



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

TESE DE DOUTORADO

**ATIVIDADE QUIMIOSENSIBILIZANTE E ANTITUMORAL
IN VITRO DO 8-METOXIPSORALENO, UM NOVO INIBIDOR
DA GLUTATION S-TRANSFERASE- π**

Diêgo Madureira de Oliveira

**Salvador – Bahia – Brasil
2012**



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

**ATIVIDADE QUIMIOSENSIBILIZANTE E ANTITUMORAL
IN VITRO DO 8-METOXIPSORALENO, UM NOVO INIBIDOR
DA GLUTATION S-TRANSFERASE- π**

Diêgo Madureira de Oliveira

Orientador: Dr. Ramon dos Santos El-Bachá

Tese apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau Doutor.

Salvador – Bahia – Brasil
2012

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

O48a Oliveira, Diêgo Madureira de
Atividade quimiossensibilizante e antitumoral *in vitro* do 8-metoxipsoraleno, um novo inibidor da glutathione *S*-transferase- π .[manuscrito] / Diêgo Madureira de Oliveira. - 2012. 164f.; 30cm

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana, 2012.
Orientador: Dr. Ramon dos Santos El-Bachá.

1. 8-MOP 2. GST-P1 3. Glioma 4. Câncer 5. Quimioterapia I. Título

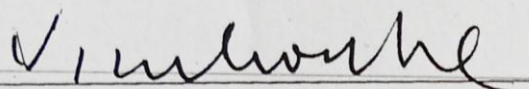
CDU 616-006:615.28

**“ATIVIDADE QUIMIOSSENSIBILIZANTE E ANTITUMORAL IN VITRO DO
8-METOXIPSORALENO, UM NOVO INIBIDOR DA GLUTATION S-
TRANSFERASE- π .”**

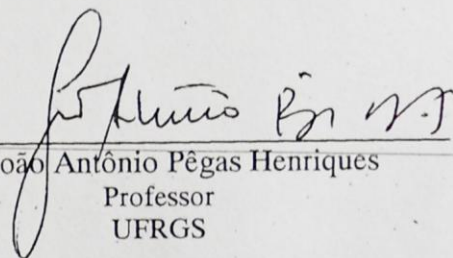
DIEGO MADUREIRA DE OLIVIEIRA

FOLHA DE APROVAÇÃO

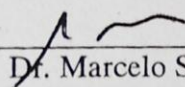
COMISSÃO EXAMINADORA



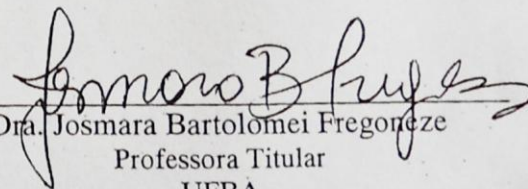
Dr. Vivaldo Moura Neto
Professor Titular
UFRJ



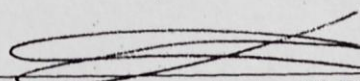
Dr. João Antônio Pêgas Henriques
Professor
UFRGS



Dr. Marcelo Santos Castilho
Professor Adjunto
UFBA



Dra. Josmara Bartolomei Fregoneze
Professora Titular
UFBA



Dr. Ramon dos Santos El-Bachá
Professor Associado
UFBA

Dedico este trabalho a todos aqueles que sofrem com câncer e depositam na ciência a esperança de uma cura. Que essa esperança fale mais alto que o ego dos cientistas, para que se lembrem dos reais princípios que fundamentam a carreira que escolheram seguir.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por terem “me criado para o mundo”, me ensinando a temer, mas não desistir, desconfiar, mas não desacreditar, cansar, mas não desanimar, e até a perder a paciência às vezes, mas nunca a fé. Com isso, não apenas me deram asas, mas disseram-me o que poucos tem coragem de dizer àqueles que amam: voa!

Ao meu amigo Ramon, por ter sido meu orientador, me ensinando valores que vão além dos acadêmicos, sendo exemplo de ética, organização, competência e senso de justiça, qualidades que o tornaram referência, não apenas na minha formação profissional, mas também pessoal.

Aos meus antigos orientadores, Dra. Joice Neves Reis e Dr. Lisandro Diego Giraldes, por me ajudarem nos primeiros passos na ciência.

À minha eterna companheira de bancada Rute, pelos muitos momentos divididos.

À Vanessa, Liz, Ana, pelo companheirismo, e também à Érica, Bruno, Help, Édson, Lú, Mona, João, Sr. Carlos, Paulo, Luã, Rosan, Noélio, Tina, Keu, pelas tempestades e calmarias que atravessamos juntos, sem jamais perde o bom humor. Enfim, a toda a família LabNq por ser assim, de fato uma família.

Às professoras Cátia Suse, Fátima, Suzana e Sílvia, pelas marcantes características de cada uma, que trazem para o laboratório a diversidade, um elemento que torna desafiadora, e bonita, a vida.

Aos parceiros: Professor Martins, pela disposição em compartilhar seu conhecimento e humildade em querer aprender sempre; Marcel Tavares, por comprar a idéia do projeto e não medir esforços para ajudar nas análises cromatográficas; Professora Zênis Novais da Rocha, pela imensa ajuda, paciência, boa vontade e por ser exemplo de professora e pesquisadora; professor Eudes Velozo e a Ilza Amorin e Sandra Virgínia, pelo paciente trabalho de isolamento e caracterização dos compostos de origem natural, e por confiarem o produto de tão laborioso trabalho aos meus experimentos; André Teles e Professor Manoelito, por concordarem com a parceria na parte *in silico*, mesmo não sendo este seu tema de trabalho; Jorge Clarêncio, pela paciência e disposição em colaborar com as análises de citometria de fluxo; pessoal do laboratório de microscopia eletrônica do CPqGM, em especial a Maria Lúcia, pela receptividade e boa vontade na colaboração.

À Capes e ao CNPq pelo financiamento desse estudo.

A todos os responsáveis por minha educação, desde os primeiros passos, quando destaco o nome da educadora Maria Ely, passando pela base que consegui no segundo grau, cito os professores Marcos e Neiva representando todos os outros, e chegando ao ensino superior, quando agradeço especialmente aos mestres que mais exigiram de mim, a exemplo dos professores Sílvio Cunha, Marcelo Castilho, Zênis e Maria Helena.

Aos meus alunos, por me mostrarem a cada dia o quanto ainda tenho a aprender.

Aos amigos, por serem meus amigos, isso resume tudo de bom que fizeram por mim; e são muitos: Rick, Sr. Thiago, Nego, Ranyere, Deise, R2, Bartira, Liu, Van, Mila, Lú, Taciana, Emília, TT, Dani, Wager Alexandre, Felipe, Thassila, Berthier, Jaff, Clístene, Paulo, Camile, Dan, Milena, Aninha... só para citar alguns.

Aos companheiros da pós-graduação, pelo trabalho em equipe para sairmos ilesos das (muitas) horas de aula, e pelos incentivos trocados.

Aos meus irmãos, por me darem a responsabilidade de irmão mais velho, forçando meu amadurecimento, e por serem, antes de tudo, meus amigos.

A toda a minha família, por ser o alicerce que eu preciso, nem fraco o bastante para comprometer a construção, nem forte o bastante para gerar excesso de autoconfiança e displicência.

A mim mesmo, sim, sem modéstia nem presunção; pois muitas vezes só continuei nessa jornada por me agarrar a minha própria força de vontade.

Ao sertão, quente e seco, porém belo, de onde vim; por me ensinar a encontrar inspiração nas coisas mais simples, como um mato verde ou um dia chuvoso.

À minha noiva, Tacila, por me arrancar do laboratório quando eu esquecia que havia vida lá fora, e por me enfiar lá outra vez quando eu queria me esquecer dele... Mas especialmente, por me amar, e por ter respondido sim.

Aos meus futuros filhos, por, apesar de ainda não terem sido concebidos, terem motivado importantes decisões sobre minha carreira profissional.

A todos que acreditam na ciência, e a todos que não vivem sem arte, pois me encaixo em ambas as categorias.

Por fim, mas certamente não menos importante, a Deus, por ter colocado em minha vida cada um(a) destes(as), me dando razão para tantos agradecimentos.

"A ciência não passa do bom senso exercitado e organizado"
Aldous Huxley (autor de *Admirável Mundo Novo*)

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
Lista de Abreviaturas e Siglas	10
Lista de Figuras	12
Lista de Tabelas	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Gliomas e glioblastomas	16
2.2 As GSTs e a GST- π	18
2.3 GST- π como alvo terapêutico	20
2.4 Cumarinas, psoraleno e 8-metoxipsoraleno	21
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
4 METODOLOGIA	25
4.1 Modelos de estudo e sumário metodológico	25
4.2 Metodologia detalhada	26
4.2.1 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade de GST- π	26
4.2.2 Estudos de cinética enzimática de GST- π	26
4.2.3 Espectrofotometria na região do Ultravioleta/visível	27
4.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	28
4.2.5 Cálculo do valor teórico de logP	28
4.2.6 Cultura de células tumorais	29
4.2.7 Cultura primária de astrócitos	29
4.2.8 Dosagem de proteínas totais	30
4.2.9 Avaliação da atividade de GST celular	30
4.2.10 Imunocitoquímica	31
4.2.11 Teste do monoclorobimano para avaliação de depleção de GSH	32
4.2.12 Avaliação da viabilidade celular pelo teste do MTT	32
4.2.13 Microscopia de contraste de fase	33
4.2.14 Teste de exclusão do corante azul de Tripán	33
4.2.15 Avaliação do tipo de morte celular	34
4.2.16 Visualização de condensação e/ou fragmentação nuclear	35
4.2.17 Teste de ciclo celular	35
4.2.18 Teste de formação de colônia	36
4.2.19 Microscopia eletrônica de varredura	36
4.2.20 Microscopia eletrônica de transmissão	37
4.2.21 Quantificação da expressão de proteínas	37
4.2.22 Teste de migração	38
4.2.23 Análise estatística dos dados	38
5 RESULTADOS	40
6 DISCUSSÃO	81
7 CONCLUSÕES	93
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
9 ANEXOS	113

