Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Biologia

"Avaliação dos efeitos antitumorais da inibição *in vitro* do fator de transcrição AP-1 por DTCM-g em glioblastoma adulto e pediátrico"

Gabriela Molinari Roberto

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ribeirão Preto – SP
2014

Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Biologia

"Avaliação dos efeitos antitumorais da inibição *in vitro* do fator de transcrição AP-1 por DTCM-g em glioblastoma adulto e pediátrico"

Gabriela Molinari Roberto

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dr. María Sol Brassesco Annichini

Ribeirão Preto – SP
2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Roberto, Gabriela Molinari

Avaliação dos efeitos antitumorais da inibição *in vitro* do fator de transcrição AP-1 por DTCM-g em glioblastoma adulto e pediátrico. Ribeirão Preto, 2014

Monografia apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética

Orientadora: Brassesco, María Sol Annichini

1. Glioblastoma. 2. AP-1. 3. DTCM-g.

P A R E C E R

O trabalho de Conclusão de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas que se intitula "**Avaliação dos efeitos antitumorais da inibição *in vitro* do fator de transcrição AP-1 por DTCM-g em glioblastoma adulto e pediátrico**"

A aluna obteve a nota ( ) com distinção e louvor.

Ribeirão Preto, de Novembro de 2014.

Prof. Dra. María Sol Brassesco Annichini

Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dra. Jaqueline Carvalho de Oliveira

Prof. Dra. Maria Helena de Souza Goldman

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo n° 2013/23239-9).

- Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP.

- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP e Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Eliana e Giuseppe e as minhas
irmãs Daniela, Laera Giulia e Luiza
por todo o seu apoio e amor
incondicional.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a **Deus** por sua presença constante, sempre me iluminando nos momentos de indecisão e desânimo.

À minha orientadora **Profª Drª María Sol Brassesco Annichini**, grande responsável pelo meu crescimento profissional. Obrigada pela orientação cuidadosa, confiança e todos os momentos agradáveis compartilhados.

Ao **Profº Dr Luiz Gonzaga Tone** pela oportunidade de participar da sua equipe provendo toda infraestrutura para o desenvolvimento dos meus projetos.

Ao **Departamento de Puericultura e Pediatria** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo apoio prestado **ao Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular**, onde realizei meus experimentos.

À **Fundação de Apoio do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

Às técnicas do laboratório de Citogenética do Departamento de Puericultura e Pediatria **Aide Barbosa**, **Sônia Scandusi** e à secretária do Laboratório de Puericultura e Pediatria **Evelise Visconte** pelo apoio e convivência.

À **Julia Alejandra Pezuk** e a **Profª Dra Jaqueline Carvalho de Oliveira** por me incentivarem e ajudarem em diversas situações ao longo da minha iniciação científica.

As minhas grandes companheiras **Lara** e **Lenisa** que estiveram sempre ao meu lado durante toda a caminhada da graduação, tanto nos bons momentos quanto nos ruins. Vocês tornam os desafios mais fáceis de serem cumpridos.

Aos meus amigos da futura Casa F e da vida, **Gabi, Marcela, Rodrigo, Guilherme, Karina** e **Giovanna** pelos melhores momentos no fluxo e na sala de estudo. Vocês são minha alegria nos dias de trabalho duro!

Aos meus colegas do laboratório **Mirella, Carol, Paola, Régia, Pâmela, Veridiana, Rosane, Vanessa, Gustavo, Kleiton, Daniel, Augusto, Maurício e Caio** pela amizade e por todo conhecimento compartilhado ao longo dessa etapa da minha vida.

Aos meus queridos pais, **Eliana** e **Giuseppe** que sempre me incentivaram a seguir os meus sonhos e suportaram toda as minhas crises com muito amor e dedicação. E as minhas irmãs **Daniela**, **Laera Giulia** e **Luiza** por sempre estarem do meu lado.

A minha madrinha**, Adrianne Palanch** por me mostrar a beleza da Biologia. Este é o resultado de todas as vezes que me levou quando criança para o passar o dia no seu laboratório.

A minha irmã de coração **Thairine**, pela amizade e paciência. Obrigada por sempre me apoiar e apreciar a beleza do meu trabalho mesmo sem entender nada do que eu faço.

A companhia da minha **avó Laura** e do meu **nono Domenico** durante as noites em que fiquei escrevendo este trabalho e a **todos os meus familiares** que estão sempre na torcida pelo meu sucesso.

Aos meus grandes amigos da **BIO47** que me acompanharam por todas as longas aulas e aventuras nos últimos cinco anos e também a toda a **BIO48** que me adotou e fez o meu último ano de graduação muito mais bonito.

A **todos** que de alguma modo me apoiaram e contribuíram para a realização desse trabalho.

"I had no specific bent toward science until my grandfather died of stomach cancer. I decided that nobody should suffer that much"

Gertrude B. Elion

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido"

Marie Curie

RESUMO

“Avaliação dos efeitos antitumorais da inibição *in vitro* do fator de transcrição AP-1 por DTCM-g em glioblastoma adulto e pediátrico”.

O Glioblastoma (GBM) é um tumor maligno que atinge o sistema nervoso central (SNC) e representa 50% dos tumores cerebrais em adultos sendo sua ocorrência em crianças mais rara (9%). Apesar dos avanços terapêuticos, a sobrevida dos pacientes permanece baixa em torno de um ano. A dificuldade no combate desse câncer se deve em grande parte à natureza invasora do tumor e a sua resistência ao tratamento quimioterápico convencional. Sendo assim, torna-se essencial a procura por novos alvos terapêuticos. Um importante ponto de convergência das vias envolvidas nos processos de proliferação, apoptose e invasão é representado pelo fator de transcrição AP-1. Em GBM, a subunidade c-Jun deste fator é encontrada hiperfosforilada e, portanto mais ativa na transcrição gênica, atuando na expressão de genes relacionados ao desenvolvimento deste tumor. Recentemente, foi sintetizado um inibidor específico para este fator chamado 3-[(dodeciltiocarbonil)methil] glutarimide (DTCM-g) que impede a translocação do seu componente c-Jun para o núcleo. Neste estudo, avaliou-se o efeito da inibição de AP-1 por DTCM-g na proliferação, apoptose, dinâmica do ciclo celular e invasão em linhagens celulares de Glioblastoma adulto (U87 e U251) e pediátrico (KNS42 e SF188). Os resultados obtidos mostraram que o DTCM-g apresentou efeitos antiproliferativos em todas as linhagens, entretanto não houve aumento na taxa de apoptose, sugerindo que a droga apresenta um efeito citostático por meio de um retardo na passagem da fase G1 para S do ciclo celular. Além disso, foi observado redução da capacidade invasiva das linhagens de GBM quando tratadas com este inibidor. Paralelamente, estudos preliminares com DTCM-g combinado à radioterapia revelaram efeitos supra-aditivos, atuando como uma droga radiossenssibilizante. Dessa forma, este estudo confirma a ação antitumoral do inibidor DTCM-g, assim como evidencia a participação do AP-1 na manutenção e progressão do GBM, apontando-o como um alvo terapêutico promissor para o tratamento adjuvante.

Palavra-Chaves: Glioblastoma, AP-1, DTCM-g

ABSTRACT

"*In vitro* evaluation of the antitumor effects of AP-1 inhibition by DTCM-g in adult and pediatric glioblastoma"

Glioblastoma (GBM) is a malign tumor occurring in the central nervous system (CNS). It represents 50% of brain tumors in adults; being less frequent in children (9%). Despite therapeutic advances, the median survival of glioblastoma patients is still dismal (around one year), hampered by the tumor´s invasive nature and inherent chemo-radioresistance. Thus, the search for new therapeutic targets is still critical. The AP-1 transcription factor is an important point of convergence of many oncogenic pathways involved in proliferation, apoptosis and invasion. In GBM, the c-Jun subunit of this factor is found hyperphosphorylated and, therefore, more active to act on gene transcription. In this situation, c-Jun acts on the expression of several genes related to the tumor development. Recently, a new specific inhibitor of this factor, 3-[(dodecylthiocarbonyl)methyl] glutarimide (DTCM-g), was synthesized. This inhibitor prevents the translocation of the AP-1 component, c-Jun, into the nucleus. In this study, we evaluated the influence of AP-1 inhibition by DTCM-g on proliferation, apoptosis, cell cycle progression and invasion in adult (U87 and U251) and pediatric (KNS42 and SF188) glioblastoma cell lines. The results demonstrated that DTCM-g treatment exerts antiproliferative effects in all cell lines, however no apoptosis increase was observed. These data suggest that the drug is not cytotoxic, but promotes a cytostatic effect through cell cycle delay on the G1/S phase transition. Furthermore, a reduction in the invasive capacity of GBM cell lines was observed after treatment with this inhibitor. Preliminary assays revealed supra-additive effects when DTCM-g was combined with radiotherapy. Therefore, this study confirms the antitumor effects of DTCM-g, and evinces AP-1 participation on GBM proliferation and progression, pointing it as promising therapeutic target for adjuvant treatment.

Keywords: Glioblastoma, AP-1, DTCM-g

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular do DTCM-g.....23

Figura 2: Inibição de AP-1 por DTCM-g apresenta ação antiproliferativa significativa (*p<0,05) em linhagens de GBM sob concentrações iguais ou maiores que 10ug/mL quando comparadas ao controle.....35

Figura 3: A inibição de AP-1 por DTCM-g diminui significativamente (*p<0,05) a capacidade clonogênica em linhagens de GBM em relação ao controle.....36

Figura 4: Inibição de AP-1 por DTCM-g não induz morte celular em linhagens de GBM em relação ao controle.....37

Figura 5: Tratamento com DTCM-g (10ug/mL) em GBM induz um aumento médio na expressão do gene antiapoptótico *BCL-2*, mas não altera de forma expressiva a expressão de *BIRC3*.....38

Figura 6: Inibição de AP-1 por DTCM-g leva ao aumento significativo (*p<0,05) na população de células na fase G1 em três das linhagens de GBM quando comparados ao controle.....38

Figura 7: Tratamento com DTCM-g (10ug/mL) induz um aumento na expressão do gene da *Ciclina D1* em todas as linhagens de GBM.....39

Figura 8: A inibição de AP-1 por DTCM-g reduz significativamente (*p<0,05) a capacidade invasiva de linhagens de GBM.....40

Figura 9: Tratamento com DTCM-g (10ug/mL) induz aumento comparado ao controle na expressão de genes relacionados a invasão na linhagem U251 e redução nas demais linhagens de GBM analisadas.....41

Figura 10: Tratamento com DTCM-g sensibiliza as linhagens de GBM estudadas ao tratamento radioterápicos.....42

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Dose de DTCM-g necessária para 50% de inibição do crescimento celular (IC_{50}) nas quatro linhagens de Glioblastoma estudadas.....34

Tabela II: Valores da Taxa de Redução de Dose (TRD) obtidos a partir do pré-tratamento com DTCM-g e irradiação com três diferentes doses.....41

LISTA DE SIGLAS

DAPI	4' 6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTCM-g	Inibidor de AP-1 3-[(dodeciltiocarbonil)methil] glutarimide
EP	Eficiência de Plaqueamento
FA	Fração Afetada
FS	Fração de Sobrevivência
GBM	Glioblastoma
HAM F-10	Solução Nutritiva para o Cultivo Celular
KNS-42	Linhagem Celular derivada de Glioblastoma Pediátrico
MEM	Solução Nutritiva para o Cultivo Celular
NP40	Tergitol nonil-fenoxipolietoxiletanol
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão salina fosfato
PI	Iodeto de Propídeo
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa
SBF	Soro Bovino Fetal
SF188	Linhagem Celular derivada de Glioblastoma Pediátrico
SNC	Sistema Nervoso Central
TRD	Taxa de Redução de Dose
TMZ	Quimioterápico Temozolomida
U251	Linhagem Celular derivada de Glioblastoma Adulto
U87	Linhagem Celular derivada de Glioblastoma Adulto

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
Gy	Grey
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômero
µM	Micromolar
mg	Miligrama
mL	Mililitros
ng	Nanograma
nm	Nanometro
rpm	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1. Introdução..... 17

1.1. Glioblastoma.....18
1.2. AP-1 como alvo terapêutico.....20
1.3. DTCM-g.....22

2. Objetivos.....24

2.1. Objetivos Específicos.....25

3. Materiais e Métodos.....26

3.1. Linhagens Celulares e Condições de Cultura.....27
3.2. Tratamento de cultivos com DTCM-g.....27
3.3. Ensaio de Proliferação Celular.....28
3.4. Teste de Sobrevivência clonogênica.....28
3.5. Ensaio de Apoptose por detecção de atividade caspase.....29
3.6. Ciclo celular.....29
3.7. Ensaio de Invasão em Matrigel.....30
3.8. Extração de RNA e análise de expressão gênica por RT- qPCR.....30
3.9. Combinação com radiação ionizante.....31
3.10. Análise Estatística.....32

4. Resultados.....33

4.1. Efeitos de DTCM-g na Proliferação celular.....34
4.2. Efeitos do DTCM-g na Capacidade clonogênica.....35
4.3. Efeitos de DTCM-g na Apoptose.....36
4.4. Efeitos de DTCM-g no Ciclo Celular.....38
4.5. Efeitos de DTCM-g na Invasão Celular.....39
4.6. Efeitos de DTCM-g combinado com Radiação Ionizante.....41

5. Discussão.....43

6. Conclusão.....50

7. Referências Bibliográficas.....52

Introdução

1.1) Glioblastoma

Os gliomas são os tumores mais frequentes do SNC e podem ser classificados de acordo com a célula da glia envolvida no processo tumorigênico. A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica os tumores astrocíticos (formado a partir de astrócitos) em quatro grupos: Astrocitoma Pilocítico (grau I), Astrocitoma Difuso (grau II), Astrocitoma Anaplásico (grau III) e Glioblastoma (grau IV). Essa classificação é baseada nas características histológicas, genéticas e de proliferação celular observadas no tecido tumoral. Assim, o Glioblastoma (GBM) é conhecido por ser o tipo mais comum e agressivo de tumor cerebral primário em adultos.

