

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Comissão de Graduação do Curso de Biotecnologia

**Determinação do papel das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-8
na proliferação, resistência quimioterápica e invasão celular em
glioblastoma humano.**

Karina Klafke

Porto Alegre, 2015

Karina Klafke

Determinação do papel das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-8 na proliferação, resistência quimioterápica e invasão celular em glioblastoma humano.

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia com ênfase em Biotecnologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

Co-orientador: Dr. Alfeu Zanotto-Filho

Porto Alegre

2015

Karina Klafke

Determinação do papel das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-8 na proliferação, resistência quimioterápica e invasão celular em glioblastoma humano.

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia com ênfase em Biotecnologia Molecular

Banca Examinadora:

Dr^a. Luana Heimfarth – UFRGS

Prof^a. Dr^a. Elizandra Braganhol – UFCSPA

Prof. Dr. Daniel Pens Gelain – UFRGS

Porto Alegre, 2015

Agradecimento

À minha família, meus pais e irmão por sempre ser meu lar. E a minha dinda por sempre estar presente nos momentos de crise.

Aos meus amigos por todo o apoio e amor (Dani, Rudolf, sem vocês não daria).

Ao meu orientador Daniel pelo conhecimento, confiança e liberdade no trabalho.

Ao meu co-orientador Alfeu pelos ensinamentos, apoio e paciência.

Aos colegas de laboratório 32, por me fazer rir todos os dias. E aos colegas do Cristália pelo acolhimento e risadas.

Resumo

Inflamação associada ao câncer vem sendo relacionado com progressão de fenótipo maligno em diversos tipos tumorais, inclusive glioma. Este estudo teve o intuito de realizar uma caracterização do microambiente inflamatório em gliomas, partindo da importância das interleucinas como moduladores solúveis na composição do secretoma inflamatório, além da investigação de vias de sinalização e processos envolvidos na caracterização inflamatória em gliomas humanos.

A função do secretoma e alguns dos seus componentes chave foram investigados *in vitro* para processo celulares de proliferação, invasão, quimiorresistência, quimiotaxia e ativação de macrófagos. E, em adição, a caracterização das rotas de sinalização de STAT3 e NF- κ B como reguladores essenciais na mediação do secretoma inflamatório foi estudada. A inibição conjunta destes apresentou diminuição de parâmetros do fenótipo maligno agressivo de GBM, atuando tanto na proliferação e migração celular quanto na abolição da ativação de monócitos.

Os resultados fornecem um panorama dos processos inflamatórios em glioma correlacionados com seu secretoma pela interação de tipos celulares complexos e descreve vias inflamatórias passíveis de intervenção por inibidores farmacológicos para proveito de terapias em GBM.

Palavras-chave: Glioma; Inflamação; Secretoma.

Abstract

Inflammation linked to cancer has been associated with progression of malignant phenotype in various tumor types including glioma. This study aimed to characterize the inflammatory microenvironment in gliomas, based on the importance of interleukins as soluble modulators in the composition of the inflammatory secretome, as well as to investigate signaling pathways and processes involved in inflammatory characterization in human gliomas.

The function of the secretome and of some of its key components were investigated *in vitro* for cellular processes of proliferation, invasion, chemoresistance, chemotaxis and macrophages activation and, in addition, the signaling pathways of STAT3 and NF- κ B as essential regulators in the mediation of inflammatory secretome production were characterized. The co-inhibition of these parameters presented a decrease on the malignant aggressive GBM features, acting not only in the proliferation and cellular migration but also in the abolition of monocytes activation.

The results provide an overview of inflammatory processes correlated with glioma secretome by the interaction of complex cell types and describes inflammatory pathways that can be prevented by pharmacological inhibitors for the benefit of therapies for GBM.

Keywords: Gliomas; Inflammation; Secretome.

Índice de figuras

Figura I: Macrófagos associados ao tumor.....	16
Figura II: Via de sinalização JAK/STAT.....	22
Figura III: Via de sinalização NF- κ B.....	24
Figura 1: Condições basais de produção de interleucinas 6 e 8, migração celular e imunoconteúdo de quinase	33
Figura 2: Silenciamento de interleucina 6 e 8 e sua interferência na invasão celular em linhagem U251MG	34
Figura 3: Efeitos do tratamento de TMZ combinado ao silenciamento de interleucinas 6 e 8 na viabilidade e ciclo celular em linhagem U251MG	36
Figura 4: Tratamento com inibidores de quinase MAPK e sua influência na viabilidade celular, produção de interleucina e invasibilidade celular	38
Figura 5: Localização intracelular das proteínas STAT3 e p65, bem como suas formas ativas por detecção imunofluorescente em linhagem celular U251MG	39
Figura 6: Efeito da co-cultura de monócito U937 com a linhagem de glioma U251MG	41

Dicionário de Termos e Abreviações

Akt	Proteína quinase B
CM	Meio condicionado
CSF	Fator estimulante de colônia
CXCR	Receptor de quimiona CXC
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidérmico
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FACS	Separador de célula ativado por fluorescência
GBM	Glioblastoma Multiforme
IL	Interleucina
JAK	Janus quinase
MAPK	Proteína quinase ativadas por mitógeno
MMP	Metaloproteinase da matriz
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
PI3K	Fosfoinosítido 3-quinase
PTEN	Fosfatase homóloga a tensina
siRNA	Pequeno RNA de interferência
SNC	Sistema Nervoso Central
SOCS	Supressor de sinalização de citocinas
SRB	Sulforrodamina B
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TAM	Macrófago associado ao tumor
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Sumário

1. Introdução	11
1.1. Glioblastoma Multiforme	11
1.2. Glioblastoma e inflamação.....	14
1.3. Macrófagos associados ao tumor	15
1.4. Interleucina 8	17
1.5. Interleucina 6	19
1.6. Via de sinalização JAK/STAT	21
1.7. Via de sinalização NF-κB	23
2. Justificativa	25
3. Objetivos	26
3.1. Objetivos Gerais	26
3.2. Objetivos Específicos.....	26
4. Metodologia	27
4.1. Cultivo celular	27
4.2. Viabilidade celular	28
4.3. Ensaio Clonogênico	28
4.4. Transfecção reversa	28
4.5. Ensaio de invasão celular	28
4.6. Ensaio de adesão celular.....	29
4.7. ELISA.....	29
4.8. Western blot.....	30
4.9. Análise de ciclo celular	30
4.10. Imunocitoquímica.....	30
4.11. Análise Estatística.....	31

5. Resultados	32
5.1. Linhagens celular de glioma U251MG e U87MG produzem interleucina 6 e 8, possuem capacidade de invasão celular e atividade basal de quinases	32
5.2. Interleucina 6 é importante para a capacidade de invasão celular na linhagem U251MG	33
5.3. Silenciamento das interleucinas sensibiliza a linhagem celular U251MG a tratamento com TMZ	35
5.4. STAT3 e p65 são reguladores chave na mediação da migração celular em linhagem U251MG	37
5.5. Co-cultura com monócitos potencializa a proliferação e invasão de gliomas via ativação de macrófagos pelo meio condicionado de gliomas.....	40
6. Discussão	43
7. Conclusão	48
8. Perspectivas	49
9. Referências Bibliográficas	50

1. Introdução

1.1. Glioblastoma Multiforme

Tumores do Sistema Nervoso Central foram inicialmente classificados pela Organização Mundial da Saúde em 1979 e desde então, aspectos histológicos e imunohistoquímicos, perfis genéticos, dados epidemiológicos e sinais clínicos foram considerados para estabelecer um arranjo de mais de 130 tipos e subtipos tumorais (Louis et al, 2007; Huttner 2012). A classificação atual inclui graus de malignidade entre os tumores de gliomas que varia em escala de I (potencial proliferativo baixo e geralmente tem a possibilidade de resecção e cura cirúrgica) a IV (rápida progressão e de difícil terapia, apresentam alta taxa de recorrência). Podendo ser classificados amplamente como gliomas, este grande grupo inclui astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitoma,ependimomas e glioblastomas.

Os gliomas de baixo grau de malignidade são tumores de grau I e II, diferenciados e de crescimento lento, apresentando bom prognóstico. Entre os mais comuns estão: astrocitoma difuso, astrocitoma pilocítico, oligodendroglioma, ganglioglioma e gliomas mistos. Já os de alto grau de malignidade são os tumores de grau III (Astrocitoma anaplástico) e IV (Glioblastoma Multiforme), os quais correspondem a 80% dos gliomas diagnosticados, tipicamente não diferenciados ou anaplásicos, de alta taxa de proliferação e resistentes a terapia, apresentam, comumente, prognóstico desfavorável.

Glioblastoma multiforme (GBM) é um tumor cerebral primário de grau IV do Sistema Nervoso Central, sendo o mais comum e o mais agressivo em adultos (Nishikawa, 2010), contando com até 80% dos tumores cerebrais de alto grau diagnosticados (CBTRUS 2011). Apresenta padrão de crescimento multifocal e é reconhecido por sua média de sobrevivência baixa, em torno de doze a dezoito meses após diagnóstico (Wen & Kesari, 2008; Grossman et al, 2010), sendo que a sobrevida média de cinco anos é extremamente baixa, apenas 5% (Stupp et al, 2005). Pouca melhoria no prognóstico de pacientes e retardo da progressão da

doença foi alcançada nas últimas cinco décadas apesar dos avanços da medicina e dos esforços aplicados à pesquisa, refletindo uma necessidade médica não atendida e a complexidade deste tipo tumoral, que abrange aspectos multifatoriais (Koukourakis et al, 2009). Pelo fato de o sistema nervoso central ser um ambiente anatômico de difícil acesso, as terapias disponíveis costumam ser invasivas, ineficientes e, normalmente, paliativas, apresentando um sucesso de tratamento bastante limitado. As estratégias terapêuticas atuais incluem ressecção cirúrgica, terapia de radiação e quimioterapia, principalmente com o agente alquilante de DNA, temozolamida (Omar & Mason, 2010).

Baseado em esforços recentes para caracterizar anormalidades genéticas nesses tumores, GBM's foram organizados em quatro subtipos moleculares fundamentado na sua assinatura transcricional, são estes: proneural, neural, clássico e mesenquimal (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; Verhaak RG et al, 2010). Destes, o tipo mesenquimal tem sido relacionado com o pior prognóstico e com recorrência tumoral (Phillips HS et al, 2006). A natureza agressiva deste câncer reside na sua capacidade de se infiltrar através do tecido cerebral, em sua característica de crescimento extremo e na resistência intrínseca a terapias. A habilidade das células GBM de invadir tecido cerebral saudável é crítica para a recorrência tumoral, responsável pelo desfecho fatal desta doença. Outra característica patológica muito importante é a extensa vascularização, ou seja, a capacidade de formação de novos vasos sanguíneos pelo processo de angiogênese, sendo que o grau deste correlaciona diretamente com o estágio tumoral (Jain RK et al, 2007).

Além disso, a complexidade desse tipo de câncer tem base em sua heterogeneidade; do ponto de vista celular, GBM's possuem diversos tipos celulares, alguns com tumorigenicidade aumentada, outros com características exacerbadas de células tronco, fatores que são relacionados com relapso tumoral e parada transiente no ciclo celular. Apresentando características fenotípicas de astrócitos e de seus precursores (Louis et al, 2007), as células estaminais neuronais, já foram propostas como as células de origem deste câncer, sugerindo que a perda de regulação no mecanismo normal das células, incluindo a diferenciação de célula tronco em astrócito pode contribuir para a patogênese do glioblastoma. Porém, as células parenquimais associadas ao tumor, como células vasculares, microglia e

células imunes periféricas também possuem um papel central na progressão da patologia (Yeung YT et al, 2013).

Sob uma perspectiva molecular, a heterogeneidade do tumor é evidenciada pela presença de vários sítios de mutação tumor-específico. Existem vários marcadores oncogênicos distribuídos de maneira desigual no GBM; os mais comuns incluem a superexpressão de EGFR mutante (EGFRvII) e a perda do homólogo de fosfatase e tensina (PTEN), além de diferentes mutações na proteína p53; resultando no silenciamento/ativação diferencial de múltiplas vias de sinalização. Acredita-se que a combinação complexa dos fatores celulares e moleculares confere ao tumor uma resposta imprevisível e usualmente negativa a intervenções terapêuticas (Yeung YT et al, 2013).

Por fim, o desenvolvimento de um micro ambiente inflamatório tem sido considerado importante no desencadeamento e desenvolvimento do glioblastoma, já que é conhecido como a força motriz para a progressão na neoplasia incipiente. No caso de GBM, o tumor é cercado por um *pool* de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento, abrindo a possibilidade de estes contribuírem ativamente para o fenótipo global de GBM. Porém, o entendimento da relação direta entre o glioblastoma multiforme e o desenvolvimento de abordagens terapêuticas que tem como alvo a inflamação para GBM são ainda limitadas (Mantovani et al, 2008; Solinas et al, 2010).

1.2. Glioblastoma e inflamação

A relação entre câncer e inflamação vem sendo extensamente estudada e já se sabe que vários modelos de eventos inflamatórios contribuem para o desenvolvimento tumoral e que há relação com o grau da doença. Doenças ou infecções repetitivas que desencadeiam um quadro de resposta inflamatória crônica podem eventualmente levar a um câncer e, no aspecto intrínseco, a manifestação de oncogenes pode também desencadear inflamação associada à patologia (Aggarwal BB, Sung B, Gupta SC, 2014).

O microambiente tumoral é influenciado por muitos outros tipos celulares, tanto os que formam o tumor como também as células extrínsecas. Em adição a isso, o rápido crescimento tumoral resulta em hipóxia e proliferação vascular aberrante, proporcionando a infiltração de células do sistema imunitário, como eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos. A comunicação dessa rede celular é complexa e envolve diversas citocinas que atuam de forma parácrina e autócrina, resultando na ativação ou supressão aberrante de várias vias de sinalização, as quais contribuem possivelmente para a progressão da doença. (Rossi et al, 1987; Fossati et al, 1999; Murat et al, 2009; Charles & Holland 2010; Yang et al, 2011; Sen 2011; Huysentruyt et al, 2011; Curran & Bertics 2012; Charles et al, 2012).

Na patofisiologia de GBM, a relação entre predisposição inflamatória e desenvolvimento tumoral ainda não foi estabelecida, sendo assim, glioblastoma provavelmente não é um câncer induzido por inflamação. Há indícios de que a inflamação em GBM seja impulsionada por mutações oncogênicas assim como mudanças no microambiente, logo GBM é melhor descrito como um câncer que induz inflamação. É importante ressaltar que a evolução da inflamação é uma resposta não apenas à doença, mas também à senescência e morte celular induzida por dano a DNA devido às terapias com natureza necrótica. Instabilidade genética, modificações epigenéticas e mutações também podem estar relacionadas à carcinogênese por meio da inflamação (Albulescu R et al, 2013).

