UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (UNIRIO)

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)

INSTITUTO BIOMÉDICO (IB)

CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

JESSICA HONORATO RIBEIRO

A INIBIÇÃO DA VIA DE SONIC HEDGEHOG EM LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA *IN VITRO* POTENCIALIZA O EFEITO DA TEMOZOLOMIDA?

Rio de Janeiro

2017

JESSICA HONORATO RIBEIRO

A INIBIÇÃO DA VIA DE SONIC HEDGEHOG EM LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA *IN VITRO* POTENCIALIZA O EFEITO DA TEMOZOLOMIDA?

Trabalho de conclusão de curso apresentado como exigência para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO.

Orientador(a): Dra. Tania Cristina Leite de Sampaio e Spohr

Co-orientador(a): Dra. Giselle Pinto de Faria Lopes

Rio de Janeiro

2017

RIBEIRO, Jessica Honorato

A inibição da via de Sonic Hedgehog em linhagens de Glioblastoma *in vitro* potencializa o efeito da temozolomida?
xvi; 98

Orientadora: Tania Cristina Leite de Sampaio e Spohr
Co-Orientadora: Giselle Pinto de Faria Lopes

Monografia (Trabalho de conclusão de curso) – UNIRIO – Centro de Ciência Biológica e da Saúde - Instituto Biomédico – Faculdade de Biomedicina, 2017

1.Glioblastoma. 2.Células tumorais tipo tronco. 3.Sonic Hedgehog. 4.Temozolomida. I. Spohr, TCLS. II. Lopes, GPF. III. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Centro de Ciências Biológica e da Saúde. IV Título.

JESSICA HONORATO RIBEIRO

A INIBIÇÃO DA VIA DE SONIC HEDGEHOG EM LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA *IN VITRO* POTENCIALIZA O EFEITO DA TEMOZOLOMIDA?

Trabalho de conclusão de curso apresentado como exigência para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO.

Aprovado em _____ de 2017.

BANCA EXAMINADORA

_____

Dra. Paula Sabbo Bernardo
Instituto Nacional do Câncer – INCA

_____

Prof. Dr. Rômulo Sperduto Dezonne
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

_____

Dra. Tania Cristina Leite de Sampaio e Spohr
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ
Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer – IECPN

Dedico este trabalho à minha madrinha
Sônia Tavares Honorato e ao meu tio Gilberto Bastos
Portella por não medirem amor e comprometimento ao
longo de uma década.

AGRADECIMENTOS

Agradeço pela oportunidade de viver e realizar. Agradeço à todos os professores, mestres e doutores que fizeram parte desta trajetória, deixando comigo as sementes do conhecimento. Agradeço à todos os colegas de faculdade que passaram por mim em algum momento de suas vidas, breves ou longos, deixando um pouco de si, e levando um pouco de mim.

Agradeço em especial,

aos meus queridos tios Sônia Honorato e Gilberto Portella pela reconstrução de uma base sólida, por todos os ensinamentos ao longo destes anos, e por não medirem amor e esforços para me ver feliz.

à minha querida Mãe, Selma Honorato, que mesmo longe ocupa um lugar especial e cativo em meu coração.

ao Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto por me receber em seu laboratório com tanto acolhimento e por manter todas as portas abertas.

à minha orientadora Dra. Tânia Spohr por me acolher brilhantemente, confiar no meu trabalho e repartir comigo incontáveis ensinamentos que iluminaram os caminhos desta monografia e do meu futuro.

à minha co-orientadora Dra. Giselle Lopes por todos os ensinamentos, pelas incontáveis demonstrações de carinho, por acreditar e me fazer acreditar que sou sempre capaz.

aos meus queridos amigos Alice Duque, Carole Massolar, Isabela Gomes, Lucas Quintaes, Maiara Guedes, Mayra Braga, Michelle Gomes, Miguel Martins e Thaynan Lopes por serem morada e me darem abrigo em seus corações, por repartirem os dias, as alegrias, as tristezas, as festas e as cervejas comigo.

aos meus amigos de laboratório, em especial minhas LBMC *girls* Diana Matias, Fabiana Ribeiro, Gabriela Basile e Luciane Vieira por me acolherem com tanto carinho logo que cheguei, por aguentarem minhas dúvidas diárias e me presentearem tão depressa com a amizade. Obrigada de todo o coração.

“[...] E mais importante, tenha a coragem de seguir seu coração e sua intuição. Eles de alguma forma já sabem o que você realmente quer se tornar.

Tudo o mais é secundário. “

(Steve Jobs)

RESUMO

Gliomas são tumores intracranianos malignos, podendo ocorrer em qualquer região do sistema nervoso central (SNC). Dentre eles, o glioblastoma (GBM) é o mais agressivo e frequente. No tratamento para o GBM, o alquilante temozolomida (TMZ) é o quimioterápico de primeira linha utilizado, no entanto, o prognóstico dos pacientes permanece limitado. Durante a tumorigênese, diversas vias de sinalização vitais ao desenvolvimento embrionário são ativadas ou inibidas, como as do fator de crescimento transformante beta (TGFβ), *Wingless* (Wnt) e *Sonic hedgehog* (Shh). Atualmente, sabe-se que a via de Shh está envolvida nas propriedades de resistência dos GBMs, já que estes possuem ativação constitutiva desta via sendo um dos fatores limitantes do tratamento com TMZ. Esta limitação pode ser contornada através da identificação de um tipo celular com propriedades tronco, as células tronco tumorais (CTTs). Para vencer este problema, alguns fármacos inibidores seletivos de Shh foram desenvolvidos, como o caso do GANT-61. Neste trabalho, investigamos se a inibição de Shh potencializa os efeitos da TMZ e, averiguamos os mecanismos envolvidos neste processo. Para tal, as linhagens GBM11 e T98G foram tratadas com TMZ (100, 200 e 400µM) e GANT-61 (20µM) em diferentes tempos de incubação. Nossos resultados sugerem que ambas as linhagens são resistentes à TMZ, e que a combinação do GANT-61 com TMZ400µM durante 72 horas reduziu a viabilidade celular da linhagem T98G, por MTT. Os nossos resultados também sugerem que entre os mecanismos envolvidos na redução de viabilidade observada pela associação de TMZ+GANT estejam a morte celular por fragmentação de DNA e perda de integridade de membrana, assim como formação de vesículas ácidas indicativas de autofagia e produção de espécies reativas de oxigénio (EROs). Em suma, os nossos resultados sugerem que a inibição seletiva da via de Shh, por GANT-61, é capaz de potencializar o efeito da TMZ, sendo uma estratégia promissora para o tratamento de GBMs.

Palavras-chave: Glioblastoma, Células tumorais tipo tronco, *Sonic hedgehog*, Temozolomida, GANT-61.

ABSTRACT

Gliomas are malignant intracranial tumors and may occur in any region of central nervous system (CNS). Among them, glioblastoma (GBM) is the most aggressive and frequent brain tumors. In GBM treatment, the alkylating agent temozolomide (TMZ) is the first-line chemotherapy used, however the patients prognosis remains limited. During tumorigenesis, several signaling pathways vital for embryonic development are activated or inhibited, such as transforming growth factor beta (TGFßs), Wingless (Wnt) and Sonic hedgehog (Shh). Currently, it is known that Shh pathway is involved in the chemioresistance of GBMs, and most of them have this pathway constitutive activated which is one of the factors responsible to resistance to TMZ treatment. The limitation of using TMZ treatment can be solved by the identification of cell type with stem cell-like properties, the cancer stem cells (CSCs). To overcome this problem, some selective inhibitory drugs of Shh pathway have been developed, such as GANT-61. In this work, we investigated if Shh inhibition potentiates the effects of TMZ and verify the mechanisms involved in this process. To achieve our goals, GBM11 and T98G cell lines were treated with TMZ (100, 200 and 400μM) and GANT-61 (20μM) at different times of incubation. Our results suggest that both cell lines are resistant to TMZ, and the combination of GANT-61 with TMZ during 72h reduced the cell viability of T98G lineage by MTT assay. Also, our results suggest that among the mechanisms involved in the cell viability reduction observed by combination of TMZ+GANT, occurs the cell death due DNA fragmentation and loss of membrane integrity, as well as formation of acidic vesicles that are indicative of autophagy and reactive oxygen species (ROS) production. In short, our results suggest that selective inhibition of the Shh pathway by GANT-61 is potentiating the effect of TMZ, being a promising strategy for GBMs treatment.

Keywords: Glioblastoma, cancer stem cells, Sonic hedgehog, Temozolomide, GANT-61.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aspectos clínicos do GBM.

Figura 2 – Os três modelos para a origem do câncer e sua heterogeneidade. (A) Modelo estocástico. (B) Modelo hierárquico. (C) Modelo de plasticidade celular.

Figura 3 – Estrutura química das moléculas de TMZ e MITC, durante reação de conversão em pH fisiológico de 7,4.

Figura 4 – Principais moléculas da via de Shh.

Figura 5 – Modelos de desregulações da via de Shh que resultam em câncer.

Figura 6 – Inibidores da via de Shh.

Figura 7 – Estrutura química das moléculas inibitórias GANT. Em (A) GANT-58 e em (B) GANT-61.

Figura 8 – Diferentes papéis do inibidor da via de Shh, o GANT61.

Figura 9 – Reação de metabolização do componente cromogênico metil-tiazolil-tetrazólio (MTT) em cristais roxos de Formazan, pela enzima redutase mitocondrial.

Figura 10 – Parâmetros utilizados para avaliação de ciclo celular da linhagem T98G.

Figura 11 – Parâmetros utilizados para marcação de AVOs com LA, na linhagem T98G.

Figura 12 – Parâmetros utilizados para avaliação de EROs por marcação com DCF da linhagem T98G.

Figura 13 – Parâmetros utilizados para avaliação de morte celular por perda da integridade da membrana na linhagem T98G.

Figura 14 – Viabilidade celular das linhagens humanas GBM11 e T98G com TMZ.

Figura 15 – A inibição seletiva da via de Shh potencializou o efeito da TMZ na linhagem T98G.

Figura 16 – Efeito da inibição da via de Shh por GANT-61 na potencialização do tratamento por TMZ.

Figura 17 – O tratamento isolado com TMZ 400 µM induz parada do ciclo celular em G2/M na linhagem T98G.

Figura 18 – A combinação de TMZ e GANT-61 induz a produção de vesículas ácidas na linhagem T98G após 72 horas.

Figura 19 – O tratamento da linhagem T98G com TMZ e GANT-61 induz a produção de EROs.

Figura 20 – A combinação de TMZ e GANT-61 induz morte celular da linhagem T98G.

Figura 21 – Imunofluorescência da linhagem T98G com anticorpos contra Gli-1 e Vimentina.

Figura 22 – Imunofluorescência da linhagem T98G com anticorpo contra Ki67 para avaliar proliferação celular.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de significância referentes a figura 15B.

Tabela 2 – Valores de significância referentes a figura 16B.

Tabela 3 – Valores de significância referentes a figura 17.

Tabela 4 – Valores de significância referentes a figura 18.

Tabela 5 – Valores de significância referentes a figura 20.

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

AGAT – O(6)-alquil-guanina-alquiltransferase

ATCC – do inglês *American Type Culture Collection*

BHE – Barreira hemato-encefálica

BSA – do inglês *Bovine Serum Albumin* (Albumina de soro bovino)

CCK8 – do inglês *Cell counting kit-8* (kit-8 de contagem de células)

CBTRUS – do inglês *Central Brain Tumor Registry of the United States* (Registro Central de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos)

CNS – do inglês *Central nervous system* (Sistema Nervoso Central)

CSC – do inglês *Cancer stem cell* (Célula tronco cancerosa)

CTT – Célula tumoral tipo tronco

CONITEC – Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS

DAPI – 4’,6-diamino-2-fenilindol

DCFH-DA – 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato

Dhh – *Desert hedgehog*

DMSO – Dimetil-sulfóxido

DNA – do inglês *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FL1, FL3 – fluorescência 1 e 3 do citômetro de fluxo

FSC – do inglês *Forward Scatter* (Dispersão Frontal)

GANT-58 – Gli *ANTagonist* 58

GANT-61 – Gli *ANTagonist* 61

GBM – Glioblastoma

GBM11 – Linhagem primária de GBM humano

Hh – *Hedgehog*

Ihh – *Indian hedgehog*

INCA – Instituto Nacional do Câncer

Ki67 – Antígeno marcador de proliferação celular

LA – Laranja de acridina

LBMC – Laboratório de Biomedicina do Cérebro

MGMT – O(6)-metilguanina-DNA metiltransferase

MTIC – 5-(3-metiltriazeno-1-il)imidazol-4-carboxamida

MTT – Metil-tiazolil-tetrazólio

Nanog – Proteína do segmento gênico homeobox (reguladores da embriogênese)

Oct-4 – Fator de transcrição de ligação ao octâmero 4

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – do inglês *phosphate buffer saline* (tampão salino fosfatado)

PFA – Paraformaldeído

pH – Potencial hidrogeniônico

PI – do inglês *Propidium Iodide* (Iodeto de Propídeo)

Ptch – do inglês *Protein patched homolog I (*Proteína *patched* homóloga I)

RNA – do inglês *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

RNAse – Enzima ribonuclease

SFB – Soro Fetal Bovino

Sox-2 – do inglês *Sex determining region Y-box 2* (Região determinante do sexo Y-box2)

Shh – *Sonic hedgehog*

Smo – *Smoothened*

SNC – Sistema Nervoso Central

SSC – do inglês *Side Scatter* (Dispersão Lateral)

SUFU – do inglês *Supressor of Fused* (Supressor de *Fused*)

T98G – Linhagem comercial de GBM humano

TGF-β – do inglês *Transforming growth factor beta* (Fator de crescimento transformante beta)

TMZ – Temozolomida

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Wnt – *Wingless*

SUMÁRIO

RESUMO viii

ABSTRACT ix

LISTA DE FIGURAS x

LISTA DE TABELAS xi

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS xii

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. Tumores do Sistema Nervoso Central: O glioblastoma 1

1.1.1. Células tumorais tipo tronco 4

1.2. Tratamento 6

1.2.1. A Temozolomida 7

1.3. A via de Sonic Hedgehog (Shh) 8

1.3.1. Papel da Via de Shh na embriogênese 10

1.3.2. Papel da Via de Shh na tumorigênese 11

1.4. O inibidor GANT-61 14

2. OBJETIVOS 17

2.1. Objetivo Geral 17

2.2. Objetivos Específicos 17

3. MATERIAL E MÉTODOS 18

3.1. Cultura celular das linhagens de Glioblastoma 18

3.2. Incubação com os fármacos TMZ e GANT-61 18

3.3. Microscopia de contraste de fase 19

3.4. Ensaio de viabilidade celular (MTT) 19

3.5. Ciclo celular e fragmentação de DNA 20

3.6. Marcação de vesículas ácidas 23

3.7. Mensuração de espécies reativas de oxigênio (EROs) 24

3.8. Morte celular por perda de integridade da membrana (incorporação de azul de PI) 26

3.9. Morte celular por perda de integridade da membrana (incorporação de azul de tripano) 26

3.10. Imunofluorescência 27

3.11. Análises estatísticas 28

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 29

4.1. *As linhagens GBM11 e T98G diminuem sua viabilidade com diferentes concentrações de TMZ?* 29

4.2. *A inibição seletiva da via de Shh é capaz de potencializar o efeito do TMZ em glioblastomas?* 32

4.3. Qual s*eria o efeito da combinação de TMZ e GANT-61 na proliferação celular?* 40

4.4. *O tratamento combinado de TMZ e GANT-61 induz autofagia?* 43

4.5. *TMZ e GANT-61 são capazes de induzir estresse oxidativo?* 46

4.6. *A combinação de TMZ e GANT-61 induz eventos de morte celular?* ... 49

5. CONCLUSÕES 52

6. PERSPECTIVAS 52

6.1. Resultados Preliminares 53

6.1.1. Ensaios de imunofluorescência para expressão de Gli-1 e Vimentina ... 53

6.1.2. Ensaios de imunofluorescência para expressão do marcador proliferativo Ki67 55

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tumores do Sistema Nervoso Central: O glioblastoma

O glioma é o tumor malígno intracraniano primário de origem glial mais comum presente em todas as faixas etárias, podendo ocorrer em qualquer ponto anatômico do sistema nervoso central (SNC), principalmente no cérebro (Ostrom *et al*., 2014). Apresentando de 1 a 2% de incidência populacional dentre os dez tipos de câncer mais frequentes, é responsável por uma alta taxa de morbidade e mortalidade no mundo (McNeill, 2016), sendo considerado a segunda maior causa de morte relacionada à doenças neurológicas. O avanço das técnicas de diagnóstico por imagem (ressonância magnética e tomografia computadorizada) permitiu observar, nas últimas décadas, um considerável aumento na incidência de tumores do SNC (Mendes *et al*., 2014).

De acordo com a nova classificação descrita pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2016, os gliomas difusos incluem os astrocitomas e os oligodendrogliomas de graus II e III, e os glioblastomas (GBMs) de grau IV. Estes tumores são subdivididos de acordo com critérios moleculares, envolvendo mutações na enzima isocitrato desidrogenase (IDH) e co-deleção na região 1p/19q cromossomial. Desta forma, as neoplasias que apresentam a enzima IDH mutada, são classificados em astrocitomas difusos de grau II, astrocitomas anaplásicos de grau III e GBMs de grau IV. Os GBMs de grau IV também podem apresentar IDH selvagem. Já aqueles com IDH mutada e co-deleção de 1p/19q, são classificados como oligodendrogliomas de grau II e oligodendrogliomas anaplásicos de grau III.

O estudo realizado pelo Registro Central de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos (CBTRUS), com dados referentes aos anos de 2009 à 2013, demonstrou que 32% de todos os tumores primários do SNC são malignos, onde, 80,62% são gliomas. Observou-se ainda que o tumor maligno de maior frequência na população estudada é o glioblastoma (GBM), representando 46,56% das neoplasias primárias malignas do SNC (Mendes *et al*., 2014). Além disso, a sobrevida de pacientes que apresentam GBMs é a menor, em torno de 15 meses (Lima *et al.,* 2012). No Brasil, estas neoplasias mostraram-se com a mesma importância e gravidade que no resto do mundo. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou em 2016, de 5.440 novos casos de câncer do SNC em homens e

4.830 em mulheres, enquanto registrou 8.741 óbitos em 2014 com estimativa semelhante. A razão mortalidade/incidência para este tipo de câncer é alta: 73% para o mundo e 92% para o Brasil.

O GBM é a neoplasia de maior agressividade derivada dos astrócitos, tipo celular de maior abundância no sistema nervoso, que desempenha importante papel na sustentação e nutrição dos neurônios. Alguns GBMs podem ter origem a partir de astrocitomas de baixo grau, enquanto outros não apresentam essa origem, surgindo como tumores completamente novos, já no estágio IV (glioblastomas *de novo*) (Shaw *et al.,* 2003; Gatta *et al*., 2016).

Microscopicamente, os GBMs são altamente heterogêneos, apresentando comumente células de tamanhos e formas variadas, células fibrilares, com atividade mitótica intensa, proliferação vascular endotelial e necrose com áreas de hemorragia. O grau de necrose, hemorragia e proliferação vascular são apontados na literatura como sinal de mau prognóstico para o paciente (Ferreira *et al.,* 2004).

As diferentes células presentes no interior da massa tumoral são responsáveis por diversos papéis no processo de tumorigênese (Coons *et al*., 1997; Daumas-Duport *et al*., 2000). Atualmente o que está bem estabelecido é que algumas propriedades do tumor como angiogênese, migração e invasividade são distintas entre as células que se localizam no centro daquelas da periferia tumoral, confirmando assim a sua heterogeneidade (Alves *et al*., 2011; Dubois *et al*., 2014; Louis *et al*., 2007; Moura-Neto *et al*., 2014) (Figura 1).

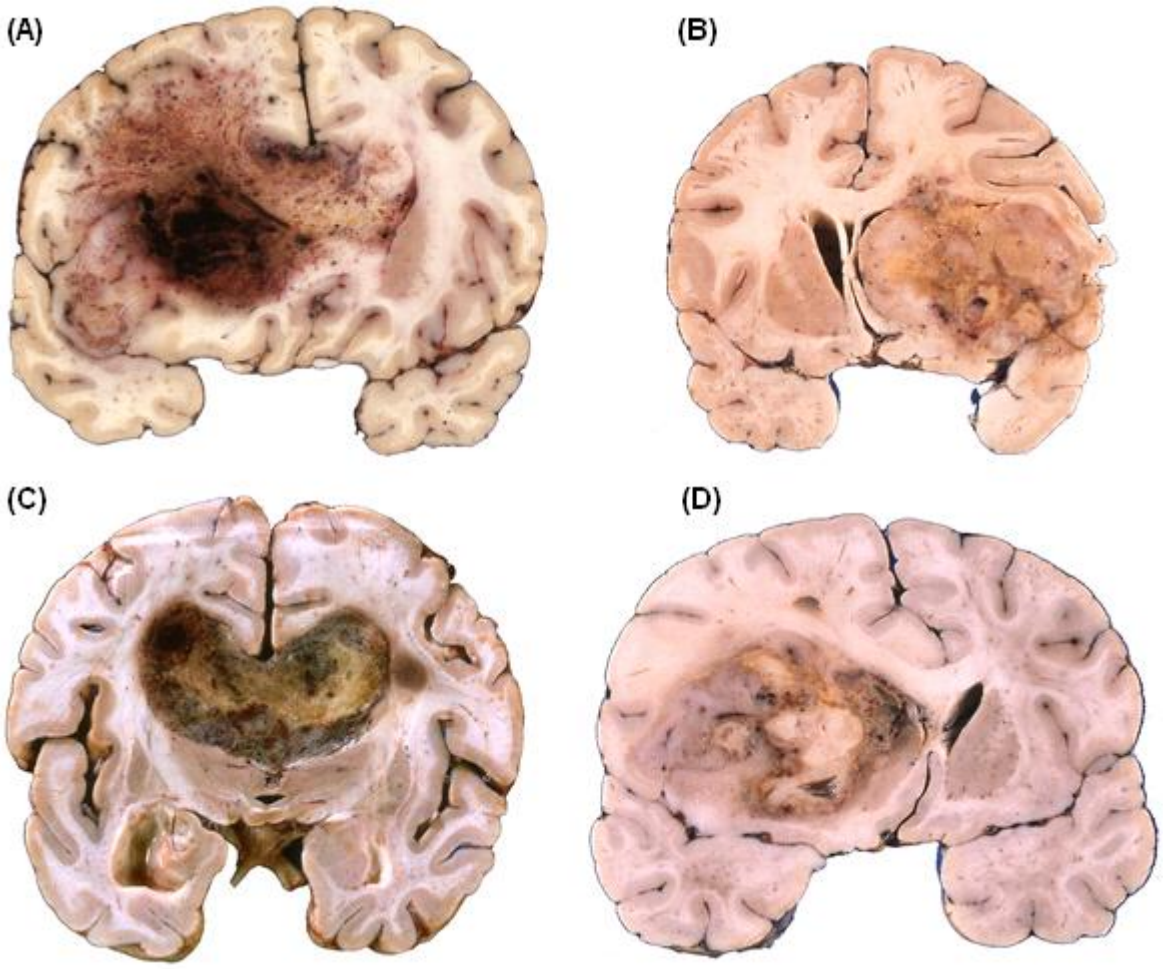


Figura 1: Aspectos clínicos do GBM. O GBM apresenta-se como uma massa tumoral capaz de desviar a linha média do cérebro, o que se destaca na imagem **(D)**. Possui capacidade de infiltração **(B)** e **(C)**, e de promover hemorragias **(A)**, atestando sua agressividade (Disponível em pubcan.org/printicdotopo.php?id=4938).

O processo de transformação de uma célula normal em tumoral envolve a ativação e inibição de diversas vias de sinalização, promovendo assim o crescimento do tumor. Frequentemente observa-se que vias de sinalização vitais ao desenvolvimento e organogênese do embrião voltam a ser moduladas na tumorigênese. Dentre as vias ativadas durante a embriogênese que voltam a desempenhar um papel importante na tumorigênese, podemos citar: as do fator de crescimento transformante beta (TGFßs), a de *Wingless* (Wnt) e a de *Sonic hedgehog* (Shh) (Roth *et al*., 2000; Golestaneh e Mishra, 2005; Lima *et al*., 2012).

