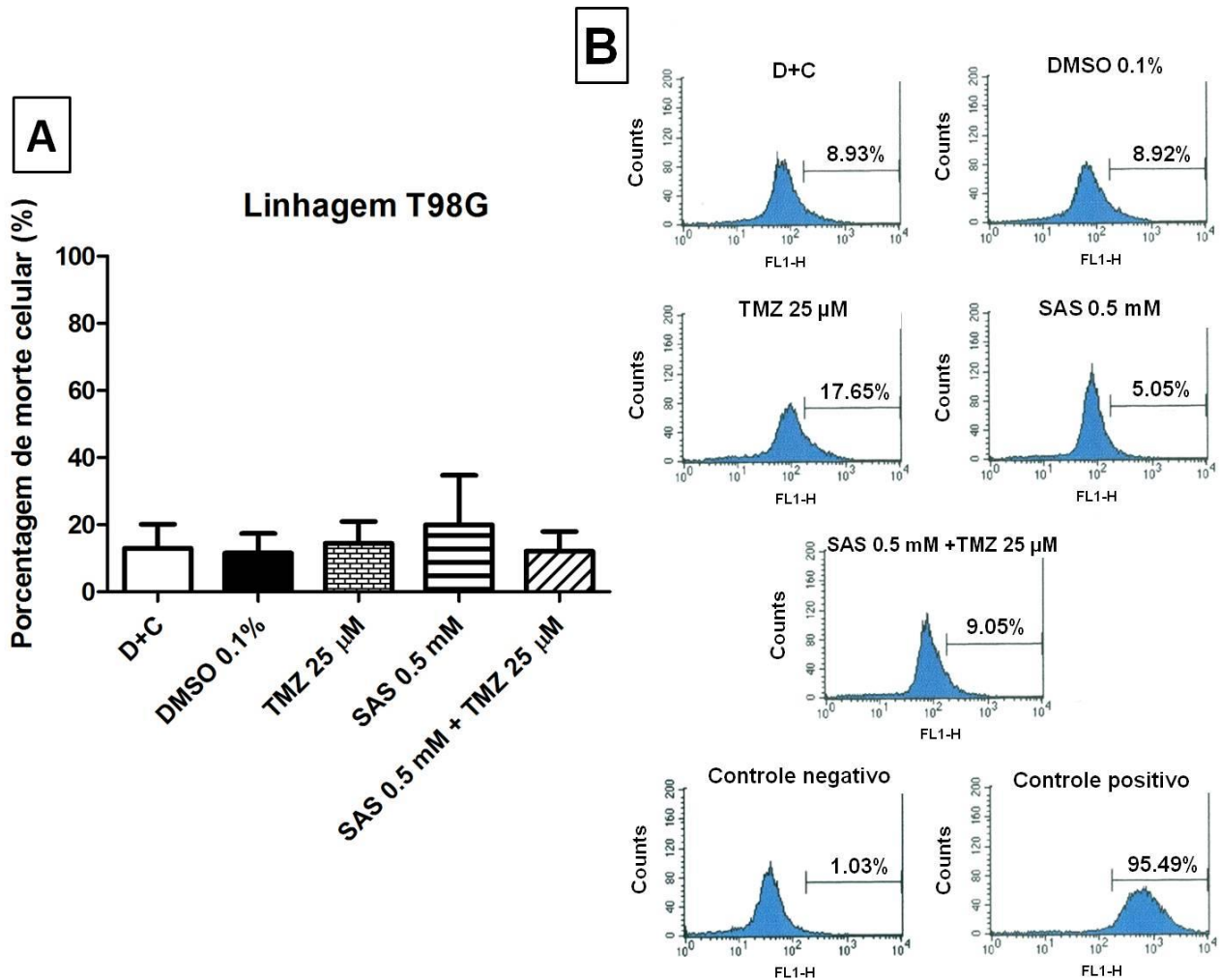


FIGURA 18. Análise de morte celular (fragmentação de DNA) na linhagem de glioblastoma humano T98G após 3 dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Análise através de reação de TUNEL e citometria de fluxo. O gráfico à esquerda representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. Os histogramas à direita são representativos de um experimento, mostrando a intensidade de fluorescência das células captada pelo filtro FL1-H e o valor de porcentagem de morte (fragmentação de DNA) em cada grupo. D+C: grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado; DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ; Controle negativo: grupo exposto apenas ao meio de cultura suplementado, submetido à ação de DNaseI, porém, sem adição da enzima TdT ao protocolo da reação de TUNEL. Controle positivo: células expostas apenas ao meio de cultura suplementado e submetidas à ação da DNase I. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos estudados (ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

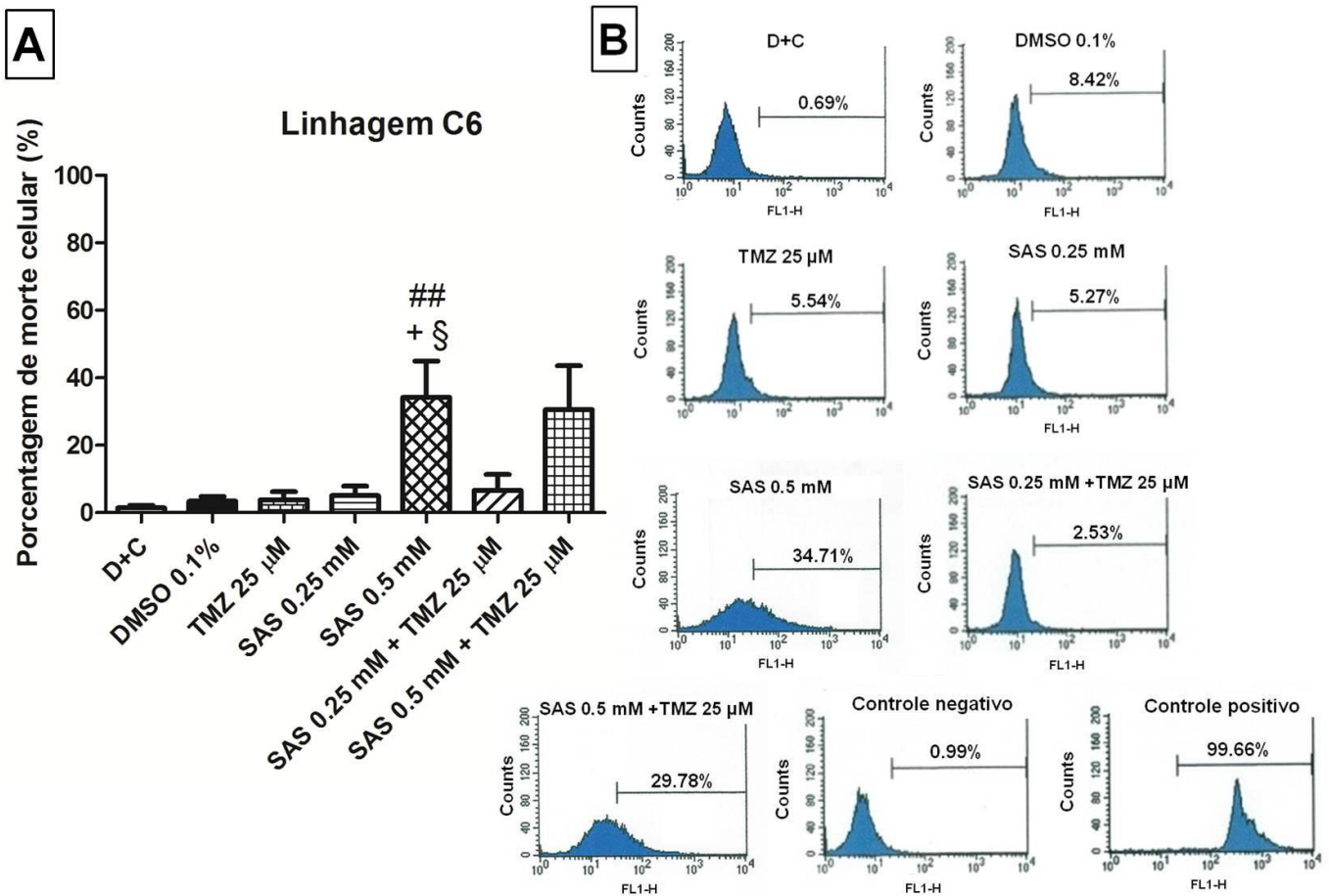


FIGURA 19. Análise de morte celular (fragmentação de DNA) na linhagem de glioma de rato C6 após 3 dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Análise através de reação de TUNEL e citometria de fluxo. O gráfico à esquerda representa a média \pm erro padrão da média de quatro a oito experimentos independentes. Os histogramas à direita são representativos de um experimento, mostrando a intensidade de fluorescência das células captada pelo filtro FL1-H e o valor de porcentagem de morte (fragmentação de DNA) em cada grupo. D+C: grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado; DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ; Controle negativo: grupo exposto apenas ao meio de cultura suplementado, submetido à ação de DNaseI, porém, sem adição da enzima TdT ao protocolo da reação de TUNEL. Controle positivo: células expostas apenas ao meio de cultura suplementado e submetidas à ação da DNase I. O tratamento com SAS 0.5 mM induziu morte em cerca de 30% das células (###: $p < 0.01$ vs D+C; +: $p < 0.05$ vs DMSO 0.1% e §: $p < 0.05$ vs TMZ 25 μ M; ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

4.6. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real após administração de temozolamida e/ou sulfasalazina

Em todas as linhagens celulares, as análises de expressão gênica foram realizadas após três dias de exposição às drogas. Visto que três dias corresponde aproximadamente à média do intervalo de tempo máximo aqui avaliado, consideramos que neste ponto seriam maiores as chances de se detectar alterações funcionais em curso.

4.6.1. Linhagem U87MG

Em comparação com os grupos que receberam apenas meio suplementado, apenas meio suplementado e o veículo de diluição da temozolamida (TMZ) ou TMZ 25 μ M, as células tratadas com sulfasalazina (SAS) - associada ou não com TMZ - apresentaram redução ou manutenção dos níveis de expressão dos genes *MMP2*, *MMP9*, *EGFR*, *TP53* e *PTEN*. Porém, não foram observadas diferenças significativas entre as condições estudadas (Figura 20).

4.6.2. Linhagem A172

As células A172 expostas a SAS - associada ou não com TMZ - apresentaram modulação dos níveis de expressão dos genes *MMP2*, *MMP9* e *EGFR*, quando comparadas com aquelas que receberam apenas meio suplementado, apenas meio suplementado e o veículo de diluição da temozolamida (TMZ) ou TMZ 25 μ M. No entanto, não foi observada diferença estatística entre as condições avaliadas.

Com relação ao gene *TP53*, sua expressão não foi modificada de forma significativa pela administração individual de TMZ, SAS ou veículo de diluição da TMZ. Por outro lado, a associação de TMZ 25 μ M com SAS 0.5 mM diminuiu tal expressão em cerca de 73%, em relação ao grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado (Figura 21).

Por fim, ainda que tenhamos empregado os mesmos reagentes e condições experimentais que foram utilizados para as outras linhagens celulares, não foi possível detectar expressão da forma selvagem do gene *PTEN* nas células A172.

4.6.3. Linhagem T98G

Nas células T98G, o tratamento com SAS - associada ou não com TMZ - alterou (aumentou ou diminuiu) ou manteve a expressão dos genes avaliados, em comparação com os grupos que receberam apenas meio suplementado, apenas meio suplementado e o veículo de diluição da TMZ ou TMZ 25 μ M. Porém, não foram observadas diferenças significativas entre as condições estudadas (Figura 22).

4.6.4. Linhagem C6

Ao contrário do observado nas linhagens humanas, a administração de TMZ 25 μ M alterou de forma significativa a expressão do gene da metaloproteinase 2 (mmp2) nas células C6, após 3 dias de tratamento. Especificamente, detectou-se expressão aumentada em cerca de 5 vezes com relação às células que receberam meio de cultura suplementado contendo ou não o veículo de diluição da TMZ. De maneira semelhante, o grupo que recebeu TMZ e SAS apresentou expressão elevada de mmp2 em cerca de 6 vezes, comparado com os mesmos grupos. É importante ressaltar que o efeito verificado na associação deveu-se prioritariamente à TMZ. De fato, a administração isolada de SAS não alterou a expressão deste gene (Figura 23).

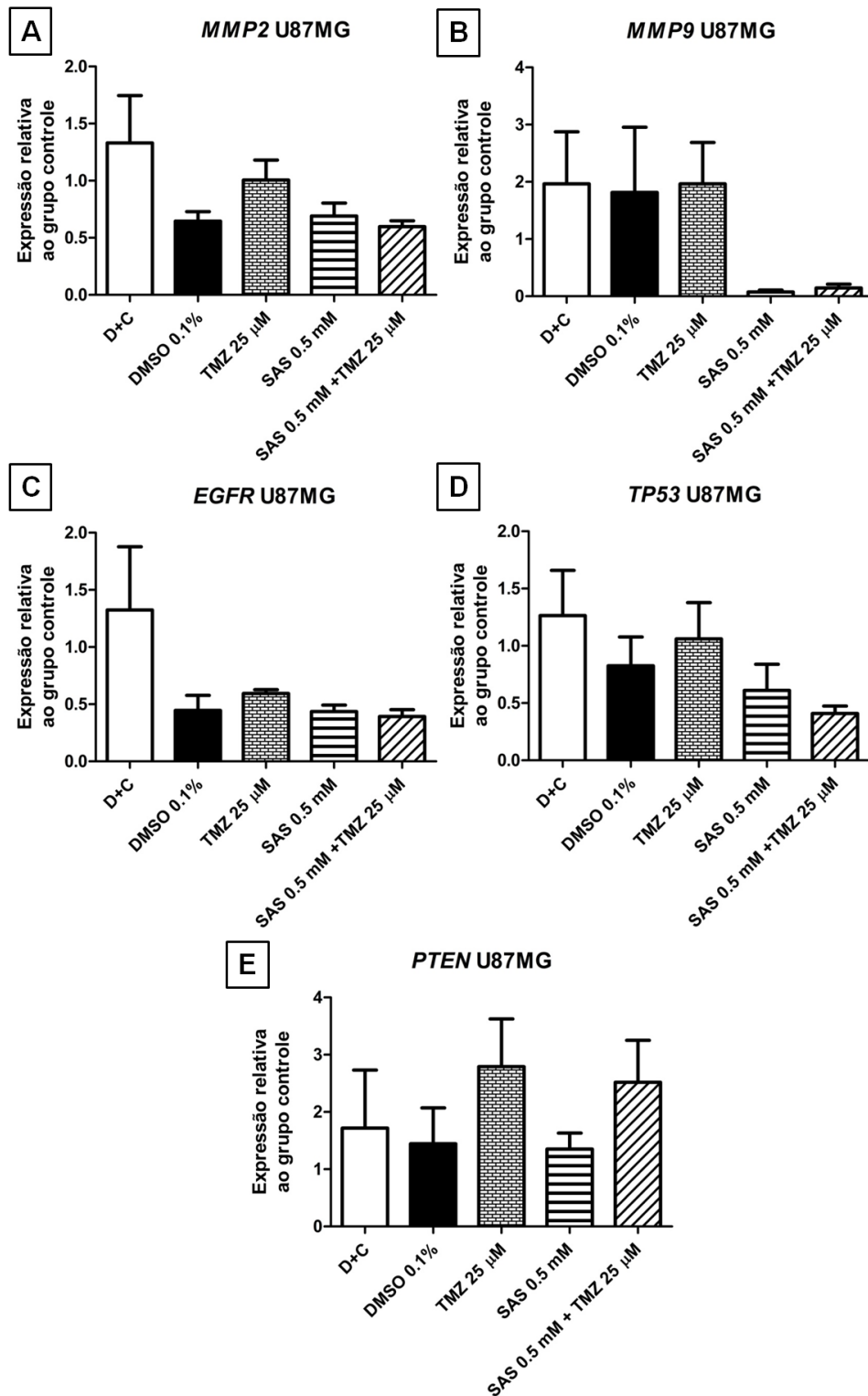


FIGURA 20. Expressão relativa dos genes *MMP2*, *MMP9*, *EGFR*, *TP53* e *PTEN* na linhagem de glioblastoma humano U87MG após 3 dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Análise através de PCR em tempo real. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média de cinco ou seis experimentos independentes realizados em triplicata. D+C: grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado; DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. Para cada gene avaliado, não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

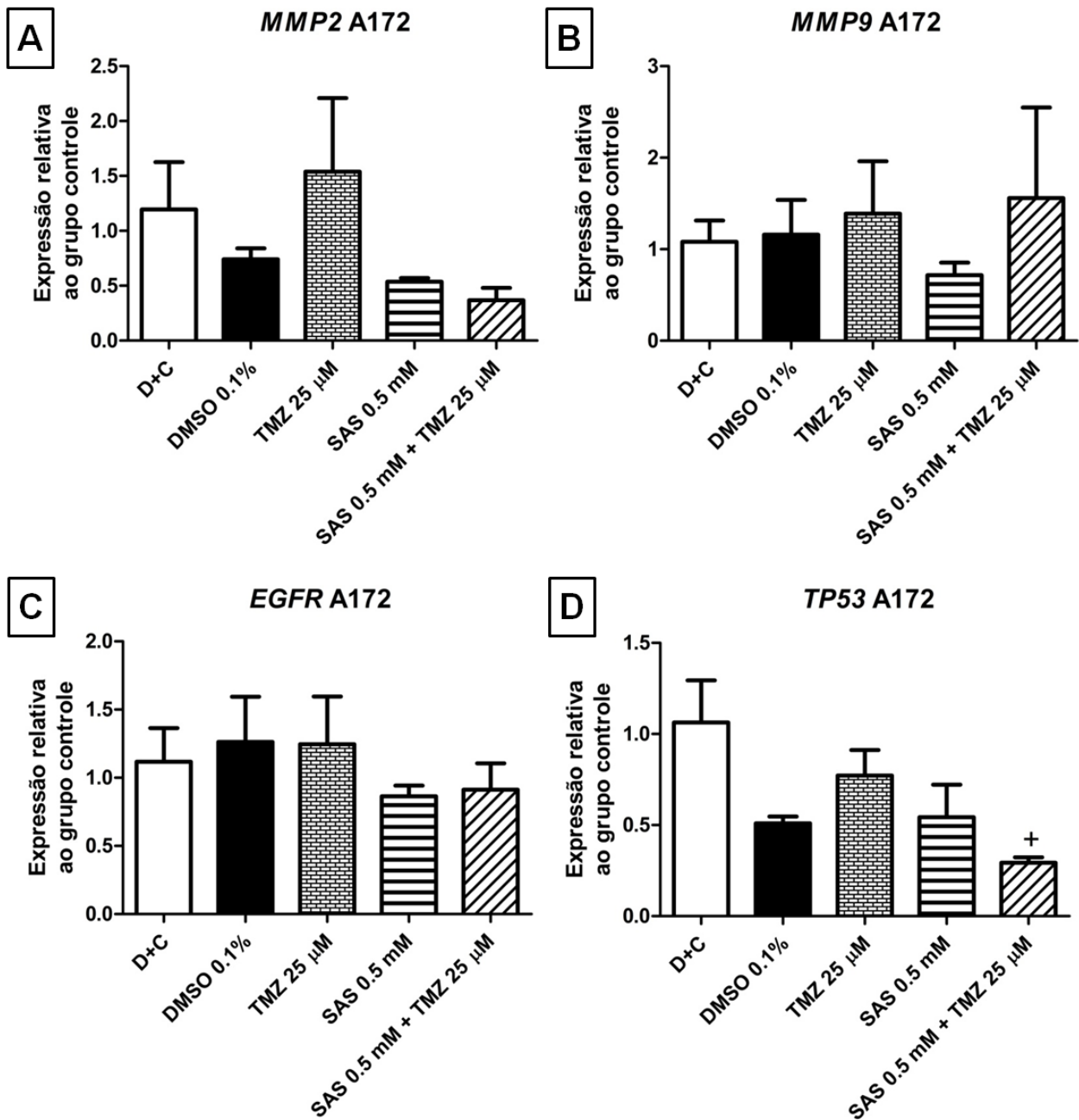


FIGURA 21. Expressão relativa dos genes *MMP2*, *MMP9*, *EGFR* e *TP53* na linhagem de glioblastoma humano A172 após 3 dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Análise através de PCR em tempo real. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média de três ou quatro experimentos independentes realizados em triplicata. D+C: grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado; DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. A expressão do gene *TP53* foi significativamente menor no grupo tratado com TMZ 25 μ M e SAS 0.5 mM, em comparação com o grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado (+; $p < 0.05$). Para os demais genes, não houve diferença significativa entre os grupos. ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

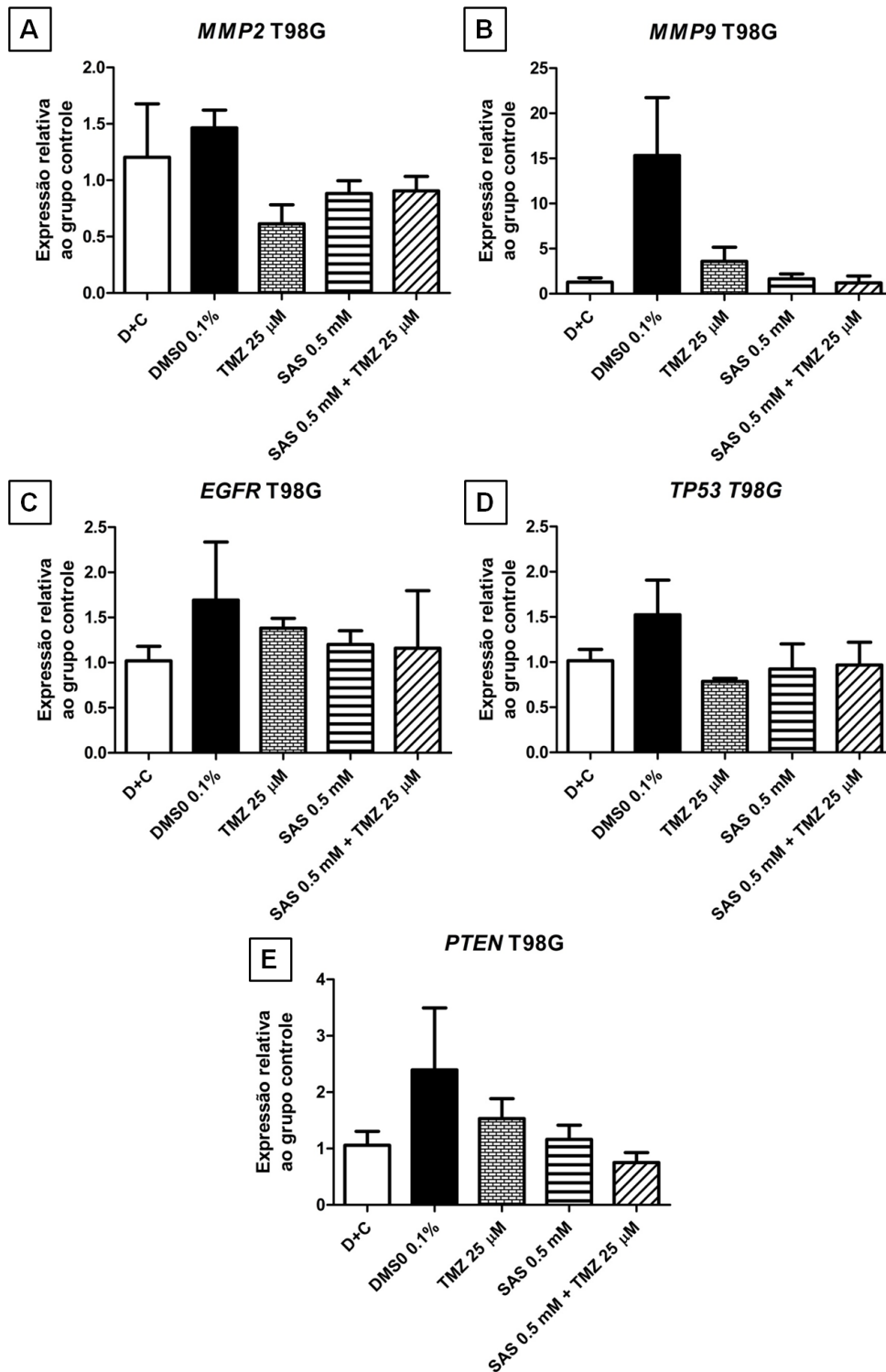


FIGURA 22. Expressão relativa dos genes *MMP2*, *MMP9*, *EGFR*, *TP53* e *PTEN* na linhagem de glioblastoma humano T98G após 3 dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Análise através de PCR em tempo real. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. D+C: grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado; DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. Para cada gene avaliado, não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

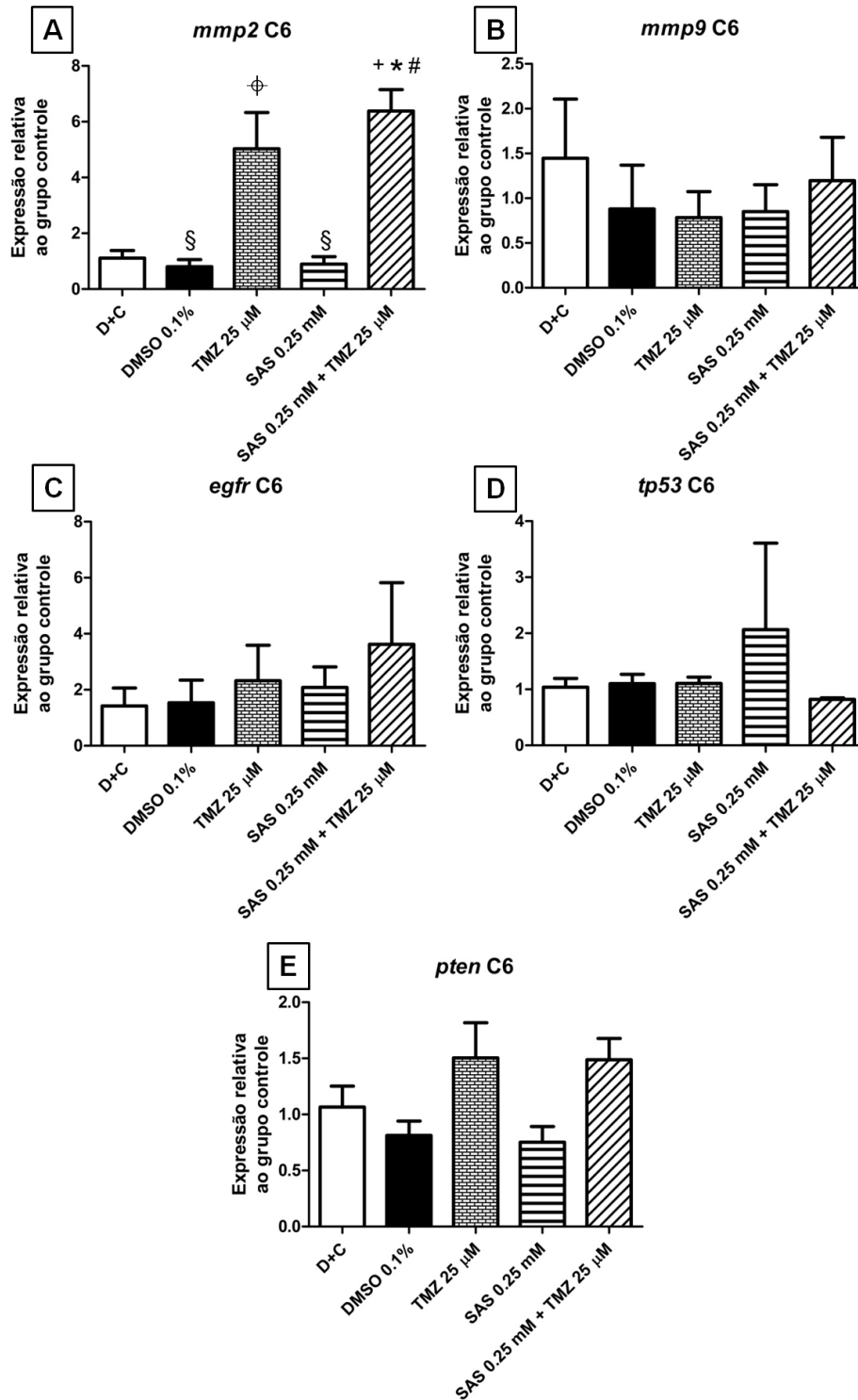


FIGURA 23. Expressão relativa dos genes *mmp2*, *mmp9*, *egfr*, *tp53* e *pten* na linhagem de glioma de rato C6 após 3 dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Análise através de PCR em tempo real. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. D+C: grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado; DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. A expressão do gene *mmp2* foi significativamente maior nos grupos que receberam TMZ 25 μ M (+; * e #: $p < 0.001$ vs D+C, DMSO 0.1% e SAS 0.25 mM, respectivamente; ϕ : $p < 0.05$ vs D+C; ξ : $p < 0.01$ vs TMZ 25 μ M; ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

4.7. Análise de expressão gênica: Transcriptoma de células A172 tratadas com temozolamida e/ou sulfasalazina

O objetivo da realização desta análise foi obter informações sobre a expressão gênica de células de glioblastoma humano expostas a temozolamida, droga atualmente considerada como padrão para o tratamento de pacientes com este tumor (Stupp et al., 2005; Stupp et al., 2009), bem como à sulfasalazina. Até onde sabemos, não há relatos prévios sobre este tipo de análise em experimentos *in vitro* com células comerciais de glioblastoma. Além disso, os resultados obtidos com a reação de PCR em tempo real apresentaram grande variabilidade entre os experimentos e pudemos analisar com esta metodologia, apenas alguns genes (*EGFR*, *PTEN*, *TP53*, *MMP2* e *MMP9*). Sendo assim, realizamos uma avaliação complementar e mais abrangente de expressão gênica usando a técnica de transcriptoma, a qual permite a análise de milhares de genes ao mesmo tempo. Escolhemos a linhagem A172 pelo fato de ter apresentado resultados com maior reprodutibilidade em nossos experimentos. Com base nos dados de viabilidade celular, os grupos tratados com TMZ 25 μ M, SAS 0.5 mM e TMZ 25 μ M associado com SAS 0.5 mM foram selecionados para análise do transcriptoma.