1.3. Macrófagos associados ao tumor

Um tumor que evolui sem inflamação crônica subjacente também apresenta inflamação, através de um microambiente inflamatório tipicamente gerado por macrófagos associados ao tumor (TAM), os quais contribuem significativamente para a massa tumoral (Gordon & Taylor, 2005). Estes são derivados de monócitos circulantes atraídos por moléculas secretadas pelo tumor que induzem sua diferenciação para macrófagos ativos, principalmente pelo fator estimulante de colônia CSF1. TAM comumente se acumulam em regiões de necrose caracterizadas por hipóxia (Sica A, Allavena P, Mantovani A, 2008) (Fig. 1) e, apesar de a função usual de um macrófago ser a de responder a patógenos modulando a resposta imunitária adaptativa e reparo tecidual (Mosser & Edwards 2008), TAM's têm sido associados com a progressão do câncer, principalmente à metástase, por meio de suporte de sobrevivência e crescimentos em sítios distantes.

Dois estados distintos de ativação polarizada para macrófagos foram definidos: o fenótipo clássico de macrófago ativo M1 e o fenótipo alternativo M2, ambos induzidos por flutuações na secreção de citocinas (Gordon & Taylor 2005; Mantovani et al, 2002; Davis et al, 2013). Macrófagos M1 tem papel efetor em resposta imune celular TH1 pela produção de moduladores solúveis. Enquanto o tipo M2 tem envolvimento com imunossupressão, além de possuir baixa capacidade de apresentação de antígenos e alta produção de citocinas; estes podem ainda ser divididos em M2a, M2b e M2c baseado no perfil de expressão gênica (Mantovani et al, 2004; Qian BZ & Pollard JW et al, 2010). Estudos recentes tem associado o fenótipo M2 com macrófagos associados ao tumor, relacionando estes com processo de angiogênese, crescimento tumoral, remodelação tecidual e migração celular, favorecendo um ambiente pró-tumoral; além disso, a expressão predominante de macrófagos M2 reflete em estágios finais da progressão tumoral (Mantovani A et al, 2002; Gabrusiewicz K et al, 2011).

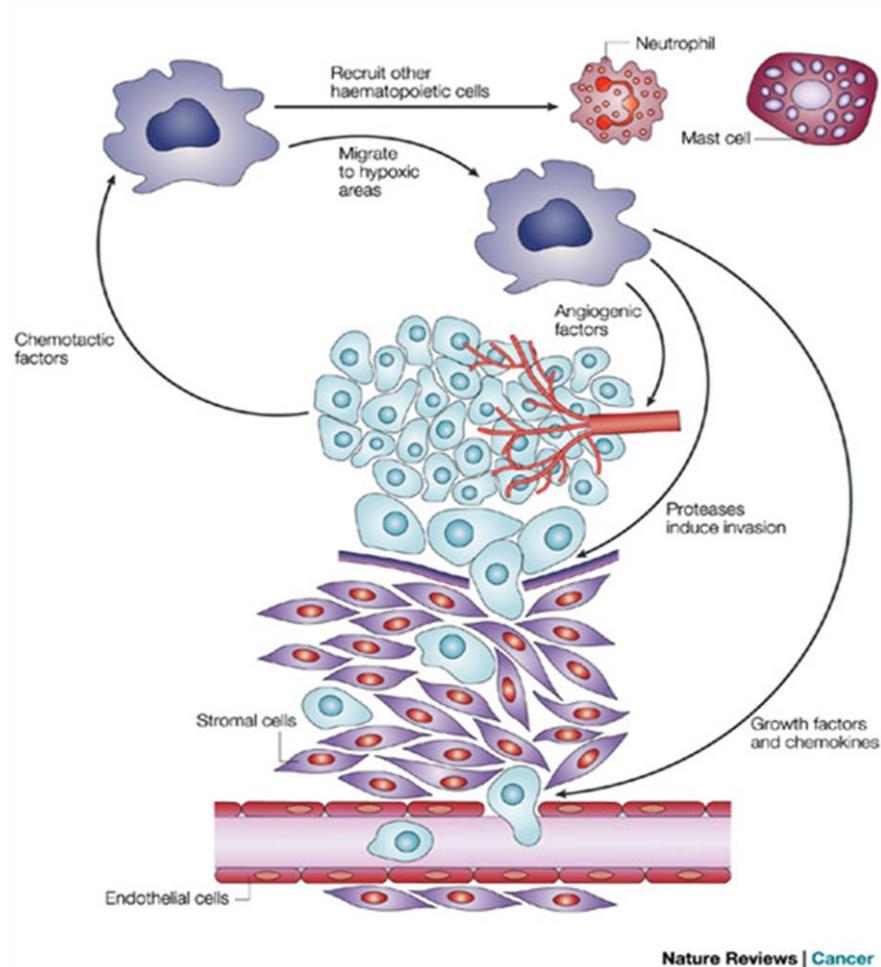


Figura I: Monócitos são recrutados para área tumoral por fatores quimiotáticos, onde sofrem diferenciação por CSF1 a macrófagos, estes migram para regiões de hipóxia, onde estimulam angiogênese pela expressão de fatores como fator de crescimento endotelial (VEGF) e angiopietina 1 e 2 (ANG1 e ANG2). TAM também promovem invasão tumoral, através da produção de proteases como metaloproteínas da matriz (MMP), crescimento e migração tumoral devido a fatores de crescimento e quimiocinas (fator de crescimento epidermal EGF, interleucina 8 IL-8 e fator tumoral de necrose TNF), além de sinais anti-apoptóticos. Além disso, também são capazes de recrutar outros monócitos e outras células hematopoiéticas, como neutrófilos e mastócitos, que amplificam este processo (Pollard JF, 2004).

1.4. Interleucina 8

Interleucina 8 (IL-8) foi uma das primeiras quimiocinas descobertas e foi inicialmente identificada como um fator quimiotático secretado por monócitos ativos e macrófagos que promovem a migração coordenada e direcional de células do sistema imunitário como neutrófilos, basófilos e linfócitos T (Baggiolini et al, 1989; Rossi & Zlotnik, 2000). Posteriormente, foi atribuída como um importante fator para doenças inflamatórias e autoimune devido as suas propriedades pró-inflamatórias (Harada et al, 1994; Koch et al, 1992; Smyth et al, 1991). Em ambiente tumoral, IL-8 pode ser secretada por diversos tipos celulares presentes de forma intrínseca ao tumor, tais como células de defesa (macrófagos, linfócitos e neutrófilos), células da microglia, células endoteliais, neurônios e células neoplásicas.

IL-8 é uma quimiocina da família CXC, em que as duas primeiras cisteínas são separadas por um aminoácido, sendo que se acredita que o monômero é a sua forma biologicamente ativa podendo também ter atividade autócrina (Horcher et al, 1998; Rajarathnam et al, 1994). Os efeitos biológicos de IL-8 são mediados pela interação específica com dois membros da superfamília de receptores transmembrana acoplado a proteína G, CXCR1 e CXCR2. Ambos possuem alta afinidade por IL-8, porém CXCR2 é naturalmente promíscuo e também se liga a outras quimiocinas do tipo CXC (Holmes et al, 1991; Murphy & Tiffany, 1991). Enquanto muitas das suas funções se sobrepõem, esses dois receptores também são capazes de ativar vias de sinalização intracelular distintas, exibindo diferentes papéis fisiológicos. Entre estes meios de transdução de sinal se encontram muitas vias desencadeadas por quinases, entre elas: PI3K, Raf-MAPK/ERK (MEK)-ERK, p38 MAPK e JAK2-STAT3 (Waugh & Wilson, 2008).

A expressão de IL-8 é influenciada por diversos estímulos, principalmente que desencadeiam estresse celular, como por exemplo, produção de espécies reativas de oxigênio, deprivação de nutrientes, hipóxia e secreção de fatores pró-inflamatórios como por TNF α , IL-1 β ou infiltração de macrófagos. Em particular, TNF α aumenta drasticamente a síntese de IL-8 em células GBM pela estabilização do mRNA. Além disso, o promotor de IL-8 contém sítios de ligação de diversos fatores de transcrição, sendo que a regulação por NF-kB parece ser necessária para atividade transcricional, enquanto que AP-1 e C-EBP/NF-IL-6 contribuem para a

transcrição de modo dependente da célula (Mahe et al, 1991; Mukaida et al, 1990). A secreção da citocina é fortemente controlada em células normais e é indetectável em sistemas saudáveis, no entanto, sua expressão aberrante tem relação com a patogênese do câncer e se localiza, principalmente, em regiões circundantes a necrose e angiogênese.

A angiogênese, processo no qual há formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros preexistentes (Brat & Van Meir, 2001), é essencial para a progressão tumoral do glioblastoma, já que por meio deste ocorre a entrega de oxigênio e nutrientes às células malignas, fatores críticos tanto para a expansão das mesmas quanto para manutenção das células tronco que fazem parte do tumor. A neovascularização é altamente regulada e ativa apenas em condições patológicas; é iniciada pelo aumento da permeabilidade vascular e extravasamento do plasma, permitindo a deposição de proteínas pró-angiogênicas da matriz extracelular e causando aumento da pressão do líquido intersticial e formação de edema, além de limitar o acesso efetivo de drogas terapêuticas. A atividade angiogênica de IL-8 estimula a proliferação de células endoteliais inibindo sua apoptose, atua na formação de tubos capilares e também induz expressão de metaloproteínas da matriz (MMP) (Li et al, 2003). Sendo que estas funções aparentam ser independentes de sua atividade quimiotática (Hu et al, 1993).

Assim, reverter essas características por meio de terapia antiangiogênica parece ser um alvo promissor como forma de tratamento. Expressão de fatores pró angiogênicos, como fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), já foram detectados no microambiente tumoral. Entretanto, terapias anti-VEGF, apesar de promissoras, não são adequadas a todos os pacientes, visto que a administração é cara e efeitos colaterais de caráter severo foram descritos (Keunen O et al, 2011). Provavelmente, mecanismos compensatórios interferiram na eficácia esperada; portanto, a identificação e investigação de outros reguladores chave da permeabilidade e angiogênese tem potencial para estudos promissores.

1.5. Interleucina 6

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina inflamatória potente, com atividade redundante e pleiotrópica que medeia uma série de funções fisiológicas, incluindo a diferenciação de linfócitos, proliferação e sobrevivência celular, além de potencializar sinais apoptóticos (Kamimura D, Ishihara K, Hirano T, 2003; Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G et al, 1998). Adicionalmente, IL-6 exerce efeitos na formação óssea, metabolismo geral e funções endócrinas, tendo a habilidade de afetar diversos tecidos e órgãos (Ershler WB, 1993; Wolvekamp MC, Marquet RL, 1990).

Em resposta a infecção ou dano tecidual, IL-6 é prontamente sintetizada e ativa resposta imune aguda, induzindo a diferenciação de células B ativa em plasmócitos produtores de anticorpos e também células T CD4+ imaturas em efectoras. Além disso, estimula hepatócitos para produção de proteínas de fase aguda como a proteína reativa C (CRP), proteína amiloide A sérica (SAA), fibrinogênio, hepcidina e antiqumiotripsina- α , o aumento no nível dessas proteínas propaga um sinal de estresse emergencial, contribuindo, juntamente com a indução da hematopoiese, para a defesa do hospedeiro (Heinrich PC et al, 1990). CRP e SAA são marcadores de inflamação, sendo que sua síntese é regulada principalmente por IL-6 e pacientes de GBM tem níveis aumentados dessas proteínas no sangue, correlacionando com extensão do tumor (Weiss JF et al, 1979). IL-6 tem também a habilidade de estimular a ativação de células *natural killers* NK e a geração de linfócitos T citotóxicos (Takai Y et al, 1988; Okada M et al, 1988).

A produção de IL-6 é altamente regulada transcricionalmente e pós-transcricionalmente e, assim que o sistema volta a homeostase, a produção é interrompida (Anderson P, 2008). Todavia, a síntese contínua e desregulada de IL-6 tem sido relacionada com diversas doenças, entre elas o câncer (Tanaka T & Kishimoto T, 2014). A expressão de IL-6 já foi descrita em diversos tipos tumorais, sendo que em GBM sua expressão tem correlação com mau prognóstico do paciente (Tchirkov A et al, 2007). Além disso, a expressão de IL-6 em astrocitomas benignos acontece raramente, sugerindo um papel potencial na malignidade do tumor (Chang CY et al, 2005). Apesar de a produção de IL-6 parecer ser uma

característica geral de células de GBM, ainda não se sabe sua significância funcional.

A transdução de sinal canônica de IL-6 é iniciada pela sua ligação ao seu receptor que consiste num complexo heteromérico na membrana plasmática formado pelo receptor específico, IL6R α (CD126/gp80) e pelo receptor comum de transdução de sinal, glicoproteína 130 (CD130/gp130) (Frei K et al, 1989). Muitos tipos celulares respondem a IL-6, sendo assim, possui uma vasta gama de indutores. Alternativamente, a sinalização trans de IL-6 é ativada pela interação do mesmo com a forma solúvel, IL6R α e a subsequente ligação desse complexo com gp130 ligado a membrana.

Em ambas as vias, através de homodimerização do complexo receptor, a sinalização intracelular é propagada por membros da família das quinases Janus (JAK) que sofre trans e auto-fosforilação (Liu KD, Gaffen SL, Goldsmith MA, 1998), levando a ativação e a fosforilação do fator de transcrição STAT, particularmente STAT3 (Yang J et al, 2005). Esta modificação permite que STAT3 forme homodímeros pela interação recíproca do domínio SH2 (Mertens C et al, 2007), expondo o sinal de localização nuclear, resultando na sua translocação para o núcleo onde reconhece regiões *enhancer* de genes alvo, para iniciação da transcrição destes (Fig. II).