Hoje em dia já se sabe que a via de sinalização de Shh está envolvida no desenvolvimento das propriedades de quimio e radiorresistência dos GBMs, limitando o tratamento do paciente. Esta limitação pode ser contornada através da

identificação e isolamento de um tipo celular distinto com propriedades de células tronco e capacidade de iniciar um tumor, as células tumorais tipo tronco (CTT) (Cohen, 2010; Munoz *et al.,* 2015). A via de sinalização de Shh tem sido descrita como responsável pela manutenção do estado de auto-renovação das CTTs, responsáveis pela agressividade e recidiva dos GBMs (Biswas *et al.*, 2015).

1.1.1. *Células tumorais tipo tronco*

A primeira vez que se propôs a existência das células tumorais tipo tronco (CTTs), foi em 1963, pelos pesquisadores Bruce e van der Gaag, que identificaram um tipo celular da massa tumoral capaz de iniciar e sustentar o crescimento de clones tumorais (Bruce e van der Gaag, 1963). A identificação deste tipo celular com propriedades tão específicas possibilitou um melhor entendimento da formação e heterogeneidade da massa tumoral (Dick e Wang, 2005).

Entretanto, ainda não está completamente elucidado o mecanismo pelo qual as células tumorais tipo tronco contribuem para o surgimento do tumor. Atualmente, são descritas três teorias que explicam o surgimento tumoral e, como a heterogeneidade das células geradas contribui para a progressão da doença. Essas teorias ficaram conhecidas como: **teoria da evolução clonal** (modelo estocástico), **teoria das células tronco tumorais** e a última, recentemente descrita, como **teoria da plasticidade celular** (Wang *et al.,* 2014). Na **teoria da evolução clonal**, acredita-se que o acúmulo de sucessivas mutações em virtude de pressões seletivas do microambiente, leve à geração de clones capazes de progredir fenotipicamente, selecionando os clones com maior potencial tumorigênico (Marjanovic *et al.,* 2013). Já a **teoria das células tronco tumorais** se baseia no modelo clássico das células tronco normais. Esta teoria sugere que as CTTs tenham uma natureza unidirecional, onde estas células entrariam na via de auto-renovação através de divisões simétricas mantendo o *pool* de CTTs, potencial tumorigênico. Entretanto, um novo modelo de tumorigênese considera a **plasticidade celular**, que descreve conversões bidirecionais das CTTs. Neste modelo mais recente, as não-CTTs são capazes de readquirir o fenótipo de CTTs e vice-versa, sugerindo então a existência de uma certa plasticidade entre as CTTs e as demais células da massa tumoral. Já foi demonstrado que células da

massa tumoral podem espontaneamente se diferenciar em CTTs, criando deste modo um novo *pool* de CTTs em diferentes estágios do desenvolvimento do tumor. Este novo *pool* de CTTs seria responsável então por continuamente renovar e/ou expandir a massa tumoral (Marjanovic *et al.,* 2013) (Figura 2).

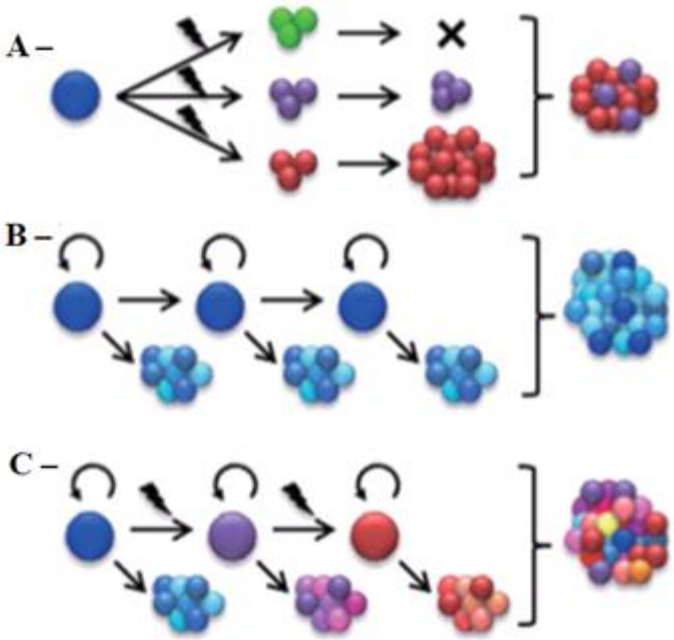


Figura 2: ***Os três modelos para a origem do câncer e sua heterogeneidade*****. (A)** Modelo estocástico: O acúmulo de sucessivas mutações levaria à geração de clones capazes de progredir fenotipicamente, selecionando aqueles com maior potencial tumorigênico; **(B)** Modelo das CTTs: As CTTs teriam uma natureza unidirecional, e entrariam na via de auto-renovação através de divisões simétricas mantendo o *pool* de CTTs; **(C)** Modelo de plasticidade celular: As não-CTTs seriam capazes de readquirir o fenótipo de CTTs e vice-versa, sugerindo existir certa plasticidade entre as CTTs e as demais células do tumor (Fonte: Adaptado de Wang *et al.,* 2014).

As CTTs são conhecidas por serem radio e quimiorresistentes, com capacidade de se diferenciarem nos diversos tipos celulares que formam a massa tumoral (Kahlert *et al.,* 2016). Além disso, este tipo celular também tem uma elevada capacidade migratória, possibilitando deste modo que o tumor atinja sítios secundários e gere metástases (Deshmukh *et al.,* 2016). Por se apresentarem quiescentes dentro da massa tumoral, as CTTs constituem um alvo terapêutico difícil, uma vez que a maioria dos fármacos atua principalmente nas células do *pool* proliferativo (Deshmukh *et al.,* 2016). Sabe-se que as células quiescentes não erradicadas através da terapia, podem levar ao crescimento e recorrência do tumor tanto em sítios primários como secundários (Ajani *et al.,* 2015). Hoje em dia

já se sabe que em GBMs, as CTTs são responsáveis pela resistência ao tratamento aos quimioterápicos atualmente disponíveis

De acordo com as propriedades e evidências apresentadas, acredita-se que as CTTs em quiescência sejam um potencial alvo de novas terapias, uma vez que os mecanismos que regulam seu comportamento ainda são desconhecidos. Hoje o que se sabe é que as vias moleculares implicadas na patobiologia das CTTs incluem *Notch*, *Hedgehog*, *Wingless* (Wnt) e o fator de crescimento transformante beta (TGF-ß) que são muito importantes no período embrionário (Boyle *et al*., 2014).

1.2. Tratamento

Atualmente a combinação da terapia empregada para o tratamento dos tumores do SNC envolve a remoção cirúrgica da lesão, radio e quimioterapia adjuvante. Normalmente, recomenda-se a remoção cirúrgica da maior porção possível do tumor, dentro de uma margem de segurança que proteja o tecido normal adjacente e que não comprometa as funções neurológicas (Ministério da Saúde, CONITEC, 2014). A radioterapia possui um papel importante no tratamento do tumor cerebral, principalmente quando a doença é inicialmente inoperável ou recorrente, onde esta é aplicada para matar as células tumorais remanescentes. Entretanto, sua dosagem deve ser controlada evitando danos às células sadias adjacentes (Tsao *et al.,* 2005). A quimioterapia pode ser utilizada com a mesma finalidade, porém apresenta limitações, uma vez que alguns fármacos são incapazes de atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE) e/ou atingem também células saudáveis (Buckner, 2003).

Atualmente pacientes com GBM são inicialmente operados, e após esta etapa ocorre o tratamento combinado de radioterapia pós-operatória e quimioterapia adjuvante (Kelles, 2011). O agente quimioterápico de primeira linha atualmente utilizado para o tratamento de GBMs é a Temozolomida (TMZ). Estudos mostraram que a TMZ possui uma atividade antitumoral como agente único no tratamento do GBM recorrente, sendo um fármaco bem tolerado, com perfil de segurança favorável uma vez que apresenta menos efeitos colaterais quando comparada à outros fármacos, como as nitrosuréias (Lamers *et al.,* 2008).

1.2.1. *A Temozolomida*

A temozolomida é um fármaco pertencente à uma nova classe de agentes alquilantes de DNA, como derivado da imidazotetrazina (Najman *et al.,* 2002). É uma substância precursora, apresentando atividade quando hidrolisada em pH fisiológico no composto MTIC (5-(3-metiltriazeno-1-il)imidazol-4-carboxamida), como observado na figura 3 (Mutter e Stupp, 2006). A TMZ é uma substância de baixo peso molecular (194,151 g/mol), sendo 100% absorvida e sua eliminação do organismo ocorre de forma rápida, diminuindo sua toxicidade. Além disso, apresenta hepatotoxicidade reduzida, uma vez que não é metabolizada pelo fígado como outros quimioterápicos. É um fármaco capaz de atravessar a BHE devido a sua lipossolubilidade, o que a faz alcançar de forma eficiente os tumores cerebrais. Este fármaco tem sido utilizado como tratamento de primeira linha para o GBM (Najman *et al.,* 2002).

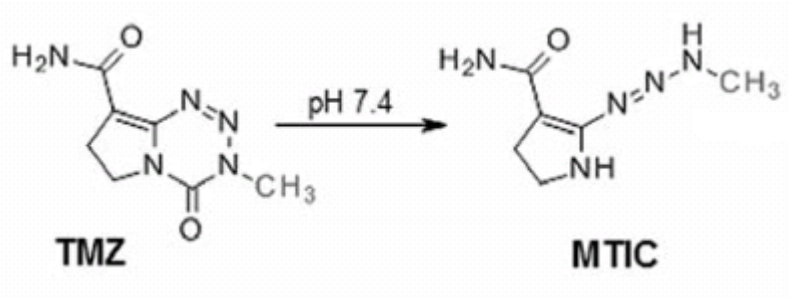


Figura 3**: **Estrutura química das moléculas de TMZ e MITC, durante reação de conversão em pH fisiológico de 7,4 (Fonte: Adaptado de Wang *et al.,* 2016).

A metilação do DNA parece ser o principal mecanismo pelo qual o composto ativo MITC, derivado da TMZ, promove citotoxicidade em células tumorais. MITC metila o DNA nas posições N7 e O6 da guanina e N3 da adenina (Mutter e Stupp, 2006). Embora os adutos formados estejam em sua maioria nas posições N7 da guanina, a posição O6 quando metilada é responsável pelo efeito biológico mais severo provocado por agentes alquilantes, como mutagenicidade e toxicidade (Beranek, 1990). Entretanto, os danos causados ao DNA podem ser reparados pela enzima O(6)-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), antes denominada como O(6)-alquil-guanina-alquiltransferase (AGAT). Esta enzima é frequentemente expressa em tumores de alto grau, como o GBM, tornando-se um importante protagonista na resistência às drogas antineoplásicas e no mau

prognóstico dos pacientes (Rocha, 2015). Já está descrito na literatura, casos de pacientes que se mostraram resistentes ao tratamento à TMZ, nos quais o tipo tumoral superexpressava esta enzima (Esteller *et al.,* 2000).

Devido aos danos causados pelo fármaco ao DNA, acreditava-se que este fármaco induzia morte celular por apoptose (Montaldi, 2009). Entretanto, alguns trabalhos demonstraram sua capacidade de induzir apoptose tardia, enquanto outros demonstraram que a TMZ é capaz de induzir outros três mecanismos distintos: autofagia, senescência e catástrofe mitótica (Zou *et al*., 2014; Knizhnik *et al.,* 2013; Filippi-Chiela *et al.,* 2013).

Apesar da TMZ ser o fármaco de primeira linha para o tratamento do GBM nesta última década, alguns estudos demonstram que o prognóstico dos pacientes permanece limitado. Geralmente, o prognóstico dos pacientes varia de 3 a 24 meses no máximo, sem melhoras da qualidade de vida. O que demonstra a urgência de pesquisas visando estratégias eficazes para contornar esta patologia ainda incurável (Metha *et al.,* 2011).

1.3. A via de Sonic Hedgehog (Shh)

A via de Sonic Hedgehog foi descrita pela primeira vez pela primeira vez pela cientista alemã Christiane Nüsslein-Volhard e pelo cientista americano Eric Wieschaus durante uma análise genética (1980) da mosca *Drosophila melanogaster* (Nusslein-Volhard e Wieschaus, 1980). Nesta ocasião então, foi descoberto o gene responsável pela polarização e segmentação do plano corporal durante o desenvolvimento embrionário (Rimkus *et al*., 2016). O fenótipo mutante que leva a perda da função exercida por este gene gerava embriões repletos de dentículos, com aparência de ouriço, e por isso recebeu o nome Hedgehog (*HH*). O trabalho foi contemplado com o prêmio Nobel em Medicina no ano de 1995 (Lee *et al*., 2014).

Na tentativa de encontrar genes semelhantes em mamíferos, foram realizados estudos com ratos, onde se notou a presença de três genes homólogos à Hh, denominados de Sonic Hedgehog (*SHH*), Indian Hedgehog (*IHH*) e Desert Hedgehog (*DHH*). Estes genes, de alta importância durante a embriogênese, foram posteriormente também descobertos em humanos (Pathi *et*

al., 2001). *DHH* e *IHH* mostraram-se relevantes durante o desenvolvimento normal de tecidos, e *SHH* foi descrito como o mais potente destes três homólogos, tendo um papel crucial no desenvolvimento embrionário e na manutenção da polarização tecidual (Lee *et al*., 2014; Heussler e Suri, 2003).

O gene *SHH* codifica a proteína ligante Sonic Hedgehog (Shh), que funciona como sinal químico essencial durante a embriogênese. A interação de Shh com seu receptor de membrana Ptch (*patched*) faz com que este deixe de inibir a proteína Smo (*smoothened),* ativando-a. Como demonstrado na figura 4, a ligação da proteína de sinalização Shh à Ptch regula a atividade de Smo (Choudhry *et al.*, 2014). Com Smo ativada, inicia-se a cascata de sinalização de Shh que permite que proteínas da família Gli sejam translocadas para o núcleo, transcrevendo genes alvo (Heussler e Suri, 2003; Zhu e Lo, 2010).

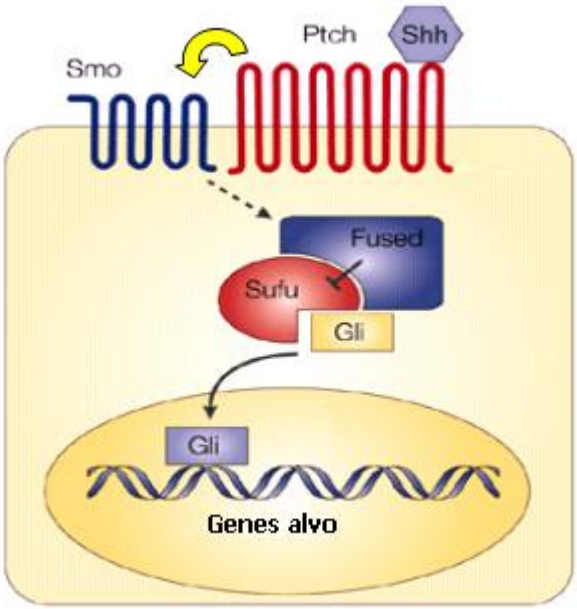


Figura 4**: **Principais moléculas da via de Shh. A proteína ligante Shh ativa o receptor de membrana Ptch que deixa de inibir o receptor Smo. Smo ativa a proteína Fused que reprime a atividade de SUFU. SUFU inibida, permite que os fatores de transcrição da família Gli sejam translocados para o núcleo ativando genes alvo (Fonte: Adaptado de Magliono, 2003).

As proteínas Gli (Gli1, Gli2, Gli3) são as principais efetoras da via de Shh, e atuam ativando ou inibindo a transcrição de genes responsivos à via de sinalização de Shh, processo que ocorre a partir da ligação dos domínios *zinc finger* de Gli as sequências específicas do DNA de genes alvo como *SOX2, NANOG* (Sasaki *et al.,* 1997). Enquanto Gli1 funciona exclusivamente como ativadora da via de Shh, Gli2 e Gli3, podem funcionar tanto como ativadores ou

repressores da via, dependendo do contexto celular (Hui e Angers, 2011; Hanna e Shevde 2016). Outro controlador importante da via de Shh, que regula negativamente a atividade de Gli é o *Supressor of Fused* (SUFU). Quando Shh não está ligado a Ptch, SUFU se liga diretamente às proteínas Gli inibindo a sua translocação para o núcleo impedindo deste modo a ativação da via (Kogerman *et al.,* 1999). Gli1 foi originalmente isolada de um glioma, e já foi descrita na literatura por possuir significativa atividade em diversos tipos tumorais como musculares, cerebrais e de pele (Ruiz i Altaba, 2011).

1.3.1. *Papel da Via de Shh na embriogênese*

Atualmente existem informações importantes sobre as bases genéticas do processo de embriogênese, devido principalmente aos estudos de Nüsslein-Volhard (1980), que identificaram um conjunto de genes produtores de morfógenos, substâncias capazes de definir os eixos corporais do embrião de vertebrados e invertebrados, como Shh (Stathopoulos e Iber, 2013). Em *Drosophila,* essas substâncias se mostraram cruciais para a formação adequada dos eixos ântero-posterior e dorso-ventral do embrião, enquanto sua ausência foi prejudicial a formação das estruturas corporais (Wood *et al*., 2007). Em mamíferos, esta proteína auxilia à estabilizar a linha média que separa os eixos cerebrais direito e esquerdo atuando desta forma na formação dos hemisférios (Monuki, 2007).

Como um morfógeno, Shh é importante na padronização tecidual por controlar múltiplos processos biológicos como a determinação do destino celular, proliferação e diferenciação celular (Mill *et al.,* 2005; Li *et al.,* 2015). Desta forma, a difusão da proteína Shh cria um gradiente no qual concentrações diferentes do ligante fazem com que células vizinhas ou distantes da fonte de Shh assumam destinos diferentes (Seppala *et al.,* 2007).

Hoje em dia, já está bem estabelecido que o desenvolvimento da parte frontal do cérebro, dos dentes, olhos, pulmões, cólon, mama e esôfago do embrião é dependente de Shh (Monuki, 2007; Hardcastle *et al.,* 1998; Grindley *et al*., 1997; Ingham *et al*., 2001). Além disso, Shh é capaz de regular a auto renovação das células tronco, mantendo o balanço entre a quantidade de células indiferenciadas e diferenciadas do embrião (Ingham e Placzek, 2006). Defeitos na

sinalização por Shh podem acarretar em problemas no desenvolvimento e/ou resultar em um processo tumoral (Borges-Osório e Robinson, 2013).

1.3.2. *Papel da Via de Shh na tumorigênese*

Curiosamente, quando a via de Shh está inativa devido à ausência da proteína ligante Shh, o receptor Ptch atua como um supressor tumoral. Agindo como supressor tumoral Ptch interage com o co-receptor Smo (proto-oncoproteína), impedindo a transcrição de fatores da família Gli para o núcleo, não ocorrendo desta forma a ativação de genes alvo como *SOX2, NANOG* e *OCT4* (Sicklick *et al.,* 2006). As desregulações nas vias de sinalização normalmente envolvidas no desenvolvimento embrionário como Shh, *Wingless* (Wnt) e Notch, estão relacionadas com o aparecimento de diversos tipos de câncer, como gastrointestinal, pulmonar, de mama, de próstata e cerebral. (Mintz e Fleischman, 1981; Ruiz i Altaba *et al*., 2002; Chen *et al*., 2007; Gupta *et al.,* 2010). Especificamente, o envolvimento da via de Shh na tumorigênese foi demonstrado pela primeira vez em pacientes com carcinomas basocelulares, associados a Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide (Gorlin, 1995; Hahn *et al*., 1996). Atualmente, já foi demonstrado que a via de Shh participa do desenvolvimento e progressão de tumores de próstata, pulmão, mama, ovário e cérebro (Karhadkar *et al*., 2004; Watkins, *et al*., 2003; Kubo *et al.,* 2004; Cherepanov *et al.,* 2016).

O fator de transcrição Gli-1, efetor da via de Shh, foi identificado como um gene amplificado em gliomas humanos, sugerindo que haja uma correlação entre a ativação da via de Shh e o desenvolvimento dos GBMs (Braun *et al.,* 2012). Já se sabe também que a superexpressão de Gli1 em um GBM é um marcador altamente preditivo de um mau prognóstico para o paciente (Rossi *et al.,* 2011).

Os mecanismos pelos quais as moléculas Shh atuam durante o processo de carcinogênese ainda não estão totalmente elucidados, porém já foi visto que mutações no gene Ptch1, ativação dos fatores de transcrição da família Gli e a superexpressão da proteína Shh estão relacionadas ao processo de formação tumoral (Quijada *et al.,* 2013; Santoni *et al.,* 2013). Sugere-se ainda que em alguns tipos tumorais a via de Shh estaria ativa por meio de mecanismos

independentes da proteína ligante, onde a via estaria constitutivamente ativa (Cavicchioli *et al.,* 2011).

Já está bem estabelecido que a ativação da via de Shh durante a tumorigênese pode ocorrer de quatro formas: **sinalização independente de ligante**, **sinalização autócrina dependente de ligante**, **parácrina dependente de ligante** e **parácrina reversa dependente de ligante** (Teglund, *et al.,* 2010; Rubin *et al.*, 2006; Scales *et al.,* 2009). A **sinalização independente de ligante** ocorre quando eventuais mutações induzem a perda de função de Ptch1 ou ganho de função de Shh, Smo e Gli1/2. Entretanto, na maior parte dos tumores, a sinalização anormal da via de Shh é dependente de ligante, porém, ainda existem muitas controvérsias a respeito desta sinalização ser autócrina, parácrina ou ambas (Scales *et al.,* 2009) (Figura 5).

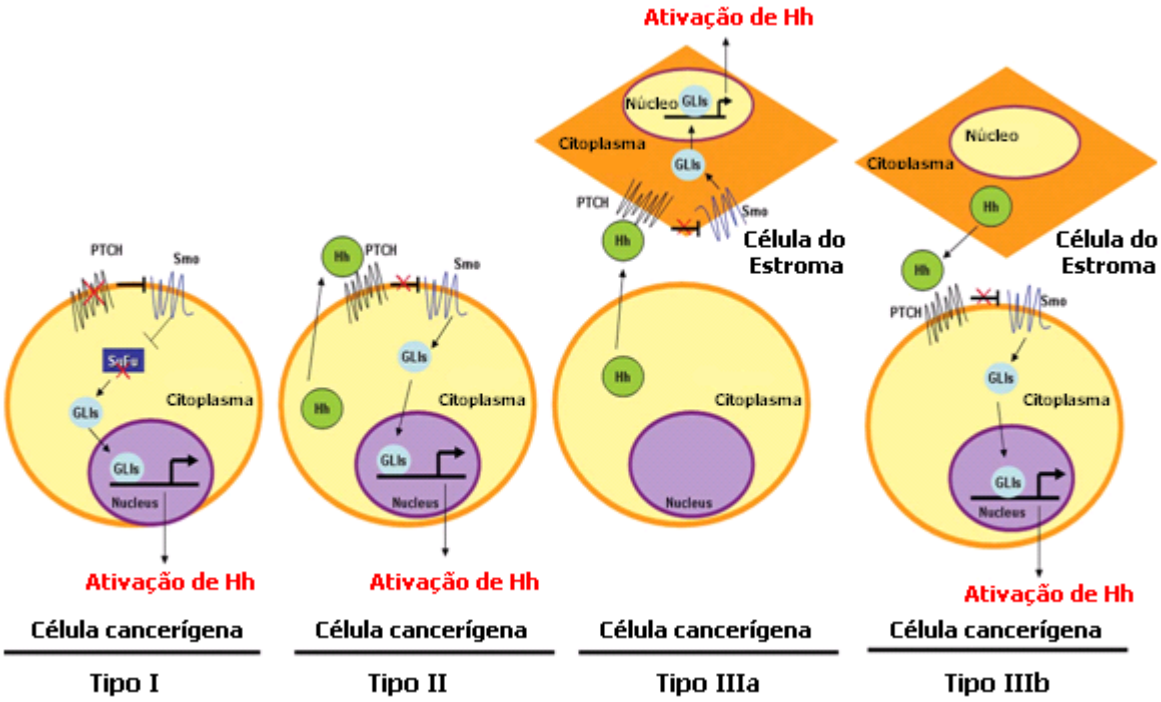


Figura 5: Modelos de desregulações da via de Shh que resultam em câncer. Na desregulação constitutiva da via de Shh (Tipo I) os fatores de transcrição da família Gli são continuamente translocados para o núcleo, devido mutações nas proteínas Ptch ou SUFU. Na desregulação autócrina (Tipo II), a célula tumoral secreta a proteína Hh que ativa o receptor Ptch na própria célula. Na parácrina (Tipo IIIa), a célula tumoral secreta a proteína Hh que ativa o receptor Ptch nas células do estroma, e na parácrina reversa (Tipo IIIb) as células do estroma secretam a proteína Hh que ativa Ptch na célula tumoral (Adaptado de Zheng *et al.,* 2013).