A corrida de sequenciamento produziu em torno de 162.248.078 sequências de 2x100 pares de base (*paired-end reads*) sendo que, aproximadamente, 80% das bases sequenciadas apresentaram índice de qualidade acima de Q30. Como foi realizada a análise de 4 amostras por grupo tratado e 4 amostras controle (células expostas a meio de cultura suplementado contendo DMSO 0.1%), o total de amostras sequenciadas foi de 16. Assim, foram produzidas em média 10 milhões de sequências (*paired-end*) para cada amostra.

Os dados de expressão gênica foram processados utilizando-se o método de redução de dimensionalidade PCA e os resultados são mostrados graficamente na Figura 24, onde cada réplica biológica é representada por símbolos.

A comparação do transcriptoma das células tratadas com TMZ com aquele das células tratadas apenas com o veículo de diluição (DMSO 0.1%) indicou a existência de 1.018 genes diferencialmente expressos (558 genes “up”-regulados e 460 genes “down”-regulados). A mesma análise aplicada às células expostas a SAS ou TMZ associada com SAS, em comparação com células tratadas com veículo, evidenciou 575 (423 genes “up”-regulados e 152 genes “down”-regulados) ou 2368 (1200 genes “up”-regulados e 1168 genes “down”-regulados) genes diferencialmente expressos, respectivamente. Entre estes três conjuntos de genes diferencialmente expressos, 139 genes são comuns a todos os grupos, enquanto que 233 genes são diferencialmente expressos exclusivamente no grupo TMZ, 173 genes são diferencialmente modulados apenas no

grupo SAS e 1.334 genes têm sua expressão alterada apenas no grupo tratado com a associação de TMZ com SAS (Figura 24).

Além disso, considerando-se o mecanismo de ação da TMZ e da SAS (alquilação do DNA e inibição do sistema X_c^- , respectivamente), calculou-se o enriquecimento de vias biológicas para o conjunto de genes diferencialmente expressos utilizando Metacore® (Thomas-Reuter) (Figura 25 e Anexo 1). Com relação aos genes “down”-regulados pelo tratamento com TMZ, foram encontradas 17 vias que enriqueceram significativamente, principalmente vias envolvidas com o ciclo celular. A combinação de drogas, considerando os genes “down”-regulados, mostrou 20 vias enriquecidas, sendo que a maioria coincide com aquelas moduladas pelo tratamento com TMZ. Por sua vez, a exposição das células apenas a SAS não indicou vias enriquecidas considerando genes “down”-regulados (Figura 25 e Anexo 1).

Com relação aos genes “up”-regulados, o tratamento apenas com SAS levou ao enriquecimento de 7 vias, as quais são envolvidas principalmente com metabolismo de aminoácidos, glutathiona e sistema de defesa antioxidante. A associação de TMZ com SAS modulou de forma significativa 5 vias biológicas, entre elas a de defesa antioxidante. Este resultado foi semelhante ao observado no grupo que foi tratado apenas com SAS. Além disso, apesar de o co-tratamento com TMZ e SAS não enriquecer a via do metabolismo da glutathiona, houve regulação significativa de alguns genes que fazem parte desta via. Por fim, considerando-se os genes “up”-regulados, a exposição apenas a TMZ não promoveu o enriquecimento de vias celulares (Figura 25 e Anexo 1).

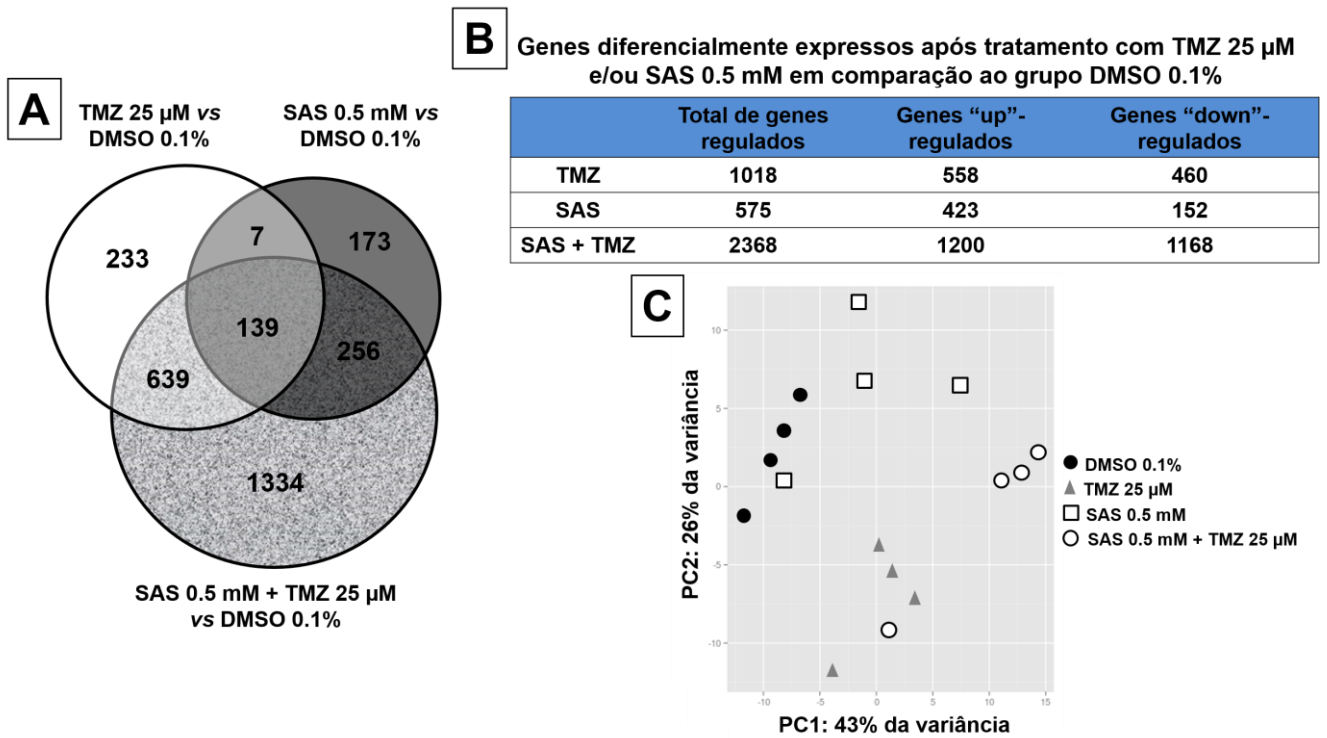
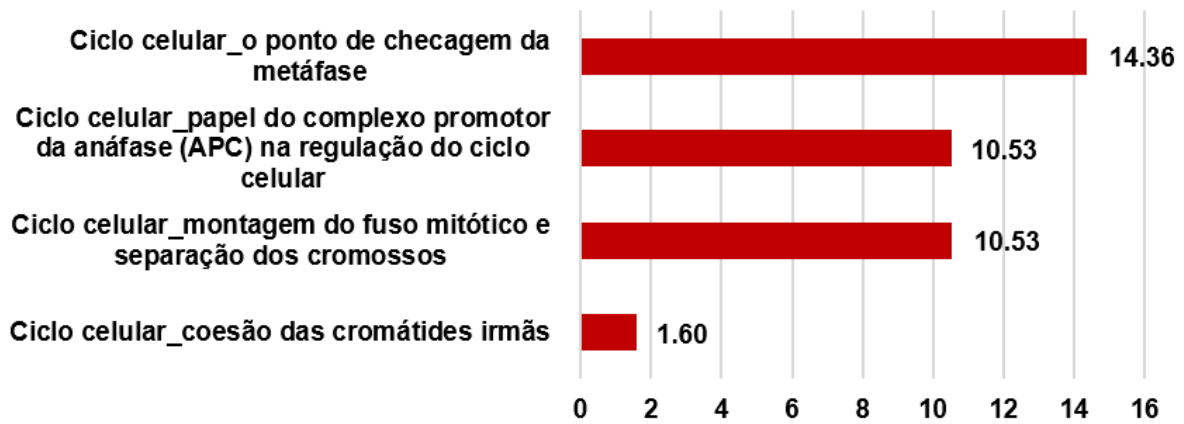


FIGURA 24. Análise de expressão gênica em larga escala na linhagem de glioblastoma humano A172 após 3 dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). (A) O diagrama de Venn mostra o número de genes diferencialmente expressos em cada grupo experimental em comparação com as células que receberam apenas meio de cultura suplementado contendo 0.1 % de DMSO. Notar que o grupo que recebeu TMZ associada com SAS possui o maior número de genes exclusivamente regulados (1.334), seguido por aquele tratado apenas com TMZ (233) e, por fim, pelo grupo exposto apenas a SAS (173). (B) A tabela apresenta o número de genes “up” e “down”-regulados dentro do total de genes diferencialmente expressos. (C) Os dados de expressão gênica foram processados usando o método de redução de dimensionalidade PCA. Os resultados são apresentados graficamente e demonstram a segregação de cada amostra. Cada símbolo diferente indica um tratamento (n = 4 para cada grupo experimental).

A

TMZ 25 μ M vs DMSO 0.1%
Vias enriquecidas contendo genes "down"-
regulados

**B**

SAS 0.5 mM+TMZ 25 μ M vs DMSO 0.1%
Vias enriquecidas contendo genes "down"-
regulados

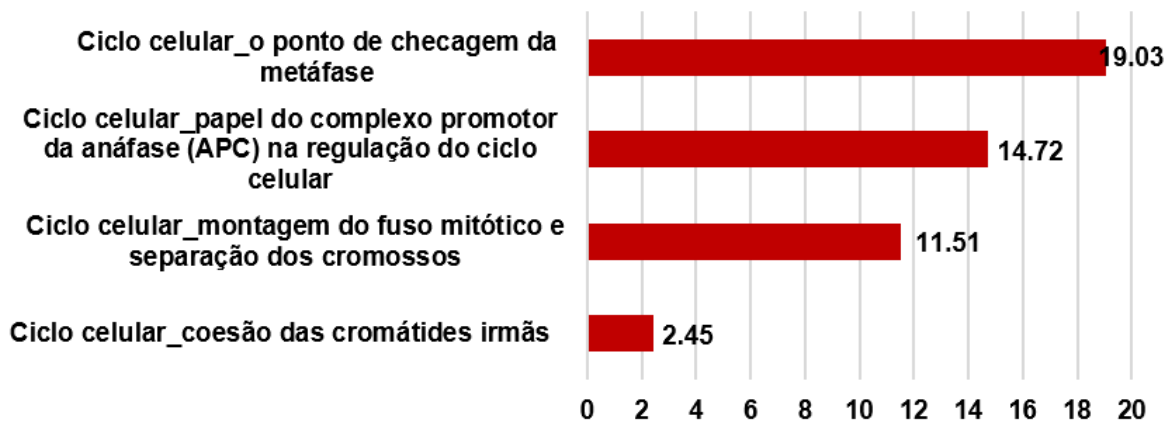
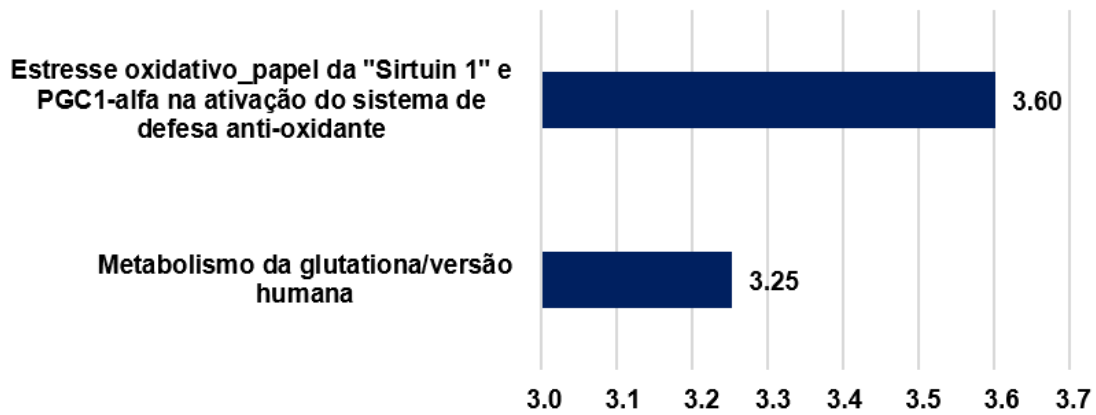


FIGURA 25. (A-D) Gráficos que mostram vias biológicas enriquecidas contendo os genes diferencialmente expressos representados no diagrama de Venn na Figura 24, após 3 dias de tratamento com TMZ 25 μ M e/ou SAS 0.5 mM. Em cada gráfico, o eixo X apresenta os valores obtidos através da equação $-\log(p \text{ valor ajustado})$. Desta forma, vias enriquecidas associadas com valores superiores a $-\log(0.05) = 1.30$ foram consideradas estatisticamente significativas. Estão apresentadas nesta figura as vias significativas que foram consideradas relevantes para a discussão dos resultados considerando o mecanismo de ação de cada droga. As demais vias enriquecidas são apresentadas no Anexo 1.

C

SAS 0.5 mM vs DMSO 0.1%
Vias enriquecidas contendo genes "up"-
regulados

**D**

SAS 0.5 mM + TMZ 25 µM vs DMSO 0.1%
Vias enriquecidas contendo genes "up"-
regulados

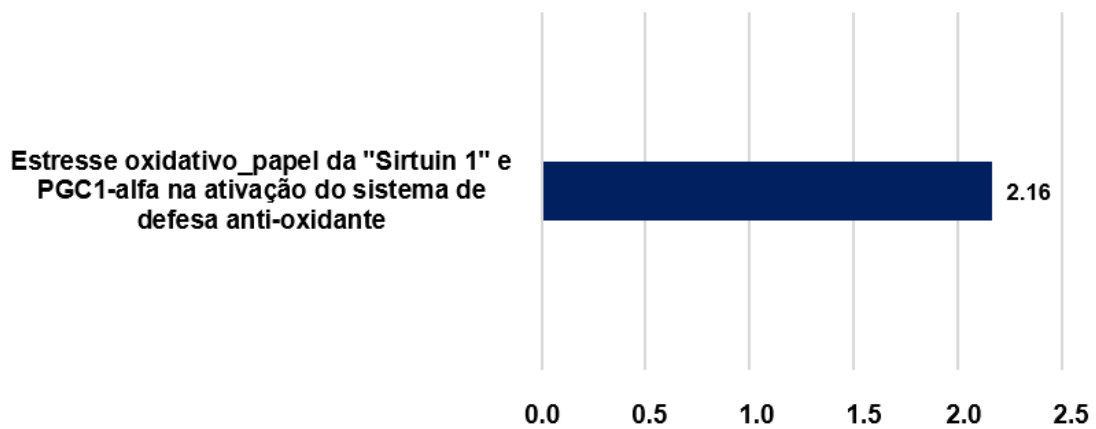


FIGURA 25. Continuação. (A-D) Gráficos que mostram vias biológicas enriquecidas contendo os genes diferencialmente expressos representados no diagrama de Venn na Figura 24, após 3 dias de tratamento com TMZ 25 µM e/ou SAS 0.5 mM. Em cada gráfico, o eixo X apresenta os valores obtidos através da equação $-\log(p \text{ valor ajustado})$. Desta forma, vias enriquecidas associadas com valores superiores a $-\log(0.05) = 1.30$ foram consideradas estatisticamente significativas. Estão apresentadas nesta figura as vias significativas que foram consideradas relevantes para a discussão dos resultados considerando o mecanismo de ação de cada droga. As demais vias enriquecidas são apresentadas no Anexo 1.

4.8. Atividade enzimática das metaloproteinases 2 e 9

A atividade das metaloproteinases 2 (MMP2) e 9 (MMP9) liberadas no meio de cultura foi detectada através da técnica de zimografia, após três ou cinco dias de tratamento. Através desta técnica, são visualizadas bandas com pesos moleculares distintos (MMP2: 72 kDa; MMP9: 92 kDa) em gel de poliacrilamida corado com Coomassie Blue. Com relação às linhagens humanas (U87MG, A172 e T98G), a atividade de cada enzima não foi modificada após três ou cinco dias de tratamento com temozolamida e/ou sulfasalazina, em comparação com o grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado ou com o grupo DMSO 0.1%. Especificamente para a linhagem U87MG, não foi possível detectar e, portanto, quantificar a atividade enzimática da MMP9 após os dois tempos de tratamento (Figuras 26 a 30).

Por sua vez, as análises de densitometria das bandas das células de glioma de rato (C6) revelaram, após três dias de tratamento, aparente redução de atividade da enzima MMP9 nos grupos SAS 0.5 mM e TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM em relação ao grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado ou exposto a meio com o veículo de diluição da TMZ (DMSO 0.1%). No entanto, tal redução não foi estatisticamente significativa. Após cinco dias de tratamento, a atividade da enzima MMP9 apresentou diminuição no grupo TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM em relação às células que receberam meio de cultura com o veículo de diluição da TMZ. Especificamente, houve redução de cerca de 40% da atividade enzimática. Tendência de redução semelhante foi observada no grupo SAS 0.5 mM, embora não tenha sido verificada diferença estatística (Figuras 31 e 32).

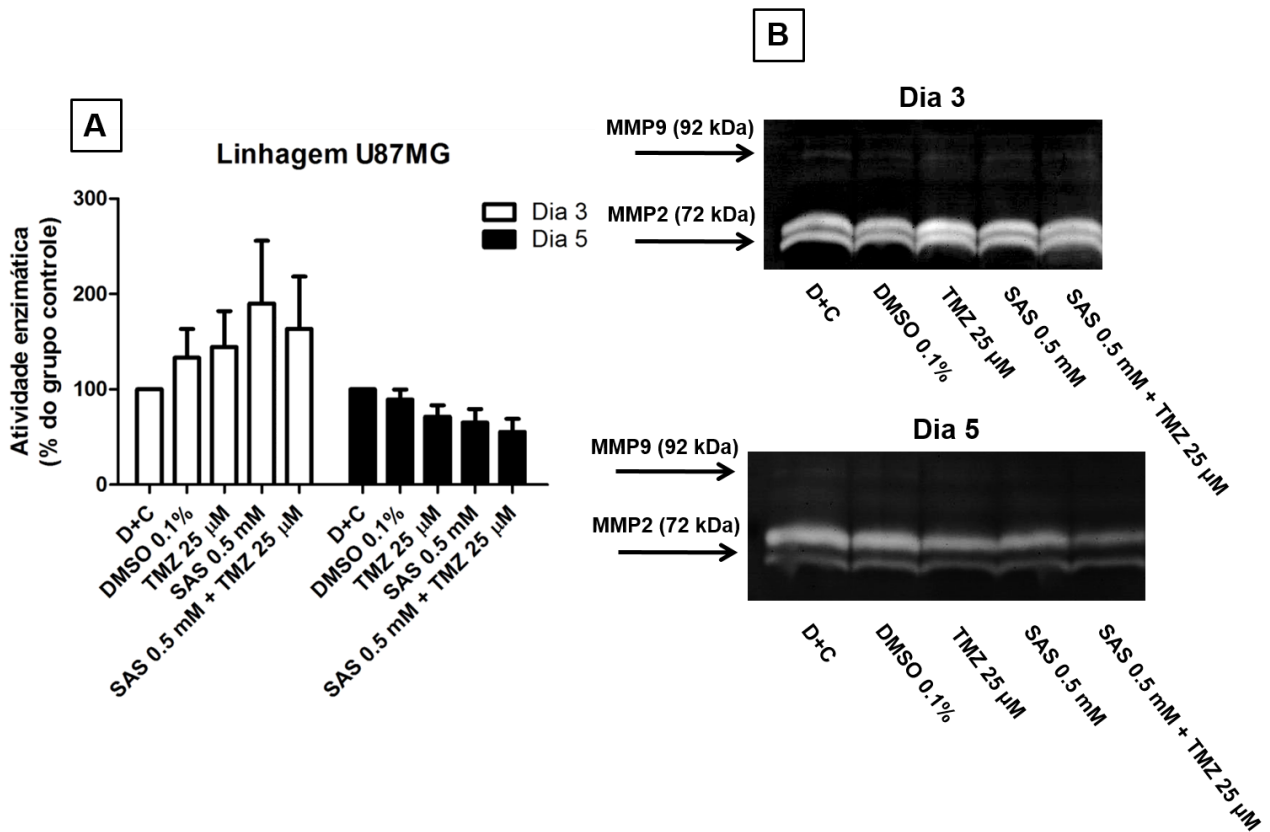


FIGURA 26. Atividade da metaloproteinase 2 (MMP2) na linhagem de glioblastoma humano U87MG, após 3 ou 5 dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Análise do meio de cultura através de zimografia. Em A, os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média da porcentagem da atividade enzimática em relação ao grupo que recebeu meio de cultura suplementado apenas (D+C: grupo controle; 100%). Foram realizados três experimentos independentes. Em B, gel de poliácridamida corado com Coomassie Blue representativo dos experimentos. Observar que a banda correspondente à metaloproteinase 9 (MMP9) não foi eficientemente detectada por esta técnica. DMSO 0.1%: grupo que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. Os tratamentos realizados não alteraram a atividade enzimática da MMP2, em relação ao grupo D+C ou em relação ao grupo DMSO 0.1% (ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

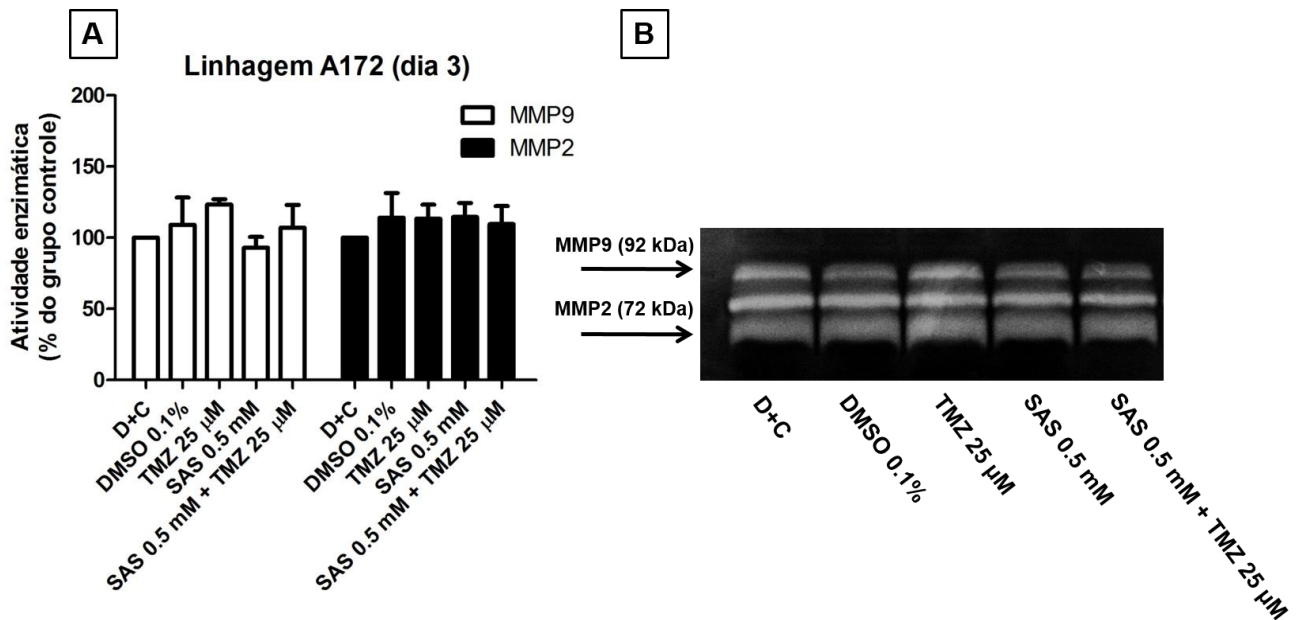


FIGURA 27. Atividade das metaloproteinasas 2 e 9 (MMP2 e MMP9) na linhagem de glioblastoma humano A172, após 3 dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Análise do meio de cultura através de zimografia. Em A, valores expressos como média \pm erro padrão da média da porcentagem da atividade enzimática em relação ao grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado (D+C: grupo controle; 100%), após três experimentos independentes. Em B, gel representativo dos experimentos. DMSO 0.1%: grupo que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. Considerando-se tanto a atividade da MMP2, quanto da MMP9, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais avaliados (ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

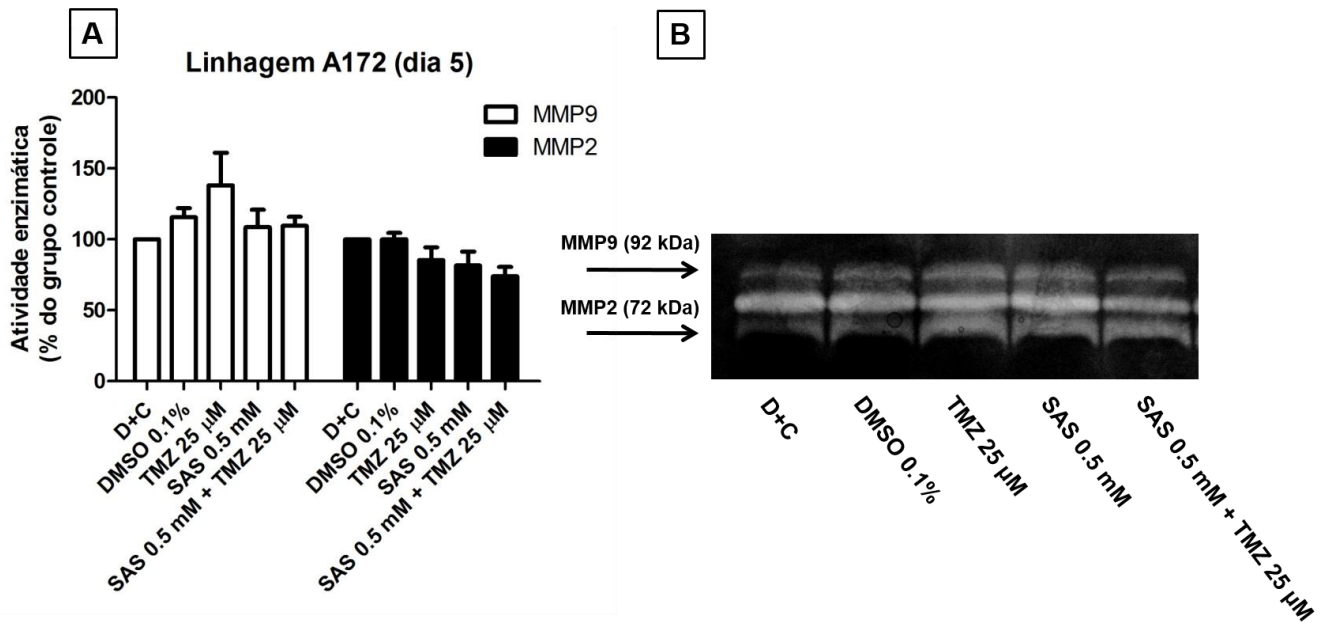


FIGURA 28. Atividade das metaloproteinasas 2 e 9 (MMP2 e MMP9) na linhagem de glioblastoma humano A172, após 5 dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Análise do meio de cultura através de zimografia. Em A, valores expressos como média \pm erro padrão da média da porcentagem da atividade enzimática em relação ao grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado (D+C: grupo controle; 100%), após três experimentos independentes. Em B, gel representativo dos experimentos. DMSO 0.1%: grupo que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. Considerando-se tanto a atividade da MMP2, quanto da MMP9, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais avaliados (ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