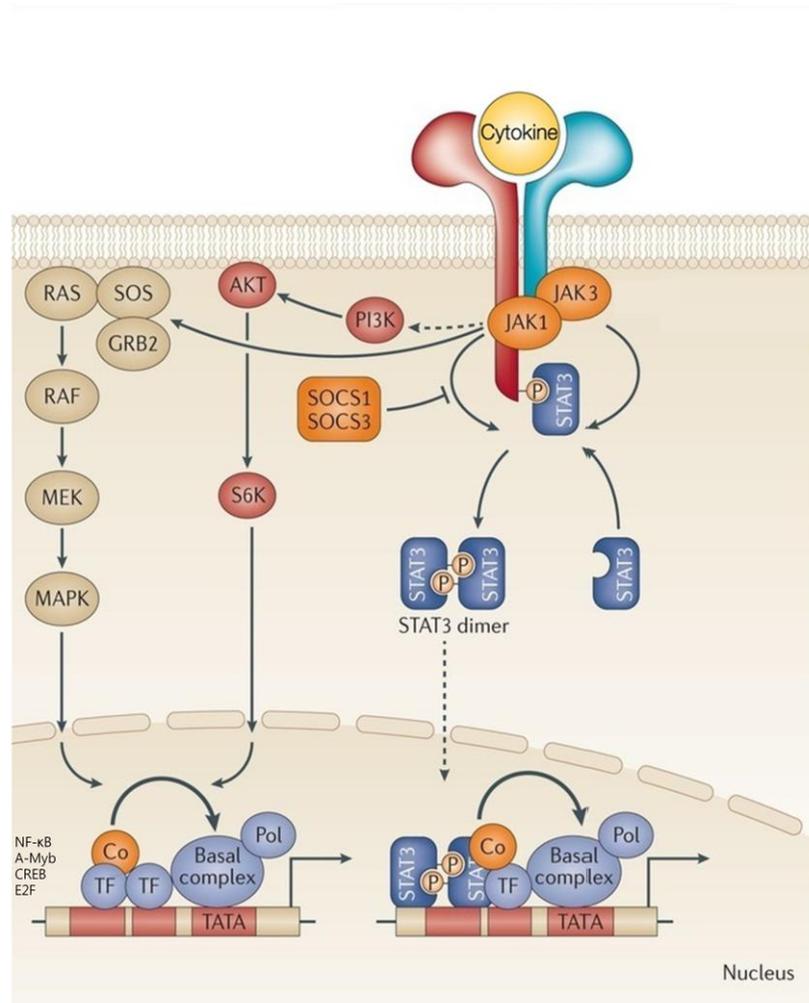
1.6. Via de sinalização JAK/STAT

STAT3 é raramente ativo em tecido cerebral saudável, no entanto, é constitutivamente ativo em muitos tipos tumorais, inclusive GBM, provavelmente, em parte, devido ao efeito autócrino de IL-6. STAT3 regula uma diversidade de processos celulares, pois promove a transcrição de genes relacionados à sobrevivência e crescimento celular, angiogênese, bem como genes pró-apoptóticos. Também induz expressão de Supressor de sinalização de citocinas (SOCS), reguladores negativos que previnem ativação prolongada de STAT3 em organismos saudáveis. Além disso, STAT3 é necessário para manter a propagação e pluripotência de células estaminais embrionárias normais e neurais, evidenciando sua relação com a manutenção de células-tronco. (Schaefer LK et al, 2002; Lo HW et al, 2005; Lo HW et al, 2007; Alvarez JV et al, 2007; Abou-Ghazal M et al, 2008; Lo HW et al, 2008; Rahaman SO et al, 2002, Carpenter RL et al, 2014)

Dado sua habilidade de regular tanto oncogenes como genes supressores tumorais, STAT3 é associado com promoção e inibição de oncogênese, sendo que é dependente do tipo tumoral e contexto celular (Ecker A et al, 2009). Apesar de apresentar papel ambíguo no desenvolvimento do tumor, STAT3 é usualmente relacionado com padrão tumoral mais maligno e agressivo devido à sobrevivência tumoral e resistência a terapias; em consequência, possui correlação com grau tumoral e desfecho clínico ruim (Weissenberger J et al, 2004; Rahaman SO et al, 2002; Wang H et al, 2004). Em adição a ativação de STAT, quinases JAK também fosforilam outras proteínas sinalizadoras, vinculando a via de sinalização JAK/STAT com outras, como MAP quinases, essa regulação paralela é importante na modulação da especificidade da resposta celular a diversas citocinas.

STAT3 também tem sido estudado no contexto de resposta imune associada ao tumor, e foi demonstrado que microglia/macrófagos associados ao glioma apresentam expressão diminuída de moléculas co-estimulatórias, que é restaurada com um inibidor de STAT3. Sugerindo que inibição de STAT3 em células apresentadoras de antígenos pode aumentar resposta imune anti-tumoral mediada por células T em glioma, aprimorando tanto resposta imune inata quanto adaptativa (Yu H et al, 2009; Hussain SF et al, 2006; Hussain SF et al, 2007; Matsukawa A et al, 2005; Kortylewski M et al, 2005). Por fim, STAT3 também tem correlação com agressividade tumoral por meio da regulação da transformação de fenótipo para

subtipo mesenquimal (Bromberg J & Wang TC, 2009; Carro MS et al, 2010; Bhat KP et al, 2011).



Nature Reviews | Drug Discovery

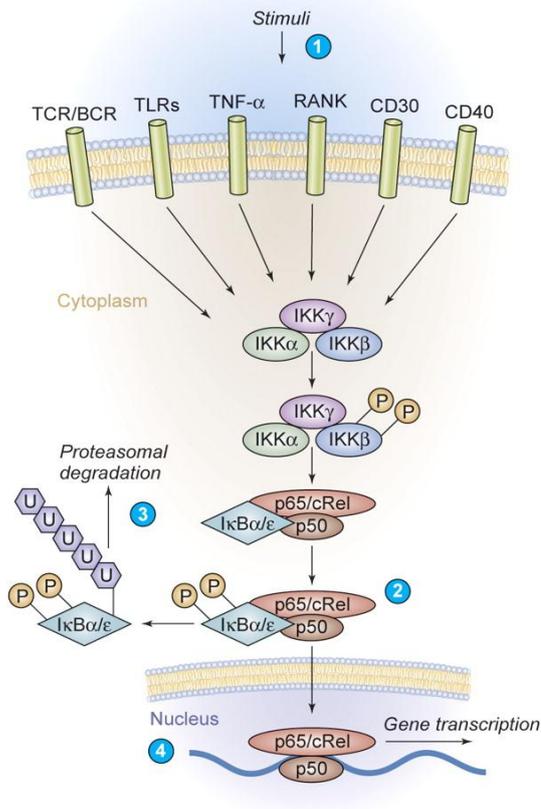
Figura II: Citocina se liga e estabiliza o complexo receptor levando a ativação da quinase Janus 1 e 3 (JAK 1 e JAK3), permitindo o recrutamento e fosforilação de STAT3, a qual dimeriza e entra no núcleo, ativando um programa de transcrição dos genes alvo, sendo possível a ativação dos fatores de transcrição NF- κ B, A-Myb, CREB, E2F. A ligação da citocina pode também ativar a via de sinalização das proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK) e sinalização de fosfoinosítideo 3-quinase (PI3K), além da indução da transcrição de supressores de sinalização de citocina 1 e 3 (SOCS1 e SOCS3), as quais inibem a via JAK/STAT (Adaptado de Spolski R & Leonard WJ, 2014).

1.7. Via de sinalização NF- κ B

A família NF- κ B contém cinco membros estruturalmente similares: p65/Rel A, RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) e p52/p100 (NF- κ B2). No SNC, a forma predominante é um dímero de p65/p50 e é encontrado inativo e sequestrado no citosol pela interação com inibidor de NF- κ B, I κ B α (Gilmore TD, 2006). Exposição a uma variedade de estímulos, incluindo TNF- α , leva a fosforilação e a ativação do complexo de quinases IKK composto por IKK α , IKK β e NEMO (Chen LF et al, 2004). Esse complexo, uma vez ativo, fosforila I κ B α , que é então ubiquitinada e degradada pelo proteossomo. O dímero p65-p50 livre é então passível de fosforilação por IKK β , translocação para o núcleo para exercer sua função, induzindo a expressão de genes inflamatórios alvo como IL-6 e IL-8, assim como genes anti-apoptóticos incluído Bcl-2 e Bcl-XI (Pahl HL, 1999). Além disso, NF- κ B induz expressão de seu regulador negativo I κ B α (McFarland BC et al, 2013). Há também uma via de sinalização não canônica demonstrada na Figura III.

Sendo um fator nuclear importante na célula, este regula processos celulares diversos pela transcrição de genes de sobrevivência anti-apoptóticos e proliferação, regulação da resposta imunitária à infecção, além de ser um componente chave na reação inflamatória. Apesar de o mecanismo preciso da ativação de NF- κ B em GBM ser indefinido, há inúmeras proteínas e vias de sinalização desreguladas que podem causar a ativação aberrante deste fator de transcrição, já demonstrado superexpresso em gliomas (Brown RE & Law A, 2006; Zanotto-Filho et al, 2011). Ademais, evidências mostram que NF- κ B é importante para o balanço entre propriedade antitumoral e pró-tumoral dos macrófagos associados ao tumor, estando envolvido na manutenção de fenótipo M1/M2 (Saccani A et al, 2006 e Hagemann T et al, 2008). Além de também ter envolvimento com o subtipo genético agressivo mesenquimal (Bromberg J & Wang TC, 2009; Carro MS et al, 2010; Bhat KP et al, 2011).

A) Activation of the Canonical NF- κ B Pathway



B) Activation of the Alternative NF- κ B Pathway

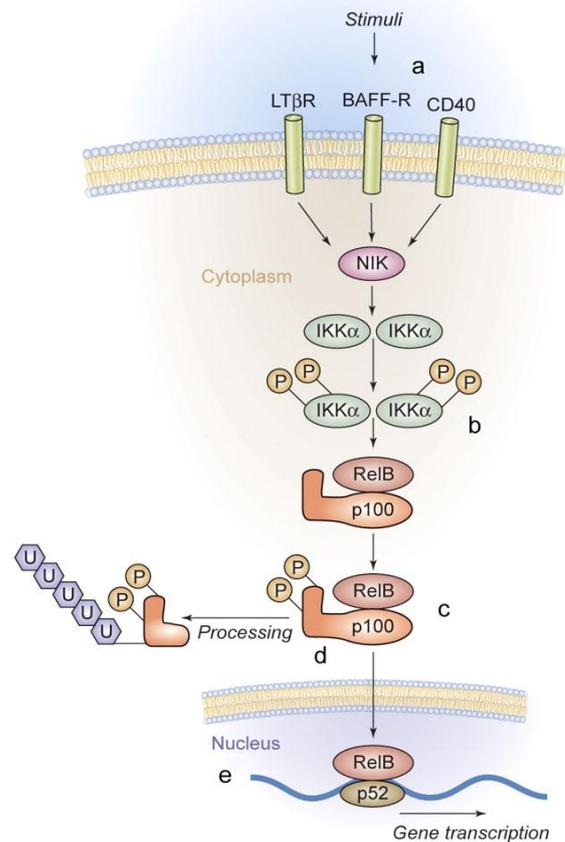


Figura III: (A) Ativação da via canônica de NF- κ B: diversos estímulos (1) podem ativar esta via como citocinas pró-inflamatórias, padrões moleculares associados a patógenos, entre outros. IKK ativa fosforila I κ B em dois resíduos de serina conservados, induzindo sua poliubiquitinação (2) e degradação proteolítica (3). Dímeros citoplasmáticos de NF- κ B são liberados e translocam para o núcleo, onde realizam transcrição gênica (4).

(B) Ativação da via alternativa: é iniciada por um grupo de receptores restritos que fazem parte da superfamília de receptores TNF (a), essa via culmina na ativação de IKK α (b), a qual fosforila diretamente NF- κ B2/p100 (c), induzindo proteólise parcial de p100 pelo proteossoma (d). A proteína p52 preferencialmente dimeriza com RelB para translocação ao núcleo (e) (Philipp J. Jost & Jürgen Ruland, 2007).

2. Justificativa

Glioblastoma é uma doença de incidência comum e grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, levando em conta que o prognóstico é, geralmente, ruim e de poucos meses de sobrevida, pode ser considerado um tópico importante de estudos devido aos desafios clínicos desta área em desenvolver alternativas terapêuticas eficientes.

Considerando que as terapias disponíveis para o tratamento são bastante restritas, a investigação de mecanismos de vias de transdução de sinal inflamatório que possam modular estas, interferindo no crescimento ou malignidade tumoral, é de grande interesse. Especialmente, pelo fato de já existir inibidores farmacológicos de diversas vias de sinalização que interferem em processos celulares essenciais para o desenvolvimento do câncer; e, sendo moléculas pequenas, estes são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo então, uma alternativa promissora. Além disso, a investigação da combinação destes proporciona meios de atingir mais de um processo celular em alternativa a um alvo limitado, abrindo a possibilidade de aprimorar a intervenção terapêutica.

Ademais, há também evidências que alterações no secretoma inflamatório de células neoplásicas possam ser um mecanismo de escape do sistema imunitário, contribuindo para a aquisição de um fenótipo maligno. Sendo assim, a investigação da modulação local por citocinas pró-inflamatórias, moléculas sinalizadoras da resposta imune e, em particular, interleucinas, pode ajudar a entender o microambiente pró-inflamatório tumoral. Logo, o somatório de efeitos das diferentes citocinas - seja na proliferação, migração ou quimiorresistência – faz com que a análise combinada e do papel diferencial desses mediadores seja mais informativa que o estudo individual dos mesmos, já que considera o ambiente complexo que o tumor esta inserido.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral:

O objetivo deste projeto é determinar o papel das interleucinas IL-6 e IL-8 na proliferação, quimioresistência e/ou invasão de células de glioblastoma humano, além da investigação de potenciais vias de sinalização envolvidas na produção destes mediadores.

3.2. Objetivos Específicos:

- Avaliar a produção basal de IL-6 e IL-8 em linhagens U87MG e U251MG de glioma;
- Avaliar influência destas interleucinas na ativação de monócitos *in vitro*;
- Investigar comunicação célula-célula entre glioblastoma e monócitos e suas consequências para a progressão tumoral;
- Investigar vias de transdução de sinal envolvidas no processo e efeito na inibição destas.

4. Metodologia

4.1. Cultivo celular

Foram utilizadas as linhagens celulares derivadas de glioma humano U373MG/U251MG (p53/PTEN mutante) e U87MG (PTEN mutante); SH –SY5Y, derivada de neuroblastoma humano; MCF-7, adenocarcinoma de mama; e U937, linhagem celular de monócito de leucemia humana. Todas as linhagens celulares listadas são provenientes do painel de células ATCC (American Type Culture Collection).