Atualmente já se descobriu e desenvolveu alguns agentes farmacológicos sintéticos e naturais, capazes de regular a atividade da via de Shh que atuam bloqueando a via *upstream* ou *downstream* em diferentes pontos (Mas *et al.,* 2010; Stanton *et al.,* 2010) (Figura 6). O composto mais estudado é a ciclopamina, que é de origem natural, sendo extraída da planta *Veratrum californicum*, que atua na inibição da via de Shh ao interagir com o co-receptor Smo (*upstream*) (Nanta *et al.,* 2013; McKee *et al.,* 2012). Porém, como já mencionado acima, alguns tipos de tumores possuem ativação constitutiva da via de Shh sendo, portanto, independentes do ligante. Desta forma, outros agentes farmacológicos inibidores têm sido desenvolvidos objetivando um bloqueio *downstream* da via, como os inibidores *Gli ANTagonist* (GANT) 58 e 61 que atuam em Gli 1/2, efetores da via de Shh (Gonnissen *et al.,* 2015) (Figura 6).

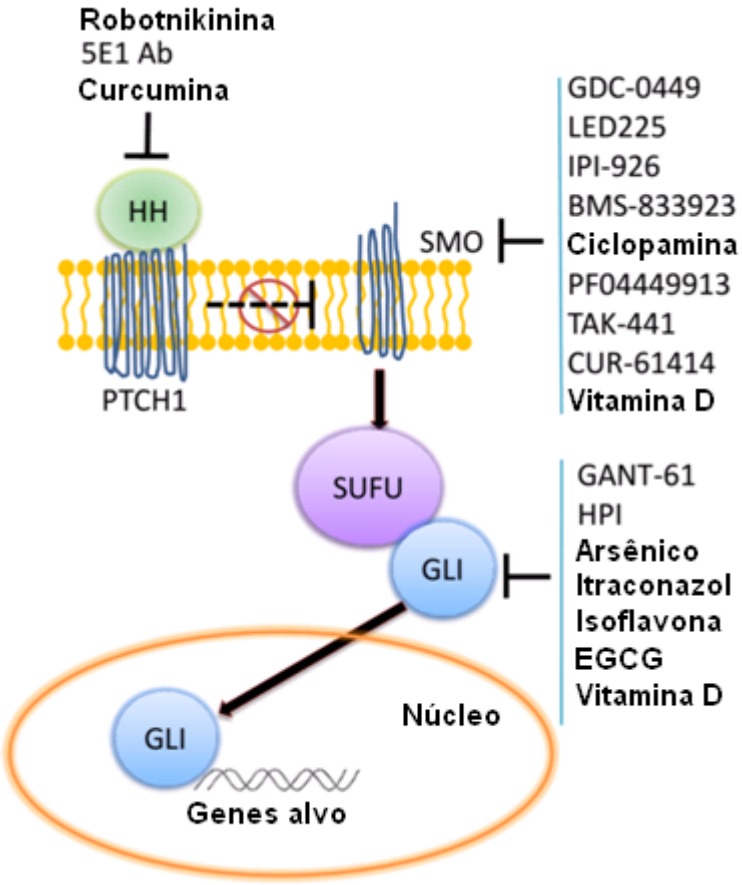


Figura 6: Inibidores da via de Shh. Os inibidores da via de Shh podem atuar *upstream* impedindo a ligação da proteína Hh ao receptor Ptch ou bloqueando a atividade de Smo, ou podem atuar *downstream* bloqueando a translocação dos fatores de transcrição da família Gli para o núcleo (Adaptado de Meng *et al.,* 2015).

1.4. O inibidor GANT-61

Diante da necessidade de obtenção de novos fármacos capazes de bloquear a atividade da via de Shh constitutivamente ativa, foram realizados estudos para a busca de pequenas moléculas que atendessem à este propósito. Como resultado, no ano de 2007, foi realizado um *screen* celular onde foi descrito pela primeira vez a presença de moléculas com a capacidade de inibir seletivamente os fatores de transcrição da família Gli (Gli1 e Gli2). Este estudo possibilitou a identificação das moléculas GANT-58 e GANT-61 como os primeiros antagonistas de Gli (Gonnissen *et al.,* 2015).

O inibidor GANT-58 é quimicamente caracterizado por seu núcleo de tiofeno apresentando quatro anéis de piridina, ao passo que GANT-61 se apresenta como derivado da hexa-hidropirimidina (Figura 7).

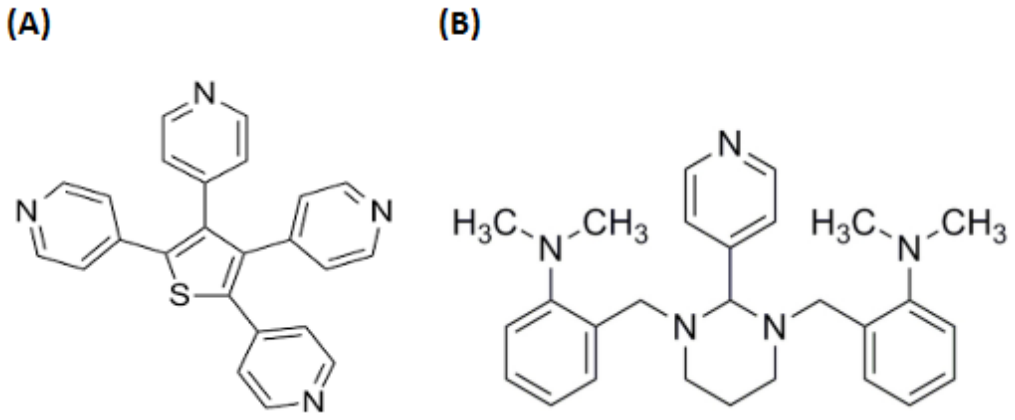


Figura 7: Estrutura química das moléculas inibitórias GANT. Em (A) GANT-58 e em (B) GANT-61. (Fonte: Disponível em https://www.medchemexpress.com/GANT-58.html; http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/373403?lang=pt&region=BR).

Apesar destas moléculas possuírem características químicas diferentes, ambos são capazes de desempenhar funções semelhantes em relação à inibição de Gli (Lauth *et al.,* 2007). Seu mecanismo de ação consiste em impedir que os fatores de transcrição da família Gli se liguem ao DNA nuclear, bloqueando sua atividade de transcrição (Hanna e Shevde, 2016).Curiosamente, apesar de tanto GANT-58 quanto GANT-61 inibirem o crescimento tumoral mediado por Gli, alguns estudos demonstraram a maior eficácia de GANT-61 quando comparado à

GANT-58 (Lauth *et al.,* 2007). Apesar de ambos atuarem à nível nuclear inibindo a atividade de Gli, GANT-61 foi capaz de inibir a ligação de Gli-1 ao DNA nuclear, gerando acúmulo de Gli-1 no núcleo (Lauth *et al.,* 2007). Este fato contribuiu para que GANT-61 fosse a molécula de preferência nas investigações atuais, se tornando a ferramenta mais valiosa para a inibição farmacológica da via de Shh.

A especificidade de GANT-61 em inibir a via de Shh *downstream*, foi descrita pela primeira vez por Lauth e colaboradores, em 2007 e, já foi demonstrada a sua eficácia em diversos estudos. Até pouco tempo, porém, o exato mecanismo de ação de GANT-61 era desconhecido, entretanto um estudo realizado através de modelagem computacional demonstrou a direta ligação do inibidor com Gli (Agyeman *et al.,* 2014). Este estudo demonstrou que esta ligação ocorre em uma região próxima ao sítio de ligação do fator de transcrição com o DNA. GANT-61 interage, mais especificamente, com um sulco existente entre os *zinc fingers* 2 e 3 de Gli. Mutações nestes sítios de ligação demonstraram redução da capacidade de GANT-61 em inibir Gli, confirmando assim a interação entre estas moléculas (Agyeman *et al*. 2014; Gonnissen *et al.,* 2015).

Já foram descritos alguns efeitos de GANT-61 em células cancerosas, entre eles de citotoxicidade associada com o aumento direto de morte celular. Portanto, a inibição da via de Shh levaria à apoptose ou por meio da ativação da via de Fas-FasL, ou por meio da redução de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 (Gonnissen *et al.,* 2015). Outro mecanismo importante de GANT-61 é sobre a capacidade de auto-renovação celular. Este mecanismo de atuação interfere numa propriedade importante da via de Shh, a regulação das CTTs, que possuem potencial de auto-renovação e pluripotência. Alguns estudos têm demonstrado também que GANT-61 atua como indutor de autofagia, contribuindo para a redução da viabilidade celular e aumento da apoptose (Agyeman *et al*. 2014; Gonnissen *et al.,* 2015). A figura 8 ilustra estes e outros papéis deste inibidor já descritos pela literatura.

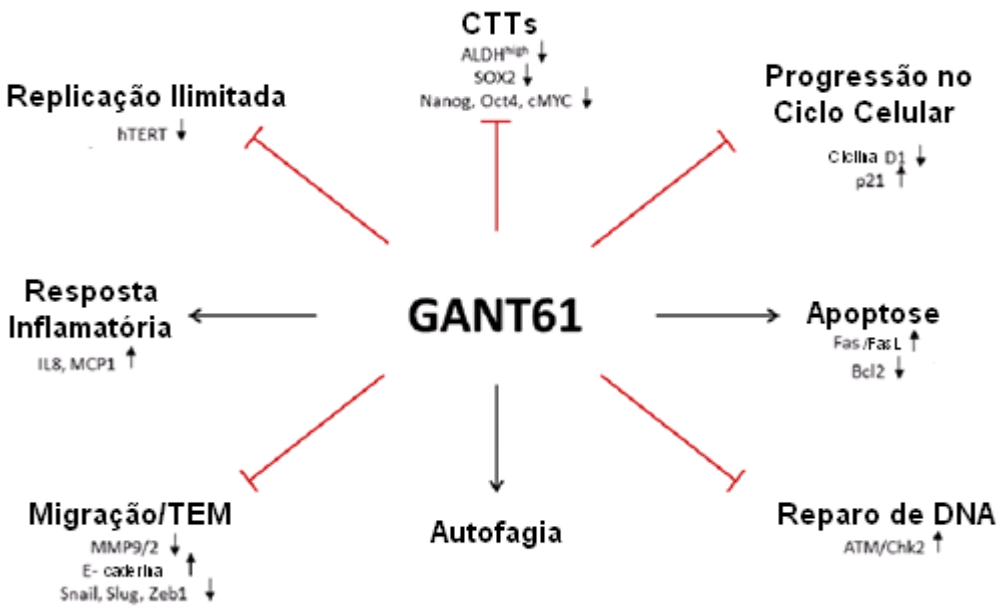


Figura 8: Diferentes papéis do inibidor da via de Shh, o GANT-61. GANT-61 já foi descrito por limitar o potencial de replicação celular, reverter o perfil de CTT, reduzir a progressão no ciclo celular, bloquear o reparo de danos ao DNA e impedir a migração/transição epitélio mesenquimal. E conhecido também por induzir resposta inflamatória, apoptose e autofagia (Gonissen *et al.,* 2015).

Tendo em vista os dados epidemiológicos, o potencial de agressividade do GBM, e a baixa sobrevida do paciente, é evidente a urgência de aprofundar os estudos sobre este tipo tumoral. Há alguns anos nosso grupo procura entender e contornar os mecanismos moleculares pelos quais as células isoladas de GBM resistem aos tratamentos atuais, buscando novas estratégias de terapia.

Portanto, devido à propriedade de GANT-61 de silenciar a via de Shh, reduzindo assim a auto-renovação das CTTs importantes para a manutenção da massa tumoral que são normalmente resistentes à quimio e radioterapia, acreditamos que sua associação com a TMZ, possa ser uma terapia promissora para pacientes com GBM.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar se a inibição *in vitro* da via Sonic Hedgehog por GANT 61 nas linhagens de glioblastoma humano T98G e GBM11 potencializa o efeito do agente quimiterápico TMZ.

2.2. Objetivos Específicos

a. Avaliar o potencial citotóxico de TMZ nas linhagens T98G e GBM11.

b. Avaliar o potencial citotóxico da associação e alternância de TMZ e GANT-61 nas linhagens T98G e GBM11.

c. Investigar os mecanismos de proliferação e morte na linhagem T98G, tratados com TMZ e GANT-61.

d. Investigar os efeitos da associação de TMZ e GANT-61 sobre a formação de vesículas ácidas, indicativas de autofagia, na linhagem T98G.

e. Investigar a produção de EROs durante a associação de TMZ e GANT-61 na linhagem T98G.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultura celular das linhagens de Glioblastoma

A linhagem primária GBM11 foi obtida através de retirada cirúrgica, procedimento realizado em colaboração com o Dr. Jorge Marcondes (HUCFF-UFRJ) e seu repique foi realizado de acordo com Faria *e* colaboradores (2006), seguindo as normas do comitê de ética em pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas (DAHEICB 015). Também foi utilizada a linhagem comercial T98G do *American Type Culture Collection* (ATCC). O cultivo das linhagens foi feito em meio DMEM/F-12 (Gibco, Grand Island, cat nº 11330057) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Grand Island, cat nº 10438018) em ambiente úmido com estufa a 37°C e 5% de CO_2.

3.2. Incubação com os fármacos TMZ e GANT-61

A Temozolomida (TMZ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, cat nº T2577), segundo orientação do fabricante, foi diluída em DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, cat nº W387520) até atingir a concentração de 100 mM e o estoque foi então armazenado à -80ºC (seguindo orientações do fabricante) ficando à -20ºC somente o microtubo tipo *eppendorf* em uso, para que mantivesse suas propriedades farmacológicas. Para fins experimentais, foi novamente diluída em DMEM/F-12 com SFB à 5% até alcançar as concentrações de 100, 200 e 400 µM.

O inibidor GANT-61 (Tocris Bioscience, Bristol, cat nº 3139), segundo orientação do fabricante, foi também diluído em DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, cat nº W387520) até atingir a concentração de 5 mM e armazenado à -20ºC. Para fins experimentais, foi novamente diluído em DMEM/F-12 com SFB à 5% até alcançar a concentração de 20 µM.

Inicialmente as linhagens foram incubadas com TMZ nas concentrações de 100, 200 e 400 µM durante 24 e 48 horas. De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade, a dose de 400 µM (TMZ) foi a escolhida para dar continuidade aos demais experimentos em 48 e 72 horas.

Tendo definido tempo e dosagem, novos ensaios de citotoxicidade foram realizados a fim de definir estratégias de associação farmacológica para posterior observação do mecanismo de ação destes fármacos. Portanto, a incubação das

linhagens com TMZ e GANT-61 ocorreu em duas condições experimentais distintas, em combinação e em alternância de fármacos.

Após 24h do plaqueamento das células tumorais em placas de 96 poços, foram estabelecidos os grupos experimentais de células cultivadas com meio DMEM/F12 e 5% de SFB na presença de 0,4% do veículo DMSO (Controle); células na presença de 400μM de TMZ (TMZ400); células cultivadas com 20μM de GANT-61 (GANT20) ou células cultivadas com ambos os fármacos nas mesmas concentrações. Considerando esse último grupo experimental, foram feitas duas diferentes condições: (1) combinação dos fármacos durante 48h e 72h (TMZ400+GANT20) ou (2) alternância dos fármacos, incubando inicialmente com TMZ por 48h ou 72h e trocando para a incubação com GANT (TMZ400/GANT20) e vice-versa (GANT20/TMZ400) também por 48h ou 72h.

A estratégia de combinação em 72 horas, foi selecionada como modelo experimental do estudo a ser utilizado para os ensaios conseguintes.

3.3. Microscopia de contraste de fase

As linhagens GBM11 e T98G foram observadas em microscopia de contraste de fase durante o período de tratamento, que também foi utilizada para avaliar a densidade celular em cultura. Ao final do tratamento de combinação e alternância, as linhagens foram fotografadas em microscópio invertido DMi1 (Leica Microsystems, Wetzlar) na objetiva de 20x.

3.4. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

Após o tempo de incubação dos grupos experimentais citados anteriormente, a técnica de MTT foi utilizada para avaliar a viabilidade celular através do componente cromogênico metil-tiazolil-tetrazólio (MTT, 5 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, cat nº M2128). As enzimas mitocondriais de células viáveis são capazes de metabolizar o MTT atestando, portanto, a atividade respiratória destas células, levando a formação de cristais roxos de Formazan (figura 9). Após incubação de 2 horas com o MTT, este foi descartado e as células viáveis foram lisadas com 50µl de DMSO durante 20 minutos, e a coloração resultante foi analisada através da densidade óptica emitida em 570 nm.

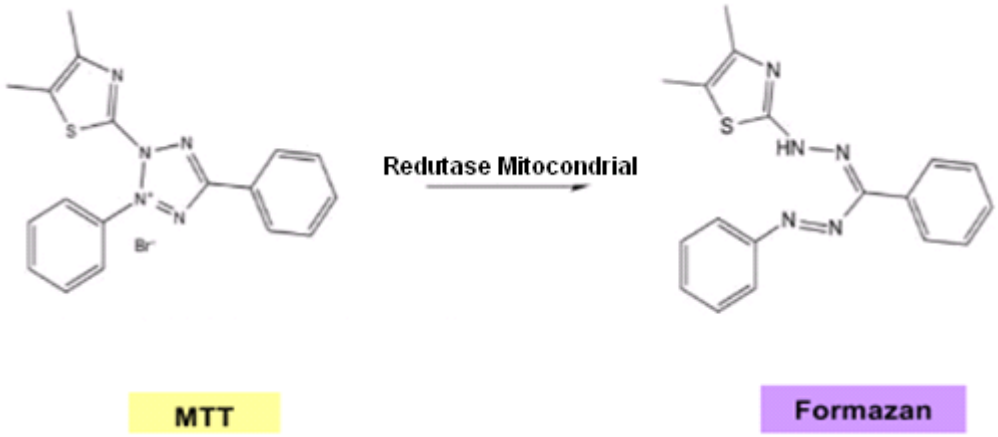


Figura 9: Reação de metabolização do componente cromogênico metil-tiazolil-tetrazólio (MTT) em cristais roxos de Formazan, pela enzima redutase mitocondrial (Adaptado de Kronek *et al.,* 2013).

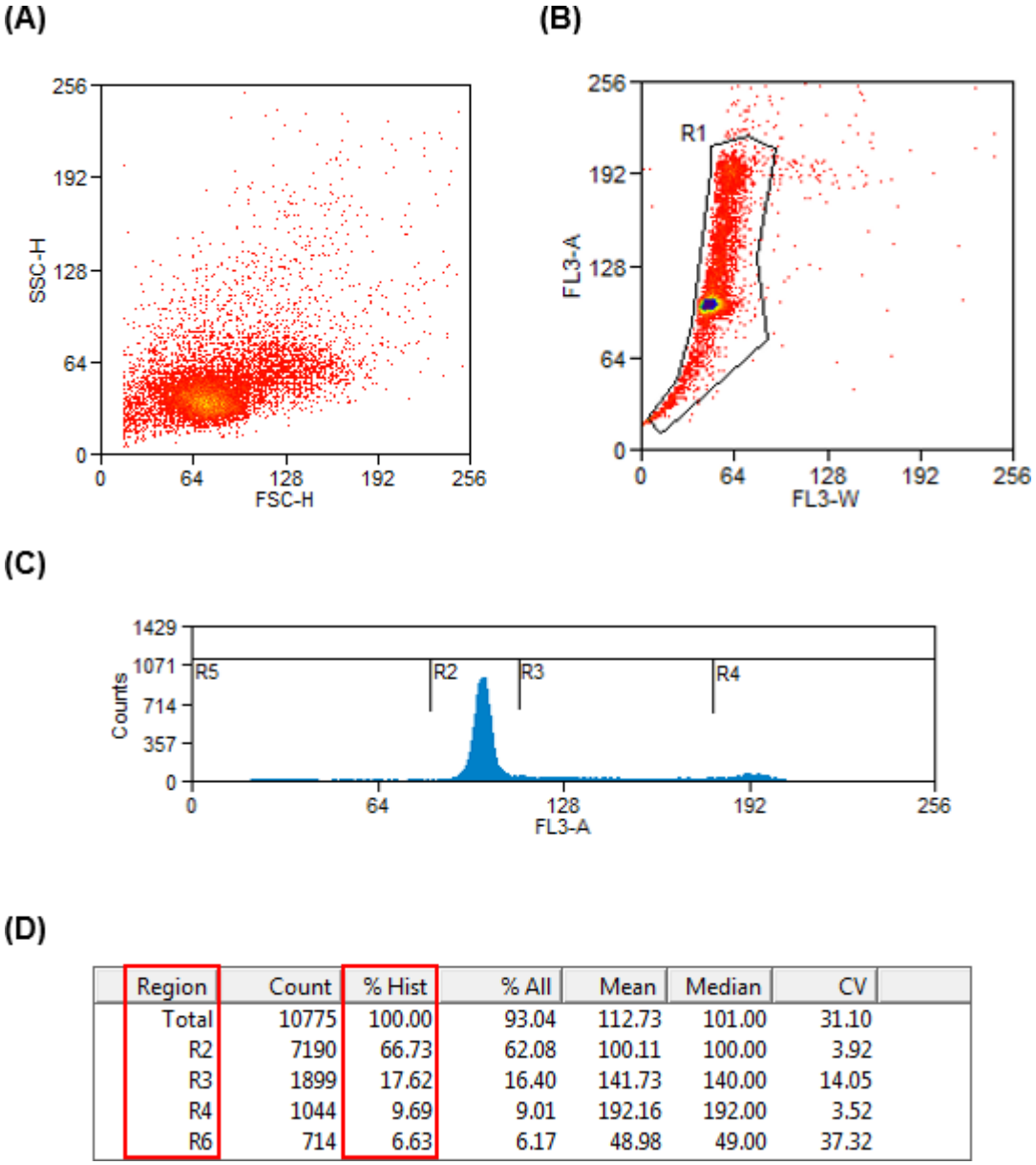
Foram realizados 3 experimentos independentes em quintuplicata, sendo considerado 100% de viabilidade a média da densidade ótica correspondente ao grupo controle, utilizando o *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Califórnia). As análises estatísticas foram feitas por teste estatístico paramétrico ANOVA One-way com pós-teste de Tukey para comparar estatisticamente os pares colunas.

3.5. *Ciclo Celular e Fragmentação de DNA*

Para avaliar o efeito citostático e citotóxico da combinação dos fármacos TMZ e GANT-61, as células (9,5 x 10^4) da linhagem T98G foram plaqueadas em placas de 24 poços. Após 24h, as células foram cultivadas nas condições experimentais descritas no item 3.2. Após a incubação combinada de TMZ (400μM) e GANT-61 (20μM) por 72 horas, as células foram destacadas dos poços com 0,25% de Tripsina (Gibco, Grand Island, cat nº 15400054) e centrifugadas durante 5 minutos à 27g (microcentrífuga 5430R, Eppendorf, Hamburgo) em temperatura ambiente, o sobrenadante foi então descartado e o *pellet* foi ressuspenso em uma solução contendo iodeto de propídeo (PI) na concentração de 50 µg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, cat nº P4170), 0,3% de Triton-X100 (Sigma) e tampão citrato de sódio (4mM) (Sigma), e uma solução contendo RNAse 100 µg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, cat nº R7884), no mesmo tampão citrato de sódio, obedecendo a proporção de 250 µL de solução A e 250 µL de solução B para cada 5 x 10^5 células. As células foram então homogeneizadas

com as soluções e incubadas durante 15 minutos, e, em seguida, analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciencies, São Paulo) em colaboração com a tecnologista Dra. Karina Lani, da plataforma multiusuário de citometria do INCA.

