

Tales Henrique Andrade da Mota

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DO INIBIDOR DE  
TELOMERASE MST-312 EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO

Brasília 2019

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Tales Henrique Andrade da Mota

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DO INIBIDOR DE  
TELOMERASE MST-312 EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Doralina do Amaral Rabello Ramos

Brasília

2019

Tales Henrique Andrade da Mota

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DO INIBIDOR DE  
TELOMERASE MST-312 EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Banca examinadora

Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira

Presidente, Universidade de Brasília

Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann

Membro titular, Universidade de Brasília

Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo

Membro titular, Universidade de Brasília

Prof. Dr. Rodrigo Haddad

Membro suplente, Universidade de Brasília

Dedico esse trabalho aos meus pais;

Ao meu grupo de pesquisa;

Aos meus amigos e namorada;

Aos trabalhadores que pagam impostos, os quais financiaram  
minha pesquisa;

Aos que precisam de tratamento para o câncer;

Por fim à Deus.

Há pessoas que choram por saber que as rosas têm espinho. Há outras que sorriem por saber que os espinhos têm rosas!

Machado de Assis

## **Agradecimentos**

Deus venho aqui hoje lhe agradecer  
Por ter me dado uma excelente família  
Todos meus dias foram de alegria  
E por isso sigo meu sonho de viver

Meu orientador já virou velho amigo  
O amor, graças a Mariana, foi reencontrado  
Por meu irmão estar sempre ao meu lado  
Senhor, obrigado por estar sempre comigo

Minha coorientadora todo aluno quer ter  
Ela é inteligente e tem um bom coração  
Mais uma vez tenho de agradecer a você

Desejo a todos, dias como esses meus  
Que alegria foi terminar essa dissertação  
Por fim, mais uma vez obrigado, Deus!

## Resumo

O câncer é uma doença extremamente complexa, que tem similaridade intrínseca com o tecido saudável e ainda hoje existe várias pesquisas que buscam uma terapia menos agressiva e mais específica para o tratamento do câncer. Uma alternativa para a terapêutica da doença é testar novas moléculas seja natural seja sintética. Nesse estudo foi analisado o efeito do MST-312, um composto derivado do galato de epigalocatequina, em linhagem de glioblastoma humano por dois períodos de exposição: curto e longo prazo. Em longo prazo, foi demonstrado que as células conseguiram driblar o efeito do composto e a partir de 200 dias de exposição desenvolveram mecanismo de resistência que as permitiram ter uma sobrevivência comparável à do controle. Além disso, a expressão relativa do gene da telomerase (*hTERT*) não se mostrou alterado em nenhum momento do tratamento. Já em curto prazo, o composto apresentou efeito tóxico na linhagem original e nas culturas monoclonais produzidas a partir desta; contudo, na linhagem policlinal com o gene da *hTERT* silenciado, foi visto que o efeito do MST-312 foi menor em relação aos controles. Também foi demonstrado que o composto é capaz de induzir apoptose, que é precedida de parada na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> do ciclo celular. Por conseguinte, é possível concluir que o MST-312 é citotóxico para células de glioma da linhagem U251, atuando por mecanismo de ação que envolve a enzima telomerase, embora não repercuta em redução dos telômeros, já que o efeito foi observado em curto prazo, de modo que o papel dessa enzima no controle do ciclo celular em células tumorais torna-se evidente, apontando possíveis novas abordagens no desenvolvimento de fármacos antitumorais.

## **Abstract**

Cancer is an extremely feared and complex disease, which has intrinsic similarity to the healthy tissue of origin and there is a constant search for less aggressive and more specific treatment for cancer. Therefore, several studies have been testing new natural and synthetic molecules. In this study, the effect of telomerase inhibitor MST-312, a derivative of epigallocatechin gallate, was analyzed in human glioblastoma cells, with a long or short time exposure. In the long time exposure, it was demonstrated that cells were able to overcome the drug effect, and after 200 days of exposure they developed a mechanism of resistance that allowed them to survive; the relative expression of hTERT was not altered in this long time exposure. In the short term, the compound showed a toxic effect on the non-transfected lineage as well as on the control clones selected from that lineage. However, in the polyclonal lineage, with silenced hTERT, MST-312 was unable to reduce cell viability, compared to the control cells. Therefore, it is possible to suggest that in the short term MST-312 is toxic for U251 cells, acting through a mechanism dependent on the telomerase, even though the telomeres length was not affected. In the long term treatment, cells were able to develop resistance mechanisms in order to survive, The role of the telomerase enzyme in the cell cycle control of malignant cells become evident, pointing out to new possible approaches to the development of antitumoral drugs.



## Lista de figuras

Figura 1. Localização do telômero no cromossomo e sua estrutura.	18
Figura 2. Estrutura da telomerase.	19
Figura 3. Estrutura química do MST-312.	21
Figura 4. Imagem representativa da seleção clonal.	28
Figura 5. Atividade do MST-312 sobre as células de U251 tratadas por 24 horas.	30
Figura 6. Atividade do MST-312 sobre as células de U251 tratadas por 48 horas	30
Figura 7. Atividade do MST-312 sobre as células de U251 tratadas por 72 horas.	31
Figura 8. Figura representativa do tratamento a longo prazo.	33
Figura 9. Citometria de Fluxo de apoptose e parada de ciclo celular.	35
Figura 10. Teste da puromicina e transfecção celular.	36
Figura 11. Linha do tempo da seleção clonal e RT-qPCR dos clones.	37
Figura 12. Testes com o MST-312 nas linhagens U251 policlonais transfectadas, com o gene <i>hTERT</i> silenciado.	38
Figura 13. MTT por 72 horas nas linhagens U251 monoclonais.	39
Figura 14. Tempo de duplicação de todas as linhagens.	40
Figura 15. Possível mecanismo de ação do MST-312 na linhagem U251.	48

## **Lista de tabelas**

Tabela 1. Dados das células testadas a curto prazo, com IC50% de 24, 48 e 72 horas; expressão de *hTERT* e tempo de duplicação. 41

## **Lista de abreviaturas e siglas**

- (*AAT*) alongamento alternativo de telômero.
- (*ABCG2*) transportador G2 ABC.
- (*BCNU3*) carmustina.
- (*CCNU1*) lomustina.
- (*cDNA*) DNA complementar.
- (*C<sub>q</sub>*) ciclo de quantificação.
- (*CXCR7*) C-X-C Motif Chemokine Receptor 7.
- (*DANT*) doenças e agravos não transmissíveis.
- (*DF-1*) fibroblastos embrionários de galinha.
- (*DMEM*) dulbecco's Modified Eagle's Medium.
- (*DMF*) dimetilformamida.
- (*DMSO*) dimetilsulfoxido.
- (*DNA*) ácido desoxirribonucleico.
- (*GB*) glioblastoma.
- (*GHET1*) gastric Carcinoma Proliferation Enhancing Transcript.
- (*hTERT*) human telomerase reverse transcriptase.
- (*hTR*) template utilizado para alongar o telômero.
- (*IDH*) Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+)) 1, Cytosolic.
- (*KD*) = knock-down.
- (*LEF*) lymphoid Enhancer Binding Factor 1.
- (*LINC01503*) long Intergenic Non-Protein Coding RNA 1503.
- (*MST-312*) N,N'-1,3-Phenylenebis-[2,3-dihydroxy-benzamide].
- (*OMS*) organização mundial de saúde.

(*PCR*) reação da Polimerase em Cadeia.

( $R^2$ ) coeficiente de correlação.

(*RNA*) ácido ribonucleico.

(*RT*) transcriptase reversa.

(*RT-qPCR*) reação da polimerase em cadeia quantitativa com transcriptase reversa.

(*SDS*) dodecil sulfato de sódio.

(*shRNA*) short hairpin RNA.

(*TPP1*) Triplo fosfato isomerase 1.

(*WnT*) proto-Oncogene Int-1 Homologo.

( $\Delta\Delta CT$ ) Delta-Delta-Ct.

## Sumário

<b>Introdução</b> .....	14
<b>1.1 Epidemiologia do câncer</b> .....	14
<b>1.2 Gliomas</b> .....	16
<b>1.3 Imortalização celular</b> .....	17
<b>1.4 Inibidores da telomerase</b> .....	20
<b>1.5 O inibidor da telomerase MST-312</b> .....	21
<b>Objetivo geral</b> .....	22
<b>Objetivos Específicos</b> .....	22
<b>Justificativa</b> .....	23
<b>Metodologia</b> .....	24
<b>Estratégia metodológica</b> .....	24
<b>Seleção da linhagem</b> .....	24
<b>Cultura de células e tratamento com MST-312</b> .....	24
<b>Análise do tempo de duplicação pelo teste do MTT</b> .....	25
<b>Análise de viabilidade celular pelo teste de MTT</b> .....	25
<b>Determinação de IC<sub>50%</sub></b> .....	25
<b>Avaliação morfológica</b> .....	26
<b>Análise de expressão gênica de <i>hTERT</i></b> .....	26
<b>Avaliação de morte celular</b> .....	27
<b>Análise da distribuição nas fases do ciclo celular</b> .....	27
<b>Transfecção</b> .....	27
<b>Seleção clonal</b> .....	28
<b>Análise estatística</b> .....	29
<b>Resultados</b> .....	29
<b>Atividade citotóxica do MST-312 em células de U251</b> .....	29
<b>Atividade do MST-312 em exposição a longo prazo</b> .....	32
<b>Atividade do MST-312 em exposição a curto prazo</b> .....	35
<b>Discussão</b> .....	41
<b>Conclusão</b> .....	49
<b>Referencias</b> .....	50

## **Introdução**

### **1.1 Epidemiologia do câncer**

Hoje é certo que a neoplasia maligna, câncer, é uma doença caracterizada como sendo um problema social de largo espectro para a saúde pública (NEWTON et al., 2019; QUIRINO, 2013). Dessa forma foi travada uma espécie de guerra contra o câncer, em âmbito mundial, que aparentemente está longe de ser vencida, devido ao fato de as células cancerosas serem extremamente semelhantes às normais e por apresentarem mecanismos de defesa complexos, o que torna o combate ao câncer um desafio a ser vencido (KOGANI, G. et al., 2008).

Neoplasia é caracterizada por uma nova massa que se origina de um crescimento anormal de células, podendo ser benigna ou maligna. A lesão neoplásica benigna tem seu crescimento algumas vezes mais lento, de forma organizada e com os limites bem nítidos, não fazendo a invasão de outros tecidos (KARIM, F; CHANDRA, S. R, 2017). Já a maligna é caracterizada por conseguir invadir localmente e outros tecidos fazendo o que é chamado de metástase (KNOWLES et al., 2018).

Ao observar dados da OMS fica claro que o câncer é um dos maiores problemas de saúde pública. A estimativa mundial mostrou que no ano de 2012 apareceram cerca de 14 milhões de novos casos de câncer e aproximadamente oito milhões de óbitos, e que desses foi possível distinguir uma maior mortalidade para o sexo masculino de aproximadamente 57%. Genericamente e por motivo das pessoas destes países terem a maior sobrevivência, as maiores taxas de incidência foram vistas em países desenvolvidos como o Japão, Coreia do Sul, Austrália, Nova Zelândia e nações da América do Norte. Taxas medianas são vistas no leste europeu, China e alguns países da América Central e do Sul. As menores taxas são vistas na África e na Índia. Em lugares mais desenvolvidos, os problemas estão associados com a evolução das cidades e seu desenvolvimento urbanístico, com os tipos mais comuns da doença sendo de pulmão, próstata, mama feminina, cólon e reto. Já nos países menos desenvolvidos, o surgimento do câncer está mais ligado a problemas decorrentes de infecção, de maneira que as formas mais frequentes são de colo do útero, estômago, esôfago e fígado. Destarte, apesar de serem menos incidentes, as taxas de mortalidade dos cânceres associados a processos

infecciosos representam grande parte dos óbitos no mundo (MARTIN-LOECHES et al., 2019).

No Brasil, é estimado que nos anos de 2018 e 2019 haja um total de um milhão e duzentos mil novos casos de câncer (INCA 2018). O cálculo feito por FERLAY e colaboradores estimou a ocorrência de seiscentos e quarenta mil novos casos por ano na Europa, estimativa essa que mostra altas taxas da doença e diferentes subtipos (FERLAY et al., 2013).

Nos diversos estados do Brasil, existe uma grande diversidade dos tipos de câncer, mas a maior incidência de câncer está na região sudeste e no Sul, onde se concentram os 70% de novos casos da doença no país, de modo que na região sudeste está a maior parte do percentual citado. Nas regiões sul e sudeste, o predomínio é de casos de câncer de próstata, pele não melanoma, mama feminina, pulmão e intestino. No centro-oeste, além de todos os tipos citados para a região sudeste e sul, também há alta incidência de câncer de colo do útero e estômago. Para a região norte e nordeste também há uma estimativa de novos casos elevada de cânceres de mama e de próstata, além de uma significativa incidência de câncer de estômago e colo do útero (INCA 2018).

Mesmo com a capacidade de se originar em diversos tecidos, ainda não se sabe definir especificamente quando e como o câncer vai aparecer, isso porque há vários fatores relacionados com seu surgimento, ou seja, essa doença é classificada como multifatorial e complexa (XIU et al, 2015), tendo como exemplos de fatores de risco, o histórico familiar, a falta de atividade física, a alimentação inadequada, o fumo, o uso de bebidas alcoólicas, a idade, dentre outros (MATSUDO et al.,2001; LI et al., 2019).

Uma boa alimentação, bem como a prática de atividades físicas de maneira regular, podem ajudar na prevenção do câncer, isso porque uma nutrição inadequada está ligada a mais de 20% dos casos de câncer em países em desenvolvimento, como o Brasil. Estima-se que se a população tivesse uma alimentação de melhor qualidade e mais adequada, associada com a prática de exercício físico, cerca de 33% dos cânceres poderiam ser evitados. Essa doença geralmente é altamente complexa de ser tratada, de modo que a prevenção, quando possível, é extremamente recomendada (PITANGA,2008; LUGO et al., 2019).

## 1.2 Gliomas

Os tumores primários do sistema nervoso central são extremamente complexos de serem tratados, estando em terceiro lugar nas causas mais comuns de óbito na faixa etária de 15 a 34 anos de idade (OSBORNE. et al., 2001). Dentre eles está o glioma, o tumor primário mais comum no sistema nervoso central (HA et al., 2019).

Em 2016, a OMS anunciou mudanças na classificação dos gliomas. Anteriormente, tais tumores eram classificados, unicamente, com base na histologia e a semelhança fenotípica e morfológica quando comparados com tecidos saudáveis. Entretanto, com a nova classificação, além de levar em conta as mudanças histopatológicas que ocorrem no tecido, também está sendo considerada a presença de marcadores genéticos (MOLINARI; CURRAN; GRANT, 2019).

Os tumores do sistema nervoso central são, portanto, divididos em 4 classes diferentes, sendo os de grau III e IV os mais agressivos. O glioblastoma (GB) é classificado como grau IV e tem alguns subtipos, como o glioblastoma IDH tipo selvagem, que corresponde a 90% dos casos e acomete principalmente pacientes com mais de 55 anos de idade, e o glioblastoma IDH tipo mutante (10% dos casos), que acomete preferencialmente pacientes mais novos. O IDH é um gene relacionado a vias de sinalização do metabolismo, principalmente de carbono, e sua mutação está fortemente relacionada ao surgimento de astrocitomas, oligodendroglioma e glioblastoma. (SASAKI; YOSHIDA, 2017; LOUIS et al., 2016).

Os GBs conseguem se infiltrar e invadir tecidos adjacentes, além de ter uma propensão de disseminar pela região cranioespinhal, com ausência de delimitação anatômica, tornando-se assim, na maioria dos casos, uma neoplasia difícil de ser tratada (TAYLOR et al., 2012). Por ser uma doença silenciosa nos primeiros estágios, com alta heterogeneidade genética, a maioria dos GBs não é diagnosticada precocemente, quando ainda se encontra no grau I, o que torna mais difícil o tratamento da doença (YAN et al., 2011).

Os principais fármacos utilizados para o tratamento do glioma incluem a temozolamina, o agente cloroetilante BCNU3 (carmustine) e o CCNU1 (lomustine), que são quimioterápicos utilizados sozinhos ou combinados, acompanhados quando couber de tratamentos cirúrgicos. Mas mesmo com essas opções de tratamentos, a taxa de



sobrevida para pacientes com essa doença ainda é mínima (ZHANG et al., 2018; PETÖVÁRI et al., 2019).