As células derivadas de glioma foram mantidas em meio DMEM com baixa glicose, linhagens provenientes de leucemia humana em meio RPMI, SH-SY5Y foi mantida em DMEM-F12 e, por fim, MCF-7 foi cultivada em DMEM com alta glicose. Os meios de cultivo foram suplementados com 10% de soro fetal bovino inativado e antibiótico, as linhagens celulares foram mantidas numa estufa com umidade, temperatura e nível de CO₂ constantes.

A preparação do meio condicionado (CM) foi feita pelo plaqueamento em placas de doze poços com 700µL de meio livre de soro fetal bovino e antibióticos por 24 horas. Quando tratadas com inibidores farmacológicos ou transfectados com siRNA, as células foram pré-tratadas ou transfectadas por 12 horas para permitir a captação intracelular, após, o meio foi substituído por outro sem soro fetal bovino e antibióticos e assim, condicionado.

A co-cultura foi feita com as linhagens U251MG e U937 em proporção 2:1, células de glioma plaqueadas (1×10^5 células) em placas de doze poços, tiveram seu meio retirado e adicionado os monócitos ($0,5 \times 10^4$ células) em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos.

Além disso, foram usados os seguintes inibidores de proteínas quinases: UO126 (MEK/ERK), SP600129 (JNK1/2), SB203580 (p38), BAY 11-7082 (IκBα) e Stattic (STAT3) e o agente alquilante temozolamida (TMZ), os quais foram dissolvidos em DMSO.

4.2. Viabilidade celular

Para acessar a viabilidade celular *in vitro*, foi usado como estimativa a redução de MTT (3-(4,5-dimetil)-2,5- difeniltetrazolio brometo) que, pela ação de desidrogenases mitocondriais, forma cristais de formazan de cor azul, passíveis de quantificação em 560/630 nm, sendo proporcional à quantidade de células vivas.

4.3. Ensaio Clonogênico

1×10^6 células foram plaqueadas em placa de seis poços, após tratamento por 72 horas, o meio de cultivo celular foi trocado e o ensaio foi mantido por mais três dias. As células foram então coradas com sulforrodamina B (SRB), corante que se liga a aminoácidos celulares básicos em meio ácido (1% de ácido acético), a placa foi lavada e seca para possibilitar visualização em microscópio.

4.4. Transfecção reversa

Para os procedimentos de silenciamento celular através de RNA de interferência pequenos (siRNA) foi utilizado Lipofectamina RNAiMax (Invitrogen) para a transfecção reversa dos genes de IL-6 humano, IL-8 humano e p65. Além disso, foi usado como controle negativo do método, um siRNA *scrambled* que possui uma sequência aleatória que não é complementar a nenhuma sequência celular. O silenciamento foi realizado por 24 horas antes de submeter às células a experimentação.

4.5. Ensaio de invasão celular

Para avaliação da capacidade de invasão celular *in vitro* foi usado Kit fluorimétrico QCM™ Boyden Chamber Assay Millipore conforme instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram preparadas por tripsinização para uma quantidade de, aproximadamente, 1×10^5 células em um volume de 250µL de meio livre de soro, este é aplicado na parte de cima de uma câmara que possui uma membrana mimetizando as propriedades da matriz extracelular; na parte externa da câmara é adicionado 500µL de meio suplementado com soro, induzindo diferença quimiotática, agindo como um quimio-atraente. As células capazes de migrar através da matriz em um período de 24-48 horas foram dissociadas da membrana, lisadas e detectadas através de corante CyQuant GR® que se liga a material genético; a fluorescência foi lida a 480/520 nm e comparada a situação controle.

4.6. Ensaio de adesão celular

As linhagens celulares de monócitos são comumente cultivadas em suspensão, ou seja, são células não-aderentes, um dos processos iniciais da ativação em macrófagos é a adesão a matriz extracelular, sendo assim, em cultura, os monócitos aderem a superfície da placa quando ativos, sendo um importante parâmetro para estudar a interação destas com as células de glioma e seus mediadores solúveis.

Em torno de 3×10^5 células da linhagem U937 foram plaqueadas em placas de vinte e quatro poços e incubadas na proporção 1:1 com meio condicionado ou com as interleucinas recombinantes (5ng/mL) por 72 horas e, após este período, foram lavadas com PBS, fixadas com 4% de paraformaldeído por 15 minutos, lavadas novamente com PBS e coradas com giemsa para observação em microscópio ou 0,1% de cristal de violeta por 20 minutos à temperatura ambiente para quantificação, este foi dissolvido em 10% de ácido acético e quantificado em espectrofotômetro em 590 nm.

4.7. ELISA

Para quantificação das interleucinas 6 e 8 nos meios condicionados das células foi usado o kit para ensaio imunoenzimático sanduíche da Sigma-Aldrich específico para IL-6 humano e IL-8/CXCL-8 humano, conforme instrução do fabricante. Os meios de cultivo para IL-8 foram diluídos até 50 vezes para detecção apropriada. De maneira sucinta, a amostra desconhecida foi adicionada a poços que possuem o anticorpo primário contra a proteína de interesse (antígeno) adsorvidos no fundo da placa, em seguida foi adicionado anticorpo específico contra o antígeno e marcado com uma enzima (HRP – Peroxidase de raiz-forte) que reage com substrato incolor, produzindo um produto colorido proporcional à quantidade de proteína de interesse da amostra e passível de quantificação em 450/550 nm, a amostra foi comparada a uma curva padrão com concentrações conhecidas. Os resultados estão normalizados para 1×10^6 células.

4.8. Western blot

Células tratadas foram tripsinizadas, lavadas com PBS, incubadas com inibidores de proteases (ortovanadato 1mM e fenilmetilsulfonilflúor 1mM) e lisadas. O lisado celular total, em torno de 30-40ug de proteína, foi separado por SDS-PAGE e transferido por diferença de potencial para uma membrana de nitrocelulose. Estas foram coradas com Ponceau, lavadas e bloqueadas com solução de albumina 5% por cerca de 1h, seguida de incubação por 16h à 4°C com anticorpo primário anti-p-p38, anti-p-ERK1/2 e anti-p-Akt (diluição 1:1000), lavagem consecutivas de 30 minutos e nova incubação com anticorpo secundário anti-IgG (diluição 1:2000) por 2h à temperatura ambiente foi realizada. A detecção quimioluminescente foi feita através do fotodocumentador GE Healthcare Life Sciences® ImageQuant LAS 4000.

4.9. Análise de ciclo celular

Células tratadas foram tripsinizadas, lavadas com PBS e centrifugadas. Em seguida foram ressuspensas em 500 µL de tampão de lise (10mM PBS, 0,1% v/v Nonidet P-40, 1,2 mg/mL de espermina, 5µg/mL de RNase e 2,5 µg/mL de Iodeto de propídio) e incubadas no gelo por 15 minutos. A aquisição da incorporação de iodeto de propídio no DNA celular foi medido por citometria de fluxo por FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*), possibilitando a dedução da etapa do ciclo celular em que a célula se encontrava dependendo da proporção de DNA, avaliando assim a distribuição populacional celular nas diferentes fases do ciclo celular com a finalidade de diferenciar o efeito do tratamento sobre a proliferação celular (paradas no ciclo em G1/G0, S ou G2/M) e apoptose (células hipodiplóides em sub-G1). A análise foi feita através do software CellQuest® (BD Biosciences).

4.10. Imunocitoquímica

Células foram fixadas, em placa de vinte e quatro poços, com solução de 4% de Paraformaldeído e 2% de glicerol em PBS por 15 minutos à temperatura ambiente e lavadas com PBS, após, foi aplicada solução de permeabilização (PBS e 0,3% de Triton X-100) por 5 minutos à temperatura ambiente, seguido de bloqueio com 5% de albumina solubilizada em solução de permeabilização durante 30 minutos à temperatura ambiente. A incubação com anticorpo primário anti p65 (1:250), p-p65 (1:200), STAT3 (1:500) e p-STAT3 (1:300) foi realizada por 16h a 4°C e, por fim, foi incubado com anticorpo anti-rabbit IgG conjugado ao fluoróforo Alexa

488 (1:500). Para marcação nuclear foi utilizado DAPI, as imagens foram obtidas com EVOS FL Auto Cell Imaging System[®] (Invitrogen).

4.11. Análise Estatística

Os experimentos *in vitro* foram realizados três vezes em triplicatas. ANOVA seguido de Tukey post-hoc (Graphpad Prism) foi utilizado com $p < 0,05$ como significante.

5. Resultados

5.1. Linhagens celular de glioma U251MG e U87MG produzem interleucina 6 e 8, possuem capacidade de invasão celular e atividade basal de quinases.

Primeiramente, com o intuito de acessar as condições normais da célula, foi realizado ELISA do meio condicionado de ambas as linhagens celulares para quantificar a produção de IL-6 e IL-8 (Fig. 1A 1B). Além disso, foi feito ensaio de invasão para determinar a migração basal das células de glioma (Fig. 1C). A linhagem SH-SY5Y, derivada de neuroblastoma humano, foi usada para fins de comparação já que também é um câncer do SNC; já a linhagem celular MCF-7, derivada de adenocarcinoma de mama, foi usada como um parâmetro de baixa capacidade de invasão. Por fim, para analisar a ativação basal de quinases foi feito western blot do lisado proteico celular para algumas proteínas chave (Fig. 1D).

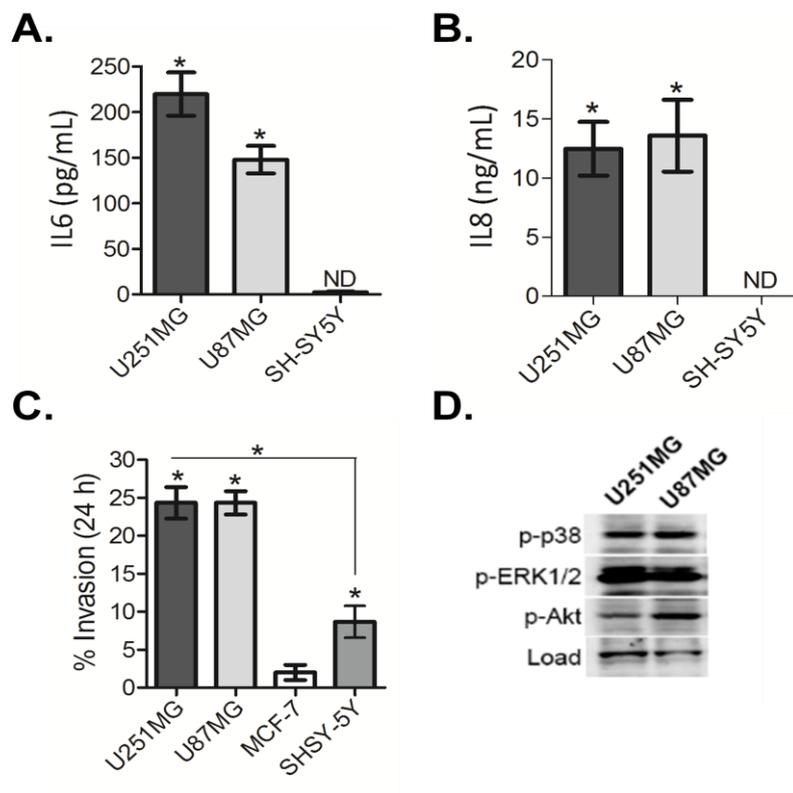


Figura 1: Condições basais de produção de IL-6 e IL-8, migração celular e imunoconteúdo de quinase. (A) Quantificação da secreção de IL-6 e (B) IL-8 do meio condicionado das linhagens celulares U251MG, U87MG e SH-SY5Y foi realizado por ELISA.. (C) Ensaio de invasão celular por Boyden Chamber por 24 h nas linhagens celulares U251MG, U87MG, MCF-7 e SH-SY5Y. (D) Western blot para as quinases p-38, ERK1/2 e Akt fosforiladas em lisado proteico das linhagens U251MG e U87MG. (n=3 em triplicata, $p < 0,05$, ANOVA seguido de post hoc de Tukey).

Como pode ser constatado no gráfico, as linhagens celulares de GBM U87MG e U251MG produzem ambas as citocinas. Sendo que a interleucina 8 estava presente em maior concentração no meio de cultivo, na ordem de ng/mL e a interleucina 6, secretada para o meio na ordem de pg/mL, mais abundante na linhagem U251MG. Ademais, ambas as linhagens possuem capacidade de migração através da matriz extracelular e apresentam ativação basal das proteínas quinases p38, ERK1/2 e Akt, as quais são tipicamente envolvidas em processos de invasão celular.

5.2. Interleucina 6 é importante para a capacidade de invasão celular na linhagem U251MG.

Para determinar o papel da IL-6 e da IL-8 na invasão celular, foi realizado o silenciamento destas interleucinas através de transfecção reversa por 24 h na linhagem U251MG. Os siRNA's foram usados em concentração de 60 nM e 80 nM para IL-6 e IL-8, respectivamente, e após 24 h de silenciamento, a detecção de IL-8 e IL-6 por ELISA foi realizada para verificar a eficiência dos silenciamentos (Fig. 2A, B). Em seguida, as células U251MG silenciadas foram submetidas ao ensaio de invasão.

O quelante de ferro/zinco, fenantrolina, foi usado como controle experimental positivo para inibição de metaloproteinases da matriz (MMP's) (Fig. 2C).

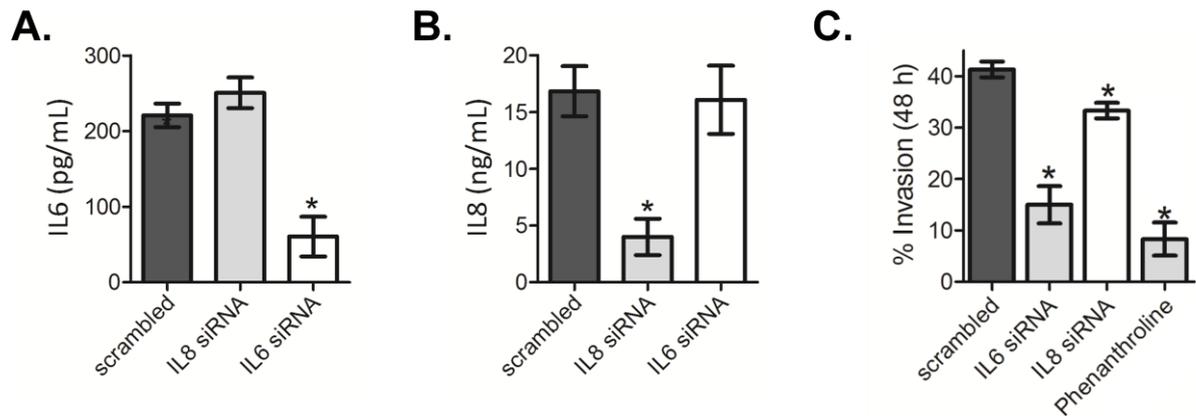


Figura 2: Silenciamento de interleucina 6 e 8 e sua interferência na invasão celular em linhagem U251MG. (A) Quantificação de IL-6 e de (B) IL-8 através de ELISA do meio condicionado da cultura celular U251MG transfectada com siRNA para IL-6 e IL-8, bem como RNA *scrambled* como controle negativo. (C) Ensaio de migração por 48 h da linhagem U251MG silenciada para ambas as interleucinas, bem como controle negativo ou tratado com 100 μ M fenantrolina. (n=3 em triplicata, $p < 0,05$, ANOVA seguido de post hoc de Tukey).