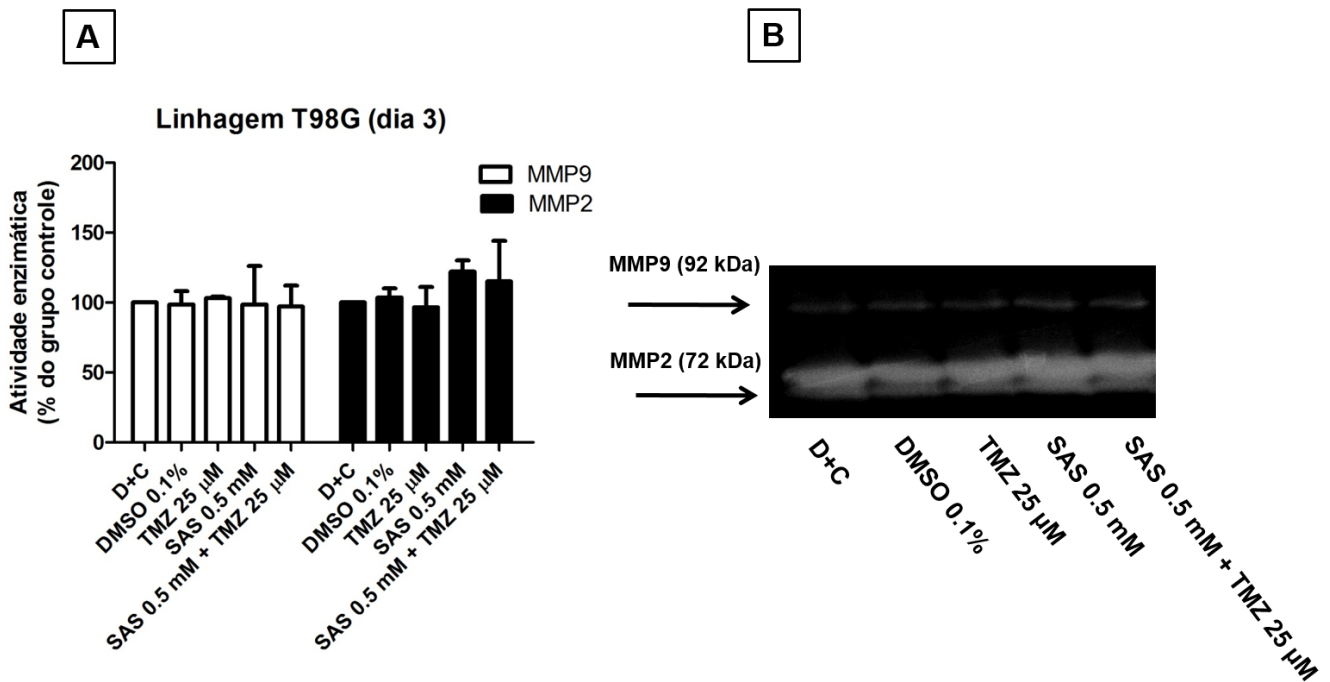


FIGURA 29. Atividade das metaloproteinases 2 e 9 (MMP2 e MMP9) na linhagem de glioblastoma humano T98G, após 3 dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Análise do meio de cultura através de zimografia. Em A, valores expressos como média \pm erro padrão da média da porcentagem da atividade enzimática em relação ao grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado (D+C: grupo controle; 100%), após três experimentos independentes. Em B, gel representativo dos experimentos. DMSO 0.1%: grupo que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. Os tratamentos realizados não alteraram as atividades enzimáticas (ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

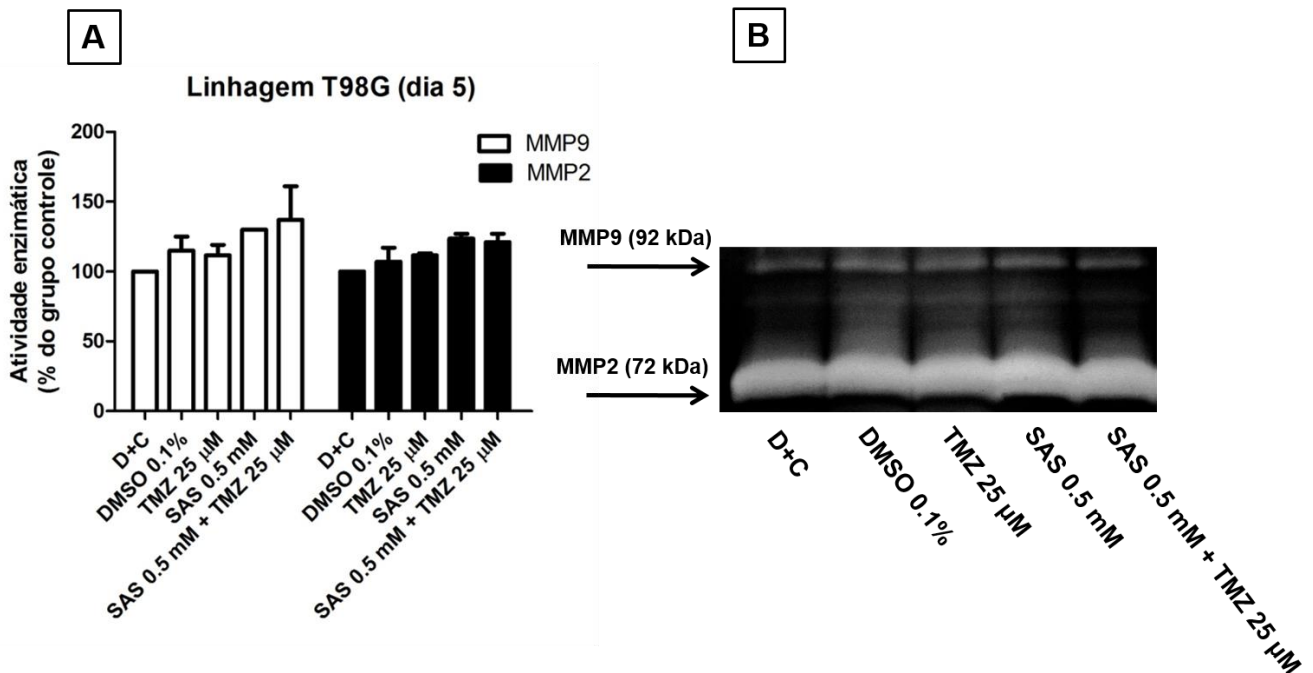


FIGURA 30. Atividade das metaloproteinases 2 e 9 (MMP2 e MMP9) na linhagem de glioblastoma humano T98G, após 5 dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Análise do meio de cultura através de zimografia. Em A, valores expressos como média \pm erro padrão da média da porcentagem da atividade enzimática em relação ao grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado (D+C: grupo controle; 100%), após três experimentos independentes. Em B, gel representativo dos experimentos. DMSO 0.1%: grupo que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. Os tratamentos realizados não alteraram as atividades enzimáticas (ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

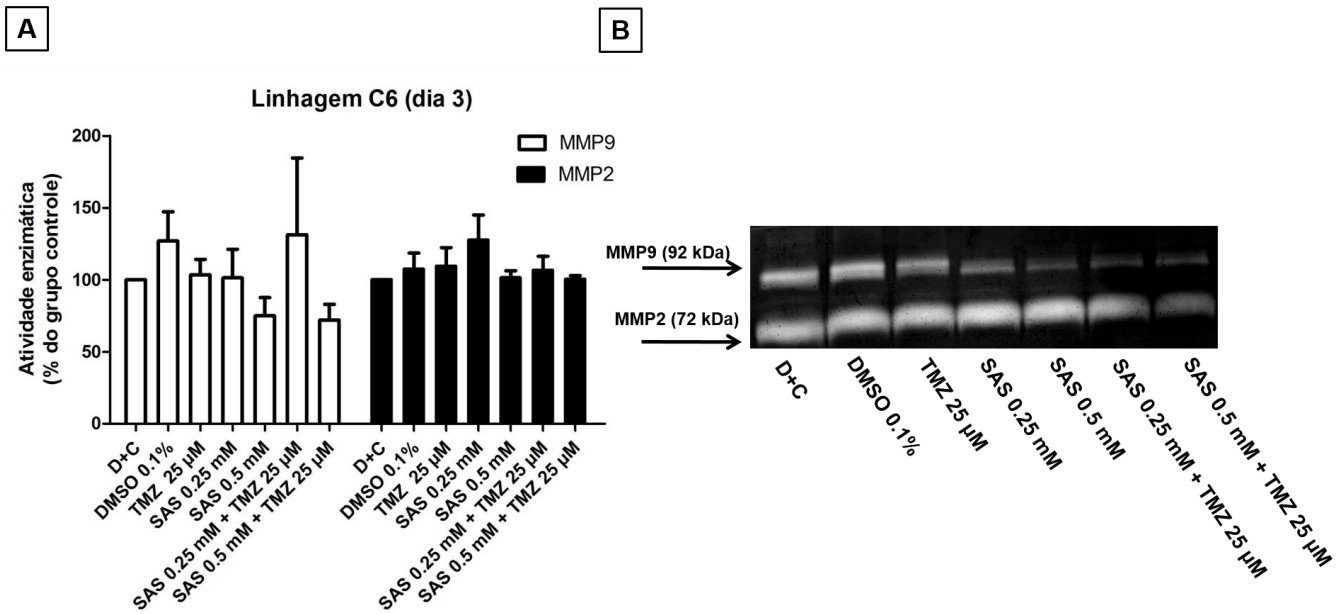


FIGURA 31. Atividade das metaloproteinases 2 e 9 (MMP2 e MMP9) na linhagem de glioma de rato C6, após 3 dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Análise do meio de cultura através de zimografia. Em A, valores expressos como média \pm erro padrão da média da porcentagem da atividade enzimática em relação ao grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado (D+C: grupo controle; 100%), após ao menos três experimentos independentes. Em B, gel representativo dos experimentos. DMSO 0.1%: grupo que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. Os tratamentos realizados não alteraram as atividades enzimáticas (ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

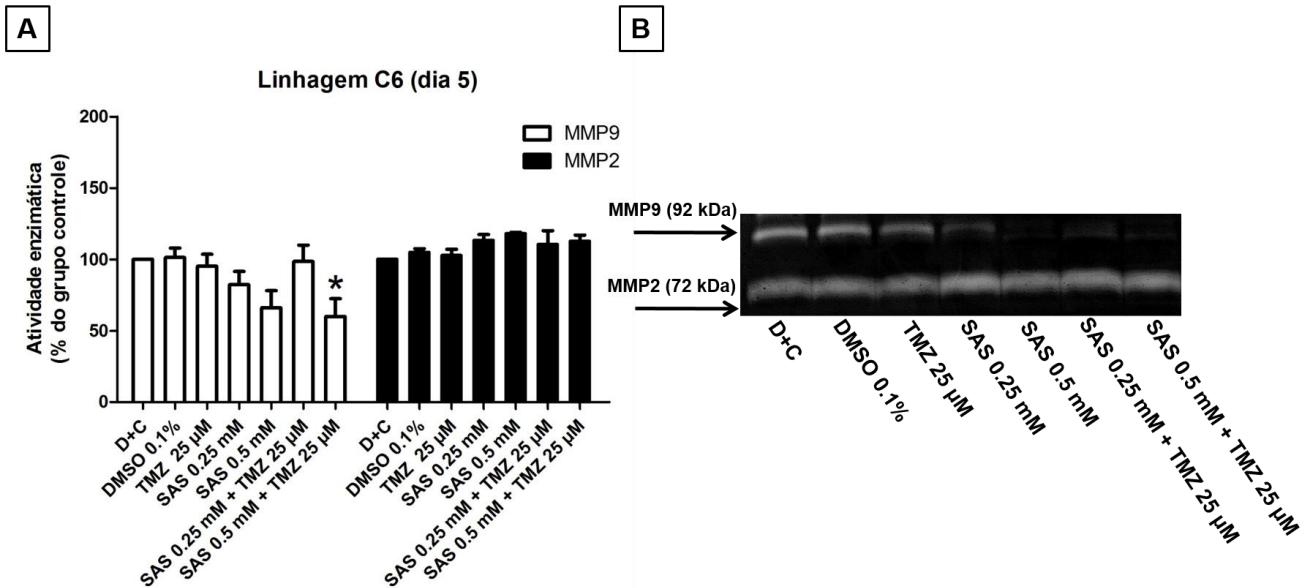


FIGURA 32. Atividade das metaloproteinasas 2 e 9 (MMP2 e MMP9) na linhagem de glioma de rato C6, após 5 dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Análise do meio de cultura através de zimografia. Em A, valores expressos como média \pm erro padrão da média da porcentagem da atividade enzimática em relação ao grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado (D+C: grupo controle; 100%), após quatro a oito experimentos independentes. Em B, gel representativo dos experimentos. DMSO 0.1%: grupo que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. Asterisco indica diferença estatística ($p < 0.05$) em relação ao grupo DMSO 0.1% (ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

4.9. Quantificação da glutatona total

4.9.1. Linhagem U87MG

Após três dias de tratamento, os valores de glutatona total do grupo veículo da TMZ (DMSO 0.1%) não diferiram do grupo exposto apenas ao meio de cultura suplementado (D+C). Embora exista redução numérica dos níveis de glutatona total nos grupos tratados com SAS 0.5 mM apenas ou associada com TMZ 25 μ M, em relação às células dos grupos D+C e DMSO 0.1%, não houve alterações estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (Figura 33).

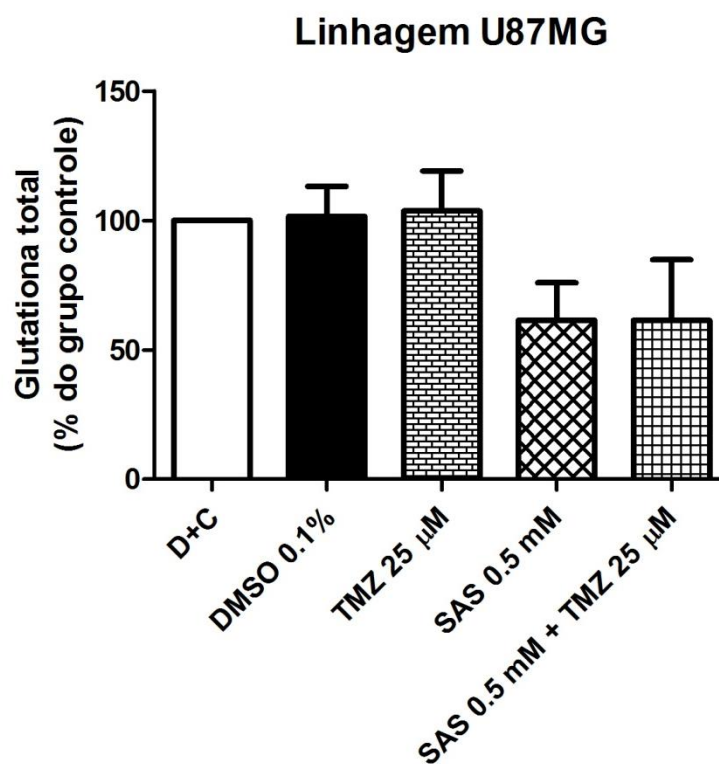


FIGURA 33. Análise do conteúdo de glutatona total na linhagem de glioblastoma humano U87MG após três dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de quatro experimentos independentes. D+C: grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado; DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais. ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

4.9.2. Linhagem A172

Após três dias de tratamento, verificou-se que os valores de glutathiona total do grupo veículo da TMZ (DMSO 0.1%) não diferiram do grupo exposto apenas ao meio de cultura suplementado (D+C). No que se refere à temozolamida, observou-se que a quantidade de glutathiona total não foi alterada pela administração de TMZ 25 μ M. De fato, os valores do grupo TMZ 25 μ M não diferiram estatisticamente em relação ao grupo D+C, nem ao grupo DMSO 0.1%. Já a SAS apresentou efeito pronunciado sobre a quantidade de glutathiona total intracelular. A administração de 0.5 mM de SAS ocasionou queda aproximada de 93% dos níveis de glutathiona em relação ao grupo de células expostas apenas ao meio de cultura suplementado. Ainda, a co-administração de TMZ e SAS não ocasionou alteração do efeito observado devido à administração de SAS apenas (Figura 34).

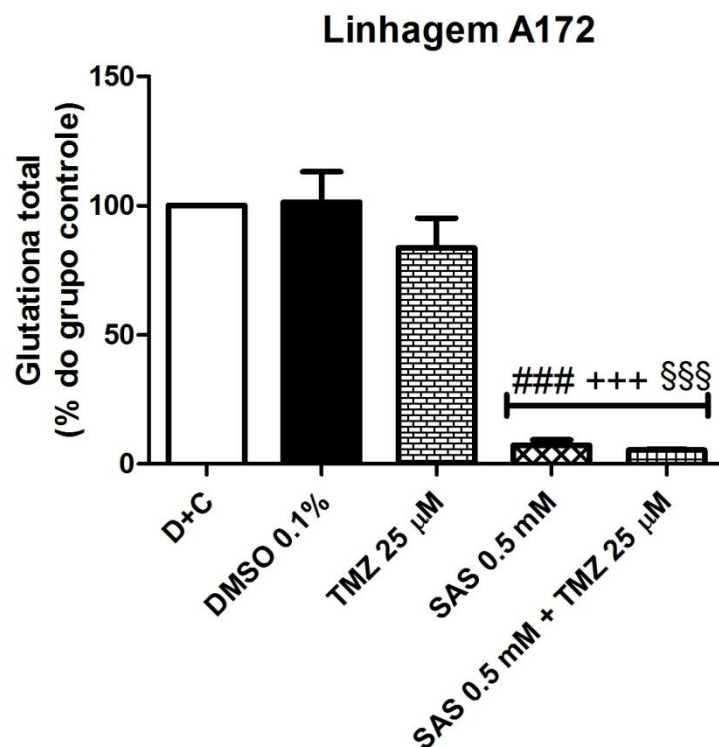


FIGURA 34. Análise do conteúdo de glutathiona total na linhagem de glioblastoma humano A172 após três dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). A quantidade de glutathiona total apresentou drástica redução devido à administração de 0.5 mM de SAS, mas não foi influenciada pelo tratamento com TMZ. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. D+C: grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado; DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. #: vs. D+C; +: vs DMSO 0.1% e §: vs TMZ 25 μ M. Três símbolo indicam $p < 0.001$. ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

4.9.3. Linhagem T98G

Nas células da linhagem T98G não foi observada alteração significativa da quantidade de glutatona intracelular após tratamento por três dias com as drogas indicadas, isoladas ou em associação, com relação aos grupos expostos ao meio de cultura suplementado ou contendo o veículo de diluição da temozolamida (Figura 35).

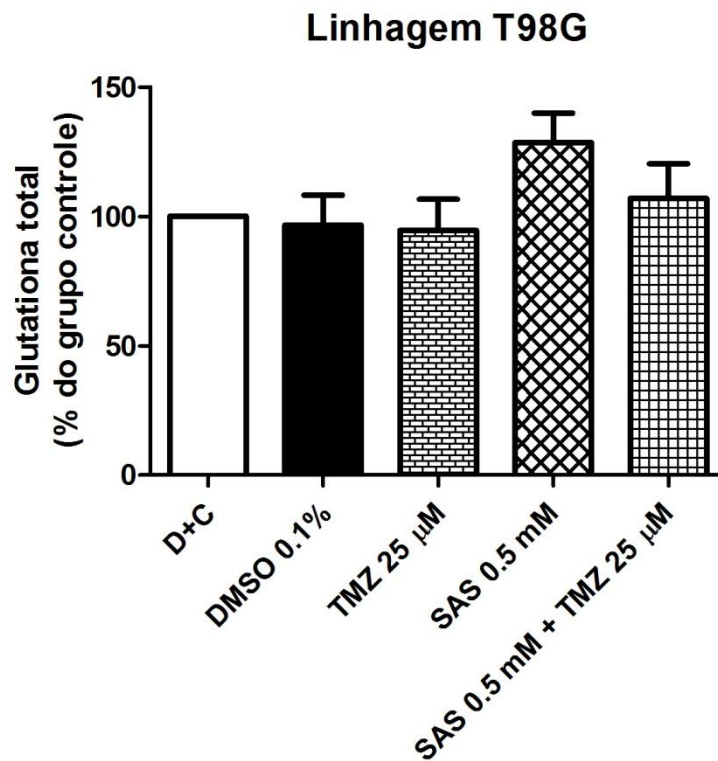


FIGURA 35. Análise do conteúdo de glutatona total na linhagem de glioblastoma humano T98G após três dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três a seis experimentos independentes. D+C: grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado; DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais. ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

4.9.4. Linhagem C6

Após três dias de tratamento, verificou-se que os valores de glutatona total do grupo de células que recebeu meio de cultura contendo 0.1% de DMSO não diferiram do grupo exposto apenas ao meio de cultura suplementado. Com relação à temozolamida, observou-se que a quantidade de glutatona total não foi alterada pela administração de TMZ 25 µM. De fato, os níveis de glutatona das células com este tratamento não diferiram daqueles dos grupos que receberam

apenas meio de cultura suplementado ou meio de cultura contendo 0.1% de DMSO. Por outro lado, a administração de SAS nas concentrações de 0.25 mM ou 0.5 mM levou à redução de 61% e 81%, respectivamente, em relação aos valores do grupo que recebeu apenas meio de cultura (D+C). Não houve diferença estatística entre as concentrações de 0.25 e 0.5 mM de SAS. Ainda, a co-administração de TMZ e SAS não demonstrou aumento do efeito observado devido à SAS administrada isoladamente (Figura 36).

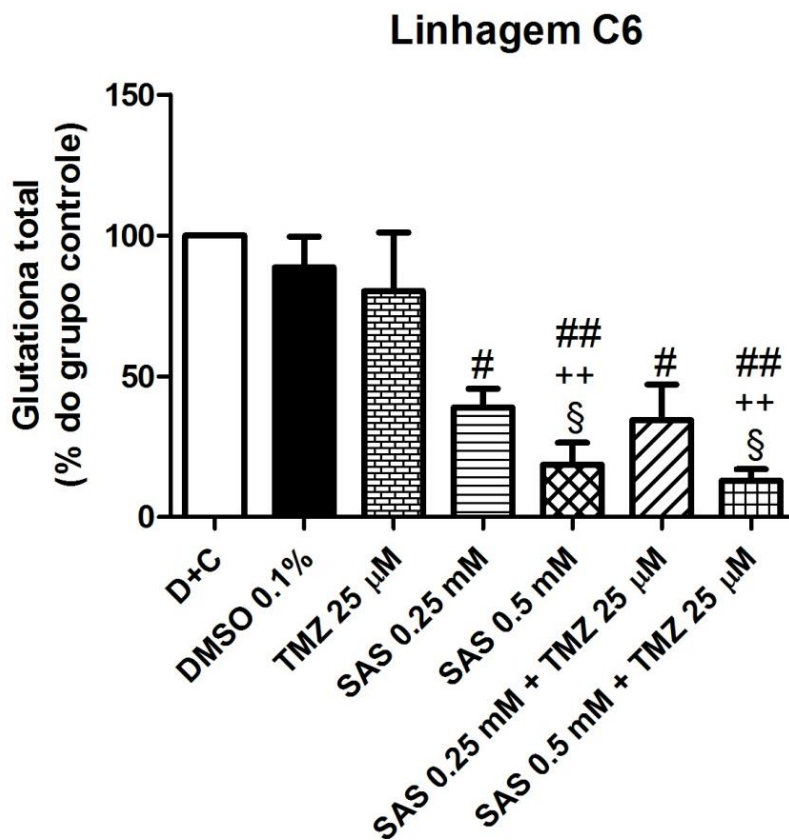


FIGURA 36. Análise do conteúdo de glutathiona total na linhagem de glioma de rato C6 após três dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). A quantidade de glutathiona total foi reduzida pela administração de SAS 0.25 mM ou SAS 0.5 mM e não foi influenciada pelo tratamento com TMZ. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. D+C: grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado; DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. #: vs. D+C; +: vs DMSO 0.1% e §: vs TMZ 25 µM. Um ou dois símbolo(s) indica(m) $p < 0.05$ e $p < 0.01$, respectivamente. ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

4.10. Análise de peroxidação lipídica: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

4.10.1. Linhagem U87MG

Após três dias de tratamento, observamos diminuição significativa dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos grupos experimentais que receberam SAS isoladamente ou associada com TMZ, em relação às células que foram expostas apenas ao meio de cultura (53.2%, 67.4% e 100%, respectivamente) (Figura 37).

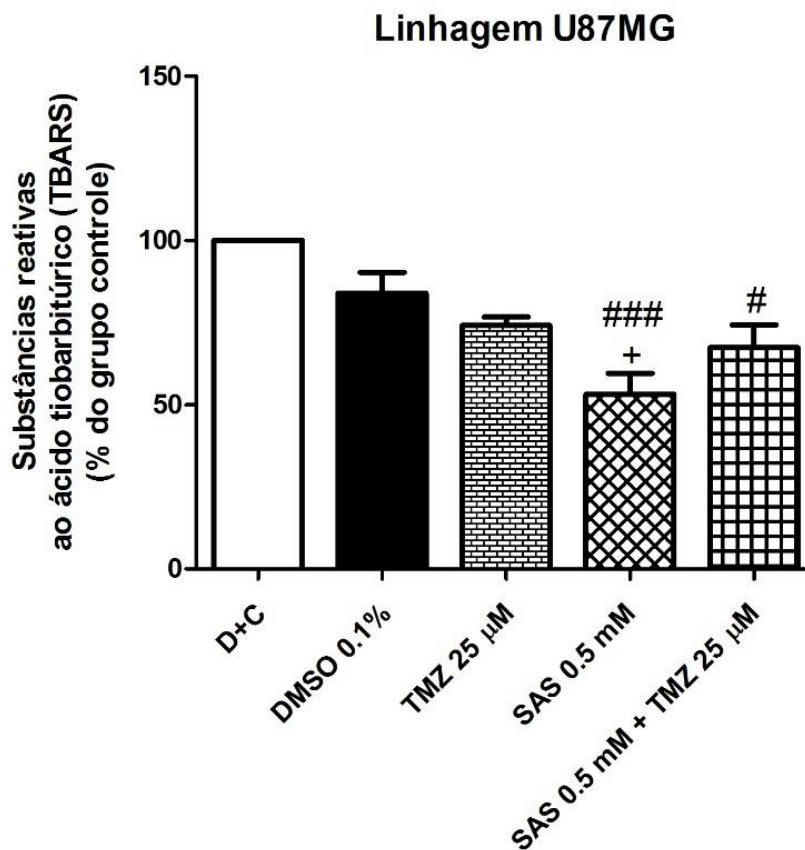


FIGURA 37. Detecção de peroxidação lipídica (TBARS) nas células de glioblastoma humano U87MG após três dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de quatro experimentos independentes. D+C: grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado (considerado como 100%); DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. #: vs D+C; +: vs DMSO 0.1%; Um ou três símbolo(s) indica(m) $p < 0.05$ e $p < 0.001$, respectivamente. ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

4.10.2. Linhagem A172

Com relação aos níveis de TBARS após três dias de tratamento das células A172, foi observada diferença significativa apenas entre o grupo tratado com TMZ associada com SAS e o grupo de células expostas a meio contendo apenas DMSO 0.1%. Especificamente, houve diminuição dos níveis no primeiro grupo, com relação ao segundo (62.3% vs 111%, respectivamente) (Figura 38).