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte e apresenta importantes índices de morbidade em todo o mundo. Gliomas são os tumores primários malignos mais comuns e letais em adultos, e embora sejam estudados já há muito tempo, os avanços tecnológicos não se traduziram em ganhos terapêuticos reais, de forma que a sobrevivência dos pacientes com esse diagnóstico continua muito baixa. Dessa forma, a pesquisa de novas formas de terapia e fármacos se apresenta como uma necessidade para a implementação de um tratamento realmente eficaz. As glutatión *S*-transferases (GST) são enzimas multifuncionais que atuam na detoxificação celular por catalisarem a conjugação de compostos exógenos com o tripeptídeo glutatión (GSH). Como esta reação também pode ocorrer com moléculas de agente terapêuticos, a expressão destas enzimas, principalmente a isoforma π , está relacionada com aquisição de resistência à quimioterapia no câncer, tornando-a um alvo na busca por novos fármacos. No presente trabalho, o 8-metoxipsoraleno (8-MOP), um derivado do psoraleno de uso clínico rotineiro no tratamento de doenças da pele, é apresentado como possível promissor agente antineoplásico por demonstrar atividade inibitória da GST- π e antiproliferativa em um modelo *in vitro* de glioma. O estudo adotou uma abordagem que associa técnicas químicas, bioquímicas e celulares. Análises de cinética enzimática foram feitas utilizando-se o GSH e o cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substratos e o conteúdo de GSH intracelular foi visualizado por coloração com monoclorobimano (MCB). As técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria auxiliaram no estabelecimento dos detalhes do mecanismo de ação. Para a avaliação da atividade antitumoral, células de glioma murino (C6) e humano (GL-15) foram usadas, além de astrócitos de rato como controle de células normais. A ação do 8-MOP na viabilidade, proliferação, migração, expressão de proteínas, morfologia e tipo de morte celular foi avaliada através de variadas técnicas. O composto inibiu competitivamente (aumentou K_m sem alterar V_{max}) a atividade enzimática, ligando-se ao sítio H da enzima. O 8-MOP agiu como quimiossensibilizante, potencializando o efeito de fármacos como etoposídeo e temozolomida em células tumorais. Além disso, reduziu a proliferação celular de forma tempo- e concentração-dependente, e induziu alterações morfológicas e apoptose quando em altas concentrações. Não foi observada morte celular por necrose. As células normais não foram afetadas nas mesmas proporções das tumorais. Adicionalmente, derivados cumarínicos estruturalmente relacionados ao 8-MOP apresentaram atividade similar, ou mesmo superior, à deste. Assim, o 8-MOP apresenta-se como um protótipo para novo agente para o tratamento, não apenas de glioma, mas do câncer de uma forma geral, podendo ainda ser útil no tratamento de outras doenças com falhas terapêuticas ligadas à GST.

ABSTRACT

Cancer is an important cause of mortality around the world. Gliomas are the most common and lethal primary malignant brain tumors, and have been studied for a long time. Nevertheless, the impact of technological advances on clinical outcome has not been satisfactory, and the available drugs are not able to provide significant increase on the survival of patients. Then, researches to find new therapeutic approaches, treatments and drugs are necessary. The Glutathione *S*-transferases (GSTs) are multifunctional enzymes which play a key role in cellular detoxification. Due to its ability to promote conjugation between drugs and the tripeptide glutathione (GSH), its expression is related to drug resistance, specially the isoform π (GSTP1-1), that plays a crucial role in cancer chemoprevention and chemoresistance and is a key target for anticancer drug development. In this work we presented, for the first time, the 8-methoxypsoralen (8-MOP), a psoralen derivative clinically used in skin diseases treatment, as a novel promising antitumor drug for acting as GST- π inhibitor and anti-proliferative agent. The approach was the association of chemical, biochemical and cellular techniques. Enzymatic kinetic analysis were performed *in vitro* using GSH and chloro-dinitrobenzene (CDNB) as substrates and cellular content of GSH was visualized by monochlorobimane (MCB) staining. Chromatographic and spectrophotometric techniques were used for elucidation of detailed mechanism of action. In order to investigate antitumor activity, rat glioma C6 cells and human glioblastoma GL-15 cells were used in tests, as well as rat astrocytes for comparison. The action of 8-MOP on cell viability, proliferation, migration, morphology, specific protein expression, and type of cell death was evaluated by several techniques. The drug inhibited dose-dependently and competitively (increased K_m but did not change V_{max}) the enzyme activity, binding to the H-site of GST- π . 8-MOP acted as chemosensitizer, increasing the effect of the drugs etoposide and temozolomide on tumor cells. Also, this drug reduced tumor cell proliferation *in vitro* time- and dose-dependently, and induced apoptosis and changes on cell morphology when used at high concentrations. No necrosis was observed. The normal astrocytes were not affected to the extent that tumor cells were. Additionally, coumarin derivatives structurally related to 8-MOP presented similar, or stronger, effects. Therefore, the 8-MOP is a prototype for new chemosensitizer and anti-cancer drug design, and could also be useful for treatment of other diseases with failure of therapy related to GST.

Lista de abreviaturas e siglas

8-MOP – 8-metoxipsoraleno

8-MOP-SG – Conjugado entre 8-MOP e glutation

Abs – Absorbância

ASB – Albumina sérica bovina

AST – Astrócitos

BCNU – 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosuréia (carmustina)

BHE – Barreira hemato-encefálica

C6 – Linhagem de células de glioma murino

CCNC – 1-(2-cloroetil)-3 ciclo hexil-1-nitrosuréia (lomustina)

CDNB – Cloro 2,4-dinitrobenzeno

CI₅₀ – Concentração inibitória de 50% (de atividade ou viabilidade)

c-Jun – Componente do fator de transcrição proteína ativadora 1

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

COUMUR – Coumurrayina

CUM – Cumarina

DM – Dinâmica molecular

DMEM – meio de Eagle modificado por Dulbecco

DNA – *Desoxirribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

DNP-SG – Dinitrofenol-SG (conjugado com glutation)

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EGTA – Ácido bis(2-aminoetil) etilenoglicol-N,N ,N',N'-tetraacético

ERO – Espécie reativa de oxigênio

ex/em – excitação/emissão

FITC – Isocitrato de fluoresceína (do inglês *fluorescein isothiocyanate*)

GB – Glioblastoma

GFAP – *Glial fibrillary acidic protein*

GL-15 – Linhagem de células de glioblastoma humano

GSH – Glutation reduzido

GST – Glutation *S*-transferase

Hsp90 – *Heat shock protein 90*

ICL - *Interstrand DNA cross-links* (ligação cruzada entre as fitas de DNA)

IP – Iodeto de propídio

JNK – c-Jun N-terminal cinase, do inglês *c-Jun N-terminal kinase*

K_m – Constante de Michaelis-Menten

MCB – Monoclorobimano

MDSO – Dimetilsulfóxido

MRP - *Multi-drug resistance protein*

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium

MUBF – Metoxiumbeliferona

NBD – 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol

NBDHEX – 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-iltio) hexanol

ns – nano segundos

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – *Phosphate buffered saline*

PDB – *Protein data bank*

ps – pico segundos

PSR – Psoraleno

PUVA – Psoraleno & Ultravioleta

R² – Coeficiente de regressão

RSMD – *Root Mean Square Deviation*

SDS – *Sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)

SFB – Soro fetal bovino

SNC – Sistema nervoso central

TMZ – Temozolomida

UI – Unidades internacionais

UV – Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta e visível

V_{max} – Velocidade máxima (constante enzimática)

Lista de Figuras

Figura 1. Dados epidemiológicos sobre tipos de câncer no Brasil	15
Figura 2. Aspectos macro- e microscópico do glioblastoma	16
Figura 3. Estrutura tridimensional da GST- π	19
Figura 4. Estrutura do 8-MOP e cabine para terapia PUVA	22
Figura 5. Inibição da atividade de GST- π por 8-MOP	40
Figura 6. Cinética enzimática com concentração variável de CDNB	41
Figura 7. Cinética enzimática com concentração variável de GSH	42
Figura 8. Esquema de inibição de GST- π por 8-MOP	43
Figura 9. Mecanismo de reação de formação do 8-MOP-SG	44
Figura 10. Espectros de absorção UV-Vis dos substratos e conjugados	45
Figura 11. Estrutura tridimensional dos compostos	46
Figura 12. Evidências cromatográficas da ausência do conjugado 8-MOP-SG	47
Figura 13. Efeito do 8-MOP em GST de células tumorais humanas	49
Figura 14. Depleção de glutathion reduzido (GSH) pelo CDNB	50
Figura 15. Citotoxicidade do 8-MOP em células GL-15	51
Figura 16. Avaliação da atividade quimiossensibilizante do 8-MOP	52
Figura 17. Citotoxicidade do 8-MOP em células GL-15, C6 e astrócitos	54
Figura 18. Atividade relativa de GST por tipo celular	55
Figura 19. Efeito do 8-MOP sobre a quantidade de proteínas totais nas culturas	56
Figura 20. Atividade anti-proliferativa e citotóxica do 8-MOP	57
Figura 21. Efeito de exposição prolongada à baixa concentração de 8-MOP	58
Figura 22. Tipo de morte celular promovida pelo 8-MOP	59
Figura 23. Índícios de apoptose em células tratadas com 8-MOP	60
Figura 24. Estudo do ciclo celular após tratamento com 8-MOP	61
Figura 25. Citotoxicidade do 8-MOP em culturas com diferentes confluências	62
Figura 26. Mudanças na morfologia celular e celularidade provocadas pelo 8-MOP	63
Figura 27. Teste de formação de colônia com células C6 tratadas com 8-MOP	64
Figura 28. Eletromicrografias de varredura das células tratadas com 8-MOP	65-67
Figura 29. Eletromicrografias de transmissão das células tratadas com 8-MOP	68
Figura 30. Teste de migração com células tumorais tratadas com 8-MOP	69
Figura 31. Modificações ultra-estruturais em células tratadas com 8-MOP	70
Figura 32. Expressão de GFAP por astrócitos tratados com 8-MOP	71
Figura 33. Imunomarcção para vimentina em células GL-15	72
Figura 34. Efeito do 8-MOP na expressão de vimentina em células GL-15	73
Figura 35. Derivados cumarínicos estruturalmente relacionados ao 8-MOP	74
Figura 36. Avaliação da citotoxicidade dos derivados cumarínicos	75-78
Figura 37. Perfil de toxicidade de derivados cumarínicos nas diferentes linhagens	79
Figura 38. Ação dos derivados cumarínicos na morfologia de células tumorais	80
Figura 39. Moléculas com reconhecida atividade inibitória da GST- π	83
Figura 40. Função não enzimática da GST- π	85
Figura 41. Estrutura de ICL formado pelo 8-MOP após irradiação com ultravioleta	87

Lista de Tabelas

Tabela 1. Gradiente de eluição para análise cromatográfica por CLAE	29
Tabela 2. Anticorpos utilizados para marcações imunocitoquímicas	32
Tabela 3. Atividade antiproliferativa de 8-MOP a baixa concentração.....	58

1 INTRODUÇÃO

Câncer é um termo utilizado para designar neoplasias classificadas como malignas; assim, por definição, todo câncer apresenta características de malignidade como capacidade de invasão e metástase (com raras exceções), e achados histopatológicos como anaplasia e ausência de limites definidos com tecido normal (ROBBINS et al., 2000). Embora seja difícil precisar o significado de neoplasia, uma definição clássica sugerida há mais de meio século continua abordando suas principais características ao descrevê-la como “massa anormal de tecido, cujo crescimento ultrapassa e não é coordenado com o dos tecidos normais e persiste na mesma maneira excessiva depois da interrupção dos estímulos que deram origem à mudança” (WILLIS, 1952).