O gráfico mostra que a metodologia de silenciamento foi efetiva após 24 h de transfecção, já que a detecção das interleucinas no meio condicionado para seus respectivos siRNA's diminui quando comparado com o controle negativo, o RNA *scrambled*. Ainda, não observamos especificidade cruzada dos siRNA, pelo menos nas duas interleucinas analisadas. No ensaio da câmara de Boyden foi verificado que o nocaute das interleucinas suprime, em parte, o fenótipo maligno de invasão celular, o nocaute da IL-6 teve um efeito mais significativo, destacando-se como um mediador importante na capacidade invasiva da célula, atrelado a ação de metaloproteinases devido a grande eficácia do tratamento com fenantrolina.

5.3. Silenciamento das interleucinas sensibiliza a linhagem celular U251MG a tratamento com TMZ.

A inflamação associada ao dano quimioterápico tem sido associada a um efeito adverso da terapia citotóxica, a qual pode favorecer indiretamente a resistência tumoral. Enquanto tal inflamação tem sido atribuída ao dano celular necrótico causado pela quimioterapia, não se sabe se agentes como o TMZ poderiam causar secreção ativa de mediadores inflamatórios pelas células tumorais danificadas. Com o intuito de estabelecer os efeitos do quimioterápico na produção e secreção de citocinas, as células U251MG foram tratadas com TMZ 400 μ M por 24 e 48 h e, após, foi realizado ELISA do meio condicionado destas para verificar a quantidade de interleucina 6 e 8 (Fig. 3A, 3B). Foi verificado um aumento na secreção de interleucinas pró-inflamatórias em ambos os tempos de tratamento de TMZ quando comparado ao controle.

Ademais, as células silenciadas para ambas as interleucinas, nas concentrações de 60 nM para siRNA-IL6 e 80 nM para siRNA-IL8, também foram submetidas ao tratamento com o quimioterápico nas doses de 200 μ M e 400 μ M, por um período de 72 h, usando como referência de comparação DMSO, diluente do TMZ. E, em seguida, foi realizado ensaio de viabilidade por MTT, considerando o grupo tratado com DMSO e transfectado com RNA *scrambled* como parâmetro controle (Fig. 3C). Nota-se pelo gráfico que a supressão das citocinas sensibiliza a linhagem U251MG ao tratamento com TMZ de maneira dose dependente, sendo que silenciamento da interleucina 6 induziu maior impacto na viabilidade celular combinada ao tratamento com o quimioterápico a 400 μ M.

Com a finalidade de constatar o efeito da combinação do tratamento do alquilante com o silenciamento das interleucinas no ciclo celular de U251MG, foi realizado citometria de fluxo (FACS). As células foram primeiramente silenciadas por 24 h com concentrações de siRNA de 60 nM e 80 nM para IL-6 e IL-8, respectivamente, e tratadas por 48 horas com 400 μ M de TMZ e, então submetidas ao protocolo de FACS (Fig. 3D), o qual possibilita análise da quantidade de células em cada fase do ciclo celular. As células tratadas com o alquilante de DNA sofreram um deslocamento para fase S em comparação a células saudáveis do controle. A intervenção com siRNA afetou ligeiramente o ciclo e a proliferação celular, ocasionando uma concentração celular em fase G1/G0. Além disso, a combinação

das abordagens demonstrou efeito aditivo, contudo não sinérgico, principalmente em relação a supressão da interleucina 6, evidenciado pela diminuição de células em fase G1/G0 e aumento em fase S.

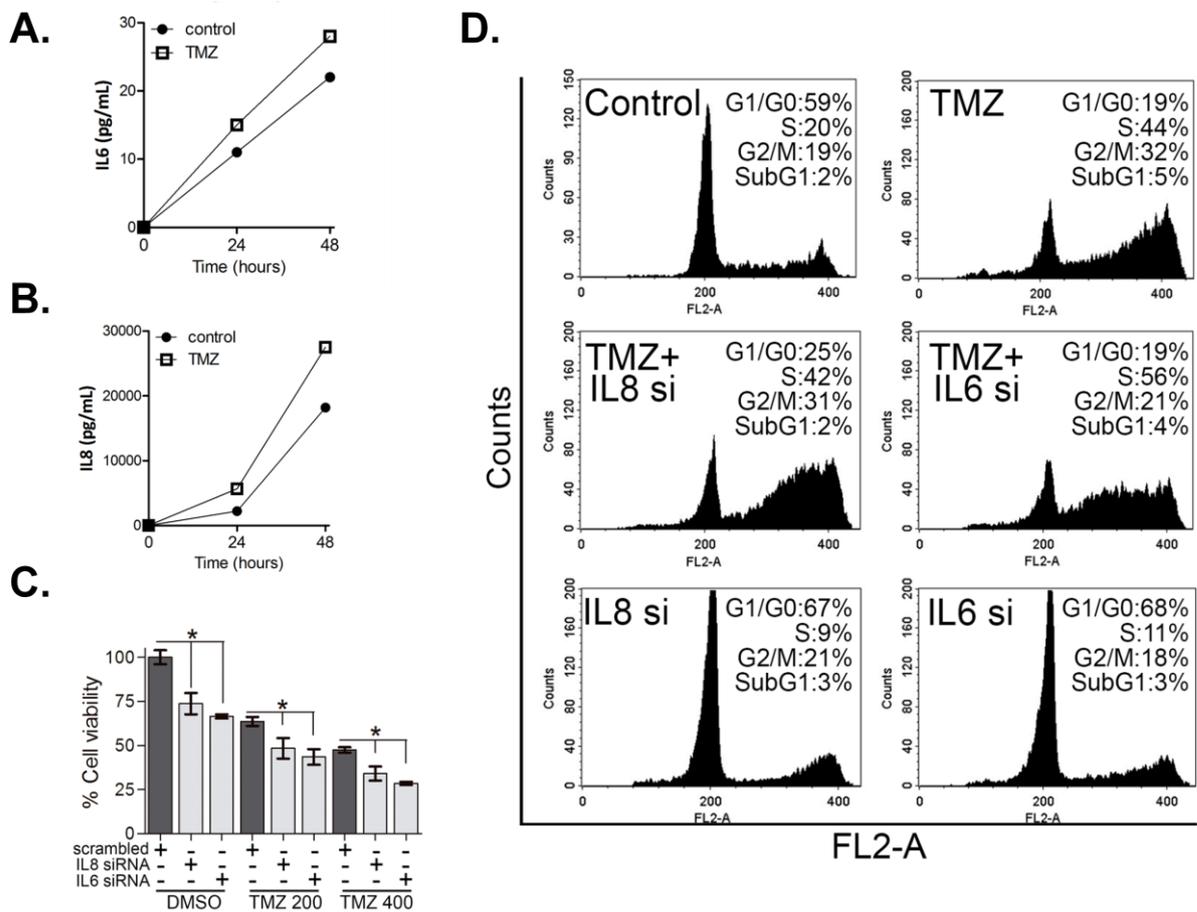


Figura 3: Efeitos do tratamento de TMZ combinado ao silenciamento de interleucinas 6 e 8 na viabilidade e ciclo celular em linhagem U251MG. (A) Quantificação de IL-6 por ELISA no meio condicionado de células U251MG tratadas com 400 μ M de TMZ no período de 48 horas. (B) Quantificação de IL-8 por ELISA no meio condicionado de células U251MG tratadas com 400 μ M de TMZ no período de 48 horas. (C) Ensaio de viabilidade celular por MTT das células U251MG silenciadas para interleucina 6 e 8 com 60 nM e 80 nM de siRNA, respectivamente, e tratadas por 24h e 48h com 200 μ M e 400 μ M de TMZ. (D) FACS da linhagem U251MG com combinações de tratamento das células silenciadas para interleucina 6 e 8 com 60 nM e 80 nM de siRNA, respectivamente, e tratadas por 48 horas com 400 μ M de TMZ. (n=3 em triplicata, p<0,05, ANOVA).

5.4. STAT3 e p65 são reguladores chave na mediação da migração celular em linhagem U251MG.

Para averiguar o envolvimento de proteínas quinases classicamente envolvidas em eventos neoplásicos no desencadeamento da sinalização intracelular que regula a produção de IL-8 e IL-6, a linhagem celular U251MG foi tratada com as seguintes concentrações de inibidores de quinase: 20 μ M UO126 (MEK/ERK), 30 μ M SP600129 (JNK1/2), 20 μ M SB203580 (p38), 20 μ M BAY 11-7082 (I κ B α) e 5 μ M Stattic (STAT3); também foi feita combinação de tratamento com Stattic e BAY 11-7082, bem como o silenciamento da subunidade p65 da proteína NF- κ B por transfecção reversa usando 60 nM de siRNA.

A viabilidade celular foi verificada visualmente por ensaio clonogênico em que as células são plaqueadas em baixa densidade para que seja possível a formação de colônias a partir de um pequeno grupo de células, estas então são tratadas por 72 horas, seguido de cultivo em meio normal por mais 72 horas para recuperação celular, e então são coradas com SRB (Fig. 4A). Através da visualização da coloração, pode-se observar um efeito pronunciado no tratamento das células com os inibidores BAY-117082 e Stattic quando comparado ao controle, a combinação destes evidencia a importância dessas proteínas para a sobrevivência celular já que há pouquíssimas células isoladas e nenhuma colônia.

O meio condicionado foi quantificado para ambas as interleucinas através de ELISA para cada tratamento, usando como referência células tratadas somente com DMSO, diluente dos inibidores farmacológicos (Fig. 4B, 4C); por meio dos resultados, pode-se constatar uma dramática diminuição na produção de interleucinas quando U251MG é tratada com inibidores de I κ B α e STAT3, bem como o co-tratamento destes. Por fim, a linhagem U251MG tratada foi submetida a ensaio de migração por um período de 48 horas (Fig. 4D) e, em encontro aos resultados anteriores, Stattic e BAY tiveram efeito sinérgico, suprimindo a invasão celular, os inibidores de MAPK também demonstraram efeito, porém não tão eficaz.

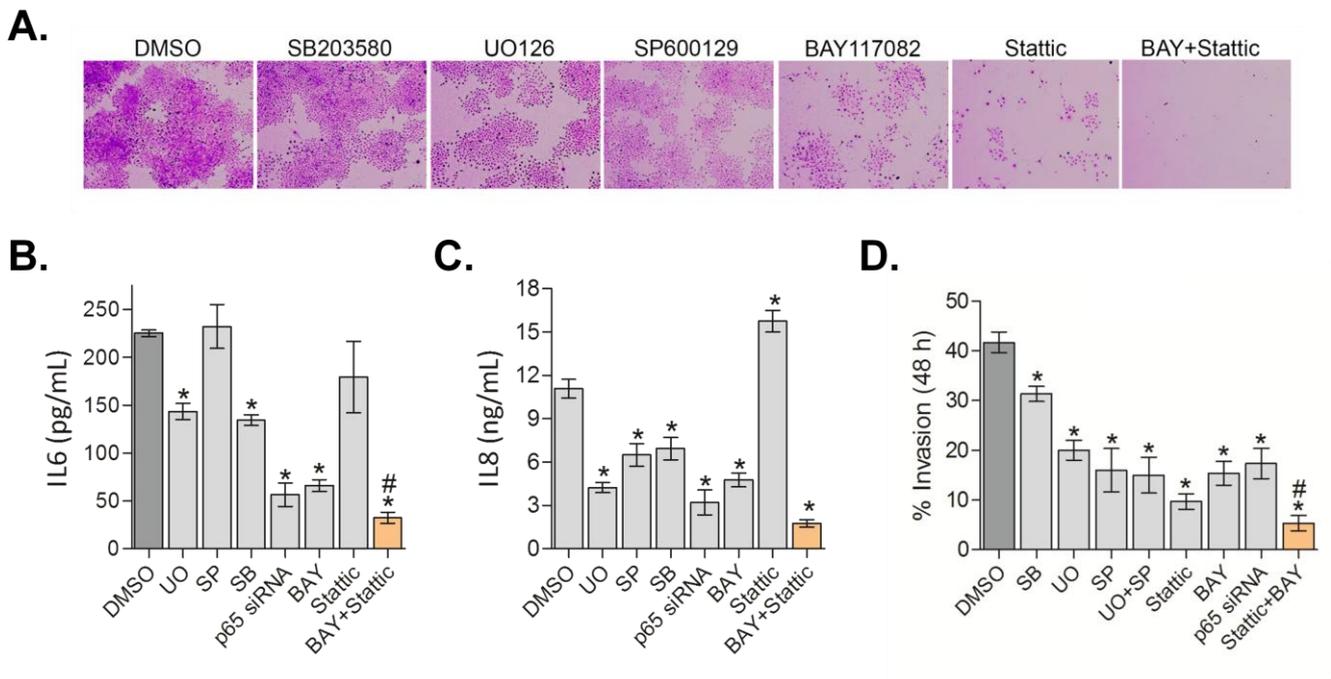


Figura 4: Tratamento com inibidores de quinase MAPK e sua influência na viabilidade celular, produção de interleucina e invasibilidade celular. (A) Microscopia do ensaio clonogênico de U251MG (aumento 10X). (B) Quantificação, por ELISA de interleucina 6 no meio condicionado das células U251MG tratadas com inibidores farmacológicos. (C) Quantificação de interleucina 8 por ELISA do meio condicionado da linhagem U251MG após tratamento. (D) Ensaio de invasão celular de 48 horas de U251MG tratadas com inibidores de MAPK, NF- κ B e STAT3. (n=3 em triplicata, $p < 0,05$, ANOVA).

Dado que STAT3 e NF κ B-p65 parecem ser dois reguladores importantes na produção destas citocinas e na invasão, realizamos imunocitoquímicas para acessar a localização intracelular destas proteínas e de suas formas ativas (fosforiladas) através de anticorpos primário específicos, os anticorpos secundário eram conjugados a Alexa 488 e o núcleo celular foi marcado com DAPI (Fig. 5). A imunofluorescência revelou localização intranuclear das proteínas STAT3 e p65 fosforiladas, evidenciado sua ativação devido a função de fator de transcrição.