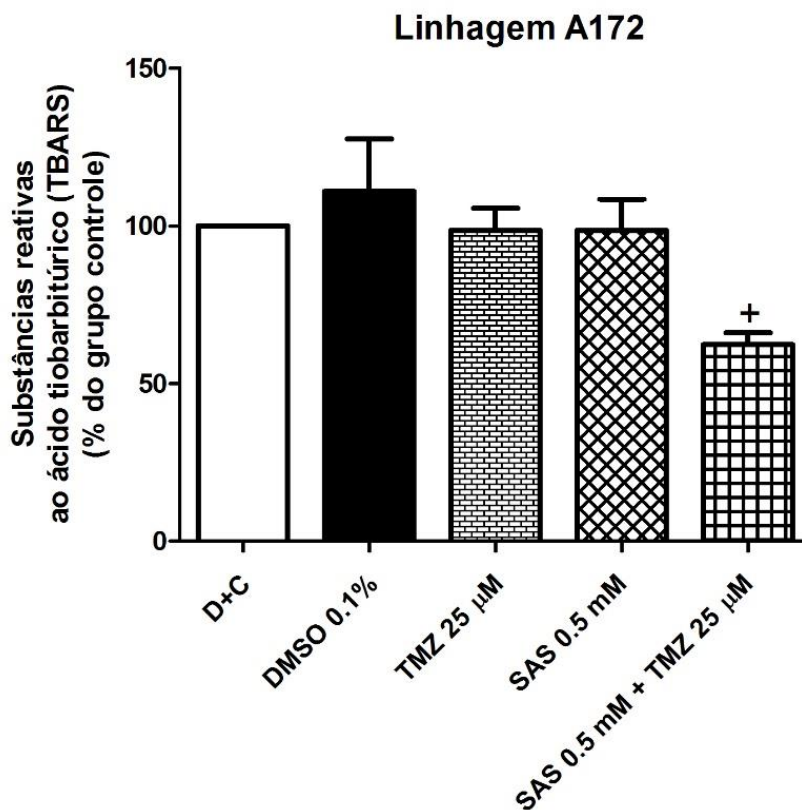


FIGURA 38. Detecção de peroxidação lipídica (TBARS) nas células de glioblastoma humano A172 após três dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de quatro experimentos independentes. D+C: grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado (considerado como 100%); DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. +: vs DMSO 0.1%; $p < 0.05$. ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

4.10.3. Linhagem T98G

A análise de peroxidação lipídica nas células T98G não revelou diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais, após três dias de tratamento (Figura 39).

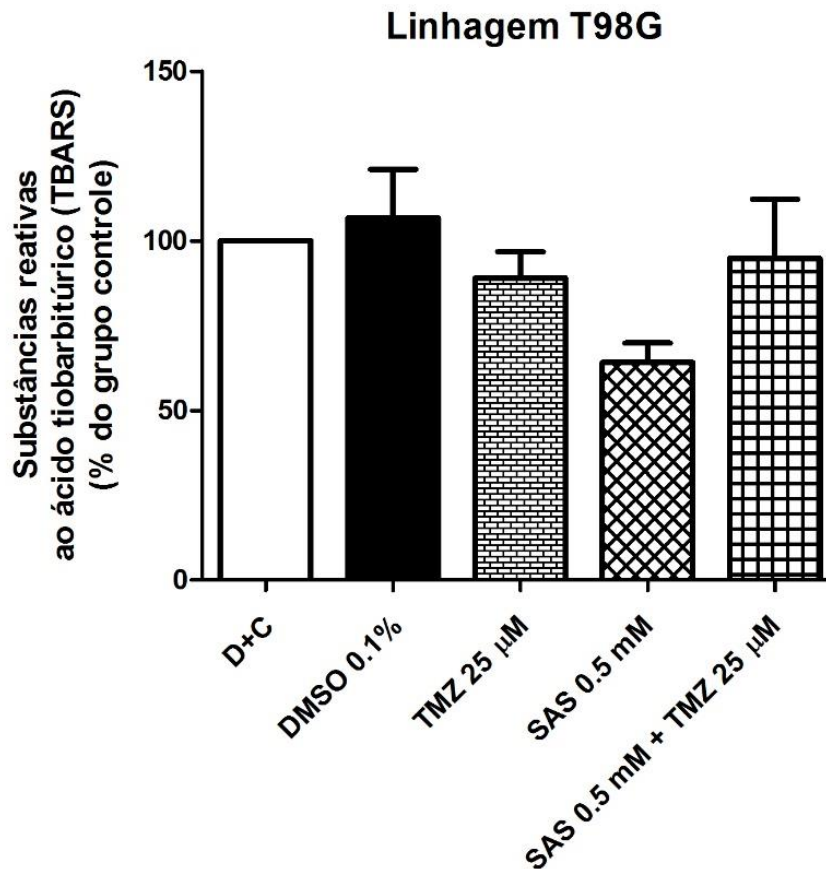


FIGURA 39. Detecção de peroxidação lipídica (TBARS) nas células de glioblastoma humano T98G após três dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. D+C: grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado (considerado como 100%); DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais. ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

4.10.4. Linhagem C6

Após três dias de exposição às drogas, os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) do grupo exposto apenas ao meio de cultura suplementado (D+C) não diferiram daqueles do grupo veículo da TMZ (DMSO 0.1%). Além disso, em comparação aos grupos D+C (100%) e DMSO 0.1% (99.3%), houve aumento significativo de peroxidação lipídica nos grupos tratados com SAS 0.5 mM apenas (238.9%) ou com a associação de TMZ e SAS 0.5 mM (239.6%).

Por sua vez, considerando-se a administração isolada de SAS, também se observou aumento significativo de peroxidação lipídica no grupo tratado com a maior concentração (0.5 mM), com relação àquele exposto à menor concentração (0.25 mM) (238.9% e 94.93%, respectivamente), indicando um efeito dose-dependente (Figura 40).

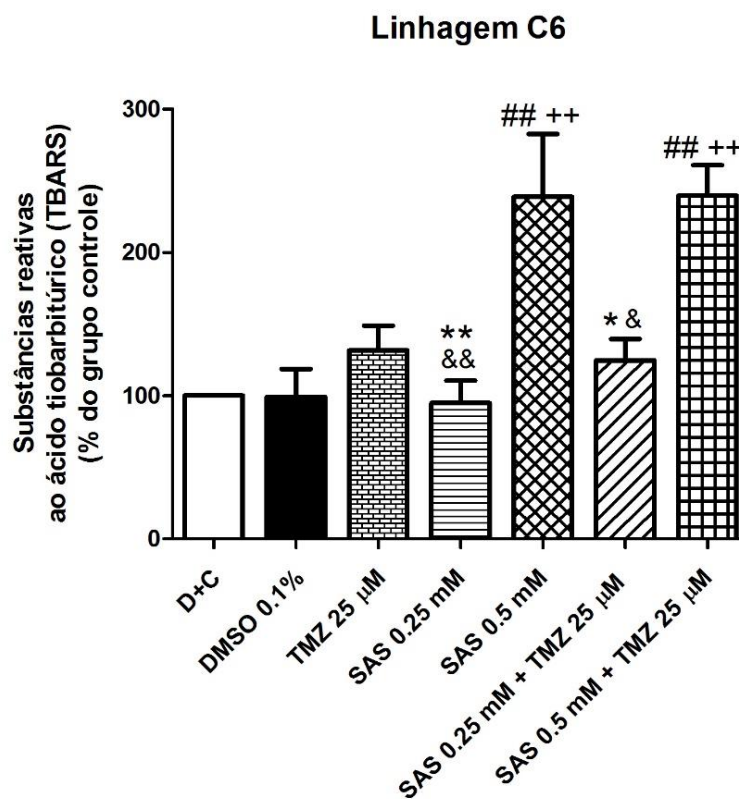


Figura 40. Detecção de peroxidação lipídica (TBARS) nas células de glioma de rato C6 após três dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de quatro experimentos independentes. D+C: grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado (considerado como 100%); DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. #: vs D+C; +: vs DMSO 0.1%; * vs SAS 0.5 mM; &: vs SAS 0.5 mM + TMZ 25 µM. Um ou dois símbolo(s) indica(m) $p < 0.05$ e $p < 0.01$, respectivamente. ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

4.11. Análise de proliferação celular: Western Blotting para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)

4.11.1. Linhagens U87MG, T98G e C6

A expressão da proteína PCNA foi avaliada após cinco dias de tratamento com as drogas TMZ e/ou SAS. Com relação às linhagens U87MG, T98G e C6, não foram detectadas alterações significativas entre os grupos estudados (Figuras 41 a 43). Especificamente, as células de glioma de rato (C6) foram aquelas que apresentaram a maior variabilidade de expressão protéica. Com relação a exposição da linhagem C6 a 0.5 mM de SAS, não foi possível identificar o padrão de bandas do Ponceau S com segurança, ainda que tal identificação tenha ocorrido nos demais grupos analisados na mesma membrana. Tal resposta pode ter sido decorrente da drástica redução da viabilidade celular determinada por esta concentração, conforme apresentado no item 4.3.

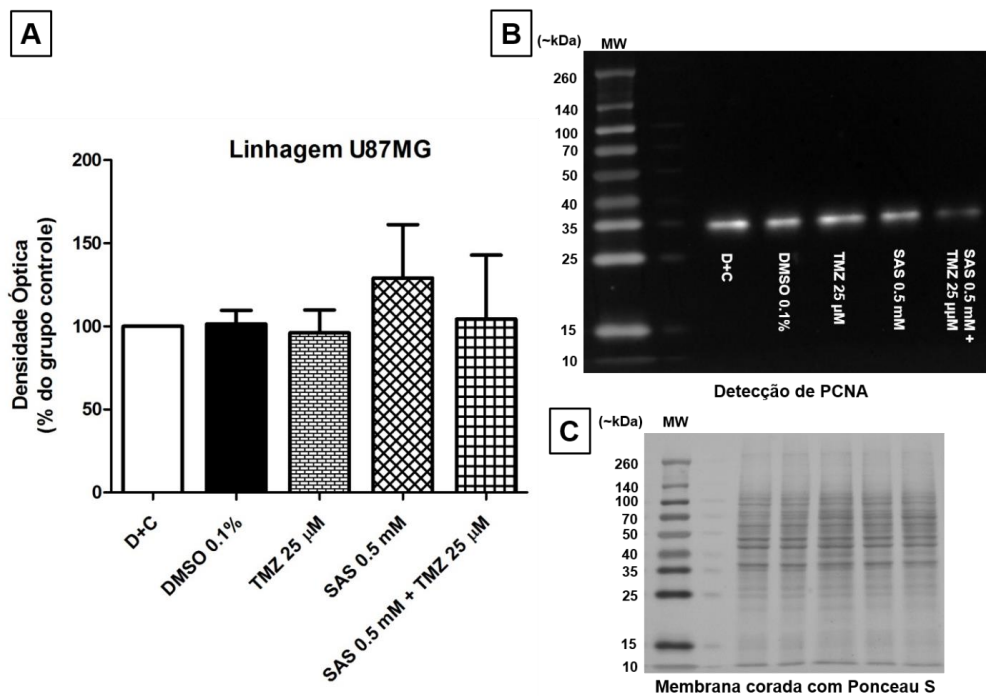


FIGURA 41. Análise da expressão da proteína PCNA na linhagem de glioblastoma humano U87MG após cinco dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). (A) O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. D+C: grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado; DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais. ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. (B) As bandas imunorreativas são de um experimento representativo (PCNA: ~36 kDa). (C) Membrana corada com Ponceau S mostrando a coloração de todas as proteínas do extrato celular. A ordem dos grupos experimentais é a mesma daquela apresentada na figura B. A densitometria de todas as bandas coradas com Ponceau S de cada grupo experimental foi utilizada como controle interno para o respectivo grupo. MW: peso molecular (kDa).

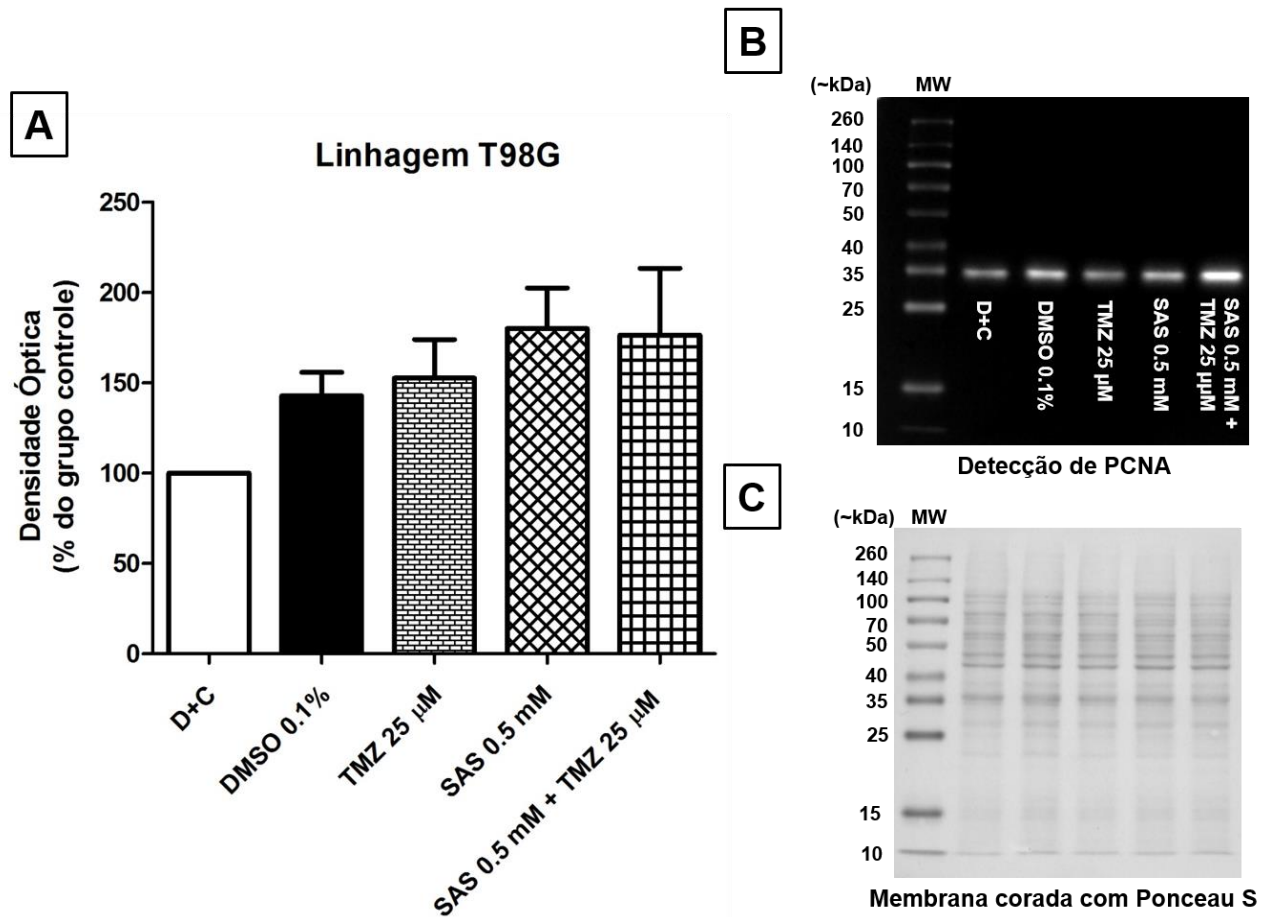


FIGURA 42. Análise da expressão da proteína PCNA na linhagem de glioblastoma humano T98G após cinco dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). (A) O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. D+C: grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado; DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais. ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. (B) As bandas de proteína são de um experimento representativo (PCNA: ~36 kDa). (C) Membrana corada com Ponceau S mostrando a coloração de todas as proteínas do extrato celular. A ordem dos grupos experimentais é a mesma daquela apresentada na figura B. A densitometria de todas as bandas coradas com Ponceau S de cada grupo experimental foi utilizada como controle interno para o respectivo grupo. MW: peso molecular (kDa).

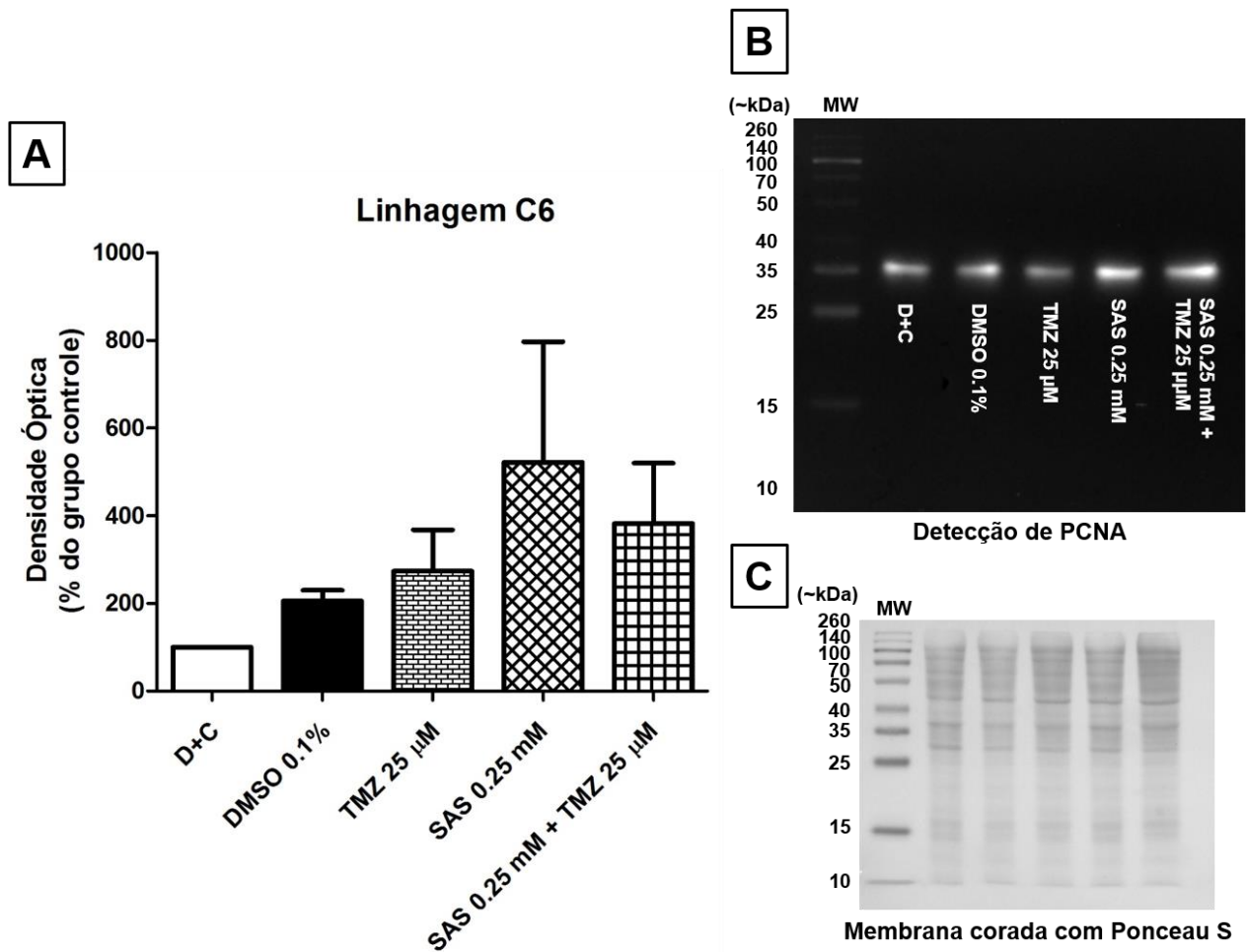


FIGURA 43. Análise da expressão da proteína PCNA na linhagem de glioma de rato C6 após cinco dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). (A) O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. D+C: grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado; DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais. ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. (B) As bandas de proteína são de um experimento representativo (PCNA: ~36 kDa). MW (molecular weight): peso molecular em kDa. (C) Membrana corada com Ponceau S mostrando a coloração de todas as proteínas do extrato celular. A ordem dos grupos experimentais é a mesma da apresentada na figura B. A densitometria de todas as bandas coradas com Ponceau S de cada grupo experimental foi utilizada como controle interno para o respectivo grupo. MW: peso molecular (kDa).

4.11.2. Linhagem A172

Não foi encontrada diferença de expressão da proteína PCNA entre os grupos que receberam meio suplementado (DMEM) apenas ou contendo DMSO 0.1%. Entretanto, houve redução significativa da expressão de PCNA após a exposição das células A172 a TMZ 25 μ M, comparado com o grupo DMSO 0.1% (53.5% vs 128.8%, respectivamente). Ainda, a administração conjunta de TMZ 25 μ M e SAS 0.5 mM reduziu a expressão de PCNA, em comparação com as células que receberam DMSO 0.1% (60% vs 128.8%, respectivamente). A expressão de PCNA após administração conjunta das drogas também diferiu daquela do grupo exposto apenas a SAS 0.5 mM (60% vs 135.8%, respectivamente). Além disso, a SAS isolada não alterou os níveis de PCNA (Figura 44).

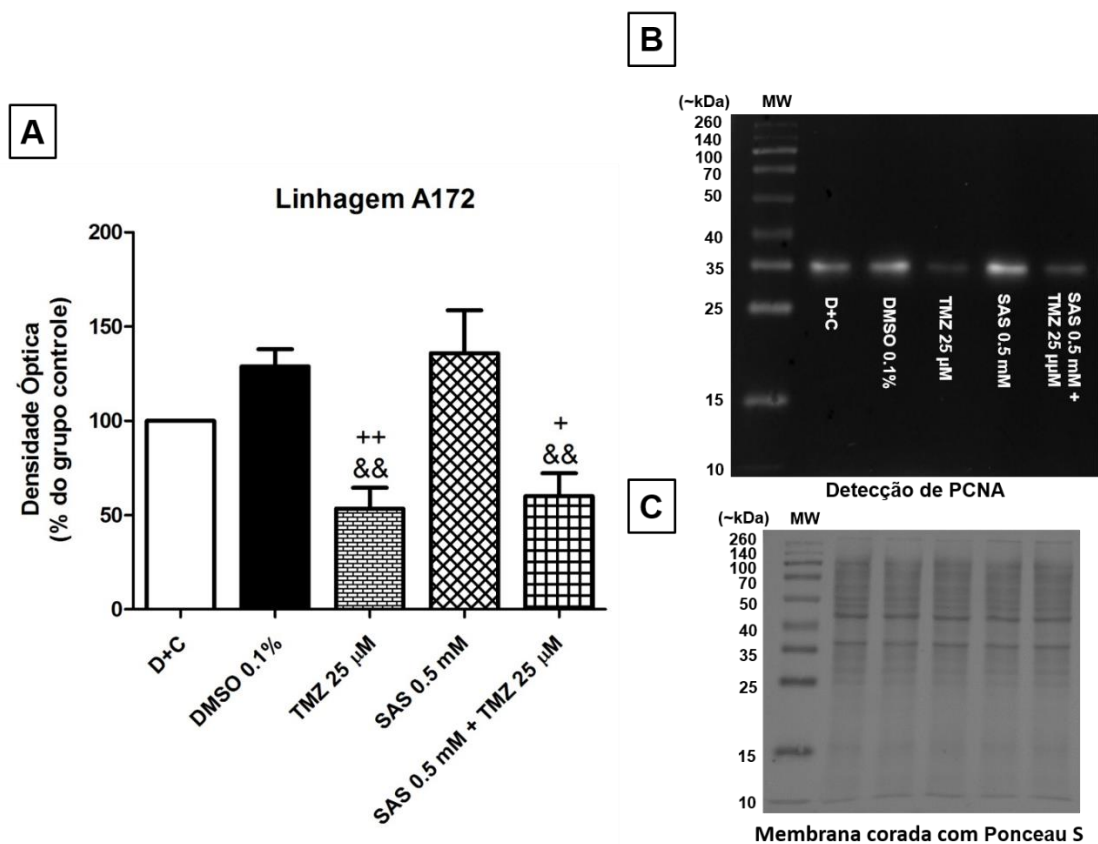


FIGURA 44. Análise da expressão da proteína PCNA na linhagem de glioblastoma humano A172 após cinco dias de tratamento com temozolomida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). (A) O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de seis experimentos independentes. D+C: grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado; DMSO 0.1%: grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado e o veículo de diluição da TMZ. +: vs DMSO 0.1%; &: vs SAS 0.5 mM. Um ou dois símbolos indica(m) $p < 0.05$ ou $p < 0.01$, respectivamente. ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. (B) As bandas de proteína são de um experimento representativo (PCNA: ~ 36 kDa). (C) Membrana corada com Ponceau S mostrando a coloração de todas as proteínas do extrato celular. A ordem dos grupos experimentais é a mesma da apresentada na figura B. A densitometria de todas as bandas coradas com Ponceau S de cada grupo experimental foi utilizada como controle interno para o respectivo grupo. MW: peso molecular (kDa).

5. DISCUSSÃO

5.1. Análise de viabilidade das células de glioma após administração de temozolamida e/ou sulfasalazina

Em nossos experimentos com a linhagem U87MG, observamos uma tendência à diminuição da viabilidade celular após a administração isolada - 25 ou 50 μM - de temozolamida (TMZ) por três ou cinco dias. No entanto, não foi observado efeito estatisticamente significativo destas concentrações. De maneira semelhante, Gabelloni et al. (2010), através de contagem de células viáveis, não verificaram alterações significativas de crescimento após plaqueamento de células na densidade de 3.000/cm² e tratamento por três dias com 50 μM de TMZ. Além disso, Sun et al. (2012), ao tratarem 15.000 células U87MG/cm² com TMZ por quatro dias, identificaram que a IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação às células não tratadas) foi de 1.021,38 μM . Esta última análise foi feita através de ensaio colorimétrico para quantificação da síntese proteica total das células. Por outro lado, Yoshino et al. (2010) expuseram 5.000 ou 10.000 células U87MG/cm² a TMZ por três dias e reportaram uma IC₅₀ de 23 μM , após contagem de células viáveis. Desta forma, encontram-se na literatura resultados variáveis a respeito da sensibilidade das células U87MG à TMZ. É possível que a variação seja decorrente de diferentes protocolos experimentais utilizados. De fato, condições experimentais (como origem das células; forma de preparo, diluição e administração da droga; densidade celular plaqueada e passagem utilizada) podem variar ou estarem indisponíveis, dificultando ou impedindo comparações detalhadas. De qualquer forma, baseamo-nos nos dados de Ostermann et al. (2004) e de Barazzuol et al. (2012) para utilizar concentrações *in vitro* que corresponderiam àquelas presentes no plasma de indivíduos com GBM em tratamento quimioterápico. Desta forma, nossos estudos mostraram que tais concentrações não reduzem significativamente a viabilidade destas células, conforme constatado por Gabelloni et al. (2010) e Sun et al. (2012). A obtenção deste dado, reforçou a importância da nossa investigação sobre os efeitos de associação da TMZ com outra droga sobre a viabilidade e função das células tratadas.

Em relação ao tratamento da linhagem U87MG apenas com sulfasalazina (SAS), observamos redução significativa da viabilidade celular após o tratamento com as concentrações de 0.50 mM e/ou 1.0 mM, sugerindo que a inibição do sistema X_c⁻ participe desta redução. De forma geral, outros pesquisadores reportam efeitos variáveis da SAS sobre o crescimento das células U87MG. Especificamente, após um dia de tratamento com 0.5 mM de SAS, Robe et al. (2004) verificaram redução de 50% da sobrevivência celular. A densidade celular inicial utilizada foi de

aproximadamente 30.000 células/cm², e a avaliação do efeito da droga, realizada através de teste colorimétrico (MTT). Porém, este resultado não foi reproduzido por Chung e Sontheimer (2009). Tais autores, ao utilizarem a mesma concentração de SAS, não observaram alterações significativas do crescimento celular, quantificado através de contagem de células (a densidade celular não foi informada). Desta forma, o fato de não termos observado efeito significativo das concentrações de 0.25 mM e 0.50 mM de SAS sobre a viabilidade celular após um dia de exposição (Figura 4) não corrobora os dados de Robe et al. (2004), mas sim aqueles de Chung e Sontheimer (2009). Como mencionado acima, é possível que os dados diferentes obtidos na literatura sejam decorrentes de variações entre os protocolos experimentais utilizados por grupos de pesquisa distintos. Especificamente, utilizamos meio DMEM com 2g/L de glicose e a densidade inicial de células foi de 10.000 células/cm². Por outro lado, o meio de cultura utilizado por Robe et al. (2004) foi RPMI suplementado com L-glutamina.