Nos últimos anos, a luta contra o câncer vem crescendo drasticamente, sendo a busca por novas terapias estudada de maneira intensa, mas com sucesso limitado. De maneira que um dos maiores desafios para o tratamento dos gliomas, e principalmente para a sua forma mais agressiva, o glioblastoma, é desvendar de forma precoce sua localização e conseguir decifrar sua biologia complexa e heterogênea (DIAO et al., 2019) (DELGADO-LÓPEZ; CORRALES-GARCÍA, 2016).

### **1.3 Imortalização celular**

O tumor, para que se torne invasivo, precisa passar por algumas etapas, como a perda do controle da proliferação celular, algum mecanismo de manutenção telomérica que tenha capacidade de manter a imortalização celular, mudança nos cromossomos, alterações na membrana celular que dificultam o reconhecimento célula-célula, perda da diferenciação, capacidade de realizar a invasão de diferentes tecidos e a capacidade de realizar angiogênese (MARQUES., 2016).

A imortalização celular é um processo indispensável para a formação do câncer. De acordo com pesquisas realizadas, é sabido que uma célula normalmente tem um potencial finito de se dividir, de maneira que existe um limite. Tal limite, quando alcançado, gera uma sinalização que faz com que a célula se torne senescente ou entre em crise mitótica (VON MORGEN; MACIEJOWSKI, 2018). No primeiro caso, a proliferação celular é cessada, todavia a célula mantém a viabilidade (TOLEDO et al., 2005). No segundo caso, é iniciado o processo de crise telomérica que geralmente leva à apoptose (ZHONG et al., 2018). Não obstante, as células tumorais adquirem a capacidade de ir além das possibilidades citadas, bem como de se dividir de maneira ilimitada, tornando-se imortais (WEINBERG, 2008; A PICKETT; REDDEL, 2015).

Os telômeros, indispensáveis no processo da imortalização, são estruturas que fazem parte do DNA e apresentam sequências repetidas de TTAGGG que fazem parte da heterocromatina (Figura 1) (MARTENS et al., 2018). Eles são ricos em guanina, tendo um tamanho que varia de 4 a 15 quilo bases (BASU et al., 2013; FEIJOO et al., 2014). Dentre suas principais funções, estão as de manter a integridade cromossômica,

estabelecer uma estrutura tridimensional do núcleo celular e de agir como um relógio biológico da célula, no âmbito das divisões celulares (TEIXEIRA, et AL., 2010).

Elizabeth Blackburn, bióloga especializada em biologia molecular, estudou os telômeros e em 2009 conseguiu ganhar o prêmio Nobel. Ela, juntamente, de sua equipe, Carol W Greider e Jack W Szostak, viram como os cromossomos são protegidos pelos telômeros e pela telomerase (VARELA; A BLASCO, 2010).

O telômero é ligado a um complexo proteico de seis proteínas chamadas de shelterinas, as quais desempenham função de proteção bem como de manutenção telomérica (LUSTIG, 2019). Também é de relevância mencionar que alterações epigenéticas estão intrinsicamente ligadas aos mecanismos citados acima, onde proteínas capazes de metilar histonas promovem alterações na cromatina e no tamanho de telômero (CACCHIONE; BIROCCIO; RIZZO, 2019).

Nas células somáticas, o telômero tem uma redução natural de tamanho toda vez que é finalizado um ciclo celular. Assim, ao término de sucessivas divisões, a capacidade proliferativa da célula pode chegar ao seu limite, desencadeando uma sinalização celular específica que pode levar à senescência e apoptose. Sendo assim, os telômeros funcionam como uma espécie de relógio biológico, pois eles podem marcar o fim da capacidade de divisão celular (WEINBERG, 2008; BAR e BLASCO, 2016).

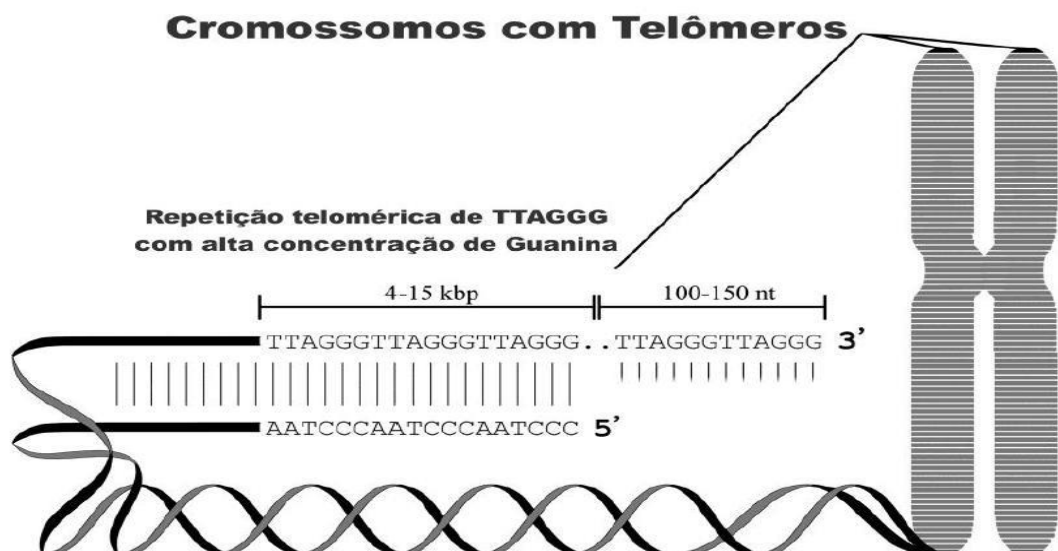


Figura 1. Localização do telômero no cromossomo e sua estrutura (Adaptado de PEREIRA Jr, 2008).

Por ter uma estrutura molecular complementar à da telomerase, os telômeros permitem o anelamento dessa enzima, que por sua vez consegue fazer o alongamento telomérico, como visto em trabalhos como o de Hannen e Bartsch (2018), onde aproximadamente 85% a 90% dos tumores utilizam a telomerase para tal atividade, deixando assim as células com capacidade proliferativa aumentada (CESARE E REDDEL, 2010).

A telomerase é uma ribonucleoproteína composta por duas subunidades diferentes, uma é a chamada *hTR*, que é uma subunidade de RNA que atua como molde. Já a segunda é a *hTERT*, parte proteica, cuja função é de transcriptase reversa. A *hTR* tem 461 nucleotídeos, cuja estrutura rica em guanina (Figura 2) permite a interação da sequência molde com seu domínio funcional (*hTERT*). Tal ligação promove a atividade enzimática capaz de replicar o DNA telomérico (HAJJ et al., 2018; SANTOS et al., 2017).

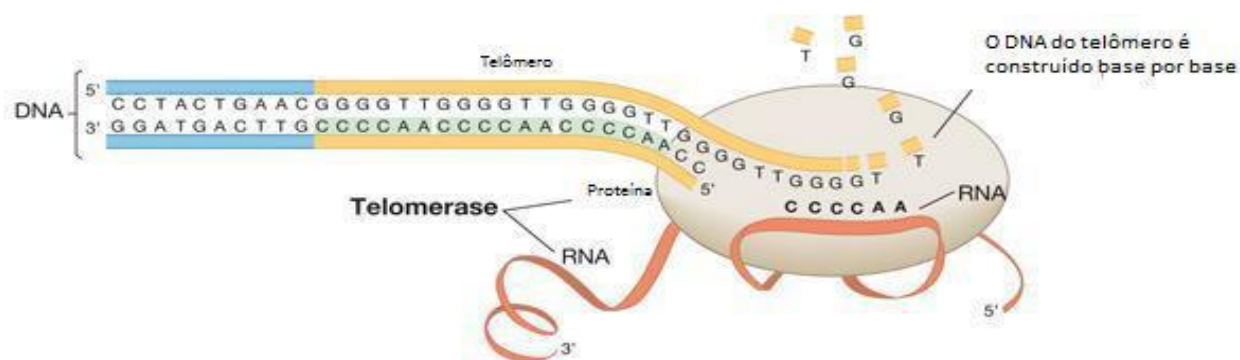


Figura 2. Estrutura da telomerase: complexo enzimático terminal transferase ribonucleoprotéico. Fonte: <http://www.spektrum.de/news/verkappt-zur-unsterblichkeit/1009938> (Acessado em 13/05/2018 às 23h09min).

Normalmente, a telomerase se encontra ativa nas células germinativas, progenitoras, algumas células do sistema imunológico e nas células do sistema embrionário, mas não nas células somáticas. As células do estágio embrionário, com o passar do tempo, começam a suprimir a enzima, tornando-a inativa (ISHAQ et al., 2016; KARP, 2005).

A *hTR* é comumente encontrada em diversas células do corpo humano, enquanto a *hTERT* é mais restrita e a sua expressão geralmente está mais associada à atividade da telomerase em si. Além disso, a *hTERT* serve como cofator do complexo de transcrição  $\beta$ -catenina/LEF na via de sinalização do *Wnt*, e também pode estar associado a outros diversos locais do cromossomo (SERAKINCI; TIBER; ORUN, 2018; ZHANG et al., 2017). Destarte, mesmo atuando em outras vias, a *hTERT* é um fator essencial para a

função da telomerase, de modo que torna essa enzima um alvo de extrema relevância e interesse para fins terapêuticos no câncer (LEÃO et al., 2018), porque ela está presente na maioria das células tumorais e ausente em grande parte dos tecidos saudáveis. Posto isso, uma abordagem terapêutica interessante, que vem sendo intensamente pesquisada, seria a utilização de inibidores de telomerase para tratar o câncer.

#### **1.4 Inibidores da telomerase**

O câncer é uma doença que surgiu há muito tempo (DAVID & ZIMMERMAN, 2010), existindo inúmeros estudos, no mundo todo, que buscam tratamentos mais eficientes (SEIMIYA, 2006; BLOCK et al., 2015; TURCOTTE et al., 2017). Uma alternativa válida para tratar essa enfermidade é a utilização de inibidores da telomerase, considerando que a maioria das neoplasias malignas utilizam essa enzima para se manterem imortalizadas. Porém, não se pode esquecer que também existem as neoplasias malignas que conseguem manter a estrutura telomérica mesmo na ausência da telomerase, ou seja, por um mecanismo alternativo, chamado de alongamento alternativo de telômero AAT (Chen et al., 2010), o que configura uma rota de escape para as células que forem tratadas com tais inibidores de telomerase. Assim, mesmo sabendo que os inibidores da telomerase ainda não são usados na prática clínica, a inibição da atividade desta enzima continua sendo uma ação farmacológica de extrema relevância, desde que o tratamento não leve as células a uma pressão seletiva que resulte em um tumor com fenótipo AAT (VITIS; BERARDINELLI; SGURA, 2018).

Várias moléculas vêm sendo estudadas como inibidores da telomerase. Elas começaram a ser estudadas com a finalidade de impedir o funcionamento dessa enzima para levar ao encurtamento dos telômeros, com posterior ação de senescência, gerando danos mínimos às demais células (FRINK et al., 2016).

O composto sintético BIRB-1532, por exemplo, compromete o potencial da enzima de fazer a transcrição reversa, levando a célula à senescência de maneira dose dependente (PASCOLO et al., 2002) e sem apresentar efeito contra células normais (DAMM, 2001). Outra classe frequentemente citada na literatura é a das moléculas estabilizadoras do G quadruplex, que conseguem estabilizar o DNA nesta estrutura, fazendo com que a telomerase não consiga prosseguir com sua atividade de alongamento telomérico (MAJI; BHATTACHARYA, 2014).

Recentemente, o pantoprazol, medicamento usado para refluxo gástrico foi apresentado como um possível inibidor da telomerase em carcinomas gástricos, por promover um rompimento da interação do *STAT3* com o gene do *hTERT* (ZHANG et al., 2019). Também não se deve esquecer do imetelstat, que se mostrou um fármaco promissor. Ela se liga ao *hTR* e bloqueia a região que a telomerase usa para fazer a transcrição reversa e assim formar o telômero (SCHRANK et al., 2018).

Por fim, dentre os vários inibidores, existe o MST-312 que é um composto descoberto recentemente e que atua por inibição direta da telomerase (GURUNG et al., 2014), mostrando potencial para ser utilizado no tratamento de alguns tipos de câncer, desde que seja provada sua eficiência clínica.

### 1.5 O inibidor da telomerase MST-312

O MST-312 é molécula sintética (figura 3) baseada em um extrato do chá verde, galato de epigallocatequina, com o potencial de inibir a telomerase (SEIMIYA *et al.*, 2002; WAGHORN et al., 2017). Em diversos estudos, já está sendo demonstrado que esse composto apresenta ação antiproliferativa, em curto prazo, que pode induzir parada no ciclo celular, senescência ou apoptose em diferentes linhagens de células tumorais (SERRANO *et al.*, 2011; GURUNG *et al.*, 2014; GURUNG et al., 2015).

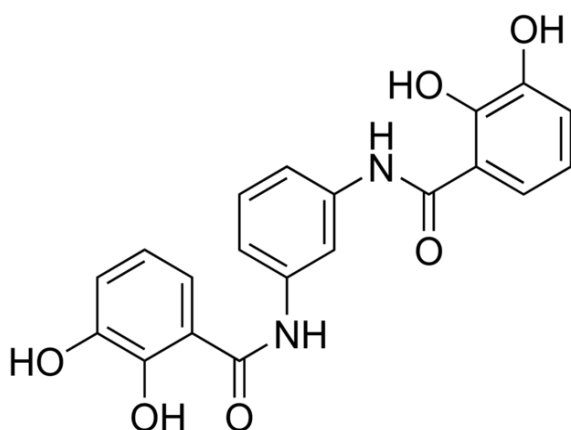


Figura 3. Estrutura química do MST-312, de acordo com o fabricante (Acessado em 17/05/2018 <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m3949?lang=pt&region=BR>).

Apesar de todas as ações citadas, a atividade do MST-312 ainda não foi totalmente entendida, e o que se sabe é que existe a atividade como inibidor da telomerase. Todavia, questões como a consequência do uso do composto a longo prazo, se a ação citotóxica a

curto prazo é dependente de alguma via envolvendo a telomerase e o mecanismo exato de morte celular que ocorre ainda precisam ser melhor elucidados. Com esses fatos expostos, fica clara a necessidade da realização de pesquisas com o intuito de entender melhor os mecanismos desse fármaco em células de glioma, que tem a telomerase ativa.

### **Objetivo geral**

O objetivo geral deste estudo é investigar as possíveis formas de ação do MST-312 em células de glioblastoma.

### **Objetivos Específicos**

Investigar o efeito do MST-312 a longo prazo.

Analisar o efeito do MST-312 na expressão do hTERT.

Entender o mecanismo de morte provocado pelo composto.

Avaliar o papel da inibição da telomerase no mecanismo de ação da toxicidade do MST-312 a curto prazo.

## **Justificativa**

O câncer é uma doença extremamente complexa, com grande repercussão no Brasil e no mundo, o que faz com que existam pesquisas a nível mundial buscando melhor compreender os mecanismos da carcinogênese e a melhor maneira de enfrentá-la. Dessa forma, a busca por novas moléculas com potencial antitumoral é imprescindível. O MST-312 é um composto, relativamente novo, que apresentou efeito contra a atividade da telomerase, enzima responsável por manter o tamanho telomérico, o que permite a ilimitada capacidade proliferativa das células cancerígenas. Assim, ele pode ser considerado uma molécula promissora a ser utilizada contra o câncer, embora ainda sejam necessários estudos que aumentem o entendimento dos mecanismos de ação do composto para que, possivelmente, ele possa ser utilizado na prática clínica. Diante disso, este estudo busca esclarecer as formas de ação do MST-312 em células humanas de glioblastoma da linhagem U251, tanto com exposição de curto prazo, como de longo prazo, objetivando compreender o efeito esperado em um possível regime de tratamento na prática clínica.

## **Metodologia**

### **Estratégia metodológica**

Avaliar a longo prazo:

- Toxicidade;
- Morfologia;
- Expressão do hTERT;
- Adaptações provenientes do tratamento.