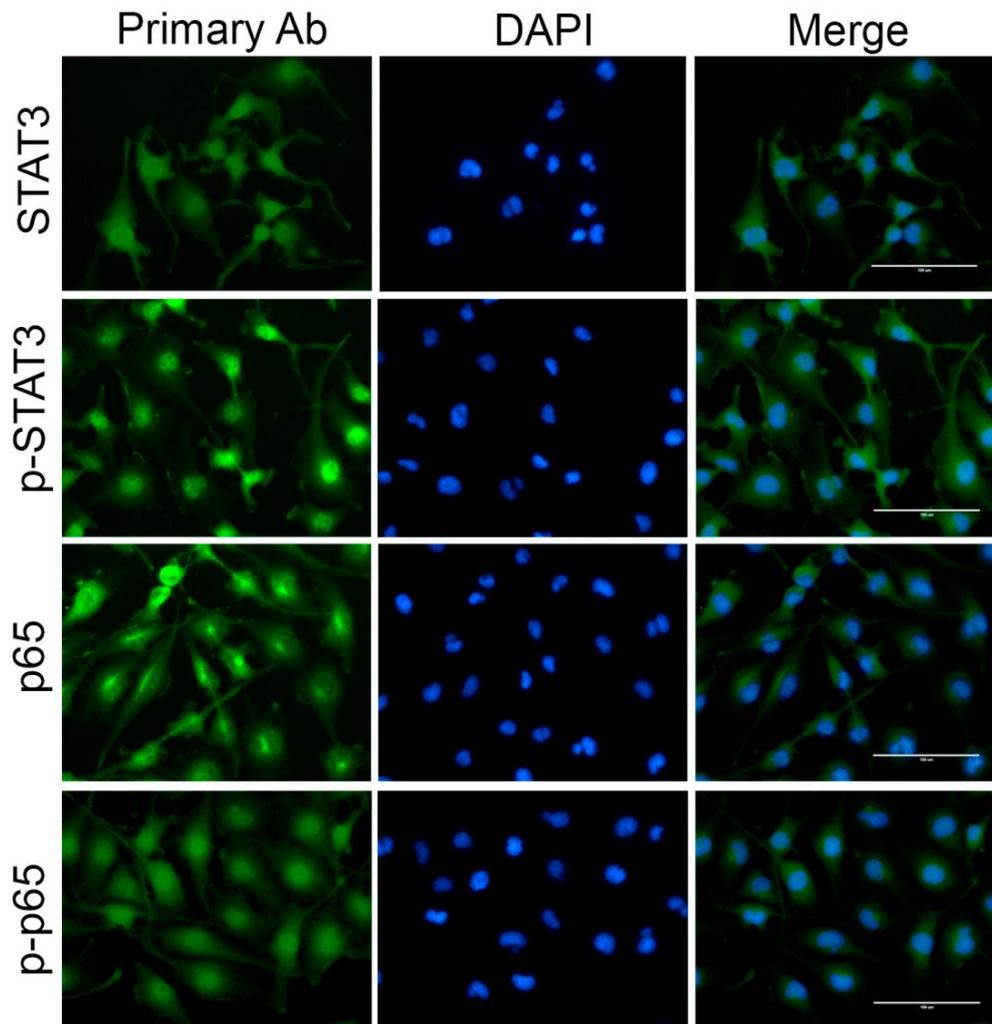


Figura 5: Localização intracelular das proteínas STAT3 e p65, bem como suas formas ativas por detecção imunofluorescente em linhagem celular U251MG. Imunocitoquímica da linhagem celular U251MG das proteínas STAT3 e p65, bem como suas formas ativas p-STAT3 e p-p65; na primeira coluna microscopia da marcação com o anticorpo primário, na segunda localização nuclear por DAPI e na terceira coluna a sobreposição das duas imagens (aumento de 50X). (n=3 em triplicata, $p < 0,05$, ANOVA).

5.5. Co-cultura com monócitos potencializa a proliferação e invasão de gliomas via ativação de macrófagos pelo meio condicionado de gliomas.

Por fim, com o objetivo de estudar a interação entre células tumorais e células do sistema imune, foi realizado co-cultura da linhagem U251MG com monócitos U937 (Fig. 6A). Diferentes quantidades do monócito foram submetidos à cultura com U251MG por 72 horas e, em seguida, foi analisada a viabilidade celular através de redução de MTT (Fig. 6B); pode-se observar indução de proliferação dos gliomas quando em contato com as células de monócito. Além disso, foi realizado ensaio de migração celular para estabelecer a influência da comunicação celular destas na capacidade de invasão em um período de 72 horas (Fig. 6C) e, de maneira similar a viabilidade, a linhagem U937 induziu aumento da habilidade de invasão das células U251MG, enquanto que a cultura pura de monócitos não demonstrou capacidade de migração.

Monócitos são cultivados em suspensão, todavia, quando estimulados, se tornam ativos, aderindo à superfície da placa, sendo assim, a adesão celular para este tipo celular é um parâmetro importante nos primeiros passos da transformação fenotípica de monócito para macrófago. Logo, foi feito o ensaio de adesão das células “monocyte-like” U937 incubadas com o meio condicionado de cultura de glioma (produzido a partir de células de glioma previamente silenciadas ou tratadas com inibidores farmacológicos), numa proporção de 2 U251MG:1 U937, a cultura dos monócitos com RPMI é usada como controle (Fig. 6D). O silenciamento foi realizado por 24 horas com 60 nM e 80 nM de siRNA para IL-6 e IL-8, além de também utilizar o meio condicionado de células U251MG tratadas com 100 µM de fenantrolina, meio condicionado de cultura basal de U251MG e U87MG, e também do tratamento dos monócitos com IL-6 e IL-8 recombinante na concentração de 5 ng/mL. Em concordância com os resultados até então obtidos, o silenciamento de IL-6 diminui a ativação dos monócitos, evidenciado pela menor adesão celular, esta não vinculada a MMP's já que o tratamento com fenantrolina não surtiu efeito. Assim como a aplicação de interleucina 6 recombinante no meio da cultura de U937 induziu adesão.

Foi realizado coloração com giemsa dos monócitos ativos quando tratados com meio condicionado de U251MG silenciada ou tratada com IL-6 recombinante (Fig. 6E); a imagem mostra menor número de células aderidas quando tratadas com

meio condicionado de supressão de IL-6, bem como a ativação na adição de interleucina 6 recombinante no meio de U937. Ademais, o ensaio de adesão foi feito com meio condicionado com inibidores farmacológicos em linhagem U251MG (Fig. 6F); assim como a coloração dos monócitos com giemsa (Fig, 6G). Ambos mostram a efetividade do co-tratamento dos inibidores de fator de transcrição I κ B α e STAT3 em minimizar a adesão e ativação dos monócitos.

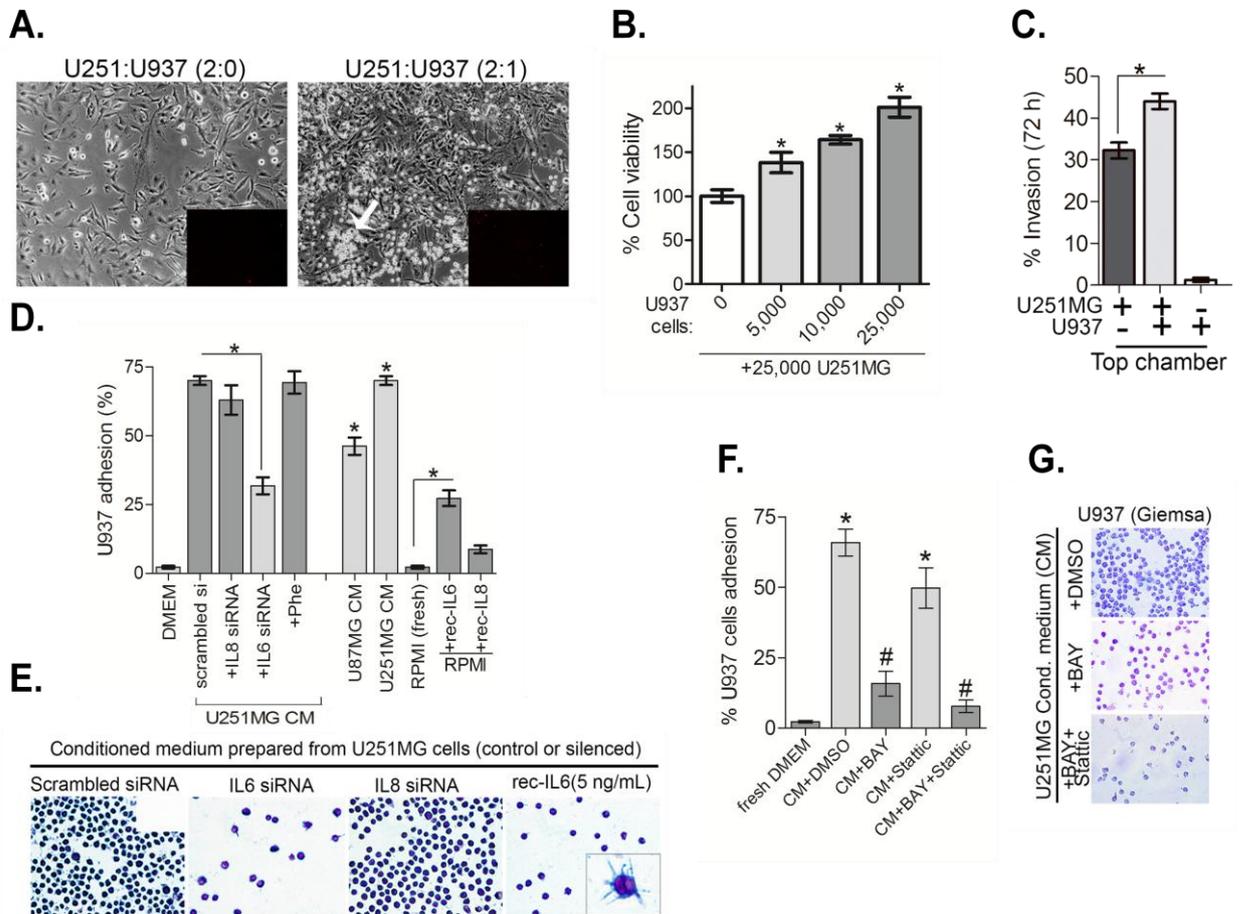


Figura 6: Efeito da co-cultura de monócito U937 com a linhagem de glioma U251MG. (A) Microscopia da cultura de U251MG e da co-cultura com monócitos (flecha branca), num período de 24 horas, numa proporção de 2 U251MG: 1 U937 (aumento de 20X). (B) Viabilidade celular por redução de MTT do co-cultivo com diferentes quantidades de U937 por 72 horas. (C) Ensaio de invasão celular comparando co-cultura e cultura das linhagens U251MG e U937 por 72 horas. (D) Ensaio de adesão celular das células U937 incubadas com meio condicionado de células de glioma por 48 horas. (E) Microscopia da linhagem U937 coradas com giemsa e condicionadas em meio de U251MG silenciadas para ambas as interleucinas e tratada com interleucina 6 recombinante (aumento de 10X). (F) Ensaio de adesão celular da linhagem U937 condicionadas em meio de células U251MG tratadas com inibidores de I κ B α e STAT3 por 48 horas. (G) Microscopia das células U937 coradas com giemsa e incubadas com meio condicionado de U251MG tratadas com BAY e Stattic (aumento de 10x). (n=3 em triplicata, p<0,05, ANOVA).

6. Discussão

Glioblastoma multiforme é um câncer primário extremamente agressivo e que tem mostrado pouco progresso no aperfeiçoamento de sua terapia, tomando pouco proveito dos estudos atuais e dependendo ainda de resecção tumoral e eficácia do agente alquilante temozolamida combinado à radioterapia. Avanços através de sua classificação molecular elucidaram alguns itens importantes para o estudo desse tipo tumoral, como: marcadores histológicos, perfis transcricionais e padrão de mutação, todavia esse progresso não tem demonstrado ainda consequências diretas no cenário clínico.

Cada vez mais evidências sugerem que GBM é um tumor extremamente inflamatório, estando inserido num ambiente complexo e dinâmico, de interação de muitos mediadores solúveis e componentes do sistema imunitário que provavelmente possuem a capacidade de manter e amplificar o processo de inflamação local. Assim, o entendimento do secretoma inflamatório e a interação entre os diferentes tipos celulares que integram o tumor podem trazer benefícios no desenvolvimento de novas terapias, principalmente quando analisado como um microambiente inserido em uma rede de integração de um espectro de sinais com propriedades diversas oriundas de uma variedade de tipos celulares associados ao tumor.

Inicialmente, foi determinada as condições padrão das células de glioma, validando a produção de ambas as citocinas no meio condicionado das duas linhagens celulares, U87MG ($PTEN^{mut}/p53^{wt}$) e U251MG ($p53^{mut}/PTEN^{mut}$) comparada a linhagem de origem neuronal, SH-SY5Y (Fig. 1A e 1B). IL-8 apresentou alta produção e de maneira similar nas linhagens de glioma, enquanto IL-6 demonstrou secreção em proporção menor e mais proeminente da linhagem U251MG. Além disso, ambas as linhagens mostraram grande potencial de invasão verificada pelo ensaio de migração celular, principalmente quando comparado à linhagem de adenocarcinoma de câncer de mama não invasivo MCF-7 (Fig. 1C). Ambas as linhagens apresentaram ativação basal das quinases p38, ERK1/2 e Akt (Fig. 1D).

Através do nocaute da produção das interleucinas 6 e 8 (Fig. 2A e 2B), foi possível verificar uma supressão da migração celular para ambas as citocinas, de

forma mais proeminente. Contudo, no silenciamento de IL-6, destacando este como um efector importante na capacidade de invasão das células de glioma U251MG e promovendo comportamento maligno na linhagem (Fig. 2C).