Em geral, ele pode afetar qualquer região do SNC, porém é mais comumente encontrado na região dos hemisférios cerebrais (Fergunson, 2011). O tumor é caracterizado por sua infiltração difusa no parênquima neural, significante angiogênese, grande resistência a apoptose, presença de necrose e alta instabilidade genômica (Furnari *et al.,* 2007). Dentre os tumores intracraniais primários, o GBM representa cerca de 50% dos casos em adultos com o pico de incidência entre 45 e 70 anos (Minniti *et al*., 2009; Fergunson, 2011). Trantando- se do grupo pediátrico, ele é menos frequente, constituindo 9% das neoplasias intracraniais (Pollack, 1994).

Dependendo da forma de surgimento do tecido tumoral, o glioblastoma é considerado primário (*de novo*) ou secundário. Ambos os tipos não apresentam características morfológicas particulares, entretanto se desenvolvem a partir de vias genéticas diferentes. Os GBM primários ou *de novo*, são aqueles diagnosticados diretamente como tais, sem que haja evolução a partir de neoplasias de menor grau. Geralmente, eles se desenvolvem em pacientes com idade acima de 50 anos e tem um histórico clínico de menos de seis meses, representando 80% dos casos de GBM. O glioblastoma secundário ocorre em pacientes mais jovens a partir da transformação progressiva de um astrocitoma de baixo grau (Fergunson, 2011).

Durante o seu desenvolvimento, os GBM apresentam algumas alterações genéticas bem estabelecidas. Dentre as primeiras variações encontradas temos a amplificação ou hiperexpressão do *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) encontrado em cerca de 50% dos pacientes, sendo mais característico dos GBM primários e de indivíduos com idade mais avançada. Estudos mostraram que essa alteração não é encontrada em pacientes menores que 35 anos, sendo muito rara em tumores da infância e adolescência (Masui *et al*., 2012).

Cerca de 50% dos GBM com amplificação e hiperexpressão de *EGFR* apresentam mutação única neste gene, caracterizada pela deleção dos exons 2-7 e que resulta numa oncoproteína mutada constitutivamente ativa conhecida por EGFRvIII (Sugawa *et al*., 1990; Masui *et al*., 2012).

Esta proteína atua aumentando a proliferação celular atráves da ativação da via PI3K/Akt. O receptor ativo recruta PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) para a membrana celular, que fosforila fosfodinositol-4,5-bifosfato em fosfodinositol- 3-fosfato (PIP3), e este ativa moléculas efetoras como AKT (*Protein kinase B*) e mTOR (*Mammalian target of rapamycin*) que influenciam nos processos de angiogênese, proliferação, invasão e no controle do ciclo celular (Mellinghoff *et al*., 2005). Mutações em *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog)* também são encontradas predominantemente em GBM primários e, em muitos casos, levam a ativação constitutiva da via PI3K/AKT/mTOR (Endersby & Baker, 2008).

Os GBM secundários, por outro lado, apresentam em cerca de 68% dos casos, mutações no gene *TP53 (tumor protein p53),* importante supressor tumoral*,* além de alterações no gene *TGF-β (transforming growth factor beta*) e hiperexpressão de *PDGFR (Platelet-derived growth factor receptor)*, ambos envolvidos no processo de crescimento celular. Além disso, alterações nas vias supressoras de tumor de *TP53* e *Rb (Retinoblastoma gene)* são encontradas na maioria dos glioblastomas (Ohgaki & Kleihues, 2009; Masui *et al*., 2012; Lima, 2012).

O tratamento atual padrão dessa neoplasia consiste em neurocirurgia visando a remoção do tumor seguida de tratamento com radioterapia combinado com administração do quimioterápico temozolomida (TMZ); entretanto mesmo com os avanços nas ferramentas de diagnóstico e neurocirúrgicas, além do desenvolvimento de novas drogas terapêuticas nos últimos anos, a sobrevida dos pacientes nas últimas 3 décadas não tem conquistado grandes melhorias, continuando baixa, entre 12 a 15 meses (Minniti *et al.,* 2009).

A dificuldade no combate ao glioblastoma se deve principalmente a resistência à apoptose e às terapias convencionais, além da própria natureza invasiva do tumor, que influencia em sua alta taxa de recorrência (Furnari *et al.*, 2007). Em se tratando da elevada resistência do GBM às terapias atualmente empregadas, uma das características responsáveis por esse perfil é a sua heterogeneidade, em que um único tumor apresenta diferentes tipos de populações celulares com diferentes características histopatológicas, além de alta taxa de polimorfismo (Minniti *et al.,* 2009).

Quanto aos glioblastomas pediátricos, sabe-se atualmente, que estes apresentam diferenças genéticas em relação aos adultos, entretanto as vias que promovem a tumorigênese do GBM infantil continuam pouco conhecidas (Bax *et al*., 2009; Gaspar *et al.,* 2010). Dessa forma, esses tumores são difíceis de serem tratados não havendo uma terapia particular e eficaz estabelecida para seu tratamento. Porém, observa-se que os tumores infantis devem ser combatidos de forma diferente aos adultos, sendo necessária maior investigação, não apenas

quanto a biologia dessa neoplasia, mas também quanto novas drogas para seu tratamento específico.

1.2) AP-1 como alvo terapêutico

Devido à ineficiência dos tratamentos atualmente empregados no combate ao glioblastoma, nos últimos anos, tem-se aumentado as pesquisas que buscam o desenvolvimento de agentes capazes de inibir a ação de fatores moleculares envolvidos nos processos de proliferação e apoptose. Neste contexto, grande interesse tem sido depositado no AP-1 (*Activator protein-1*). Trata-se de um fator de transcrição pleiotrópico que atua como ponto convergente em várias vias oncológicas através da regulação na expressão de genes envolvidos na proliferação, morte e diferenciação celular (Shaulian & Karin, 2002).

O AP-1 é um complexo dimérico constituído principalmente por proteínas pertencentes às subfamílias Jun (c-Jun, JunB e Jun D) e Fos (c-Fos, Fos B, Fra1 e Fra2). Além disso, podem ser encontrados como componentes de AP-1 as proteínas ativadoras de fatores de transcrição da subfamília ATF (*Activating transcription factor*) (ATF1, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1 e JDP2) e membros da subfamília MAF. A associação em dímeros para ativação deste fator de transcrição ocorre através dos domínios de dedos de leucina, componente comum na estrutura de quase todos os membros de AP-1 (Shaulian, 2010).

AP-1 pode ser constituído de heterodímeros ou homodímeros, sendo que os últimos envolvem apenas proteínas da família Jun. Devido à vasta possibilidade de combinação entre as proteínas de AP-1, aumenta-se a diversidade na regulação genética promovida por esse fator de transcrição, pois se altera a afinidade e especificidade da ligação com promotores e acentuadores (*enhancer*) dos genes alvos (Hess *et al.*, 2004). Enquanto os heterodímeros Jun-Fos apresentam alta afinidade de ligação a sequência de sete nucleotideos (5'-TGA(C/G)TCA-3') conhecido por TRE (*tetracycline response element*), heterodímeros Jun-ATF se ligam preferencialmente a sequencias CRE (elementos de resposta ao AMP-cíclico) e em outros casos, dependendo da combinação de dímeros, são encontradas maiores afinidades de AP-1 com elementos de reconhecimento MAF (MARES) ou elementos de resposta a antioxidantes (Efer & Wagner, 2003).

Este fator de transcrição é ativado através de uma grande variedade de estímulos como citocinas, fatores de crescimento, estresse, agentes infecciosos e alterações oncogênicas. A rede de atividade de AP-1 é regulada no nível transcricional e traducional através de miRNAs,

alterações na estabilidade protéica e interações com outros fatores de transcrição (Hess *et al.,* 2004).

A atividade do AP-1 no câncer apresenta-se de forma diferenciada e até mesmo contraditória como supressor ou oncogene de acordo com a sua constituição em dímeros. Assim, observando-se a subfamília Jun e Fos, algumas subunidades atuam como oncogênicas (c-Jun, c-Fos e FosB) e outras como supressores (JunB, JunD, Fra-1 e Fra-2). Essa atividade depende dos potenciais de transativação de cada subunidade. As subunidades c-Jun, c-Fos e FosB apresentam alto potencial de transativação, sendo apontadas como indutoras de proliferação celular e angiogênese e tendo propriedades antiapoptóticas. Por outro lado, as subunidades JunB e JunD apresentam fraco potencial de transativação, formando complexos praticamente inativos que podem agir como supressores tumorais ao competir pelos sítios de AP-1 com aqueles fatores de transcrição ativos (Hess *et al.*, 2004; Eferl & Wagner, 2003). O heterodímero mais comum é o constituído de c-Jun/c-Fos (Takeiri, 2011).

Estudos mostram que c-Jun apresenta grande importância no controle da proliferação celular e apoptose, sendo que camundongos nocaute para c-Jun não sobrevivem ao décimo quarto dia do desenvolvimento embrionário, morrendo devido a complicações hepáticas e cardíacas (Eferl *et al.*, 1999). Evidências apontam para uma forte participação dessa subunidade de AP-1 em processos de transformação e tumorigênese, sendo este encontrado superexpresso em uma grande variedade de cânceres humanos (Lopez-Bergami *et al.,* 2010).

Os níveis de expressão de c-Jun são finamente regulados através de modificações na estabilidade protéica e por ser transcrito em um RNAm de vida curta. Modificações na estrutura protéica em alguns casos resultam em um *looping* de retroalimentação em que o Jun/AP-1 formado se liga ao promotor de c-Jun, aumentando sua transcrição (Angel *et al.,* 1988). Durante o ciclo celular, a alta expressão de c-Jun está associada à estimulação da expressão de fatores como ciclinas D1 e A, promovendo a passagem de G1 para S (Shaulian & Karin, 2001; Katabami *et al.,* 2005).

Um importante influenciador na atividade de c-Jun é conhecido como JNK (*JUN N-terminal kinase*). Essa enzima fosforila as Ser63 e Ser73 de c-Jun levando a um grande aumento na sua estabilidade e potencial de transativação, intensificando a sua atividade transcricional (Vogt, 2001).

Experimentos mostraram que quando c-Jun apresenta altos níveis de expressão, ele estimula a proliferação, aumentando a expressão de *Ciclina D1, CSF-1 (colony stimulating factor 1), EGF (Epidermal growth factor), EGFR,* e por outro lado, baixos níveis de expressão levam a inibição da proliferação através da regulação do gene *TP53*. Além da proliferação, a

superexpressão de c-Jun age na regulação do gene *BCL3,* que resulta na inibição da apoptose; os genes antiapoptóticos *BCL-2* e *BIRC3* também já foram descritos relacionados a via do AP-1 (Zhao *et al.,* 2014; Eferl & Wagner, 2003).