Após três dias de exposição celular a 0.5 mM e 1.0 mM de SAS (Figura 4), verificamos diminuição da viabilidade celular de 43% e 68%, respectivamente, em relação ao grupo tratado apenas com meio de cultura suplementado contendo o veículo de diluição da SAS. Após o mesmo intervalo de tempo, Chung e Sontheimer (2009) reportaram que 0.25 mM e 0.5 mM de SAS reduziram a viabilidade em cerca de 60% e 70%, respectivamente, em relação às células não tratadas. Por fim, após cinco dias de tratamento com SAS, observamos 57% e 90% de redução de viabilidade das células expostas a 0.5 mM e 1.0 mM de SAS, respectivamente. Depois de igual período, Chung et al. (2005) observaram que o tratamento com 0.5 mM de SAS causou morte celular por apoptose, avaliada por citometria de fluxo e ativação de caspase-3. Ainda, os mesmos autores relatam que a dose de 0.25 mM ocasionou redução de cerca de 80% da viabilidade celular em relação às células não tratadas. No entanto, ao utilizarmos esta mesma concentração, detectamos queda não significativa de aproximadamente 10% da viabilidade, com relação ao grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado contendo o veículo de diluição da SAS. Entendemos que a diferença na densidade de células utilizada por nós e por Chung et al. (2005) pode ter influenciado a obtenção de efeitos diferentes de redução do crescimento celular com a concentração de 0.25 mM. De fato, tais autores utilizaram 5.000 células/cm², ou seja, metade da densidade celular utilizada em nosso trabalho (10.000 células/cm²). É possível que a menor densidade, ao aumentar a superfície de contato das células com o meio de cultura, facilite o acesso da droga ao compartimento intracelular e leve a um maior efeito de redução da viabilidade.

No que se refere às associações de drogas avaliadas em nosso trabalho (item 4.3), é importante ressaltar que elas foram comparadas não só com o grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado e DMSO 0.1%, mas também com aqueles que receberam TMZ 25 µM ou

TMZ 50 μM . Estas últimas duas comparações foram realizadas uma vez que a TMZ é o quimioterápico padrão utilizado no tratamento de pacientes com gliomas de alto grau. Além disso, as concentrações aqui testadas foram baseadas em curvas dose-resposta estabelecidas em nosso laboratório e em estudos prévios que estimaram concentrações *in vitro* de TMZ, que corresponderiam aos valores plasmáticos da droga em pacientes com GBM em fase de tratamento quimioterápico (Ostermann et al., 2004; Barazzuol et al., 2012).

Após um e três dias de tratamento, não observamos diferenças significativas com relação à viabilidade das células U87MG dos diferentes grupos avaliados. Por outro lado, depois de cinco dias, verificamos que algumas associações de TMZ com SAS diminuíram a viabilidade desta linhagem. De fato, a administração conjunta de SAS 0.5 mM com TMZ 25 μM ou TMZ 50 μM levaram a redução de 57% e 71% da viabilidade dos grupos, respectivamente, em comparação com o grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado e DMSO 0.1% (Figura 8). O efeito da combinação de drogas é particularmente interessante se considerarmos que a administração isolada de TMZ 25 μM ou 50 μM ou SAS 0.5 mM não ocasionou redução significativa da viabilidade em comparação com o grupo DMSO 0.1%. Os percentuais não significativos de diminuição de viabilidade das drogas isoladas TMZ 25 μM ou 50 μM ou SAS 0.5 mM foram 21.31%, 26.73% e 35.34%, respectivamente, em relação ao grupo DMSO 0.1%. Com o objetivo de se investigar as repercussões da administração simultânea destas drogas sobre vias e funções celulares, utilizamos a combinação TMZ 25 μM + SAS 0.5 mM, uma vez que tal associação não diferiu significativamente da TMZ 50 μM + SAS 0.5 mM. Além disso, entendemos que a obtenção de praticamente o mesmo resultado utilizando menos quantidade de droga, é um cenário experimental mais favorável inclusive para futuros testes com pacientes. Dessa forma os efeitos colaterais da administração de TMZ poderiam ser minimizados com esta dose menor.

De forma semelhante ao observado com a linhagem U87MG, as células A172 não tiveram seu crescimento alterado significativamente após um, três ou cinco dias de tratamento com TMZ 25 μM ou TMZ 50 μM , em comparação com o grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado e DMSO 0.1%. No entanto, Yoshino et al. (2010) relataram a concentração de 52.4 μM como sendo o IC_{50} da TMZ para a linhagem A172, através de contagem de células residuais após exposição à droga por três dias. É possível que diferenças metodológicas relacionadas à densidade celular inicial adotada e quantificação do crescimento celular possam ter influenciado na divergência entre nossos resultados e aqueles de Yoshino et al. (2010). De fato, estes autores utilizaram densidade ao redor de 5.000 células/ cm^2 e avaliaram o efeito da droga através de contagem.

Com relação a exposição das células A172 a SAS (Figura 5), nossos resultados evidenciaram efeito dose-dependente similar àquele observado na linhagem U87MG. De fato, após três e cinco

dias de tratamento com SAS 0.5 mM, a redução de viabilidade celular foi de 36% e 39%, respectivamente. Por sua vez, a exposição a SAS 1.0 mM levou a redução de viabilidade celular de 46%, 91% e 100%, após um, três e cinco dias, respectivamente. Desta forma, estes dados sugerem que a inibição do sistema X_c^- esteja envolvida com a diminuição da viabilidade das células A172. Esta observação parece ser original, uma vez que não encontramos relatos deste efeito em células de glioma humano A172 na literatura.

Assim como observado nas células U87, a associação de TMZ com SAS reduziu a viabilidade das células A172. Porém, tal redução foi mais intensa e notada mais precocemente na segunda linhagem. De fato, após um dia de tratamento da linhagem A172, já observamos redução de viabilidade no grupo TMZ 50 μ M + SAS 0.5 mM. Após três e cinco dias, verificamos que as combinações TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM e TMZ 50 μ M + SAS 0.5 mM reduziram significativamente a viabilidade das células A172 quando comparadas com os tratamentos com TMZ apenas (25 μ M ou 50 μ M) e com o grupo DMSO. Além disso, o efeito destas combinações foram semelhantes entre si. Os percentuais e diferenças estatísticas estão indicados na figura 10.

Ainda, após três ou cinco dias, o tratamento com TMZ associada com SAS levou a queda de viabilidade maior do que as drogas administradas isoladamente, quando comparadas com o grupo DMSO. De fato, após três dias, os percentuais de redução foram de 9.01% (TMZ 25 μ M), 12.94% (TMZ 50 μ M), 33.20% (SAS 0.5 mM), 63.96% (TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM) e 58.69% (TMZ 50 μ M + SAS 0.5 mM). Tais percentuais após cinco dias foram de 7.61% (TMZ 25 μ M), 19.08% (TMZ 50 μ M), 52.69% (SAS 0.5 mM), 76.31% (TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM) e 76.01% (TMZ 50 μ M + SAS 0.5 mM).

Desta forma, em função destes resultados de viabilidade e seguindo o mesmo raciocínio utilizado para as células U87MG, também utilizamos a associação TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM para estudar possíveis repercussões da administração conjunta destas drogas sobre o funcionamento das células A172.

Por sua vez, a viabilidade da linhagem T98G não foi alterada significativamente pelas concentrações de TMZ aqui testadas, após todos os intervalos de exposição. Este achado concorda com dados anteriores da literatura. De fato, Kanzawa et al. (2004) e Yoshino et al. (2010) determinaram o IC_{50} da TMZ para a linhagem T98G, através de contagem celular, como sendo 1.000 μ M e 441.6 μ M, respectivamente, após três dias de incubação com a droga. Além disso, Yoshino et al. (2010) sugeriram que a resistência destas células a concentrações menores de TMZ estaria relacionada à expressão da enzima O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), a qual repara a metilação de guanina do DNA realizada por agentes alquilantes, como a TMZ. Especificamente, tais autores não detectaram a MGMT em linhagens de glioblastoma que foram

sensíveis à TMZ (A172, AM-38, U87-MG, U-251 MG). De maneira oposta, detectaram a expressão gênica e protéica da MGMT em linhagens que se mostraram resistentes à TMZ (T98G, U-138 MG e YH-13).

A exposição das células T98G a SAS evidenciou efeito dose-dependente (Figura 6). Após cinco dias, a redução de viabilidade celular induzida pelas concentrações de 0.5 mM e 1.0 mM foi de 25% e 86%, respectivamente. No entanto, as combinações aqui testadas de TMZ e SAS apresentaram apenas uma tendência a reduzir a viabilidade da linhagem T98G (Figura 12), não sendo detectada diferença significativa entre os grupos experimentais e aquele que recebeu apenas meio de cultura suplementado e DMSO. Acreditamos que os dados decorrentes do tratamento com SAS, associada ou não com TMZ, sejam novos, uma vez que não encontramos na literatura outras investigações similares. Particularmente, nossos dados ainda não nos permitem obter subsídios para propor hipótese a respeito da ausência de efeito significativo das associações de TMZ e SAS sobre a viabilidade celular. Visto que não houve diferença entre os tratamentos investigados, optamos por utilizar a mesma combinação de TMZ e SAS utilizada nos experimentos com as linhagens U87MG e A172 (TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM) para pesquisar possíveis alterações funcionais nas células T98G que poderiam explicar a ausência de efeito das drogas.

No que se refere à linhagem de glioma de rato (C6), observamos discreta redução (12%) de viabilidade em relação ao grupo DMSO 0.1%, após tratamento com TMZ 50 μ M por cinco dias. Após 1 ou 3 dias, a TMZ (25 μ M ou 50 μ M) não alterou significativamente a viabilidade celular. Estes resultados corroboram dados da literatura que evidenciaram resistência destas células à TMZ. Particularmente, Huang et al. (2008), calcularam, através de ensaio colorimétrico (MTT), o IC₅₀ da TMZ como sendo de 560 μ M após dois dias de incubação com a droga. A densidade celular utilizada por estes autores foi de 7.500 células/cm², um valor próximo ao que utilizamos (10.000/cm²).

Sobre a exposição da linhagem C6 a SAS, observamos intensa diminuição da viabilidade celular determinada pelas maiores concentrações testadas. Especificamente, depois de um e três dias de tratamento, a concentração de 0.25 mM reduziu a viabilidade ao redor de 10%. Por outro lado, após todos os períodos estudados, 0.5 mM e 1.0 mM de SAS levaram a cerca de 100% de redução, comparado com as células que receberam meio suplementado e DMSO 0.1% (Figura 7). Robe et al. (2004) descreveram redução de cerca de 90% da sobrevivência de células C6 tratadas com 0.5 mM de SAS por um dia, avaliada através de teste colorimétrico (MTT). No mesmo estudo, foi verificada ação inibitória da SAS sobre o fator de transcrição nuclear NF- κ B, o qual promove crescimento e sobrevivência de linhagens comerciais e culturas primárias de glioblastoma. Desta forma, Robe et al. (2004) relacionam o efeito da SAS sobre o crescimento da linhagem C6 à

inibição do NF- κ B, porém não avaliaram o efeito da droga sobre a molécula de glutathiona ou sobre outros sistemas de defesa antioxidantes, como abordaremos posteriormente no texto.

No presente trabalho, assim como observado após a administração isolada de SAS 0.5 mM em todos os períodos avaliados, as associações TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM e TMZ 50 μ M + SAS 0.5 mM também reduziram de forma significativa (cerca de 100%) a viabilidade das células C6, em comparação com os grupos tratados com TMZ (25 μ M ou 50 μ M) e/ou SAS 0.25 mM e com as células que receberam apenas meio suplementado e DMSO. Por sua vez, a administração isolada de SAS 0.25 mM levou a redução significativa de viabilidade somente após um dia de tratamento, em relação ao grupo tratado somente com meio suplementado e DMSO (Figura 14).

Depois de três ou cinco dias de exposição, o efeito das combinações TMZ 25 μ M + SAS 0.25 mM e TMZ 50 μ M + SAS 0.25 mM sobre a viabilidade foi numericamente maior quando comparado com o resultado das administrações isoladas de TMZ (25 μ M ou 50 μ M) e de SAS 0.25 mM. Especificamente, após três dias, as porcentagens de redução em relação ao grupo DMSO 0.1%, foram: 6.89% (TMZ 25 μ M), 10.45% (TMZ 50 μ M), 7.70% (SAS 0.25 mM) e 20.09% (TMZ 25 μ M + SAS 0.25 mM) e 23.48% (TMZ 50 μ M + SAS 0.25 mM). Após cinco dias os valores foram os seguintes: 9.46% (TMZ 25 μ M), 11.80% (TMZ 50 μ M), 4.10% (SAS 0.25 mM), 15.79% (TMZ 25 μ M + SAS 0.25 mM) e 22.93% (TMZ 50 μ M + SAS 0.25 mM) (Figura 14).

Não encontramos na literatura dados de outros grupos de pesquisa a respeito da ação da SAS em conjunto com a TMZ sobre células C6. Mesmo assim, nosso conjunto de dados referentes a associação das duas drogas sugerem ação preponderante da SAS sobre a TMZ na redução da viabilidade das células C6 e nos levaram a utilizar a associação TMZ 25 μ M + SAS 0.25 mM para estudar repercussões celulares da administração conjunta destas drogas.

5.2. Avaliação de morte celular por citometria de fluxo: Reação de TUNEL

Em geral, a detecção de fragmentação de DNA através da reação de TUNEL tem sido associada com morte celular por apoptose. No presente estudo, a avaliação de morte celular inferida a partir da reação de TUNEL foi feita por citometria de fluxo. Observamos que nenhuma das linhagens de glioblastoma humano apresentou alteração significativa após tratamento com TMZ 25 μ M por 72 horas.

Especificamente, as células U87MG expostas ao meio de cultura contendo 0.1% de DMSO apresentaram 0.7% de morte celular, enquanto 2.5% das células tratadas com TMZ 25 μ M foram TUNEL positivas. Por sua vez, Roos et al. (2007) encontraram cerca de 55% de células U87MG em apoptose após 6 dias de tratamento com 50 μ M de TMZ. Estes autores avaliaram a ocorrência de apoptose através da porcentagem de células na fase sub-G1 do ciclo celular. Entretanto, outros

trabalhos reportaram menor porcentagem de morte celular por apoptose ou não conseguiram detectar este fenômeno utilizando a mesma linhagem (Hirose et al., 2001; Kanzawa et al., 2004; Lan et al., 2014). De fato, Lan et al. (2014) detectaram 12% de células U87MG em apoptose após tratamento com TMZ 100 μ M por um dia. A detecção foi realizada através de marcação com anexina V e citometria de fluxo. Em nosso estudo, detectamos 2.5% de apoptose no grupo TMZ 25 μ M, após três dias de tratamento. Desta forma, os dados de Lan et al. (2014) estão mais próximos daqueles obtidos no presente estudo, uma vez que ao testarmos dose quatro vezes menor, observamos ocorrência de morte celular em porcentagem proporcional (cerca de quatro vezes menor).

Corroborando ainda nossos dados, Kanzawa et al. (2004) não observaram indução significativa de apoptose após 72 horas de tratamento com TMZ 100 μ M nas linhagens U87MG, A172, T98G, U373-MG e U251-MG. É importante observar que tais autores detectaram redução de viabilidade celular através da contagem de células não marcadas com azul de tripan, porém tal diminuição não foi acompanhada por alterações no processo de apoptose. A metodologia realizada por estes autores para detecção de fragmentação de DNA foi semelhante àquela adotada na presente investigação, ou seja, citometria de fluxo. Portanto, uma concentração de TMZ quatro vezes maior do que aquela que utilizamos, não induziu apoptose nas linhagens celulares de glioma humano U87MG, A172 e T98G. Por fim, Hirose et al. (2001) não verificaram aumento do número de células na fase sub-G1 do ciclo celular (consideradas apoptóticas) 10 dias após o tratamento de células U87MG por 3 horas com TMZ 100 μ M.

A falta de apoptose significativa em linhagens de glioma humano após diferentes protocolos experimentais de exposição a TMZ *in vitro*, levou alguns autores a propor outros mecanismos de ação desta droga não relacionados a apoptose. Tais mecanismos envolveriam indução de autofagia e parada das células na fase G₂/M do ciclo celular (Hirose et al., 2001; Kanzawa et al., 2004; Shen et al., 2014).

Especificamente, Shen et al. (2014), ao estudar o efeito da TMZ (100 μ M) por três dias em células de glioma humano U251, evidenciaram diminuição de 30% da viabilidade celular avaliada por MTT. Porém, tal diminuição não foi acompanhada de indução de apoptose, a qual foi avaliada por citometria de fluxo (marcação com anexina V/iodeto de propídeo). Por outro lado, tais autores verificaram ocorrência de autofagia nestas células. A autofagia consiste em um tipo de morte celular em que há participação de enzimas lisossomais, além de degradação e reciclagem de proteínas. Shen et al. (2014) visualizaram este fenômeno através da coloração das organelas vesiculares acídicas com acridina laranja. Os autores observaram ainda, após tratamento com TMZ (100 μ M) por três dias, aumento da proporção de células na fase G₂/M do ciclo celular, em

comparação com a fase G_0/G_1 . Especificamente, o grupo tratado com TMZ apresentou 79.9% das células em G_2/M e 8.17% na fase G_0/G_1 , ao passo que as respectivas porcentagens das células controle foram 4.16% e 63.42%.

Esta ação da TMZ sobre o ciclo celular, não relacionada à morte por apoptose, também foi proposta por Hirose et al. (2001). Estes autores, cujas condições experimentais investigadas foram descritas acima, detectaram que a TMZ aumenta a proporção de células U87MG que se encontram na fase G_2/M , em comparação com aquelas que estão na fase G_1 . Em situações fisiológicas, o ciclo celular pára em G_2/M quando há danos na molécula de DNA, os quais devem ser reparados antes que a mitose se inicie. Após o reparo do DNA, a célula se divide e não entra em processo de morte. Especificamente, as células neoplásicas que se encontram paradas em G_2/M apresentam o material genético duplicado, porém não entram na fase M. Além disso, Hirose et al. (2001) verificou que parte das células que se encontrava na fase G_2/M , entrou em processo de senescência, ou seja, não se replicavam mais. Desta forma, os eventos de parada em G_2/M e senescência retardariam a progressão do ciclo celular e, portanto, a proliferação neoplásica.

Com relação à linhagem de glioma de rato (C6), observamos que a exposição a SAS 0.5 mM aumentou significativamente a fragmentação de DNA em comparação com os grupos tratados apenas com meio de cultura (D+C) ou meio contendo o veículo de diluição (DMSO) da TMZ (34.2%, 1.46% e 3.42%, respectivamente). Por sua vez, o grupo tratado com TMZ 25 μ M e SAS 0.5 mM apresentou 31% de células com DNA fragmentado. Porém, este último resultado não diferiu estatisticamente daqueles dos grupos D+C e DMSO. É provável que o fato de a significância estatística existir apenas para o grupo tratado com SAS seja decorrente de maior variabilidade biológica no grupo que recebeu TMZ e SAS. De fato, este último grupo apresentou erro padrão da média maior que aquele referente ao grupo composto por células expostas apenas a SAS. No entanto, como os valores médios das porcentagens de fragmentação de DNA nos grupos SAS 0.5 mM e TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM são próximos (34.2% e 31%, respectivamente), é plausível supor que a ocorrência de morte celular tenha sido mantida no grupo que recebeu TMZ em associação com SAS. Por fim, o grupo de células C6 tratadas com TMZ 25 μ M apresentou 3.82% de células em apoptose, não diferindo do grupo exposto ao veículo de diluição da TMZ (3.42%), nem do grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado (1.46%). Desta forma, os presentes resultados favorecem que a SAS 0.5 mM exerça um efeito preponderante sobre aquele da TMZ 25 μ M.

Além disso, os dados de viabilidade celular também indicam que a ação da SAS 0.5 mM tenha sido preponderante àquela da TMZ. De fato, nossos dados obtidos através da técnica de MTT, após 1, 3 ou 5 dias de tratamento, corroboram aqueles da reação de TUNEL. Especificamente, o

ensaio colorimétrico (MTT) mostrou redução praticamente total da viabilidade celular em todos os grupos expostos a SAS 0.5 mM, independente da associação com TMZ. Em conjunto, os presentes dados sugerem que a redução drástica de viabilidade celular deveu-se, ao menos em parte, pela indução de apoptose.

O efeito indutor de apoptose da SAS sobre as células C6 foi previamente reportado por Robe et al. (2004), ao utilizarem 1 mM de SAS por 24 horas. Tais autores reportaram aumento significativo de células na zona sub-G1 do ciclo celular (células apoptóticas). Particularmente, o grupo controle apresentou 33% das células nesta zona e, o grupo tratado, 67%. Em nosso trabalho, detectamos 34.2% de células apoptóticas no grupo tratado com SAS 0.5 mM, ao passo que as células expostas somente ao meio de cultura apresentaram 1.46% de células mortas. As diferenças entre nosso trabalho e o de Robe et al. (2004) incluem a técnica de detecção de apoptose, a concentração de SAS utilizada e o tempo de incubação. Tais diferenças possivelmente geraram porcentagens de células apoptóticas diversas. Entretanto, apesar disso, ambos os trabalhos verificaram que a SAS é capaz de induzir morte celular por apoptose em células C6.

Com relação à indução de apoptose por TMZ em células C6, há poucos dados na literatura. Huang et al. (2008) avaliaram ocorrência de apoptose nesta linhagem através de marcação com anexina V/iodeto de propídeo por citometria de fluxo, após tratamento com TMZ 250 μ M por 48 horas. Tais autores encontraram 7.3% de células com marcação dupla, o que indica apoptose tardia. Por outro lado, o valor encontrado para o grupo controle foi de 0.4%. No presente trabalho, utilizamos uma concentração de TMZ dez vezes menor por três dias e a taxa de apoptose observada foi de 3.82%, não diferindo do grupo D+C, nem do DMSO 0.1%. Desta forma, nossos dados mostram que a concentração de 25 μ M de TMZ não foi capaz de induzir apoptose em células C6, após três dias de tratamento. Finalmente, em relação à associação de TMZ com SAS sobre as células C6, não encontramos dados prévios na literatura.

Em resumo, nossos dados de fragmentação de DNA sugerem que as linhagens humanas U87MG, A172 e T98G não apresentaram aumento significativo de apoptose após administração de TMZ 25 μ M e/ou SAS 0.5 mM por 3 dias. Ao contrário, a linhagem de glioma de rato (C6) se mostrou sensível à indução de apoptose pelo tratamento com SAS 0.5 mM. Observamos ainda, nas células C6, que a associação de TMZ 25 μ M com SAS 0.5 mM não altera o efeito de indução de apoptose causado pela SAS 0.5 mM, favorecendo efeito preponderante da SAS sobre a TMZ nas presentes condições experimentais.

5.3. Análise de expressão gênica: PCR em tempo real nas células de glioma após administração de temozolamida e/ou sulfasalazina

No presente estudo, avaliamos se o tratamento por três dias com TMZ, associado ou não com SAS, alteraria a expressão relativa de genes associados com a fisiopatogênese do glioblastoma (*EGFR*, *TP53* e *PTEN*), em linhagens celulares humanas (U87MG, A172 e T98G) e de glioma de rato (C6). Além disso, também foi avaliada a expressão de genes relacionados com a capacidade invasiva das células neoplásicas (*MMP2* e *MMP9*). Foi utilizada a técnica de PCR em tempo real, empregando-se os genes *TBP* e *RPL13A* como controles endógenos.

Com relação às linhagens humanas, observamos apenas alteração da expressão do gene *TP53* nas células A172 expostas a TMZ 25 µM em conjunto com SAS 0.5 mM. Especificamente, houve redução de cerca de 70% da expressão deste gene, em comparação com o grupo que recebeu somente meio de cultura suplementado. O produto do gene *TP53* (proteína p53) é um fator de transcrição de genes que inibem a proliferação celular após dano ao DNA (Vousden and Prives 2009). Dados prévios de outros grupos de pesquisa mostram que a linhagem A172 pode expressar tanto formas mutantes quanto a forma selvagem da proteína p53 (Van Meir et al. 1994; Bramford et al. 2004). Desta forma, nossos dados evidenciam redução da expressão da forma selvagem do gene *TP53* após tratamento das células A172 com TMZ e SAS. Tal fato poderia implicar aumento da proliferação celular após o tratamento. No entanto, nossos resultados obtidos com o ensaio colorimétrico MTT pós-tratamento não favorecem proliferação descontrolada como consequência da alteração da expressão do *TP53*, uma vez que foi detectada redução significativa da viabilidade celular depois da administração de TMZ e SAS por três dias.

Por fim, ainda com relação à linhagem A172, é possível que não tenhamos detectado a expressão da forma selvagem do gene *PTEN* pelo fato de tal linhagem expressar forma mutante deste gene (Bramford et al. 2004). No entanto, ainda que exista informação semelhante com relação à expressão do *PTEN* por células U87MG (Bramford et al. 2004), verificamos expressão da forma selvagem deste gene por estas células. Apesar disso, este último dado não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados.

Com relação à linhagem de glioma de rato (C6), verificamos aumento de cerca de cinco vezes da expressão do gene *mmp2* nos grupos tratados com TMZ 25 µM isoladamente ou associada com SAS 0.25 mM, em relação às células que receberam meio de cultura suplementado contendo ou não o veículo de diluição da TMZ. Tal efeito parecer ser determinado prioritariamente pela TMZ, visto que a administração de SAS apenas não modificou significativamente a expressão do *mmp2*. Alteração da expressão de metaloproteinases (MMPs) tem sido descrita após a administração de

TMZ a células tumorais humanas. De fato, Ulasov et al (2013) observaram que o tratamento de células U87MG por quatro dias com TMZ (100 μ M) em associação com um inibidor da expressão de MMP14 (Marimastat) e radioterapia (4Gy/dia por três dias), levou à inibição da expressão de MMP14 e parada do ciclo celular em G₂/M. Porém, o tratamento apenas com TMZ e radioterapia aumentou a expressão da MMP14, em relação às células expostas apenas ao veículo de diluição da TMZ (DMSO). Tal aumento de expressão foi interpretado como uma resposta tumoral a condições de estresse, como a exposição a agentes quimioterápicos (Trog et al, 2006). Resposta similar pode ter ocorrido nas células que estudamos (C6).

Especificamente com relação aos resultados descritos por Ulasov et al (2013), nossos dados com a linhagem U87MG não evidenciaram alteração da expressão gênica de MMPs após tratamento com TMZ, o que não corrobora o mesmo tipo de resposta a estresse causado pelo quimioterápico no contexto que estudamos. É possível que condições experimentais distintas e os tipos de tratamento investigados possam ter contribuído para os diferentes resultados obtidos por nosso grupo e o de Ulasov et al (2013). Particularmente, estes autores utilizaram o meio MEM e não há especificação do número de células plaqueadas. Além disso, a TMZ foi administrada em associação com radioterapia e/ou Marimastat, mas não isoladamente. Desta forma, o estímulo lesivo às células U87MG pode ter sido mais intenso que aquele que empregamos (TMZ apenas), repercutindo em resposta celular de aumento de expressão de MMP.

Por fim, não identificamos alteração significativa da expressão gênica nas demais linhagens e/ou condições de tratamento analisadas, em relação aos grupos que receberam meio de cultura suplementado contendo ou não o veículo de diluição da TMZ. Após revisão da literatura, não encontramos trabalhos que permitissem análise comparativa com nossos resultados. De qualquer forma, nossos dados sugerem que os tratamentos aqui testados não modificam a expressão dos genes avaliados.