Para avaliação do ciclo celular foram construídos três gráficos utilizando o *software* Summit, versão 4.3 (Beckman Coulter, Califórnia). Os parâmetros utilizados no primeiro gráfico *dot plot* (figura 10A) foram *Forward Scatter* (FSC-H) e *Side Scatter* (SSC-H), que avaliam, respectivamente, o tamanho relativo da célula por dispersão frontal da luz e a granulosidade da célula por dispersão lateral da luz, ambos os parâmetros morfológicos. O reagente PI, quando incorporado aos ácidos nucleicos, é excitado em 488nm e transmite fluorescência a partir de 525nm. Diante disso, no segundo *dot plot* (figura 10B) foi utilizado o canal de intensidade de fluorescência 3 (FL3), o qual capta fluorescência acima de 650nm. Foi importante considerar os parâmetros FL3-*width* (FL3-W) e FL3-*area* (FL3-A), representando, respectivamente, a largura e a área do pulso elétrico captado pelos fotomultiplicadores, o que torna possível a distinção entre *doublets* e células na fase G2/M. Neste histograma foi determinada uma região de aquisição de eventos (*gate R1*). Para o terceiro gráfico, em histograma (figura 10C), foi utilizado o parâmetro FL3-A e o número de eventos celulares, definindo-se marcas estatísticas para as fases do ciclo celular, baseando-se no grupo controle.



Region	Count	% Hist	% All	Mean	Median	CV
Total	10775	100.00	93.04	112.73	101.00	31.10
R2	7190	66.73	62.08	100.11	100.00	3.92
R3	1899	17.62	16.40	141.73	140.00	14.05
R4	1044	9.69	9.01	192.16	192.00	3.52
R6	714	6.63	6.17	48.98	49.00	37.32

Figura 10: Parâmetros utilizados para avaliação de ciclo celular da linhagem T98G. O dot plot A é representativo da morfologia celular através dos parâmetros *Forward Scatter* (FSC-H) para tamanho e *Side Scatter* (SSC-H) para granulosidade da célula. O dot plot B é representativo do canal de intensidade de fluorescência FL3 através da área (FL3-A) e da largura (FL3-W) do pulso elétrico gerado a partir da captação da fluorescência do PI pelo citômetro, onde R1 representa os eventos excluindo-se doublets do experimento. O histograma C considera os eventos da área R1. E nele estão representados os parâmetros FL3-A e o número de eventos celulares, onde as marcas estatísticas R2, R3, R4 e R5, representam, respectivamente, as fases G0/G1, S, G2/M e sub-G0. A tabela ilustrada em D representa as marcas estatísticas e suas respectivas porcentagens.

Os resultados representativos das marcas estatísticas R2, R3, R4 e R5, em porcentagem (figura 10D), representam as fases do ciclo celular G0/G1, S e

G2/M, e a fragmentação de DNA chamada sub-G0/G1, respectivamente. A partir dos valores na tabela, em que % Hist representa a porcentagem de células em cada fase considerando o gate R1, foram organizados gráficos de barras com auxílio do *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Califórnia). Foram realizados 3 experimentos independentes, sendo adquiridos 10.000 eventos por grupo experimental.

3.6. *Marcação de organelas vesiculares ácidas (AVOs)*

Foram realizados ensaios com o fluorocromo laranja de acridina - LA (Sigma-Aldrich, St. Louis, cat nº A8097), capaz de marcar AVOs (Santos *et al.,* 2015), para verificar a possível ocorrência de autofagia. Para a realização deste experimento foram utilizadas placas de 24 poços com 9,5 x 10^4 células da linhagem T98G nas condições controle, TMZ400, GANT20 e TMZ400+GANT20.Após 72 horas de incubação, as células foram destacadas dos poços com 0,25% de Tripsina e centrifugadas durante 5 minutos à 27g em temperatura ambiente, o sobrenadante foi então descartado e o *pellet* foi ressuspenso em LA na diluição de 1:10000 (1μM) em meio DMEM/F12 com 10% de SFB. As células foram então homogeneizadas com a solução e incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Para avaliar a marcação de LA, foram construídos dois gráficos *dot plot* através do *software* BD Accuri C6 (BD Biosciences, Califórnia). Os parâmetros utilizados no primeiro *dot plot* (figura 11A) foram FSC e SSC, parâmetros morfológicos, como já descritos. Neste gráfico, determinamos uma região de células viáveis (P2) para excluir debris. No segundo *dot plot* (figura 11B) foram analisados os eventos em P2 nos canais de fluorescência FL3-A (610/20nm) no eixo x e FL1-A (585/40nm) no eixo y, em que células FL1+ foram consideradas viáveis e FL1+/FL3+ foram consideradas células viáveis que apresentaram AVOs. Neste gráfico foi determinada uma região (R3) a partir do grupo controle, sendo considerado a porcentagem de células FL1+/FL3+. Os resultados foram organizados em gráficos de barras com auxílio do *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Califórnia). Foram realizados 3 experimentos independentes, sendo adquiridos 10.000 eventos por grupo experimental.

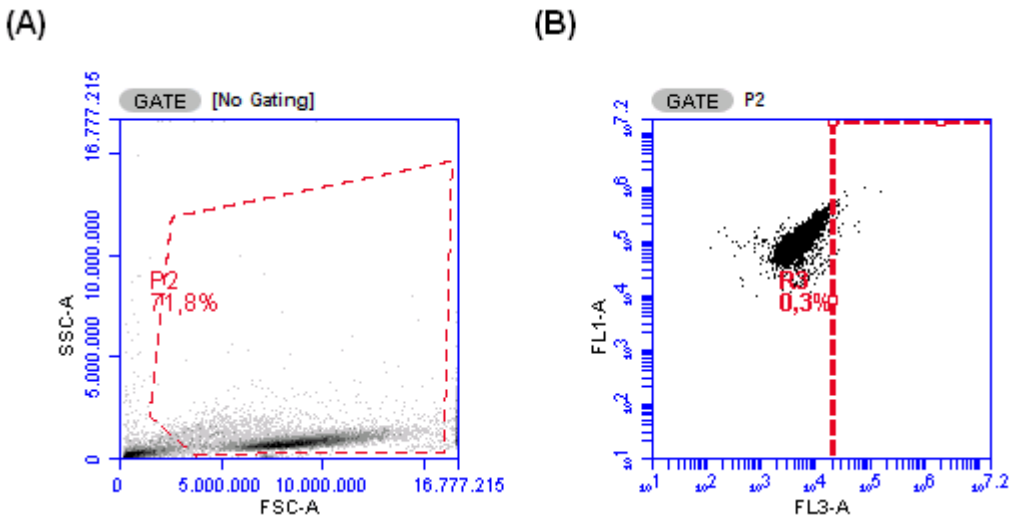


Figura 11: Parâmetros utilizados para marcação de AVOs com LA, na linhagem T98G. O *dot plot* **(A)** é representativo da morfologia celular através dos parâmetros *Forward Scatter* (FSC-A) para tamanho e *Side Scatter* (SSC-A) para granulosidade da célula. O *dot plot* **(B)** é representativo dos canais de intensidade de fluorescência FL3 e FL1. P2: população celular. R3: células FL1/FL3 positivas.

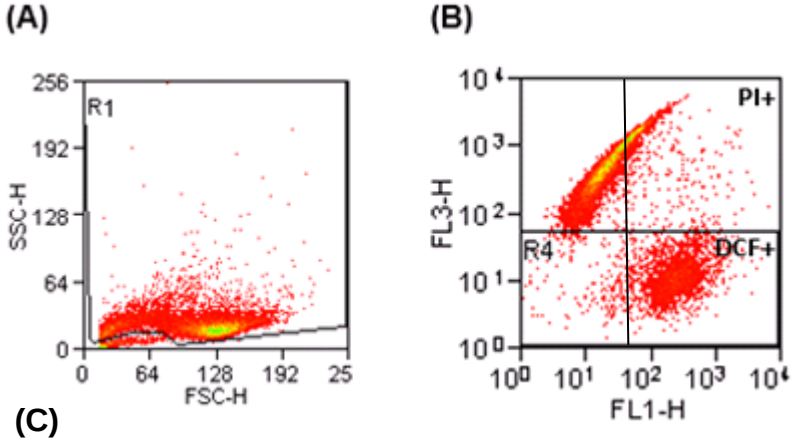
3.7. *Mensuração de espécies reativas de oxigênio (EROs)*

Foram realizados ensaios para avaliar a presença de EROS através do 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, cat nº D6883), o qual reage com o peróxido de hidrogênio, resultando em DCF que emite fluorescência em 525nm. Para a realização deste experimento foram utilizadas placas de 24 poços com 9,5 x 10^4 células da linhagem T98G nas condições controle, TMZ400, GANT20 e TMZ400+GANT20.Após 72 horas de incubação, células foram destacadas dos poços com 0,25% de Tripsina e centrifugadas durante 5 minutos à 27g em temperatura ambiente, o sobrenadante foi então descartado e o *pellet* foi ressuspenso em solução de DCFHA-DA (40 µM) em PBS. As células foram então homogeneizadas e incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente para em seguida serem adquiridas no citômetro de fluxo.

Para este ensaio fez-se necessário a presença de controles negativos (células apenas em PBS) para cada grupo experimental, para descontar a autofluorescência da célula e possível fluorescência emitida por TMZ e/ou GANT, além de permitir a compensação eletrônica após a aquisição de 3,5% FL3-FL1. No momento da aquisição de eventos todas as células (controle negativo e na

presença de DCF) foram marcadas com PI para reconhecimento de marcação inespecífica de DCF por células mortas.

Para avaliação da formação de EROs foram construídos dois gráficos *dot plot* através do *software* Summit, versão 4.3 (Beckman Coulter, Califórnia). Os parâmetros utilizados no primeiro gráfico foram FSC-H e SSC-H, onde se fez um *gate* R1 para exclusão de debris (figura 12A). No segundo gráfico (figura 12B) foram utilizados os canais de fluorescência FL1 e FL3, nos eixos x e y, respectivamente, já tendo sido descontada a fluorescência dos controles negativos. Neste gráfico, foram definidos quatro quadrantes a partir do grupo controle, sendo células viáveis (DCF-/PI-), células mortas (DCF-/PI+) e (DCF+/PI+) e células viáveis com marcação de EROs (DCF+/PI-). Para mensuração da formação de EROs, a mediana da fluorescência de células (DCF+/PI-) foi organizada em gráficos de barras com auxílio do *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Califórnia). Foram realizados 2 experimentos independentes, sendo adquiridos 10.000 eventos por grupo experimental.



(C)

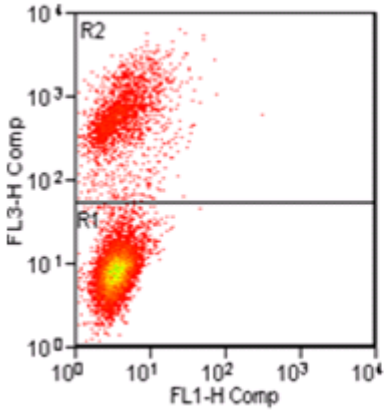
Region	Count	% Hist	% All	Mean	Median
Total	12656	100.00	77.73	827.82, 154.84	464.16, 5.08
R5	4357	34.43	26.76	18.40, 421.13	16.14, 373.72
R6	100	0.79	0.61	1330.65, 515.44	991.01, 360.46
R7	496	3.92	3.05	27.40, 64.26	19.33, 63.67
R8	7703	60.86	47.31	1330.66, 5.37	1187.16, 1.00

Figura 12: Parâmetros utilizados para avaliação de EROs por marcação com DCF da linhagem T98G. O dot plot A é representativo da morfologia celular através dos parâmetros *Forward Scatter* (FSC-H) para tamanho e *Side Scatter* (SSC-H) para granulosidade da célula, onde R1 representa a população celular sem *debris*. O *dot plot* B representa células viáveis (DCF-

/PI-) no quadrante inferior esquerdo, células mortas (DCF-/PI+ e DCF+/PI+) nos quadrantes superior esquerdo e direito e células viáveis com marcação de EROs (DCF+/PI-). A tabela ilustrada em C representa as marcas estatísticas e suas respectivas medianas consideradas.

3.8. Morte celular por perda de integridade da membrana (incorporação de PI)

As células marcadas com PI foram utilizadas para avaliar morte celular por perda de integridade de membrana plasmática.



Region	Count	% Hist	% All
Total	14705	100.00	94.02
R1	11997	81.58	76.70
R2	2715	18.46	17.36

Figura 13: Parâmetros utilizados para avaliação de morte celular por perda da integridade da membrana na linhagem T98G. O histograma é representativo dos canais de intensidade de fluorescência FL1 e FL3 através da altura (H) do pulso elétrico gerado a partir da captação da fluorescência do DCF e do PI, respectivamente, pelos fotomultiplicadores do citômetro de fluxo. Onde R2 representa os eventos PI+, em que neste exemplo, 18,46% das células estariam com marcação positiva, considerando a população de células e descontado o debris.

3.9. Morte celular por perda de integridade da membrana (incorporação de azul de tripano)

Foram realizados ensaios para avaliar morte celular por perda de integridade de membrana plasmática por consequente incorporação de Azul de Tripano. Quando a célula incorpora este composto, conclui-se que há perda de integridade de membrana devido a sua propriedade hidrofílica. Para a realização deste experimento foram utilizadas placas de 24 poços com 9,5 x 10^4 células da linhagem T98Gnas condições controle, TMZ400, GANT20 e TMZ400+GANT20. Após 72 horas de incubação, os sobrenadantes foram recolhidos e realocados em microtubos tipo *eppendorfs*. Em seguida, acrescentou-se aos *eppendorfs* as células destacadas dos poços com 0,25% de Tripsina e centrifugadas durante 5

minutos à 27g em temperatura ambiente, o sobrenadante foi então descartado e o *pellet* foi ressuspenso em meio DMEM/F12 e 10% de SFB.

Foi recolhida uma alíquota de 10 µL de célula de cada grupo experimental e adicionados à 10 µL de azul de tripano (Sigma-Aldrich, St. Louis, cat nº T8154), solução esta que foi homogeneizada e 10 µL foram transferidos a uma lâmina contadora (BioRad, Hercules, cat nº 1450011) que foi lida em contador automático de células (BioRad, Hercules, Automated Cell Counter). Foram anotadas as quantidades de células viáveis, e fez-se o cálculo percentual de células marcadas com azul de tripano a partir da quantidade total de células do grupo controle, sendo 100%. Os valores obtidos foram organizados em gráficos de barras com auxílio do *software* GraphPad Prism 5.0. Foram realizados 3 experimentos independentes, considerando um total de células em torno de 5 milhões de células.

3.10. Imunofluorescência

Foram realizadas imunofluorescências conforme descrito (Spohr *et al.*, 2008) utilizando os anticorpos contra Gli-1 (rabbit policlonal 1:500, Millipore, Billerica, cat nº ABC217), Ki67 (mouse monoclonal 1:200, Dako Denmark, Glostrup, cat nº M7240) e Vimentina (mouse monoclonal 1:100, Dako Denmark, Glostrup, cat nº M0725). O procedimento foi realizado nas duas linhagens de glioblastoma após a incubação combinada de TMZ e GANT-61 por 72 horas (Condição I) discutida na seção 3.3, com o objetivo de avaliar a expressão destes marcadores nestas linhagens. Para a realização deste experimento foram utilizadas placas de 24 poços com 95.000 células para a linhagem T98G e 166.000 células para a linhagem GBM11 plaqueadas em lamínulas de vidro, em 300 µL de meio DMEM/F12 com SFB à 5% em adição dos respectivos fármacos de acordo com o grupo experimental.

Após 72 horas de tratamento, o meio com os fármacos TMZ e GANT-61 foi retirado e em seguida foram adicionados 400 µl de paraformaldeído (PFA) 4% por poço durante 20 minutos para as marcações intracelulares (Gli-1 e Ki67), com a finalidade de fixar as células na lamínula. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS, por cinco minutos cada. Em seguida, as células foram incubadas com 50 µL de PBS-Triton 0,2% por lamínula por 5 minutos para

permeabilização da membrana celular e posteriormente feitas três lavagens de 5 minutos com PBS. Em seguida, foram adicionados 50 µL de PBS/BSA 5% em cada lamínula com a finalidade minimizar as ligações inespecíficas dos anticorpos, procedimento com duração de 1 hora de incubação em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 50 µL de anticorpo primário por lamínula, e este foi diluído em PBS/BSA 1%. As células foram incubadas com o anticorpo, *overnight* em câmara úmida a 4ºC. No dia seguinte, as células foram lavadas cuidadosamente três vezes com PBS, por cinco minutos cada lavagem. Depois 50 µL do anticorpo secundário diluído em PBS/BSA 1%, foram adicionados a cada lamínula e incubado por 2 horas em temperatura ambiente. Então, as células foram cuidadosamente lavadas por três vezes com PBS, por cinco minutos cada lavagem, e, após a terceira lavagem, foram adicionados 50 µL de 4,6-diamidino-2-phenylinole (DAPI, Sigma-Aldrich, St. Louis, cat nº D9542) um intercalante de DNA, na concentração de 1 µg/mL por lamínula durante 5 minutos. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS, uma terceira vez com água deionizada e a lamínula foi montada com auxílio de ProLong Gold Antifade Mountant (Life Technologies, Califórnia, cat nº P10144) e as lâminas foram armazenadas a –20º C para posterior observação das marcações em microscópio de fluorescência.

3.11. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas através de teste paramétrico de variancia one-way e teste de Tukey para comparação múltipla entre as médias dos experimentos nas condições experimentais apresentadas neste estudo. Os valores foram representados pela média ± erro padrão da média ou desvio padrão das variações, que foram consideradas significativas quando $P<0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. *As linhagens GBM11 e T98G diminuem sua viabilidade com diferentes concentrações de TMZ?*

Atualmente a TMZ é utilizada na clínica como fármaco padrão ouro para o tratamento adjuvante de GBMs (Najman *et al.,* 2002), entretanto, a sobrevida dos pacientes ainda é baixa e, apesar do avanço nas pesquisas, não se encontrou um fármaco ou conjunto de fármacos que possibilitem a cura. Como trabalhamos com uma linhagem primária, obtida em colaboração com o Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (UFRJ), a GBM11, realizamos ensaios de viabilidade celular por MTT na presença de TMZ em diferentes concentrações e diferentes tempos, e comparamos com a linhagem comercial T98G, com a finalidade de averiguar a resposta destas linhagens à incubação ao quimioterápico. Como podemos observar na figura 14, não observamos redução significativa de viabilidade das linhagens.

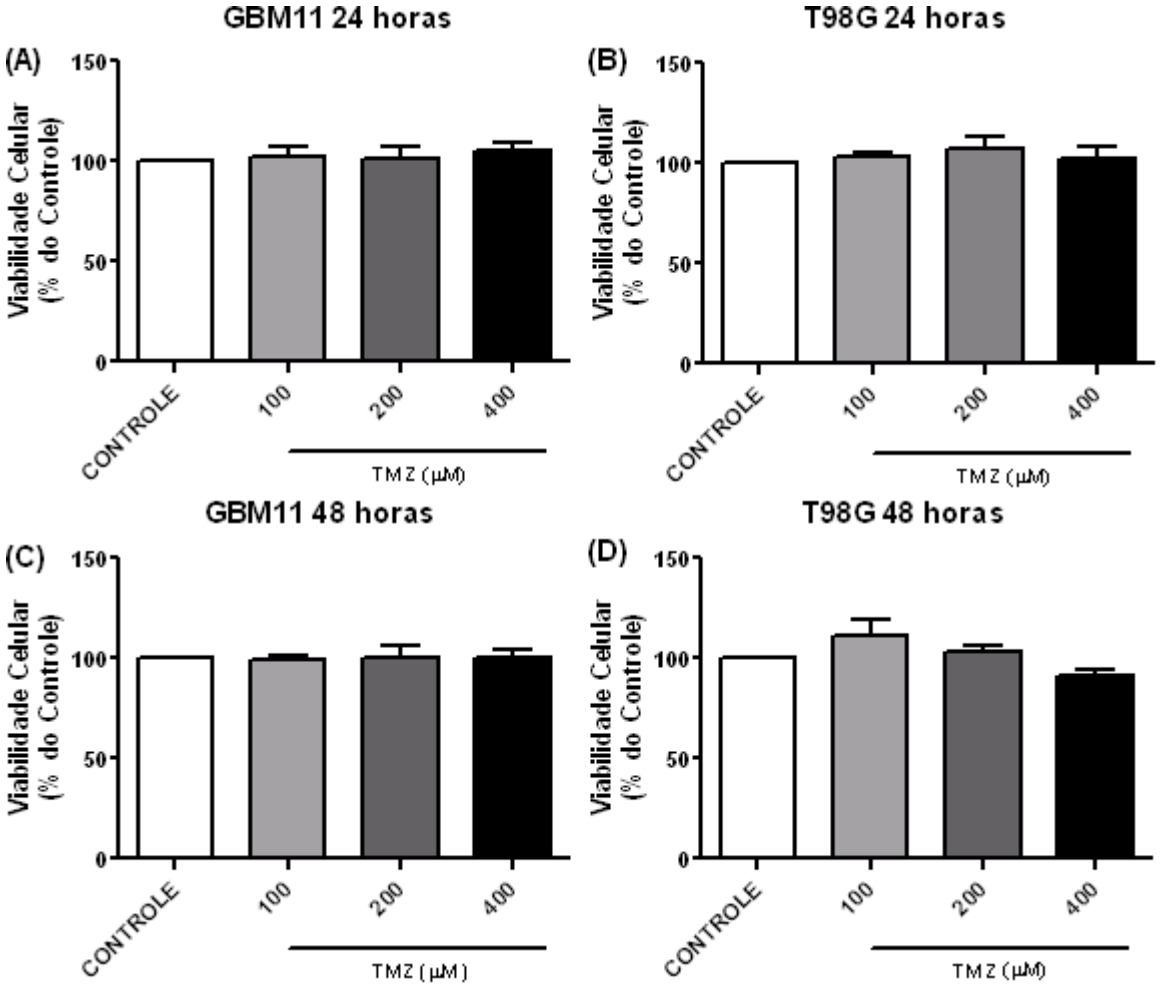


Figura 14: Viabilidade celular das linhagens humanas GBM11 e T98G com TMZ. Células nas condições CONTROLE (células na presença do veículo) ou TMZ (100µM, 200µM, 400µM). Observamos em **(A)** a linhagem GBM11 e em **(B)** a linhagem T98G, ambas em 24 horas de incubação, em percentual do controle. E observamos em **(C)** a linhagem GBM11 e em **(D)** a linhagem T98G, ambas em 48 horas de incubação, também em percentual do controle. As células foram então incubadas com MTT (5 mg/ml) por 2 horas e, em seguida, lisadas com DMSO por 20 minutos e a absorbância lida por espectrofotometria 570nm. Teste estatístico One-way ANOVA com teste de Tukey, P<0,05. Cada gráfico é representativo de 3 experimentos independentes feitos em quintuplicata, sendo a média±erro padrão da média.

Os resultados obtidos através do ensaio de MTT observados na figura 14 mostraram que as linhagens T98G e GBM11 apresentaram resistência às três concentrações (100, 200 e 400 µM) do quimioterápico TMZ, em 24 e 48 horas de incubação, uma vez que não observamos redução significativa da viabilidade celular. Provavelmente estas linhagens não foram sensíveis ao TMZ por apresentarem mecanismos de resistência ao fármaco. Nossos resultados com a linhagem T98G corroboram com os achados de Sousa e colaboradores (2015),

que demonstram que as linhagens tumorais U87MG e T98G apresentam resistência à TMZ na concentração de 800µM, durante 24 horas de tratamento. Vale frisar que diferente do trabalho de Sousa, foi utilizado concentrações menores de TMZ por um período mais longo, 48 horas. Porém, ainda assim não observamos uma diminuição da viabilidade celular. Ao contrário de Sousa e colaboradores, testamos a viabilidade celular da TMZ até 400µM, concentração utilizada na literatura capaz de reduzir a viabilidade de células sensíveis em torno de 50% (Zhang *et al.,* 2015; Lee *et al.,* 2015).