O câncer apresenta elevadas taxas de morbi-mortalidade em todo o mundo, e apesar de ser uma doença muito antiga (DAVID & ZIMMERMAN, 2010), vem sendo tratada como uma epidemia no mundo desenvolvido (CAVALLI, 2009). No Brasil, as estimativas mais atuais para incidência de câncer prevêem aproximadamente meio milhão de novos casos somente no ano de 2011 (INCA, 2011)

Segundo os dados mais recentes disponíveis, neoplasias constituem a segunda principal causa de óbito no Brasil, se desconsideradas mortes violentas ou por acidentes, perdendo apenas para doenças cardiovasculares (DATASUS, 2011), seguindo assim, a tendência mundial (DAVID & ZIMMERMAN, 2010). Dentre os tipos de câncer que mais matam, estão os tumores no encéfalo (figura 1). Fica, portanto, evidente, a relevância que tem o câncer, particularmente os tumores do sistema nervoso central (SNC), como problema de saúde pública, principalmente se for levado em consideração a possibilidade dos dados expostos estarem sob efeito do fenômeno de sub-notificação.

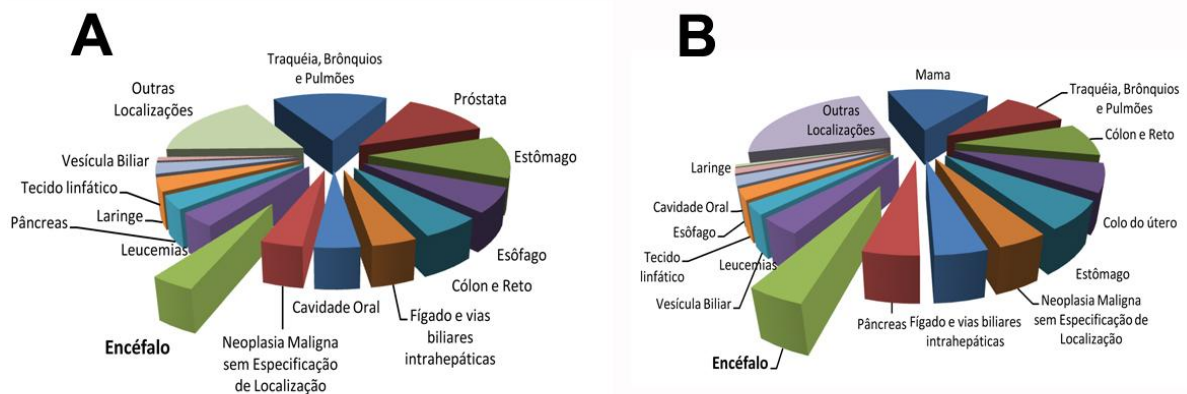


Figura 1. Distribuição proporcional do total de mortes por câncer segundo localização primária do tumor em homens (A) e mulheres (B) no Brasil para o período entre 2004 e 2008. Tumores no encéfalo foram responsáveis por 3,8% e 4,8% do total de mortes por câncer entre homens e mulheres, respectivamente. Estes valores foram de 4,1% e 4,2% considerando-se apenas a região Nordeste, e 4,4% e 4,3% para o estado da Bahia no mesmo período. FONTE: Instituto Nacional do Câncer – INCA.

Dentre os tumores que acometem o encéfalo, destacam-se os gliomas como mais frequentes e agressivos, ainda com prognóstico muito desfavorável, mesmo quando admitidos todos os recursos terapêuticos disponíveis (NIYAZI et al., 2011). Tumores sólidos, como os gliomas, dificultam o acesso à maioria dos agentes quimioterápicos, o que impede inúmeros compostos de atingirem e matarem todas as células tumorais em doses consideradas terapêuticas. Isso tem motivado a busca por novos fármacos e tratamentos para esse tipo de câncer (DASSEUS & ONICIU; KING; PARK et al.; THORPE & RAN, 2007). Além disso, o fenômeno de resistência à drogas, apresentado por muitos tipos de câncer (BREDEL & ZENTNER, 2002; FODALE et al., 2011), leva à busca de novos alvos terapêuticos e compostos que possam agir aumentando a sensibilidade das células tumorais aos fármacos já utilizados (GOEL & AGGARWAL, 2010; CAMPOS-ARROYO et al., 2011). A quimioterapia convencional apresenta efeitos colaterais substanciais (náuseas, vômitos, perda de cabelo e deficiência hematopoiética, resultando em maior risco de infecção), e os agentes terapêuticos auxiliares na terapia anti-neoplásica, como fator de crescimento hematopoiético (Neupogen®) e antagonistas de receptores de serotonina (Zofran®) têm o objetivo óbvio de amenizar os efeitos colaterais, não agindo contra as células neoplásicas em si (KAUVAR et al., 1998). Fica clara, portanto, a relevância da pesquisa por novas moléculas candidatas a fármacos para o tratamento de neoplasias.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gliomas e glioblastoma

Embora o termo “glioma” seja reservado a um tipo específico de tumor de origem neuroepitelial segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) (LOUIS et al., 2007), o uso pela comunidade científica o consagrou como nome dado a qualquer tumor astrocitário, oligodendroglial, oligoastrocitário, ependimal, ou do plexo coróide (sub-classificações dos tumores neuroepiteliais) (OSBORN et al., 2011), uma vez que se originam de células da glia ou seus precursores. O estadiamento sugerido pela OMS considera a celularidade, atipia nuclear, necrose, figuras mitóticas e proliferação microvascular. Este esquema de classificação divide os tumores astrocitários, mais comuns dentre os neuroepiteliais, em 4 graus de crescente gravidade: grau I (astrocitoma pilocítico); grau II (glioma astrocitário); grau III (astrocitoma anaplástico); grau IV (glioblastoma multiforme, ou simplesmente glioblastoma), sendo este último composto de astrócitos neoplásicos pobremente diferenciados com áreas de proliferação vascular e/ou necrose (figura 2) (PHILLIPS et al., 2007).

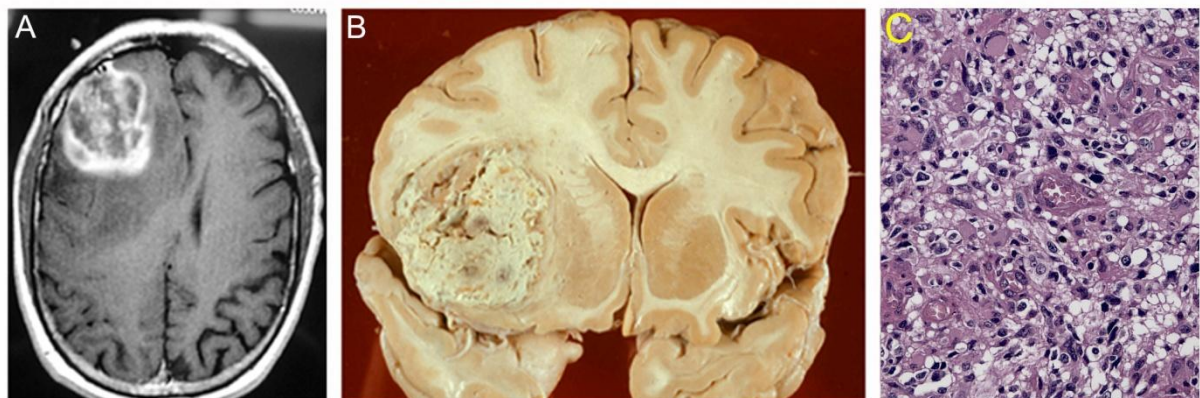


Figura 2. Aspecto do glioblastoma (glioma grau IV). A - visão do tumor por tomografia computadorizada evidenciando possíveis áreas de necrose central; B - visão macroscópica em peça retirada de paciente após óbito por glioblastoma mostrando o efeito da massa tumoral comprimindo estruturas cerebrais; C - perfil histopatológico demonstrando o alto grau de anaplasia do tumor.

FONTE: A) http://www.gfmer.ch/selected_images_v2/detail_list.php?offset=30&cat1=3&cat3=96&styp=d acessado em 21/09/2011 às 15:05 horas; B) <http://brainchemist.wordpress.com/210/11/07/studies-on-long-term-survival-with-the-glioblastoma-multiforme-gbm/> acessado em 19/09/2011 às 11:22 horas; C) arquivo próprio.

Gliomas difusos representam a forma mais comum de tumor cerebral primário, sendo o glioblastoma (GB) o tumor cerebral mais frequente em adultos (BRENNAN, 2011), com mediana de sobrevida após diagnóstico entre nove e doze meses (ALPUENTE et al., 2011). Sobrevida de cinco anos só é alcançada numa taxa de 2% a 5% dos diagnosticados com GB (FRUEHAUF et al., 2006), e apenas cerca de 35% alcançam 2 anos de sobrevida (PORTER et al., 2010). A terapia atualmente empregada em pacientes com glioma inclui ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia com agentes alquilantes, principalmente as nitrosuréis carmustina (BCNU) e lomustina (CCNU), além da temozolomida (TMZ), atualmente apontada como primeira opção terapêutica (MRUGALA & CHAMBERLAIN, 2008). No entanto, o impacto dos avanços tecnológicos, a exemplo da introdução da TMZ na terapêutica, não foi satisfatório para o prognóstico dos pacientes com esse tipo de câncer (NIYAZI et al., 2011); nos últimos trinta anos, nenhum aumento significativo na sobrevida desses pacientes foi relatado (NAKADA et al., 2007), motivando a busca por novos alvos moleculares (YAMANAKA & SAYA, 2009). Esses dados apontam a necessidade de mais pesquisas na área, que levem ao desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos ou abordagens terapêuticas mais efetivas.