Avaliar a curto prazo:

- Toxicidade;
- Mecanismo de morte celular;
- Ciclo celular;
- Células knock down;
- Tempo de duplicação.

### **Seleção da linhagem**

A expressão de *hTERT* foi verificada em diversas linhagens celulares por meio da técnica de RT-qPCR, técnica que faz a reação de transcriptase reversa seguida de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia), convertendo o RNA extraído em DNA complementar (cDNA) e amplificando o gene de interesse. A linhagem de U251 (Glioblastoma multiforme humano) apresentou expressão do gene *hTERT* e por esse motivo foi selecionada para o estudo.

### **Cultura de células e tratamento com MST-312**

Células de U251 foram cultivadas no meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium - Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e 10U/ml de penicilina e estreptomicina. As células ficaram mantidas na estufa umidificada com CO<sub>2</sub> a 5% e temperatura de 37° C. A solução estoque de 50 mM do composto MST-312 (Sigma) foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO 0,1%). Com o fim de ser usado na linhagem. Para o tratamento de longo prazo, as células foram divididas em dois grupos, o grupo controle (D - tratadas apenas com DMSO a 0,035%) e o grupo teste (M - tratadas com MST-312 a 1,7 µM) e foram tratadas por 300 dias, ou aproximadamente 21 semanas, no tempo mais longo. Já em curto prazo as células ficaram



em exposição do MST-32 por 24, 48 ou 72 horas nas concentrações crescentes de 0,25,0,5,1,2,5,10,15,25,35,50  $\mu\text{M}$  e o controle foi o DMSO.

### **Análise do tempo de duplicação pelo teste do MTT**

As células foram colocadas em placa de 96 poços (10.000 células por poço) e a viabilidade foi mensurada pelo ensaio de MTT. O meio de cultura foi trocado e adicionou-se o MTT na concentração de 1mg/ml, diluído em meio de cultura. Após duas horas, foi acrescentado o tampão para lise celular (50% de dimetilformamida (DMF) e 50% de água com 20% em peso de dodecil sulfato de sódio (SDS) em pó) (CARMICHAEL et al., 1987). A placa foi lida em leitor de ELISA com a absorbância medida em comprimento de onda de 490nm. O experimento foi feito com 8 replicatas técnicas.

A primeira leitura foi feita após 6 horas do plaqueamento das células. Nos experimentos seguintes, as horas foram contadas de acordo, sempre que o tampão era adicionado.

### **Análise de viabilidade celular pelo teste de MTT**

As células foram colocadas em placa de 96 poços (10.000 células por poço) O experimento foi feito com 8 replicatas técnicas para cada concentração. O primeiro poço (A1) foi utilizado como branco, ou seja, não continha células. Após completado o tempo de tratamento (24, 48 ou 72 horas), o meio foi trocado e o MTT adicionado na proporção de 2:10, diluído em meio. Após duas horas, foi adicionado o tampão para a lise celular (50% de dimetilformamida (DMF) e 50% de água com 20% em peso de dodecil sulfato de sódio (SDS) em pó) (CARMICHAEL et al., 1987). Para medir a viabilidade, foi utilizado o leitor de ELISA na absorbância de 490nm.

### **Determinação de IC<sub>50</sub>%.**

Foi feito o tratamento das culturas celulares com concentrações crescentes de MST-312 em placas de 96 poços, com 8 replicatas para cada concentração do composto. O tempo de exposição foi de 24, 48 e 72 horas e a viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT. Para cada placa, houve 2 controles, um com meio de cultura puro e outro com o diluente da farmaco, o DMSO, a 0,1%. Os valores de absorbância de cada experimento foram analisados e, desde que não tivesse diferença estatística entre os dois grupos de controle, foram realizados os testes estatísticos. A média ou a mediana,

dependendo do caso, do controle de DMSO foi usada como representante de 100% de viabilidade e os demais valores foram equiparados a esse. Por fim, usando regressão não linear, foi estimado o IC<sub>50</sub>%.

### **Avaliação morfológica**

A morfologia das células em cultura foi avaliada por microscopia de contraste de fase. Fotografias foram feitas com uma máquina digital acoplada ao microscópio e conectada a um computador que continha o software de análise IC capture 2,4.

### **Análise de expressão gênica de *hTERT***

Para a extração de RNA, usou-se o reagente TRIzol® (Thermo Fisher Scientific), conforme instruções do fabricante, com posterior adição de clorofórmio para separação das fases. Foi separada a parte aquosa, onde fica o RNA, e foi adicionado isopropanol e depois etanol a 75%, para lavagem, com posterior secagem e adição de água ultrapura. O RNA extraído foi quantificado pelo NanoVue Plus™ da GE Healthcare. A reação de RT-qPCR foi feita no StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific), utilizando a enzima TaqMan, os ensaios para os genes endógenos *GAPDH* e *Beta-actina*, e para o gene de interesse *hTERT* (iniciadores de sequência - 5'-GCTGCTCAGGTCTTTCTTTTATG-3' e 5'-CGACGTAGTCCATGTTTACAA-3'). O kit usado para a reação foi o GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System, Custom (Promega, A6120X), de acordo com as instruções do fabricante.

A reação foi de 4 etapas: a primeira é de transcrição reversa com 1 ciclo a 45 graus por 15 minutos; a segunda é a inativação da RT/ Ativação Hot Start com 1 ciclo a 95 graus por 2 minutos; a terceira e a quarta etapa têm ambas 40 ciclos, aquela a 95 graus por 15 segundos, e essa a 60 graus por 1 minuto.

A análise de dados de expressão gênica relativa foi feita com o teste de Delta-Delta-Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ), que calcula o  $\Delta Ct$  de cada amostra subtraindo o valor da média dos Ct (ciclo no threshold) do gene endógeno do valor da média dos Ct do gene de interesse. Para o cálculo do  $\Delta\Delta Ct$  foi utilizada a fórmula [ $\Delta Ct(\text{amostra tratada}) - \Delta Ct(\text{controle})$ ], e posteriormente a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  foi usada para se chegar ao valor de quantificação relativa (PFAFFL, 2001).

### **Análise de proliferação a longo prazo**

Para analisar a proliferação a longo prazo, as células U251 foram divididas em duas placas e o mesmo tratamento foi realizado durante os 300 dias. A primeira placa foi tratada com MST-312 na concentração de 1,7  $\mu\text{M}$  e a segunda com DMSO a 0,035%. O acompanhamento do desenvolvimento das células, bem como seu potencial proliferativo durante todo esse tempo foi feito com base nas células viáveis. A cada vez que as células cresciam até a confluência de 80%, era feita tripsinização e contagem de células na câmara de Neubauer. Por fim, eram repicadas de 5mil a 25mil células para placas novas. No final do tratamento, para identificar o comportamento proliferativo das células, esses dados foram plotados em gráfico.

### **Avaliação de morte celular**

As células, U251, foram tratadas com MST-312 na concentração de 2  $\mu\text{M}$ , por 24 e 48 horas. Depois foram tripsinizadas, centrifugadas por 15 minutos a 290G e ressuspendidas em 400 $\mu\text{L}$  de PBS. Posteriormente, as células foram marcadas com anexina V-FITC (FITC Annexin V, 556419). Seguiu-se com incubação por 15 minutos. Após a incubação, foi adicionado Iodeto de propídio, 1mg/ml e as células foram levadas ao citômetro (FACS Calibur) para coleta dos eventos (10.000) nos canais FL1e FL3 para anexina V e PI, respectivamente. A compensação dos dados foi feita depois da aquisição (OFFLINE) pela “SUMMIT V4,3 usando controles negativos e positivos. O experimento foi realizado em triplicata.

### **Análise da distribuição nas fases do ciclo celular**

As células de U251 foram tratadas com MST-312 na concentração de 2  $\mu\text{M}$  por 24 horas. Elas foram tripsinizadas, centrifugadas por 3 minutos a 2000 RPM, colocadas por 1 hora para fixação em metanol e diluídas em solução de ciclo celular com iodeto de propídio 50mg/ml. Depois de 15 minutos de incubação, as células foram levadas ao citômetro (FACS Calibur) para aquisição no canal FL3. Foram registrados 50000 eventos, os quais foram submetidos à análise. O experimento foi realizado em triplicata.

### **Transfecção**

Um plasmídeo contendo sequência relativa ao shRNA para o gene hTERT localizado no cromossomo 5p15.33(porção catalítica da telomerase humana) foi usado no protocolo de transfecção, segundo instruções do fabricante SANTA CRUZ

BIOTECHNOLOGY número de catalogo sc-36641-SH. A seleção foi feita, inicialmente, por exposição à puromicina, uma vez que o plasmídeo também contém o gene que confere resistência a esse antibiótico. Posteriormente, por diluição seriada, foram feitas culturas monoclonais, a partir de célula única.

### Seleção clonal

Após fazer a transfecção das linhagens, foi realizada a seleção clonal (Figura 4) , tanto do grupo controle (plasmídeo controle) como do grupo silenciado (com o shRNA para o gene *hTERT*). Após a realização dos cálculos, foi colocado o volume equivalente para uma única célula por poço em uma placa de 96 poços. O acompanhamento de cada poço foi feito diariamente por microscopia, iniciado 6 horas após as células serem plaqueadas e até as culturas clonais se estabelecerem. Poços com mais de uma célula ou sem células foram descartados. Foram usados para os experimentos os poços que tinham uma única célula e que originaram colônias de crescimento rápido.

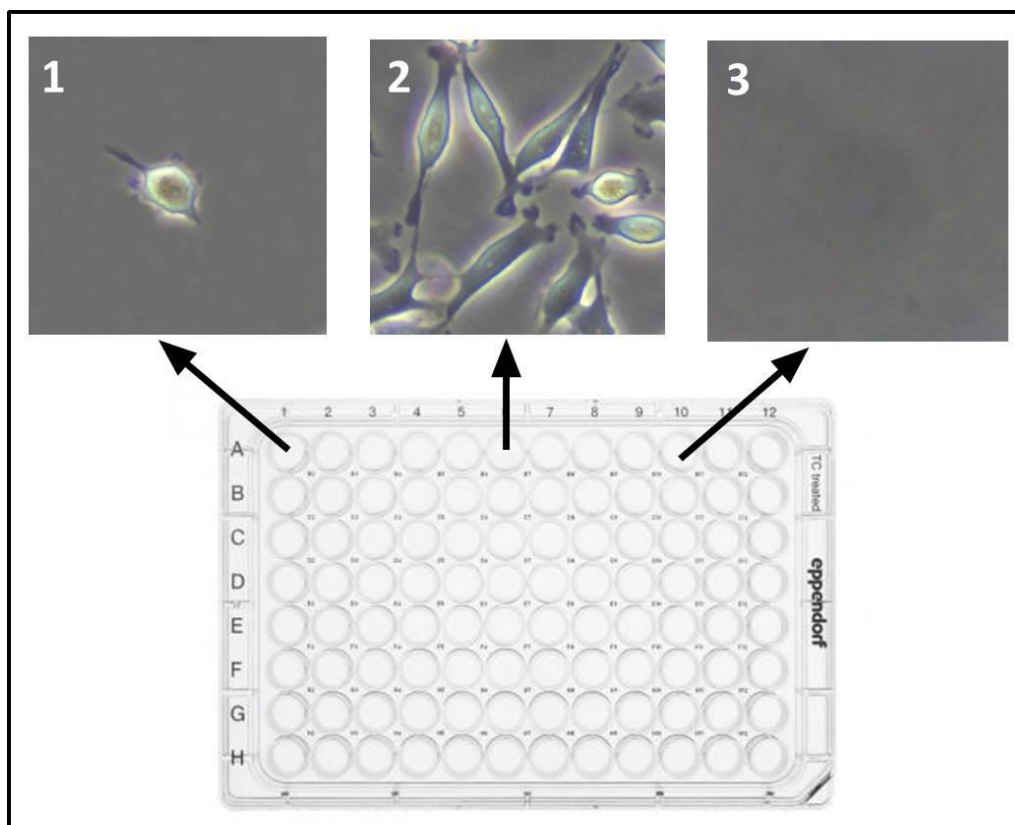


Figura 4. Imagem representativa da seleção clonal. O número 1 representa um poço que contém apenas uma célula. O número 2 demonstra que no processo ficou mais de uma célula por poço. Por fim o número 3 indica que nenhuma célula foi colocada

## Análise estatística

Todos os experimentos foram feitos no mínimo em triplicata e os dados gerados receberam tratamento estatístico, sendo expressos como média e erro padrão para testes paramétricos e mediana e percentil para os não paramétricos. A escolha da medida de tendência central e medidas de dispersão foi feita com base na forma de distribuição dos dados. Os testes utilizados para as diferentes análises estão especificados nos resultados deste trabalho. Os mais utilizados foram: o teste t de Student não pareado, o One-way ANOVA com o pós teste de Dunnett para um único parâmetro variável o two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, para quando havia dois parâmetros variáveis. Para dados com distribuição não normal, utilizou-se o Kruskal-Wallis com o pós teste de Dunn. Os valores de p considerados como significativos foram os inferiores a 0,05. Os valores de IC<sub>50%</sub> foram estimados por regressão não linear.

## Resultados

### Atividade citotóxica do MST-312 em células de U251

A linhagem U251 foi utilizada para saber o efeito tóxico do composto MST-312 em diferentes tempos de exposição: 24, 48 e 72 horas.

Em 24 horas, figura 5, o MST-312 não se mostrou tóxica suficiente para permitir o cálculo da IC<sub>50%</sub>. Na imagem de microscopia de contraste de fase (figura 5 D) fica claro que não houve redução significativa da viabilidade celular.

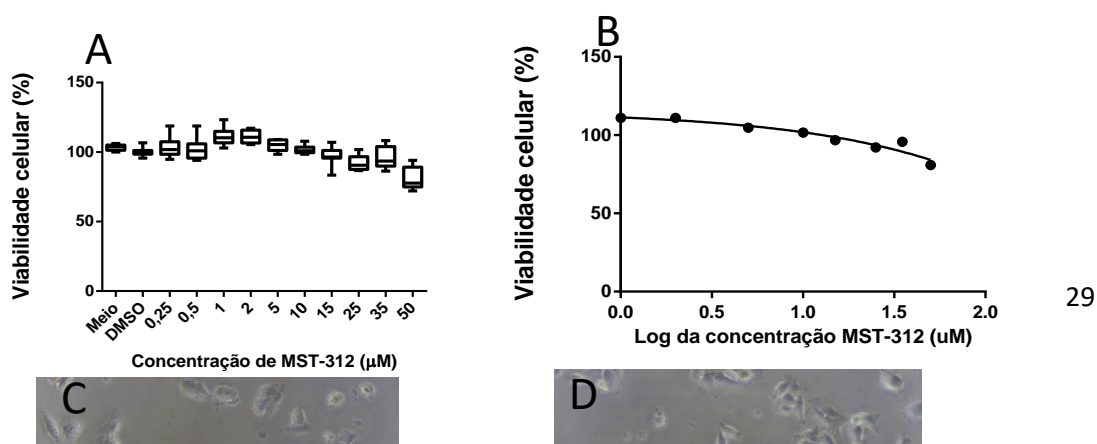


Figura 5. Atividade do MST-312 sobre as células U251 tratadas por 24 horas. Imagem A. Viabilidade celular de U251 com diferentes concentrações do composto. Os dados estão em percentual em relação ao controle (DMSO). Imagem B. Regressão não linear entre concentração e resposta sobre as células U251. O valor de  $R^2$  foi igual a 0,6798, não sendo possível calcular o IC50%. Imagem C. Fotografia do poço que representa o controle de células com aumento de 40x. Imagem D. Fotografia do poço cujas células foram tratadas na concentração de 50  $\mu\text{M}$  de MST-312.

No tempo de 48 horas, foi possível calcular o IC50%, que foi de 13,88  $\mu\text{M}$ . A figura 6 B, ratifica o resultado mostrado quando comparada às imagens C (controle de DMSO) e D (50  $\mu\text{M}$  de MST-312), ficando evidente uma redução da densidade celular em D. Houve diminuição significativa da viabilidade celular, comparando-se com o controle de DMSO, nas concentrações de 10, 15, 25, 35 e 50  $\mu\text{M}$  (Figura 6 A).