Quanto a processos invasivos, c-Jun tem sido descrito como regulador da expressão da *MMP-2* (*matrix metaloproteinase-2)* (Hsieh *et al.,* 2007). Outros componentes de AP-1 como c-Fos e Fra-1, quando superexpressos, atuam nos processos de angiogênese e invasão através da regulação de genes como *MMP-1, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 (Tissue inhibitor of metalloproteinase-1)* e *uPa (Transcriptional regulation of urokinase*) (Hu *et al*., 2004; Milde-Langosch, 2005).

Vários pesquisadores têm mostrado a relação entre a hiperexpressão de AP-1 ou de seus componentes e o desenvolvimento de câncer cervical (Prusty & Das, 2005), de mama (Kharman-Biz *et al.,* 2013), de próstata (Ouyang *et al.,* 2008) e linfomas (Drakos *et al*., 2007). No caso de astrocitomas e glioblastomas, estudos de Assimakopoulou e colaboradores (2004) mostraram um aumento na expressão de *JNK* e consequentemente nos níveis de c-Jun fosforilado e com maior potencial de transativação.

Assim, devido à atuação de AP-1 em processos como proliferação, angiogênese e apoptose, muitos pesquisadores tem estudado os efeitos de sua inibição no combate a progressão tumoral. Estudos utilizando RNA de interferência para inibição de c-Jun e c-Fos resultaram na inibição da motilidade de células de carcinoma epidermoide humano (Andersen *et al.,* 2005), assim como a inibição de Fra-1 levou a redução da proliferação e processos invasivos de células de tumor de mama (Belguise *et al.,* 2005). Porém, essa metodologia de biologia molecular não é aplicável no tratamento clínico devido à natureza transitória da inibição e ao modo de acesso do fator inibitório ao genoma alvo.

Recentemente, alguns inibidores químicos em potencial de AP-1 foram desenvolvidos, como geldanamicina (Vasilevskaya & O'Dwyer, 1999), oflavopiridol (Takada *et al*., 2008), Silibinine (Hsieh *et al*., 2007), T5224 (Aikawa *et al*., 2008) e Curcumina (Kunnumakkara *et al.,* 2008) tiveram seus efeitos anti-tumorais e inflamatórios analisados. Entretanto, na maioria dos casos, a inibição exercida por esses inibidores é indireta (atuando em outro fator de sua via de sinalização) e/ou pouco seletiva.

1.3) DTCM-g

Recentemente, um novo inibidor de AP-1 chamado 3-[(dodeciltiocarbonil)methil] glutarimide (DTCM-g) foi desenvolvido por pesquisadores do Departamento de Química

Aplicada da Universidade de Aichi (Japão) comandados pelo Prof. Kazuo Umezawa. Esse inibidor é uma molécula pequena, sinteticamente derivada da piperidina 9-methylstreptimidone de *Streptomyces sp*., (**Figura 1**) que bloqueia de forma específica a translocação nuclear de c-Jun e consequentemente sua capacidade de formar AP-1 e atuar na transcrição gênica (Takeiri *et al.,* 2011).

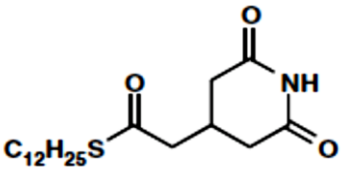

Figura 1. Estrutura molecular do DTCM-g (Takeiri *et al.,* 2011).

Foi demonstrado que o DTCM-g impede a fosforilação celular do c-Jun, tendo, portanto, efeito de inibição em determinado componente na via de fosforilação deste. Entretanto, não foi encontrado nenhum efeito na via de ativação de JNK e em sua capacidade de fosforilação (Takeiri *et al.,* 2011). Este inibidor não apresentou citotoxidade em células normais, mas mostrou efeitos antinflamatórios *in vitro* (Takeiri *et al.,* 2011) e imunossupressores através da inibição da via de sinalização *downstream* do mTOR, que se encontra frequentemente ativa em GBM (Shibasaki, *et al*. 2013).

Quanto aos efeitos antitumorais deste novo composto, estudos prévios realizados pelo nosso grupo demonstraram efeitos antiproliferativos significantes em carcinoma de bexiga e osteossarcoma (Brassesco *et al*., 2012; 2013), em que o DTCM-g levou à diminuição significativa na proliferação e capacidade clonogênica de maneira dose- e tempo-dependente em todas as linhagens testadas, apresentando também capacidade de radio- e quimiosensibilização das células para os tratamentos terapêuticos atualmente aplicados. Quanto à capacidade invasiva, houve uma diminuição desta nas células tratadas com a droga, acompanhada da redução dos níveis de expressão de genes relacionados a esse processo e regulados por AP-1 como MMP-2 e TIMP-1 (Brassesco *et al.,* 2013). Sendo assim, o DTCM-g apresenta-se como um promissor agente para o combate do Glioblastoma.

Objetivos

O presente projeto propõe-se verificar os efeitos *in vitro* da inibição do fator de transcrição AP-1 em linhagens celulares de glioblastoma adulto e pediátrico tratadas com o inibidor específico DTCM-g.

2.1) OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

i. Verificar os efeitos da inibição do AP-1 em relação à proliferação celular, capacidade clonogênica, apoptose e controle do ciclo celular em linhagens adultas e pediátricas de glioblastoma tratadas com DTCM-g;
ii. Analisar a influência da inibição do AP-1, na capacidade invasiva das linhagens adultas e pediátricas de glioblastoma tratadas com DTCM-g;
iii. Avaliar a influência do tratamento com DTCM-g em relação à dinâmica de expressão de genes associados à progressão do ciclo celular, apoptose e invasão celular das linhagens adultas e pediátricas de glioblastoma;
iv. Avaliar os efeitos de DTCM-g na radiossensibilização de linhagens adultas e pediátricas de glioblastoma;

Materiais e Métodos

3.1) Linhagens Celulares e Condições de Cultura

Para o presente estudo foram utilizadas as seguintes linhagens celulares:

- SF188 – derivada de glioblastoma pediátrico (gentilmente cedida por Nada Jabado e Damien Faury – McGill University – Canadá)
- KNS42 – derivada de glioblastoma pediátrico adquirida do Banco de Células do Japão (JCRB Cell Bank – National Institute of Biomedical Innovation)
- U87 e U251– derivadas de glioblastoma adulto provenientes do Centro de Recursos Biológicos (ATCC - American Type Culture Collection) (EUA).

Estas linhagens celulares foram cultivadas em meio HAM/F10 suplementado com 1% de glutamina, 100 mg/ml de estreptomicina, 60 mg/ml de penicilina, e 10% de soro bovino fetal (SBF) (pH 7.2–7.4) em atmosfera úmida contendo 5% CO_2 a 37ºC. No caso específico da linhagem KNS-42, foi utilizado meio MEM suplementado com 60mg/L de penicilina, 100mg/mL de estreptomicina e 5% de soro bovino fetal (pH de 7,2-7,4).

3.2) Tratamento de cultivos com DTCM-g

O DTCM-g foi gentilmente cedido pelo professor de Bioquímica Dr. Kazuo Umezawa, da Universidade de Aichi, no Japão. A solução estoque da droga (10 mg/mL) foi preparada através de diluição em Dimetilsulfóxido (DMSO), filtrada em filtro millipore (0,5µm), e estocada a -20°C. As células foram tratadas com as concentrações finais de 2,5, 5, 10 e 20 µg/mL. A droga foi diluída em meio de cultivo imediatamente antes de ser aplicada às células. Para o tratamento controle foi utilizado DMSO a 0,2%.

3.3) Ensaio de Proliferação Celular

Para o ensaio de proliferação, as células foram semeadas por poço em densidades iniciais de $2x10^3$ em placas de 96 poços e mantidas em condições de cultura por 24h. Após este período, as células foram tratadas e incubadas com os diferentes tratamentos por 24, 48 e 72 horas.

A cada intervalo de tratamento, o meio de cultivo dos poços foi subtituído por 100µL de meio de cultivo com 10µL do kit *XTT* (Roche, Molecular Biochemicals, IN, USA). As placas foram

incubadas por 4 horas em atmosfera úmida contendo 5% CO_2 a 37ºC. As células metabolicamente ativas clivam o sal amarelo tetrazolium XTT e produzem o corante formazan de coloração laranja. A leitura da absorbância de 450nm com onda de referência de 655nm foi realizada utilizando o aparelho iMark Microplate Absorbance reader (BioRad Laboratories, Inc, CA, EUA). Os experimentos foram repetidos três vezes em sextuplicata. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão.

Os valores da fração afetada (FA) que correspondem a proporção da inibição em cada tratamento quando comparado ao controle, foram calculados e utilizados para a obtenção do IC_{50} de cada linhagem através do programa CalcuSyn software v2.1 (Biosoft® Ferguson, MO).

3.4) Teste de Sobrevivência clonogênica

Este ensaio visou avaliar a capacidade de formação de colônias das linhagens celulares após tratamento com DTCM-g. Para isso, 500 células foram semeadas por poço em placas de seis poços e após o período de aderência foram tratadas nas concentrações de 2,5, 5, 10 e 20µg/mL de DTCM-g. Após 24h de tratamento, as células foram lavadas com PBS e colocadas novamente em meio de cultivo sem droga. Os cultivos foram incubados em estufa a 37°C por 7 dias, até que as colônias se tornassem visíveis, mas não confluentes. Para a visualização das colônias o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol absoluto e coradas com Giemsa (1%).

As colônias foram contadas com auxílio de estereomicroscópio (40x), sendo consideradas somente aquelas formadas por pelo menos 50 células.

Para analisar a contagem foram usadas duas fórmulas. Na primeira fórmula, considera-se apenas a amostra controle e observa-se a Eficiência de plaqueamento (EP), isto é, a porcentagem de células plaqueadas que efetivamente resultaram em colônias visíveis. Na segunda, calcula-se a Fração de sobrevivência (FS) que corresponde à porcentagem de células capazes de formar colônias visíveis após o tratamento considerando-se a eficiência de plaqueamento de cada linhagem em uma específica condição de cultivo.

1) $$EP = \frac{\text{nº colônias formadas}}{\text{nº de células plaqueadas}} \times 100$$

2) $$FS = \frac{\text{nº colônias formadas após tratamentos}}{\text{nº de células plaqueadas} \times EP}$$

Os experimentos foram repetidos três vezes em triplicata. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão.

3.5) Ensaio de Apoptose por detecção de atividade caspase

Para análise da atividade da caspase 3, enzima que se encontra ativa em células apoptóticas, foi utilizado o kit Apoptosis Assay Kit for living cells with NucViewTM488 caspase-3 (Biotium Inc, CA, EUA). Após 48h de tratamento nas quatro concentrações da droga, as células foram transferidas para tubos cônicos e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. As células foram então lavadas duas vezes com PBS, contadas e ressuspendidas na concentração de 10^6 células/mL e por fim adicionou-se 5µL de *NucViewTM 488 caspase-3 substrate*. As células foram então incubadas a temperatura ambiente ao abrigo da luz por 30 minutos. Após este período, as mesmas foram incubadas com DAPI (0.15 ug/mL) (Sigma-Aldrich, Inc, MO, EUA) para marcação fluorescente do núcleo e analisadas em microscópio de epifluorescência. As células normais e apoptóticas foram contadas e expressas em porcentagem. Os experimentos foram repetidos 3 vezes e os resultados expressos como média ± desvio padrão.

3.6) Ciclo celular

A análise da dinâmica do ciclo celular foi realizada utilizando o programa Guava CytoSoft 4.2.1 (Guava Technologies, Hayward, CA). Para tanto, 5 $x10^4$ células por poço foram plaqueadas em placa de 6 poços, e tratadas com as diferentes concentrações de DTCM-g durante 24, 48 e 72h. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas, fixadas com etanol 70% e estocadas em freezer a -20°C. Para a leitura, o material foi descongelado e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos, lavado com PBS 1X (filtrado e gelado) e centrifugado novamente a 1000 rpm por 5 minutos. Após descartar o sobrenadante, foram acrescentados 200 µL da solução PI (iodeto de propídeo) 1 mg/mL, RNAse 50 µg/mL, NP40 0,2%) ao pellet e 5000 eventos foram avaliadas no citômetro. Os experimentos foram repetidos 3 vezes em duplicata e os resultados expressos como média.