5.4. Análise de expressão gênica: Transcriptoma de células A172 tratadas com temozolamida e/ou sulfasalazina

A análise da expressão gênica através do estudo do transcriptoma de linhagem celular humana de glioblastoma foi realizada nas células A172, visto termos verificado melhor reprodutibilidade de resultados após experimentos realizados com estas células em ocasiões distintas (células em diferentes passagens), comparando com as linhagens U87MG e T98G. Especificamente, para discussão dos resultados obtidos através da análise do transcriptoma, consideramos também dados de outros experimentos realizados com as células A172 (viabilidade celular, níveis de glutathiona

total e proliferação celular). O objetivo foi relacionar dados de expressão gênica com dados verificados após análises funcionais de células expostas à droga padrão utilizada para tratamento de pacientes com glioblastoma (TMZ) e/ou às condições experimentais aqui testadas (TMZ associada ou não com SAS). Até onde sabemos, não há dados prévios sobre experimentos *in vitro* com células A172 tratadas com TMZ e/ou SAS.

Os resultados obtidos através da análise do transcriptoma das células A172 evidenciaram enriquecimento significativo de diversas vias celulares, as quais estão apresentadas no Anexo 1. Considerando as células tratadas com TMZ, houve enriquecimento de vias relacionadas a ciclo celular e reparo do DNA, em comparação com o grupo que recebeu apenas o veículo de diluição da TMZ (DMSO 0.1%). Durante o ciclo celular, o ponto de checagem do fuso mitótico pode detectar adesão anormal entre os cromossomos e os microtúbulos levando a atraso ou inibição da anáfase. Diversas proteínas controlam este processo, incluindo aquelas codificadas por genes das famílias *budding uninhibited by Benzimidazole (BUB)* e *mitotic arrest deficient (MAD)* (*BUB1*, *BUB3* e *MAD1*, *MAD2*, *MAD3* (*BUBR1* em humanos)) (Musacchio e Hardwick, 2002; Morales et al., 2013) Morales et al. (2013) verificaram aumento de expressão de *BUB1* e *BUBR1* em células de glioblastoma de linhagens comerciais e de amostras de pacientes em comparação com substância branca não-neoplásica. Além disso, estes autores reportaram que a inibição de *BUB1* e *BUBR1* diminui a proliferação de células de glioblastoma pediátrico (SF188) e também as tornam mais sensíveis a radiação. No presente estudo, verificamos que a TMZ reduz a expressão de *BUB1* e *BUBR1*, o mesmo ocorrendo após o tratamento com SAS (via celular “Ciclo celular_o ponto de checagem da metáfase”). Embora a TMZ isoladamente não tenha reduzido a viabilidade celular após três dias de exposição, a associação de TMZ com SAS a reduziu significativamente. Portanto, pode-se propor a hipótese de que a redução da viabilidade de células A172 pode ter ocorrido, ao menos em parte, devido à diminuição da expressão de *BUB1* e *BUBR1*. Considerados em conjunto, estes achados corroboram a ideia de considerar os genes *BUB1* e *BUBR1* como alvos de abordagens futuras para tratamento de indivíduos portadores de glioblastoma.

A administração de TMZ isolada ou associada com SAS alterou significativamente a via “Ciclo celular _ papel do complexo promotor da anáfase (APC) na regulação do ciclo celular” devido à redução da expressão de genes. O APC é ativado pela proteína 20 do ciclo de divisão celular (Cdc20) e regula a progressão do ciclo celular através da ubiquitinação de proteínas. Sabe-se que a Cdc20, a qual é necessária para a separação de cromossomos, exerce um papel oncogênico em carcinomas (Wang et al., 2015) e tem sua expressão aumentada em glioblastomas (Marucci et al., 2008). Além disso, a inibição farmacológica de APC/Cdc20 causa a parada da mitose na metáfase em várias linhagens celulares neoplásicas (Zeng et al., 2010). No presente trabalho,

observamos que a exposição das células A172 a TMZ associada ou não com SAS diminui a expressão do gene *CDC20*. Visto que a proteína Cdc20 ativa o APC, a diminuição de *CDC20* após três dias de ambos os tratamentos pode ter parado o processo mitótico das células de glioblastoma.

A administração de TMZ isolada ou associada com SAS também alterou significativamente as vias “Ciclo celular _ montagem do fuso mitótico e separação dos cromossomos” e “Ciclo celular _ coesão das cromátides irmãs”. Durante o ciclo celular, o complexo proteico da coesina mantém unidas cromátides irmãs recém-replicadas. A endopeptidase separase cliva uma subunidade específica da coesina, permitindo, assim, separação acurada dos cromossomos (Musacchio e Hardwick, 2002; Ivanchuk et al., 2004). Neste sentido, Mukherjee et al. (2014) estudaram amostras de glioblastoma de pacientes adultos e verificaram aumento de expressão de separase, o que foi correlacionado negativamente com sobrevida global. Nossos resultados mostraram reduzida expressão de separase (gene *ESPL1*) após administração de TMZ apenas ou em conjunto com SAS. Este resultado apóia um efeito anti-proliferativo da TMZ e também um efeito potencialmente benéfico da combinação de TMZ com SAS, visto que a expressão aumentada de separase pode se correlacionar com redução da sobrevida de indivíduos com glioblastoma (Mukherjee et al., 2014).

Considerando que nossos dados de transcriptoma evidenciaram enriquecimento de vias celulares relacionadas com progressão do ciclo celular, investigamos eventual ação da TMZ e/ou SAS sobre proliferação celular. Assim, estudamos a expressão da proteína PCNA após 5 dias de tratamento e observamos redução de sua expressão nas células que receberam TMZ, em comparação com o grupo que recebeu apenas veículo de diluição da TMZ. Além disso, resposta similar foi verificada no grupo que recebeu TMZ e SAS, quando comparado ao grupo DMSO 0.1% e com aquele que recebeu apenas SAS. No entanto, não foi detectada alteração na expressão do gene *PCNA* três dias após qualquer tratamento que realizamos. Embora a viabilidade celular do grupo que recebeu apenas TMZ não diferiu daquele exposto ao veículo de diluição da TMZ após cinco dias de tratamento, nossos resultados sobre a expressão da proteína PCNA sugerem que as células tenham menos atividade proliferativa. De fato, a TMZ induz parada do ciclo celular na transição entre as fases G_2 e M e reduz a proliferação de células de glioblastoma U251 e U87MG (Hirose et al., 2001; Shen et al., 2014). Além disso, redução do número de células imunopositivas para PCNA foi detectada no cérebro de roedores que receberam implantes de células de glioma C6 ou U87MG e foram tratados com TMZ (Son et al., 2006; Jo et al., 2012). Estas últimas observações, considerandas em conjunto com nossos resultados sobre a expressão da proteína PCNA, corroboram efeito anti-proliferativo da TMZ, um fato ainda não descrito em células da linhagem A172.

Com relação ao efeito da SAS sobre expressão gênica, verificamos enriquecimento de vias celulares relacionadas ao metabolismo da glutatona e estresse oxidativo. Sabe-se que a SAS inibe o sistema X_c^- , um complexo de proteína constituído por uma cadeia leve (xCT) e uma pesada (4F2) (Chung et al., 2005; Sontheimer, 2008; Mandal et al., 2010). Em nosso estudo, verificamos que a SAS sozinha ou associada com TMZ aumentou a expressão do gene que codifica a proteína xCT (*SLC7A11*). Tal gene está presente na via “Estresse oxidativo _ papel da “Sirtuin 1” e PGC1-alfa na ativação dos sistema de defesa antioxidante”. A análise da mesma via evidenciou alterações de genes que codificam diferentes subunidades da glutamato-cisteína ligase (GCL), uma enzima essencial para a síntese de glutatona (Backos et al., 2012; Aquilano et al., 2014). Especificamente, as células tratadas com SAS mostraram expressão aumentada do gene da subunidade regulatória da GCL (*GCLM*). A administração conjunta de TMZ e SAS aumentou a expressão dos genes das subunidades catalítica (*GCLC*) e regulatória da GCL.

Ainda com relação ao efeito da administração da SAS sobre expressão de genes relacionados ao metabolismo da glutatona, verificamos aumento da expressão do gene da glutatona redutase (*GSR*) após administração da SAS isolada ou associada com TMZ. Tal efeito não foi observado depois da exposição apenas a TMZ. Com relação à sua atividade antioxidante, sabe-se que a glutatona redutase (GSHR) converte a glutatona oxidada (GSSH) em reduzida (GSH) (Balendiran et al., 2004; Backos et al., 2012; Traverso et al., 2013). Uma outra ação também decorrente da administração da SAS foi o aumento de expressão de genes da via “Metabolismo da glutatona/versão humana”, tais como aqueles das glutatona-S-transferases (*GSTM2*, *GSTM3*, *GSTK1* e *MGST*). Estas enzimas dependem da glutatona e estão envolvidas em mecanismos de detoxificação de produtos gerados em condições de estresse oxidativo (Hayes et al., 2005).

Embora a administração conjunta de TMZ e SAS não tenha enriquecido a via “Metabolismo da glutatona/versão humana”, verificamos aumento individual da expressão dos genes *GSR*, *GSTM2*, *GCLM* and *GCLC*. Desta forma, é possível que as expressões aumentadas dos genes *xCT* e *GSR*, além daqueles das subunidades da GCL e das glutatona-S-transferases, após exposição à SAS sejam mecanismos compensatórios através dos quais as células com depleção de glutatona tentariam restaurar os níveis normais deste composto antioxidante e/ou minimizar danos decorrentes de estresse oxidativo. De fato, observamos redução significativa dos níveis de glutatona total após 3 dias de tratamento. Tal redução pela SAS foi previamente reportada em outras linhagens celulares de glioblastoma (Chung et al., 2005; Chung and Sontheimer 2009). Nossos resultados mostram uma resposta similar nas células A172 e apoiam uma possível causa para a redução da viabilidade celular que nós verificamos nos grupos que receberam SAS por cinco

dias. Neste contexto, a redução dos níveis de glutatona total favoreceria a ocorrência de estresse oxidativo.

Por fim, Mandal et al. (2010) mostraram que, em condições de depleção de GSH, o sistema tioredoxina/tioredoxina redutase 1 reduz a cistina importada pelo sistema X_c^- , substituindo, portanto, a GSH. Detectamos aumento da expressão do gene da tioredoxina redutase 1 (*TXNRD1*) nos grupos que mostraram depleção da glutatona total (expostos a SAS com ou sem TMZ). Assim, tal aumento poderia ser uma resposta compensatória adicional para se tentar diminuir as consequências deletérias do estresse oxidativo.

Concluindo, obtivemos dados de expressão gênica e funcionais originais sobre a exposição da linhagem de glioblastoma humano A172 a TMZ e/ou SAS. Particularmente, descrevemos genes e vias celulares cujas expressões e enriquecimento, respectivamente, foram modulados pelas diferentes condições experimentais aqui testadas e podem vir a ser considerados como alvos terapêuticos futuros. Além disso, nosso estudo reforça a importância de se testar novas abordagens terapêuticas, inclusive a combinação de drogas com mecanismos de ação diferentes, para se tentar melhorar a eficácia clínica da TMZ.

5.5. Análise da atividade enzimática das metaloproteinases após administração de temozolamida e/ou sulfasalazina

Nossos resultados referentes à linhagem C6 mostraram que a TMZ na concentração de 25 μM elevou a expressão do gene da enzima metaloproteinase 2 (*mmp2*), após 3 dias de tratamento. Este aumento foi verificado também na associação de TMZ 25 μM com SAS 0.25 mM. Porém, estas alterações não foram acompanhadas por aumento correspondente da atividade enzimática avaliada pela técnica de zimografia, após 3 ou 5 dias de tratamento. Desta forma, não detectamos repercussão funcional do aumento de expressão do gene *mmp2*, ou seja, aumento da capacidade invasiva das células tratadas.

Sobre a relação entre tratamento com TMZ e aumento da capacidade invasiva neoplásica, Trog et al. (2006) reportaram que células de glioma humano submetidas ao tratamento com TMZ apresentaram aumento da atividade da enzima MMP2. Especificamente, estes autores demonstraram que a expressão e a atividade da MMP2 foram aumentadas em células U87MG que receberam TMZ (155 μM) durante 4 ou 9 dias, associada ou não com radioterapia. A expressão proteica foi avaliada pela técnica de Western Blotting e a atividade enzimática, através de zimografia. Ainda, tais autores observaram que as atividades extracelulares da MMP2 e MMP9 foram independentes da densidade (confluência) celular. Este fato foi comprovado uma vez que

células não tratadas apresentavam os mesmos níveis de atividade enzimática da MMP2 e MMP9 após 4 ou 9 dias de crescimento, ou seja, períodos correspondentes a baixa ou alta confluência, respectivamente.

Com relação à MMP9, Trog et al. (2006) observaram aumento da expressão proteica após tratamento com TMZ e/ou radioterapia. Porém, não houve diferença entre a atividade enzimática verificada após os tratamentos. Estes autores sugerem, então, que as células que sobreviveram ao tratamento com TMZ apresentam aumento da capacidade invasiva. Sendo assim, as células neoplásicas remanescentes após tratamento quimio- e radioterápico apresentariam um fenótipo clinicamente mais agressivo que aquele apresentado pelas células tumorais pré-tratamento, prejudicando a resposta terapêutica.

No que se refere à MMP9 liberada pelas células C6, observamos que a associação TMZ 25 μ M com SAS 0.5 mM reduziu significativamente a atividade enzimática (cerca de 40%), em comparação com o grupo exposto ao meio de cultura contendo apenas DMSO. Assim, nosso estudo demonstra que há diferente susceptibilidade das células de glioma de rato e humano à modulação de atividade enzimática pelos tratamentos. De fato, não encontramos alteração significativa da atividade das MMPs nas linhagens humanas. Até onde sabemos, não há relatos prévios na literatura a respeito do tratamento com SAS e/ou TMZ em células C6, e sua influência sobre a MMP9. Deste modo, nossos resultados podem ser considerados originais e abrem perspectivas para a realização de novos estudos cujo alvo seja a inibição das MMPs em células C6 e, eventualmente, outras linhagens de glioma humano não avaliadas na presente investigação.

5.6. Quantificação de glutatona total

Um mecanismo proposto para a ação da sulfasalazina (SAS) em modelos experimentais de glioma é a inibição do sistema transportador Xc que é responsável pela importação celular de cistina. Uma vez no ambiente intracelular, a cistina importada é convertida a cisteína, a qual é utilizada para a biossíntese da glutatona (Sontheimer, 2008). Este mecanismo foi descrito em células de glioma, tanto em linhagens comerciais como U87MG, D-54MG e U251MG quanto em cultura primária de glioblastoma (GBM62) (Chung et al. (2005)). Particularmente, Chung e Sontheimer (2009) demonstraram que o tratamento *in vitro* da linhagem U87MG com sulfasalazina (0.25 mM) por 24 horas causou redução de 90% dos níveis de glutatona total intracelular em comparação com células não tratadas. Em nosso estudo, utilizamos a concentração de 0.5 mM de SAS por três dias de tratamento. Porém, embora tenhamos verificado redução de aproximadamente 40% dos níveis de glutatona total nas células que receberam SAS 0.5 mM isolada ou associada com TMZ 25 μ M, em relação às células dos grupos expostos a meio de cultura suplementado

apenas (D+C) ou contendo ainda o veículo de diluição da TMZ (DMSO 0.1%), não houve alterações estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. Diferenças das condições experimentais entre nosso estudo e o de Chung e Sontheimer (2009) poderiam explicar a divergência de resultados. De fato, aqueles autores utilizaram o meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 7% de soro fetal bovino (SFB), ao passo que utilizamos DMEM suplementado com 10% de SFB. Além disso, Chung e Sontheimer (2009) não especificaram a quantidade de células utilizadas no início do tratamento. Uma quantidade diferente daquela que empregamos (10.000 células/cm²) poderia ter contribuído também para esta discordância de resultados.

É interessante observar ainda que, apesar da redução drástica dos níveis de glutathiona após 24 horas, Chung e Sontheimer (2009) não observaram efeito da SAS (0.25 mM) sobre o crescimento das células U87MG, o que foi avaliado através da contagem de células. Tal efeito só foi observado por estes autores após 48 ou 72 horas de tratamento. Desta forma, a depleção de glutathiona total foi anterior ao efeito de inibição de crescimento. Por outro lado, em nosso estudo, vimos que, após 3 dias de tratamento das células U87MG com SAS 0.5 mM, não houve queda significativa da viabilidade celular nem dos níveis de glutathiona total. De forma análoga ao discutido no parágrafo anterior, diferenças relacionadas às condições técnicas entre a presente investigação e aquela dos outros autores poderiam justificar as diferenças entre os resultados.

Com relação às células de glioblastoma humano A172, observamos que o tratamento por três dias com SAS 0.5 mM levou à redução de 93% da glutathiona total, em comparação às células expostas somente ao meio de cultura. Entretanto, tal diminuição não se refletiu em queda significativa da viabilidade celular, após três dias. Por sua vez, após o maior tempo de exposição aqui estudado (cinco dias), foi detectada redução de 53% da viabilidade celular do grupo SAS 0.5 mM, em relação ao grupo DMSO 0.1%. Deste modo, assim como verificado por Chung e Sontheimer (2009) em outra linhagem (U87MG), a queda de viabilidade das células A172 que detectamos após cinco dias poderia ser consequente à diminuição dos níveis de glutathiona intracelular, que já é observada após três dias de tratamento. Comparando este conjunto de dados com aqueles que observamos nas células U87MG, verifica-se que, nas condições experimentais que estudamos, a redução da viabilidade celular da linhagem A172 se relaciona com a redução dos níveis de glutathiona total. Visto que tal relação não é evidente na linhagem U87MG, pode-se considerar a ocorrência de mecanismos distintos de redução de viabilidade entre estas duas linhagens: um dependente (células A172) e outro não (células U87MG) dos níveis de glutathiona total.

A outra linhagem de glioblastoma humano avaliada no presente estudo, T98G, não apresentou alteração significativa dos níveis de glutathiona total intracelular, três dias após as exposições a TMZ

e/ou SAS, em relação aos grupos D+C e DMSO 0.1%. É importante lembrar que a viabilidade celular da linhagem T98G também não foi alterada pelos tratamentos com TMZ e/ou SAS, após três dias de tratamento.

Sobre as células de glioma de rato (C6), observamos que a administração de SAS por três dias nas concentrações de 0.25 mM ou 0.5 mM levou à redução de 61% e 81% dos níveis de glutathiona total intracelular, respectivamente, em relação aos valores do grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado (D+C). Não houve diferença estatística entre os resultados obtidos com as concentrações de 0.25 mM e 0.5 mM de SAS. Nossos dados mostram ainda que, apesar de haver redução na quantidade de glutathiona total com a utilização SAS 0.25 mM após três dias, tal redução não foi acompanhada de alterações na viabilidade celular, avaliada pelo método do MTT. Por outro lado, a concentração mais alta de SAS (0.5 mM) ocasionou redução dos níveis de glutathiona total e de cerca de 100% da viabilidade celular, após três dias de exposição. Como não foi observada redução dose-dependente dos níveis de glutathiona, outros eventos celulares podem ter contribuído para a redução drástica da viabilidade observada no grupo SAS 0.5 mM. Sendo assim, é provável que a indução de apoptose, aliada à redução de glutathiona total, tenham levado à esta redução de viabilidade. De fato, nossos dados de citometria de fluxo revelaram ocorrência de ~5% e de ~34% de fragmentação de DNA nos grupos tratados com 0.25 mM e 0.5 mM de SAS, respectivamente, após três dias de tratamento. Em resumo, para a linhagem C6, nossos dados apoiam a hipótese de que apenas a redução de glutathiona total não seria suficiente para diminuir a viabilidade celular. De fato, do presente estudo, depreende-se que a redução de viabilidade das células C6 após três dias de tratamento com SAS 0.5 mM pode envolver outro(s) mecanismo(s) além da redução da glutathiona total, como indução de apoptose.

Em todas as linhagens avaliadas, após três dias de tratamento, verificou-se que os valores de glutathiona total do grupo de células que recebeu meio de cultura suplementado contendo o veículo de diluição da TMZ (DMSO 0.1%) não diferiram do grupo exposto apenas ao meio de cultura suplementado. Este fato demonstra que o veículo de diluição não altera os níveis de glutathiona total. Com relação à temozolamida, observou-se que a quantidade de glutathiona total não foi alterada pela administração de TMZ 25 μ M. Até o presente momento, não foram encontrados dados na literatura relacionando o tratamento de células de glioma com temozolamida e uma possível modulação dos níveis de glutathiona. Sendo assim, nossos dados mostram que a concentração utilizada de TMZ (25 μ M) não exerceu influência sobre a quantidade de glutathiona total. Além disso, nas células em que a SAS administrada isoladamente apresentou efeito (A172 e C6), a co-administração de TMZ com SAS não determinou efeito diferente daquele observado com SAS isolada. Sendo assim, na presente

investigação, os efeitos de diminuição do conteúdo de glutathione total intracelular documentados podem ser atribuídos prioritariamente à SAS e não à TMZ.

Até o presente, não há dados na literatura sobre o efeito da administração de SAS e/ou TMZ sobre os níveis de glutathione nas linhagens de glioblastoma humano A172 e T98G e de glioma de rato C6. Sendo assim, nossos dados são originais e mostram que a SAS ocasiona diminuição do conteúdo intracelular de glutathione nas células A172 e C6. Desta forma, além das células já estudadas por Chung et al. (2005) (U87MG, D-54MG, U251MG e GBM62), as linhagens A172 e C6 compartilham o mesmo efeito da SAS sobre a glutathione total, ou seja, a depleção de seu conteúdo.

5.7. Análise de peroxidação lipídica: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação de lipídeos consiste da oxidação de lipídeos poli-insaturados por radicais livres. As espécies químicas definidas como radicais livres são moléculas altamente reativas normalmente derivadas da molécula de O_2 , a qual pode ser reduzida por um, dois ou três elétrons. Como consequência, ocorre a formação, respectivamente, de ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH). A peroxidação lipídica provoca danos às membranas biológicas e diversos produtos finais resultantes das reações de peroxidação são originados, tais como o malondialdeído (MDA), etano e pentano (Singal et al., 1988). A quantificação de MDA através do método do ácido tiobarbitúrico (método do TBARS) vem sendo utilizada por muitos anos, embora a especificidade do ensaio seja alvo de críticas. Especificamente, considera-se como limitação do método do TBARS o fato de que outros tipos de aldeídos, além do MDA, podem reagir com o ácido tiobarbitúrico e serem também detectados. Ainda, em revisão recente, Forman et al. (2015) referem que outros compostos, além do MDA, poderiam ser detectados de modo inespecífico através deste método, como carboidratos simples e complexos oxidados, bem como produtos de oxidação de proteínas e de ácidos nucleicos. Estes compostos reagiriam com o ácido tiobarbitúrico e produziram a coloração rósea do meio, a qual é detectada e quantificada durante o ensaio. Neste sentido, alguns autores defendem a interpretação dos dados do ensaio TBARS com cautela, visto que tais dados poderiam corresponder a uma aferição de produtos de peroxidação em níveis maiores que os reais (Cirak et al., 2003).

Recentemente, observou-se que amostras de neoplasias gliais apresentam níveis mais altos de peroxidação lipídica, em comparação com o tecido adjacente não tumoral (Cirak et al., 2003; Zengin et al., 2009). Sendo assim, a avaliação de MDA no soro de pacientes como método para se

investigar a existência de uma possível neoplasia cerebral está sendo debatida (Cirak et al., 2003). Particularmente, Cirak et al. (2003) estudaram os níveis de peroxidação lipídica no soro e no tecido de pacientes com tumores gliais de alto e baixo grau. Tais autores demonstraram que os pacientes com tumores do sistema nervoso central apresentavam níveis de MDA maiores no soro quando comparado aos controles (pacientes com epilepsia e indivíduos saudáveis). A concentração de MDA no tecido tumoral também foi maior do que no tecido não tumoral retirado após a cirurgia dos pacientes com epilepsia. Além disso, foi observado também que pacientes com tumores de alto grau possuíam níveis de MDA mais altos no soro e no tecido tumoral se comparados aos pacientes portadores de tumores de baixo grau e aos controles. Um estudo mais recente avaliou também os níveis de peroxidação lipídica em astrocitomas e outros tipos de tumores primários do sistema nervoso central, como meningiomas e oligodendrogliomas (Zengin et al., 2009). De maneira semelhante aos resultados obtidos por Cirak et al. (2003), estes autores observaram níveis aumentados de peroxidação lipídica no tumor em comparação com o tecido peritumoral não neoplásico. Neste contexto, diversos estudos têm documentado que as células neoplásicas estão submetidas a estresse oxidativo persistente e aumentado se comparado às células normais/não tumorais. Tal fato ocorreria devido a uma atividade metabólica mais alta com maior geração de espécies reativas de oxigênio (Pelicano et al., 2004). Sendo assim, uma estratégia interessante de combate às células tumorais seria aumentar o estresse oxidativo a níveis cada vez mais elevados, até que os sistemas de defesa antioxidante não pudessem mais neutralizar as espécies reativas e ocorresse indução de morte celular.

Em nosso estudo, utilizando o método de TBARS, detectamos aumento dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico somente na linhagem de glioma de rato C6. Especificamente, o tratamento com SAS 0.5 mM isolada ou administrada com TMZ 25 μ M por três dias, ocasionou aumento significativo destes níveis em relação aos grupos de células expostas apenas ao meio de cultura ou à menor concentração de SAS (com ou sem TMZ). Este aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico coincide com a intensa redução da viabilidade celular e queda dos níveis de glutathiona observada após três dias de tratamento com SAS 0.5 mM (associada ou não com TMZ 25 μ M). Entretanto, deve-se considerar que tal aumento pode ter sido determinado não apenas ou principalmente por produto de lipídeos peroxidados (MDA), mas também pelos níveis de outras macromoléculas, conforme exposto acima. Considerando os dados de viabilidade celular, glutathiona e TBARS em conjunto, verificamos que o aumento dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico relaciona-se com a maior concentração de SAS testada e, ainda que indique a ocorrência de peroxidação no processo de redução de viabilidade celular, a diminuição dos níveis de glutathiona não teria participação significativa no processo de redução de

viabilidade celular. A relação entre níveis de glutathione e viabilidade celular foi descrita no item 5.6. A SAS é usada na prática clínica para tratamento de doenças inflamatórias intestinais e artrite reumatoide. Porém, alguns estudos com pacientes com estas doenças relataram efeitos adversos da SAS sobre a função renal, hepática e testicular. Estes efeitos resultariam de estresse oxidativo e peroxidação lipídica, fenômenos que vem sendo demonstrados em roedores (Linares et al., 2011). Não encontramos dados prévios na literatura que nos permitissem comparar nossos dados com outros obtidos por diferentes grupos de pesquisa com células C6 expostas a SAS. Neste sentido, nossos dados de TBARS referente a esta linhagem são originais, embora uma análise com cautela seja necessária devido às limitações da técnica.

Com relação às células humanas, verificamos uma inesperada diminuição dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nas linhagens U87MG e A172. No que se refere à linhagem U87MG, a redução em comparação com as células que receberam apenas meio de cultura ocorreu nos grupos tratados com SAS apenas ou associada com TMZ. Por sua vez, as células A172 apresentaram redução dos níveis de TBARS no grupo tratado com TMZ e SAS, em relação ao grupo DMSO 0.1%. Por fim, a linhagem T98G não apresentou diferença entre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico detectados nos diferentes grupos experimentais. Do ponto de vista técnico, considerando que o método do TBARS pode ser inespecífico, é possível que a diminuição dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico que observamos nas linhagens U87MG e A172 possa ter sido influenciada por artefato da técnica, isto é interferência dos níveis de diferentes macromoléculas (Forman et al., 2015). De forma similar ao que verificamos na linhagem C6, as mudanças dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico detectadas em grupos das células U87MG e A172 não parecem ter sofrido influência dos níveis de glutathione total. Especificamente, a quantidade de glutathione total não variou entre os grupos da linhagem U87MG. Nas células A172, ainda que a exposição à SAS tenha diminuído a glutathione total, este achado não se relacionou com a diminuição dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Por sua vez, as células T98G não apresentaram mudanças nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nem de glutathione total. Até onde pudemos aferir, não há relatos sobre detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em células expostas a TMZ e/ou SAS. Assim, não podemos estabelecer comparação com dados prévios.