Supressão da resposta imunológica antitumoral, neovascularização, resistência a estímulos apoptóticos, proliferação celular excessiva e capacidade de invasão de tecidos são algumas das características abordadas nas pesquisas no tema por contribuírem para o fenótipo maligno dos gliomas (DE OLIVEIRA et al., 2009). Além de novos fármacos (COSTA et al., 2001; ARRIETA et al., 2002; PATOLE et al., 2005; BRUYÈRE et al., 2011), também são estudados métodos alternativos de administração, transporte e distribuição de drogas dentro do cérebro (DE BOER & GAILLARD, 2007). Mas um grande desafio a ser vencido nesse campo é o fenômeno de resistência apresentado por muitos tumores, principalmente após a descoberta das células tipo tronco-tumorais que, frequentemente, são menos suscetíveis aos quimioterápicos (FU et al., 2009). TMZ a 0,5 mM, por exemplo, não foi capaz de reduzir a viabilidade de células tipo tronco de glioblastoma mesmo após 4 dias de tratamento *in vitro* (BEIER et al., 2008).

A ocorrência de resistência aos quimioterápicos tem se mostrado um dos problemas mais frustrantes no campo da oncologia (BREDEL & ZENTNER, 2002). Esta resistência pode estar ligada a diversos fatores (FODALE et al., 2011), dentre os quais um que merece atenção especial por apresentar promissores alvos terapêuticos é a expressão de enzimas de detoxificação, a exemplo da Glutation *S*-transferase (GST; EC 2.5.1.18), pelas células tumorais (DE MELO, 1991), associadas, principalmente, à resistência a agentes alquilantes

(SCHULTZ et al., 1997). Assim, é grande também a expectativa pelo desenvolvimento de novos fármacos capazes de driblar este fenômeno, ou seja, moléculas com ação quimiossensibilizante.

2.2 As GSTs e a GST- π

Glutation *S*-transferases são enzimas multifuncionais envolvidas, principalmente, com metabolismo de fase II e sistemas antioxidantes celulares, sendo, portanto, responsáveis por detoxificação e proteção de macromoléculas da ação de compostos eletrofílicos diversos, incluindo carcinógenos ambientais, e espécies reativas de oxigênio (ERO) (BAEZ et al., 1997; DI PIETRO et al., 2010). O papel antioxidante vem da capacidade que tem a enzima de promover conjugação entre radicais livres (espécies químicas com elétron desemparelhado no orbital de um de seus átomos, o que as tornam muito reativas) e o tripeptídeo glutation reduzido (GSH); já a ação detoxificante ocorre quando a conjugação se dá entre uma molécula exógena relativamente hidrofóbica e o GSH, a fim de aumentar a hidrossolubilidade e facilitar a eliminação (OAKLEY, 2011). Essas reações de conjugação consomem GSH sem reciclá-lo, o contrário do que ocorre no sistema antioxidante constituído pelas enzimas glutation peroxidase (EC 1.11.1.9) (que promove redução de peróxido de hidrogênio à água às custas da oxidação de GSH) e glutation redutase (EC 1.8.1.7) (que reduz novamente o GSSG, forma oxidada do glutation, em uma reação dependente de NADPH) (NELSON & COX, 2010). O GSH é também de fundamental importância para a manutenção das funções metabólicas e na adaptação das células de glioma às condições adversas (OGUNRINU & SONTHEIMER, 2010).

As GSTs humanas apresentam polimorfismo, inclusive na população brasileira (ALI-OSMAN et al., 1997b; MAGNO et al., 2009), e estão divididas em pelo menos sete classes (α , μ , π , σ , θ , ω e ζ) de acordo com a estrutura, gene que a codifica, reatividade imunológica e sequência de aminoácidos (HAYES et al., 2005), que estão distribuídas, em diferentes proporções, em células de muitos tecidos do organismo, incluindo as do SNC (JOHNSON et al., 1993; SAGARA & SUGITA, 2001). Atenção especial tem sido dada a estas enzimas em função de uma associação direta entre a expressão e polimorfismo destas e o fenômeno de resistência a drogas, principalmente em casos de câncer (O'BRIEN et al., 2000; GOTO et al., 2001; GOTO et al., 2002; LO & ALI-OSMAN, 2007; SAU et al., 2010). Existem evidências,

inclusive, de associação entre polimorfismo de GST e predisposição a alguns tipos de tumores (DI PIETRO et al., 2010).

Apesar de todas as classes de GST estarem, potencialmente, envolvidas no fenômeno de resistência a drogas, a isoforma comumente super-expressa em cânceres humanos é a GST- π (figura 3), também denominada GSTP, produto de gene P1-1 (SAU et al., 2010). Assim como as demais, esta isoforma admite no sítio H (região do sítio ativo em que se ligam moléculas hidrofóbicas) uma diversidade de compostos, dentre eles moléculas de fármacos (CLARK, 1989). A super-expressão de GST- π está associada com resistência a quimioterápicos em diversos tipos de tumores, tais como osteossarcoma (PASELLO et al., 2008), gliomas (FRUEHAUF et al., 2006; SINGH et al., 2010) e câncer de pulmão (WANG et al., 2001), além de relacionar-se com prognóstico negativo em câncer gástrico (WANG et al., 2007), carcinoma primário de ovário (LU et al., 2011) e também gliomas (ALI-OSMAN et al., 1997a; KAUVAR et al., 1998; OKCU et al., 2004). Na verdade, a expressão dessa isoforma da enzima em gliomas, e especificamente em glioblastomas, já foi extensivamente demonstrada (ALI-OSMAN et al., 1997a; LO & ALI-OSMAN, 1998; OKCU et al.; LO et al., 2004; CALATOZZOLO et al., 2005)

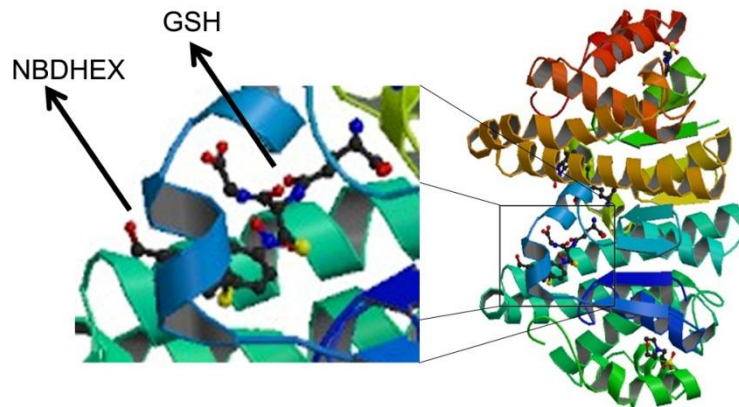


Figura 3. Estrutura tridimensional (PDB ID 3IE3) mostrando as duas subunidades formadoras da GST- π com os respectivos sítios ativos preenchidos com ligantes. No detalhe, o sítio ativo de uma das subunidades com uma molécula de GSH ocupando o sítio G, e o inibidor 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-iltio) hexanol (NBDHEX), o sítio H.

Inibição da atividade, ou da expressão, da GST- π demonstrou aumentar a sensibilidade de células tumorais a agentes quimioterápicos (SAU et al., 2010), colocando esta isoforma da enzima na posição de alvo terapêutico importante na busca de novos agentes com ação quimiossensibilizante.

2.3 GST- π como alvo terapêutico

A descoberta do relevante papel da GST- π no câncer despertou o interesse de pesquisadores que, desde então, tentam desenvolver variadas abordagens baseadas nessa enzima, como pró-fármacos ativados por ela (JOHANSSON et al., 2011) e mesmo reguladores de sua expressão (ZHAO et al., 2011), para serem implementadas terapêuticamente. Mas o fato do efeito protetor da GST estar diretamente relacionado com sua atividade catalítica, juntamente com o histórico de sucesso de uma série de fármacos que inibem atividade enzimática (MAZHAR et al., 2006; PATEL et al., 2010; EDGAR et al., 2011), apontam a busca de inibidores de GST- π como a estratégia mais plausível para o desenvolvimento de um novo fármaco.

Já há muito tempo se publicam estudos apontando o potencial dos inibidores de GST como agentes quimiossensibilizantes (HALL et al., 1989; BLADEREN & OMMEN, 1991; TEW, 1994; SCHULTZ et al., 1997; KAUVAR et al., 1998; TOWNSEND & TEW, 2003). O primeiro inibidor usado com esta finalidade foi o ácido etacrínico (AE), que apresentava as desvantagens de falta de seletividade e forte efeito diurético (DEVULDER et al., 1977). Posteriormente, a síntese de análogos de GST com auxílio de abordagens computacionais levaram ao surgimento do γ -glutamil-*S*-(benzil)cisteinil-*R*(-)-fenilglicinadietil éster (TER 199), agente quimiossensibilizante com relativa seletividade para a GST- π e sem efeitos diuréticos (LYTTLE et al., 1994), embora com parâmetros farmacocinéticos, como a baixa meia-vida, desfavoráveis para o melhor aproveitamento terapêutico desse composto (KAUVAR et al., 1998). O γ -glutamil-*S*-(benzil)cisteinil-*D*-fenilglicina (TER 117) é outro inibidor seletivo da isoforma π da GST (OAKLEY et al., 1997), mas está demonstrada também sua atividade na inibição da enzima glioxalase I (JOHANSSON et al., 2000). Já o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), também se mostrou capaz de inibir GST, mas apresentou seletividade pela isoforma α da enzima (BENBRAHIM-TALLAA et al., 2002). Ésteres de tocoferol, alguns flavonóides e derivados do 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (a exemplo do NBDHEX) também são capazes de inibir GST- π (HAAFTEN et al., 2001; VAN ZANDEN et al., 2003; VAN ZANDEN et al., 2004; RICCI et al., 2005; REYES & ZAKHARYAN, 2006), embora careçam de testes clínicos que demonstrem utilidade terapêutica.