3.7) Ensaio de Invasão em Matrigel

Para a análise da capacidade invasiva foi realizado o ensaio de invasão em Matrigel. As células foram tripsinizadas, contadas e ressuspensas em meio de cultivo sem SBF na presenca

de diferentes concentrações de DTCM-g. Foi adicionado 100uL de matriz de matrigel do kit BD Biocoat™ Matrigel™ Matrix–24 well plate (Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA) sob os insertos correspondentes a placa de 24 poços. Posteriormente, 5 x 10^5 células já em meio tratado foram colocadas no topo da matriz de matrigel. Na parte inferior do inserto foi adicionado meio de cultivo com 10% de SBF. Após a incubação a 37ºC por 24 horas, as células que não transpassaram a camada de matrigel foram removidas da parte superior do inserto com o uso de um *swab* (tipo de haste flexivel com pontas de algodão). As células que invadiram foram fixadas com metanol absoluto por 15 minutos e coradas com uma solução de Giemsa (1%). As membranas do inserto foram removidas posteriormente, montadas em laminas de vidro com Entellan (Merk®) e fotografadas no microscópio de luz clara (magnificência de 40x) sendo contadas com o auxilio do software CytolabView software (Applied Spectral Imaging [ASI], Migdal Ha'Emek, Israel). Os experimentos foram repetidos três vezes, em triplicata e os resultados expressos como média ± desvio padrão.

3.8) Extração de RNA e análise de expressão gênica por RT- qPCR

Através da PCR quantitativa em tempo real foram mensuradas alterações na expressão dos genes *Ciclina D1, Bcl-2, BIRC3, MMP2 e uPA,* todos descritos como alvos de AP-1, em todas as linhagens utilizadas neste estudo. Aproximadamente 5x10^5 células de cada linhagem foram tratadas por 24h com DTCM-g na concentração de 10 µg/mL e foram obtidas amostras calibradoras de cada linhagem pelo tratamento com DMSO; a concentração de 10ug/mL foi escolhida por se tratar do valor mais próximo ao IC_{50} médio das linhagens estudadas. Para avaliação de genes envolvidos no processo de invasão, as células foram submetidas ao tratamento em meio de cultivo com apenas 0.5% de SBF.

O RNA total foi isolado utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, São Paulo, Brazil) seguindo instruções do fabricante. Um total de 1000 ng de RNA foi retrotranscrito com o *kit* High Capacity (Applied Biosystems Foster City, CA, USA). A qRT- PCR foi realizada utilizando-se sondas inventariadas TaqMan® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para *BCL-2* (Hs 00608023_m1), *BIRC3* (Hs00154109_m1), *Ciclina D1* (Hs 00765553_m1), *MMP2* (Hs 01548727_m1) e *uPa* (Hs 01547954_m1) no aparelho ABI Prism 7500 fast (Applied Biosystems). Os genes *TBP (TATA-binding protein)* (4326322E0811008), e *HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase)* (4310809E0502006) (Applied Biosystems) foram usados como controles endógenos. Cada reação consistiu em 10uL, sendo 5,0 µL do Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, part number 4304437), 0,5 µL de sonda e 4,5 µL de cDNA.

A quantificação relativa da expressão gênica foi determinada através do método $2^{-\Delta\Delta ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

3.9) Combinação com radiação ionizante

Este ensaio visou avaliar a capacidade de formação de colônias das linhagens celulares após tratamento sequencial de DTCM-g e diferentes doses de irradiação. Para isso, 500 células foram semeadas por poço em placas de seis poços e após o período de aderência foram tratadas com a concentração de 10µg/mL de DTCM-g. Após 24h, as células foram lavadas com PBS, colocadas novamente em meio de cultivo sem droga e submetidas a irradiação nas doses de 2, 4 e 6 Gy a partir de uma fonte de raio X a uma taxa 2,85Gy/min utilizando o irradiador RS-2000 (Rad Source Technologies Inc., Suwanee, Georgia, USA) do Setor de Radioterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP). O tempo de exposição foi calculado conforme a dose pretendida e se considerou o decaimento do radioisótopo. As placas foram colocadas de forma equidistante do centro da fonte assegurando a uniformidade da dose.

Após este tratamento, os cultivos foram incubados em estufa a 37°C por 7 dias, até que as colônias se tornassem visíveis, mas não confluentes. Para a visualização das colônias o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol absoluto e coradas com Giemsa (1%). A análise foi realizada da mesma forma que a descrita no item 3.4 calculando-se os valores de Eficiência de Plaqueamento (EP) e a Fração de Sobrevivência (FS).

A partir destes dados, uma terceira fórmula foi utilizada (representada abaixo) para a obtenção do valor referente a Taxa de Reforço de Dose, que define se a associação entre a droga e a irradiação tem efeito supra-aditivo (TRD>1 - a droga aumenta o efeito da radiação funcionando como radiossensibilizante) ou sub-aditivo (TRD <1 - a droga diminui o efeito da radiação funcionando como radioprotetor).

$$TRD = \frac{\text{FS para uma dose de irradiação}}{\text{FS para uma dose de irradiação + droga}}$$

Os resultados apresentados neste estudo são provenientes de apenas um experimento e portanto ainda considerados preliminares.

3.10) Análise estatística

A análise estatística foi realizada mediante a utilização dos software SigmaStat (Jandel Scientific, Co) considerando-se o nível de significância de $\alpha = 0,05$ para todos os testes realizados. Para avaliar estatisticamente os ensaios funcionais foi empregada a análise de variância ANOVA RM One Way seguida pelo teste pareado Holm-Sidak Pairwise Multiple Comparison.

Resultados

4.1) Efeitos de DTCM-g na Proliferação celular

Os experimentos realizados utilizando o kit-XTT com as quatro linhagens de GBM, mostraram resultados positivos, apontando inibição significativa (*$p < 0,05$) da proliferação celular por DTCM-g em relação ao controle em todas as linhagens sob concentrações iguais ou maiores que 10µg/mL após 24h de tratamento (**Figura 2**).

Observando-se as linhagens pediátricas, a linhagem SF188 foi a mais sensível aos efeitos de DTCM-g na proliferação celular, apresentando reduções significativas em relação ao controle nas concentrações mais baixas da droga inclusive sob o tempo de 24h. Enquanto que, a linhagem KNS42, sofreu somente reduções significativas em relação ao controle sob as concentrações mais elevadas de 10 e 20 µg/mL independentemente do tempo, sendo a redução máxima igual a 75% sob o maior tempo de exposição à droga e a maior concentração desta. Já a linhagem SF188 apresentou redução máxima de aproximadamente 92% em relação ao controle após 48h sob 20ug/mL de DTCM-g. O diferente comportamento das duas linhagens celulares em relação ao tratamento com a droga fica evidente quando se compara os IC_{50} delas (**Tabela I**). A linhagem SF188 apresentou IC_{50} muito inferior ao da KNS42.

Quanto às linhagens adultas, a U251 mostrou-se como uma linhagem muito sensível aos efeitos antiproliferativos de DTCM-g, que atuaram de maneira dose e tempo dependente, já apresentando reduções significativas nas doses mais baixas e sob 24 horas de tratamento. A redução máxima desta linhagem foi aproximadamente igual a 86%. A linhagem U87 mostrou-se ligeiramente mais resistente no tempo de 24h com IC_{50} relativamente alto, apresentando redução significativa apenas sob a maior dose de DTCM-g. Entretanto, sob tempos de exposição maiores esta respondeu melhor a ação antiproliferativa da droga mostrando reduções significativas até mesmo em doses mais baixas. Neste caso, a redução máxima atingiu 90%.

Tabela I. Dose de DTCM-g necessária para 50% de inibição do crescimento celular (IC_{50}) nas quatro linhagens de Glioblastoma estudadas.

Tempo de tratamento	Linhagens Celulares de GBM			
	SF188	KNS42	U251	U87
24h	4,8	15,1	10,9	32,2
48h	6,5	14,1	4,6	3,3
72h	6,2	13,8	3,7	2,3

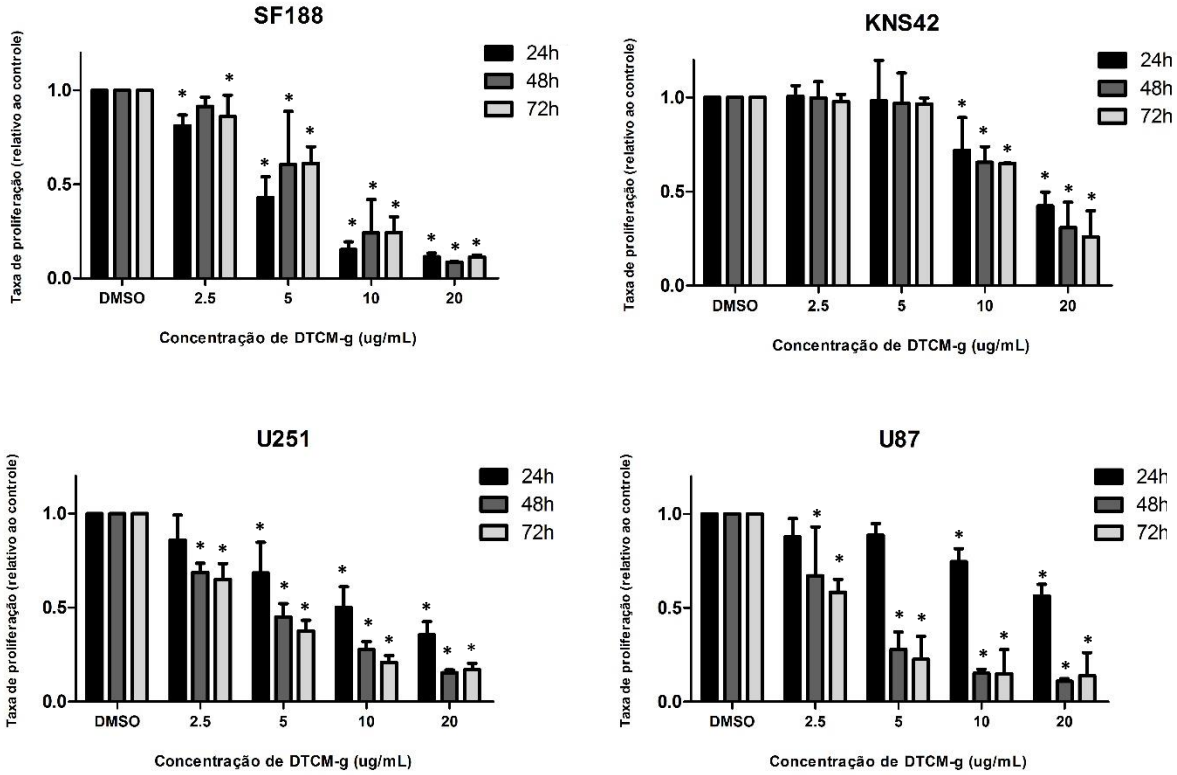

Figura 2. Inibição de AP-1 por DTCM-g apresenta ação antiproliferativa significativa (*p<0,05) em linhagens de GBM sob concentrações iguais ou maiores que 10µg/mL quando comparadas ao controle.

4.2) Efeitos do DTCM-g na Capacidade clonogênica

O ensaio clonogênico foi realizado com três das quatro linhagens propostas, pois a linhagem U87 não possui a capacidade de formar colônias, característica esta imprescindível para a realização de tal experimento. Sendo assim, este foi realizado com duas linhagens de GBM pediátrico e apenas uma linhagem de GBM adulto.

Como mostrado na **figura 3**, todas as linhagens apresentaram redução significativa na capacidade clonogênica em relação ao controle quando expostas a concentração máxima de 20µg/mL de DTCM-g. As linhagens KNS42 e U251 evidenciaram reduções dose-dependentes significativas também nas concentrações de 5µg/mL e 10µg/mL. Foi observado uma redução máxima de 100% em KNS42 e igual a 95% em U251. A linhagem SF188 apresentou-se mais resistente, tendo redução significativa apenas na maior concentração e apresentando redução máxima de 36%.