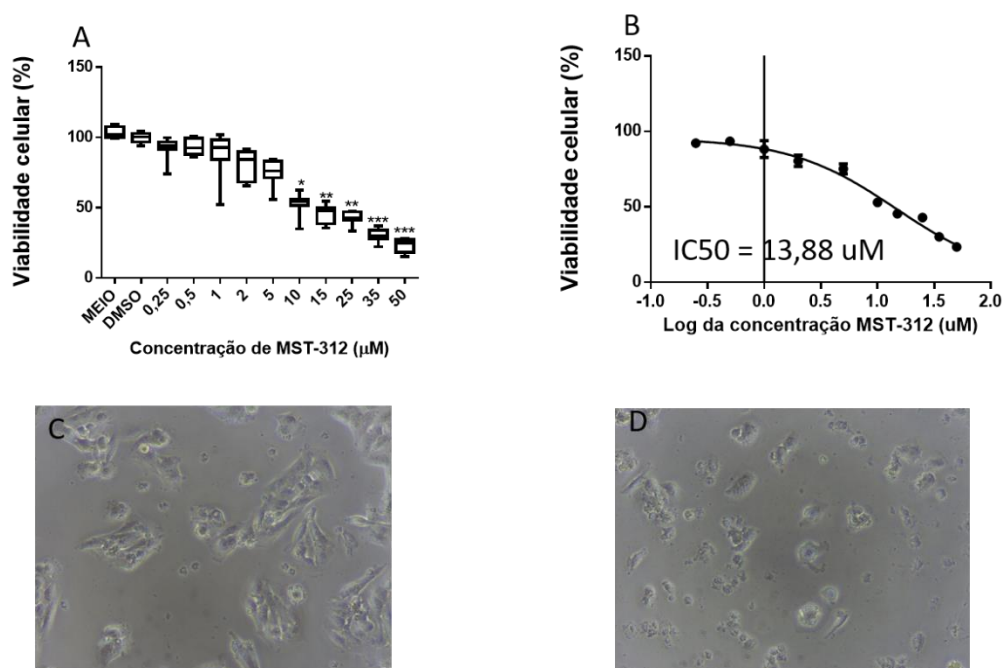


Figura 6. Atividade do MST-312 sobre as células U251 tratadas por 48 horas. Imagem A. Viabilidade celular de U251 com diferentes concentrações do composto. Os dados estão em percentual em relação ao controle (DMSO). Houve resultados significativos nas concentrações de 10 até a de 50  $\mu\text{M}$ . Imagem B. Regressão não linear entre concentração e resposta sobre as células U251. O valor de  $R^2$  foi igual a 0,8998, sendo possível calcular o IC50% que foi de 13,88  $\mu\text{M}$  Imagem C. Fotografia do poço que representa o

controle de células com aumento de 40x. Imagem D. Fotografia do poço cujas células foram tratadas na concentração de 50  $\mu\text{M}$  de MST-312.

No tempo de 72 horas, as células apresentaram menor viabilidade, sendo a concentração de IC<sub>50</sub> de 6,56  $\mu\text{M}$ . A Figura 7 B ratifica o resultado visto com a microscopia, quando comparado a imagem 7 C (controle de DMSO) e com 7D (50  $\mu\text{M}$  de MST-312). Também se destaca que houve efeito tóxico significativo a partir da concentração de 15 até a de 50  $\mu\text{M}$ .

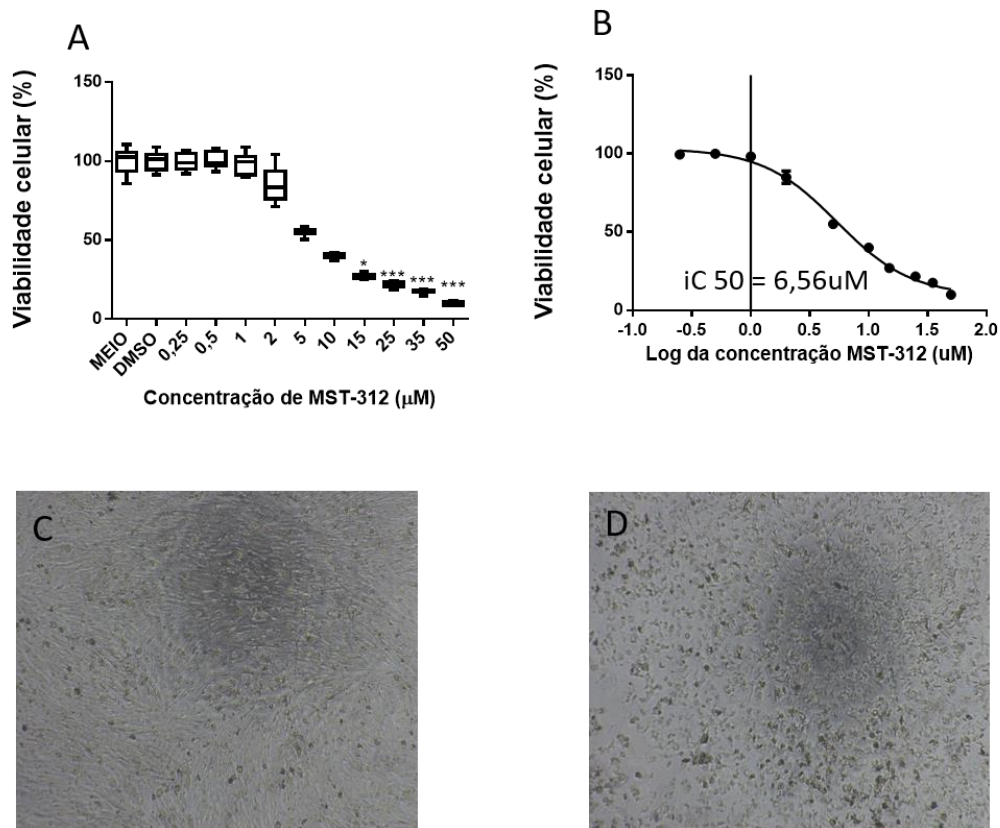


Figura 7. Atividade do MST-312 sobre as células U251 tratadas por 72 horas. Imagem A. Viabilidade celular de U251 com diferentes concentrações do composto. Os dados estão em percentual em relação ao controle (DMSO). Houve resultados significativos nas concentrações de 15 até a de 50  $\mu\text{M}$ . Imagem B. Regressão não linear entre concentração e resposta sobre as células U251. O valor de  $R^2$  foi igual a 0,8998. Imagem C. Fotografia do poço que representa o controle de células com aumento de 40x. Imagem D. Fotografia do poço cujas células foram tratadas na concentração de 50  $\mu\text{M}$  de MST-312.

Os dados mostram que o MST-312 consegue reduzir a viabilidade celular de forma tempo-dependente, uma vez que o composto se mostrou mais tóxico em 72 horas de exposição, e também de forma dose-dependente, pois houve significância estatística

em 48 e 72 horas a partir da concentração de 15  $\mu\text{M}$  até a concentração de 50  $\mu\text{M}$ . Considerando que a curto prazo é difícil se estabelecer a relação da redução da viabilidade com o encurtamento dos telômeros, é necessária uma exposição mais longa para se avaliar essa relação.

Posto isso, para investigar os efeitos do MST-312 em longo prazo de exposição, foi escolhida uma dose sub tóxica, uma vez que um dos objetivos é descobrir os efeitos do composto na expressão da telomerase, e também de tentar diminuir ao máximo o efeito tóxico do composto nas células durante o período de tratamento. Com base nos experimentos das figuras 6 e 7, a concentração escolhida foi de 1,7  $\mu\text{M}$ .

### **Atividade do MST-312 em exposição a longo prazo**

As células U251 foram expostas ao MST-312 por 300 dias (figura 8 A) e a cada tripsinização foi realizada a contagem das células em ambos os grupos (M - células tratadas com MST-312 na concentração de 1,7 $\mu\text{M}$ , e D - células tratadas com o diluente de MST-312- DMSO na concentração de 0,035%).



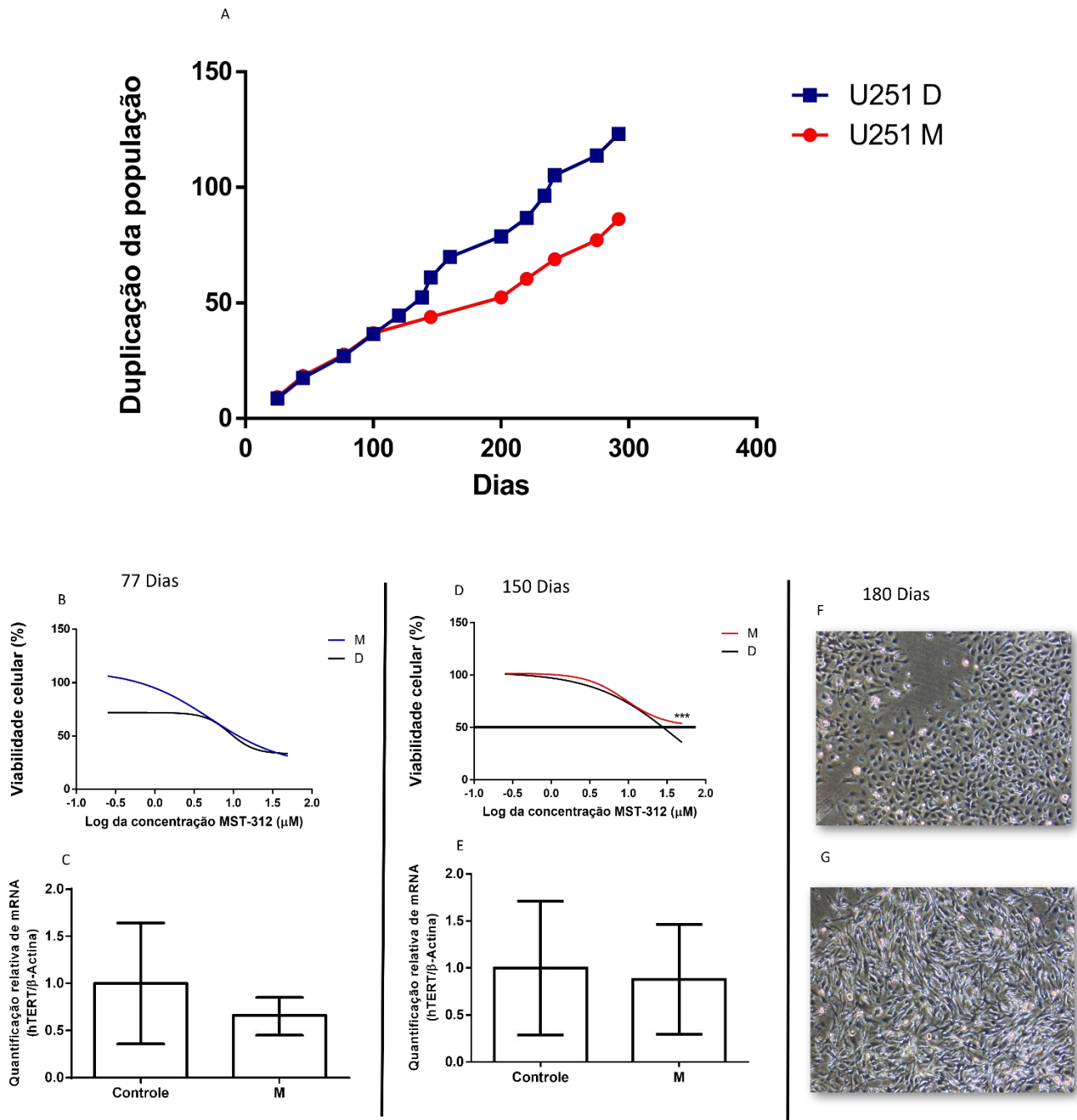


Figura 8. Figura representativa do tratamento de longo prazo. Imagem A. Tratamento a longo prazo por período máximo de 300 dias com MST-312 (eixo X: dias decorridos do tratamento com MST-312 na concentração de 1,7 μM; eixo Y: duplicação da população) a curva azul em D é o controle e em M é a célula tratada com MST-312. Imagem B. MTT da linhagem U251 com 77 dias de exposição ao MST-312 comparando grupo tratado (M; azul) com o grupo controle (D; preto) não houve diferença estatísticas entre os grupos. Imagem C. Expressão relativa de *hTERT* do grupo tratado em relação ao controle no período de 77 dias de tratamento. Imagem D. MTT da linhagem U251 com 150 dias de tratamento, comparando o grupo tratado (M; vermelho) com o grupo controle (D; preto). Houve diferença estatística entre os grupos ( $P < 0,01$ ). Imagem E. Expressão relativa de *hTERT* do grupo tratado em relação ao controle no período de 150 dias de tratamento. Imagem F. Fotografia da placa controle que estava em exposição ao diluente DMSO 0,035%, por 180 dias. Imagem G. Fotografia da placa tratada com MST-312 na concentração de 1,7 μM pelo tempo de 180 dias.

Após 77 dias de tratamento, quando as taxas de crescimento nos grupos ainda eram equivalentes, foi realizado o experimento de curva de citotoxicidade por um período

de 72 horas. Foi possível identificar, a princípio, um discreto efeito citotóxico do MST-312, nas menores concentrações, no grupo exposto ao fármaco em longo prazo em relação ao grupo controle (figura 8 B). Entretanto, nas concentrações mais elevadas o efeito foi semelhante, o que gerou um  $IC_{50}$  próximo em ambos os grupos (10,2  $\mu$ M e 11,63  $\mu$ M). A expressão gênica do *hTERT* também não foi alterada no grupo M, uma vez que está semelhante ao controle (Figura 8C).

O teste de MTT também foi realizado após 100 dias de exposição à dose subtóxica do MST-312, mas não houve mudança em relação ao tempo de 77 dias (dados não mostrados). Após 150 dias de exposição, um efeito diferente daqueles observados até então ficou evidente: na linhagem tratada com o fármaco não foi possível fazer o cálculo de  $IC_{50\%}$ , uma vez que não ocorreu redução da viabilidade celular (Figura 8 D) e o grupo controle ainda se mostrou sensível ao MST-312, pois seu  $IC_{50\%}$  foi de 28,24  $\mu$ M. Além disso, mesmo as células sendo tratadas por um período extremamente longo com o composto, não houve redução da expressão da telomerase, que se mostrou expressa de forma semelhante em ambos os grupos (figura 8 E).

Um efeito que seria esperado, a superexpressão de *hTERT* como mecanismo de compensação, não foi observado. Assim, a resistência encontrada parece estar relacionada a outro mecanismo.

Após 180 dias de exposição ao MST-312, foi percebida uma alteração na morfologia celular. Na figura 8 G, que representa as células tratadas com o composto, as células mostram nítida alteração morfológica quando comparadas com as células do controle (figura 8 F).

Depois de 200 dias, as células tratadas com o composto continuaram a proliferar de forma contínua, adquirindo taxa proliferativa semelhante à do grupo controle. Assim, esses dados de longo prazo sugerem a aquisição de novo fenótipo (provavelmente por seleção) resistente ao inibidor, de modo que o mesmo, provavelmente, não foi capaz de reduzir a expressão da telomerase, como esperado para sua ação terapêutica.

## Atividade do MST-312 em exposição a curto prazo

Considerando que o MST-312 apresentou efeito tóxico nos tempos de 48 horas e 72 horas (figuras 6 e 7), foi feita citometria de fluxo com a finalidade de definir o mecanismo de morte celular induzida pelo composto na linhagem U251, bem como o efeito do fármaco na distribuição das células nas fases do ciclo celular.

Na figura 9 é possível notar, depois de 24 horas de exposição ao MST-312, um efeito citostático significativo. Também é possível observar uma parada na fase G0/G1 do ciclo celular nas células tratadas com o MST-312, um efeito significativo em comparação ao grupo controle. O dado fica ratificado uma vez que o grupo tratado com o fármaco apresentou um percentual em G2/M bem menor do que o controle (figura 9 A e B). Para o mesmo período de tempo de tratamento, foi também testado o efeito pró-apoptótico da molécula nas células, mas não houve diferença significativa entre os grupos (figura 9 C). O efeito pró-apoptótico foi visto após 48 horas de exposição, com um percentual de morte foi significativamente maior nas células tratadas (Figura 9 C).