IL-6 é uma citocina pró-inflamatória, produzida primariamente por células imunes que constituem a massa tumoral e contribuem para o secretoma da região cancerosa, sendo assim sua produção pode estimular outras células a produzir citocinas quimioatraentes, formando um ciclo de retroalimentação positiva. Vários estudos mostram a correlação da alta expressão de IL-6 com mau prognóstico, e também já foi demonstrado promover migração em outros tumores sólidos (Badache A et al, 2001; Yao JS et al, 2006; Kanasawa T et al, 2007; Walter M et al, 2009; Ataie-Kachoie P et al, 2013). Porém sua ação específica depende do tipo celular (Weidle UH et al, 2010). Através do uso de fenantrolina, foi possível delinear também, a atribuição essencial de metaloproteinases da matriz na mediação da invasão celular e, por conseguinte, na agressividade do tumor e desenvolvimento de metástase (Fig. 2C); corroborando estudos anteriores, que já relacionaram IL-6 na indução da expressão de MMP-2 e MMP-9. Assim, IL-6 parece ter uma função autócrina na promoção da migração celular em glioblastoma regido, provavelmente, pela indução de metaloproteinases, enquanto que IL-8 possivelmente apresente um efeito parácrino.

O padrão de tratamento na clínica é o quimioterápico alquilante de DNA, temozolamida, portanto foi realizado o estudo da influência deste na produção de interleucinas. A supressão de IL-6 e IL-8 levou a uma diminuição da viabilidade celular em U251MG, já que ambas estão envolvidas em processos celulares de crescimento e proliferação (Fig. 3C), e acúmulo das células em fase G1/G0 do ciclo celular, com aumento de quase 10% em relação ao controle (Fig. 3D). Ambas as interleucinas também se mostraram levemente aumentadas em tratamento com o quimioterápico TMZ (Fig. 3A) e, quando silenciadas, sensibilizaram as células ao efeito do alquilante, reduzindo a viabilidade celular, mas de maneira aditiva (Fig. 3C); posteriormente, por citometria de fluxo, foi possível confirmar o efeito aditivo e não sinérgico do tratamento conjunto do nocaute das interleucinas com TMZ (Fig. 3D). Apesar de atingir vias de promoção de sobrevivência diferentes, o viés de rotas de compensação para promoção de viabilidade celular também podem ter influenciado para a eficácia mediana da combinação terapêutica.

Até então, algumas evidências mostram que gliomas manipulam o secretoma inflamatório produzido pelas células imunitárias infiltradas no tumor para promover sua sobrevivência e favorecer um fenótipo mais agressivo. Contudo, apesar dos resultados positivos nos experimentos realizados, é improvável que a supressão individual de uma interleucina, ou inibição de MMP's, sejam suficientes para diminuir o perfil maligno desse tumor, especialmente *in vivo*, uma vez que supressão de uma destas citocinas pode ser compensada por um efeito de rebote em outra via inflamatória, como outros dados do nosso grupo demonstram (não publicados). Portanto, o estudo da participação de reguladores-mestre das cascatas de inflamação, como quinases e fatores de transcrição reguladores de vários genes inflamatórios, poderia elucidar uma maneira mais eficaz ou combinada de alvejar o tumor.

Assim sendo, foi realizado ensaio clonogênico para acessar a toxicidade do tratamento com inibidores de quinase ERK1/2, JNK1/2, p38 e os fatores de transcrição STAT3 e NF- κ B (por meio da inibição de I κ B α). Os inibidores BAY-117082 e Stattic se mostraram os mais promissores e a combinação destes pareceu mostrar efeito tóxico sinérgico na linhagem U251MG (Fig. 4A). O mesmo aconteceu na secreção de quimiocinas quantificada no meio condicionado das células U251MG tratadas com os inibidores farmacológicos e também com silenciamento da proteína p65, uma subunidade de NF- κ B. A diminuição da produção de IL-6 foi mais proeminente no meio de células tratadas com BAY e transfectadas com siRNA para p65, justamente pelo fato de esta interleucina ser um dos alvos de NF- κ B (Fig. 4B), já a secreção de IL-8 foi diminuída significativamente não só pela inibição de componentes da rota NF- κ B, como também das quinases ERK1/2, JNK1/2 e p38, evidenciando participação destas quinases na propagação intracelular desencadeada por IL-8, que também é um alvo de NF- κ B (Fig. 4C). O efeito combinado destes inibidores se manteve na supressão da invasão celular, sendo que o tratamento com Stattic teve um grande efeito na migração, justamente por ser um regulador na via de sinalização de IL-6, já demonstrada estar envolvida com a capacidade celular de migração (Fig. 4D).

Através desses experimentos fica claro o papel central de STAT3 e NF- κ B agindo como reguladores chave na invasão e proliferação celular, o efeito sinérgico provavelmente se dá devido ao *crosstalk* destas vias já demonstrada em outros estudos (Yoshida Y et al, 2004). A diminuição do efeito de compensação de vias

também demonstra sua importância já que a inibição destes foi suficiente para abolir a característica de invasão neste fenótipo agressivo. Ademais o experimento de localização celular mostra a presença de ambos reguladores ativos e no núcleo dos gliomas, onde exercem sua função na forma ativa (Fig. 5)

Por fim, para estudar a influência do secretoma na ativação de monócitos, foi utilizado a linhagem U937 para realizar co-cultura com células de glioma U251MG. O efeito da interação celular é rápido (24 horas) e corresponde a etapas iniciais da transição monócito-macrófago, evidenciada pela adesão celular (Fig. 6A). O secretoma do resultado da interação das células estimula proliferação dos glioblastomas, evidenciado pelo ensaio de viabilidade (Fig. 6B) e também promove invasão através da matriz extracelular (Fig. 6C), o qual demonstrou um efeito ainda maior do que o potencial de migração basal da linhagem U251MG. Além disso, foi constatado a relação da indução da adesão com a presença de interleucina 6 já que quando o monócito é incubado com meio condicionado de nocaute de IL-6, a adesão é diminuída significativamente, e o tratamento com interleucina 6 recombinante aumenta a adesão quando comparado com meio livre de mediadores inflamatórios (Fig. 6D e 6E); pelo contrário, a inibição da atividade de MMP's e supressão de IL-8 não exerceram modulação na adesão de U937 (Fig. 6D). Enfim, a adesão celular foi verificada com meio condicionado do tratamento com BAY e Stattic e, corroborando os resultados anteriores, o efeito sinérgico dos inibidores farmacológicos quase reestabeleceu a condição basal do monócito (Fig. 6F e 6G).

O *crosstalk* dos reguladores chave STAT3 e NF- κ B já foi discutido em outros estudos e parece ser usual em GBM, correlacionando positivamente com o grau tumoral (Nozell S et al, 2008; Lo HW et al, 2008; Brantley EC et al, 2008; Brantley EC et al, 2008), porém não se sabe exatamente qual é a sobreposição destas vias, sendo que é dependente do processo celular. A interação complexa entre as vias de sinalização JAK/STAT e NF- κ B tem sido cada vez mais associada com um papel central na progressão tumoral (Lee H et al, 2009; Grivennikov S et al, 2009) e já foi demonstrada em diferentes níveis: pela ativação de STAT3 por fatores induzidos por NF- κ B, como por exemplo IL-6, o qual possui íntima relação com NF- κ B no desenvolvimento tumoral, sendo que os efeitos de proliferação e sobrevivência de IL-6 são mediados por STAT3 (Grivennikov S et al, 2009); pela ativação de STAT3 no processamento de NF- κ B levando a respostas pró-apoptóticas (Nadiminty N et al, 2006); pela promoção da translocação nuclear de NF- κ B por STAT3 (Yang J et al,

2007); pela ativação constitutiva de ambos os fatores de transcrição estar correlacionada reciprocamente através do aprisionamento no núcleo (Lee H et al, 2009); e pela competição em vários sítios promotores já que possuem genes alvos em comum (Lee H et al, 2009). Essas evidências demonstram cooperatividade entre STAT3 e NF-kB no câncer e ajudam a elucidar o motivo de ambos os fatores de transcrição possuírem um repertório sobreposto de genes relacionados com sobrevivência, proliferação e angiogênese; colocando-os em eminência principalmente como alvo promissor para novas abordagens terapêuticas (Atkinson GP et al, 2010).

7. Conclusão

GBM continua como um dos cânceres mais desafiadores devido a sua complexidade que engloba característica como: localização, agressividade natural, quimiorresistência, fenótipo invasivo e heterogeneidade celular e molecular. Nesse contexto, o estudo de componentes chaves bem como a integração com o sistema imunitário auxilia no entendimento do processamento de inúmeras sinalizações provenientes do diálogo intercelular, resultando no secretoma inflamatório, o qual demonstra ter participação crucial no desenvolvimento e progressão de GBM.

Conforme nossas análises, componentes distintos do secretoma inflamatório contribuem para diferentes processos malignos em glioma, em particular a interleucina 6 demonstrou função central na regulação da migração celular, provavelmente mediada por MMP's. Ademais, demonstramos também que o secretoma de GBM participa na quimiotaxia e ativação de monócitos, e que estes correlacionam-se com o perfil de macrófagos associados ao tumor.

O quimioterápico usado na clínica, não apresentou sinergia com inibição da atividade de interleucinas, demonstrando apenas um efeito aditivo, apesar de o nocaute de IL-6 e IL-8 sensibilizar os gliomas ao tratamento com o quimioterápico.

A co-cultura de monócitos e células de glioma potencializou o fenótipo maligno, corroborando novamente o envolvimento do secretoma inflamatório na agressividade tumoral.

Por fim, STAT3 e NF- κ B são reguladores essenciais do fenótipo inflamatório em GBM e a combinação de sua inibição diminui significativamente invasão, proliferação e ativação de monócitos em GBM.

Através dos experimentos, evidenciamos STAT3 e NF- κ B como alvos promissores para abordagem terapêutica; a abolição principalmente da interleucina 6, também se mostrou como alvo terapêutico promissor.

8. Perspectivas

- Avaliar atividade de metaloproteinases da matriz por zimografia;
- Identificar fenótipo M1/M2 na ativação dos monócitos;
- Distinguir população de células tronco no glioma e atribuir relação com processos celulares de migração, estudando seu envolvimento na recorrência tumoral;
- Associar conjunto de processos celulares alterados a tipo molecular em GBM (proneural, neural, clássico e mesenquimal);
- Investigar correlação de IL-8 com angiogênese em GBM;
- Experimentos *in vivo*.

9. Referências Bibliográficas

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97–109
2. Huttner A (2012) Overview of primary brain tumors. Pathologic classification, epidemiology, molecular biology, and prognostic markers. *Hematol Oncol Clin North Am* 26:715–732
3. Nishikawa R. Standard therapy for glioblastoma – a review of where we are. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2010; 50:713-719.
4. CBTRUS (2011) Statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2004–2007. <http://www.cbtrus.org/2011-NPCR-SEER/WEB-0407-Report-3-3-2011.pdf>
5. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 2008; 359:492-507.
6. Grossman AS, Ye X, Piantadosi S, Desideri S, Nabors LB, Rosenfeld M, Fisher J. Survival of patients with newly diagnosed glioblastoma treated with radiation and temozolomide in research studies in the United States. *Clin Cancer Res* 2010.
7. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987–996.
8. Koukourakis GV, Kouloulis V, Zacharias G, Papadimitriou C, Pantelakos P, Maravelis G, Fotineas A, Beli I, Chaldepoulos D, Kouvaris J. Temozolomide with radiation therapy in high grade brain gliomas: pharmaceutical considerations and efficacy; a review article. *Molecules* 2009, 14:1561-1577
9. Omar AI, Mason WP. Temozolomide: the evidence for its therapeutic efficacy in malignant astrocytomas. *Core Evidence* 2009; 4:93-111.
10. Cancer Genome Atlas Research Network (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455:1061–1068

11. Verhaak RG, et al. (2010) Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17:98-110
12. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. 2006; 9:157–73.
13. Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, et al. (2007) Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci* 8:610-622.
14. Yeung YT, McDonald KL, Grewal T, Munoz L. Interleukin in glioblastoma pathophysiology: implication for therapy. *British Journal of Pharmacology* 2013, 168: 591-606.
15. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454: 436–444.
16. Solinas G, Marchesi F, Garlanda C, Mantovani A, Allavena P (2010). Inflammation-mediated promotion of invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 29: 243–248.
17. Aggarwal B.B., Sung B., Gupta S.C. Inflammation and cancer – Advances in Experimental Medicine and Biology. Volume 816. Houston, TX, USA. Springer Basel 2014:76-96.
18. Rossi ML, Hughes JT, Esiri MM, Coakham HB, Brownell DB (1987) Immunohistological study of mononuclear cell infiltrate malignant gliomas. *Acta Neuropathol* 74:269–277
19. Fossati G, Ricevuti G, Edwards SW, Walker C, Dalton A, Rossi ML (1999) Neutrophil infiltration into human gliomas. *Acta Neuropathol* 98:349–354
20. Murat A, Migliavacca E, Hussain SF, Heimberger AB, Desbaillets I, Hamou MF, Ruegg C, Stupp R, Delorenzi M, Hegi ME (2009) Modulation of angiogenic and inflammatory response in glioblastoma by hypoxia. *PLoS One* 4:e5947
21. Charles N, Holland EC (2010) The perivascular niche microenvironment in brain tumor progression. *Cell Cycle* 9:3012–3021
22. Yang I, Han SJ, Sughrue ME, Tihan T, Parsa AT (2011a) Immune cell infiltrate differences in pilocytic astrocytoma and glioblastoma: evidence of distinct

- immunological microenvironments that reflect tumor biology. *J Neurosurg* 115:505–511
23. Trellakis S, Bruderek K, Dumitru CA, Gholaman H, Gu X, Bankfalvi A et al (2011) Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *Int J Cancer* 129(9):2183–2193
 24. Huysentruyt LC, Akgoc Z, Seyfried TN (2011) Hypothesis: are neoplastic macrophages/microglia present in glioblastoma multiforme? *ASN Neuro* 3:183–193
 25. Curran CS, Evans MD, Bertics PJ (2011) GM-CSF production by glioblastoma cells has a functional role in eosinophil survival, activation, and growth factor production for enhanced tumor cell proliferation. *J Immunol* 187:1254–1263
 26. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H (2012) The brain tumor microenvironment. *Glia* 60:502–514
 27. Albulescu R, Codrici E, Popescu ID, Mihai S, Necula LG, Petrescu D, Teodoru M, Pistol Tanase CP (2013) Cytokine Patterns in Brain Tumour Progression. Hindawi Publishing Corporation. Volume 2013, Article ID 979748, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/979748>, acessado em 15/09/2015.
 28. Gordon, S. and Taylor, P.R. (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 953964.
 29. Sica A, Allavena P, Mantovani A (2008). Cancer related inflammation: The macrophage connection. *Cancer letters* 264: 204-215.
 30. Mosser, D.M. and Edwards, J.P. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 958969.
 31. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23: 549–555.
 32. Davis, M. J. et al. (2013) Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to change in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* Infection. *mBio.* 4: 110.
 33. Mantovani, A. et al. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25: 677686.