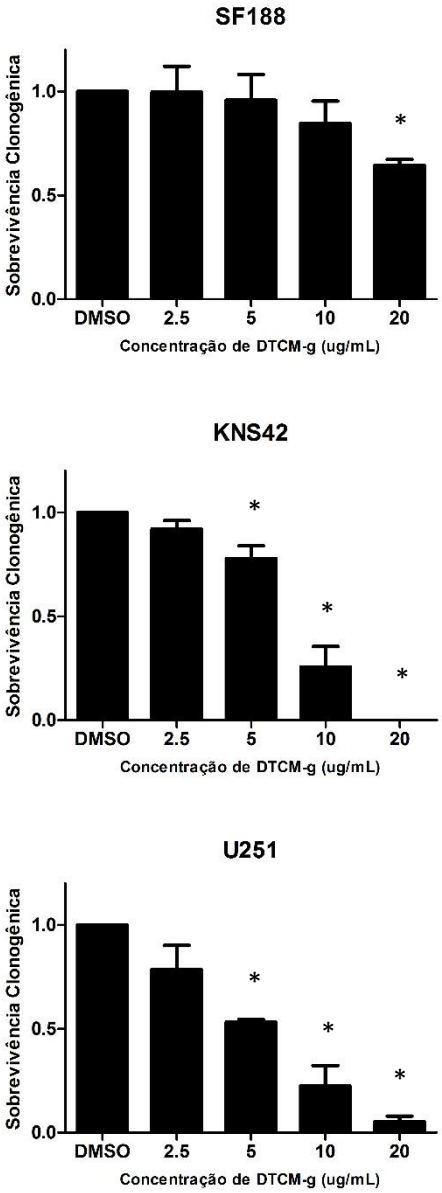

Figura 3. A inibição de AP-1 por DTCM-g diminui significativamente (*p<0,05) a capacidade clonogênica em linhagens de GBM em relação ao controle.

4.3) Efeitos de DTCM-g na Apoptose

Visando analisar se o tratamento com DTCM-g, além de causar a redução na taxa de proliferação celular, estaria também associado ao aumento na taxa de morte celular, foram realizados ensaios de apoptose por ativação da caspase-3. Os resultados obtidos são mostrados na **figura 4**. Em todas as linhagens, o tratamento com DTCM-g não levou a um aumento na taxa de apoptose que se manteve em torno de 3% do total de células analisadas para cada

tratamento. Sendo assim, o DTCM-g não induz morte celular por apoptose, sendo a redução na taxa de proliferação um provável resultado de um efeito citostático nas células.

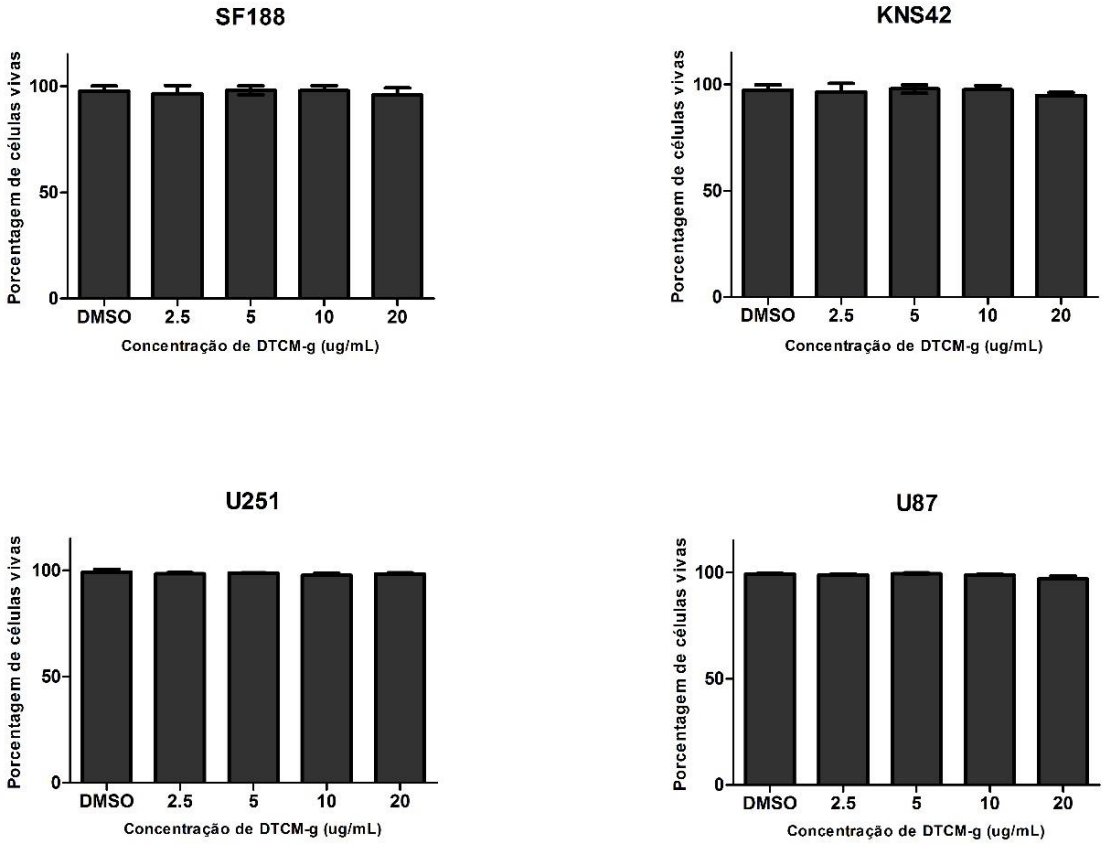

Figura 4. Inibição de AP-1 por DTCM-g não induz aumento da morte celular em linhagens de GBM em relação ao controle.

A expressão dos genes antiapoptóticos *BCL-2 e BIRC3* em linhagens tratadas com 10µg/mL de DTCM-g foi avaliada por RT-qPCR (**Figura 5**). Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com DTCM-g não altera de forma expressiva os níveis de expressão de *BIRC3* nas linhagens de estudo. Quanto aos níveis de *BCL-2*, com exceção da U87, foi evidenciado um aumento na expressão deste gene nas linhagens tratadas quando comparadas ao controle. Na linhagem U87, diferentemente das demais, o tratamento levou a diminuição da expressão do gene antiapoptótico.

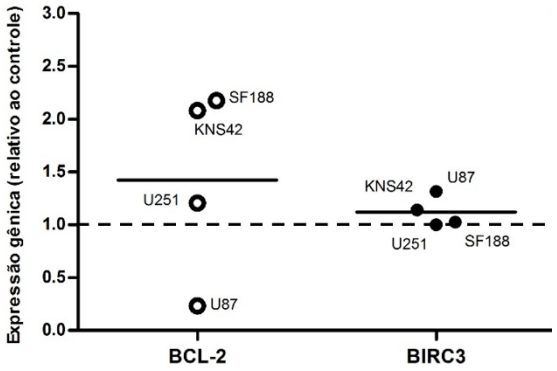

Figura 5. Tratamento com DTCM-g (10ug/mL) em GBM induz um aumento médio na expressão do gene antiapoptótico *BCL-2*, mas não altera de forma expressiva a expressão de *BIRC3*. A linha tracejada representa a expressão dos genes no controle.

4.4) Efeitos de DTCM-g no Ciclo Celular

A distribuição da população de células em cada fase do ciclo celular foi analisada por citometria de fluxo. Um aumento significativo na população de células na fase G1 em relação ao controle foi observado em todas as linhagens sob a concentração de 20µg/mL, com exceção da U251 (**Figura 6**). As linhagens U87 e KNS42 apresentaram aumento em G1 inclusive a partir do tratamento com 10µg/mL de DTCM-g. A linhagem KNS42 apresentou um aumento de 17,3% na população de células na fase G1 sob a dose de 20µg/mL em relação ao controle, enquanto nas demais linhagens esse aumento foi de 6,5%.

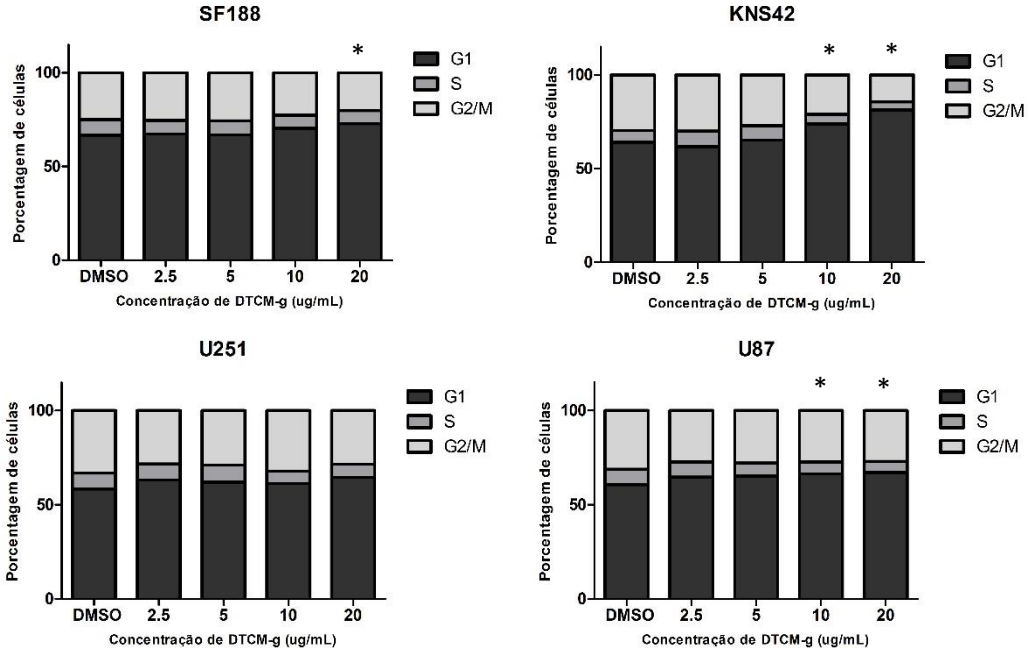

Figura 6. Inibição de AP-1 por DTCM-g leva ao aumento significativo (*p<0,05) na população de células na fase G1 em três das linhagens de GBM quando comparados ao controle.

A expressão gênica de *Ciclina D1*, proteína responsável pela transição G1/S, foi avaliada por RT-qPCR em linhagens tratadas com 10µg/mL de DTCM-g (Figura 7). Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com DTCM-g levou a um aumento da expressão desse gene em todas as linhagens de glioblastoma analisadas.

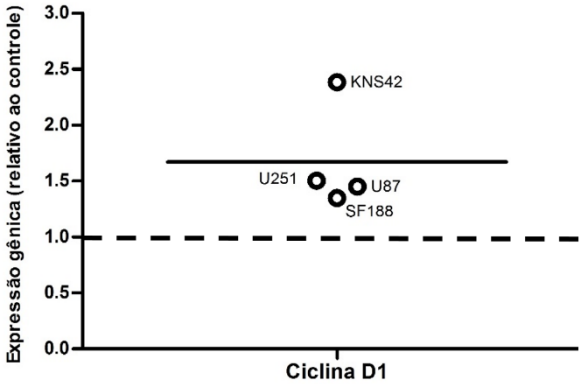

Figura 7. Tratamento com DTCM-g (10µg/mL) induz um aumento na expressão do gene da *Ciclina D1* em todas as linhagens de GBM. A linha tracejada representa a expressão dos gene no controle.

4.5) Efeitos de DTCM-g na Invasão Celular

Quanto aos efeitos da inibição de AP-1 por DTCM-g na capacidade invasiva das linhagens de GBM, os resultados encontrados foram promissores. Uma diminuição significativa da taxa de invasão celular foi observada em todas as linhagens estudadas sob concentrações iguais ou superiores a 10µg/mL quando comparadas ao controle (**Figura 8**). Com exceção da linhagem adulta U87, as demais apresentaram reduções significativas, inclusive sob concentrações inferiores a 10µg/mL. Nas linhagens KNS42, U251 e U87, a inibição da invasão pela droga ocorre de maneira dose-dependente, enquanto que na linhagem SF188, há uma redução em torno de 30% em relação ao controle já na menor concentração da droga, entretanto esse valor se manteve independentemente do aumento da dose.