Vale ressaltar que a parada no ciclo celular aconteceu em 24 horas de exposição e a apoptose foi aparecer em 48 horas, ou seja, a parada no ciclo parece ser a causa da apoptose, e sabendo que a própria telomerase tem papel regulatório no ciclo, decidiu-se investigar se o efeito indutor de apoptose do MST-312 em curto prazo, de fato, se deve à inibição da telomerase, já que o fármaco é inespecífico para a enzima.

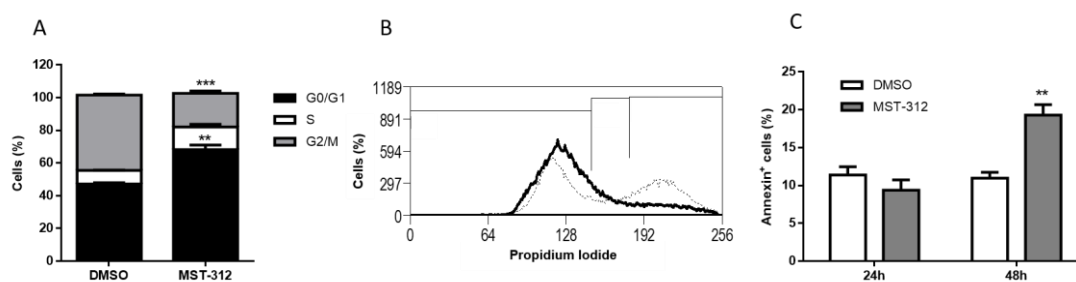


Figura 9. Citometria de fluxo de apoptose e parada de ciclo celular. Imagem A As células de U251 foram cultivadas com MST-312 na concentração de 2  $\mu$ M durante 24 horas. O percentual de células em cada fase do ciclo celular (G0/G1, S G2/M) foi analisado usando iodeto de propídio. Imagem B. gráfico que mostra a distribuição nas fases do ciclo celular de todos os eventos testado. Na linha preta está representado as células tratadas com MST-312 já na linha cinza o controle de DMSO. Imagem C. O efeito apoptótico do MST-312 (2  $\mu$ M) nas células de U251 foi avaliado nos tempos de 24 e 48 horas de tratamento. As células positivas para anexina foram consideradas em apoptose e usando o teste T para comparação dos

grupos de MST-312 com DMSO temos os valores de  $P^{**}p<0,01/****P<00001$ . Os resultados foram expressados em média mais o desvio padrão devido aos experimentos que foram em triplicada.

Assim, buscando-se elucidar se a telomerase influencia, mesmo que em curto prazo, nos efeitos promovidos pelo MST-312 foi feita a transfecção com o intuito de inibir expressão da enzima e comparar os efeitos do composto na linhagem transfectada e no controle. A U251 então foi exposta a puromicina, e posteriormente foi feita a transfecção. Com o teste feito (Figura 10) foi possível estabelecer a concentração tóxica de  $920\ \mu\text{M}$  do antibiótico, em um tempo de exposição de 96 horas.

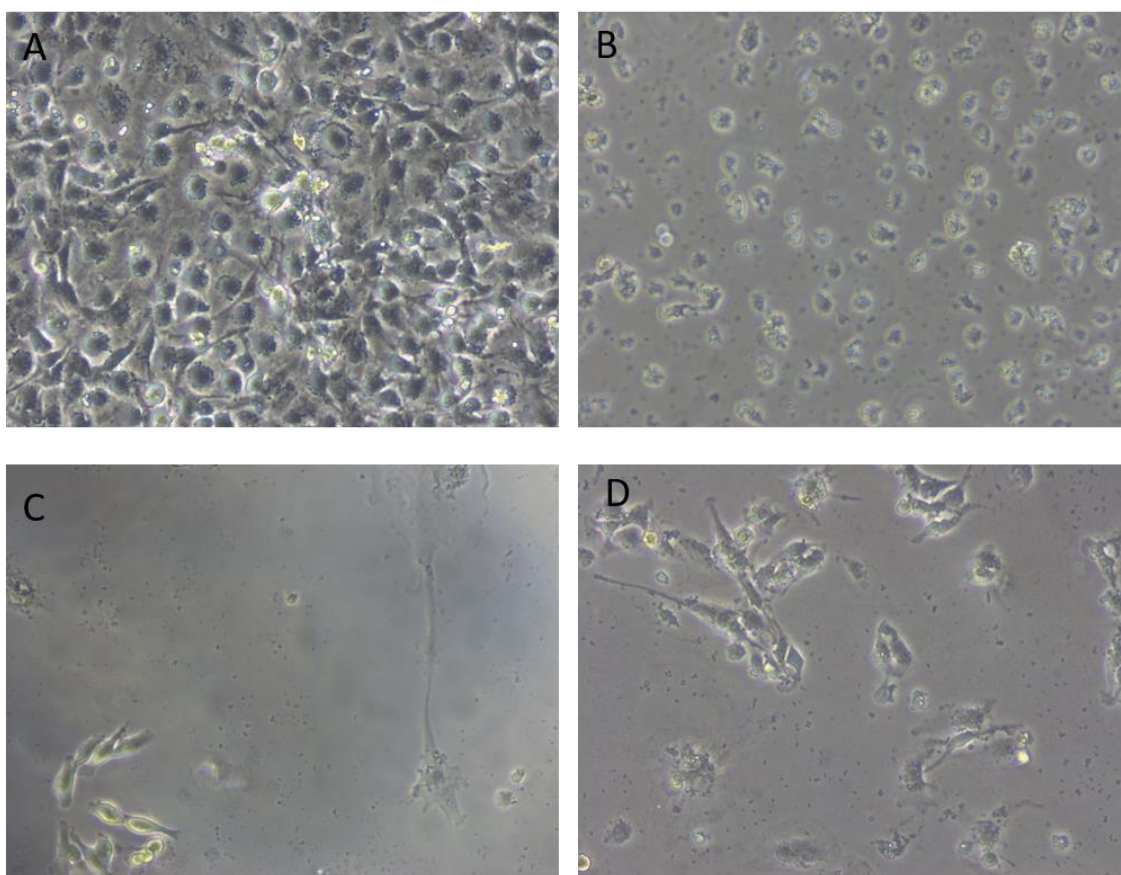


Figura 10. Teste da puromicina e transfecção celular. Imagem A. fotografia de 96 horas com a puromicina poço controle. Imagem B. Fotografia com a linhagem U251 com a concentração de  $920\ \mu\text{M}$  do antibiótico por 96 horas. Imagem C. Células U251 que contém apenas o plasmídeo de resistência a puromicina, tais células ficaram em contato com a puromicina por 196 horas. Imagem D. Células U251 transfectadas com o plasmídeo capaz de inibir o gene da telomerase, e junto porta o gene que concede resistência a puromicina. Essas células ficaram em contato com a puromicina por 196 horas.

Com o teste da puromicina, fica claro que com 96 horas de exposição na concentração de  $920\ \mu\text{M}$ , figura 10 B, ocorre a morte total das células, ao contrário do que ocorre no grupo controle, o qual ficou em cultura sem nenhum tratamento, figura 10

A. Com o estabelecimento da concentração tóxica de puromicina, foi realizada a transfecção.

Assim, as células U251 foram divididas em duas placas, uma delas recebeu o plasmídeo que contém o gene responsável por inibir a *hTERT* (KD), juntamente com o que concede resistência a puromicina. A outra placa recebeu um gene que tem apenas o plasmídeo de resistência ao antibiótico, o qual vai ser utilizado como controle da transfecção.

Feita a transfecção, as células ficaram em contato com a puromicina não apenas por 96 horas, mas por 196 horas, sobrevivendo à exposição, tanto o grupo controle Figura 10 C, como o grupo silenciado (KD) Figura 10 D. Como na transfecção as células são consideradas poli clonais, foi feito o procedimento de seleção clonal em duas placas. A primeira com as células KD e a segunda com as do grupo controle. Quatro clones da linhagem KD foram aproveitados (clones A, B, C e D) e um do controle. Os demais clones se perderam no processo.

O teste de seleção clonal é um processo lento, devido ao fato de que a colônia provém de apenas uma célula. Na figura 11 há uma linha do tempo que demonstra a duração de todo esse processo. Em aproximadamente 20 dias após a transfecção é possível ter as células transfectadas poli clonais, mas são necessários cerca de 115 dias até conseguir o clone estável (mono clonal).

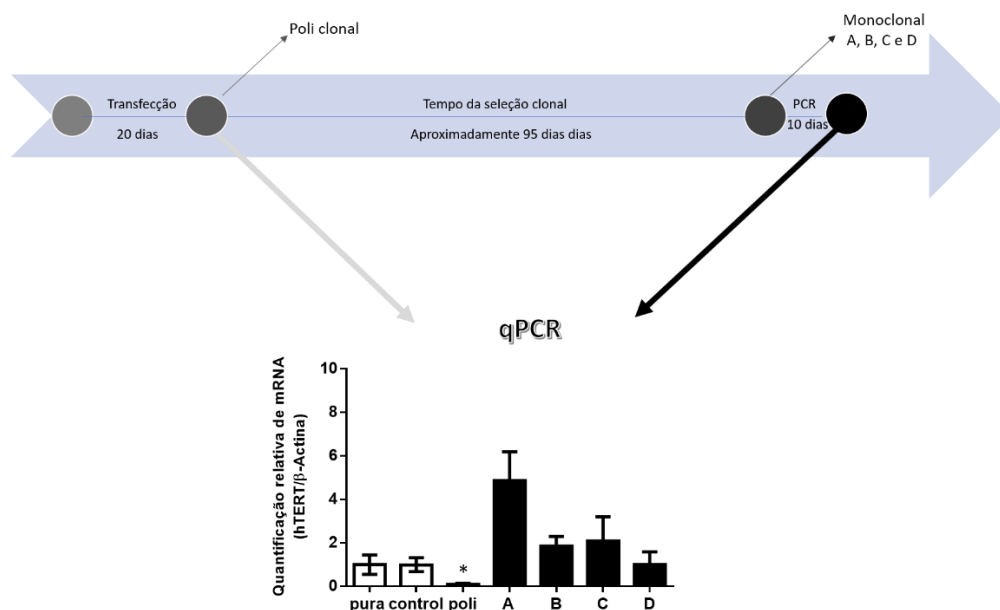


Figura 11. Linha do tempo da seleção clonal e RT-qPCR dos clones. Do tratamento com a puromicina até a transfecção demora 20 dias. Do início da seleção clonal até a amplificação do clone, o tempo médio foi de 95 dias e ao terminar essa etapa, se passaram 10 dias até a execução da RT-qPCR. No gráfico referente as RT-qPCRs o gene controle foi a *Beta-actina* e o de interesse o *hTERT*. A barra denominada poli são das células poli clonais e as barras com letras de A até D são os diferentes clones mono clonais. O teste T de student, comparando os grupos controle e a poli clonal transfectada mostrou em resultado significativo com P menor de 0,05 (\*).

Na RT-qPCR as células poli clonais mostraram redução da expressão do gene *hTERT* em relação ao controle, resultado esse significativo estatisticamente. Já os clones (A, B, C e D) tiveram resultados diferentes, em que o A mostrou hiperexpressão de *hTERT* e os demais clones mostraram expressão do gene semelhante ao controle. Destarte, foram testadas diferentes concentrações de MST-312 nas linhagens monoclonais e poli clonais com a finalidade de entender os possíveis efeitos do composto em tais células.

Ao fazer o teste com MST-312 na linhagem poli clonal (KD), única linhagem com redução da expressão do *hTERT* (figura 11), é possível identificar resistência ao composto de forma que não foi possível calcular o IC<sub>50</sub>%. Outro efeito que foi observado é que em todas as concentrações, a linhagem KD mostrou-se mais resistente à farmaco, desde a menor concentração (1 µM) até a maior (50 µM) onde tal efeito foi o dobro do grupo controle (figura 12).

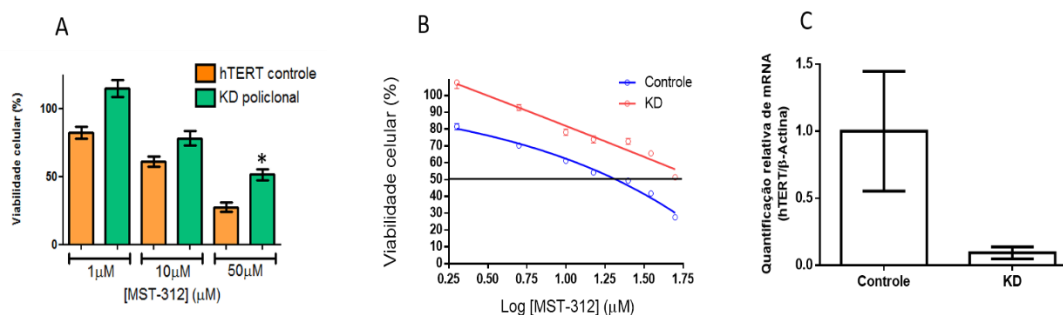


Figura 12. Teste com o MST-312 nas linhagens U251 poli clonal transfectada. Imagem A. MTT comparativo entre as linhagens transfectadas controle e KD, o tempo de exposição ao fármaco foi de 72 horas. Imagem B. Regressão não linear da U251 controle e da KD. O R<sup>2</sup> do controle foi de 0,9442 com IC<sub>50</sub>% de 21,21 µM. Já na linhagem KD o R<sup>2</sup> foi de 0,87 e não foi possível calcular a IC<sub>50</sub>%. Imagem C. RT-qPCR para mensurar a expressão de *hTERT*. A linhagem KD teve uma redução na expressão do gene responsável pela telomerase em aproximadamente 10 vezes quando comparado ao controle.

Na figura 12 A o teste estatístico T de student demonstrou significância estatística na diferença de viabilidade celular entre o grupo tratado e controle nas maiores concentrações (50 µM). Posto isso, talvez seja possível que o mecanismo de ação do

MST-312 esteja ligado a alguma via relacionada à telomerase, mas que esta não seja sua única via de ação, até mesmo porque ainda houve redução da viabilidade celular em mais de 40%.

O MST-312, em todas as linhagens monoclonais, se manteve altamente tóxico no tempo de 72 horas, sendo notório o efeito do composto na redução da viabilidade celular que foi dose-dependente. Na figura 13 A a linhagem U251 monoclonal não transfectada teve o  $IC_{50\%}$  de 5,578  $\mu$ M, o que se assemelha a linhagem poli clonal não transfectada (6,56  $\mu$ M), mostrando assim que o processo de seleção clonal em si não altera em nada a toxicidade do fármaco testado.

Na figura 13 B, a linhagem U251 controle, na qual ocorreu a transfecção, teve  $IC_{50\%}$  de 14,21  $\mu$ M, sendo bastante parecido com a figura 13 C, que representa os clones transfectados, cujas  $IC_{50\%}$  foram todas maiores que 10  $\mu$ M, sendo, portanto, todos equivalentes a quase o dobro da linhagem monoclonal não transfectada. Isso sugere que talvez a seleção com a puromicina pode estar relacionada com uma possível resistência ao MST-312. Entretanto, a resistência é mínima e não se pode esquecer que nas monoclonais não houve a redução da expressão da telomerase.

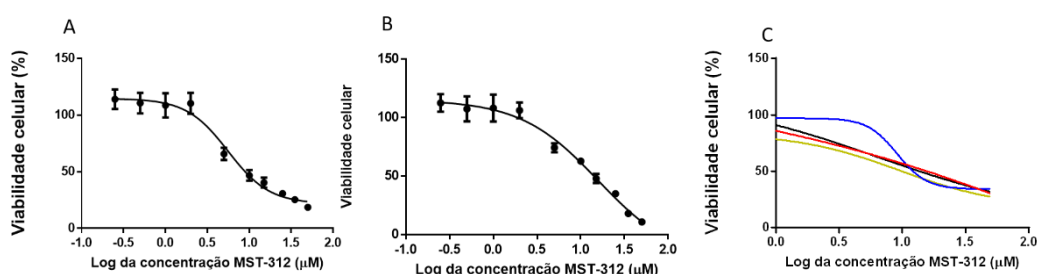


Figura 13. MTT por 72 horas nas linhagens U251 monoclonais. Imagem A. Linhagem U251 sem transfecção monoclonal. O  $R^2$  foi igual a 0,9604 e o  $IC_{50\%}$  foi de 5,578  $\mu$ M. Imagem B. Linhagem U251, controle de transfecção.  $R^2$  foi igual a 0,9666 com o  $IC_{50\%}$  de 14,21  $\mu$ M. Imagem C. Regressão não linear entre concentração e resposta sobre as células U251 transfectadas com o plasmídeo responsável por inibir o *hTERT*. O clone A tem  $R^2$  de 0,9295 e apresentou  $IC_{50\%}$  de 15,64  $\mu$ M. O clone B apresentou o  $R^2$  de 0,9421 e  $IC_{50\%}$  de 12,26  $\mu$ M. O C teve o  $R^2$  de 0,8616 e  $IC_{50\%}$  de 10,02  $\mu$ M. e por fim o clone D com  $R^2$  de 0,9521 e  $IC_{50\%}$  de 13,83  $\mu$ M.