34. Qian BZ, Pollard JW (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141: 39–51.
35. Gabrusiewicz K, Ellert-Miklaszewska A, Lipko M, Sielska M, Frankowska M, et al. (2011) Characteristics of the Alternative Phenotype of Microglia/Macrophages and its Modulation in Experimental Gliomas. *PLoS ONE* 6(8): e23902. doi:10.1371/journal.pone.0023902
36. Jeffrey W. Pollard. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis(2004). *Nature Reviews Cancer* 4, 71-78
37. Baggiolini, M., Walz, A., and Kunkel, S.L. (1989) Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest.* 84, 1045–1049.
38. Baggiolini, M., Walz, A., and Kunkel, S.L. (1989) Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest.* 84, 1045–1049.
39. Harada, A., Sekido, N., Akahoshi, T., Wada, T., Mukaida, N., and Matsushima, K. (1994) Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 56, 559–564.
40. Koch, A.E., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Harlow, L.A., DiPietro, L.A., Elner, V.M., Elner, S.G., and Strieter, R.M. (1992) Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258, 1798–1801.
41. Smyth, M.J., Zachariae, C.O., Norihisa, Y., Ortaldo, J.R., Hishinuma, A., and Matsushima, K. (1991) IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte subsets. *J. Immunol.* 146, 3815–3823.
42. Horcher, M., Rot, A., Aschauer, H., and Besemer, J. (1998) IL-8 derivatives with a reduced potential to form homodimers are fully active in vitro and in vivo. *Cytokine* 10, 1–12.
43. Rajarathnam, K., Sykes, B.D., Kay, C.M., Dewald, B., Geiser, T., Baggiolini, M., and Clark-Lewis, I. (1994) Neutrophil activation by monomeric interleukin-8. *Science* 264, 90–92.
44. Holmes, W.E., Lee, J., Kuang, W.J., Rice, G.C., and Wood, W.I. (1991) Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 253, 1278–1280.

45. Murphy, P.M., and Tiffany, H.L. (1991) Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* 253, 1280–1283.
46. Waugh DJJ, Wilson C (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 14: 6735–6741.
47. Mahe, Y., Mukaida, N., Kuno, K., Akiyama, M., Ikeda, N., Matsushima, K., and Murakami, S. (1991) Hepatitis B virus X protein transactivates human interleukin-8 gene through acting on nuclear factor kB and CCAAT/enhancer-binding protein-like cis-elements. *J. Biol. Chem.* 266, 13759–13763.
48. Mukaida, N., Mahe, Y., and Matsushima, K. (1990) Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding proteinlike factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by proinflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* 265, 21128–21133.
49. Brat, D.J., and Van Meir, E.G. (2001) Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF: A new world of angiogenesis research. *Am. J. Pathol.* 158, 789–796.
50. Li, A., Dubey, S., Varney, M.L., Dave, B.J., and Singh, R.K. (2003) IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J. Immunol.* 170, 3369–3376.
51. Hu, D.E., Hori, Y., and Fan, T.P. (1993) Interleukin-8 stimulates angiogenesis in rats. *Inflammation* 17, 135–143.
52. Keunen O, Johansson M, Oudin A, Sanzey M, Rahim SA, et al (2011) Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:3749-3754.
53. Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003, 149, 1–38.
54. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, et al. Interleukin-6- type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998, 334(Pt 2), 297–314.
55. Ershler WB. Interleukin-6: a cytokine for gerontologists. *J Am Geriatr Soc* 1993, 41, 176–181.
56. Wolvekamp MC, Marquet RL. Interleukin-6: historical background, genetics and biological significance. *Immunol Lett* 1990, 24, 1–9.

57. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990;265:621–36.
58. Weiss, J. F., Morantz, R. A., Bradley, W. P., and Chretien, P. B. Serum acute-phase proteins and immunoglobulins in patients with gliomas. *Cancer Res.* 39: 542-544, 1979.
59. Takai, Y., Wong, G. G., Clark, S. C., Burakoff, S. J., and Herrmann, S. B. B-cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T- 33. lymphocytes. *J. Immunol.*, 140: 508-512, 1988.
60. Okada, M., Kitahara, M., Kishimoto, S., Matsuda, T., Mirano, T., and Kishimoto. T. IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. *J. Immunol.* 141: 1543-1549, 1988.
61. Anderson P. Post-transcriptional control of cytokine production. *Nat Immunol* 2008;9:353–9.
62. Toshio Tanaka and Tadamitsu Kishimoto. The Biology and Medical Implications of Interleukin-6. *Cancer Immunol Res* 2014;2:288-294.
63. Tchirkov A, Khalil T, Chautard E et al. Interleukin-6 gene amplification and shortened survival in glioblastoma patients. *Br J Cancer* 2007;96:474–476.
64. Chang CY, Li MC, Liao SL, Huang YL, Shen CC, Pan HC (2005) Prognostic and clinical implication of IL-6 expression in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci* 12:930–933
65. Frei, K., Malipiero, U. V., Leist, T. P., Zinkernagel. R. M., Schwab, M. E., and Fontana. A. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur. J. Immunol.* 19: 689- 694, 1989.
66. Liu KD, Gaffen SL, Goldsmith MA. JAK/STAT signalling by cytokine receptors. *Curr Opin Immunol* 1998, 10, 271–278.
67. Yang J, Chatterjee-Kishore M, Staugaitis SM, et al. Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Res* 2005, 65, 939–947.
68. Mertens C, Darnell JE Jr. SnapShot: JAK–STAT signaling. *Cell.* 2007; 131(3):612.

69. Schaefer LK, Ren Z, Fuller GN, Schaefer TS. Constitutive activation of STAT3 α in brain tumors: localization to tumor endothelial cells and activation by the endothelial tyrosine kinase receptor (VEGFR-2). *Oncogene*. 2002; 21(13):2058–2065
70. Lo, H.W.; Hsu, S.C.; Ali-Seyed, M.; Gunduz, M.; Xia, W.; Wei, Y.; Bartholomeusz, G.; Shih, J.Y.; Hung, M.C. Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell* 2005, 7, 575–589.
71. Lo, H.W.; Hsu, S.C.; Xia, W.; Cao, X.; Shih, J.Y.; Wei, Y.; Abbruzzese, J.L.; Hortobagyi, G.N.; Hung, M.C. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of twist gene expression. *Cancer Res*. 2007, 67, 9066–9076.
72. Alvarez, J.V.; Mukherjee, N.; Chakravarti, A.; Robe, P.; Zhai, G.; Chakladar, A.; Loeffler, J.; Black, P.; Frank, D.A. A STAT3 gene expression signature in gliomas is associated with a poor prognosis. *Transl. Oncogenomics* 2007, 2, 99–105.
73. Abou-Ghazal, M.; Yang, D.S.; Qiao, W.; Reina-Ortiz, C.; Wei, J.; Kong, L.Y.; Fuller, G.N.; Hiraoka, N.; Priebe, W.; Sawaya, R.; et al. The incidence, correlation with tumor-infiltrating inflammation, and prognosis of phosphorylated STAT3 expression in human gliomas. *Clin. Cancer Res*. 2008, 14, 8228–8235.
74. Lo, H.W.; Cao, X.; Zhu, H.; Ali-Osman, F. Constitutively activated Stat3 frequently coexpresses with epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas and targeting STAT3 sensitizes them to irressa and alkylators. *Clin. Cancer Res*. 2008, 14, 6042–6054.
75. Rahaman SO, Harbor PC, Chernova O et al. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene* 2002;21: 8404–8013.
76. Carpenter, R.L. e Lo, H.W. STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers. *Cancers* 2014, 6, 897-925.

77. Ecker, A.; Simma, O.; Hoelbl, A.; Kenner, L.; Beug, H.; Moriggl, R.; Sexl, V. The dark and the bright side of STAT3: Proto-oncogene and tumor-suppressor. *Front. Biosci.* 2009, 14, 2944–2958.
78. Weissenberger J, Loeffler S, Kappeler A et al. IL6 is required for glioma development in a mouse model. *Oncogene* 2004;23:3308–3316.
79. Bromberg J, Wang TC. Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. *Cancer Cell.* 2009; 15:79–80.
80. Wang H, Wang H, Zhang W et al. Analysis of the activation status of Akt, NFkappaB, and Stat3 in human diffuse gliomas. *Lab Invest* 2004;84:941–951.
81. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(11):798–809.
82. Hussain SF, Yang D, Suki D, Aldape K, Grimm E, Heimberger AB. The role of human glioma-infiltrating microglia/ macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro Oncol.* 2006; 8(3):261–279.
83. Hussain SF, Kong LY, Jordan J, et al. A novel small molecule inhibitor of signal transducers and activators of transcription 3 reverses immune tolerance in malignant glioma patients. *Cancer Res.* 2007; 67(20):9630–9636. In vivo study of the glioblastoma-associated immune response and the role of STAT3.
84. Matsukawa A, Kudo S, Maeda T, et al. STAT3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response. *J Immunol.* 2005; 175(5):3354–3359.
85. Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, et al. Inhibiting STAT3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med.* 2005; 11(12):1314–1321. Elegant study showing the importance of STAT3 in the immune response to tumors.
86. Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, Bollo RJ, Zhao X, Snyder EY, et al. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature.* 2010; 463:318–25.
87. Bhat KP, Salazar KL, Balasubramanian V, Wani K, Heathcock L, Hollingsworth F, et al. The transcriptional coactivator TAZ regulates mesenchymal differentiation in malignant glioma. *Genes Dev.* 2011; 25:2594–609.

88. Spolski R & Leonard WJ, 2014. Interleukin-21: a double-edge sword with therapeutic potential. *Nature Reviews Drug Discovery* 13, 379–395 (2014) doi:10.1038/nrd4296
89. Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF- κ B. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5(5):392–401.
90. Gilmore TD. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene.* 2006; 25(51):6680–6684.
91. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene.* 1999; 18(49):6853–6866.
92. McFarland BC, Hong SW, Rajbhandari R, Twitty GB Jr, Gray GK, et al. (2013) NF- κ B-Induced IL-6 Ensures STAT3 Activation and Tumor Aggressiveness in Glioblastoma. *PLoS ONE* 8(11): e78728. doi:10.1371/journal.pone.0078728
93. Brown RE, Law A. Morphoproteomic demonstration of constitutive nuclear factor- κ B activation in glioblastoma multiforme with genomic correlates and therapeutic implications. *Ann Clin Lab Sci.* 2006; 36(4):421–426.
94. Zanotto-Filho A, Braganhol E, Schröder R, de Souza LH, Dalmolin RJ, Pasquali MA, Gelain DP, Battastini AM, Moreira JC. NF κ B inhibitors induce cell death in glioblastomas. *Biochemical Pharmacology* 81 (2011) 412–424.
95. Sacconi A, Schioppa T, Porta C, Biswas SK, Nebuloni M, Vago L, Bottazzi B, Colombo MP, Mantovani A, Sica A. p50 nuclear factor- κ B overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer Res.* 66, 11432–11440 (2006).
96. Hagemann T, Lawrence T, McNeish I, Charles KA, Kulbe H, Thompson RG, Robinson SC, Balkwill FR. Re-educating tumor-associated macrophages by targeting NF- κ B. *J. Exp. Med.* 205, 1261–1268 (2008).
97. Philipp J. Jost eJürgen Ruland, Aberrant NF- κ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications (2007), *Blood:* 109 (7) 2700-2707.
98. Badache A, Hynes NE (2001) Interleukin 6 inhibits proliferation and, in cooperation with an epidermal growth factor receptor autocrine loop, increases migration of T47D breast cancer cells. *Cancer Res* 61:383–391

99. Yao JS, Zhai W, Young WL, Yang GY (2006) Interleukin-6 triggers human cerebral endothelial cells proliferation and migration: the role for KDR and MMP-9. *Biochem Biophys Res Commun* 342:1396–1404
100. Kanazawa T, Nishino H, Hasegawa M, Ohta Y, Iino Y, Ichimura K, Noda Y (2007) Interleukin-6 directly influences proliferation and invasion potential of head and neck cancer cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 264:815–821
101. Walter M, Liang S, Ghosh S, Hornsby PJ, Li R (2009) Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 28:2745–2755
102. Ataie-Kachoie P, Pourgholami MH and Morris DL: Inhibition of the IL-6 signaling pathway: a strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer. (2013) *Cytokine Growth Factor Rev.* 24:163–173.
103. Weidle UH, Klostermann S, Eggle D and Kruger A: Interleukin 6/interleukin 6 receptor interaction and its role as a therapeutic target for treatment of cachexia and cancer. (2010) *Cancer Genomics Proteomics.* 7:287–302.
104. Yoshida Y, Kumar A, Koyama Y, Peng H, Arman A, Boch JA, Auron PE. Interleukin 1 activates STAT3/nuclear factor-kappaB cross-talk via a unique TRAF6- and p65-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 2004. 279(3):1768-76.
105. Nozell S, Laver T, Moseley D, et al. The ING4 tumor suppressor attenuates NF- κ B activity at the promoter of target genes. *Mol Cell Biol.* 2008; 28(21):6632–6645.
106. Lo HW, Cao X, Zhu H, Ali-Osman F. Constitutively activated STAT3 frequently coexpresses with epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas and targeting STAT3 sensitizes them to Iressa and alkylators. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(19):6042–6054.
107. Brantley EC, Nabors LB, Gillespie GY, et al. Loss of protein inhibitors of activated STAT-3 expression in glioblastoma multiforme tumors: implications for STAT-3 activation and gene expression. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(15):4694–4704.

108. Brantley EC, Benveniste EN. Signal transducer and activator of transcription-3: a molecular hub for signaling pathways in gliomas. *Mol Cancer Res.* 2008; 6(5):675–684.
109. Lee H, Herrmann A, Deng JH, et al. Persistently activated STAT3 maintains constitutive NF κ B activity in tumors. *Cancer Cell.* 2009; 15(4):283–293.
110. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, et al. IL-6 and STAT3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell.* 2009; 15(2):103–113.
111. Nadiminty N, Lou W, Lee SO, Lin X, Trump DL, Gao AC. STAT3 activation of NF- κ B p100 processing involves CBP/p300-mediated acetylation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(19):7264–7269.
112. Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE, Stark GR. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NF κ B. *Genes Dev.* 2007; 21(11):1396–1408.
113. Atkinson, G.P., Nozell, S.E., Benveniste E.N. NF- κ B and STAT3 signaling in glioma: targets for future therapies. *Expert Rev Neurother.* 2010 Apr;10(4):575-86.