5.8. Análise de proliferação celular: Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)

A proteína PCNA foi inicialmente identificada em 1978 e recebeu o nome de antígeno nuclear de proliferação celular, uma vez que foi identificado no núcleo de células em divisão. A síntese desta proteína ocorre durante a fase S do ciclo celular, ou seja, a fase de síntese do DNA (Kelman 1997). Atualmente sabe-se que a proteína PCNA apresenta estrutura tridimensional de um anel que circunda o DNA e possui diversas funções. Sua função mais conhecida é exercida durante a fase de replicação do material genético. Durante esta fase, as enzimas polimerases, incluindo a DNA polimerase delta, se associam ao PCNA o que assegura a progressão rápida e adequada da forquilha de replicação. Além disso, esta proteína se associa a outras moléculas que constituem a forquilha e, sendo assim, apresenta função importante no reparo de DNA e no reestabelecimento e remodelamento da cromatina durante a duplicação do material genético (Mailand et al., 2013). Considerando este contexto, a avaliação da expressão da proteína PCNA vem sendo utilizada como marcador de proliferação celular em diversas condições experimentais. No que se refere aos astrocitomas humanos, Revesz et al. (1993) demonstraram que os maiores níveis de expressão de PCNA, avaliados por imunistoquímica, correlacionam-se com tumores de alto grau histológico. Sendo assim, estes autores sugeriram que a marcação de PCNA fosse utilizada como método complementar de diagnóstico após ressecção cirúrgica da neoplasia.

Em nossos experimentos, avaliamos a expressão da proteína PCNA após cinco dias de tratamento com TMZ e/ou SAS. Com relação à linhagem A172, observou-se diminuição dos níveis proteicos no grupo tratado com TMZ em relação àquele que recebeu o veículo de diluição (DMSO 0.1%). Além disso, diminuição similar foi detectada no grupo que recebeu TMZ em conjunto com SAS, em comparação àquele tratado com DMSO 0.1% ou apenas com SAS. Por outro lado, a exposição somente a SAS não alterou a expressão da proteína PCNA. Ainda, após cinco dias de administração isolada de TMZ, verificamos que a viabilidade das células tratadas não diferiu daquela do grupo veículo. Desta forma, nossos dados sugerem que as células que persistiram após este período de tratamento, apesar de viáveis, tenham menor capacidade proliferativa. De fato, há relatos na literatura de que a TMZ pára o ciclo celular na fase G₂/M e, conseqüentemente, reduz a proliferação das células U251, uma linhagem de glioblastoma humano (Shen et al., 2014).

No que se refere às demais linhagens utilizadas em nosso estudo (U87MG, T98G e C6), não observamos alterações significativas da expressão da proteína PCNA após cinco dias de tratamento com TMZ e/ou SAS. Recentemente, foi estudada a expressão de PCNA após 24 horas de tratamento com 600 µM de TMZ, na linhagem T98G. A coleta de material para Western Blotting foi realizada

24, 48 ou 72 horas após o término de tratamento. Tais autores não verificaram diferenças entre os níveis de PCNA detectados no grupo que recebeu TMZ e no grupo controle, após todos os intervalos de tempo avaliados (Montaldi e Sakamoto-Hojo, 2013). Embora o esquema de tratamento adotado por nosso grupo seja diferente daquele testado por Montaldi e Sakamoto-Hojo (2013) (25 μ M de TMZ por 5 dias), também não observamos alteração dos níveis de PCNA nas células T98G. Com relação às linhagens U87MG e C6 não encontramos dados de expressão proteica de PCNA *in vitro*. Porém, alguns autores reportaram diminuição do número de células imunopositivas para PCNA no cérebro de roedores que receberam inoculações intra-cerebrais de células C6 ou U87MG e foram posteriormente tratados com TMZ (Son et al., 2006; Jo et al., 2012). É importante considerar que diferenças em relação ao microambiente tumoral em experimentos *in vivo* ou *in vitro* podem ser fundamentais para ocasionar resultados diversos e, por vezes, contraditórios. De fato, em nosso estudo *in vitro*, não detectamos diferenças de expressão de PCNA após cinco dias de tratamento com TMZ e/ou SAS nas linhagens C6 e U87MG.

Sendo assim, considerando dados prévios da literatura, nossos resultados sobre expressão da proteína PCNA corroboram a existência de um efeito anti-proliferativo da TMZ, fato ainda não reportado anteriormente em relação às células de glioblastoma humano A172. Além disso, a expressão proteica de PCNA não foi alterada nas demais linhagens estudadas, evidenciando heterogeneidade do efeito anti-proliferativo da TMZ sobre diferentes linhagens de glioma *in vitro*.

6. CONCLUSÕES

6.1. Gerais

- ✓ As quatro linhagens estudadas não apresentaram alterações significativas de viabilidade celular após tratamento com TMZ 25 μ M ou 50 μ M por 1, 3 ou 5 dias.
- ✓ Embora as três linhagens humanas estudadas (U87MG, A172 e T98G) sejam classificadas como glioblastoma, verificamos que suas respostas aos tratamentos avaliados apresentam características distintas com relação à alteração da viabilidade, ocorrência de morte celular por apoptose e de peroxidação de lipídeos e modificação dos níveis de glutatona total, da capacidade de proliferação e de invasão.
- ✓ A associação de TMZ com SAS reduziu significativamente a viabilidade de todas as linhagens aqui avaliadas, com exceção da T98G. Estudos posteriores são necessários para se avaliar a segurança e eficácia *in vivo* desta possível abordagem terapêutica.

6.2. Específicas

6.2.1. Linhagem U87MG

- ✓ O tratamento das células com a combinação de TMZ e SAS exibiu efeito de redução de viabilidade celular após 5 dias de tratamento. Particularmente, as duas associações testadas, TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM e TMZ 50 μ M + SAS 0.5 mM reduziram a viabilidade em comparação com grupo DMSO 0.1%, ao passo que as drogas isoladas não ocasionaram redução significativa de viabilidade.
- ✓ Entretanto, tal redução de viabilidade não se correlacionou com indução de morte celular por apoptose, ocorrência de estresse oxidativo ou alteração capacidade proliferativa.
- ✓ Não se pode excluir a existência de outros fenômenos possivelmente envolvidos com a diminuição da viabilidade celular, tais como autofagia ou parada do ciclo celular na fase G2/M.

- ✓ Ainda, a capacidade invasiva das células não foi alterada pelos tratamentos após 3 ou 5 dias.

6.2.2. Linhagem A172

✓ Verificamos redução da viabilidade celular após administração combinada de TMZ e SAS por 3 ou 5 dias. Este efeito se torna evidente quando comparamos o resultado da administração isolada de TMZ 25 μ M ou TMZ 50 μ M ou SAS 0.5 mM, com os efeitos das associações TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM e TMZ 50 μ M + SAS 0.5 mM. Em comparação com o grupo veículo DMSO 0.1%, a redução de viabilidade foi sempre maior após associação de drogas, do que após a administração isolada.

✓ O tratamento com SAS 0.5 mM por 3 dias causou depleção de glutathiona total, porém não observamos aumento de peroxidação lipídica nesta linhagem, sugerindo que estresse oxidativo não seja o principal mecanismo relacionado com a redução de viabilidade celular.

✓ Por outro lado, a expressão proteica de PCNA foi diminuída após tratamento por 5 dias com TMZ 25 μ M apenas ou associada com SAS 0.5 mM, indicando a existência de um efeito deste quimioterápico sobre a capacidade proliferativa das células A172. Este efeito da TMZ sobre a proliferação foi corroborado pelos dados de transcriptoma que indicaram alterações de diversas vias biológicas relacionadas ao ciclo celular.

✓ Os grupos tratados com SAS 0.5 mM apresentaram aumento de expressão de diversos genes relacionados à síntese e metabolismo de glutathiona, indicando um possível efeito compensatório das células que apresentaram os nível de glutathiona total diminuídos.

✓ Ainda, a capacidade invasiva destas células não foi alterada pelos tratamentos após 3 ou 5 dias.

6.2.3. Linhagem T98G

✓ Esta linhagem apresentou alteração significativa de viabilidade somente após tratamento com 1 mM de SAS. Por outro lado, não verificamos sensibilidade destas células às combinações testadas de TMZ com SAS.

- ✓ Não detectamos indução de apoptose, de peroxidação lipídica, bem como alterações nos níveis de glutathiona total após três dias de tratamento com TMZ 25 μ M e/ou SAS 0.5 mM.
- ✓ A capacidade invasiva destas células não foi alterada pelos tratamentos após 3 ou 5 dias.

6.2.4. Linhagem C6

- ✓ Discreta redução de viabilidade celular foi observada após tratamento com a associação de TMZ (25 ou 50 μ M) e SAS 0.25 mM por 3 ou 5 dias. Por outro lado, a viabilidade foi drasticamente diminuída após administração de SAS 0.5 mM por 1, 3 ou 5 dias.
- ✓ SAS 0.5 mM induziu apoptose após três dias de tratamento, fenômeno que provavelmente contribuiu com a redução de viabilidade observada.
- ✓ Além disso, nos grupos tratados com SAS 0.5 mM ou TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM, a redução de glutathiona total se relacionou com o aumento de peroxidação lipídica. Este fato indica a participação de estresse oxidativo no processo de redução de viabilidade e morte destas células.
- ✓ Verificamos ainda que a associação TMZ 25 μ M + SAS 0.5 mM diminuiu a atividade enzimática da MMP9 após 5 dias de tratamento, evidenciando redução da capacidade invasiva destas células.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AQUILANO, K., BALDELLI, S., CIRIOLO, M. R. (2014) Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. **Front Pharmacol.**, 5:196.
2. BACKOS, D. S., FRANKLIN, C. C., REIGAN, P. (2012) The role of glutathione in brain tumor drug resistance. **Biochem Pharmacol.**, 83 (8): 1005–1012.
3. BALENDIRAN, G. K., DABUR, R., FRASER, D. (2004) The role of glutathione in cancer. **Cell Biochem Funct.**, 22: 343–352.
4. BAMFORD, S., DAWSON, E., FORBES, S., CLEMENTS, J., PETTETT, R., DOGAN, A., FLANAGAN, A., TEAGUE, J., FUTREAL, P.A., STRATTON, M.R., WOOSTER, R. (2004) The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. **Br J Cancer.**, 91 (2): 355-8.
5. BARAZZUOL, L., JENA, R., BURNET, N.G., JEYNES, J.C., MERCHANT, M.J., KIRKBY, K.J., KIRKBY, N.F. (2012) In vitro evaluation of combined temozolomide and radiotherapy using X rays and high-linear energy transfer radiation for glioblastoma. **Radiat Res.**, 177 (5): 651-62.
6. BENDA, P., ET AL. (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. **Science.**, 161: 370-371.
7. BRADFORD, M. (1976) Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye-binding. **Anal Biochem.**, (72): 248–254.
8. CASTILHO, R. F., MEINICKE, A. R., VERCESI, A. E., HERMES-LIMA, M. (1999) Role of Fe(III) in Fe(II)citrate-mediated peroxidation of mitochondrial membrane lipids. **Mol Cell Biochem.**, 196 (1-2): 163-168.
9. COOPER, G.M. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000.
10. CHINTALA, S.K., TONN, J.C., RAO, J.S. (1999) Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. **Int J Dev Neurosci.**, 17 (5-6): 495-502.
11. CHOE, G., HORVATH, S., CLOUGHESY, T.F., et al. (2003) Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo. **Cancer Res.**, 63 (11), 2742-2746.
12. CHUNG, W.J., LYONS, S.A., NELSON, G.M., HAMZA, H., GLADSON, C.L., GILLESPIE, G.Y., SONTHEIMER, H. (2005) Inhibition of cystine uptake disrupts the growth of primary brain tumors. **J Neurosci.**, 25 (31): 7101-7110.

13. CHUNG, W.J., SONTHEIMER, H. (2009) Sulfasalazine inhibits the growth of primary brain tumors independent of nuclear factor-kappaB. **J Neurochem.**, 110 (1): 182-93.
14. CIRAK, B., INCI, S., PALAOGLU, S., BERTAN, V. (2003) Lipid peroxidation in cerebral tumors. **Clinica Chimica Acta.**, 327 (1-2): 103 – 107.
15. DAVIES, M.A., LU, Y., SANO, T., et al. (1998) Adenoviral transgene expression of MMAC/PTEN in human glioma cells inhibits Akt activation and induces anoikis. **Cancer Res.**, 58 (23), 5285-90.
16. ENDERSBY, R., BAKER, S.J. (2008) PTEN signaling in brain: neuropathology and tumorigenesis. **Oncogene**, 27 (41), 5416-5430.
17. ERMOIAN, R.P., FURNISS, C.S., LAMBORN, K.R., et al. (2002) Dysregulation of PTEN and protein kinase B is associated with glioma histology and patient survival. **Clin Cancer Res.**, 8 (5), 1100-1106.
18. ESTERBAUER, H., CHEESEMAN, K. H. (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol.**, 186: 407-421.
19. FORMAN, H. J., AUGUSTO, O., BRIGELIUS-FLOHE, R., DENNERY, P. A., KALYANARAMAN, B., ISCHIROPOULOS, H., MANN, G. E., RADI, R., ROBERTS, L. J., VINA, J., DAVIES, K. J. (2015) Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology. **Free Radic Biol Med.**, 78: 233-235.
20. FREEMAN, D.J., LI, A.G., WEI, G., et al. (2003) PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. **Cancer Cell.**, 3 (2), 117-130.
21. GABELLONI, P., DA POZZO, E., BENDINELLI, S., COSTA, B., NUTI, E., CASALINI, F., ORLANDINI, E., DA SETTIMO, F., ROSSELLO, A., MARTINI, C. (2010) Inhibition of metalloproteinases derived from tumours: new insights in the treatment of human glioblastoma. **Neuroscience.**, 168 (2): 514-22.
22. GROBBEN, B., DE DEYN, P.P., SLEGGERS, H. (2002) Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. **Cell Tissue Res.**, 310 (3); 257-270.
23. HAPPOLD, C., ROTH, P., WICK, W., SCHMIDT, N., FLOREA, A.M., SILGINER, M., REIFENBERGER, G., WELLER, M. (2012) Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells. **J Neurochem.**, 122 (2): 444-55.

24. HATANPAA, K.J., BURMA, S., ZHAO, D., et al. (2010) Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. **Neoplasia**, 12 (9), 675-684.
25. HAY, R.J., PARK, JAE-GAHB., GAZDAR, A. (1994) Atlas of Human Tumor Cell Lines. Academic Press., San Diego, California.
26. HAYES, J. D., FLANAGAN, J. U., JOWSEY, I. R. (2005) Glutathione transferases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, 45: 51–88.
27. HEDE, S.M., NAZARENKO, I., NISTÉR, M., et al. (2011) Novel perspectives on p53 function in neural stem cells and brain tumors. **J Oncol.**, 852970.
28. HIROSE, Y., BERGER, M.S., PIEPER, R.O. (2001) p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. **Cancer Res.**, 61 (5): 1957-63.
29. HOMMA, T., FUKUSHIMA, T., VACCARELLA, S., et al. (2006) Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. **J Neuropathol Exp Neurol.**, 65 (9), 846-854.
30. HU, X., PANDOLFI, P.P., LI, Y., et al. (2005) mTOR promotes survival and astrocytic characteristics induced by Pten/AKT signaling in glioblastoma. **Neoplasia**, 7 (4), 356-368.
31. HUANG, X.J., LI, C.T., ZHANG, W.P., LU, Y.B., FANG, S.H., WEI, E.Q. (2008) Dihydroartemisinin potentiates the cytotoxic effect of temozolomide in rat C6 glioma cells. **Pharmacology.**, 82 (1): 1-9.
32. IGNARRO, R.S., VIEIRA, A.S., SARTORI, C. R., LANGONE, F., ROGÉRIO, F., PARADA, C.A. (2013) JAK2 inhibition is neuroprotective and reduces astrogliosis after quinolinic acid striatal lesion in adult mice. **J Chem Neuroanat.**, 48-49: 14–22.
33. IVANCHUK, S.M., RUTKA, J. T. (2004) The Cell Cycle: Accelerators, Brakes, and Checkpoints. **Neurosurgery.**, 54 (3): 692–700.
34. JO, M.Y., KIM, Y.G., KIM, Y., LEE, S. J., KIM, M. H., JOO, K. M., KIM, H. H., NAM, D. H. (2012) Combined therapy of temozolomide and ZD6474 (vandetanib) effectively reduces glioblastoma tumor volume through anti-angiogenic and anti-proliferative mechanisms. **Mol Med Rep.**, 6 (1): 88–92.
35. KANZAWA, T., GERMANO, I.M., KOMATA, T., ITO, H., KONDO, Y., KONDO, S. (2004) Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. **Cell Death Differ.**, 11 (4): 448-57.
36. KELMAN, Z. (1997) PCNA: structure, functions and interactions. **Oncogene.**, 14 (6): 629-640.

37. KLEIHUES, P., OHGAKI, H. (1999) Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. **Neuro Oncol.**, 1(1), 44-51.
38. KNOBBE, C.B., LAPIN, V., SUZUKI, A., et al. (2008) The roles of PTEN in development, physiology and tumorigenesis in mouse models: a tissue-by-tissue survey. **Oncogene**, 27 (41), 5398-5415.
39. KRAUS, J.A., GLESMANN, N., BECK, M., et al. (2000) Molecular analysis of the PTEN, TP53 and CDKN2A tumor suppressor genes in long-term survivors of glioblastoma multiforme. **J Neurooncol.**, 48 (2), 89-94.
40. KRETH, S., HEYN, J., GRAU, S., KRETZSCHMAR, H. A., EGENSERGER, R., KRETH, F.W. (2010) Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in human glioma. **Neuro Oncol.**, 12 (6): 570-579.
41. LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.**, 227: 680–685.
42. LAN, J., XUE, Y., CHEN, H., ZHAO, S., WU, Z., FANG, J., HAN, C., LOU, M. (2014) Hypoxia-induced miR-497 decreases glioma cell sensitivity to TMZ by inhibiting apoptosis. **FEBS Lett.** [Epub ahead of print]
43. LEVIDOU, G., EL-HABR, E., SAETTA, A.A., et al. (2010) P53 immunoeexpression as a prognostic marker for human astrocytomas: a meta-analysis and review of the literature. **J Neurooncol.**, 100 (3), 363-371.
44. LINARES, V., ALONSO, V., DOMINGO, J. L. (2011) Oxidative stress as a mechanism underlying sulfasalazine-induced toxicity. **Expert Opin Drug Saf.**, 10 (2): 253-263.
45. LINDEN, A., GÜLDEN, M., MARTIN, H. J., MASER, E., SEIBERT, H. (2008) Peroxide-induced cell death and lipid peroxidation in C6 glioma cells. **Toxicol In Vitro.**, 22 (5): 1371-1376.
46. LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods.**, 25 (4): 402-8.
47. LOUIS, D.N., OHGAKI, H., WIESTLER, O.D., CAVENEE, W.K. (eds) (2007a) WHO Classification of tumours of the central nervous system. 3rd edition. Lyon: IARC Press.
48. LOUIS, D.N., OHGAKI, H., WIESTLER, O.D., CAVENEE, W.K., BURGER, P.C., JOUVET, A., SCHEITHAUER, B.W., KLEIHUES, P. (2007b) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol.**, 114 (2): 97-109.
49. LYONS, S.A., CHUNG, W.J., WEAVER, A.K., OGUNRINU, T., SONTHEIMER, H. (2007) Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion. **Cancer Res.**, 67 (19): 9463-71.

50. MACHADO, D., SHISHIDO, S.M., QUEIROZ, K.C., OLIVEIRA, D.N., FARIA, A.L., CATHARINO, R.R., SPEK, C.A., FERREIRA, C.V. (2013) Irradiated riboflavin diminishes the aggressiveness of melanoma in vitro and in vivo. **PLoS One.**, 8 (1): e54269.
51. MAILAND, N., GIBBS-SEYMOUR, I., BEKKER-JENSEN, S. (2013) Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, 14 (5): 269-282.
52. MANDAL, P. K., SEILER, A., PERISIC, T., ET AL (2010) System xc- and thioredoxin reductase 1 cooperatively rescue glutathione deficiency. **J Biol Chem.**, 285 (29): 22244–22253.
53. MARÍ, M., MORALES, A., COLELL, A., GARCÍA-RUIZ, C., FERNÁNDEZ-CHECA, J.C. (2009) Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. **Antioxid Redox Signal.**, 11 (11): 2685-700.
54. MARUCCI, G., MORANDI, L., MAGRINI, E., FARNEDI, A., FRANCESCHI, E., MIGLIO, R., CALÒ, D., PESSION, A., FOSCHINI, M.P., EUSEBI, V. (2008) Gene expression profiling in glioblastoma and immunohistochemical evaluation of IGFBP-2 and CDC20. **Virchows Arch.**, 453 (6): 599–609.
55. McLENDON, R.E., ROSENBLUM, M.K. BIGNER, D.D. (eds) Russell and Rubinstein's Pathology of Tumors of the Nervous System. 7th edition. London: Hodder Arnold, 2006.
56. MEISTER, A. (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. **J Biol Chem.**, 263 (33): 17205-8.
57. MONTALDI, A. P., SAKAMOTO-HOJO, E. T. (2013) Methoxyamine sensitizes the resistant glioblastoma T98G cell line to the alkylating agent temozolomide. **Clin Exp Med.**, 13 (4): 279-288.
58. MORALES, A.G., PEZUK, J.A., BRASSESCO, M.S., DE OLIVEIRA, J.C., DE PAULA QUEIROZ, R. G., MACHADO, H. R., CARLOTTI CG, JR., NEDER, L., DE OLIVEIRA, H.F., SCRIDELI, C.A., TONE, L. G. (2013) BUB1 and BUBR1 inhibition decreases proliferation and colony formation, and enhances radiation sensitivity in pediatric glioblastoma cells. **Childs Nerv Syst.**, 29 (12): 2241–2248.
59. MUKHERJEE, M., BYRD, T., BRAWLEY, V. S., BIELAMOWICZ, K., AHMED, N., ZHANG, N., PATI, D. (2014) Overexpression and constitutive nuclear localization of cohesin protease Separase protein correlates with high incidence of relapse and reduced overall survival in glioblastoma multiforme. **J Neurooncol.**, 119 (1) :27–35.
60. MUSACCHIO, A., HARDWICK, K.G. (2002) The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, 3 (10): 731–741.

61. NAG, S., MANIAS, J.L., STEWART, D.J. (2009) Pathology and new players in the pathogenesis of brain edema. **Acta Neuropathol.**, 118 (2), 197-217.
62. NOZAKI, M., TADA, M., KOBAYASHI, H., et al. (1999) Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression. **Neuro Oncol.**, 1 (2), 124-137.
63. OHGAKI, H., DESSEN, P., JOURDE, B., et al. (2004) Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. **Cancer Res.**, 64 (19), 6892-6899.
64. OHGAKI, H., KLEIHUES, P. (2009) Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. **Cancer Sci.**, 100 (12): 2235-2241.
65. OSTERMANN, S., CSAJKA, C., BUCLIN, T., LEYVRAZ, S., LEJEUNE, F., DECOSTERD, L.A., STUPP, R. (2004) Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. **Clin Cancer Res.**, 10 (11): 3728-36.
66. PARK, M.J., KIM, M.S., PARK, I.C., KANG, H.S., YOO, H., PARK, S.H., RHEE, C.H., HONG, S.I., LEE, S.H. (2002) PTEN suppresses hyaluronic acid-induced matrix metalloproteinase-9 expression in U87MG glioblastoma cells through focal adhesion kinase dephosphorylation. **Cancer Res.**, 62 (21): 6318-22.
67. PELICANO, H., CARNEY, D., HUANG, P. (2004) ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. **Drug Resist Updat.**, 7 (2): 97-110.
68. PHILLIPS, H.S., KHARBANDA, S., CHEN, R., et al. (2006) Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. **Cancer Cell.**, 9 (3) 157-173.
69. PUC, J., KENIRY, M., LI, H.S., et al. (2005) Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. **Cancer Cell**, 7 (2), 193-204.
70. PUC, J., PARSONS, R. (2005) PTEN loss inhibits CHK1 to cause double stranded-DNA breaks in cells. **Cell Cycle.**, 4 (7), 927-929.
71. RAFFEL, C., FREDERICK, L., O'FALLON, J.R., et al. (1999) Analysis of oncogene and tumor suppressor gene alterations in pediatric malignant astrocytomas reveals reduced survival for patients with PTEN mutations. **Clin Cancer Res.**, 5 (12), 4085-4090.
72. RAHMAN, I., KODE, A., BISWAS, S.K. (2006) Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nat Protoc.**, 1(6): 3159-65.
73. RAJAN, P., MCKAY, R.D. (1998) Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. **J Neurosci.**, 18 (10), 3620-3629.
74. RAO, J.S. (2003) Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. **Nat Rev Cancer.**, 3 (7): 489-501.

75. REVESZ, T., ALSANJARI, N., DARLING, J. L., SCARAVILLI, F., LANE, D. P., THOMAS, D. G. (1993) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): expression in samples of human astrocytic gliomas. **Neuropathol Appl Neurobiol.**, 19 (2): 152-158.
76. RIEMENSCHNEIDER, M.J., JEUKEN, J.W., WESSELING, P., et al. (2010) Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. **Acta Neuropathol.**, 120 (5), 567-584.
77. ROBE, P.A., BENTIRES-ALJ, M., BONIF, M., ROGISTER, B., DEPREZ, M., HADDADA, H., KHAC, M.T., JOLOIS, O., ERKMEN, K., MERVILLE, M.P., BLACK, P.M., BOURS, V. (2004) In vitro and in vivo activity of the nuclear factor-kappaB inhibitor sulfasalazine in human glioblastomas. **Clin Cancer Res.**, 10 (16): 5595-603.
78. ROMERO-CALVO, I., OCÓN, B., MARTÍNEZ-MOYA, P., SUÁREZ, M. D., ZARZUELO, A., MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O., DE MEDINA, F. S. (2010) Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Anal Biochem.**, 401 (2): 318–320.
79. ROOS, W.P., BATISTA, L.F., NAUMANN, S.C., WICK, W., WELLER, M., MENCK, C.F., KAINA, B. (2007) Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. **Oncogene.**, 26 (2): 186-97.
80. SAUVAGEOT, C.M., WEATHERBEE, J.L., KESARI, S. et al. (2009) Efficacy of the HSP90 inhibitor 17-AAG in human glioma cell lines and tumorigenic glioma stem cells. **Neuro Oncol.**, 11(2), 109-121.
81. SCHLEGEL, J., STUMM, G. BRÄNDLE, K., et al. (1994) Amplification and differential expression of members of the erbB-gene family in human glioblastoma. **J Neurooncol.**, 22 (3), 201-207.
82. SENFT, C., PRIESTER, M., POLACIN, M., SCHRÖDER, K., SEIFERT, V., KÖGEL, D., WEISSENBERGER, J. (2011) Inhibition of the JAK-2/STAT3 signaling pathway impedes the migratory and invasive potential of human glioblastoma cells. **J Neurooncol.**, 101 (3): 393-403.
83. SHEN, W.H., BALAJEE, A.S., WANG, J., et al. (2007) Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. **Cell**, 128 (1), 157-70.
84. SHEN, W., HU, J.A., ZHENG, J.S. (2014) Mechanism of temozolomide-induced antitumour effects on glioma cells. **J Int Med Res.**, 42 (1): 164-72.
85. SINGAL, P. K., PETKAU, A., GERRARD, J. M., HRUSHOVETZ, S., FOERSTER, J. (1988) Free radicals in health and disease. **Mol Cell Biochem.**, 84 (2): 121-122.
86. SMITH, J.S., TACHIBANA, I., PASSE, S.M., et al. (2001) PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. **J Natl Cancer Inst.**, 93 (16), 1246-1256.