Em seu trabalho, Sousa utilizou uma concentração maior de TMZ (800µM), porém por um tempo curto (24 horas). Entretanto, já é conhecido que a citotoxicidade induzida por TMZ funciona de maneira tempo dependente (Barciszewska *et al.,* 2015), o que já foi demonstrado inclusive em estudos pré-clínicos (Khan *et al.,* 2001). Isto nos levou a acreditar que a dose de 400µM se utilizada por um período de tempo maior, seria suficiente para reduzir a viabilidade de forma moderada, permitindo o estudo dos mecanismos de ação do fármaco sem a necessidade de uma dose tão elevada, como os 800µM utilizados por Sousa. Além disso, alguns estudos demonstraram que células sensíveis à TMZ a dosagem utilizada normalmente é de 350µM. Estes estudos se basearam na concentração de 150 mg/m²/dia por cinco dias, utilizada na clínica durante o tratamento de pacientes portadores de GBM (Balça-Silva *et al.,* 2014). Além de considerar também estudos farmacocinéticos, que demonstraram que somente 20% da TMZ administrada via oral foi quantificado no líquido cefalorraquidiano, penetrando no cérebro (Ostermann *et al.,* 2004).

Visto isso, aumentamos o tempo de incubação das linhagens para 72 horas nos demais experimentos e mantivemos a concentração de 400µM. É importante destacar que nosso estudo visa esclarecer os mecanismos envolvidos no uso de TMZ, quando em combinação com a terapia adjuvante, e não apenas erradicar as células tumorais. Portanto, é interessante que as dosagens utilizadas afetem a viabilidade de forma moderada, sem comprometer todas as células em cultura.

Diversos mecanismos podem estar envolvidos na resistência celular à múltiplas drogas. Dentre os mecanismos de resistência da linhagem T98G que já estão descritos por estarem envolvidos na resistência ao tratamento com TMZ *in vitro* podemos citar, a superexpressão da enzima de reparo MGMT e a

superexpressão do gene MDR1 (Goellner *et al.*, 2011; Munoz *et al.*, 2015), responsáveis, respectivamente, por reparar adutos de DNA ocasionados pelo agente alquilante e por codificar proteínas de efluxo dificultando a permanência do fármaco no interior da célula (Qiu *et al.,* 2014; Hodges *et al.,* 2011).

Porém, acreditamos que além dos mecanismos citados, a via de Shh possa estar envolvida neste processo, uma vez que sua ativação vem sendo relacionada com a resistência de linhagens de GBM à TMZ em CTTs (Munoz *et al.*, 2015). O mecanismo pelo qual não se observa redução de viabilidade da linhagem GBM11 ainda é desconhecido, por se tratar de linhagem primária. Pretendemos ainda avaliar quais os mecanismos que são ativados na linhagem primária GBM11 que a tornam resistente ao tratamento de TMZ nos tempos e concentrações avaliadas em perspectivas deste estudo.

4.2. *A inibição seletiva da via de Shh é capaz de potencializar o efeito do TMZ em glioblastomas?*

Como falado anteriormente, os glioblastomas são os tumores mais agressivos do SNC, onde a sobrevida média dos pacientes é baixa (em média 12 à 15 meses), mesmo após a descoberta da TMZ (Li *et al.,* 2016). Acredita-se que a resistência do GBM ao tratamento com TMZ ocorra principalmente pela alta expressão da enzima MGMT que anula o efeito da TMZ no DNA (Sarkaria *et al.,* 2008). Além disso, sabe-se que a agressividade dos GBMs está intimamente relacionada à presença de CTTs na sua massa tumoral e que a via de Shh é muito importante para a manutenção e proliferação das CTTs (Kahlert *et al.,* 2016; Boyle *et al*., 2014).

Para investigar se a inibição seletiva da via de Shh, por GANT 61 nas linhagens GBM 11 e T98G era capaz de potencializar o efeito da TMZ, realizamos ensaios de MTT para atestar a viabilidade celular. Optamos por usar a concentração de 20µM de GANT-61 por ser a normalmente usada em ensaios *in vitro* com linhagens de GBM (Mazumdar *et al.,* 2013; Li *et al.,* 2016). E, para o quimioterápico, optamos pela concentração de 400 µM baseado nos resultados descritos na figura 14. Para tal, decidimos utilizar os fármacos em estratégias de combinação ou alternância.

A primeira estratégia foi de combinação (figura 15), onde as linhagens T98G e GBM11 foram incubadas com os fármacos TMZ e GANT-61 em concomitância, com a finalidade de verificar um possível sinergismo, após as 48 e 72 horas de incubação.

O que podemos observar nas fotos de contraste de fase (figura 15A), quando combinamos o tratamento com TMZ400+GANT20 por 72 horas, na linhagem T98G ocorreu aparentemente uma diminuição na proliferação, uma vez que observamos a monocamada menos confluente. Esta observação foi corroborada com o ensaio por MTT nas mesmas condições nos tempos de 48 e 72 horas (figura 15B) quando observamos uma diminuição na viabilidade celular com o tratamento TMZ400+GANT20, sugerindo que esta linhagem possa ser mais sensível à combinação farmacológica. A linhagem GBM11, apesar de não apresentar redução de confluência nas fotos de contraste de fase (figura 15A), apresentou sensibilidade no grupo TMZ400+GANT20 pela técnica de MTT (figura 15B), tendo redução significativa em sua viabilidade quando comparado ao controle, em 48 horas. Os valores de significância estão na tabela 1.

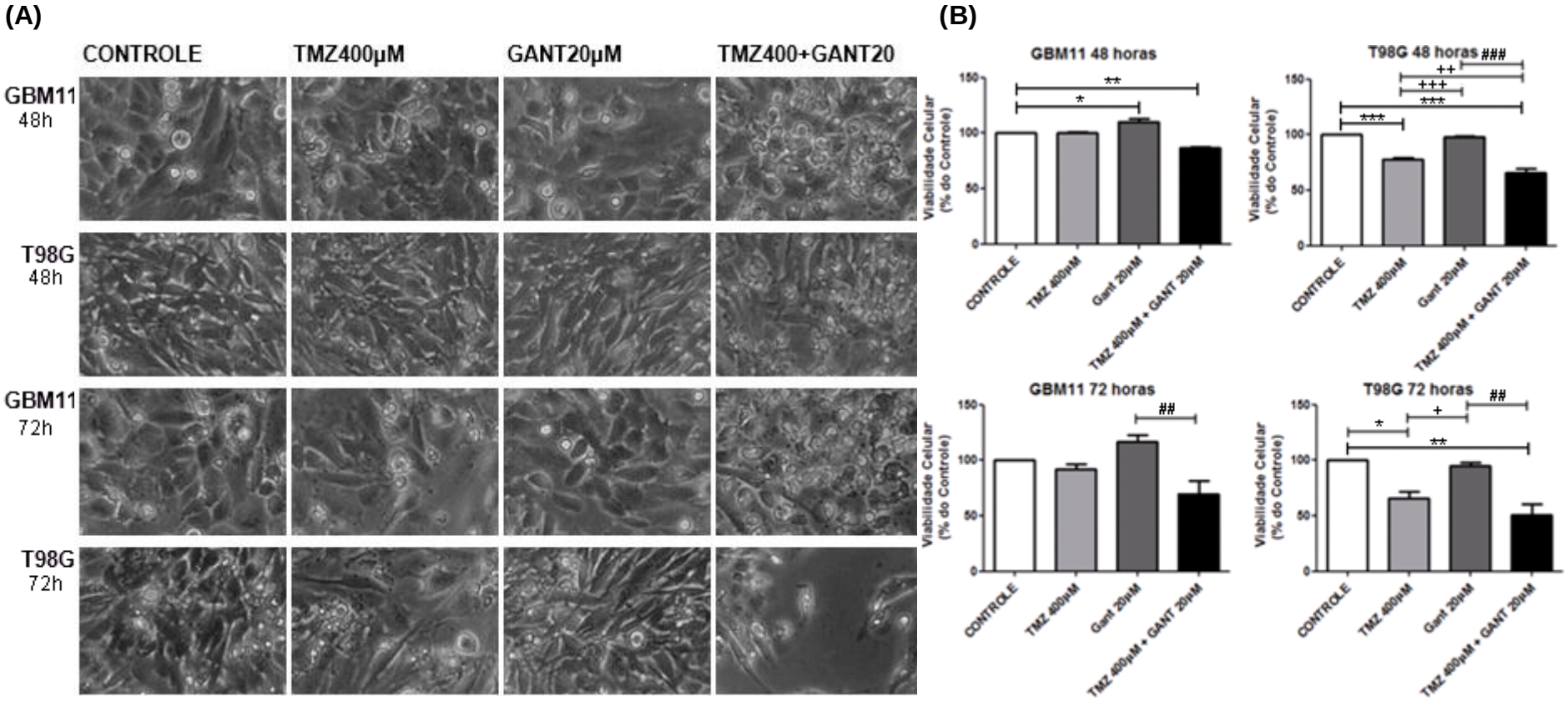


Figura 15: A inibição seletiva da via de Shh potencializou o efeito da TMZ na linhagem T98G. Células de GBM11 ou T98G foram tratadas nas condições CONTROLE (células na presença do veículo), TMZ 400µM, GANT-61 20 µM e TMZ 400µM+GANT-61 20µM, nos tempos de 48 e 72 horas. As células foram então fotografadas e incubadas com MTT (5 mg/ml) por 2 horas e, em seguida, lisadas com DMSO por 20 minutos e a absorbância lida por espectrofotometria 570nm. Em **(A)** observamos fotos em contraste de fase das linhagens GBM 11 ou T98G (aumento de 20x, microscópio DMi1). Em **(B)** observamos a viabilidade celular das linhagens por MTT após os tratamentos de 48 e 72 horas, em percentual, sendo o controle 100%. Teste estatístico One-way ANOVA com teste de Tukey. Os símbolos *(P<0,05), **(P<0,01) e ***(P<0,001) representam a significância em relação ao controle, +(P<0,05), ++(P<0,01) e +++(P<0,001) em relação ao grupo TMZ400 e ##(P<0,01), ###(P<0,001) em relação ao grupo GANT20. Cada gráfico é representativo de 3 experimentos independentes feitos em quintuplicata, sendo a média±erro padrão da média.

Tabela 1: Valores de significância referentes a figura 15B.

% DE SIGNIFICÂNCIA (DIFERENÇA DAS MÉDIAS)				
	48 horas		72 horas	
GRUPOS	**GBM11**	**T98G**	**GBM11**	**T98G**
CONTROLE x TMZ400	ns	21,92%	ns	33,92%
CONTROLE x GANT20	10,25%	ns	ns	ns
CONTROLE x TMZ400+GANT20	13,44%	34,09%	30,24%	49,23%
TMZ400 x GANT20	ns	ns	ns	ns
TMZ400 x TMZ400+GANT20	21,9%	ns	ns	ns
GANT20 x TMZ400+GANT20	ns	ns	ns	ns

Teste estatístico One-way ANOVA com teste de Tukey, P<0,05
ns = não significativo

Um estudo realizado por Li e colaboradores, em 2016, demonstrou que a concentração de 5µM de GANT-61 é capaz de reduzir a viabilidade das linhagens U87 e U251 em 50%, durante 48 ou 72 horas de tratamento (Li *et al.*, 2016). Estes achados discordam de nossos experimentos, pois ao utilizarmos uma concentração maior (20 µM), no mesmo intervalo de tempo, não observamos redução de viabilidade das linhagens GBM11 e T98G no grupo GANT20, como observado na figura 15B. Acreditamos que a diferença observada se deva a dois fatores principais: a técnica utilizada e a diferença de resistência das linhagens. Quanto a técnica para avaliar viabilidade, utilizamos ensaios de MTT enquanto Li e colaboradores utilizaram o *cell counting kit-8* (CCK8), este último já foi descrito na literatura por superestimar a proporção de células inviáveis quando comparado a técnica de MTT (Jiao *et al.,* 2015). Além disso, já se sabe que as linhagens comerciais U87 e U251 apresentam maior sensibilidade aos tratamentos quimioterápicos do que a linhagem T98G, como mostrou Ryu e colaboradores, em 2012, ao tratar estas três linhagens durante 72 horas com diferentes concentrações de TMZ (Ryu *et al.,* 2012).

Entretanto, os resultados de Li e colaboradores corroboram os nossos achados no que diz respeito a combinação farmacológica de TMZ com GANT-61. Em ambos os trabalhos, as linhagens apresentaram redução de viabilidade no grupo de combinação farmacológica quando comparado ao controle. Para este experimento, Li e colaboradores utilizaram GANT-61 na concentração de 1µM associado à TMZ 60 µM, enquanto utilizamos 20µM e 400µM, respectivamente.

Acreditamos que a diferença nas dosagens se deva também ao perfil de resistência das linhagens, como já foi explicado anteriormente. Mesmo nestas concentrações, a linhagem GBM11 mostrou menor redução de viabilidade quando comparado com a T98G, nos levando a acreditar que os mecanismos envolvidos na sua resistência aos quimioterápicos sejam mais eficazes.

Ainda, atestando nossa suposição de que um maior tempo de tratamento seria capaz de reduzir a viabilidade da linhagem T98G, com dosagens de 20μM de GANT-61 e 400μM de TMZ, observamos que durante o tratamento com TMZ400 (figura 15B) a linhagem T98G apresentou redução significativa de viabilidade quando comparo ao grupo controle, em 48 e 72 horas. Reiterando os achados de Sousa e colaboradores, acreditamos que a dose de TMZ 800μM utilizada nesse estudo não tenha sido efetiva em reduzir a viabilidade devido ao baixo tempo de exposição, de apenas 24 horas (Sousa *et al.,* 2015). E, enfatizamos que metade desta dose, 400 μM, foi efetiva em reduzir a viabilidade da linhagem T98G durante um maior tempo de exposição.

A segunda estratégia foi de alternância (figura 16), onde as linhagens T98G e GBM11 receberam os fármacos TMZ e GANT-61 em tempos alternados, TMZ primeiro por 48 horas e 72 horas e GANT-61 depois por 48 horas e 72 horas ou GANT-61 primeiro e TMZ depois, no intervalo de tempo indicado. Nosso objetivo foi verificar se inibindo primeiro a via de Shh potencializava o efeito do tratamento com TMZ, ou se o efeito de TMZ nas linhagens de GBM era potencializado quando inibíamos a via após o tratamento com o quimioterápico nos tempos de 48 e 72 horas.

Como podemos observar nas fotos de contraste de fase na figura 16A, houve uma redução na confluência celular da linhagem T98G na condição de tratamento alternado, isto é, tratando primeiro com GANT-61 20μM por 72 horas e depois com TMZ 400μM por 72 horas. Entretanto, quando fizemos o ensaio por MTT (figura 16B), observamos que a linhagem T98G apresentou diminuição na viabilidade celular quando tratamos primeiro tanto com GANT-61 e depois com TMZ, quanto quando fizemos o tratamento inverso no tempo de 48 horas. Curiosamente, esperávamos que quando aumentássemos o tempo para 72 horas, que fossemos observar uma redução ainda maior nas duas condições, entretanto, observamos somente uma diminuição na viabilidade para o tratamento alternado

GANT20/TMZ400. Não houve diferença de viabilidade quando comparamos os dois grupos de alternância entre si, sugerindo que foi indiferente, em termos de sensibilização, adicionar o inibidor primeiro ou a TMZ primeiro.

Apesar disso, a linhagem T98G também demonstrou maior sensibilidade aos fármacos neste experimento, e curiosamente a linhagem GBM11 apresentou resistência às estratégias de alternância em todos os tempos de incubação, diferente do que observamos para o tratamento combinado, em 48 horas. Os valores de significância estão na tabela 2.

A resistência persistente observada na linhagem GBM11, confirma o laudo obtido do paciente de quem esta linhagem foi extraída: um glioma de alto grau, apresentando, portanto, diferentes mecanismos de escape ao tratamento. Para contornar este problema, acreditamos que a estratégia de combinação seja a mais promissora, uma vez que foi a única a demonstrar alguma efetividade em reduzir a viabilidade desta linhagem (figura 15B). Contudo, acreditamos que o tempo de exposição deva ser maior que 72 horas, visto que já foi descrito que as linhagens respondem de forma tempo dependente aos tratamentos (Barciszewska *et al.,* 2015).

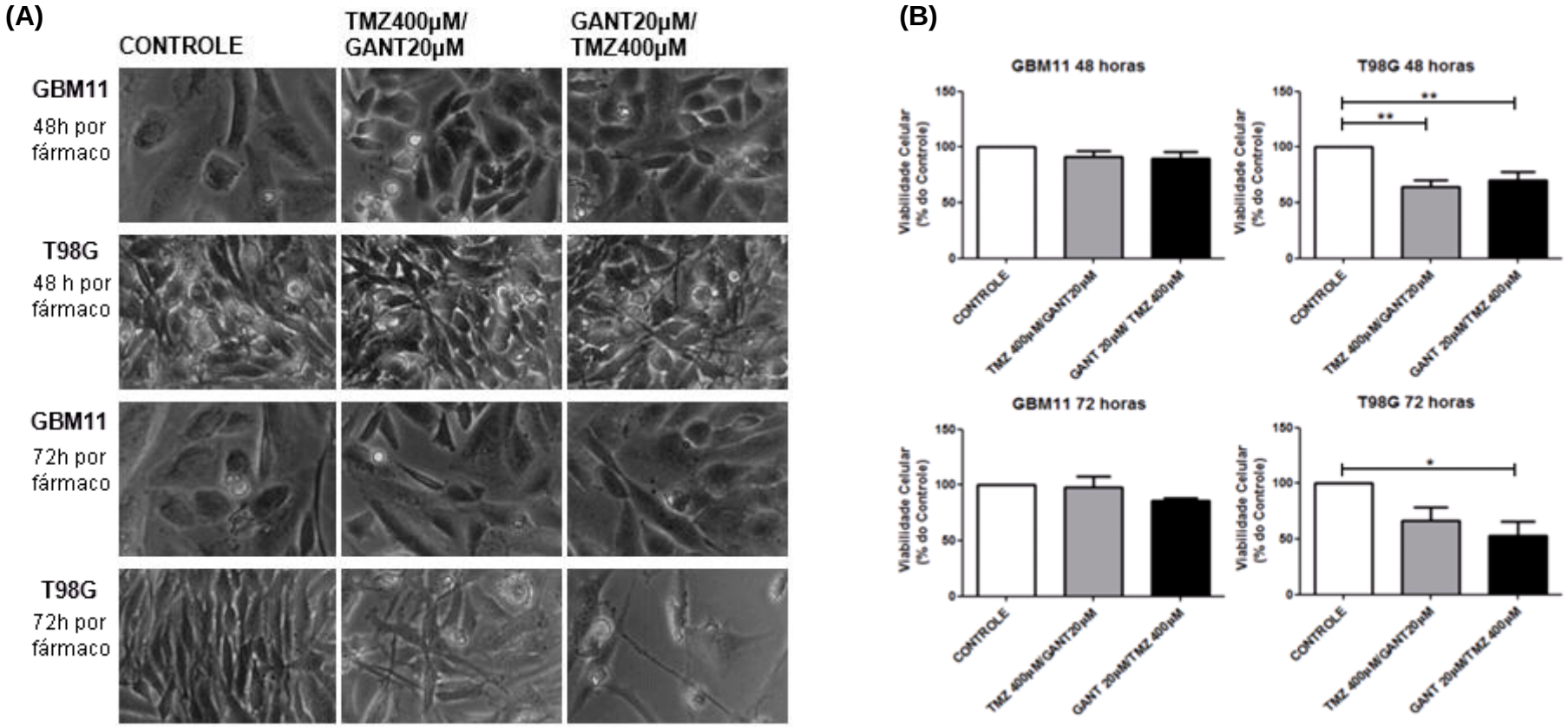


Figura 16: Efeito da inibição da via de Shh por GANT-61 na potencialização do tratamento por TMZ. Células de GBM11 ou de T98G foram tratadas nas condições CONTROLE (células na presença do veículo), TMZ 400µM primeiro e GANT-61 20 µM depois, e GANT-61 20µM primeiro e TMZ 400µM depois. O experimento foi realizado nos tempos de 48 e 72 horas por fármaco. As células foram então fotografadas e incubadas com MTT (5 mg/ml) por 2 horas e, em seguida, lisadas com DMSO por 20 minutos e a absorbância lida por espectrofotometria 570nm. Em **(A)** observamos fotos em contraste de fase das linhagens GBM11 ou T98G no aumento de 20x no microscópio DMi1. Em **(B)** observamos a viabilidade celular das linhagens através da técnica de MTT após os tratamentos, em percentual do controle. Teste estatístico One-way ANOVA com teste de Tukey. Os símbolos *(P<0,05) e **(P<0,01) representam a significância em relação ao controle. Cada gráfico é representativo de 3 experimentos independentes feitos em quintuplicata, sendo a média±erro padrão da média.

Tabela 2: Valores de significância referentes a figura 16B.

% DE SIGNIFICÂNCIA (DIFERENÇA DAS MÉDIAS)				
	48 horas/fármaco		72 horas/fármaco	
GRUPOS	**GBM11**	**T98G**	**GBM11**	**T98G**
CONTROLE x TMZ400/GANT20	ns	30,04%	ns	ns
CONTROLE x GANT20/TMZ400	ns	35,4%	ns	47,33%
TMZ400/GANT20 x GANT20/TMZ400	ns	ns	ns	ns

Teste estatístico One-way ANOVA com teste de Tukey, P<0,05
ns = não significativo

Acreditamos que a sensibilização observada na linhagem T98G em ambos os experimentos, seja fruto da modulação farmacológica da via de Shh, por GANT-61. À medida que silenciamos esta via, impedindo a ligação do fator de transcrição Gli-1 ao DNA, silenciamos também genes como Oct-4, Nanog e Sox-2, amplamente relacionados à manutenção do estado tronco e proliferação celular (Liu *et al.*, 2013). Dessa forma, sugerimos que a inibição da via de Shh tenha reduzido o fenótipo das CTTs, descritas na literatura como responsáveis pelo perfil de resistência de diversos tipos de câncer ao tratamento quimioterápico (Kahlert *et al.,* 2016). Permitindo, portanto, a sensibilização das linhagens à TMZ, como observamos nos resultados.

Já se sabe também que a superexpressão de Gli1 em um GBM é um marcador altamente preditivo de um mau prognóstico para o paciente (Rossi *et al.,* 2011). Além disso, SUFU que é um regulador negativo da via de *Shh,* muitas vezes se encontra hiperfosforilado mantendo-se inativo, o que permite que a transcrição de Gli ocorra e a via se mantenha ativa, independente da sinalização via receptor (Lauth *et al.,* 2007).

Para avaliar de forma mais ampla os mecanismos envolvidos na redução de viabilidade durante a inibição de Shh na presença de TMZ, decidimos prosseguir os experimentos com a linhagem T98G, que apesar de ser resistente a TMZ, respondeu ao tratamento conjunto com GANT-61 de forma mais eficiente do que a linhagem GBM11. Escolhemos ainda a estratégia combinada de 72 horas, já que neste tempo o sinergismo entre os fármacos foi capaz de reduzir a viabilidade celular em torno de 50%. As estratégias de alternância foram descartadas, já que não houve diferença entre os grupos de alternância.

Reiterando o trabalho de Li e colaboradores, que também combinaram GANT-61 ao tratamento com TMZ (Li *et al.,* 2016), acreditamos que as dosagens utilizadas tenham sido menores devido a maior sensibilidade das linhagens utilizadas (U87 e U251), do ponto de vista da resposta quimioterápica. Essa maior sensibilidade permitiu que as células do estudo respondessem a doses mais brandas do que as linhagens T98G e GBM11, como já demonstramos em nosso trabalho.

4.3. *Qual seria o efeito da combinação de TMZ e GANT-61 na proliferação celular?*

A proliferação celular é controlada fisiologicamente por diversos mecanismos, e já se sabe que a via de Shh é capaz de se opor a estes mecanismos de controle, promovendo a proliferação (Chen *et al.,* 2007). Dessa forma, o estudo farmacológico de TMZ e GANT-61 sobre o ciclo celular é essencial. Sabemos que alguns fármacos atuam em fases específicas do ciclo, porém, os agentes alquilantes, como a TMZ, são descritos na literatura por atuarem em todas as fases ao interagirem diretamente no DNA (American Cancer Society, 2015).

Para averiguar se o inibidor específico da via de Shh, GANT-61, é capaz de potencializar o efeito de TMZ sobre o ciclo celular, tratamos a linhagem T98G com 400µM de TMZ (TMZ400), ou 20µM de GANT-61 (GANT20) ou os dois fármacos combinados nestas concentrações (TMZ400+GANT20), por 72 horas. Após este período de tratamento, foram realizados ensaios de citometria de fluxo, com o intercalante de DNA PI.