O potencial de tratamentos baseados na modulação de GST também já está bem evidente para gliomas. Polimorfismo de GST- π foi associado, por exemplo, à maior sobrevida em pacientes com astrocitoma anaplásico, o que pode ser explicado pela menor atividade associada a um genótipo de GST- π que aumenta a eficácia da quimioterapia (KILBURN et

al., 2010). O aumento na expressão e atividade dessa enzima, promovido pelo kaempferol, também explica a resistência à cisplatina que esse flavonoide pode provocar em células tumorais (NAKATSUMA et al., 2010). A expressão de GST- π já foi associada à resistência de gliomas a drogas (FRUEHAUF et al., 2006) e prognóstico desfavorável, principalmente em casos de glioblastoma (OKCU et al., 2004; LO et al., 2004; CALATOZZOLO et al., 2005).

Embora a enzima *O*⁶-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT, EC: 2.1.1.63) seja o fator mais frequentemente associado à resistência em glioblastoma (MRUGALA et al., 2008), algumas observações experimentais sugerem que a inibição da atividade de GST aumenta a resposta de células desse tipo de tumor a agentes alquilantes de forma mais eficiente que a inibição da MGMT (JULLERAT-JEANNERET et al., 2008). Apesar de todas as evidências, a literatura atual é escassa de trabalhos que testem inibidores de GST- π como alternativa terapêutica para gliomas.

O fato é que, independentemente do tipo de câncer, as tentativas de uso de drogas que têm como alvo a GST até então não resultaram em tratamentos efetivos (MAHAJAN & ATKINS, 2005), o que faz deste um campo aberto e promissor para pesquisas que visem o desenvolvimento de novos fármacos.

2.4 Cumarinas, psoraleno e 8-metoxipsoraleno

Cumarinas constituem uma grande classe de substâncias encontradas em fungos e bactérias, mas principalmente em plantas, oriundas da fusão do benzeno com o anel α -pirona. A derivados cumarínicos são atribuídas atividades anti-inflamatória, hipoglicemiantes, anti-alérgica, hepatoprotetora, antitrombótica, antioxidante, antiviral e anticarcinogênica (KOSTOVA, 2005; ARONSON, 2009). Atividade quimiopreventiva contra câncer também já foi sugerida para essa classe (IRANSHAHI et al., 2008). A 7-hidroxicumarina foi capaz de inibir a liberação da ciclina D1, a qual é super-expressa em muitos tipos de câncer (LACY & O'KENNEDY, 2004). Além disso, está demonstrado que cumarinas anticoagulantes inibem metástase em diversos modelos animais (KOSTOVA, 2005). Devido à baixa toxicidade de muitos desses derivados cumarínicos, além da estrutura química simples, há crescente interesse em explorar combinações de cumarinas antimitóticas e agentes quimioterápicos a fim de aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade (KOSTOVA, 2005).

O psoraleno é constituído pelo núcleo cumarínico (benzopinona) com o anel furano, e seus derivados (furanocumarinas) também são alvo de muitas pesquisas (MURAKAMI et al., 2001, POLIGONE & HEALD, 2010; SCAFFIDI et al., 2011). Efeitos antiproliferativos em diversas linhagens de células tumorais humanas foram atribuídos a furanocumarinas (KIM et al., 2007), que podem interferir em diversos processos celulares, como crescimento e diferenciação (LACY & O'KENNEDY, 2004). O 8-metoxipsoraleno (8-MOP), também conhecido como xantotoxina, é um desses derivados (figura 4 A) já com aplicação clínica, com uso tópico e oral (TZANEVA et al., 2009), no tratamento de doenças de pele como eczema e psoríase (ENGIN & OGUZ, 2005).

O 8-MOP é utilizado em um conjunto de esquemas terapêuticos conhecido como terapia PUVA (psoraleno associado à radiação ultra-violeta A) (DARDALHON et al., 2007; CAO et al., 2008). Essa terapia consiste na administração oral de derivados de psoraleno com posterior ativação destes por meio de irradiação ultravioleta de comprimento de onda longo (tipo A) diretamente na pele (figura 4 B). Tal procedimento garante maior atividade do fármaco nas células da pele, embora não seja isento de efeitos adversos. A terapia PUVA, apesar de usada há mais de três décadas (HERFST & DE WOLFF, 1982), está associada, por exemplo, com aumento do risco de desenvolvimento de carcinoma de células escamosas (STERN & LAIRD, 1994).

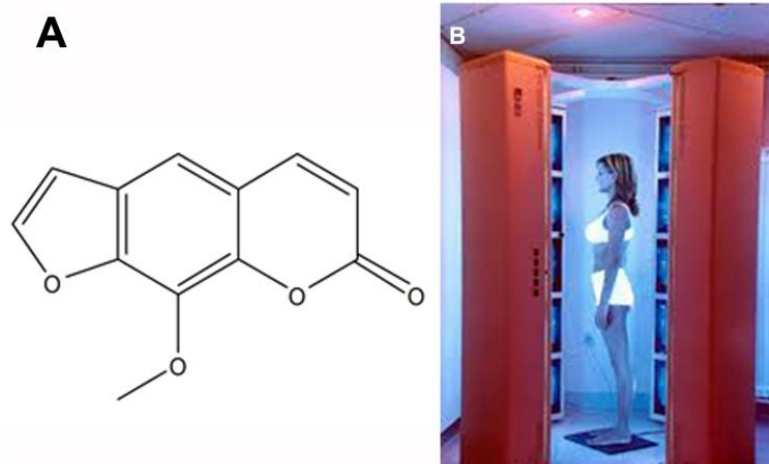


Figura 4. Estrutura do 8-MOP (A) e foto demonstrativa de cabine para terapia PUVA (B).

FONTE: <http://medicoweb.com/skin-health/puva-therapy> acessado em 23/09/2011 às 14:40h.

Apesar dos dados expostos, evidências apontam atividade de derivados de psoraleno mesmo na ausência de irradiação (RODIGHERO, 1996), o que representa um bom indício de que ainda há o que se explorar do potencial terapêutico desses compostos, uma vez que não há registro do uso de 8-MOP como agente antitumoral, embora muitos derivados da cumarina apresentem tal atividade *in vitro* (LACY & O’KENNEDY, 2004; KOSTOVA, 2005; DONNELLY et al., 2008; BELLUTI et al., 2010; DEVJI et al., 2011), dentre estes, algumas furanocumarinas (LEE et al., 2003; KIM et al., 2007).

 **OBJETIVOS****3.1 Objetivo geral**

Avaliar o potencial uso terapêutico, através de abordagens *in vitro*, do composto 8-MOP para o tratamento do câncer, especificamente de gliomas.

3.2 Objetivos específicos

a) Avaliar o potencial do 8-MOP em inibir atividade da enzima glutation *S*-transferase π e, se encontrada a atividade inibitória proposta, caracterizar o mecanismo de inibição.

b) Testar a ação quimiossensibilizante do 8-MOP frente a diferentes quimioterápicos.

c) Estudar os efeitos do tratamento com 8-MOP na viabilidade de células tumorais de glioma e comparar com os efeitos em células normais do SNC de rato.

d) Caso seja identificada morte celular nos grupos tratados, investigar o tipo de morte induzida pelo tratamento.

e) Investigar alterações nos seguintes parâmetros celulares promovidos pelo 8-MOP: morfologia, capacidade de migração, composição ultraestrutural e expressão de marcadores prognósticos, para avaliar seu potencial como protótipo de quimioterápico.

f) Testar, sob as mesmas condições, compostos quimicamente relacionados ao 8-MOP quanto à citotoxicidade em células normais e tumorais, a fim de estabelecer relações entre estrutura e atividade biológica.

METODOLOGIA

4.1 Modelos de estudo e sumário metodológico

A fim de se alcançar os objetivos propostos, dois modelos experimentais distintos foram adotados, um visando o estudo da atividade inibitória da molécula sobre a ação catalítica da GST- π , outro visando o estudo da ação antitumoral *in vitro* do mesmo composto.

No primeiro modelo a enzima purificada comercialmente adquirida (Sigma®), ou presente em lisado celular, teve sua atividade catalítica mensurada *in vitro* através do acompanhamento espectrofotométrico de uma reação por ela catalisada, a conjugação entre os substratos 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e GSH, cujo produto absorve a 340 nm (VAN HAAFTEN et al., 2001). Alterações na atividade e nos parâmetros cinéticos após adição da droga no meio reacional foram registradas e devidamente analisadas. O mecanismo de ação foi estabelecido por estudo de cinética enzimática (avaliação de atividade em diferentes condições de concentração de substrato) e com uso de técnicas de espectrofotometria e cromatografia (para identificar a formação de conjugados com GSH). A avaliação do conteúdo citoplasmático de GSH através do teste do monoclorobimano (MCB) em cultura de células tumorais também foi empregada no estudo do mecanismo de ação.

Já o segundo modelo consistiu na avaliação dos efeitos do tratamento de células em cultura com a droga. Para isso, foram utilizadas duas linhagens de células de glioma, uma murina (C6) e outra humana (GL-15) bem caracterizada (BOCCHINI et al., 1991), além de cultura primária de astroglioma de ratos Wistar como controle de células normais. A ideia de utilizar C6 e células normais do sistema nervoso central vem da tentativa de avaliar se os efeitos encontrados possuem alguma seletividade e as células de origem humana foram incluídas a fim de se averiguar se tais efeitos seriam restritos à espécie (SOLETTI et al., 2008; GERHARDT et al., 2009). Células normais do sistema nervoso central humano não foram utilizadas como controle devido a implicações técnicas e éticas da implantação de culturas desse tipo. Foram avaliadas: citotoxicidade pelo teste do MTT em diferentes condições e por dosagem de proteínas totais, atividade antiproliferativa pelo teste de exclusão do azul de Tripán (LOUIS & SIEGEL, 2011) e formação de colônia, interferências na densidade e

morfologia celular por microscopia (contraste de fase e eletrônica de varredura), modificações ultra-estruturais por microscopia eletrônica de transmissão, interferência na migração celular, interferência no ciclo celular pelo teste de incorporação do iodeto de propídio (IP) e indução de apoptose por marcação com anexina V e coloração do núcleo com agente intercalante. A expressão de proteínas foi visualizada por meio de imunomarcação e quantificada, quando necessário, por *western immunoblot* ou citometria de fluxo. Algumas moléculas estruturalmente relacionadas foram acrescentadas ao estudo em sua fase final para permitir inferências acerca da relação estrutura atividade.