87. SON, M. J., KIM, J. S., KIM, M. H., ET AL (2006) Combination treatment with temozolomide and thalidomide inhibits tumor growth and angiogenesis in an orthotopic glioma model. **Int J Oncol.**, 28 (1): 53–59.
88. SONTHEIMER, H. (2008) A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors. **J Neurochem.**, 105 (2): 287-295.
89. STAMBOLIC, V., MACPHERSON, D., SAS, D., et al. (2001) Regulation of PTEN transcription by p53. **Mol Cell.**, 8 (2), 317-325.
90. STUPP, R., HEGI, M. E., MASON, W.P., ET AL. (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **Lancet Oncol.**, 10 (5): 459–466.
91. STUPP, R., MASON, W. P., VAN DEN BENT, M.J., ET AL. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med.**, 352 (10):987–996.
92. SUN, S., WONG, T.S., ZHANG, X.Q., PU, J.K., LEE, N.P., DAY, P.J., NG, G.K., LUI, W.M., LEUNG, G.K. (2012) Protein alterations associated with temozolomide resistance in subclones of human glioblastoma cell lines. **J Neurooncol.**, 107 (1): 89-100.
93. SYLVESTER, P.W. (2011) Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. **Methods Mol Biol.**, 716: 157-68.
94. TADA, H., SHIHO, O., KUROSHIMA, K., KOYAMA, M., TSUKAMOTO, K. (1986) An improved colorimetric assay for interleukin 2. **J Immunol Methods.**, 93 (2): 157-65.
95. TADA, K., SHIRAISHI, S., KAMIRYO, T., et al. (2001) Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 10 in patients with malignant astrocytic tumors: correlation with patient age and survival. **J Neurosurg.**, 95 (4), 651-659.
96. TENTORI, L., RICCI-VITIANI, L., MUZI, A., CICCARONE, F., PELACCHI, F., CALABRESE, R., RUNCII, D., PALLINI, R., CAIAFA, P., GRAZIANI, G. (2014) Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates resistance of human glioblastoma stem cells to temozolomide. **BMC Cancer.**, 14: 151.
97. TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 76:4350–4354.
98. TRAVERSO, N., RICCIARELLI, R., NITTI, M., MARENGO, B., FURFARO, A. L., PRONZATO, M. A., MARINARI, U. M., DOMENICOTTI, C. (2013) Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. **Oxid Med Cell Longev.** doi:10.1155/2013/972913.

99. TROG, D., YEGHIAZARYAN, K., FOUNTOULAKIS, M., FRIEDLEIN, A., MOENKEMANN, H., HAERTEL, N., SCHUELLER, H., BREIPOHL, W., SCHILD, H., LEPPERT, D., GOLUBNITSCHAJA, O. (2006) Pro-invasive gene regulating effect of irradiation and combined temozolomide-radiation treatment on surviving human malignant glioma cells. **Eur J Pharmacol.**, 542 (1-3): 8-15.
100. UHRBOM, L., DAI, C., CELESTINO, J.C., et al. (2002) Ink4a-Arf loss cooperates with KRas activation in astrocytes and neural progenitors to generate glioblastomas of various morphologies depending on activated Akt. **Cancer Res.**, 62 (19), 5551-5558.
101. ULASOV, I., THACI, B., SARVAIYA, P., YI, R., GUO, D., AUFFINGER, B., PYTEL, P., ZHANG, L., KIM, C.K., BOROVJAGIN, A., DEY, M., HAN, Y., BARYSHNIKOV, A.Y., LESNIAK, M.S. (2013) Inhibition of MMP14 potentiates the therapeutic effect of temozolomide and radiation in gliomas. **Cancer Med.**, 2 (4):457-67.
102. UZZAMAN, M., KELLER, G., GERMANO, I.M. (2007) Enhanced proapoptotic effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand on temozolomide-resistant glioma cells. **J Neurosurg.**, 106 (4): 646-51.
103. VAN MEIR, E.G., KIKUCHI, T., TADA, M., LI, H., DISERENS, A.C., WOJCIK, B.E., HUANG, H.J., FRIEDMANN, T., DE TRIBOLET, N., CAVENEE, W.K. (1994) Analysis of the p53 gene and its expression in human glioblastoma cells. **Cancer Res.**, 54(3): 649-52.
104. VOGELSTEIN, B., LANE, D., LEVINE, A.J. (2000) Surfing the p53 network. **Nature**, 408 (6810), 307-310.
105. VOUSDEN, K.H., PRIVES, C. (2009) Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. **Cell**, 137 (3), 413-431.
106. WANG, L., ZHANG, J., WAN, L., ZHOU, X., WANG, Z., WEI, W. (2015) Targeting Cdc20 as a novel cancer therapeutic strategy. **Pharmacol Ther.**, 151:141-151.
107. WEINBERG, R.A. (2006) *The Biology of Cancer*. London: Garland Science.
108. WEN, S., STOLAROV, J., MYERS, M.P., et al. (2001) PTEN controls tumor-induced angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 98 (8), 4622-4627.
109. YIN, Y., SHEN, W.H. (2008) PTEN: a new guardian of the genome. **Oncogene**, 27 (41), 5443-5453.
110. YIP, S., IAFRATE, A.J., LOUIS, D.N. (2008) Molecular diagnostic testing in malignant gliomas: a practical update on predictive markers. **J Neuropathol Exp Neurol.**, 67 (1), 1-15.
111. YOSHINO, A., OGINO, A., YACHI, K., OHTA, T., FUKUSHIMA, T., WATANABE, T., KATAYAMA, Y., OKAMOTO, Y., NARUSE, N., SANO, E., TSUMOTO, K. (2010) Gene

expression profiling predicts response to temozolomide in malignant gliomas. **Int J Oncol.**, 36 (6): 1367-77.

112. ZENG, X., SIGOILLOT, F., GAUR, S., CHOI, S., PFAFF, K. L., OH, D.C., HATHAWAY, N., DIMOVA, N., CUNY, G. D., KING, R. W. (2010) Pharmacologic inhibition of the anaphase-promoting complex induces a spindle checkpoint-dependent mitotic arrest in the absence of spindle damage. **Cancer Cell.**, 18 (4): 382–395.
113. ZENGIN, E., ATUKEREN, P., KOKOGLU, E., GUMUSTAS, M. K., ZENGIN U. (2009) Alterations in lipid peroxidation and antioxidant status in different types of intracranial tumors within their relative peritumoral tissues. **Clin Neurol Neurosurg.**, 111(4): 345-351.

ANEXO

Tabelas apresentando vias de sinalização enriquecidas em células de glioblastoma humano A172 após três dias de tratamento com temozolamida (TMZ) e/ou sulfasalazina (SAS). Dados obtidos através da análise do transcriptoma e avaliação pela plataforma Metacore® (Thomas Reuters). São apresentadas apenas as vias com enriquecimento significativo (p valor ajustado < 0.05). As vias estão agrupadas considerando-se os genes “up” ou “down”- regulados. O valor entre parênteses após o nome de cada gene indica a variação de expressão do gene (*fold change*), em relação às células que receberam apenas meio de cultura suplementado contendo o veículo de diluição da TMZ (DMSO 0.1%).

TMZ 25 µM vs DMSO 0.1%: vias enriquecidas contendo genes "down"- regulados	
1	Ciclo celular_ o ponto de checagem da metáfase (p valor ajustado: 4.37 E-15) BUBR1 (0.45), Nek2A (0.43), INCENP (0.52), BUB1 (0.38), CENP-A (0.41), DSN1 (0.69), Aurora-A (0.42), PLK1 (0.29), Aurora-B (0.57), HP1 gamma (0.68), HEC (0.50), CDCA1 (0.51), CDC20 (0.39), CENP-F (0.44), MAD2a (0.53), ZW10 (0.66), Survivin (0.51), CENP-E (0.39) Genes totais nesta via: 36, genes "down"- regulados: 18
2	Ciclo celular_ montagem do fuso mitótico e separação dos cromossomos (p valor ajustado: 2.95 E-11) Nek2A (0.43), TPX2 (0.51), RCC1 (0.58), Aurora-A (0.42), KNSL1 (0.47), Aurora-B (0.57), HEC (0.50), Kid (0.54), CDC20 (0.39), MAD2a (0.53), Separase (0.47), ZW10 (0.66) Genes totais nesta via: 20, genes "down"- regulados: 12
3	Ciclo celular_ papel do complexo promotor da anáfase (APC) na regulação do ciclo celular (p valor ajustado: 2.95 E-11) Nek2A (0.43), BUB1 (0.38), Tome-1 (0.50), Emi1 (0.54), Aurora-A (0.42), PLK1 (0.29), Aurora-B (0.57), CDC25A (0.58), Kid (0.54), CDC20 (0.39), MAD2a (0.53), ORC1L (0.61), BUBR1 (0.45) Genes totais nesta via: 25, genes "down"- regulados: 13
4	Ciclo celular_ condensação dos cromossomos na prometáfase (p valor ajustado: 2.32 E-08) INCENP (0.52), BRRN1 (0.54), CAP-G (0.51), CAP-C (0.52), CNAP1 (0.60), Aurora-A (0.42), Aurora-B (0.57), CAP-E (0.61) Genes totais nesta via: 11, genes "down"- regulados: 8
5	Ciclo celular_ início da replicação do DNA na fase S inicial (p valor ajustado: 4.48 E-07) DRF1 (0.60), MCM4 (0.55), MCM3 (0.41), Cyclin E (0.62), E2F1 (0.51), MCM10 (0.58), ASK (Dbf4) (0.38), MCM2 (0.49), ORC1L (0.61), MCM5 (0.49) Genes totais nesta via: 26, genes "down"- regulados: 10
6	Ciclo celular_ iniciação da mitose (p valor ajustado: 5.55 E-06) CDC25C (0.51), Cyclin B1 (0.48), Nucleolin (nucleolin) (0.74), PLK1 (0.29), KNSL1 (0.47), Wee1 (0.61), Cyclin B2 (0.54), FOXM1 (0.58) Genes totais nesta via: 19, genes "down"- regulados: 8
7	Ciclo celular_ ciclo celular (esquema genérico) (p valor ajustado: 5.21 E-05) CDC25C (0.51), E2F5 (0.61), p107 (0.66), Cyclin E (0.62), CDC25A (0.58), E2F1 (0.51), E2F2 (0.39) Genes totais nesta via: 18, genes "down"- regulados: 7
8	Dano ao DNA_ regulação do ponto de checagem G1/S via proteínas ATM/ATR (p valor ajustado: 6.19 E-05) Bard1 (0.54), Cyclin E (0.62), Claspin (0.53), Chk1 (0.53), USP1 (0.52), NFB1 (0.69), CDC25A (0.58), FANCL (0.63) Genes totais nesta via: 26, genes "down"- regulados: 8
9	Ciclo celular_ papel do Nek na regulação do ciclo celular (p valor ajustado: 1.27 E-04) Nek2A (0.43), Cyclin B1 (0.48), TPX2 (0.51), RCC1 (0.58), Aurora-A (0.42), HEC (0.50), MAD2a (0.53) Genes totais nesta via: 21, genes "down"- regulados: 7
10	Transcrição_ papel da família da proteína heterocromatina 1 (HP1) no silenciamento da transcrição (p valor ajustado: 1.27 E-04) Cyclin A2 (0.42), Cyclin E (0.62), DNMT1 (0.65), E2F1 (0.51), HP1 gamma (0.68), CDC25A (0.58), Sin3A (0.69), Suv39H1 (0.59) Genes totais nesta via: 29, genes "down"- regulados: 8
11	Ciclo celular_ papel do complexo SCF na regulação do ciclo celular (p valor ajustado: 4.25 E-04) Emi1 (0.54), Cyclin E (0.62), Chk1 (0.53), PLK1 (0.29), E2F1 (0.51), CDC25A (0.58), Wee1 (0.61) Genes totais nesta via: 25, genes "down"- regulados: 7
12	Dano ao DNA_ regulação do ponto de checagem G2/M via proteínas ATM/ATR (p valor ajustado: 1.92 E-03) CDC25C (0.51), Claspin (0.53), Chk1 (0.53), NFB1 (0.69), Wee1 (0.61), FANCL (0.63) Genes totais nesta via: 22, genes "down"- regulados: 6
13	Ciclo celular_ transporte das Ciclinas/CDks entre o núcleo e o citoplasma (p valor ajustado: 8.23 E-03) Cyclin B1 (0.48), Cyclin E (0.62), Karyopherin beta 1 (0.60), CRM1 (0.67) Genes totais nesta via: 11, genes "down"- regulados: 4
14	Ciclo celular_ papel das proteínas 14-3-3 na regulação do ciclo celular (p valor ajustado: 9.85 E-03) CDC25C (0.51), Chk1 (0.53), CDC25A (0.58), Wee1 (0.61), 14-3-3 eta (0.65) Genes totais nesta via: 20, genes "down"- regulados: 5
15	Ciclo celular_ coesão das cromátides irmãs (p valor ajustado: 2.54 E-02) DNA polymerase sigma (0.72), Rad21 (0.60), SMC3 (0.63), Separase (0.47) Genes totais nesta via: 15, genes "down"- regulados: 4
16	Dano ao DNA_ papel dos genes Brca1 e Brca2 no reparo do DNA (p valor ajustado: 3.54 E-02) MSH6 (0.57), Bard1 (0.54), NFB1 (0.69), MSH2 (0.62), FANCL (0.63) Genes totais nesta via: 27, genes "down"- regulados: 5
17	Ciclo celular_ transição e término da replicação do DNA (p valor ajustado: 3.59 E-02) Ribonuclease H1 (0.79), Bard1 (0.54), POLD reg (p68) (0.68), MCM2 (0.49) Genes totais nesta via: 17, genes "down"- regulados: 4

SAS 0.5 mM + TMZ 25 µM vs DMSO 0.1% vias enriquecidas contendo genes "down"- regulados	
1	Cell cycle_ The metaphase checkpoint (p valor ajustado: 9.42 E-20) INCENP (0.47), SPBC25 (0.47), BUB3 (0.68), Rod (0.58), DSN1 (0.69), Aurora-B (0.41), HEC (0.29), HZwint-1 (0.55), CENP-C (0.49), ZW10 (0.64), Survivin (0.32), CENP-E (0.29), Nek2A (0.27), BUB1 (0.23), CENP-A (0.26), Aurora-A (0.23), PLK1 (0.19), HP1 gamma (0.57), CDCA1 (0.34), CDC20 (0.24), CENP-F (0.27), Zwlch (0.52), MAD2a (0.39), CENP-H (0.55), NSL1 (0.72), AF15q14 (0.40), BUBR1 (0.33) Genes totais nesta via: 36, genes "down"- regulados: 27
2	Ciclo celular_papel do complexo promotor da anáfase (APC) na regulação do ciclo celular (p valor ajustado: 1.92 E-15) CDC18L (CDC6) (0.63), BUB3 (0.68), Tome-1 (0.33), Aurora-B (0.41), Kid (0.41), CDC25A (0.61), SKP2 (0.50), ORC1L (0.45), Nek2A (0.27), BUB1 (0.23), Geminin (0.59), Emi1 (0.38), Aurora-A (0.23), PLK1 (0.19), CDC20 (0.24), MAD2a (0.39), Securin (0.42), CDK1 (p34) (0.41), CDK2 (0.54), BUBR1 (0.33) Genes totais nesta via: 25, genes "down"- regulados: 20
3	Ciclo celular_ montagem do fuso mitótico e separação dos cromossomos (p valor ajustado: 3.10 E-12) RCC1 (0.44), KNSL1 (0.29), Aurora-B (0.41), HEC (0.29), Kid (0.41), Separase (0.38), ZW10 (0.64), Nek2A (0.27), TPX2 (0.32), CSE1L (0.51), Aurora-A (0.23), CDC20 (0.24), MAD2a (0.39), Securin (0.42), Ran (0.66), CDK1 (p34) (0.41) Genes totais nesta via: 20, genes "down"- regulados:16
4	Ciclo celular_início da replicação do DNA na fase S inicial (p valor ajustado: 3.51 E-12) CDC18L (CDC6) (0.63), MCM3 (0.41), ORC6L (0.67), RPA1 (0.65), ORC2L (0.74), ASK (Dbf4) (0.29), CDC7 (0.58), MCM2 (0.48), ORC1L (0.45), MCM5 (0.54), DRF1 (0.42), Geminin (0.59), MCM4 (0.48), Cyclin E (0.61), E2F1 (0.65), MCM10 (0.49), CDK2 (0.54), CDC45L (0.60) Genes totais nesta via: 26, genes "down"- regulados:18
5	Ciclo celular_ condensação dos cromossomos na prometáfase (p valor ajustado: 1.08 E-06) INCENP (0.47), CAP-C (0.39), CNAP1 (0.41), Aurora-B (0.41), BRRN1 (0.38), CAP-G (0.33), Aurora-A (0.23), CAP-E (0.44), CDK1 (p34) (0.41) Genes totais nesta via:11, genes "down"- regulados:9
6	Ciclo celular_papel das proteínas 14-3-3 na regulação do ciclo celular (p valor ajustado: 1.10 E-05) 14-3-3 epsilon (0.67), Chk1 (0.55), CDC25A (0.61), Wee1 (0.43), 14-3-3 eta (0.64), CDC25C (0.30), p53 (0.66), 14-3-3 theta (0.78), 14-3-3 zeta/delta (0.69), CDC25B (0.53), CDK1 (p34) (0.41) Genes totais nesta via: 20, genes "down"- regulados:11
7	Dano ao DNA_ regulação do ponto de checagem G1/S via proteínas ATM/ATR (p valor ajustado: 2.54 E-05) Chk1 (0.55), CDC25A (0.61), Brca1 (0.66), FANCL (0.50), BLM (0.53), FANCD2 (0.61), p53 (0.66), Bard1 (0.43), Cyclin E (0.61), Claspin (0.47), USP1 (0.50), CDK2 (0.54) Genes totais nesta via: 26, genes "down"- regulados: 12
8	Ciclo celular_ ciclo celular (esquema genérico) (p valor ajustado: 2.54 E-05) CDC25A (0.61), E2F2 (0.51), CDC25C (0.30), E2F5 (0.59), p107 (0.62), Cyclin E (0.61), E2F1 (0.65), CDC25B (0.53), CDK1 (p34) (0.41), CDK2 (0.54) Genes totais nesta via: 18, genes "down"- regulados: 10
9	Dano ao DNA_ regulação do ponto de checagem G2/M via proteínas ATM/ATR (p valor ajustado: 2.54 E-05) Chk1 (0.55), Brca1 (0.66), Wee1 (0.43), FANCL (0.50), CDC25C (0.30), BLM (0.53), FANCD2 (0.61), p53 (0.66), Claspin (0.47), CDC25B (0.53), CDK1 (p34) (0.41) Genes totais nesta via: 22, genes "down"- regulados:11
10	Ciclo celular_ iniciação da mitose (p valor ajustado: 4.31 E-05) Nucleolin (0.65), KNSL1 (0.29), Wee1 (0.43), Cyclin B2 (0.29), CDC25C (0.30), Cyclin B1 (0.28), PLK1 (0.19), CDC25B (0.53), FOXM1 (0.46), CDK1 (p34) (0.41) Genes totais nesta via: 19, genes "down"- regulados: 10
11	Transcrição_papel da família da proteína heterocromatina 1 (HP1) no silenciamento da transcrição (p valor ajustado: 7.78 E-05) HDAC9 (0.73), DNMT1 (0.55), CDC25A (0.61), HP1 beta (0.64), Sin3A (0.66), HDAC2 (0.66), Cyclin A2 (0.24), Cyclin E (0.61), E2F1 (0.65), HP1 gamma (0.57), Suv39H1 (0.61), CDK1 (p34) (0.41) Genes totais nesta via: 29, genes "down"- regulados: 12
12	Ciclo celular_ papel do complexo SCF na regulação do ciclo celular (p valor ajustado: 9.56 E-05) Cullin 1 (0.80), Chk1 (0.55), CDC25A (0.61), SKP2 (0.50), Wee1 (0.43), Emi1 (0.38), Cyclin E (0.61), PLK1 (0.19), E2F1 (0.65), CDK1 (p34) (0.41), CDK2 (0.54) Genes totais nesta via: 25, genes "down"- regulados:11
13	Apoptose e sobrevivência_ apoptose induzida por dano ao DNA (p valor ajustado: 2.05 E-04) Histone H2AX (0.48), Chk1 (0.55), Brca1 (0.66), FANCL (0.50), BLM (0.53), FANCD2 (0.61), p53 (0.66), E2F1 (0.65) Genes totais nesta via: 14, genes "down"- regulados: 8
14	Ciclo celular_ papel do Nek na regulação do ciclo celular (p valor ajustado: 9.61 E-04) RCC1 (0.44), HEC (0.29), Nek2A (0.27), Cyclin B1 (0.28), TPX2 (0.32), Aurora-A (0.23), MAD2a (0.39), Ran (0.66), CDK1 (p34) (0.41) Genes totais nesta via: 21, genes "down"- regulados: 9
15	Ciclo celular_ transição e término da replicação do DNA (p valor ajustado: 1.15 E-03) TOP2 alpha (0.36), Brca1 (0.66), MCM2 (0.48), FEN1 (0.61), Bard1 (0.43), POLD reg (p68) (0.54), CDK1 (p34) (0.41), CDK2 (0.54) Genes totais nesta via: 17, genes "down"- regulados: 8
16	Dano ao DNA_ papel dos genes Brca1 e Brca2 no reparo do DNA (p valor ajustado: 1.34 E-03) Histone H2AX (0.48), Brca1 (0.66), BRIP1 (0.56), MSH2 (0.55), FANCL (0.50), MLH1 (0.68), FANCD2 (0.61), p53 (0.66), MSH6 (0.48), Bard1 (0.43) Genes totais nesta via: 27, genes "down"- regulados: 10
17	Ciclo celular_ coesão das cromátides irmãs (p valor ajustado: 3.54 E-03) DNA polymerase sigma (0.72), SMC3 (0.56), RFC3 (0.53), Separase (0.38), Rad21 (0.52), Securin (0.42), CDK1 (p34) (0.41) Genes totais nesta via: 15, genes "down"- regulados: 7
18	Ciclo celular_ transporte das Ciclinas/CDks entre o núcleo e o citoplasma (p valor ajustado: 3.67 E-03) Karyopherin beta 1 (0.54), CRM1 (0.66), Cyclin B1 (0.28), Cyclin E (0.61), CDK1 (p34) (0.41), CDK2 (0.54) Genes totais nesta via: 11, genes "down"- regulados: 6
19	Apoptose e sobrevivência_ apoptose dependente de p53 (p valor ajustado: 7.17 E-03) p73 (0.53), Brca1 (0.66), p53 (0.66), Apaf-1 (0.63), 14-3-3 theta (0.78), Bard1 (0.43), E2F1 (0.65), CDK1 (p34) (0.41), MEKK4 (MAP3K4) (0.71) Genes totais nesta via: 27, genes "down"- regulados: 9
20	Dano ao DNA_ inibição da atividade da telomerase e senescência celular (p valor ajustado: 4.99 E-02) p73 (0.53), Brca1 (0.66), p53 (0.66), p107 (0.62), E2F1 (0.65), CDK2 (0.54) Genes totais nesta via: 17, genes "down"- regulados: 6

SAS 0.5 mM vs DMSO 0.1%: vias enriquecidas contendo genes "up"- regulados	
1	Biossíntese de aminoacil-RNA transportador no citoplasma (p valor ajustado: 1.12 E-04) CysRS (1.88), WARS (1.73), GlyRS (1.71), TyrRS (1.45), SerRS (1.57), MARS (1.67), AARS (1.51) Genes totais nesta via: 18, genes "up"- regulados: 7
2	Estresse oxidativo_papel da "Sirtuin 1" e PGC1-alfa na ativação do sistema de defesa anti-oxidante (p valor ajustado: 2.50 E-04) Sequestosome 1(p62) (2.19), Thioredoxin (2.33), Heme oxygenase 1 (2.59), PRDX5 (1.74), SLC7A11 (2.14), TXNRD1 (2.04), GSHR (1.78), NQO1 (1.98), GCL reg (1.77) Genes totais nesta via: 41, genes "up"- regulados: 9
3	Metabolismo da glicina, serina, cisteína e treonina (p valor ajustado: 2.72 E-04) SERB (1.50), GCST (1.75), SERA (1.74), GlyRS (1.71), SerRS (1.57), SARS2 (1.57), AKR1C4 (2.78), SARDH (1.75), AKR1C1 (2.78) Genes totais nesta via: 43, genes "up"- regulados: 9
4	Metabolismo da glutatona/versão humana (p valor ajustado: 5.59 E-04) GSTK1 (1.72), GSTM2 (1.81), GSTM3 (2.01), GSTA4 (1.93), MGST (2.33), GSHR (1.78), GCL reg (1.77) Genes totais nesta via: 37, genes "up"- regulados: 8
5	Via das pentoses-fosfato (p valor ajustado: 1.64 E-03) PGMU (1.72), TALDO (1.65), G6PD (2.32), 6PGD (1.74), RBSK (2.24) Genes totais nesta via: 14, genes "up"- regulados: 5
6	Glicólise e gliconeogênese p.1 (p valor ajustado: 6.97 E-03) PGMU (1.72), GALM (1.52), G6PT1 (1.92), AK1BA (2.84), MANA (1.55) Genes totais nesta via: 19, genes "up"- regulados: 5
7	Biossíntese e metabolismo do leucotrieno 4 (p valor ajustado: 2.02 E-02) CYP4F3 (2.14), LTB4DH (2.43), AL3A2 (1.76), CYP4F2 (2.14) Genes totais nesta via: 14, genes "up"- regulados: 4

SAS 0.5 mM + TMZ 25 µM vs DMSO 0.1%: vias enriquecidas contendo genes "up"- regulados	
1	Estresse oxidativo_papel da "Sirtuin 1" e PGC1-alfa na ativação do sistema de defesa anti-oxidante (p valor ajustado: 6.89 E-03) ERR1 (2.1), Sequestosome 1(p62) (2.5), Heme oxygenase 1 (5.27), GCL cat (1.9), FKHR (1.78), Sestrin 2 (3.08), TXNRD1 (1.82), GSHR (1.71), NQO1 (1.65), GCL reg (2.09), PPAR-gamma (1.86), Sestrin 1 (3.99), SLC7A11 (2.65) Genes totais nesta via: 41, genes "up"- regulados: 13
2	Apoptose e sobrevivência_vias apoptóticas da família do TNF (p valor ajustado: 1.86 E-02) Bcl-XL (2.20), NGF (1.97), NGFR(TNFRSF16) (1.88), DR5(TNFRSF10B) (2.31), Bax (2.09), TRADD (1.71), Caspase-9 (1.39), DR4(TNFRSF10A) (2.31), c-IAP1 (2.75), RAIDD (1.61), CD70(TNFSF7) (2.41), FasR(CD95) (4.89) Genes totais nesta via: 41, genes "up"- regulados: 12
3	Biossíntese de aminoacil-RNA transportador no citoplasma (p valor ajustado: 3.54 E-02) TyrRS (1.45), WARS (1.88), GlyRS (1.76), MARS (1.50), CysRS (1.84), SerRS (1.62), AARS (1.82) Genes totais nesta via: 18, genes "up"- regulados: 7
4	Apoptose e sobrevivência_vias anti-apoptóticas do TNF/NF-kB/Bcl-2 (p valor ajustado: 3.54 E-02) OX40L(TNFSF4) (2.06), Sequestosome 1(p62) (2.50), Bcl-XL (2.20), NGF (1.97), NGFR(TNFRSF16) (1.88), NF-kB2 (p100) (1.70), TRADD (1.71), RelB (NF-kB subunit) (2.71), NF-kB2 (p52) (1.70), IKK-beta (1.65) Genes totais nesta via: 36, genes "up"- regulados: 10
5	Metabolismo da glicina, serina, cisteína e treonina (p valor ajustado: 3.54 E-02) GCST (2.25), SARS2 (1.62), AKR1C1 (2.64), GlyRS (1.76), AKR1C4 (2.64), CBS (1.84), SERA (1.53), SERB (1.42), AOC2 (1.99), SerRS (1.62), SARDH (1.57) Genes totais nesta via: 43, genes "up"- regulados: 11
6	Metabolismo da glutatona/versão humana (p valor ajustado > 5.0 E-02, não significante) GSHR (1.71), GSTM2 (1.83), GGT1 (1.94), GCL reg (2.09), GCL cat (1.9) Genes totais nesta via: 37, genes "up"- regulados: 6




COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "*Estudo da ação de temozolamida e sulfasalazina sobre células de glioblastoma humano e de glioma de rato*", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: 
Nome do(a) aluno(a): Rafaela Silvestre Ignarro

Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): Fabio Rogerio


Data: 02/02/16

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Estudo da ação de temozolamida e sulfasalazina sobre células de glioblastoma humano e de glioma de rato**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 02 de Fevereiro de 2016

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Raffaella Silvestre Ignarro**
RG n.º 34170223-7

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Fabio Rogerio**
RG n.º 22.155.011-2