Em geral, a redução média da taxa de invasão sob 20µg/mL de DTCM-g foi de 60% em relação ao controle, chegando a 80% nas linhagens KNS42 e U87. As linhagens SF188 e U251 apresentaram reduções significativas em relação ao controle sob a menor concentração de 2,5µg/mL, diferentemente das outras linhagens, entretanto elas não responderam tão bem ao aumento da dose sendo a máxima redução igual a 30% em SF188 e 59% em U251 em comparação aos 80% das demais linhagens.

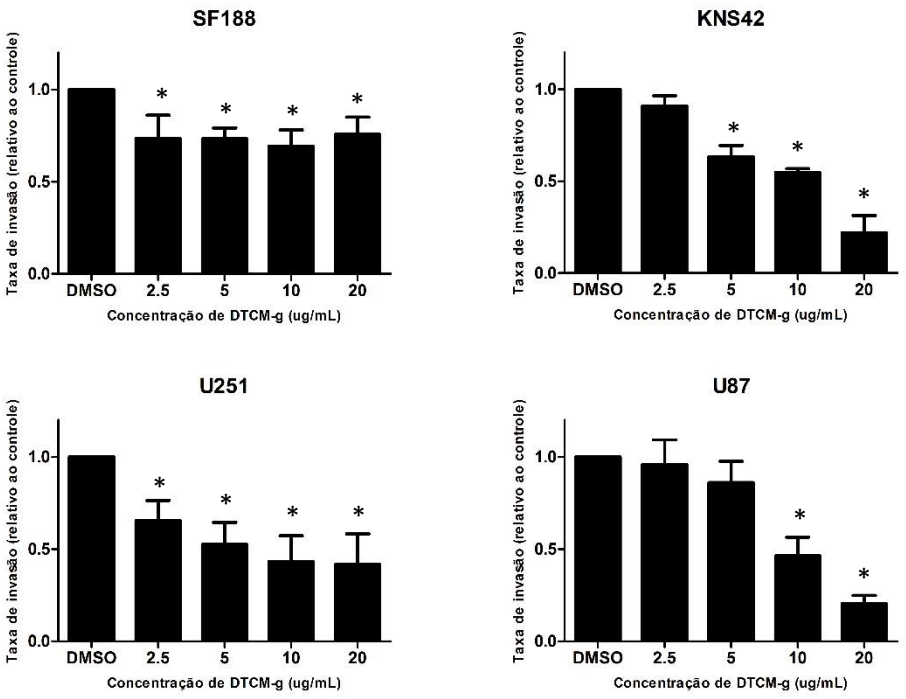

Figura 8. A inibição de AP-1 por DTCM-g reduz significativamente (*p<0,05) a capacidade invasiva de linhagens de GBM.

A expressão dos genes *MMP2* e *uPa*, relacionados ao processo de invasão, foi avaliada por RT-qPCR em três linhagens celulares de Glioblastoma tratadas com 10µg/mL de DTCM-g (**Figura 9**). Os resultados encontrados mostraram um perfil bastante heterogêneo no nível de expressão da *MMP2* entre as linhagens estudadas. Na linhagem U251, foi observado um aumento na expressão de *MMP2* quando comparado ao controle, enquanto que nas demais linhagens observou-se uma diminuição na expressão deste gene, sendo esta mais expressiva na linhagem U87. A expressão do gene *uPa* apresentou-se da mesma forma que de *MMP2*, com um aumento na linhagem U251 e uma redução nas demais. Entretanto, neste caso, a redução na expressão de *uPa* encontrada nas linhagens U87 e SF188 foi menos expressiva que a redução na expressão da *MMP2*.

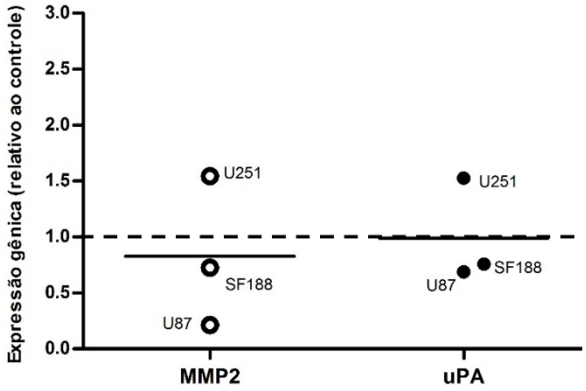

Figura 9. Tratamento com DTCM-g (10µg/mL) induz aumento comparado ao controle na expressão de genes relacionados à invasão na linhagem U251 e redução nas demais linhagens de GBM. A linha tracejada representa a expressão dos genes no controle.

4.6) Efeitos de DTCM-g combinado com Radiação Ionizante

A ação de DTCM-g na eficiência de sensibilização ao tratamento radioterápico foi observada em experimentos preliminares realizados com as três linhagens de glioblastoma capazes de formar colônias. Os resultados observados mostraram que nas três linhagens ocorre um efeito supra-aditivo entre o tratamento com DTCM-g e o radioterápico (TRD>1), portanto este pode ser considerado uma droga radiossenssibilizante (**Tabela II**). A linhagem KNS42 mostrou-se a mais susceptível a radiação sob o efeito do DTCM-g, de forma que o tratamento com a dose de radiação de 2Gy quando combinada com a droga tem sua eficiência clonogênica consideravelmente diminuída, passando de apenas 35% para 87% de redução na capacidade formar colônias. A linhagem U251 também respondeu consideravelmente bem ao tratamento sequencial entre droga e radiação. Diferentemente, a linhagem SF188 apresenta apenas um leve efeito aditivo quando compara-se o tratamento radioterápico sozinho com aquele combinado com DTCM-g (**Figura 10**).

Tabela II. Valores da Taxa de Redução de Dose (TRD) obtidos a partir do pré-tratamento com DTCM-g e irradiação com três diferentes doses. O símbolo ∞ representa ausência completa de colônias. Valores de TRD>1 indicam o efeito supra-aditivo entre DTCM-g e irradiação e apontam-o como uma droga radiossenssibilizante promissora.

Tratamento		Linhagens Celulares		
	Dose de radiação	KNS42	SF188	U251
DTCM-g (10ug/mL)	2GY	4,963	1,146	1,496
	4GY	22,500	1,092	2,548
	6GY	∞	1,338	2,455

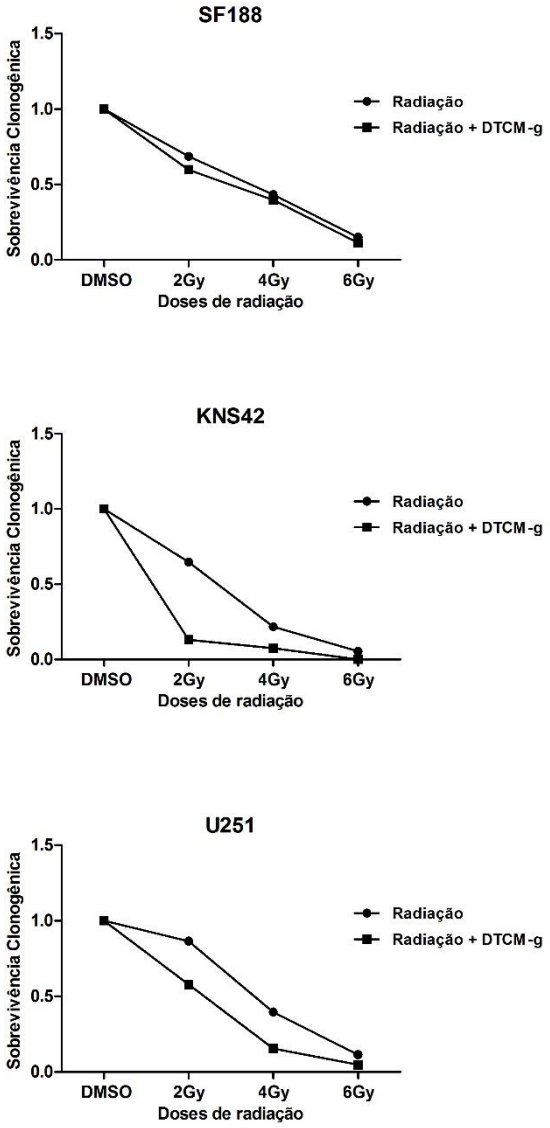

Figura 10. Tratamento com DTCM-g sensibiliza as linhagens de GBM estudadas ao tratamento radioterápico.

Discussão

O DTCM-g atua como inibidor específico do fator de transcrição AP-1 impedindo a translocação do seu componente c-Jun e, consequentemente, a formação da principal composição dimérica do fator e sua atuação na transcrição gênica. Sendo o AP-1 um fator pleiotrópico que atua regulando diversos processos celulares como proliferação, mobilidade, morte e diferenciação celular (Shaulian & Karin, 2002), é assim esperado neste estudo que sua inibição induza alterações nesses processos.

Em células tumorais, a forma de atuação de AP-1 mostra-se variada e até mesmo contraditória dependendo da sua constituição em dímeros, podendo atuar como supressor tumoral ou oncogene (Hess *et al.,* 2004). Dentre os componentes de AP-1 que formam o complexo dimérico estão as proteínas das subfamílias Jun (c-Jun, JunB e Jun D) e Fos (c-Fos, Fos B, Fra1 e Fra2), além das proteínas ativadoras de fatores de transcrição da subfamília ATF (ATF1, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1 e JDP2) e membros da subfamília MAF.

A subunidade c-Jun, cuja translocação nuclear é inibida pelo DTCM-g (Takeiri *et al.,* 2011), apresenta alto potencial de transativação, sendo apontada como indutora de proliferação celular e angiogênese, com propriedades antiapoptóticas e encontrando-se hiperexpressa numa grande variedade de cânceres humanos (Lopez-Bergami *et al.,* 2010). Especificamente em GBM, já foi demonstrado um aumento nos níveis de c-Jun fosforilado e com maior potencial de transativação (Assimakopoulou *et al.,*2004).

O GBM é o tumor mais comum e maligno do SNC e apesar dos avanços da medicina oncológica nos últimos anos, melhorando o processo de diagnóstico bem como da neurocirurgia, o prognóstico da doença continua crítico com a sobrevida dos pacientes mantendo-se em torno de 15 meses (Ferguson, 2011; Lima *et al.*, 2012). Assim, c-Jun/AP-1 apresenta-se como um possível alvo terapêutico e o DTCM-g como um promissora droga no combate a este tipo tumoral.

Neste estudo, linhagens derivadas de GBM pediátrico e adulto apresentaram significativa redução nos índices de proliferação e capacidade clonogênica quando tratadas com DTCM-g, sugerindo a atuação de c-Jun/AP-1 nos processos proliferativos deste tumor.

Tratamentos com outros inibidores de AP-1 também demonstraram efeitos antiproliferativos. A curcumina, substância encontrada no pó amarelo extraído da raiz de uma planta herbácea chamada açafrão-da-índia, é conhecida como inibidora dos fatores de transcrição NF-kB e AP-1 (Kunnumakkara *et al.,* 2008). No caso do AP-1, ela atua diminuindo os níveis de c-Jun fosforilado e, portanto, diminuindo a seu potencial de transativação. Nos últimos anos, ela já apresentou efeitos antiproliferativos em diversos tipos tumorais como câncer de colo de útero (Hu *et al.,* 2013), de próstata (Liu *et al.,*2011) e de pulmão (Mehta *et al.,* 2014).

Em GBM, o tratamento com esta droga resultou também em diminuição da viabilidade celular e capacidade clonogênica (Dhandapani *et al.,* 2007).

TAM67 é um conhecido mutante negativo-dominante de c-Jun, assim, células tumorais cujo TAM67 é transduzido, apresentam inibição de c-Jun/AP-1 (Liu *et al.,* 2002). Diversos tipos tumorais, como cânceres de mama (Liu *et al.,* 2002), de colo de útero (Shimizu *et al.,* 2008), cervical (Maritz *et al.,* 2011) e de esôfago (Luo *et al.,* 2014), apresentaram redução na proliferação quando expressavam essa mutação.

Outro composto que interfere na via do AP-1 é o Flavopirinol, um composto semissintentizado a partir de flavonóides que atua de forma ainda desconhecida. Seus efeitos sob glioblastoma foram descritos por Alonso e colaboradores (2003) mostrando que o tratamento leva a diversos efeitos antitumorais, incluindo a diminuição da viabilidade celular. Quanto ao DTCM-g, resultados semelhantes foram observados em estudos realizados com carcinoma de bexiga e osteossarcoma, evidenciando o efeito antiproliferativo deste com diminuições significativas na proliferação e capacidade clonogênica (Brassesco *et al.,* 2012; 2013).