Como o MST-312 age no ciclo celular, nós aproveitamos a disponibilidade de diversas culturas clonais para avaliar se o efeito do composto variava com a taxa de proliferação celular.

Na figura 14 é possível observar o gráfico de tempo de duplicação de todas as linhagens. Para facilitar a visualização, a tabela 2 resume os dados mostrados até aqui. Os tempos de duplicação das linhagens foram parecidos, embora dois deles tenham se

mostrado diferentes em relação aos demais, como é o caso da linhagem poli clonal KD e do clone A.

As linhagens poli clonal (KD) e o clone A tiveram o tempo de duplicação semelhantes e ao mesmo tempo discrepante dos demais 70,25 horas para as células KD e 71,24 horas do clone A. Entretanto, os efeitos tóxicos do MST-312 foram divergentes, posto que na linhagem poli clonal não foi possível calcular a dose responsável por decrescer em mais de 50% da viabilidade celular. Já o clone A apresentou  $IC_{50\%}$  de 15,64  $\mu$ M. Isso mostra que o tempo de duplicação não está relacionado à resistência ao composto apresentada na linhagem KD, o que aponta para uma possível relação do efeito demonstrado com a inibição do *hTERT*.

Ao observar a expressão relativa do *hTERT*, é possível notar que todos os clones voltaram a expressar o gene *hTERT*, com alguns clones duplicando a expressão, como foi o caso do clone C, ou quadruplicando como ocorrido no clone A (Tabela 2), sugerindo que talvez com o longo tempo de seleção clonal, essa linhagem consiga reverter a transfecção e as células voltem a expressar o gene.

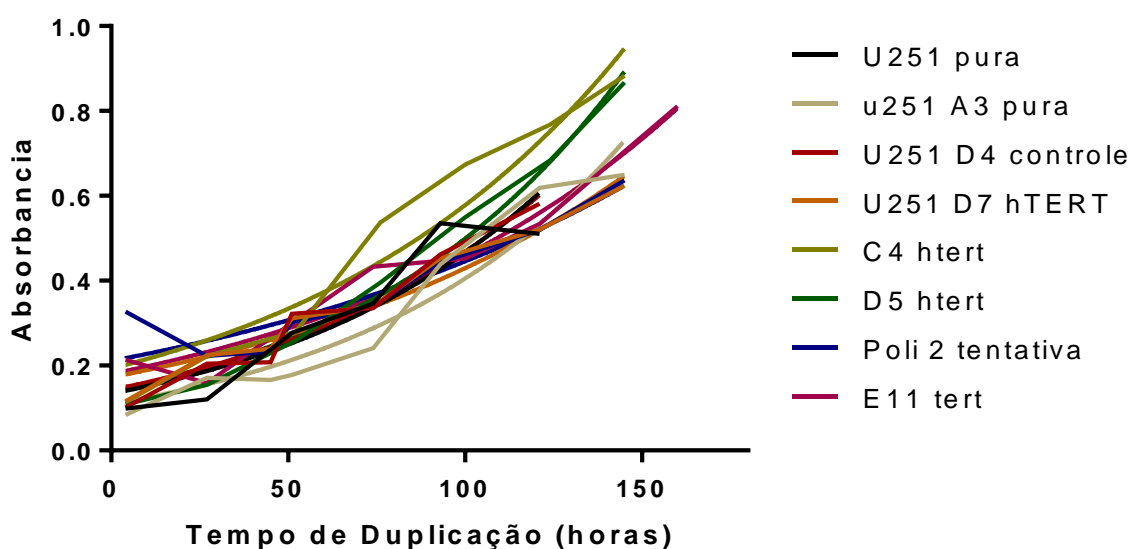


Figura 14. Tempo de duplicação de todas as linhagens. O Gráfico demonstra o tempo de duplicação em relação a absorbância. O teste estatístico usado para saber os diferentes tempos de duplicação foi a equação de crescimento exponencial ( $Y=Y_0 \cdot \exp(k \cdot X)$ )



*Tabela 1. Dados compilados dos experimentos conduzidos em curto prazo (IC50% para 24, 48 e 72 horas, expressão relativa do hTERT e tempo de duplicação das respectivas linhagens).*

Célula	IC50 24h (µM)	IC50 48h (µM)	IC50 72h (µM)	hTERT relativa	DT (horas)	Longo prazo
U251	Viabilidade não chegou a reduzir 50%	13,88	6,56	1	47,65	29, 34, 180+ dias
U251 KD poli	-	-	Não da de calcular	0,0926	70,25	-
U251 KD cont poli	Viabilidade não chegou a reduzir 50%	27,15	14,21	0,9888	53,86	77 dias
U251 KD A (D7)	-	-	15,64	4,86	71,24	67 dias
U251 KD B (C4)	-	-	12,26	1,85	57,72	29 dias
U251 KD C (D5)	-	-	10,026	2,084	50,45	37
U251 KD D (E11)	-	-	13,83	1,007	61	-
U251 monoclonal	Viabilidade não chegou a reduzir 50%	28,31	5,57	-	48,01	31

*O símbolo de traço (-) indica que não foi realizado o experimento.*

## **Discussão**

Uma das mais importantes discussões na esfera do câncer é compreender os complexos mecanismos de iniciação e progressão da doença. Isso vem sendo realizado pelo estudo de marcadores específicos e do entendimento das diversas e complexas vias de sinalização que estão relacionadas a essa doença. No caso do glioblastoma, por exemplo, um gene de extrema relevância é o IDH, que quando mutado está relacionado a um tipo de classificação do tumor, e quando selvagem é vinculado a outra categoria (JOO

et al., 2019). Tais classificações são de suma importância quando se cogita uma possível terapia, uma vez que, conhecendo os processos específicos da carcinogênese, conhece-se os melhores alvos para o tratamento, o que o torna mais específico, acarretando o aumento de sua eficiência. (GOLUB et al., 2019).

Hoje em dia na clínica o quimioterápico mais utilizado para o tratamento de glioma é a temozolamida. Já foi demonstrado que seu uso traz benefícios terapêuticos como por exemplo o aumento de sobrevida dos pacientes com glioma. Entretanto como o glioma apresenta múltiplas mudanças genéticas uma única droga é incapaz de oferecer uma completa solução para essa doença (CHEN et al., 2019). Assim, há uma busca por fármacos para suprir tal necessidade. Um exemplo de busca é o fucoxanthin, um composto carotenoide derivado de algas, que apresentou potencial de induzir apoptose em células de gliomas humana por meio de dano oxidativo (WU et al., 2019).

Outro composto estudado é o Imetelstat, inibidor da telomerase, que apresentou inicialmente efeitos promissores para tratar pacientes com neoplasias mieloproliferativas. Contudo, com o avançar das pesquisas, demonstrou-se que além de afetar células tumorais, o composto apresentava toxicidade acentuada também em células normais (MOSOYAN et al., 2017). Tal fato demonstra a importância de esclarecer melhor os mecanismos de ação de qualquer composto com possível aplicação clínica.

O tratamento a longo prazo com o MST-312 já havia sido anteriormente documentado, no estudo de MORAIS e colaboradores, que tratou células de MDA-MB-231 por 140 dias. Entretanto, o tratamento de longo prazo realizado nesse estudo em linhagem de glioblastoma foi de aproximadamente 300 dias, um dos maiores executados com o MST-312. Sendo assim, esse longo tempo de exposição foi suficiente para demonstrar a característica desse inibidor de telomerase nas células U251.

Nos diferentes experimentos realizados, como nos testes de viabilidade celular, foi demonstrado que o MST-312 possui um efeito tempo e dose dependente na linhagem U251, a partir de 48 horas de exposição. Contudo, observou-se que esse efeito não se deve à inibição da telomerase, uma vez que é necessário um longo período de tempo para que o telômero comece a encurtar. Assim, a exposição a longo prazo foi realizada utilizando-se o fármaco em doses subtóxicas, o que demonstrou que o MST-312 não é significativamente efetivo para a inibição da expressão do gene do *hTERT*. Efeito parecido foi verificado em linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, em

que houve redução da viabilidade celular quando expostas ao mesmo composto testado no presente trabalho (GURUNG et al., 2015).

Em 72 horas de exposição ao tratamento, houve efeito equivalente ao tempo de 48 horas, também dose dependente. Embora nesse tempo, a viabilidade chegou a reduzir quase que totalmente na maior concentração testada e o IC<sub>50%</sub> foi menor (6,56 µM). No trabalho realizado por van Tonder, Joubert e A Cromarty (2015), foi feita a comparação entre os tempos de 24h e de 72 horas de exposição, com o teste de MTT, com um outro composto 3-bromopyruvate que também demonstrou que com o aumento do tempo de exposição há uma maior redução da viabilidade celular.

Em relação ao experimento de longo prazo, é pertinente ressaltar que houve uma mudança morfológica que ao final do tratamento não se manteve contínua, pois, as células mostraram-se resistentes ao MST-312, uma vez que, ao longo do tratamento foram capazes de voltar a duplicar suas populações de forma constante após 200 dias de exposição. Esses dados justificam-se no que diz respeito aos glioblastomas, por possuírem alguns mecanismos que os fazem resistentes à quimioterapia, como é o caso da temozolamida (YIN et al., 2019), bem como a radiação (ZEMBRZUSKA; OSTROWSKI; MATYJA, 2019; FAN et al., 2018).

Ademais, não se pode ignorar que nem em 77 nem em 150 dias de tratamento com o MST-312 ocorreu diferença significativa da expressão da telomerase, quando comparado com os respectivos controles. No trabalho de Moraes et al. (2017), as células também apresentaram resistência a esse mesmo fármaco testado, todavia além de ocorrer erosões teloméricas, houve uma pressão seletiva que selecionou células que possuíam uma maior expressão da telomerase. Esses dados sugerem que na linhagem de glioblastoma, ao contrário do que ocorreu na de mama, as células buscaram outros meios de resistência.

Uma hipótese para explicar tal resistência é que após um certo tempo de exposição ao MST-312 e com o objetivo de permanecerem vivas, as células conseguiram utilizar as bombas de efluxo. Já existe estudo que tentou demonstrar relação das bombas de efluxo com a telomerase (MORAIS et al., 2017). Um exemplo dessas bombas é a ABCG2, o qual é um transportador de membrana existente tanto em células normais como em algumas cancerosas, detendo um papel importante na defesa biológica contra xenobióticos (VLAMING; LAGAS; SCHINKEL, 2009). Contudo, já é relatado na

literatura formas de inibir o ABCG2 e uma delas é usando o inibidor febuxostat, o qual altera a característica cinética na proteína de resistência (HEYES; KAPOOR; KERR, 2018). Dessa forma, a utilização de técnicas eficazes contra essas proteínas, que conseguiriam aumentar o tempo de vida de fármacos, poderia ser uma alternativa interessante para driblar os mecanismos de resistência que alguns tumores desenvolvem (TOYODA; TAKADA; SUZUKI, 2019).

O mecanismo de resistência visto nesse estudo é alarmante para o uso do MST-312 na linhagem de glioblastoma U251, pois como as células se adaptaram rapidamente ao composto torna-se difícil buscar uma possível utilização desse na clínica. Tal fato se justifica porque pacientes com glioblastoma, recorrentemente, necessitam de longos períodos de tratamento, dado que, de acordo com a genotipagem do tumor a progressão da doença pode passar de 23 meses (JUE et al., 2019).

Outro ponto pertinente para acrescentar, é que se opondo ao que se demonstrava, como as promissoras terapias telomerase alvo, o MST-312 – sendo um inibidor de telomerase – não apresentou efeito significativo para uma possível terapia a longo prazo. Entretanto, tal fato não é constatado apenas nesse inibidor. O Imetelstat (GRN163L) em 2010, mostrou-se eficiente para terapias de diversos tumores, uma vez que, por se tratar de um potente inibidor específico da telomerase, se revelou um fármaco com altas expectativas para o tratamento de diferentes tumores (RÖTH; HARLEY; BAERLOCHER, 2009). Contudo, em 2016, foi demonstrado, em tumores pulmonares, que o imetelstat apresenta eficiência considerável a curto prazo, porém, a longo prazo, os telômeros possivelmente retomam o seu crescimento (FRINK et al., 2016).

Um recente estudo, no entanto, concluiu que moléculas que têm como alvo a dinâmica dos telômeros, bem como a modulação da telomerase, continuam sendo uma boa abordagem para terapia anticâncer, posto que a telomerase é a maior responsável por alongar os telômeros em células cancerosas. Embora alguns inibidores da telomerase não têm apresentado efetividade clínica, recentemente, avanços aconteceram com a utilização do 6-thio-dG, uma molécula pequena que potencializa os efeitos de tais inibidores (SUGARMAN; ZHANG; SHAY, 2019).

Não se pode deixar de frisar que no tempo de 24 horas de exposição, verificou-se a parada do ciclo celular nas fases G0/G1 nas células tratadas. Esse efeito, por sua vez, pode estar associado com a morte celular por apoptose e tal argumento confirma-se, pois

em 48 horas de exposição com o composto, houve diferença estatística entre os grupos tratados e o controle. Dessa forma, a parada que ocorreu no ciclo celular em G0/G1 relaciona-se fortemente com a apoptose no maior tempo de tratamento utilizado (48 horas). Trabalhos relacionados ao composto demonstraram anteriormente o efeito do MST-312 em parada do ciclo celular em G2/M ou em apoptose. Porém em célula U251, o efeito desse composto foi observado pela primeira vez nesse estudo, e a diferença se dá na parada, que não foi em G2/M, mas sim em G0/G1 (AMERI et al., 2019; FUJIWARA et al., 2018; FATEMI; SAFA; KAZEMI, 2015).

A parada em G0/G1 pode estar relacionada ao efeito que a telomerase apresenta em outras vias de sinalização relacionadas ao ciclo celular (THOMPSON et al., 2018). Trabalho com eupatilin, flavonoide com atividade antitumoral, usado em glioma mostrou efeitos de parada de ciclo em G1 no entanto não houve posterior apoptose (FEI et al., 2019). Já com a inibição da telomerase, via *TPPI*, ocorreu também a parada no ciclo celular em G1 a diferença é que houve a morte celular via apoptose (ZHU et al., 2019). Sendo assim, uma hipótese para uma possível explicação é que com a inibição da telomerase, mesmo que a curto prazo, ocorra algum efeito de parada do ciclo celular dessas células com um posterior apoptose.

Sabendo dos efeitos tóxicos que o MST-12 produz na linhagem, realizou-se o teste de transfecção com a finalidade de relacionar se este está ligado a ação sobre a telomerase ou se é produzido por alguma via independente. Trabalhos diversos vêm usando tal metodologia: Chen et al. (2017), Tomc et al. (2018) e Dilshara et al. (2019). Todos eles inibiram o *hTERT* por meio de transfecção para algum propósito específico de estudo.

Alguns trabalhos utilizaram a puromicina como controle de transfecção como é o caso do Cheng et al. (2019) e do Salazar et al. (2014). Neste é descrito um protocolo para silenciamento de *CXCR7* utilizando shRNA na linhagem de MCF-7 e a concentração do antibiótico utilizada foi de 1840  $\mu$ M. Naquele, há um tempo de exposição de 48 horas ao composto na linhagem de fibroblastos embrionários de galinha (DF-1), mas na concentração de 480  $\mu$ M. No presente estudo, a linhagem U251 ficou em exposição por 96 horas, na concentração de 920  $\mu$ M (figura 9 B), o que demonstra que o efeito tóxico da puromicina é dependente da linhagem testada.