Como podemos observar na figura 17 a linhagem T98G apresentou uma diferença significativa nas fases G0/G1 do ciclo celular, entre os grupos TMZ400 e TMZ400+GANT20 em relação aos grupos controle e GANT20. Entretanto, não observamos diferença significativa na fase S entre os grupos. Curiosamente, nas fases G2/M, observamos somente uma diferença significativa entre o grupo TMZ400 e os grupos controle, GANT20 e TMZ400+GANT20. Os valores de significância se encontram na tabela 3.

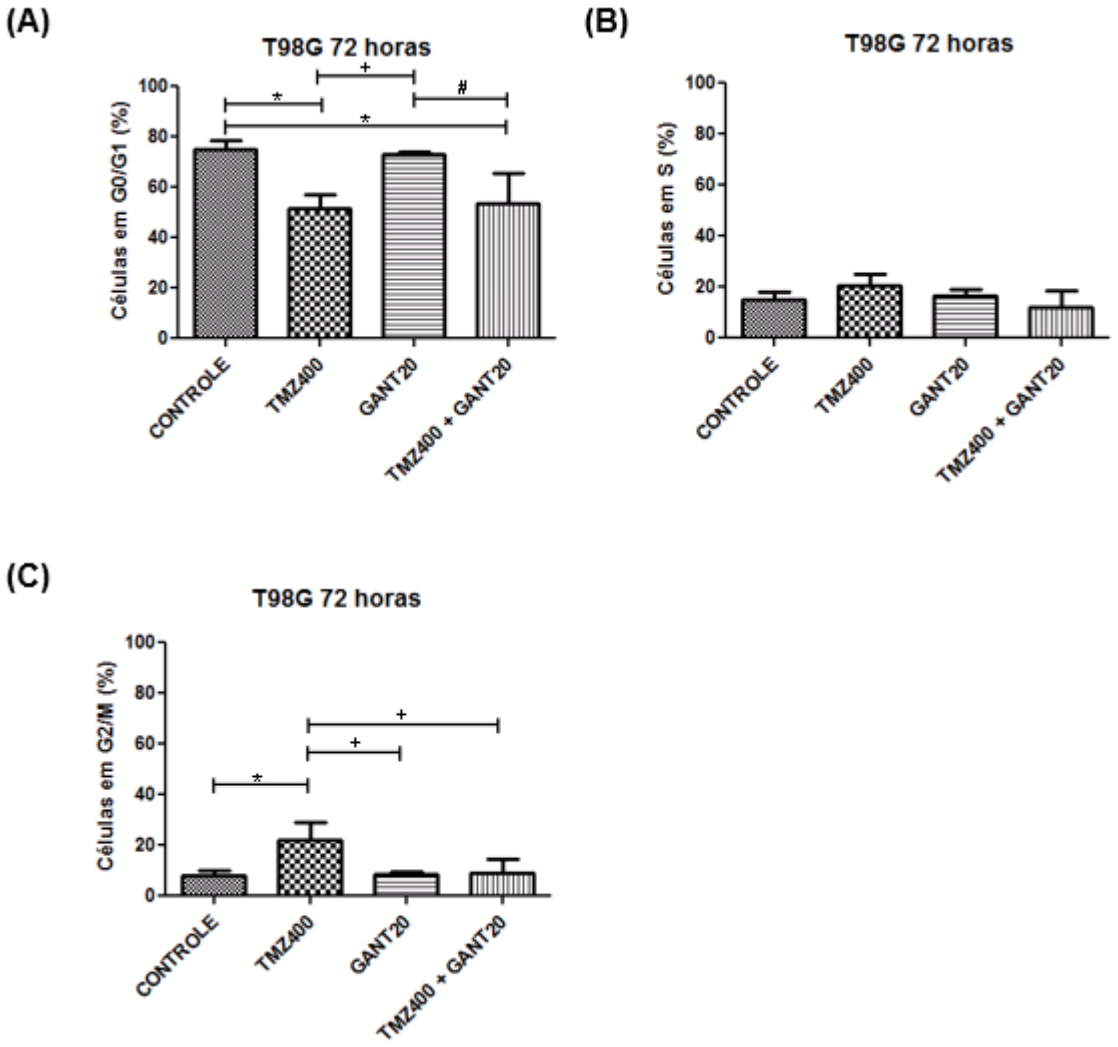


Figura 17: O tratamento isolado com TMZ 400 µM induz parada do ciclo celular em G2/M na linhagem T98G. As células da linhagem T98G foram tratadas por 72 horas com 400µM de TMZ (TMZ400), ou 20µM de GANT-61 (GANT20) ou os dois fármacos combinados nestas concentrações (TMZ400+GANT20) por 72 horas. Após este tempo realizamos ensaios de ciclo celular que foram adquiridos por citometria de fluxo após incubação da linhagem com PI e RNAse. Em **(A)** observa-se a fase G0/G1, S em **(B)** e G2/M em **(C)**, todas em percentual do controle**.** Teste estatístico One-way ANOVA com teste de Tukey. O símbolo *(P<0,05) representa a significância em relação ao controle, +(P<0,05) em relação ao grupo TMZ400 e #(P<0,05) em relação ao grupo GANT20. Cada gráfico é representativo de 3 experimentos independentes feitos em quintuplicata, sendo a média±erro padrão da média.

Tabela 3: Valores de significância referentes a figura 17.

% DE SIGNIFICÂNCIA (DIFERENÇA DAS MÉDIAS)			
GRUPOS	**FIGURA 17A**	**FIGURA 17B**	**FIGURA 17C**
CONTROLE x TMZ400	23,30%	ns	13,84%
CONTROLE x GANT20	ns	ns	ns
CONTROLE x TMZ400+GANT20	21,42%	ns	ns
TMZ400 x GANT20	21,41%	ns	13,40%
TMZ400 x TMZ400+GANT20	ns	ns	12,95%
GANT20 x TMZ400+GANT20	19,54%	ns	ns

Teste estatístico One-way ANOVA com teste de Tukey, P<0,05
ns = não significativo

Interessantemente, quando combinamos os fármacos TMZ400+GANT20, observamos uma redução da proporção de células retidas em G0/G1, subfases da intérfase, ocorrendo em G1 o primeiro ponto de checagem de erros no material genético, envolvendo as proteínas supressoras tumorais p53 e p21, que impedem que as células com DNA danificado avancem no ciclo celular (Pietenpol e Stewart, 2002). Os achados foram similares ao observado quando tratamos estas células com TMZ400 sozinho, sugerindo que não ocorra um efeito sinérgico aditivo quando adicionamos GANT-61 à TMZ.

Nossos resultados também mostram que a TMZ na concentração de 400µM aumentou a proporção de células retidas em G2/M, momento do ciclo onde ocorre o segundo ponto de checagem de erros no material genético, impedindo que as células com DNA danificado passem da fase G2, interfásica, para a fase M, mitótica, sendo encaminhadas para a morte (Pietenpol e Stewart, 2002). Esses resultados sugerem que a TMZ possui potencial para promover parada do ciclo celular na linhagem T98G, interferindo na sua proliferação. Acreditamos que o discreto aumento de células retidas em G2/M seja consequência da resistência desta linhagem ao quimioterápico, como descreveu Kanzawa e colaboradores, em 2003. No estudo citado, os pesquisadores mostraram haver uma relação entre o grau de sensibilidade da linhagem e a capacidade do alquilante TMZ em induzir a parada do ciclo celular, onde a linhagem U373-MG, sensível, apresentou maior proporção de células retidas em G2/M quando comparado a T98G, resistente (Kanzawa *et al.,* 2003).

Visto que a ativação aberrante da via de Shh e a consequente manutenção do fenótipo das CTTs vêm sendo descritas por dificultar o tratamento

quimioterápico ocasionando a resistência (Deshmukh *et al.,* 2016), acreditamos que o grau de sensibilidade das linhagens esteja intimamente relacionado ao grau de expressão dos componentes da via de Shh. Um estudo realizado por Lo e colaboradores em 2009, demonstrou que a linhagem tumoral U373MG, que responde melhor à TMZ, possui menor expressão do fator de transcrição GLI1 (efetor da via de Shh) do que a linhagem T98G, que resiste ao quimioterápico (Lo *et al.,* 2009). Em nossos resultados preliminares, demonstramos a imunomarcação para GLI1 na linhagem T98G.

4.4. *O tratamento combinado de TMZ e GANT-61 induz autofagia?*

Algumas células cancerígenas podem apresentar mutações em moléculas essenciais da maquinaria apoptótica, resultando em resistência aos quimioterápicos comuns. Quando os mecanismos apoptóticos falham, a morte celular por autofagia pode prevalecer. Dessa forma, o processo autofágico pode ser considerado um mecanismo alternativo de morte celular (Yousefi e Simon, 2009). Visto isso, decidimos avaliar se a linhagem T98G também responde ao nosso tratamento quimioterápico através do processo autofágico. Portanto, realizamos ensaios para verificar a presença de vesículas ácidas, característica morfológica da autofagia (Shi *et al*., 2012).

Para tal, as células da linhagem T98G foram incubadas nas condições controle, TMZ400, GANT20 e TMZ400+GANT20 durante 72 horas. Após esse tempo, a linhagem foi novamente incubada com o composto LA, durante 15 minutos, para marcação de vesículas ácidas e, em seguida, a fluorescência foi adquirida por citometria de fluxo.

Como podemos observar na figura 18, o tratamento com a TMZ isolada (TMZ400) por 72hrs, foi capaz de induzir um aumento significativo na formação de vesículas ácidas quando comparado com os grupos controle e GANT20. Mais ainda, a combinação dos fármacos TMZ400+GANT20 por 72 horas, foi capaz de promover um aumento ainda mais acentuado de vesículas ácidas, quando comparado com os demais grupos. Por termos observado que a linhagem T98G responde ao tratamento com TMZ aumentando a produção de vesículas ácidas concluímos que estas células estejam sofrendo autofagia, onde o uso

concomitante de TMZ e GANT-61 tem um efeito sinérgico na formação destas vesículas, uma vez que foi capaz de potencializar a formação das mesmas, até mesmo quando comparamos com o TMZ400 sozinho.

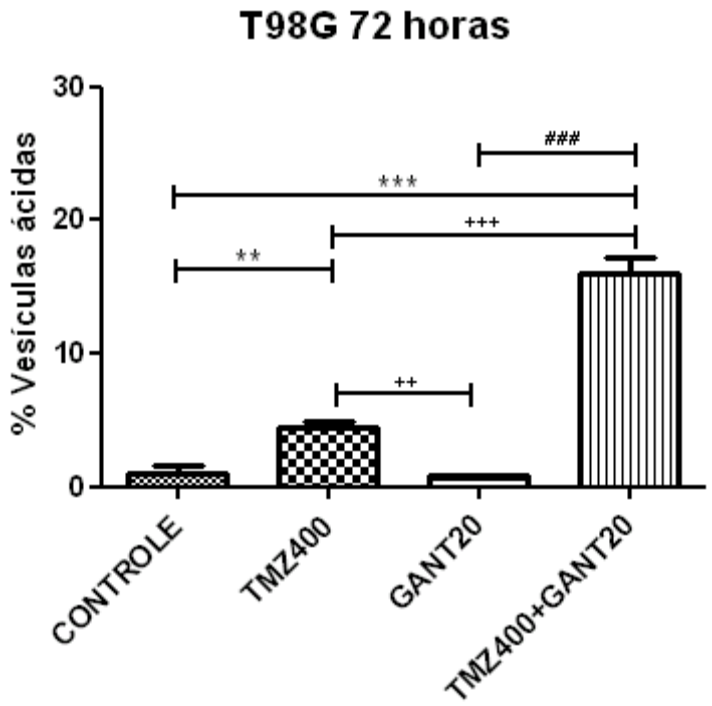


Figura 18: A combinação de TMZ e GANT-61 induz a produção de vesículas ácidas na linhagem T98G após 72 horas. Células da linhagem T98G foram incubadas por 72 hrs nas condições CONTROLE (células na presença do veículo), TMZ 400µM, GANT 20µM e TMZ400µM + GANT 20µM. Após este tempo as células foram incubadas com o componente LA durante 15 minutos, e a fluorescência foi adquirida por citometria de fluxo. Observamos no gráfico a presença de vesículas ácidas por incubação com o composto laranja de acridina, em percentual do controle. Teste estatístico One-way ANOVA com teste de Tukey. Os símbolos **(P<0,01) e ***(P<0,001) representam a significância em relação ao controle, ++(P<0,01) e +++(P<0,001) em relação ao grupo TMZ400 e ###(P<0,001) em relação ao grupo GANT20. O gráfico é representativo de 3 experimentos independentes, sendo a média± desvio padrão.

Tabela 4: Valores de significância referentes a figura 18.

% DE SIGNIFICÂNCIA (DIFERENÇA DAS MÉDIAS)	
GRUPOS	
CONTROLE x TMZ400	3,46%
CONTROLE x GANT20	ns
CONTROLE x TMZ400+GANT20	15,03%
TMZ400 x GANT20	3,6%
TMZ400 x TMZ400+GANT20	11,57%
GANT20 x TMZ400+GANT20	15,17%

Teste estatístico One-way ANOVA com teste de Tukey, P<0,05
ns = não significativo

Já está descrito na literatura que a TMZ é capaz de induzir os mecanismos de autofagia em linhagens de glioblastoma (Montaldi, 2009; Gonnissen *et al.,* 2015), o que corrobora com os nossos achados. Sabe-se também que a ativação da via de Shh através dos receptores Ptch e Smo é capaz de regular os mecanismos de autofagia, reduzindo a expressão da proteína LC3 que indica inibição do processo autofágico (Jimenez-Sanchez *et al.,* 2012). Entretanto, até o momento, pouco se sabe sobre o efeito sinérgico de GANT-61 e TMZ no processo de autofagia. Como citado anteriormente, recentemente Li e colaboradores (2016), demonstraram que o tratamento com GANT-61 sensibiliza as células de GBM à TMZ através da redução de viabilidade celular, aumento de danos ao DNA e redução na expressão de MGMT (Li *et al.,* 2016). Entretanto os autores não avaliaram os mecanismos de autofagia.

Já está bem estabelecido na literatura que durante a formação dos autofagossomos, a proteína LC3I citosólica, é conjugada a fosfatidiletanolamina formando LC3II. Esta proteína então é recrutada para a membrana dos autofagossomos, estando envolvida em sua expansão e fusão com outras membranas (Weidberg *et al.,* 2011). A proteína LC3II é normalmente utilizada para estimar a abundância dos autofagossomos em ensaios para avaliar se a célula está em processo de autofagia. Após a fusão do autofagossoma com o lisossoma a proteína LC3II é degradada (Tanida *et al.,* 2008; Glick *et al.,* 2010). Portanto, para confirmarmos se a linhagem T98G estaria em processo de autofagia como sugere os nossos resultados, pretendemos imunomarcar esta linhagem para a proteína LC3II.

Curiosamente, Wang e colaboradores (2013) demonstraram em seu estudo com linhagens de carcinoma hepatocelular humano que a inibição da via de Shh por GANT-61 faz com que ocorra um aumento significativo na expressão da proteína LC3II nestas células, indicativa da formação dos autofagossomos (Wang *et al.,* 2013). Entretanto, quando nós inibimos a via de Shh com GANT-61 não observamos nenhuma modulação na produção de vesículas ácidas na linhagem T98G. Acreditamos que isto se deva principalmente a diferença de linhagem utilizada, uma vez que não observamos diferenças a serem destacadas no que diz respeito ao tempo de incubação das linhagens e a concentração de GANT-61 utilizada.

Já é conhecido que a autofagia, além de induzir morte celular através de mudanças ocasionadas nas membranas internas da célula, também funciona como um dos mecanismos capazes de proteger as células da morte à medida que recicla as organelas celulares acometidas, sendo responsável em parte por promover resistência aos tratamentos (Kondo *et al.*, 2005). E, até o momento, todos os nossos resultados mostraram uma redução mais acentuada de viabilidade e maior citotoxicidade para o grupo de combinação farmacológica (TMZ400+GANT20), porém também demonstraram a presença de um possível *pool* de células resistentes neste grupo, o que nos leva a um questionamento intrigante: O inibidor da via de Shh em combinação com a TMZ estariam levando as células para a via autofágica da morte ou para a via autofágica protetora, favorecendo a resistência tumoral? Interessantemente, os mecanismos pelos quais as células são encaminhadas para a morte ou para a proteção ainda são desconhecidos, sendo um interessante aspecto a ser elucidado no futuro.

4.5. *TMZ e GANT-61 são capazes de induzir estresse oxidativo?*

As células eucariotas são capazes de responder e se adaptar aos agentes estressores externos através da conservação de mecanismos evolutivos de sinalização. Esses mecanismos regulatórios são importantes, já que a balança entre morte e sobrevivência celular é decisiva para proporcionar os fenótipos de sensibilidade ou resistência aos quimioterápicos. Os fármacos antineoplásicos também podem atuar como agentes estressores, muitas vezes induzindo os mecanismos protetivos da célula ou levando à apoptose (Tiligada, 2006; Circu e

Aw, 2011). Para entender o papel dos fármacos TMZ e GANT-61 em promover o estresse celular, realizamos ensaios para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênios (EROs).

Para tal, as células da linhagem T98G foram incubadas nas condições controle, TMZ400, GANT20 e TMZ400+GANT20 durante 72 horas. Após esse tempo, a linhagem foi incubada com o composto DCFH-DA para avaliar a formação de EROs e, em seguida, a fluorescência foi adquirida por citometria de fluxo.

Como podemos observar na figura 19 houve um aumento da presença de EROs em todos os grupos estudados. Entretanto, observamos um aumento acentuado dessas espécies no grupo TMZ400 e no grupo TMZ400+GANT20, em relação aos demais grupos. Estes resultados nos sugerem que a linhagem T98G respondeu aos agentes estressores através da produção de EROs, principalmente no grupo TMZ400+GANT20. Entretanto, a diferença observada não foi significativa, e acreditamos que isto seja devido ao desvio padrão acentuado no grupo TMZ400+GANT20 e ao fato do experimento ter sido feito em duplicata.

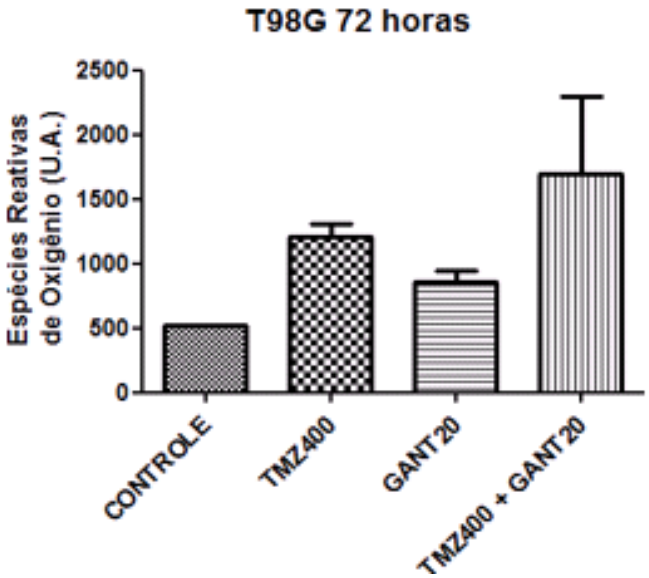


Figura 19: O tratamento da linhagem T98G com TMZ e GANT-61 induz a produção de EROs. Células da linhagem T98G foram incubadas nas condições CONTROLE (células na presença do veículo), TMZ 400µM, GANT 20µM e TMZ400µM + GANT 20µM durante 72hrs. Após este tempo as células foram incubadas com o componente DCF durante 30 minutos, e a fluorescência foi adquirida por citometria de fluxo. Observamos no gráfico a concentração de espécies reativas de

oxigênio, em unidades arbitrárias de mediana de fluorescência. Teste estatístico One-way ANOVA com teste de Tukey. O gráfico é representativo de 2 experimentos, sendo a média±desvio padrão.

Em conjunto, nossos resultados nos levaram a concluir que haja uma forte relação entre a produção acentuada de EROs na linhagem T98G observada para o grupo TMZ400+GANT20 e a citotoxicidade observada para este mesmo grupo nos demais experimentos do nosso estudo. Corroborando com os nossos resultados, recentemene foi descrito que a TMZ é capaz de induzir a produção de EROs a partir dos danos causados ao DNA (Oliva *et al.,* 2011).

Entretanto, foi também demonstrado que células consideradas resistentes à TMZ, como a linhagem T98G, permanecem com baixa produção de EROs após a exposição ao quimioterápico, o que não observamos em nossos resultados. Talvez esta diferença se deva ao tempo de incubação e a concentração de TMZ utilizada, enquanto nossa linhagem foi incubada por 72 horas com 400 µM, a linhagem do estudo foi incubada por apenas 2 horas com 300 µM, o que pode ter desfavorecido a produção de EROs no estudo citado (Oliva *et al.,* 2011).

Notavelmente, no grupo de combinação (TMZ400+GANT20), observamos um aumento ainda maior da produção de EROs. Este achado nos levou a concluir que a inibição da via de Shh por GANT-61 sensibilizou a linhagem ao tratamento com à TMZ, potencializando o efeito do fármaco. Além disso, já é conhecido na literatura que a via de Shh é capaz de responder às alterações ocasionadas pelos mecanismos de oxirredução, permanecendo inibida quando na presença de altas concentrações de EROs e retornando ao seu estado de ativação na ausência dessas espécies (Laurindo, 2010), nos levando a concluir que a produção de EROs induzida pela TMZ possa contribuir também para o silenciamento da via de Shh.

Mais ainda, existem alguns relatos na literatura que afirmam que a produção acentuada de EROs seria capaz de reduzir as CTTs presentes em um dado tumor (Shi *et al.,* 2012). Estes achados favorecem nosso estudo, já que nossa estratégia combinada de TMZ e GANT-61 induz a produção de EROs, que auxiliaria na redução das CTTs e consequentemente na redução do perfil de resistência tumoral, uma vez que as CTTs são descritas por sua radio e quimiorresistência. Futuramente, pretendemos avaliar também se existe uma

diminuição na expressão de marcadores importantes para a manutenção do estado tronco das CTTs, como Sox-2, Oct4 e Nanog.

4.6. *A combinação de TMZ e GANT-61 induz eventos de morte celular?*

Já está descrito na literatura, que os fármacos TMZ e GANT-61 são capazes de induzir isoladamente morte celular através de diferentes mecanismos, incluindo apoptose (Zou *et al*., 2014; Montaldi, 2009; Gonnissen *et al.,* 2015). Com a finalidade de avaliar os mecanismos e os eventos de morte celular envolvidos na citotoxicidade promovida pela combinação farmacológica de TMZ e GANT-61, foram realizados ensaios para avaliar a integridade da membrana e fragmentação de DNA da linhagem T98G como observado na figura 20.

Para tal, as células da linhagem T98G foram incubadas nas condições controle, TMZ400, GANT20 e TMZ400+GANT20 durante 72 horas, e após o tempo de incubação foram submetidas a técnica de Azul de Tripano, ficando em contato com este componente por alguns segundos com a finalidade de avaliar a permeabilidade membranar. As células foram também submetidas as técnicas de citometria de fluxo, onde foram incubadas com o fluorocrômo PI, para avaliar integridade membranar ou com PI e RNAse, para avaliar fragmentação de DNA em sub-G0.