A influência de c-Jun/AP-1 na proliferação celular pode ser explicada por sua atuação sob a expressão de fatores relacionados a sobrevivência e crescimento como *CSF-1, EGF, EGFR* e *TP53* (Lopez-Bergami *et al.,*2010). Além destes, a expressão de *AP-1* tem sido relacionada com a expressão dos genes antiapoptóticos como *BCL-2* (Eferl & Wagner, 2003) e *BIRC3* (Zhao *et al.,* 2014). Entretanto, apesar do tratamento com DTCM-g levar a reduções na proliferação celular, o ensaio de apoptose mostrou que esta não ocorre devido a indução de morte celular programada, pois, em todas as linhagens de GBM estudadas, não foi observado um aumento na proporção de células apoptóticas nos tratamentos, revelando um possível efeito citostático da droga.

Resultados semelhantes foram observados em estudos com TAM67 em câncer de mama (Liu *et al.,* 2002) e de pulmão (Shimizu *et al.,* 2008), assim como em carcinoma de bexiga e osteossarcoma quando tratados com DTCM-g (Brassesco *et al.,* 2012; 2013). Nos estudos de Dhandapani e colaboradores (2007) o tratamento de células de GBM com curcumina tampouco resultou em aumento da apoptose.

A análise da expressão dos genes antiapoptóticos *BIRC3* e *BCL-2* em todas as linhagens de GBM estudadas após o tratamento com DTCM-g mostrou que a expressão gênica de BIRC3 parece não ser alterada de forma expressiva com a inibição de c-Jun/AP-1, apesar de estudos apontarem relação deste gene com a via do AP-1 (Zhao *et al,.* 2014). Quanto ao *BCL-2*, três das linhagens analisadas apresentaram aumento da expressão dele em resposta ao tratamento com

DTCM-g, explicando a ausência de apoptose nestas linhagens. A diferença comportamental da U87, que apresentou redução na expressão deste gene após tratamento pode ser explicada pelo estado do gene *TP53*, que apresenta-se livre de mutações apenas nesta linhagem (Wang *et al.,* 2004).

Como fator de transcrição, o *TP53* atua inibindo a expressão de *BCL-2* (Vousden & Lu, 2002), entretanto encontra-se também sob controle de c-Jun/AP-1, cujo baixos níveis de expressão já foram relacionados com hiperexpressão de *TP53* (Schreiber *et al.,* 1999). Dessa forma, sugere-se que a inibição de c-Jun por DTCM-g poderia estar envolvida em um aumento da expressão do *TP53* selvagem da linhagem U87 e consequentemente refletindo na inibição do gene *BCL-2*. No caso das demais linhagens, o *TP53* encontra-se mutado não podendo atuar no controle de *BCL-2.*

Entretanto, apesar dos baixos níveis da expressão deste gene antiapoptótico, a linhagem comporta-se como as demais sem aumento na taxa de apoptose. Sendo a apoptose um processo complexo dependente de diversos fatores (Elmore, 2007), é provavel que a alteração na expressão de *BCL-2* não tenha sido suficiente para o desencadeamento do processo apoptótico em um nível significante de células.

Por outro lado, a análise do ciclo celular corroborou com indícios do efeito citostático de DTCM-g nas linhagens de GBM. Nas duas linhagens de GBM pediátrico e em uma das linhagens de GBM adulto observou-se que o tratamento com DTCM-g induz um aumento significativo no número de células na fase G1 do ciclo celular, sugerindo um retardo na passagem para a fase S, o que levaria portanto a uma diminuição na taxa de proliferação.

A ciclina D1 é uma proteína que começa a ser expressa no início da fase G1 do ciclo celular e é necessária para a progressão para a fase S. A expressão dessa proteína é regulada por diversos fatores e dentre eles, o AP-1 (Bariki, 2000). Estudos relatam que c-Jun/AP-1 induz a transcrição de c*iclina D1* (Eferl & Wagner, 2003). Desta forma, um retardo na transição da fase G1 para S após inibição de c-Jun/AP-1 poderia estar relacionado a variação na expressão de *ciclina D1*.

Um estudo recém divulgado com câncer de pulmão de células não pequenas, mostrou que este, quando tratado com Curcumina, apresenta parada na fase G1 do ciclo celular e hipoexpressão da *ciclina D1* em relação ao controle (Lu *et al.,* 2014). Resultados semelhantes foram encontrados em linhagens deste mesmo tumor quando transduzidas com TAM67 (Shimizu *et al.,* 2008). Em carcinoma de bexiga, o tratamento com DTCM-g também alterou a distribuição do ciclo celular acarretando um significante acúmulo de células na fase G1

(Brassesco *et al.,*2012). Esses dados, evidenciando um retardo no ciclo celular na transição G1/S, convergem com os resultados obtidos no trabalho aqui apresentado.

Apesar disto, a análise dos efeitos da inibição de c-Jun/AP-1 através de DTCM-g na expressão da *Ciclina D1* revelou um aumento na expressão deste gene em todas as linhagens, contradizendo a nossa hipótese inicial. No entanto, é importante ressaltar que além de c-Jun/AP-1, outros fatores atuam regulando a expressão de c*iclina D1* como c-Myc, NF-kB e a β-catenina (Witzel *et al.,* 2009; Liao *et al.,* 2007; Tetsu & McCormick., 1999), de forma que efeitos adversos do tratamento com a droga bem como a desregulação de outras vias regidas por c-Jun/AP-1 podem ter resultado no aumento observado na expressão da c*iclina D1*.

Também, além de inibidor de c-Jun/AP-1, Shibasaki e colaboradores (2013) em estudo recente apontaram o DTCM-g como um inibidor da fosforilação da proteína p70s6k pertencente a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, cujo papel está associado à regulação no nível pós traducional das proteínas responsáveis pela progressão do ciclo celular da fase G1 para S (Fingar *et al.,* 2004). Em câncer de próstata inclusive, o tratamento com inibidor de PI3K e p70s6k chamado LY294002 resultou em inibição da proliferação celular e parada na fase G1 do ciclo celular (Gao *et al.,* 2003). Desta forma, além de c-Jun/AP-1, outros fatores envolvidos com o controle do ciclo celular ao serem inibidos por DTCM-g poderiam contribuir para o retardo na transição G1/S observado nas linhagens de GBM estudadas.

Além dos efeitos de DTCM-g na proliferação do GBM, a ação desta droga na capacidade invasiva do tumor também é de suma importância para estudo visto que, um dos principais fatores pelo qual o GBM é considerado um tumor extremamente agressivo é sua alta capacidade de invadir o tecido normal adjacente resultando em altas taxas de recorrência após a cirurgia, mesmo após tratamento com radioterapia e administração do quimioterápico Temozolomida (Furnari *et al.,* 2007; Minniti *et al.,* 2009).

A invasão celular é um processo complexo que envolve o desancoramento da célula do seu local de origem, adesão dela a matriz extracelular próxima, degradação desta matriz e por fim migração da célula para um outro local (Nakada *et al.,* 2007). Dentre as muitas moléculas que participam deste processo, a expressão das matriz-metaloproteínases (MMPs) e de moléculas relacionadas a ativação destas já foram descritas como relacionadas a AP-1.

As MMPs são um grupo de enzimas estruturalmente relacionadas e responsáveis pela degradação de vários componentes da matriz extracelular, como os colágenos fibrilares e não fibrilares, fibronectina, laminina e proteoglicanos (Chintala *et al*.,1999), permitindo assim a migração das células. Diversos estudos apontaram que quando componentes de AP-1 estão superexpressos, a expressão dos *genes MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1, TIMP-3* e *uPa*,

relacionados a processos invasivos, se encontra também aumentada (Hu *et al.,* 2004; Milde-Langosch, 2005; Hsieh *et al.,* 2007; Lin Tsai *et al.,* 2014).

No presente trabalho, foi demonstrado que a inibição de c-Jun/AP-1 por DTCM-g diminuiu a capacidade invasiva em todas as linhagens de GBM estudadas, e o fato da droga não induzir morte celular, aumenta a confiabilidade do teste executado. Resultados semelhantes foram encontrados por Chen e colaboradores (2008) em câncer de pulmão, em que o tratamento com Curcumina resultou na redução da capacidade invasiva e migratória das células tumorais. Da mesma forma, estudos com DTCM-g em osteossarcoma, tumor ósseo pediátrico que apresenta altas taxas de mortalidade em pacientes com eventos metastáticos, e carcinoma de bexiga evidenciaram reduções na taxa de migração e invasão das células tratadas em comparação ao controle (Brassesco *et al.,* 2012, 2013). Em carcinoma de bexiga, a inibição de c-Jun/AP-1 levou a diminuição na expressão dos genes relacionados a invasão *PDPN (Podoplanin), MMP2, TIMP-1* e *TIMP-2* (Brassesco *et al.,* 2012).

A expressão gênica de *MMP2* nas linhagens de GBM tratadas com DTCM-g também foi avaliada neste trabalho e observou-se em duas das três linhagens estudadas uma redução na sua expressão quando comparada ao controle, corroborando com o resultado encontrado em carcinoma de bexiga. Na linhagem U251, apesar de observarmos reduções na capacidade invasiva das células quando tratadas com DTCM-g, a expressão de *MMP2* parece aumentar com o tratamento. O mesmo padrão foi encontrado para a expressão gênica de *uPa*, uma protease que converte o plasminogênio em plasmina que participa da ativação das MMPs (Tsumoda *et al*.,2005).

Sabendo que as linhagens celulares de GBM apresentam diferentes perfis moleculares, outros fatores além de c-Jun/AP-1 poderiam atuar sob a expressão de *MMP2* na linhagem U251 e que a redução na capacidade de invasão seja devido a variações na expressão de outros genes associados a AP-1.

Paralelamente, também avaliamos neste trabalho os efeitos do tratamento combinado de DTCM-g com radiação ionizante. A radioterapia é um dos tratamentos indicados aos pacientes com GBM. Estudos apontam que a adição do tratamento radioterápico a cirurgia aumenta a sobrevida de 4 para aproximadamente 8 meses (Barker *et al.,* 1996) entretanto, esta sobrevida permanece crítica. Dessa forma, drogas que aumentem o efeito da radioterapia são de grande interesse da comunidade médica.

O papel de AP-1 na resposta a radiação ionizante ainda permanece indefinida, entretanto um estudo com câncer de próstata apontou que a resistência a radioterapia estaria

associada a expressão de JunD, Fra-1 e Fra-2, componentes deste fator de transcrição (Kajanne *et al.,* 2009).

Ensaios preliminares de sobrevivência clonogênica combinando DTCM-g com radiacão ionizante revelaram a ação supra-aditiva entre o tratamento com a droga e radioterapia nas linhagens de GBM. Resultados semelhantes já haviam sido descritos em carcinoma de bexiga e osteossarcoma (Brassesco *et al.,* 2012; 2013). Em carcinoma de bexiga, de maneira similar aos resultados encontrados em GBM, a dose de 10ug/mL de DTCM-g foi suficiente para um efeito radiossenssibilizante sob baixas doses de radiação (2Gy e 4Gy), porém em osteossarcoma uma dose mais alta de DTCM-g (20ug/mL) foi necessária para a obtenção deste efeito (Brassesco *et al.,* 2012; 2013). Nossos resultados somados a estes dois trabalhos recentemente publicados apontam o DTCM-g como uma promissora droga radiossenssibilizante.

Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho vem a confirmar os efeitos antitumorais do DTCM-g em GBM adulto e pediátrico, indicando-o como um agente promissor para o tratamento adjuvante no combate ao Glioblastoma.

Conclusão

A partir dos dados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que o DTCM-g possui efeito antiproliferativo em linhagens de GBM adulto e pediátrico. Os estudos *in vitro* demonstraram que a inibição da proliferação após o tratamento com DTCM-g não ocorre devido ao aumento na taxa de apoptose, sugerindo um efeito citostático da droga através do retardo da passagem na fase do ciclo celular G1 para S nas linhagens de GBM tratadas. Quanto a invasão celular, principal responsável pelas altas taxas de recorrência desse tipo de tumor, o tratamento com DTCM-g também demostrou ser capaz de reduzir significativamente a capacidade invasiva das linhagens de GBM adulto e pediátrica. Paralelamente, estudos preliminares com DTCM-g combinado a radioterapia revelaram efeitos supra-aditivos entre os dois tratamentos, sugerindo sua atuação como droga radiossenssibilizante. Dessa forma, os resultados confirmam a ação antineoplásica do DTCM-g, apontando-o como um agente promissor para o tratamento adjuvante no combate ao Glioblastoma.