Neste trabalho surgiu um resultado inesperado quando analisado o dado da RT-qPCR que foi o fato de as células poli clonais, terem tido o *hTERT* com a expressão

reduzida e todos os clones selecionados voltarem a expressar o gene *hTERT*. Dos clones estudados alguns ficaram de forma até hiper-expressa como foi o caso do clone A da imagem 11.

Um dado que vai ao encontro dos nossos achados é que os clones com o *hTERT* super expressos, nas maiores concentrações testadas do MST-312 (25  $\mu\text{M}$  até 50  $\mu\text{M}$ ), se mostraram mais sensíveis ao composto quando comparado com os outros clones. Tal fato sugere, que o inibidor apresenta-se mais tóxico em células com maiores níveis de expressão de *hTERT*

Na literatura, já é bem documentado que as células conseguem comunicar-se umas com as outras para manter um tumor estável (CHIODONI et al., 2019), como também que gliomas se tornam rapidamente resistentes a certos compostos utilizados em seu tratamento (AKGÜL et al., 2019). Sendo assim, uma possível explicação para esse efeito é que como o gene responsável por manter a imortalização celular foi inibido e a seleção clonal é um teste bastante demorado, cujo resultado demora meses, é possível que tenha havido uma forte pressão seletiva que fez as células reverterem a transfecção, fazendo com que a telomerase voltasse a ser expressa normalmente ou até hiperexpressa, como efeito compensatório, podendo justificar também a resistência ocorrida em alguns clones a longo prazo.

É importante ressaltar também que no  $\text{IC}_{50\%}$  os clones monoclonais, que não ficaram hiper-expressos, apresentaram uma resistência ligeiramente maior que da linhagem não transfectada no tempo de 72 horas cuja  $\text{IC}_{50\%}$  foi de 6,56  $\mu\text{M}$ . Seja no clone controle que foi de 14,21  $\mu\text{M}$  (figura 13 B), seja nos diferentes clones que eram para ter o *hTERT* inibido. Uma hipótese possível é o processo de seleção clonal em si. Entretanto foi empregada a técnica de seleção clonal na linhagem não transfectada e quando se realizou o teste de MTT não houve diferença na toxicidade em relação a selvagem sem a seleção clonal. Destarte, tal fato poderia ser explicado pela resistência adquirida pela puromicina, uma vez que tal molécula é utilizada como controle na transfecção.

Já foi visto também que gliomas, além de serem tumores formados por diferentes alterações genéticas, são células mutáveis e vêm apresentando diversos fatores de resistência a diferentes fármacos (CAFFERY; LEE; ALEXANDER-BRYANT, 2019) o que explica, talvez, o motivo da resistência ocorrida ao MST-312 na linhagem U251.

Dessa forma, como as linhagens clonais não mantiveram a transfecção foi realizado testes com o MST-312 na célula poli clonal, já que, foi a única linhagem que teve redução da expressão de hTERT. As linhagens poli clonais são caracterizada por ter uma variedade genica imensa, pois os tumores estão suscetíveis a constantes alterações genéticas. Geralmente tais mutações acontecem para suprir sítios de ligação que as tornam sensíveis a algum composto ou até mesmo para poder conferir uma vantagem de crescimento (BIGNELL et al., 2010).

Em vista dos mecanismos que ocorrem nas células principalmente quanto a redução telomérica, é certo que a curto prazo (72 horas) não é possível um inibidor de telomerase conseguir reduzir o telômero a ponto de a célula entrar em crise e ocorrer decréscimo significativo em sua viabilidade. Posto isso, o MST-312 pode ter relação com a erosão telomérica (FUJIWARA et al., 2018), todavia o que justifica a redução da viabilidade celular demonstrada nesse estudo em vários testes é a possível relação de alguma via de sinalização ligada à telomerase, como a supressão de *NFkB* ou de *STAT3* (FATEMI; SAFA; KAZEMI, 2015; ZHANG et al., 2019) ou o fato de a telomerase facilitar diretamente a progressão do ciclo celular pela sua ligação com o telômero (THOMPSON et al., 2018).

É possível constatar a partir dos dados desse trabalho que nas células com o gene *hTERT* silenciado, há uma maior resistência ao MST-312 em todas as concentrações testadas, quando comparado com o controle, bem como, em 50  $\mu$ M o composto sequer chega a reduzir a viabilidade a menos de 50%. Entretanto, o que é inesperado é o fato de ter ocorrido a redução da viabilidade. Isso indica que o MST-312 está intimamente relacionado à via de sinalização dependente da telomerase, embora ainda exista a possibilidade desse composto estar relacionado também a outras vias ou simplesmente a redução da viabilidade ocorrer pelo fato de não ter havido um silenciamento adequado do *hTERT*.

Em um trabalho recente do Ameri et al. (2019) demonstrou-se que o MST-312 gerou toxicidade cujo motivo foi a inibição da telomerase. Isso porque a enzima além de atuar na atividade clássica de manutenção do telômero também está relacionada com vias de inflamação, apoptose e parada do ciclo celular em células de mieloma. Ele ratificou esse fato porque o composto promoveu um aumento da expressão do gene *bax* e uma diminuição do *bcl-2*, gene anti apoptótico, bem como do *c-Myc*, gene proliferativo, e do *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , genes esses relacionados a cascata da inflamação.

Nessa dissertação foi demonstrado que os efeitos do MST-312, na linhagem U251, a curto prazo, não estão associados a atividade típica da telomerase de manter o tamanho dos telômeros. A partir dos dados mostrados, pode-se sugerir que a atividade do MST-312 na telomerase tem uma possível relação com alguma via do ciclo celular com posterior morte por apoptose.

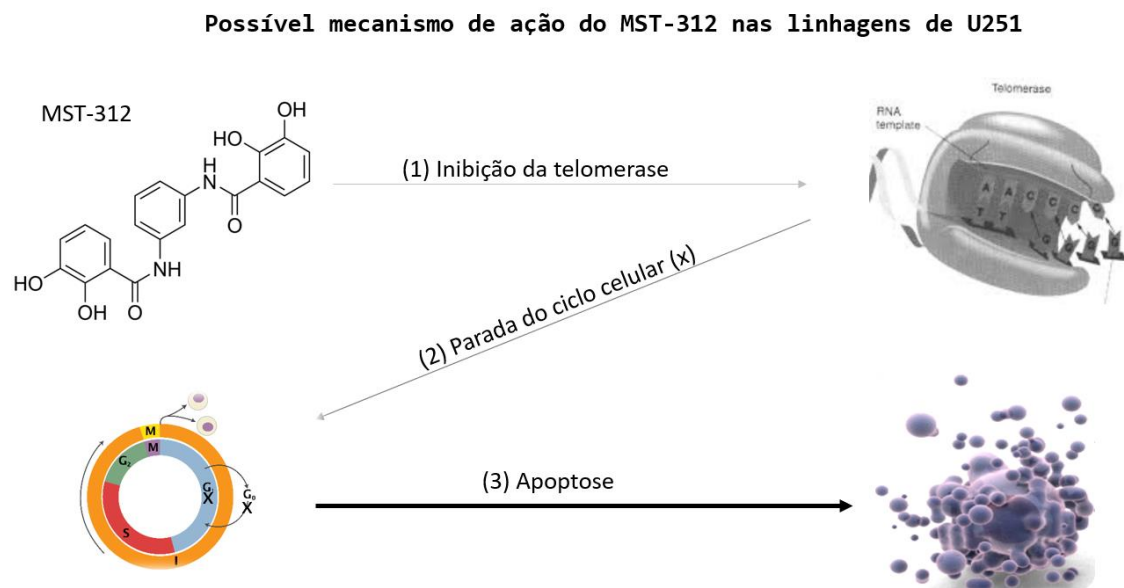


Figura 15. Possível mecanismo de ação do MST-312 na linhagem de U251. Em (1) ocorre a inibição da enzima em (2) acontece a parada do ciclo celular em G0/G1 por fim em (3) a célula entra em apoptose.



## **Conclusão**

Primeiramente, a longo prazo, é possível afirmar que o inibidor de telomerase MST-312 não seria uma boa alternativa para o uso clínico prolongado, pois, ficou claro que as células desenvolveram algum mecanismo de resistência, o que permitiu que elas ficassem vivas até o último dos 300 dias de tratamento.

Por fim, a curto prazo, é possível dizer que há uma forte relação entre o efeito tóxico do MST-312 e a telomerase, mas não por sua atividade típica relacionada ao alongamento telomérico, e sim por sua provável atividade ligada a alguma via de ciclo celular, uma vez que ocorreu a parada no ciclo em G0/G1 seguida de apoptose.

## Referencias

AKGÜL, Seçkin et al. Intratumoural Heterogeneity Underlies Distinct Therapy Responses and Treatment Resistance in Glioblastoma. **Cancers**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.190-212, 6 fev. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers11020190>.

AMERI, Zahra et al. Telomerase inhibitor MST-312 induces apoptosis of multiple myeloma cells and down-regulation of anti-apoptotic, proliferative and inflammatory genes. **Life Sciences**, [s.l.], v. 228, p.66-71, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2019.04.060>.

ANTOS, Patricia Carolina dos et al. Dysregulation of H/ACA ribonucleoprotein components in chronic lymphocytic leukemia. **Plos One**, [s.l.], v. 12, n. 6, 30 jun. 2017. Public Library of Science (PLoS). Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179883>>. Acesso em: 13 maio 2019.

BÄR, Christian et al. Telomeres and telomerase as therapeutic targets to prevent and treat age-related diseases. **F1000research**, [s.l.], v. 5, p.89-100, 20 jan. 2016. F1000 ( Faculty of 1000 Ltd). <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.7020.1>.

BASUN, S. H. L. K. V. R. B. E. B. L. **Telomeres and telomere dynamics: relevance to cancers of the gastrointestinal tract**. *Expert Rev GastroenterolHepatol*, v. 7, p. 733–748, Novembro 2013.

BIGNELL, Graham R. et al. Signatures of mutation and selection in the cancer genome. **Nature**, [s.l.], v. 463, n. 7283, p.893-898, 18 fev. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08768>.

BLOCK, Keith I. et al. Designing a broad-spectrum integrative approach for cancer prevention and treatment. **Seminars In Cancer Biology**, [s.l.], v. 35, p.276-304, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.09.007>.

CACCHIONE, Stefano; BIROCCIO, Annamaria; RIZZO, Angela. Emerging roles of telomeric chromatin alterations in cancer. **Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 38, n. 1, jan. 2019. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13046-019-1030-5>.

CAFFERY, Breanne; LEE, Jeoung; ALEXANDER-BRYANT, Angela. Vectors for Glioblastoma Gene Therapy: Viral & Non-Viral Delivery Strategies. **Nanomaterials**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.105-121, 16 jan. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nano9010105>.

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D.; MITCHELL, J. B. Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing. *Cancer Research*, v. 47, n. 15, p. 936- 942, 1987.

CESARE, A. J.; REDDEL, R. R. Alternative lengthening of telomeres: Models, mechanisms and implications. **Nat. Rev. Genet.** v. 11, p. 319-330, 2010. DOI: 10.1038/nrg2763.

CHEN, Hongwu et al. Sirtuin 1 knockdown inhibits glioma cell proliferation and potentiates temozolomide toxicity via facilitation of reactive oxygen species generation. **Oncology Letters**, [s.l.], 9 abr. 2019. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2019.10235>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6507466/>>. Acesso em: 21 jun. 2019.

CHEN, P et al. ShRNA-mediated silencing of hTERT suppresses proliferation and promotes apoptosis in osteosarcoma cells. **Cancer Gene Therapy**, [s.l.], v. 24, n. 8, p.325-332, ago. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/cgt.2017.22>.

CHENG, Yuqiang et al. CRISPR/Cas9-Mediated Chicken TBK1 Gene Knockout and Its Essential Role in STING-Mediated IFN- $\beta$  Induction in Chicken Cells. **Frontiers In Immunology**, [s.l.], v. 9, 4 jan. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.03010>. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03010>>. Acesso em: 11 maio 2019.

CHIODONI, Claudia et al. Cell communication and signaling: how to turn bad language into positive one. **Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 38, n. 1, p.128, 13 mar. 2019. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13046-019-1122-2>. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13046-019-1122-2>>. Acesso em: 11 maio 2019.

DAMM, K.. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. **The Embo Journal**, [s.l.], v. 20, n. 24, p.6958-6968, 17 dez. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/20.24.6958>.

DELGADO-LÓPEZ, P. D.; CORRALES-GARCÍA, E. M.. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. **Clinical And Translational Oncology**, [s.l.], v. 18, n. 11, p.1062-1071, 10 mar. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12094-016-1497-x>.

DIAO, Wenwen et al. Behaviors of Glioblastoma Cells in in Vitro Microenvironments. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.85-108, 14 jan. 2019. Springer Nature. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-36347-7>>. Acesso em: 11 maio 2019.

DILSHARA, Matharage Gayani et al. Camptothecin induces c-Myc- and Sp1-mediated hTERT expression in LNCaP cells: Involvement of reactive oxygen species and PI3K/Akt. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 127, p.53-60, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.001>.

FAN, Hengyi et al. Overexpressed miR-183 promoted glioblastoma radioresistance via down-regulating LRIG1. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 97, p.1554-1563, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.050>.

FATEMI, Ahmad; SAFA, Majid; KAZEMI, Ahmad. MST-312 induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in APL cells through inhibition of telomerase activity and suppression of NF- $\kappa$ B pathway. **Tumor Biology**, [s.l.], v. 36, n. 11, p.8425-8437, 29 maio 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-015-3575-z>.

FEI, Xiaowei et al. Eupatilin inhibits glioma proliferation, migration, and invasion by arresting cell cycle at G1/S phase and disrupting the cytoskeletal structure. **Cancer Management And Research**, [s.l.], v. 11, p.4781-4796, maio 2019. Dove Medical Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2147/cmar.s207257>.

FEIJOO P., D. D., T. L., G. A. **Telomere-Dependent Genomic Integrity: Evolution of the Fusion-Bridge-Breakage Cycle Concept**. *Current Pharmaceutical Design*, v.20, p.6375-6385, 2014.

FERLAY, Jacques et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. **European journal of cancer**, v. 49, n. 6, p. 1374-1403, 2013.

FERLAY, Jacques et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, v. 136, n. 5, 2015.

FRINK, Robin E. et al. Telomerase inhibitor imetelstat has preclinical activity across the spectrum of non-small cell lung cancer oncogenotypes in a telomere length dependent manner. **Oncotarget**, [s.l.], v. 7, n. 22, p.31639-34651, 13 maio 2016. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.9335>. Disponível em: <<https://doi.org/10.18632/oncotarget.9335>>. Acesso em: 11 maio 2019.

FUJIWARA, Chiaki et al. Cell-based chemical fingerprinting identifies telomeres and lamin A as modifiers of DNA damage response in cancer cells. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, 4 out. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-33139-x>. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-33139-x>>. Acesso em: 13 abr. 2019.

FURNARI, F. B. et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes & Development**, [s.l.], v. 21, n. 21, p.2683-2710, 1 nov. 2007. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1596707>.

GOLUB, Danielle et al. Mutant Isocitrate Dehydrogenase Inhibitors as Targeted Cancer Therapeutics. **Frontiers In Oncology**, [s.l.], v. 917 maio 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2019.00417>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31165048>>. Acesso em: 15 jun. 2019.

GURUNG, Resham et al. Targeting DNA-PKcs and telomerase in brain tumour cells. **Molecular Cancer**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.232-256, 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-13-232>.

GURUNG, Resham Lal et al. MST-312 Alters Telomere Dynamics, Gene Expression Profiles and Growth in Human Breast Cancer Cells. **Journal Of Nutrigenetics And Nutrigenomics**, [s.l.], v. 7, n. 4-6, p.283-298, 27 maio 2015. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000381346>.

GURUNG, Resham Lal et al. MST-312 Alters Telomere Dynamics, Gene Expression Profiles and Growth in Human Breast Cancer Cells. **Journal Of Nutrigenetics And Nutrigenomics**, [s.l.], v. 7, n. 4-6, p.283-298, 27 maio 2015. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000381346>.

HA, Shin-woo et al. Ultrasound-sensitizing nanoparticle complex for overcoming the blood-brain barrier: an effective drug delivery system. **International Journal Of Nanomedicine**, [s.l.], v. 14, p.3743-3752, maio 2019. Dove Medical Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s193258>.