4.2 Metodologia detalhada

4.2.1 Avaliação *in vitro* da atividade de GST- π

A atividade catalítica da enzima GST- π foi mensurada pelo método descrito por van Haaften e colaboradores (VAN HAAFTEN et al., 2001) com algumas modificações. Sumariamente, a reação entre os compostos CDNB e GSH catalisada pela GST (GST- π a 0,1 U/mL), em tampão de fosfato de potássio a 100 mM (pH 6,5 e 25°C) foi monitorada espectrofotometricamente através do aumento de absorbância em 340 nm, indicativo de formação do produto 2,4-dinitrofenil-S-glutation (DNP-SG, do termo em inglês), durante três minutos. Unidades de absorbância foram convertidas para concentração de DNP-SG como descrito por Mannervik e Guthenberg (MANNERVIK & GUTHENBERG, 1981). Correção para a reação espontânea de formação de DNP-SG foi feita abatendo-se a taxa de reação de formação desse produto na ausência da enzima. Para avaliação da atividade inibitória do 8-MOP, este foi adicionado ao meio reacional. O efeito do 8-MOP na formação espontânea do produto também foi descontado e o veículo deste (DMSO concentração final de 0,5% v/v) esteve presente em todos os grupos.

4.2.2 Estudos de cinética enzimática de GST- π

A atividade enzimática para concentrações de substratos iguais a 1 mM na ausência e na presença da droga em concentrações crescentes (0,025 - 0,150 mM) foi mensurada e expressa como percentual de atividade em relação ao controle (sem 8-MOP). Procedeu-se,

então, a regressão não linear dos dados, gerando a equação logarítmica com R^2 superior a 0,9 usada para o cálculo do CI_{50} (concentração que inibe em 50% a atividade enzimática nas condições adotadas). Para investigar o mecanismo de inibição foi realizado o estudo de cinética enzimática, em que a velocidade de reação de formação do conjugado DNP-SG (coeficiente angular da equação de reta que descreve a formação desse conjugado em função do tempo) foi mensurada para diferentes concentrações de CDNB, quando a concentração de GSH permaneceu fixa em 1 mM, e para diferentes concentrações de GSH, quando a concentração de CDNB permaneceu fixa também em 1 mM. Os dados foram organizados em gráficos e, considerando-se que, apesar de bi-substrato, a enzima catalisa a reação de conjugação randomicamente (SATO, 1995), submetidos à regressão não linear segundo a equação de Michaelis-Menten (1)

$$(1) \quad V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

em que V_0 representa velocidade inicial da reação catalisada pela enzima, V_{\max} velocidade máxima, S substrato e K_m uma constante cinética correspondente à concentração de substrato que conduz a enzima à catálise na metade da velocidade máxima. A partir da regressão os valores de V_{\max} e K_m aparentes foram calculados e comparados com aqueles encontrados para o mesmo experimento feito na presença de 0,1 mM de 8-MOP. Os dados foram também apresentados na forma de gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk para melhor representação gráfica do mecanismo de inibição. Cinco experimentos independentes foram realizados para garantir que o padrão de inibição é reprodutível.

4.2.3 Espectrofotometria na região do Ultravioleta/visível

Os espectros de absorção das soluções contendo CDNB com GSH ou 8-MOP com GSH na presença e na ausência de GST- π foram feitos com auxílio de um espectrofotômetro aberto UV-Vis HP®, modelo 8452. Foram usadas cubetas de quartzo de 1cm de caminho óptico. As medidas foram gravadas para análise comparativa e confecção dos gráficos. Três experimentos independentes foram efetuados.

4.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise cromatográfica dos compostos CDNB, 8-MOP e produtos da reação destes com GSH (catalisada por GST- π) foram efetuadas por CLAE de acordo com descrições prévias na literatura especializada (WANG & JIANG, 2006; VAIDYA & GERK, 2007) com pequenas alterações. O sistema de separações Alliance[®] HPLC 2695, com dupla detecção simultânea por absorção UV-Vis foi usado nos testes. Os dados foram coletados e analisados pelo software *Empower 2 chromatography* (Waters[®]). Ambas as análises (CDNB/GSH e 8-MOP/GSH) foram feitas em fase reversa, utilizando-se uma coluna C18 com 3,9 x 150 mm x 5 μ m (XTerra MS - Waters[®]) e uma pré-coluna de 3,9 x 20 mm (C18, XTerra MS – Waters). As amostras foram filtradas por membranas de celulose (0,45 μ m) antes da injeção no cromatógrafo e a temperatura das colunas foi mantida em 25°C durante todo o processo. Para a análise das soluções contendo CDNB, uma mistura de ácido acético a 1% e acetonitrila (80:20 v/v) foi usada como fase móvel, com um fluxo de 1 mL/min e a detecção foi feita simultaneamente em 280 e 340 nm. Já a análise das soluções contendo 8-MOP foi feita em esquema de gradiente de eluição (tabela 1) também com fluxo de 1 mL/min e a detecção feita simultaneamente em 248 e 301 nm.

TEMPO	ACN (%)	MeOH (%)	H2O (%)
0	5	15	80
2	5	30	65
3	5	70	25
6	5	15	80

Tabela 1. Gradiente de eluição para análise cromatográfica por CLAE das soluções contendo 8-MOP. O tempo (em minutos) indica o momento em que houve cada troca de eluente. ACN: acetonitrila, MeOH: metanol, H2O: água ultra-pura.

4.2.5 Cálculo do valor teórico de logP

As estruturas químicas foram desenhadas em 2D e convertidas para 3D usando o pacote Chemoffice[®] versão 10.0. Os valores teóricos de coeficiente de partição n-octanol/água (logP) foram calculados com auxílio da ferramenta on-line *logP Calculator*, disponível no site da Universidade de Massachusetts (*University of Massachusetts Boston General Biology*) através do endereço eletrônico <http://intro.bio.umb.edu/111->

112/OLLM/111F98/newclogp.html. Para os cálculos, o método *weighted* foi escolhido e as seguintes condições admitidas: $[Cl^-] = [Na^+] = [K^+] = 0.1 \text{ mol/dm}^3$. O logD (taxa de equilíbrio das concentrações de todas as espécies de uma molécula em n-octanol comparada às mesmas espécies na fase aquosa) também foi calculado para conjugados com GSH em seus respectivos pontos isoelétricos.

4.2.6 Cultura de células tumorais

Células da linhagem C6 de glioma de rato e GL-15 de glioblastoma humano foram cultivadas em placas plásticas de 10 cm de diâmetro, específicas para esse fim, a 37°C em meio de Eagle modificado por Dubelcco (DMEM) suplementado com ácido pirúvico (1mM), L-(+)-glutamina (2mM), NaHCO_3 (44mM), 10 % (v/v) de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$), em atmosfera úmida com 5% de CO_2 . O meio de cultura foi trocado a cada dois dias. Para os testes, as células foram tripsinizadas e semeadas em placas de 96 ou 24 poços ou 35mm de diâmetro, de acordo com o teste a ser realizado (oportunamente descrito), com densidade e confluência variável, também a depender do objetivo do teste. Todas as células, estocadas em nitrogênio líquido até o momento do lançamento em placa, foram usadas no máximo até a sexta passagem, as que atingiram passagens superiores foram descartadas, a fim de garantir a homogeneidade dos grupos e máxima reprodutibilidade dos resultados.

4.2.7 Cultura primária de astrócitos

Culturas primárias de astrócitos de rato foram feitas de acordo com o método descrito por Cookson e Pentreath (COOKSON & PENTREATH, 1994), com as modificações introduzidas pela equipe do Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq) da Universidade Federal da Bahia - UFBA (SILVA et al., 2008). Fêmeas de ratos wistar foram coletadas no biotério do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da UFBA, no máximo 24 horas após o nascimento e, depois de sacrificadas, tiveram removidos os hemisférios cerebrais em condições estéreis. Após a remoção das meninges e dissecação do material, as células foram cultivadas nas mesmas condições das células tumorais. No dia seguinte ao do estabelecimento da cultura, as células da microglia foram

excluídas por meio de agitação mecânica da placa de cultura, tal procedimento garante uma cultura com alto percentual de células astrocíticas, embora não garanta a pureza em relação à contaminação com células da microglia, o que não representou um inconveniente uma vez que as culturas primárias foram utilizadas unicamente como controle de células cerebrais normais para a ação da droga. De qualquer forma, tais células normais foram nomeadas, por conveniência, de “astrócitos” ao longo de todo o trabalho. As culturas foram mantidas em estufa, com 5% de CO₂ e a 37°C até completa diferenciação e confluência da placa (cerca de duas semanas), quando então foram tripsinizadas e lançadas em placas de 24 ou 96 poços ou de 3,5 mm de diâmetro, com as quais foram efetuados os testes.

4.2.8 Dosagem de proteínas totais

A quantidade de proteínas totais foi medida com três diferentes finalidades: avaliar a celularidade após tratamento com a droga, padronizar a quantidade de proteínas a serem depositadas no gel para eletroforese, quando foi o caso, e expressar corretamente atividade enzimática em cada tipo celular. No primeiro caso, os extratos de proteínas foram feitos por adição de tampão de lise específico (SDS 2% (p/v), EGTA a 2 mM, uréia a 4 M, Triton X-100 0,5% (v/v), e tampão Tris-HCl a 62,5 mM (pH 6.8), suplementado com 0,1% de inibidor de protease - *Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma®) nas placas lavadas com PBS. Nos outros casos o tampão de lise usado foi simplesmente solução de hidróxido de sódio 1N (20 minutos de incubação). A dosagem de proteínas foi feita por meio de utilização de kit específico baseado no método de Lowry e colaboradores (LOWRY et al., 1951) segundo instruções do fabricante (*DC protein assay reagent kit*; Bio-Rad®, Hercules, CA, USA).