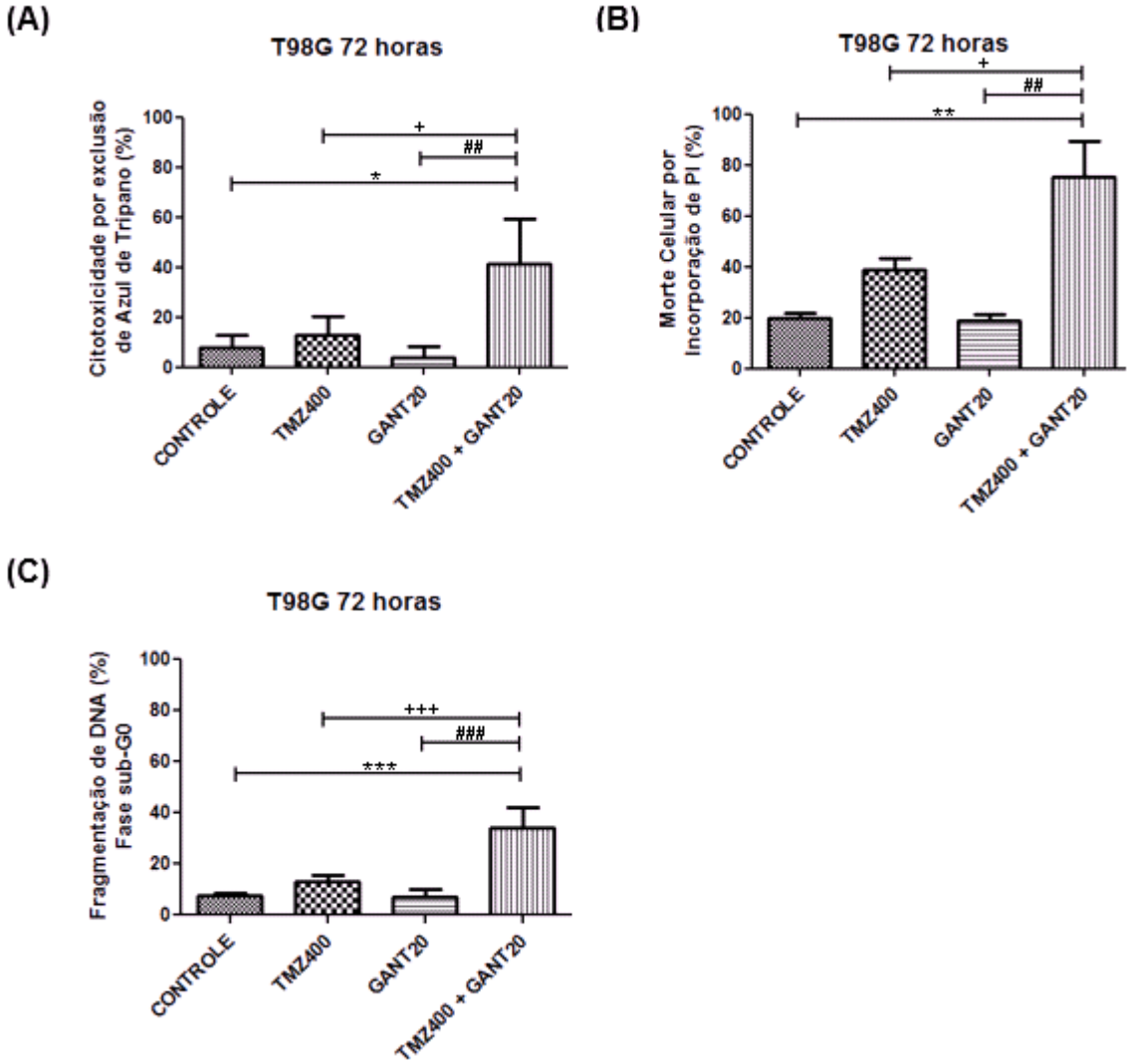


Figura 20: A combinação de TMZ e GANT-61 induz morte celular da linhagem T98G. Células incubadas nas condições CONTROLE (células na presença do veículo), TMZ 400µM, GANT 20µM e TMZ400µM + GANT 20µM durante 72 horas. Após o tempo de incubação as células foram incubadas com Azul de Tripano, ou PI, ou PI e RNAse, durante alguns segundos, 30 minutos e 15 minutos, recpectivamente. Os gráficos são representativos dos eventos de morte quando empregados os fármacos TMZ e GANT-61, em percentual do controle. Em **(A)** observa-se o potencial de citotoxicidade dos fármacos através da técnica de exclusão por Azul de Tripano. As análises em **(B)** e **(C)** foram feitas por citometria de fluxo. Em **(B)** observa-se morte celular por perda da integridade de membrana e incorporação de PI. E em **(C)** foi avaliado o ciclo celular por incubação das células com PI e RNAse, e observa-se a fragmentação de DNA em sub-G0. Teste estatístico One-way ANOVA com teste de Tukey. Os símbolos *(P<0,05), **(P<0,01) e ***(P<0,001) representam a significância em relação ao controle, +(P<0,05) e +++(P<0,001) em relação ao grupo TMZ400 e ##(P<0,01) e ###(P<0,001) em relação ao grupo GANT20. Cada gráfico é representativo de 3 experimentos independentes feitos em quintuplicata, sendo a média±erro padrão da média.

Tabela 5: Valores de significância referentes a figura 20.

% DE SIGNIFICÂNCIA (DIFERENÇA DAS MÉDIAS)			
GRUPOS	**FIGURA 20A**	**FIGURA 20B**	**FIGURA 20C**
CONTROLE x TMZ400	ns	ns	ns
CONTROLE x GANT20	ns	ns	ns
CONTROLE x TMZ400+GANT20	33,73%	55,4%	26,68%
TMZ400 x GANT20	ns	ns	ns
TMZ400 x TMZ400+GANT20	28,33%	36,28%	21,18%
GANT20 x TMZ400+GANT20	37,33%	56,54%	27,08%

Teste estatístico One-way ANOVA com teste de Tukey, P<0,05
ns = não significativo

Como podemos observar na figura 20, quando avaliamos a integridade membranar pelo uso do fluorocrômo PI, por citometria, há uma maior quantidade de células mortas nos grupos TMZ400+GANT20 e TMZ400, quando comparado ao uso da técnica de exclusão por Azul de Tripano. Acreditamos que esta diferença ocorreu, porque a técnica Azul de Tripano tenha subestimado a proporção de células com a membrana comprometida, uma vez que o tempo de incubação com o corante foi de apenas alguns segundos conforme o protocolo. Enquanto que o tempo de exposição ao flurocrômo PI é de 15 minutos (Arruda *et al.,* 2010).

Podemos observar também na figura 20, que o tratamento com TMZ400+GANT20 diminiui significativamentea integridade membranar e aumentou consideravelmentea fragmentação do DNA, quando comparado aos demais grupos. Sugerindo que a fragmentação de DNA esteja intimamente relacionada aos eventos de morte programada tipo I (apoptose), uma vez que os outros tipos de morte, como por autofagia por exemplo, que já foram associados ao uso de TMZ ou GANT-61, não apresentam fragmentação do material genético (Kondo *et al.*, 2005).

Recentemente foi demonstrado que o tratamento de linhagens de câncer de mama com GANT-61, foi capaz de reduzir a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 favorecendo a ativação dos mecanismos de apoptose, que incluem a fragmentação do material genético (Wang *et al.,* 2016). Estes resultados nos sugerem mais uma vez que o aumento da fragmentação do DNA,

observados na figura 20C, possa ser devido à apoptose, entretanto este mecanismo ainda será alvo de estudo por nosso grupo no futuro.

Com relação a perda significativa de integridade membranar observada na figura 20 (A e B) durante o tratamento com TMZ400+GANT20, acreditamos se tratar de um evento tardio, fruto do rompimento dos corpos apoptóticos, uma vez que *in vivo* não é observado perda de integridade membranar durante a apoptose, já que os corpos formados são precocemente fagocitados (Solá *et al.*, 2001).

5. CONCLUSÕES

- ✓ A inibição da via de Shh potencializa a ação de TMZ através do efeito citotóxico pela produção de EROs na linhagem T98G, o que consequentemente desencadeia formação de organelas ácidas induzindo a morte celular.
- ✓ A linhagem GBM11 se mostrou bastante resistente aos tratamentos testados, sugerindo que esta linhagem possui mecanismos mais eficazes de escape, que precisam ser elucidados.
- ✓ Os resultados sugerem que o uso combinado de TMZ e GANT-61 seja uma potencial estratégia para o tratamento de alguns subtipos de GBMs.

6. PERSPECTIVAS

Com o objetivo de melhor entender os mecanismos moleculares da inibição da via de Shh na potencialização da ação de TMZ, realizaremos alguns ensaios confirmatórios de apoptose através da imunomarcação para caspase 3 ativada, e imunomarcação para a proteína LC3, marcadora de autofagia. Para tal, a linhagem T98G será incubada nas condições controle, TMZ400, GANT20 e TMZ400+GANT20 durante 72 horas. Pretendemos também realizar a quantificação das imunofluorescências para avaliar a expressão de Gli-1 e Vimentina, bem como do marcador proliferativo Ki67, que se encontram nos resultados preliminares da seção 6.1, assim como concluir o número de ***n*** necessários para estas análises. Pretendemos ainda realizar ensaios de

imunofluorescência para o receptor Ptch da via de Shh e para os marcadores do estado tronco Oct-4 e Sox-2, e RT-PCR para os mesmos marcadores.

6.1. Resultados Preliminares

6.1.1. Ensaios de imunofluorescência para expressão de Gli-1 e Vimentina

Sabemos que o fator de transcrição Gli-1 é um dos principais efetores da via de Shh, sendo responsável pela transcrição de genes importantes para a manutenção do estado tronco durante a embriogênese, como Oct-4, Nanog e Sox-2 (Sasaki *et al.,* 1997; Liu *et al.,* 2013). Na tumorigênese, quando Shh volta a ser positivamente modulada, observamos uma expressão acentuada de Gli-1, bem como dos genes que ele transcreve (Lo *et al.,* 2009). Como demonstrou Lo e colaboradores em 2009, a expressão de Gli-1 esta proporcionalmente relacionada ao grau de resistência de uma linhagem celular ao tratamento com TMZ (Lo *et al.,* 2009). Sabendo disso, decidimos averiguar a expressão de Gli-1 na linhagem T98G, descrita por sua resistência à TMZ, bem como verificar os efeitos da inibição de Shh sobre este fator de transcrição.

Ainda, os tumores do SNC são conhecidos por superexpressar a proteína vimentina, membro mais abundante da família dos filamentos intermediários, conhecida por manter a integridade celular e proteger as células saudáveis de agentes estressores. A expressão de vimentina tem sido associada ao crescimento tumoral e ao mau prognóstico do paciente, bem como apontada como um marcador importante da transição epitélio mesenquimal (EMT) (Satelli e Li, 2011). A EMT é um processo biológico em que uma célula epitelial ao sofrer modificações moleculares e morfológicas adquire perfil de célula mesenquimal, cuja capacidade de migração, invasão e resistência quimioterápica é maior (Kalluri e Weinberg, 2009). Visto que a ativação de Shh tem sido apontada como um dos agentes promotores da EMT (Islam *et al.,* 2015), decidimos verificar a expressão de vimentina na linhagem T98G, bem como avaliar os efeitos da inibição de Shh, em combinação com a TMZ, sobre a expressão de vimentina.

Para ambas as marcações, as células da linhagem T98G foram incubadas nas condições controle, TMZ400, GANT20 e TMZ400+GANT20 durante 72 horas. Após esse tempo, a linhagem foi fixada com PFA e imunomarcada com os anticorpos contra Gli-1 e Vimentina. As células foram então fotografadas (figura

21) em microscópio de fluorescência Leica DMi8 no aumento de 63x. Pretendemos quantificar as marcações da imunofluorescência para que os resultados possam ser adequadamente discutidos.

Baseado na literatura, esperamos observar em nosso grupo controle acentuada expressão citoplasmática de Gli-1 e vimentina, e nuclear de Gli-1, visto que ambos tem tido sua expressão associada à linhagens resistentes ao tratamento quimioterápico, como a T98G (Lo *et al.,* 2009; Sun *et al.,* 2012). Esperamos que o tratamento com GANT20 promova um acúmulo de Gli-1 no núcleo, atestando o efeito do fármaco em modular negativamente a via de Shh (Lauth *et al.,* 2007). No grupo TMZ400+GANT20, esperamos observar células que expressem Gli-1 e vimentina de forma acentuada, uma vez que as células sobreviventes ao tratamento neste grupo parecem pertencer a um *pool* de resistência.

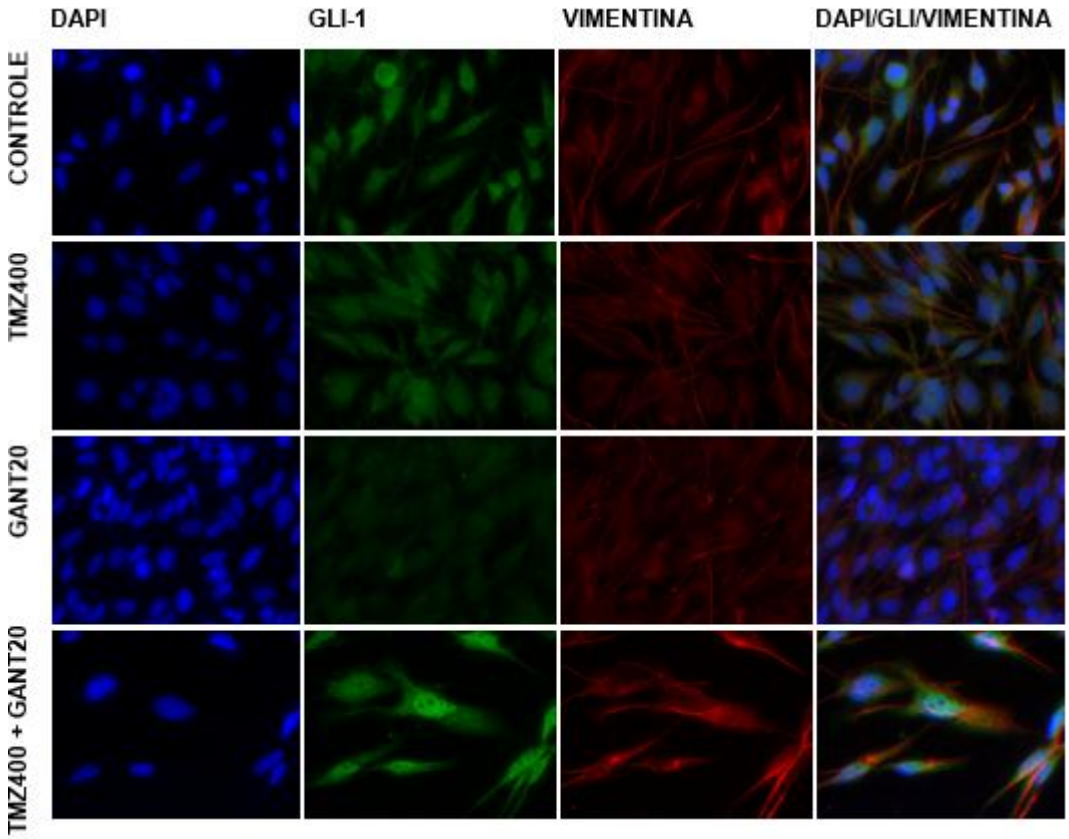


Figura 21: Imunofluorescência da linhagem T98G com anticorpos contra Gli-1 e Vimentina. Células da linhagem T98G foram incubadas nas condições CONTROLE (células na presença do veículo), TMZ 400µM, GANT 20µM e TMZ400µM + GANT 20µM durante 72 horas. Após este tempo as células foram imunomarcadas com anticorpos contra Gli-1 e Vimentina, e fotografadas em microscópio de fluorescência Leica DMi8 no aumento de 63x. Nas fotos observamos a expressão de Gli1 e Vimentina para cada um dos grupos de tratamento.

6.1.2. Ensaios de imunofluorescência para expressão do marcador proliferativo Ki67

O descontrole da proliferação celular é uma anormalidade fundamental observada durante o processo de tumorigênese, ocorrendo através de diversas alterações genéticas, as vezes em uma única célula, que passa a proliferar excessivamente (Cooper, 2000). Recentemente, alguns marcadores como o Ki67 tem sido utilizados para avaliar o prognóstico de pacientes portadores de glioma, estando associado ao grau de malignidade (Chen *et al.,* 2015; Qu *et al.,* 2014). Este marcador esta presente em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0, e sua expressão é um indicativo de progressão tumoral (Scholzen e Gerdes, 2000).

Já se sabe que a modulação positiva da via de Shh é capaz de induzir a proliferação de diversos tipos celulares durante o desenvolvimento embrionário (Mill *et al.,* 2005), e que a reativação desta via na tumorigênese é responsável pela progressão do tumor através de mecanismos de proliferação (Mill *et al.,* 2005; Li *et al.,* 2015). Em 2013, Viel e colaboradores demonstraram que células tumorais sensíveis e resistentes tratadas com TMZ tiveram a expressão de Ki67 reduzida (Viel *et al.,* 2013). Visto isso, decidimos avaliar se a inibição da via de Shh por GANT-61 seria capaz de potencializar os efeitos da TMZ sobre a proliferação celular.

Para tal, as células da linhagem T98G foram incubadas nas condições controle, TMZ400, GANT20 e TMZ400+GANT20 durante 72 horas. Após esse tempo, a linhagem foi fixada com PFA e imunomarcada com anticorpo contra Ki67. As células foram então fotografadas (figura 22) em microscópio de fluorescência Leica DMi8 no aumento de 63x. Pretendemos quantificar as marcações da imunofluorescência para que os resultados possam ser adequadamente discutidos.

Baseado na literatura, esperamos encontrar uma quantidade menor de células imunomarcadas para Ki67 no grupo TMZ400 em relação ao controle, como demonstrou Viel e colaboradores em 2013. Esperamos também que a incubação com GANT20, ao inibir a via de Shh, leve a redução da transcrição de genes responsáveis pelos eventos proliferativos, como Oct4 e Sox2, reduzindo a expressão de Ki67 (Moshai *et al.,* 2014). Entretanto, acreditamos que haja alguma expressão de Ki67 nas células que restaram no grupo TMZ400+GANT20, por se

tratar de um *pool* de células que não responderam ao tratamento, possivelmente resistentes, apesar de sabermos que as células tronco normalmente proliferam mais lentamente.

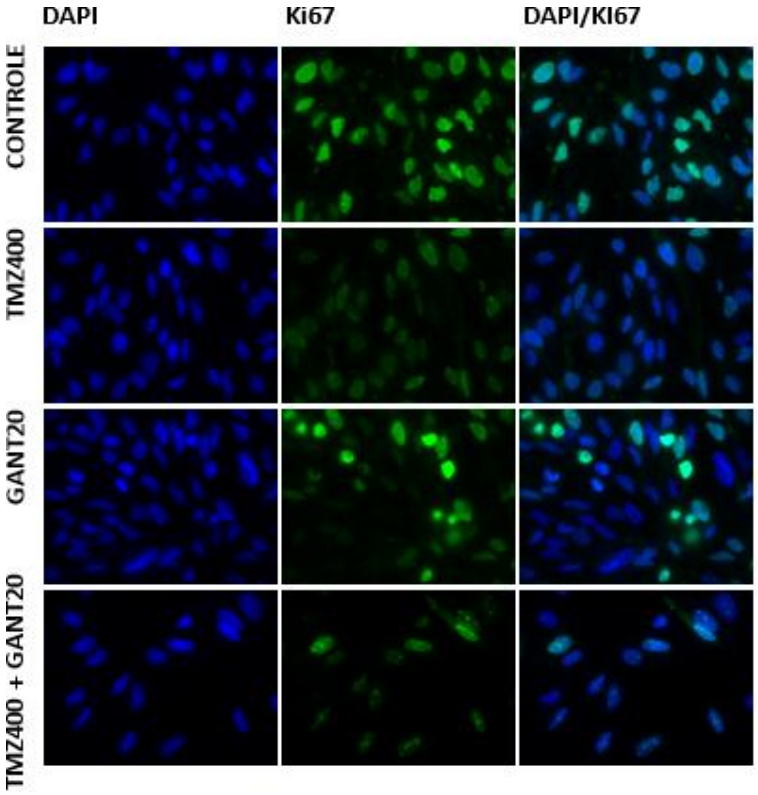


Figura 22: Imunofluorescência da linhagem T98G com anticorpo contra Ki67 para avaliar proliferação celular. Células da linhagem T98G foram incubadas nas condições CONTROLE (células na presença do veículo), TMZ 400µM, GANT 20µM e TMZ400µM + GANT 20µM durante 72 horas. Após este tempo as células foram imunomarcadas com anticorpo contra Ki67, e fotografadas em microscópio de fluorescência Leica DMi8 no aumento de 63x. Nas fotos observamos a expressão de Ki67 para cada um dos grupos de tratamento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agyeman A, Jha BK, Mazumdar T, Houghton JA. Mode and specificity of binding of the small molecule GANT-61 to GLI determines inhibition of GLI-DNA binding. **Oncotarget.** 2014. 5(12):4492-503.

2. Ajani JA, Song S, Hochster HS, Steinberg IB. Cancer stem cells: the promise and the potential. **Semin Oncol.** 2015; 42(suppl 1):S3-S17.

3. Alves TR, Lima FR, Kahn SA, Lobo D, Dubois LG, Soletti R, Borges H, Neto VM. Glioblastoma cells: a heterogeneous and fatal tumor interacting with the parenchyma. **Life Sci.** 2011. 89:532-9

4. Arruda RL, Orro IR, Passos TS, Costa e Silva EV, Zúccari CESN. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. **Rev Bras Reprod Anim.** 2010. v.34, n.3, p.168-184.

5. Balça-Silva J, Matias D, do Carmo A, Girão H, Moura-Neto V, Sarmento-Ribeiro AB, Lopes MC. Tamoxifen in combination with temozolomide induce a synergistic 2 inhibition of PKC-pan in GBM cell lines. **Biochim Biophys Acta.** 2014. 10.1016/j.bbagen.2014.12.022

6. Barciszewska A, Gurda D, Głodowicz P, Nowak S, Naskręt-Barciszewska MZ. A New Epigenetic Mechanism of Temozolomide Action in Glioma Cells. 2015. **PLoS One.** 10(8): e0136669.

7. Beranek DT. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. **Mutat Res.** 1990. 231(1):11-30

8. Biswas NK, Chandra V, Sarkar-Roy N, Tapojyoti D, Bhattacharya RN, Tripathy LN, Basu SK, Kumar S, Das S, Chatterjee A, Mukherjee A, B Pryiadarshi, Maitra A, Chattopadhyay A, Basu A, Dhara S. Variant allele frequency enrichment analysis in vitro reveals sonic hedgehog pathway to impede sustained temozolomide response in GBM. **Can Genom.** 2015.

9. Borges-Osório MR, Robinson WM. Genética Humana. 2013. 3ºed. Porto Alegre, Artmed.

10. Boyle ST, Kochetkova M. Breast Cancer Stem Cells and the Immune System: Promotion,Evasion and Therapy. **J Mammary Gland Biol Neoplasia.** 2014.

11. Braun S, Oppermann H, Mueller A, Renner c, Hovhannisyan A, Baran-Schmidt R, Gebhardt R, Hipkiss A, Thiery J, Meixensberger J, Gaunitz F.

Hedgehog signaling in glioblastoma multiforme. **Cancer Biol Ther.** 2012. Vol. 13, Iss.

12. Cancer Biology & Therapy Vol. 13 , Iss. 7,2012

13. Bruce WR, van der Gaag H. A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. **Nature**. 1963. 199:79-80.

14. Buckner JC. Factors influencing survival in high-grade gliomas. **Semin Oncol.** 2003. 10.1053

15. Cavicchioli, ME. et al. Activation of sonic hedgehog signaling in oral squamous cell carcinomas: a preliminary study. **Hum Pathol.** 2011. v. 42, n. 10, p. 1484-1490.

16. Chen Y, Sims-Mourtada J, Izzo J, Chao KSC. Targeting the Hedgehog Pathway to Mitigate Treatment Resistance. **Cell Cycle.** 2007. 6:15, 1826-1830, 10.4161

17. Chen, X. et al. Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: it's inhibition leads to growth suppression and apoptosis. **Cancer Sci.** 2007. v. 98, p. 68-76.

18. Chen WJ, He DS, Tang RX, Ren FH, Chen G. Ki-67 is a valuable prognostic factor in gliomas: evidence from a systematic review and meta-analysis. **Asian Pac J Cancer Prev.** 2015. 16(2):411-20.

19. Cherepanov SA, Cherepanova KI, Grinenko NF, Antonova OM, Chekhonin VP. Effect of Hedgehog Signaling Pathway Activation on Proliferation of High-Grade Gliomas. **Bull Exp Biol Med.** 2016. 161(5):674-678.

20. Choudhry Z, Rikani AA, Choudhry AM, Tariq S, Zakaria F, Asghar MW, Sarfraz MK, Haider K, Shafiq AA, Mobassarah NJ. Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. **Ann Neurosci.** 2014. 21:28-31

21. Circu ML, Aw TY. Reative oxygen species, cellular redox and apoptosis. **Free Radic Biol Med.** 2010. 48(6): 749–762.