HAJJ, Joëlle El et al. Telomerase regulation by the long non-coding RNA H19 in human acute promyelocytic leukemia cells. **Molecular Cancer**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.85-98, 27 abr. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12943-018-0835-8>.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 4, p. 646-674, 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hannen, R., & Bartsch, J. W. (2018). Essential roles of telomerase reverse transcriptase hTERT in cancer stemness and metastasis. *FEBS Letters*, 592(12), 2023–2031. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13084>.

HEYES, Niall; KAPOOR, Parth; KERR, Ian D.. Polymorphisms of the Multidrug Pump ABCG2: A Systematic Review of Their Effect on Protein Expression, Function, and Drug Pharmacokinetics. **Drug Metabolism And Disposition**, [s.l.], v. 46, n. 12, p.1886-1899, 28 set. 2018. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/dmd.118.083030>.

INCA, **Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva**, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2018.

ISHAQ, Abbas et al. Telomerase Activity is Downregulated Early During Human Brain Development. **Genes**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.27-41, 16 jun. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/genes7060027>.

JOO, Bio et al. Amide proton transfer imaging might predict survival and IDH mutation status in high-grade glioma. **European Radiology**, [s.l.], 7 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00330-019->

06203-x. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31175415>>. Acesso em: 15 jun. 2019.

JUE, Toni Rose et al. A case study of a long-term glioblastoma survivor with unmethylated MGMT and hypermutated genotype. **Molecular Case Studies**, [s.l.], v. 5, n. 3, jun. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31160353>>. Acesso em: 15 jun. 2019.

KARIM, F. et al. How Does Anaerobic Protein Expression Differ in Benign Versus Malignant Tumors? **Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery**, [s.l.], v. 75, n. 10, p.E396, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2017.07.122>. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.joms.2017.07.122>>. Acesso em: 13 abr. 2019.

KARP, G. **Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos**. Ed. Manole, 1ª Ed p. 512-513, São Paulo, 2005.

KNOWLES, Kurt J. et al. Malignant granular cell tumors: the role of electron microscopy in the definitive diagnosis of an extremely aggressive soft tissue neoplasm. **Ultrastructural Pathology**, [s.l.], v. 42, n. 3, p.304-311, 4 maio 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01913123.2018.1465501>.

KOGANI, G. et al. Yeast cell wall polysaccharides as antioxidants and antimutagens: Can they fight cancer? Minireview. **Neoplasma**, v. 55, n. 5, p. 387-393, 2008.

LEÃO, Ricardo et al. Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: clinical impacts in cancer. **Journal Of Biomedical Science**, [s.l.], v. 25, n. 1, 12 mar. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12929-018-0422-8>. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12929-018-0422-8>>. Acesso em: 11 abr. 2019.

LI, Huiqi et al. Smoking-induced risk of future cardiovascular disease is partly mediated by cadmium in tobacco: Malmö Diet and Cancer Cohort Study. **Environmental Health**, [s.l.], v. 18, n. 1. 14 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12940-019-0495-1>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31200698>>. Acesso em: 16 jun. 2019.

LOUIS, David N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, [s.l.],

v. 131, n. 6, p.803-820, 9 maio 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.

LUGO, Diego et al. The effects of physical activity on cancer prevention, treatment and prognosis: A review of the literature. **Complementary Therapies In Medicine**, [s.l.], v. 44, p.9-13, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctim.2019.03.013>.

LUSTIG, Arthur J.. Towards the Mechanism of Yeast Telomere Dynamics. **Trends In Cell Biology**, [s.l.], v. 29, n. 5, p.361-370, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2019.01.005>.

MAJI, Basudeb; BHATTACHARYA, Santanu. Advances in the molecular design of potential anticancer agents via targeting of human telomeric DNA. **Chem. Commun.**, [s.l.], v. 50, n. 49, p.6422-6438, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c4cc00611a>.

MARQUES, Cristiana. **Oncologia: uma abordagem multidisciplinar**. Carpe Diem, 2016.

MARTENS, Dries S. et al. Retinal microcirculation and leukocyte telomere length in the general population. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, 4 maio 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-25165-6>. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-25165-6>>. Acesso em: 12 maio 2019.

MARTIN-LOECHES, Ignacio et al. Influenza and associated co-infections in critically ill immunosuppressed patients. **Critical Care**, [s.l.], v. 23, n. 1, 2 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13054-019-2425-6>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31046842>>. Acesso em: 14 jun. 2019.

MATSUDO, Sandra Mahecha; MATSUDO, Victor Keihan Rodrigues; BARROS NETO, Turíbio Leite. Atividade física e envelhecimento: aspectos epidemiológicos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 7, n. 1, p. 2-13, 2001.

MOLINARI, Emanuela; CURRAN, Olimpia e; GRANT, Robin. Clinical importance of molecular markers of adult diffuse glioma. **Practical Neurology**, [s.l.], p.2018-



2018, 6 jun. 2019. *BMJ*. <http://dx.doi.org/10.1136/practneurol-2018-002116>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31175262>>. Acesso em: 14 jun. 2019.

MORAIS, Karollyne da Silva et al. Long-term in vitro treatment with telomerase inhibitor MST-312 induces resistance by selecting long telomeres cells. **Cell Biochemistry And Function**, [s.l.], 23 abr. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31012504>>. Acesso em: 15 jun. 2019.

MORAIS, Karollyne S. et al. Long-term exposure to MST-312 leads to telomerase reverse transcriptase overexpression in MCF-7 breast cancer cells. **Anti-cancer Drugs**, [s.l.], v. 28, n. 7, p.750-756, ago. 2017.

MORAIS, Karollyne S. et al. Long-term exposure to MST-312 leads to telomerase reverse transcriptase overexpression in MCF-7 breast cancer cells. **Anti-cancer Drugs**, [s.l.], v. 28, n. 7, p.750-756, ago. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/cad.0000000000000508>.

MOSOYAN, G et al. Imetelstat, a telomerase inhibitor, differentially affects normal and malignant megakaryopoiesis. **Leukemia**, [s.l.], v. 31, n. 11, p.2458-2467, 8 mar. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2017.78>.

NEWTON, Andrew D. et al. Intraoperative Near-infrared Imaging Can Identify Neoplasms and Aid in Real-time Margin Assessment During Pancreatic Resection. **Annals Of Surgery**, [s.l.], v. 270, n. 1, p.12-20, jul. 2019. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/sla.00000000000003201>.

OSBORNE, R. H. et al. The genetic epidemiology of glioma. **Neurology**, v. 57, n. 10, p. 1751-1755, 2001.

PASCOLO, Emanuelle et al. Mechanism of Human Telomerase Inhibition by BIBR1532, a Synthetic, Non-nucleosidic Drug Candidate. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 277, n. 18, p.15566-15572, 19 fev. 2002. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m201266200>.

PEREIRA, F. A. N. avaliação da atividade de telomerase em células-tronco embrionárias indiferenciadas e em células neoplásicas de camundongo. **Universidade**

**Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2008. Acessado em 14 de Maio de 2018  
[http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/ECJS-84NHFH/francisco\\_de\\_assis\\_nunes\\_pereira.pdf?sequence=1](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/ECJS-84NHFH/francisco_de_assis_nunes_pereira.pdf?sequence=1).

PETŐVÁRI, Gábor et al. Inhibition of Metabolic Shift can Decrease Therapy Resistance in Human High-Grade Glioma Cells. **Pathology & Oncology Research**, [s.l.], 11 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-019-00677-2>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31187466>>. Acesso em: 14 jun. 2019.

PFAFFL, M. W.. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 29, n. 9, p.45-45, 1 maio 2001. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.

PICKETT, Hilda; REDDEL, Roger R. Molecular mechanisms of activity and derepression of alternative lengthening of telomeres. **Nature Structural & Molecular Biology**, [s.l.], v. 22, n. 11, p.875-880, 4 nov. 2015.

PITANGA, FJ Gondim. Epidemiologia, atividade física e saúde. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 10, n. 3, p. 49-54, 2008.

QUIRINO, Maria Rozeli de Souza et al. Avaliação do conhecimento sobre o câncer de boca entre participantes de campanha para prevenção e diagnóstico precoce da doença em Taubaté-SP. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35, n. 4, p. 327-333, 2013.

RÖTH, Alexander; HARLEY, Calvin B.; BAERLOCHER, Gabriela M.. Imetelstat (GRN163L) - Telomerase-Based Cancer Therapy. **Recent Results In Cancer Research**, [s.l.], p.221-234, 7 out. 2009. Springer Berlin Heidelberg. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-01222-8\\_16](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-01222-8_16).

SALAZAR, Nicole et al. Use of shRNA for Stable Suppression of Chemokine Receptor Expression and Function in Human Cancer Cell Lines. **CytokineBioassays**, [s.l.], p.209-218, 2014. Springer New York. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-0928-5\\_19](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-0928-5_19).

SCHRANK, Zachary et al. Oligonucleotides Targeting Telomeres and Telomerase in Cancer. **Molecules**, [s.l.], v. 23, n. 9, p.2267-2283, 5 set. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23092267>.

SEIMIYA, H. The telomeric PARP, tankyrases, as targets for cancer therapy. **British Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 94, n. 3, p.341-345, 17 jan. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6602951>.

SEIMIYA, H.; OH-HARA, T.; SUZUKI, T.; NAASANI, I.; SHIMAZAKI, T.; TSUCHIYA, K.; TSURUO, T. Telomere shortening and growth inhibitions of human cancer cells by novel synthetic telomerase inhibitors MST-312, MST-295, and MST-199. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, p. 657-665, 2002.

SERAKINCI, Nedime; TIBER, Pınar Mega; ORUN, Oya. Chromatin modifications of hTERT gene in hTERT-immortalized human mesenchymal stem cells upon exposure to radiation. **European Journal Of Medical Genetics**, [s.l.], v. 61, n. 5, p.288-293, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.12.014>.

SERRANO, Diego et al. Inhibition of telomerase activity preferentially targets aldehyde dehydrogenase-positive cancer stem-like cells in lung cancer. **Molecular Cancer**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.96-111, 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-10-96>.

SUGARMAN, Eric T.; ZHANG, Gao; SHAY, Jerry W.. In perspective: An update on telomere targeting in cancer. **Molecular Carcinogenesis**, [s.l.], p.25-35, 6 maio 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mc.23035>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=10.1002%2Fmc.23035>>. Acesso em: 15 jun. 2019.

TAYLOR, T. E.; FURNARI, F. B.; CAVENEE, W. K.. Targeting EGFR for Treatment of Glioblastoma: Molecular Basis to Overcome Resistance. **Current Cancer Drug Targets**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.197-209, 1 mar. 2012. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/156800912799277557>.

TEIXEIRA, Ilka Nicéia D.; GUARIENTO, Maria Elena. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 6, p. 2845-2857, 2010.

THOMPSON, Connor A.h. et al. Transient Telomerase Inhibition with Imetelstat Impacts DNA Damage Signals and Cell-Cycle Kinetics. **Molecular Cancer Research**, [s.l.], v. 16, n. 8, p.1215-1225, 14 maio 2018.

TOLEDO, S. R. C. D. Genética do Câncer. In: SCHOR, N.; BOIM, M. A.; SANTOS, O. F. P. **Bases Moleculares da Biologia, da Genética e da Farmacologia**. 1ª. ed. [S.l.]: Atheneu, v. 1, 2005. Cap. 19, p. 245-253.

TOMC, Jana et al. Adipose tissue stem cell-derived hepatic progenies as an in vitro model for genotoxicity testing. **Archives Of Toxicology**, [s.l.], v. 92, n. 5, p.1893-1903, 16 mar. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-018-2190-3>.

TOYODA, Yu; TAKADA, Tappei; SUZUKI, Hiroshi. Inhibitors of Human ABCG2: From Technical Background to Recent Updates With Clinical Implications. **Frontiers In Pharmacology**, [s.l.], v. 10, p.208-217, 5 mar. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2019.00208>.

TURCOTTE, Lucie M. et al. Temporal Trends in Treatment and Subsequent Neoplasm Risk Among 5-Year Survivors of Childhood Cancer, 1970-2015. **Jama**, [s.l.], v. 317, n. 8, p.814, 28 fev. 2017. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2017.0693>.

VAN TONDER, Alet; JOUBERT, Annie M; A CROMARTY,. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **Bmc Research Notes**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.47, 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13104-015-1000-8>.

VARELA, e; A BLASCO, M. 2009 Nobel Prize in Physiology or Medicine: telomeres and telomerase. **Oncogene**, [s.l.], v. 29, n. 11, p.1561-1565, mar. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2010.15>.

VITIS, Marco de; BERARDINELLI, Francesco; SGURA, Antonella. Telomere Length Maintenance in Cancer: At the Crossroad between Telomerase and Alternative Lengthening of Telomeres (ALT). **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.606, 18 fev. 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19020606>

VLAMING, Maria L.h.; LAGAS, Jurjen S.; SCHINKEL, Alfred H.. Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): Recent findings in Abcg2 knockout mice. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 61, n. 1, p.14-25, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.007>.

VON MORGEN, Patrick; MACIEJOWSKI, John. The ins and outs of telomere crisis in cancer. **Genome Medicine**, [s.l.], v. 10 nov. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13073-018-0596-4>. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13073-018-0596-4>>. Acesso em: 11 maio 2019.

WAGHORN, Philip A. et al. Targeting telomerase with radiolabeled inhibitors. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 125, p.117-129, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.028>.

WEI, Chen et al. Alternative lengthening of telomeres in hTERT-inhibited laryngeal cancer cells. **Cancer Science**, v. 101, n. 8, p.1769-1776, out. 2010.

WU, Hua-lian et al. Induction of Apoptosis in Human Glioma Cells by Fucoxanthin via Triggering of ROS-Mediated Oxidative Damage and Regulation of MAPKs and PI3K–AKT Pathways. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 67, n. 8, p.2212-2219, 28 jan. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07126>.

WÜNSCH FILHO, Victor et al. Perspectivas da investigação sobre determinantes sociais em câncer. **Physis-Revista de Saúde Coletiva**, v. 18, n. 3, 2008.

XIU, Li-juan et al. Anticancer effects of traditional Chinese herbs with phlegm-eliminating properties – An overview. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 172, p.155-161, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.05.032>.

YAN, Wei et al. Identification of MMP-9 specific microRNA expression profile as potential targets of anti-invasion therapy in glioblastoma multiforme. **Brain Research**, [s.l.], v. 1411, p.108-115, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2011.07.002>.

YIN, Jianxing et al. Exosomal transfer of miR-1238 contributes to temozolomide-resistance in glioblastoma. **Ebiomedicine**, [s.l.], mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.016>.

ZEMBRZUSKA, Katarzyna; OSTROWSKI, Robert; MATYJA, Ewa. Hyperbaric oxygen increases glioma cell sensitivity to antitumor treatment with a novel isothiourea derivative in  $\diamond$  vitro. **Oncology Reports**, [s.l.], 14 mar. 2019. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2019.7064>.

ZHANG, Bin et al. Proton pump inhibitor pantoprazole inhibits gastric cancer metastasis via suppression of telomerase reverse transcriptase gene expression. **Cancer Letters**, [s.l.], v. 452, p.23-30, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2019.03.029>.

ZHANG, Danfeng et al. CCNG2 Overexpression Mediated by AKT Inhibits Tumor Cell Proliferation in Human Astrocytoma Cells. **Frontiers In Neurology**, [s.l.], v. 9, 18 abr. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2018.00255>.

ZHANG, Kai et al. WNT/ $\beta$ -Catenin Directs Self-Renewal Symmetric Cell Division of hTERT<sup>high</sup> Prostate Cancer Stem Cells. **Cancer Research**, [s.l.], v. 77, n. 9, p.2534-2547, 16 fev. 2017. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-16-1887>.

ZHONG, Li-xia et al. Correlation of ARHI upregulation with growth suppression and STAT3 inactivation in resveratrol-treated ovarian cancer cells. **Cancer Biomarkers**, [s.l.], v. 21, n. 4, p.787-795, 14 mar. 2018. IOS Press. <http://dx.doi.org/10.3233/cbm-170483>.

ZHU, Jinfang et al. TPP1 OB-fold domain protein suppresses cell proliferation and induces cell apoptosis by inhibiting telomerase recruitment to telomeres in human lung cancer cells. **Journal Of Cancer Research And Clinical Oncology**, [s.l.], v. 145, n. 6, p.1509-1519, 23 abr. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-019-02921-3>.