4.2.9 Avaliação da atividade de GST celular

A atividade enzimática total de GST celular foi feita segundo os mesmos princípios expostos no item 4.2.1. Um lisado de células tumorais (GL-15) foi preparado a partir de culturas confluentes por adição de 1,5 mL de água destilada ultra-pura seguida de vigorosa agitação por trinta minutos e centrifugação a 5000 g por dez minutos. O sobrenadante foi coletado e congelado a -70°C até o uso. Para os testes de atividade esse lisado (0,15 mL para 1 mL de solução final) substituiu a adição da enzima purificada. A quantidade total de

proteínas foi medida com kit específico (*DC protein assay*, Bio-Rad®, Hercules CA EUA) segundo instruções do fabricante e a atividade enzimática então calculada como unidades de absorvância/seg/mg de proteínas, e expressa como percentual do grupo controle. O teste foi feito na presença de concentrações crescentes de 8-MOP e o veículo (0,5 % de DMSO) esteve presente em todos os grupos.

4.2.10 Imunocitoquímica

A expressão das proteínas GFAP, vimentina, nestina e GST- π nas células foi avaliada através de imunocitoquímica. Para tal, as células em cultura foram permeabilizadas em metanol a -20°C por dez minutos, bloqueadas com solução de ASB a 2% por dez minutos, lavadas com PBS e incubadas com a solução de anticorpo primário (tabela 2) por uma hora sob leve agitação. Depois disso, foram novamente lavadas com PBS por três vezes e incubadas com anticorpo secundário específico (tabela 2) por doze horas, no escuro. Por fim, foram novamente lavadas e observadas por microscopia de fluorescência usando-se um microscópio Olympus® modelo AX70, com filtro adequado (tabela 2). Os núcleos foram corados com o agente intercalante Hoechst 33258 (incubação no escuro com solução de Hoechst 33258 a $2,5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS por cinco minutos seguida de tripla lavagem com PBS) e observados no mesmo microscópio com filtro ultravioleta (ex/em 340/510 nm). Imagens foram capturadas através de sistema de câmera digital acoplada ao microscópio (*CoolSNAP-Pro cf color camera* – Cybernetics®) e software específico (*Image-Pro Discovery 4.5.1.29* - Cybernetics®). O tempo de exposição foi mantido constante para todas as imagens do mesmo marcador e determinado por comparação com controles negativos (células incubadas apenas com os anticorpos secundários).

Anticorpo primário	Fabricante	Diluição (primário)	Anticorpo secundário	Diluição (secundário)	Filtro
rabbit polyclonal IgG anti GFAP	Santa Cruz®	1:400	Conjugated Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit IgG – Invitrogen®	1:400	Verde
rabbit polyclonal IgG anti nestin	Santa Cruz®	1:500	Conjugated Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit IgG – Invitrogen®	1:400	Verde
mouse polyclonal IgG anti vimentin	Santa Cruz®	1:400	Conjugated Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG – Invitrogen®	1:500	Vermelho
rabbit polyclonal IgG anti GSTP1/2	Santa Cruz®	1:500	Conjugated Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit IgG – Invitrogen®	1:400	Verde

Tabela 2. Anticorpos utilizados para marcações imunocitoquímicas

4.2.11 Teste do monoclorobimano para avaliação de depleção de GSH

A avaliação do conteúdo de GSH intracelular foi feita através da reação com monoclorobimano (MCB), reagente que atravessa livremente a membrana plasmática íntegra e sofre conjugação com GSH catalisada por diversas isoformas de GST, dando origem a um conjugado fluorescente quando irradiado com luz ultravioleta. Para o teste, após tratamento por trinta minutos com 8-MOP ou CDNB, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com 400 µL de meio contendo 1 mM de MCB, durante 40 minutos. Após o período de incubação, as células foram novamente lavadas com PBS sendo cobertas com lamínulas usando glicerina 80 % como líquido de montagem. As placas foram então observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX 51 - URA2, San Jose, USA. Faixa de excitação: 330-385 nm; faixa de emissão: 420 nm) e as imagens capturadas com uma câmera Olympus BX-2 adaptada ao microscópio com sessenta milissegundos de exposição. A intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de GSH presente.

4.2.12 Avaliação da viabilidade celular pelo teste do MTT

A viabilidade celular foi mensurada através do método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). O teste baseia-se na capacidade que têm as células viáveis de metabolizar, através das desidrogenases mitocondriais, o MTT, de coloração amarela, em um produto (formazan) de coloração purpúrea (MOSMANN, 1983). A técnica foi realizada em placas de 96 poços. As células foram lançadas com densidade de 31 x

10^3 cell/cm² nas placas e depois de 72 horas (para testes em placa confluyente) ou 24 horas (para testes em placa sub-confluentes) submetidas aos tratamentos de interesse, por tempo determinado. Depois disso o meio de cultura foi trocado e o MTT, dissolvido em tampão fosfato (PBS), adicionado em cada poço (1 mg/mL). Após duas horas de incubação, as células foram lisadas pela adição de 100 µL de duodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% (p/v) em dimetilformamida a 50% (v/v). Para quantificação da viabilidade, a placa foi submetida a espectrofotometria e a absorbância medida em um comprimento de onda de 595 nm, usando um leitor de microplacas (THERMO PLATE®, modelo *TP-reader* – tipo B). Um poço contendo meio de cultura e MTT, porém sem células, foi usado como branco, e o valor de absorbância deste foi descontado de todos os outros. Todos os experimentos constaram de um grupo controle em que as células foram tratadas apenas com os veículos das substâncias testadas. Altos valores de absorbância, indicando presença de formazan, foram relacionados positivamente a elevada viabilidade. Os dados foram expressos relativamente como percentual do grupo controle sem tratamento, cuja média, ou mediana (a depender da distribuição dos dados), corresponde a 100% de viabilidade, e foram submetidos às análises estatísticas adequadas, incluindo cálculo de CI₅₀ por regressão não linear, quando foi o caso.

4.2.13 Microscopia de contraste de fase

Todas as culturas foram acompanhadas com microscopia de contraste de fase, que também foi usada para avaliação de celularidade (densidade celular na cultura) e morfologia celular. Imagens foram adquiridas através de câmera digital de alta resolução (SNOY® Cyber-shot 12.2 mp) acoplada ao microscópio invertido. Uma régua micrométrica foi fotografada em mesmo aumento para confecção da barra de escala das fotomicrografias.

4.2.14 Teste de exclusão do corante azul de Tripán

A contagem de células em suspensão pode ser usada como método direto de avaliação de proliferação. Para isso, o corante azul de Tripán foi utilizado a fim de distinguir células viáveis das não viáveis (estas últimas se coram de azul na presença do corante por apresentarem lesões na membrana plasmática). Nos experimentos, células foram cultivadas em placas de 3,5 cm de diâmetro e tratadas com 8-MOP a 0,4 mM por 48 horas ou a 0,02 mM

a cada dois dias, por dez dias (no ensaio de longa duração com culturas com baixa densidade celular, n=5) ou ainda com DMSO 0,5%, v/v (controle). Depois dos tratamentos, o meio de cultura foi coletado e as células removidas por tripsinização (incubação com solução de tripsina a 0,05% em PBS com EDTA a 20% por cinco minutos). Então as células foram centrifugadas, juntamente com o sobrenadante, a 600 g por oito minutos. O sedimento foi ressuspensionado em volume conhecido de PBS no qual foi adicionado o corante para uma diluição final de 0,05%. Dez minutos depois a contagem foi realizada com auxílio de hemocitômetro segundo instruções do fabricante (Optik Labor Frischknecht – Hauptstrasse, Balgach). No caso dos experimentos de longa duração (dez dias de tratamento), uma vez que a quantidade de células não viáveis variou entre os grupos tratado e controle, o percentual de inibição de proliferação foi calculado seguindo a equação 2

$$(2) \quad \{ \Delta V_c - [\Delta V_t + (N_t - N_c)] / \Delta V_c \} 100$$

em que ΔV_c = variação no número de células viáveis no controle entre o primeiro e o décimo dia; ΔV_t = variação no número de células tratadas entre o primeiro e o décimo dia; N_t = células não viáveis tratadas no décimo dia e N_c = células não viáveis no controle no décimo dia.

4.2.15 Avaliação do tipo de morte celular

Após os tratamentos, as células cultivadas em placas de Petri (35 mm de diâmetro) foram tripsinizadas e centrifugadas (1000g por 3 minutos) juntamente com o sobrenadante. Após a centrifugação, as células foram ressuspensionadas em 300 μ L de PBS e incubadas, durante 15 minutos, com anexina V-FITC e iodeto de propídio (IP) de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante (Annexin-V FITC-Kit, BioSource, Camarillo, E. U. A). A anexina V é uma proteína com propriedades de ligação à fosfatidilserina. Em células normais a fosfatidilserina está localizada na região interna da membrana plasmática. Durante o processo de apoptose a fosfatidilserina é translocada para a região externa da membrana, ficando exposta a marcadores celulares como a anexina-V. Entretanto, recomenda-se a utilização de IP, que marca as células necrosadas, ou em estágio tardio de apoptose, permitindo a diferenciação dos dois processos. As células não-apoptóticas não são marcadas nem por anexina-V, nem por IP. A análise quantitativa foi efetuada através de citometria de

fluxo, com auxílio do *software Cell quest 3.1f* para FACSort (Becton Dickinson San Jose, E. U. A.). Foram usados para as análises os detectores FL-1 para aquisições dos dados correspondentes à marcação com anexina V e o FL-2 para IP.

4.2.16 Visualização de condensação e/ou fragmentação nuclear

Condensação e fragmentação dos núcleos foram evidenciadas através de observação em microscopia de fluorescência (microscópio Olympus® modelo AX70) com filtro ultravioleta (340 nm) após coloração com o agente intercalante Hoechst 33258. As culturas foram submetidas aos tratamentos de interesse e depois fixadas com metanol a -20°C por 30 minutos, lavadas com PBS por três vezes à temperatura ambiente, incubadas, ao abrigo da luz, com solução de Hoechst 33258 a 2,5 µg/mL em PBS por cinco minutos, e novamente lavadas três vezes com PBS antes de serem levadas para análise no microscópio. Imagens foram capturadas através de sistema de câmera digital acoplada ao microscópio (*CoolSNAP-Pro cf color câmera – Cybernetics®*) e *software* específico (*Image-Pro Discovery 4.5.1.29 – Cybernetics®*). O tempo de exposição foi mantido constante para todas as imagens e foram considerados condensados os núcleos que apresentavam mais de uma tonalidade de azul após regulagem de contraste para 90%.