Referências Bibliográficas

Aikawa Y, Morimoto K, Yamamoto T, Chaki H *et al.* (2008). Treatment of arthritis with a selective inhibitor of c-Fos/activator protein-1. Nat Biotechnol. 26:817–823.

Alonso M, Tamasdan C, Miller DC, Newcomb EW. (2003). Flavopiridol induces apoptosis in glioma cell lines independent of retinoblastoma and p53 tumor suppressor pathway alterations by a caspase-independent pathway. Mol Cancer Ther. 2(2):139-50.

Andersen H, Mejlvang J, Mahmood S *et al.* (2005). Immediate and delayed effects of E-cadherin inhibition on gene regulation and cell motility in human epidermoid carcinoma cells. Mol Cell Biol. 25: 9138-9150.

Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M. (1988). The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product Jun/AP-1. Cell. 55(5):875-885.

Assimakopoulou M, Varakis J. (2001). AP-1 and heat shock protein 27 expression in human astrocytomas. J Cancer Res Clin Oncol. 127(12):727-32.

Bakiri L, Lallemand D, Bossy-Wetzel E, Yaniv, M. (2000). Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. EMBO J. 19, 2056–2068.

Bakiri L, Lallemand D, Bossy-Wetzel E, Yaniv M. (2000). Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. EMBO J. 19(9):2056-68.

Barker FG 2nd, Prados MD, Chang SM, Gutin PH, *et al.* (1996). Radiation response and survival time in patients with glioblastoma multiforme. J Neurosurg. 84(3):442-8.

Bax DA, Little SE, Gaspar N, Perryman L, Marshall L, *et al.* (2009) Molecular and Phenotypic Characterisation of Paediatric Glioma Cell Lines as Models for Preclinical Drug Development. PLoS ONE 4(4): e5209.

Belguise K, Kersual N, Galtier F, Chalbos D. (2005). FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells. Oncogene. 17: 24 (8):1434-44.

Brassesco MS, Pezuk JA, Tone LG *et al.* (2012). Cytostatic in vitro effects of DTCM-glutarimide on bladder carcinoma cells. Asian Pac J Cancer Prev. 13(5):1957-1962.

Brassesco MS, Pezuk JA, Tone LG *et al.* (2013). Activator Protein-1 Inhibition by 3-[(Dodecylthiocarbonyl)Methyl]-Glutamaride Impairs Invasion and Radiosensitizes Osteosarcoma Cells In Vitro. Cancer Biother Radiopharm. [Epub ahead of print].

Chen HW, Lee JY, Huang JY, Wang CC *et al.* (2008). Curcumin inhibits lung cancer cell invasion and metastasis through the tumor suppressor HLJ1. Cancer Res. 15: 68(18):7428-38.

Chintala SK, Tonn JC, and Rao JS. (1999) Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. Int. J. Devl Neuroscience 17 (5-6): 495-502.

David NL, Hiroko O, Otmar DW *et al.* (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Acta Neuropathol. 114 (2): 97–109.

Dhandapani KM, Mahesh VB, Brann DW. (2007). Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkappaB transcription factors. J Neurochem.;102 (2):522-38.

Dhandapani, KM., Mahesh, VB. and Brann, DW. (2007), Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFκB transcription factors. Journal of Neurochemistry, 102: 522–538

Drakos, E. Leventaki V, Schlette EJ *et al.* (2007). c-Jun expression and activation are restricted to CD30+ lymphoproliferative disorders. Am J. Surg. Pathol. 31, 447-453.

Efer R, Wagner EF. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. Nature Reviews Cancer. 3: 859-868.

Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 35(4):495-516.

Endersby R, Baker SJ. (2008). PTEN signaling in brain: neuropathology and tumorigenesis. Oncogene. 18; 27(41):5416-30.

Ferguson, SD. (2011). Malignant Gliomas: Diagnosis and Treatment. Dis Mon; 57:558-569.

Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C, Blenis J.(2004). mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. Mol Cell Biol. 24(1):200-16.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A *et al.* (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. Genes Dev 21(21):2683-710.

Gao N, Zhang Z, Jiang BH, Shi X. (2003). Role of PI3K/AKT/mTOR signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer. Biochem Biophys Res Commun. 310(4):1124-32.

Gaspar, N et al. (2010). MGMT- IndependentTemozolomide Resistence in Pediatric Glioblastoma Cells Associated with PI3-Kinase – MediatedHOX/Stem Cell Gene Signature. Cancer Res: 70: 9243-9252.

Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. J Cell Sci 117 (25): 5965-5973.

Hsieh YS, Chu SC, Yang SF, Chen PN, Liu YC, Lu KH. (2007). Silibinin suppresses human osteosarcoma MG-63 cell invasion by inhibiting the ERK-dependent c-Jun/AP-1 induction of MMP-2. Carcinogenesis. 28(5):977-987.

Hu E, Mueller E, Oliveiro S *et al.* (1994). Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and -independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes. The EMBO Journal. 13(13): 3094-3103.

Kajanne R, Miettinen P, Tenhunen M, Leppä S. (2009). Transcription factor AP-1 promotes growth and radioresistance in prostate cancer cells. Int J Oncol. 35(5):1175-82.

Katabami M, Donninger H, Hommura F *et al.* (2005). Cyclin A is a c-Jun target gene and is necessary for c-Jun-induced anchorage-independent growth in RAT1a cells. J Biol Chem 280 (17):16728-16738.

Kharman-Biz A, Gao H, Ghiasvand R *et al.* (2013). Expression of activator protein-1 (AP-1) family members in breast cancer.BMC Cancer. 28;13 (1):441.

Kunnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB. (2008). Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. Cancer Lett. 8; 269 (2):199-225.

Leaner VD, Chick JF, Donninger H, *et al.* (2009). Inhibition of AP-1 transcriptional activity blocks the migration, invasion, and experimental metastasis of murine osteosarcoma Pathol. 174 (1): 265-75.

Liao DJ, Thakur A, Wu J, Biliran H, Sarkar FH. (2007). Perspectives on c-Myc, Cyclin D1, and their interaction in cancer formation, progression, and response to chemotherapy. Crit Rev Oncog. 13(2):93-158.

Lima, FRS et al. (2012). Glioblastoma: Therapeutic challenges, what lies ahead. Biochimica et Biophysica Acta. 1826: 338–349.

Lin-Tsai O, Clark PE, Miller NL *et al.* (2014). Surgical intervention for symptomatic benign prostatic hyperplasia is correlated with expression of the AP-1 transcription factor network. Prostate. 74 (6): 669-79.

Liu S, Wang Z, Hu Z et al. (2011). Anti-tumor activity of curcumin against androgen-independent prostate cancer cells via inhibition of NF-κB and AP-1 pathway in vitro. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 4:530-4.

Liu Y, Ludes-Meyers J, Zhang Y *et al.* (2002). Inhibition of AP-1 transcription factor causes blockade of multiple signal transduction pathways and inhibits breast cancer growth. Oncogene. 21(50):7680-9.

Livak, KJ, Schmittgen,TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods; 25(4):402–408.

Lopez-Bergami P, Lau E, Ronai Z. (2010). Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. Nat Rev Cancer. 10(1): 65-76.

Lu Y, Wei C, Xi Z. (2014). Curcumin suppresses proliferation and invasion in non-small cell lung cancer by modulation of MTA1-mediated Wnt/β-catenin pathway. In Vitro Cell Dev Biol Anim. [Epub ahead of print]

Luo A, Yu X, Li G, Ma G, Chen H *et al.* (2014) Differentiation-Associated Genes Regulated by c-Jun and Decreased in the Progression of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. PLoS ONE 9(5): e96610.

Maritz MF, Van der Watt PJ, Holderness N, Birrer MJ, Leaner VD. (2011). Inhibition of AP-1 suppresses cervical cancer cell proliferation and is associated with p21 expression. Biol Chem. 392(5):439-48.

Masui K, Cloughesy TF, Mischel PS. (2012). Review: molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies. Neuropathol Appl Neurobiol. 38(3):271-91.

Mehta HJ, Patel V, Sadikot RT. (2014). Curcumin and lung cancer-a review. Target Oncology. [Epub ahead of print].

Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I *et al.* (2005). Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. N Engl J Med.353 (19): 2012-24.

Milde-Langosch K. (2005). The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. Eur J Cancer. 41(16):2449-2461.

Minniti G, Muni R, Lanzetta G *et al.* (2009). Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents. Anticancer Res 29(12):5171-84.

Nakada, M, Nakada, S, Demuth, T *et al.* (2007). Molecular targets of glioma invasion. Cell Moll Life Sci. 64(4): 458-78.

Ouyang, X, Jessen WJ, Al-Ahmadie H *et al.* (2008). Activator protein-1 transcription factors are associated with progression and recurrence of prostate cancer. Cancer Res. 68, 2132–2144

Pollack, IF. (1994). Current concepts: brain tumors in children. N Engl J. Med. 331: 1500–1507.

Prusty, BK. & Das, BC. (2005). Constitutive activation of transcription factor AP1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP1 activity in HeLa cells by curcumin. Int. J. Cancer 113, 951–960.

Schreiber M, Kolbus A, Piu F, Szabowski A, Möhle-Steinlein U, Tian J, Karin M, Angel P, Wagner EF. (2007). Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. Genes Dev. 13(5):607-19.

Shaulian E, Karin M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. Oncogene. 20(19):2390-2400.

Shaulian E, Karin M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. Nat Cell Biol. 4(5):131-136.

Shaulian E. (2010). AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? Cell Signal. 22(6):894-899.

Shibasaki S, Yamashita K, Goto R *et al.* (2013). .Immunosuppressive effects of DTCM-G, a novel inhibitor of the mTOR downstream signaling pathway. Transplantation. 27;95 (4):542-50.

Shimizu Y, Kinoshita I, Kikuchi J *et al.* (2008). Growth inhibition of non-small cell lung cancer cells by AP-1 blockade using a cJun dominant-negative mutant. Br J Cancer. 98(5):915-22.

Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP. (1990). Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. Proc Natl Acad Sci U S A. 87(21): 8602–8606.

Takada Y, Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. (2008). Flavopiridol suppresses tumor necrosis factor-induced activation of activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), p44/p42 MAPK, and Akt, inhibits expression of antiapoptotic gene products, and enhances apoptosis through cytochrome c release and caspase activation in human myeloid cells. Mol Pharmacol. 73(5):1549-1557.

Takeiri M, Tachibana M, Kaneda A *et al.* (2011). Inhibition of macrophage activation and suppression of graft rejection by DTCM-glutarimide, a novel piperidine derived from the antibiotic 9-methylstreptimidone. Inflamm Res. 60(9):879-888.

Tetsu O, McCormick F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. Nature. 398(6726):422-6.

Tsunoda K, Kitange G, Anda T, Shabani HK, *et al*. (2005) Expression of the constitutively activated RelA/NF-kB in human astrocyticmtumors and the in vitro implication in the regulation of urokinase-type plasminogen activator, migration, and invasion. Brain Tumor Pathol 22:79–87.

Vasilevskaya IA, O'Dwyer PJ. (1999). Effects of geldanamycin on signaling through activator-protein 1 in hypoxic HT29 human colon adenocarcinoma cells. Cancer Res. 59(16):3935-40.

Vogt PK. (2001). Jun, the oncoprotein. Oncogene. 20: 2365 – 2377.

Wang Y, Zhu S, Cloughesy TF, Liau LM, Mischel PS. (2004). p53 disruption profoundly alters the response of human glioblastoma cells to DNA topoisomerase I inhibition. Oncogene. 23(6):1283-90

Witzel II, Koh LF, Perkins ND. (2010). Regulation of cyclin D1 gene expression. Biochem Soc Trans. 38(Pt 1):217-22

Zhao C, Qiao Y, Jonsson P, Wang J, Xu L *et al.* (2014). Genome-wide profiling of AP-1-regulated transcription provides insights into the invasiveness of triple-negative breast cancer. Cancer Res. 74(14):3983-94.

.