22. Cohen, MM. Hedgehog signaling update. **Am J Med Genet.** 2010. 10.1002

23. Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW, Yates AJ, Pearl DK. Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. **Cancer.** 1997. 79, 1381-1393.

24. Cooper GM. The Cell, a molecular approach. 2000. Boston, 2 ed. 10: 0-87893-106-6

25. Corsa P, Parisi S, Raguso A, Troiano M, Perrone A, Cossa S, Munafò T, Piombino M, Spagnoletti G, Borgia F. Temozolomide and radiotherapy as first-line treatment of high-grade gliomas. **Tumori.** 2006. 92(4):299-305.

26. Daumas-Duport C, Beuvon F, Varlet P, Fallet-Bianco C. Gliomes: classifications de l'OMS et de l'Hôpital Sainte-Anne. **Ann Pathol.** 2000. 5:413-428.

27. Deshmukh A, Deshpande K, Arfuso F, Newsholme P, Dharmarajan A. Cancer stem cell metabolism: a potential target for cancer therapy. **Mol Cancer.** 2016. 15:69, 10.1186

28. Dick JE, Wang JCY. Cancer stem cells: lessons from leukemia. Elsevier. 2005. Vol.15 No.9

29. Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Tumor Cerebral no Adulto. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, CONITEC. 2014.

30. Dubois LG, Campanati L, Righy C, D'Andrea-Meira I, Spohr TC, et al. Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier. **Front Cell Neurosci.** 2014. 8:418

31. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. **N Engl J Med.** 2000. v. 9; 343(19); p. 1530-4.

32. Ferreira NF, Barbosa M, Amaral LLF, Mendonça RA, Lima SS. Magnetic resonance imaging in 67 cases of glioblastoma multiforme and occurrence of metastases. **Arq Neuro-Psiquiatr.** 2004. vol.62 no.3a, 10.1590

33. Filippi-Chiela EC, Thomé MP, Bueno e Silva MM. Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells. **BMC Cancer.** 2013. 13: 147–147.

34. Gatta G, Mazza E, Reni M, Zanon S. Central nervous system gliomas. State of the Art Oncology in Europe. 2016.

35. Goellner EM, Grimme B, Brown AR, Lin YC, Wang XH, Sugrue KF, Mitchell L, Trivedi RN, Tang JB, Sobol RW. Overcoming temozolomide resistance in glioblastoma via dual inhibition of NAD+ biosynthesis and base excision repair. **Cancer Res.** 2011. 71(6):2308-17.

36. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **J of Pathol.** 2010. 221(1), pp.3–12.

37. Golestaneh N, Mishra B. TGF-beta, neuronal stem cells and glioblastoma. **Oncogene.** 2005. 24: 5722-5730.

38. Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K. Targeting the Hedgehog signaling pathway in cancer: beyond Smoothened. **Oncotarget.** 2015. 6(16): 13899–13913.

39. Gorlin, R.J. Nevoid basal cell carcinoma syndrome. **Clin Dermatol.** 1995. v. 13, n. 1, p.113-125.

40. Grindley, JC. Evidence for the involvement of the Gli gene family in embryonic mouse lung development. **Dev Biol.** 1997. v. 188, n. 2, 337348.

41. Gupta S, Takebe N, LoRusso P. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. **Ther Adv Med Oncol.** 2010. 2(4) 237-250. 10.1177

42. Hahn, H. et al. Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. **Cell.** 1996. v. 85, p. 841-851.

43. Hanna A, Shevde LA. Hedgehog signaling: modulation of cancer properies and tumor mircroenvironment. **Mol Cancer.** 2016. 10.1186

44. Hardcastle, Z. The Shh signaling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. **Dev.** 1998. v. 125, p. 2803-2811.

45. Heussler HS, Suri M. Sonic hedgehog. **J Clin Pathol.** 2003. 56:129–13

46. Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz DL, Klein TE, Altman RB.Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). **Pharmacogenet Genom.** 2011. 21(3):152-61.

47. Hui CC, Angers S. Gli proteins in development and disease. **Annu Rev Cell Dev Biol**. 2011. 27:513-37, 10.1146

48. Ingham PW, Placzek M. Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. **Nat Rev Genet.** 2006. 7:841-850.

49. Ingham, PW; Mcmahon, AP. Hedgehog signaling in anima development: paradigms and principles. **Genes Dev.** 2001. v. 15, n. 23, p. 3059-3087.

50. INCA: Câncer do Sistema Nervoso Central. 2016. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp. Acesso em 25 de Janeiro de 2016.

51. Islam SS, Mokhtari RB, Noman AS, Uddin M, Rahman MZ, Azadi MA, Zlotta A, van der Kwast T, Yeger H, Farhat WA. Sonic Hedgehog (Shh) Signaling

Promotes Tumorigenicity and Stemness via Activation of Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in Bladder Cancer. **Mol Carcinog.** 2015. 0.1002

52. Jiao G, He X, Li X, Qiu J, Xu H, Zhang N, Liu S. Limitations of MTT and CCK-8 assay for evaluation of graphene cytotoxicity. **RSC Adv.** 2015. 53240-53244

53. Jimenez-Sanchez M, Menzies FM, Chang Y, Simecek N, Neufeld TP, Rubinsztein DC. The Hedgehog signalling pathway regulates autophagy. **Nat Commun.** 2012. 3, 10.1038

54. Kahlert UD, Mooney SM, Natsumeda M, Steiger HJ, Maciaczyk J. Targeting cancer stem-like cells in glioblastoma and colorectal cancer through metabolic pathways. **Int J Cancer.** 2016. 140(1):10-22, 10.1002

55. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest.** 2009. 119:1420-8.

56. Kanzawa T, Germano IM, Kondo Y, Ito H, Kyo S, Kondo S. Inhibition of telomerase activity in malignant glioma cells correlates with their sensitivity to temozolomide. **Br J Cancer**. 2003. 89(5): 922–929. 10.1038

57. Karhadkar, SS. et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. **Nature.** 2004. v. 431, p. 707-712.

58. Kelles SMB. 2011. Tratamento de glioma de alto grau: temozolomida ou nitrosuréias. Hospital das Clínicas, UFMG.

59. Khan RB, Raizer JJ, Malkin MG, Bazylewicz KA, Abrey LE. A phase II study of extended low-dose temozolomide in recurrent malignant gliomas. **Neuro Oncol.** 2002. 4(1):39-43.

60. Klingbeil MFG. Ação do Viscum album em cultivo celular de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. 161 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia. 2010. Universidade de São Paulo, São Paulo.

61. Knizhnik AV, Roos WP, Nikolova T, Quiros S, Tomaszowski K. Survival and Death Strategies in Glioma Cells: Autophagy, Senescence and Apoptosis Triggered by a Single Type of Temozolomide-Induced DNA Damage. **PLoS ONE**. 2013. 8(1): e55665. 10.1371

62. Kogerman P, Grimm T, Kogerman L, Krause D, Undén AB, Sandstedt B, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. **Nat Cell Biol.** 1999. 1(5):312-9, 10.1038/13031

63. Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. **Nature.** 2005. vol 5, review. 10.1038

64. Kubo, M. et al. Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. **Cancer Res.** 2004. v. 64, p. 6071-6074.

65. Lamers LM, Stupp R, van den Bent MJ, Al MJ, Gorlia T, Wasserfallen JB. Cost-effectiveness of temozolomide for the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme: a report from the EORTC 26981/22981 NCI-C CE3 Intergroup Study. **Cancer.** 2008. 112(6):1337-44.

66. Laurindo FRM, Shah AM, Sauer H. Studies on Cardiovascular Disorders. Springer Science & Business Media, 11 de set de 2010 - 590 páginas

67. Lauth M, Bergström A, Shimokawa T, Toftgård R. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. **Proc Natl Acad Sci.** 2007. 104(20):8455-60.

68. Lee D, Sun S, Zhang XQ, Zhang PD, Ho AS, Kiang KM, Fung CF, Lui WM, Leung GK. MicroRNA-210 and Endoplasmic Reticulum Chaperones in the Regulation of Chemoresistance in Glioblastoma. **J Cancer.** 2015. 6(3): 227–232.

69. Lee ST, Welch KD, Panter KE, Gardner DR, Garrossian M. Cyclopamine: from cyclops lambs to cancer treatment. **J Agric Food Chem.** 2014. 62 (30), pp 7355–7362

70. Li J, Cai J, Zhao S, Yao K, Sun Y, Li Y, Chen L, Li R, Zhai X, Zhang J, Jiang C. GANT-61, a GLI inhibitor, sensitizes glioma cells to the temozolomide treatment. **J Exp Clin Can Res.** 2016. 35:184, 10.1186

71. Li J, Feng J, Liu Y, Ho T, Grimes W, Ho H, Park S, Wang S. BMP-SHH Signaling Network Controls Epithelial Stem Cell Fate via Regulation of Its Niche in the Developing Tooth. **Dev Cell.** 2015. 10.1016

72. Lima FRS, Kahn SA, Soletti R, Biasoli D, Alves T, Fonseca ACC, Garcia C, Romão L, Brito J, Holanda-Afonso R, Faria J, Borges H, Moura-Neto V. Glioblastoma: Therapeutic challenges, what lies ahead. **Biochimica et biophysica acta.** 2012. 1826:338-349

73. Liu A, Yu X, Liu S. Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference. **Chin J Cancer.** 2013. 32(9): 483–487, 10.5732

74. Lo H, Zhu H, Cao X, Aldrich A, Ali-Osman F. A Novel Splice Variant of GLI1 That Promotes Glioblastoma Cell Migration and Invasion. **Cell, Tumor, and Stem Biology.** 2009. 10.1158

75. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **ActaNeuropathol.** 2007. 114, 97-109

76. Magliono P, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. **Nature Rev Cancer.** 2003. 10.1038

77. Marjanovic ND, Weinberg RA, Chaffer CL. Cell plasticity and heterogeneity in cancer. **Clin Chem.** 2013. 59-1, 168-179

78. Mas, C; Altaba, A. Small molecule modulation of HH-GLI signaling: Current leads, trials and tribulations. **Biochem Pharmacol.** 2010. 80, 712–723.

79. Mazumdar T, Sandhu R, Qadan M, DeVecchio J, Magloire V, Agyeman A, Li B, Houghton JA. Hedgehog Signaling Regulates Telomerase Reverse Transcriptase in Human Cancer Cells. **PloS One.** 2013. 8(9): e75253, 10.1371

80. McKee, CM; Xu, D; Cao, Y; Kabraji, S; Allen, D; Kersemans, V; Beech, J; Smart, S; Hamdy, F; Ishkanian, A. Protease nexin 1 inhibits hedgehog signaling in prostate adenocarcinoma. **J Clin Invest.** 2012. 122, 4025–4036.

81. McNeill, KA. Epidemiology of Brain Tumors. **Neurol Clin.** 2016. 10.2016

82. Mendes GA, Ongaratti BR, Pereira-Lima JFS. Epidemiologia de uma série de tumores primários do sistema nervoso central. **Arq Bras Neurocir.** 2014. 33(4): 279-83

83. Meng E, Hanna A, Samant RS, Shevde LA. The Impact of Hedgehog Signaling Pathway on DNA Repair Mechanisms in Human Cancer. **Cancers.** 2015. 7(3), 1333-1348

84. Metha MP, Chang SM, Cuha A, Newton HB, Vogelbaum MA. Principles and Practice of Neuro-Oncology: A multidisciplinary Approach. 2011.

85. Mill P, Mo R, Hu MC, Dagnino L, Rosenblum ND, Hui CC. Shh controls epithelial proliferation via independent pathways that converge on N-Myc. **Dev Cell.** 2005. Aug;9(2):293-303.

86. Mintz B, Fleischman RA. Teratocarcinomas and other neoplasms as developmental defects in gene expression. **Adv Cancer Res.** 1981. 34:211-7

87. Montaldi, APL. Avaliação da resposta celular mediada pelo quimioterápico Temozolomida associada ao inibidor do reparo do DNA Metoxiamina em

linhagens de glioblastoma. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. 2009.

88. Monuki ES. The morphogen signaling network in forebrain development and holoprosencephaly. **J Neuropathol Exp Neurol.** 2007. 66(7):566-75.

89. Moshai EF, meau-Stervinou L, Cigna N, Brayer S, Somme JM, Crestani B, Mailleux AA. Targeting the Hedgehog–Glioma-Associated Oncogene Homolog Pathway Inhibits Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Mice. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 2014. Vol 51, Iss 1, pp 11–25.

90. Moura-Neto V, Campanati L, Pereira CM, Freitas C, Coelho-Aguiar J, Tavares AL, Spohr TCLS, Aguiar D, Kahn SA, Matias D, Balça-Silva J, Pontes B, Porto-Carreiro I, Faria J, Martins RAP, Romão LF, Costa S, Costa F, Lopes MC, Lima FR. Glioblastoma: A hidden side of the astrocyte. In: Glioma Cell Biology, vol. 1 (Mentlein, A. S. a. R., ed). 2014. Vienna: Springer Netherlends Vienna.

91. Munoz JL, Cruz-Rodrigues V, Walker ND, Rameshwar P. Temozolomide resistance and tumor recurrence: Halting the Hedgehog. **Cancer Cell Microenviron.** 2015.

92. Munoz JL, Rodriguez-Cruz V, Ramkissoon SH, Ligon KL, Greco SJ, Rameshwar P. Temozolomide resistance in glioblastoma occurs by miRNA-9-targeted PTCH1, independent of sonic hedgehog level. **Oncotarget.** 2015. 6(2): 1190–1201, 10.18632

93. Mutter N, Stupp R. Temozolomide: a milestone in neuro-oncology and beyond? **Expert Rev Anticancer Ther.** 2006. 6(8):1187-1204.

94. Najman H, Gadelha MIP. Temozolomida. **Rev Bras Cancerol.** 2002. 48(3): 439-44

95. Nanta, R; Kumar, D; Meeker, D; Rodova, M; Van Veldhuizen, PJ; Shankar, S; Srivastava, RK. NVP-LDE-225 (Erismodegib) inhibits epithelial-mesenchymal transition and human prostate cancer stem cell growth in NOD/SCID IL2Rgamma null mice by regulating Bmi-1 and microRNA-128. **Oncogenesis.** 2013. 2, e42.

96. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. **Nature.** 1980. 287, 795 - 801; 10.1038/287795a0

97. Oliva CR, Moellering DR, Gillespie GY, Griguer CE. Acquisition of Chemoresistance in Gliomas Is Associated with Increased Mitochondrial Coupling and Decreased ROS Production. **PLoS ONE.** 2011. 6(9): e24665. 10.1371

98. Ostermann S, Csajka C, Buclin T, Leyvraz S, Lejeune F, Decosterd LA, Stupp R. Plasma and Cerebrospinal Fluid Population Pharmacokinetics of Temozolomide in Malignant Glioma Patients. **Clin Cancer Res.** 2004. Vol. 10, 3728–3736

99. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, Wrensch MR, Barnholtz-Sloan JS. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. **Neuro Oncol.** 2014. 10.1093

100. Pathi S, Pagan-Westphala S, Bakerb DP, Garberd EA, Rayhornb P, Bumcrotc D, Tabina CJ, Pepinskyb RB, William KP. Comparative biological responses to human Sonic, Indian,and Desert hedgehog. **Mech Dev.** 2001. 106, 107-117

101. Pietenpol J, Stewart Z. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. **Toxicology.** 2002. 181-182, 475-481.

102. Qiu ZK, Shen D, Chen YS, Yang QY, Guo CC, Feng BH, Chen ZP.Enhanced MGMT expression contributes to temozolomide resistance in glioma stem-like cells. **Chin J Cancer.** 2014. 33(2):115-22.

103. Qu DW, Xu HS, Han XJ, Wang YL, Ouyang CJ. Expression of Cyclin D1 and Ki-67 proteins in gliomas and its clinical significance. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** 2014. 8:516-519

104. Quijada L, Callejo A, Torroja C, Guerrero I. The Patched Receptor: Switching On/Off the Hedgehog Signaling Pathway. Madame Curie Bioscience Database [Internet]. NCBI Bookshelf. 2013.

105. Rimkus TK, Carpenter RL, Qasem S, Chan M, Lo H. Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothened and GLI Inhibitors. **Cancers.** 2016. 10.3390

106. Rocha CRR. 2015. Mecanismos de Resistência à quimioterápicos em células tumorais. Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, USP/Instituto Butantan, São Paulo.

107. Rossi M, Magnoni L, Miracco C, Mori E, Tosi P, Pirtoli L, Tini P, Oliveri G, Cosci E, Bakker A. β-catenin and Gli1 are prognostic markers in glioblastoma. **Cancer Biol Ther.** 2011. 11(8):753-61.

108. Roth W, Wild-Bode C, Platten M, Grimmel C, Melkonyan HS, Dichgans J. Secreted Frizzled-related protein inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells. **Oncogene.** 2000. 19: 4210-4220.

109. Rubin LL, de Sauvage FJ. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. Nat **Rev Drug Discov.** 2006. 5, 1026–1033.

110. Ruiz i Altaba A, Sánchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. **Nat Rev Cancer.** 2002. 2(5):361-72. Review

111. Ruiz i Altaba A. Hedgehog signaling and the Gli code in stem cells, cancer, and metastases. **Sci Signal.** 2011. 4 (200): pt9. 10.1126

112. Ryu CH, Yoon WS , Park KY, Kim SM, Lim JY, Woo JS, Jeong CH, Ho Y, Jeun S. Valproic Acid Downregulates the Expression of MGMT and Sensitizes Temozolomide-Resistant Glioma Cells. **J Biomed Biotechnol.** 2012. 10.1155

113. Santoni M, Burattini L, Nabissi M, Morelli MB, Berardi R, Santoni G, Cascinu S. Essential role of Gli proteins in glioblastoma multiforme. **Curr Protein Pept Sci.** 2013. 14(2):133-40.

114. Santos DVV, Junior JAPD, Vasconcelos MA. Detecção de atividade de fosfatase ácida nos hemócitos de Biomphalaria glabrata (Gastropoda: Planorbidae): um estudo em moluscos da Região Amazônica, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude.** 2015. v.6 n.1. 2176-6223

115. Sarkaria JN, Kitange GJ, James CD, Plummer R, Calvert H, Weller M, Wick W. Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma. **Clin Cancer Res.** 2008. 14: 2900–2908

116. Sasaki H, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H. A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. **Development.** 1997. 124 (7): 1313–22.

117. Satelli A, Li S. Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy Or Vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy. **Cell Mol Life Sci.** 2011. 68(18): 3033–3046, 10.1007

118. Scales, SJ.; de Sauvage, FJ. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. **Trends Pharmacol Sci.** 2009. 30, 303–312.

119. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J Cell Physiol.** 2000. 182(3):311-22.

120. Seppala M, Depew MJ, Martinelli DC, Fan C, Sharpe PT, Cobourne MT. Gas1 is a modifier for holoprosencephaly and genetically interacts with sonic hedgehog. **J Clin Invest.** 2007. 117(6):1575-1584. 10.1172

121. Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. **Cell.** 2009. 138:822–9.

122. Shaw EG, Seiferheld W, Scott C, Coughlin C, Leibel S, Curran W, Mehta M. Reexamining the radiation therapy oncology group (RTOG) recursive partitioning analysis (RPA) for glioblastoma multiforme (GBM) patients. **Int J Radiat Oncol.** 2003. 57 (2): S135–6.

123. Shi X, Zhang Y, Zheng J, Pan J. Reactive Oxygen Species in Cancer Stem Cells. **Antioxid Redox Signal.** 2012. 16(11): 1215–1228. 10.1089

124. Sicklick, JK. Dysregulation of the hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis.** 2006. v. 27, p. 748-757.

125. Solá S, Pedro T, Ferreira H, Rodrigues CMP. Apoptose: Uma questão de vida ou morte. Centro de Patogénese Molecular, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. 2001.

126. Sousa LF, Cristofaro LF di, Serafim RB, Netto RP, Souza F de O, Soares CP, Valente V. A resistência das células T98G e U87MG à temozolamida está correlacionada com a expressão de genes de reparo de DNA. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** 2015. 36(2):213-218

127. Stanton, BZ; Peng, LF. Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway. **Mol Biosyst.** 2010. 6, 44–54.

128. Stathopoulos A, Iber D. Studies of morphogens: keep calm and carry on. **Development.** 2013. 140(20): 4119–4124. 10.1242

129. Stupp R, Mason WP, Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **N Engl J Med**. 2005. 352:987-996, 10.1056

130. Sun S, Wong TS, Zhang XQ, Pu JK, Lee NP, Day PJ, Ng GK, Lui WM, Leung GK. Protein alterations associated with temozolomide resistance in subclones of human glioblastoma cell lines. **J Neurooncol.** 2012. 107(1):89-100

131. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. **Methods Mol Biol.** 2008. 445:77-88.

132. Teglund, S; Toftgard, R. Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. **Biochim Biophys.** 2010. 181–208.

133. Tiligada E. Chemotherapy: induction o**f** stress responses. **Endocr Relat Cancer.** 2006. 1:s115-24

134. Tsao MN, Mehta MP, Whelan TJ, Morris DE, Hayman JA, Flickinger JC. The American Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ASTRO) evidence-based review of the role of radiosurgery for malignant glioma. **Int J Radiat Oncol.** 2005. 1;63(1):47-55.

135. Tumours of the central nervous system. Disponível em <pubcan.org/printicdotopo.php?id=4938>. Acesso em 02 de Fevereiro de 2017.

136. Viel T, Schelhaas S, Wagner S, Wachsmuth L, Schwegmann K, Kuhlmann M, Faber C, Kopka K, Schäfers M, Jacobs AH. Early Assessment of the Efficacy of Temozolomide Chemotherapy in Experimental Glioblastoma Using [18F]FLT-PET Imaging. **PLos One.** 2013. 8(7): e67911.

137. Wang T, Pickard AJ, Gallo JM. Histone methylation by Temozolomide; A Classic DNA methylating anticancer drug. **Anticancer Res.** 2016. 36: 3289-3300

138. Wang X, Wei S, Zhao Y, Shi C, Liu P, Caiqin Zhang C, Lei Y, Zhang B, Bai B, Huang Y, Zhang H. Anti-proliferation of breast cancer cells with itraconazole: hedgehog pathway inhibition induces apoptosis and autophagic cell death. **Cancer Lett.** 2016. S0304-3835(16)30665-6. 10.1016

139. Wang Y, Han C, Lu L, Magliato S, Wu T. Hedgehog Signaling Pathway Regulates Autophagy in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. **Hepatol.** 2013. 58(3): 995–1010.

140. Wang W, Quan Y, Fu Q, Liu Y, Liang Y, Wu J, Yang G, Luo C, Ouyang Q, Wang Y. Dynamics between cancer cell subpopulations reveals a model coordinating with both hierarchical and stochastic concepts. **Plos One.** 2014. Jan 9;9(1):E84654

141. Watkins, DN. et al. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. **Nature.** 2003. v. 422, p. 313-317.

142. Weidberg H, Shpilka T, Shvets E, Abada A, Shimron F, Elazar Z. LC3 and GATE-16 N termini mediate membrane fusion processes required for autophagosome biogenesis. 2011. **Dev Cell.** 19;20(4):444-54.

143. Wood, W; Jacinto, A. Drosophila melanogaster embryonic haemocytes: masters of multitasking. **Nature Rev Mol Cell Biol.** 2007. 8, 542-551. 10.1038

144. Yousefi S, Simon H. Autophagy in cancer and chemotherapy. **Results Probl Cell Differ.** 2009. 49:183-90

145. Zhang Z, Wang J, Shen Y, Guo C, Sai K, Chen F, Mei X, Han F, Chen Z. Dihydroartemisinin increases temozolomide efficacy in glioma cells by inducing autophagy. **Oncol Lett.** 2015. (1):379-383.

146. Zheng X, Zeng W, Gai X, Xu Q, Li C, Liang Z, Tuo H, Liu Q. Role of the Hedgehog pathway in hepatocellular carcinoma. **Oncol Rep.** 2013. Volume 30, Issue 5. 2020-2026

147. Zhu H, Lo H. The Human Glioma-Associated Oncogene Homolog 1 (GLI1) Family of Transcription Factors in Gene Regulation and Diseases. **Curr Genomics.** 2010. 11, 238-245.

148. Zou Y, Wang Q, Li B, Xie B, Wang W. Temozolomide induces autophagy via ATM-AMPK-ULK1 pathways in glioma. **Mol Med Rep.** 2014. 10(1):411-6. doi: 10.3892