4.2.17 Teste de ciclo celular

O percentual de células em cada fase do ciclo celular foi estimado a partir da leitura, por citometria de fluxo, da intensidade de fluorescência das células, permeabilizadas, após incubação com IP. Para isso, as células, após os tratamentos de interesse, foram tripsinizadas, suspensas em etanol a -20°C, no qual permaneceram por uma hora para permeabilização; depois foram tratadas com RNase (0,001 U/mL em PBS) por uma hora para degradação do RNA e, em seguida, incubadas com solução de IP de acordo com instruções do fabricante (Annexin-V FITC-Kit, BioSource, Camarillo, E. U. A) e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados foram expostos na forma de histograma com a intensidade de fluorescência (que é proporcional ao conteúdo de DNA, que, por sua vez, varia com a fase do ciclo) na abscissa. Foram testadas exposições por diferentes períodos de tempo e diferentes concentrações.

4.2.18 Teste de formação de colônia

Para o teste de formação de colônias, placas de 24 poços foram usadas. Cada poço recebeu, inicialmente, uma camada basal de meio de cultura sólido (0,2 mL contendo 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão), uma intermediária semi-sólida (0,2 mL contendo agarose de baixo ponto de fusão a 0,35%) na qual se dispersavam as células (400 por poço), adicionadas quando o meio atingia 38°C, e uma terceira camada apenas de meio líquido contendo a droga nas concentrações escolhidas ou o veículo. A camada líquida foi repostada a cada dois dias, sempre contendo droga ou veículo, até se completar o período de duas semanas (devido ao maior período de exposição, o DMSO foi usado a 0,001%), quando as colônias foram coradas por incubação por 30 minutos com solução de violeta de genciana a 10% para observação em microscópio óptico. A aquisição de imagens foi feita com uma máquina fotográfica de alta resolução acoplada ao microscópio. O número de colônias foi contado varrendo-se toda a extensão do poço sob o microscópio e o diâmetro médio foi calculado medindo-se, através de comparação com régua milimétrica fotografada em mesmo aumento, o diâmetro máximo e o perpendicular de cada colônia e calculando-se a média entre estas duas medidas. Um total de dez campos aleatórios de cada um dos seis poços de cada grupo foi fotografado para este procedimento.

4.2.19 Microscopia eletrônica de varredura

As culturas, feitas sobre lamínulas tratadas com poli-L-lisina em placas de 24 poços, foram submetidas aos tratamentos de interesse por tempo determinado pelo desenho experimental. As células foram então fixadas em glutaraldeído 2,5%, formaldeído 4% e tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4, sob refrigeração, por 24 horas, depois das quais foram lavadas com o mesmo tampão cacodilato de sódio (3 banhos de 5 minutos) seguido de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, por 30 minutos à temperatura ambiente. Depois de mais três lavagens com tampão cacodilato, o material foi submetido à desidratação por lavagens sucessivas com etanol em percentual crescente em água, finalizando o processo com etanol puro, foi então submetido à secagem por ponto crítico, metalização em ouro (20 nm), montagem em *STUBS* e observados em microscópio eletrônica de varredura JSM 6390 LV Low Vacuum - JEOL (EUA).

4.2.20 Microscopia eletrônica de transmissão

As culturas, em placas de 3,5 cm de diâmetro, foram submetidas aos tratamentos de interesse por tempo determinado pelo desenho experimental. As células foram então tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em glutaraldeído 2,5%, formaldeído 4% e tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4, sob refrigeração, para fixação por 24 horas, depois das quais foram lavadas com o mesmo tampão cacodilato de sódio (3 banhos de 5 minutos) seguido de tetróxido de ósmio 1% + ferricianeto de potássio 0,8% + cloreto de cálcio 5mM em tampão cacodilato de sódio 0,1M, por uma hora à temperatura ambiente. Depois de mais três lavagens com tampão cacodilato, o material foi submetido à desidratação por lavagens sucessivas com acetona em percentual crescente em água, finalizando o processo com acetona pura. Cada etapa foi sucedida de centrifugação para que não houvesse perda de células. As etapas seguintes foram: substituição gradual da acetona por resina polybed (overnight, à temperatura ambiente), impregnação com resina pura por 8 horas, também à temperatura ambiente, e emblocamento em molde específico identificado por três dias à 60°C. Foram então feitos cortes ultrafinos (em ultra-micrótomo) das amostras para observação em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM109 e as imagens foram adquiridas através do *software Soft Imaging Viewer* (Soft Imaging System GmbH, Olympus, Hamburgo, Alemanha).

4.2.21 Quantificação da expressão de proteínas

A expressão de GFAP foi analisada através da técnica de *western immunoblot*. Para isso, os extratos proteicos das culturas de astrócitos conseguidos para dosagem de proteínas totais (item 5.2.9) foram submetidos a eletroforese (200V por 45 minutos em gel de SDS-poliacrilamida 12%). As proteínas retidas nos géis foram então transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF, Immobilon-P, Millipore) empregando-se uma diferença de potencial de 100 V por 1 hora. As membranas foram bloqueadas com tampão Tris-salino (Tris HCl 2mM, NaCl 15mM, pH 7,5) com 0,05% (v/v) de Tween 20 (TBS-T) contendo 5% de leite em pó desnatado por 1 hora, incubadas com os anticorpos primários de interesse (Tabela 2, anti-GFAP, diluição: 1:1000) por 1 hora, lavadas três vezes com TBS-T, incubadas com os anticorpos secundários (Tabela 2, diluição de 1:5000) por 45 minutos e, finalmente, reveladas com Kit específico (BioRad) segundo especificações do fabricante. A mesma

quantidade de proteína da cada grupo foi submetida a eletroforese, o que foi confirmado com coloração das membranas com Ponceau red (Sigma). A quantificação foi efetuada por meio de análise densitométrica com auxílio do software ImageJ 1.33u (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). A análise da mudança na expressão de vimentina, por sua vez, foi avaliada por citometria de fluxo. Para tal, as células, após tratamento de interesse, foram tripsinizadas, permeabilizadas em metanol a -20°C por dez minutos, bloqueadas com solução de ASB a 2% por dez minutos, lavadas com PBS e incubadas com a solução de anticorpo primário (tabela 2, anti-vimentina) por uma hora sob leve agitação. Depois disso, foram novamente lavadas com PBS por três vezes e incubadas com anticorpo secundário específico (tabela 2) por doze horas, no escuro. Por fim, foram novamente lavadas e a suspensão em PBS levada para o citômetro para quantificação. Cada etapa descrita acima, como as lavagens consecutivas, foram sucedidas de centrifugação para recuperação da amostra. Os dados foram expressos em histograma no qual o deslocamento horizontal no eixo das abscissas (logarítmico) representa aumento na intensidade da marcação.

4.2.22 Teste de migração

Para o teste de migração as células tumorais foram cultivadas, nas mesmas condições já expostas, em placas de 24 poços. As culturas foram acompanhadas até entrarem em confluência, quando o SFB foi retirado para impedir a proliferação; 24 horas depois uma lesão linear na região central da monocamada de células foi feita com auxílio de ponteira plástica estéril (para 200 μL). Os poços foram então divididos em grupos controles (tratados com meio apenas ou com DMSO a 0,5%) e grupo tratado (8-MOP a 0,4 mM). A ocupação da região lesionada pelas células foi monitorada por microscopia de contraste de fase até o surgimento dos primeiros sinais de citotoxicidade, quando o experimento foi interrompido. Imagens foram adquiridas conforme explicado no item 4.2.13 e submetidas à análise qualitativa.

4.2.23 Análise estatística dos dados

Todos os dados gerados receberam tratamento estatístico adequado, sendo expressos como média e erro médio padrão, ou mediana e percentil. A escolha da medida de tendência

central e das medidas de dispersão foi feita de acordo com a distribuição dos dados em um histograma de frequência. Como o número amostral não foi superior a 20 em nenhum dos testes, a distribuição foi considerada normal se satisfizesse as seguintes condições: Apresentar assimetria no intervalo entre -1 e +1 e curtose no intervalo entre -2 e +2; e considerada não normal se satisfizesse as seguintes condições: Não passar em qualquer dos testes de normalidade (teste de Shapiro-Wilk ou teste de D'Agostino e Pearson) ou apresentar assimetria ou curtose fora dos intervalos citados.

Para conjuntos de dados representados por média (portanto, com distribuição normal), testes estatísticos paramétricos foram usados nas comparações entre grupos tratados e controles, enquanto testes não paramétricos foram usados para aqueles representados por mediana (com distribuição não-normal). O teste usado para cada análise está especificado na apresentação dos resultados; os mais utilizados foram os paramétricos *t de Student não pareado* para análise binária, *One-Way ANOVA* (seguido do teste de Dunnett) para múltipla comparação com apenas um parâmetro variável e *Two-Way ANOVA* (seguido do teste de Bonferroni) para múltipla comparação com dois parâmetros variáveis, e os não paramétricos de *Mann-Whitney* para análise binária ou de *Kruskal-Wallis* (seguido do teste de Dunns) para múltipla comparação.

O software *GraphPad Prism*, versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA) foi utilizado nas análises.

Regressões não lineares, como a utilizada para cálculo de CI_{50} , foram feitas utilizando-se modelos de equação logarítmica da biblioteca do programa e só foram consideradas para efeito de cálculos quando o coeficiente de regressão (R^2) foi superior a 0,9.

Os valores de p adotados como estatisticamente significantes nas análises foram aqueles superiores a 0,05.

5 RESULTADOS

A primeira abordagem experimental adotada consistiu simplesmente em avaliar a atividade enzimática da GST- π humana purificada através do monitoramento da reação entre seus substratos GSH e CDNB, de modo a estudar o efeito do 8-MOP sobre tal atividade. Os testes demonstraram claramente a ação inibitória do 8-MOP (figura 5A). O efeito foi concentração-dependente e apontou um valor de CI_{50} de 0,092 mM, calculado através de regressão não-linear dos dados provenientes de experimentos com concentrações crescentes de 8-MOP (entre 0,025 e 0,150 mM) expressas na forma de logaritmo das mesmas afim de facilitar os cálculos de regressão, efetuados a partir da equação 3

$$(3) \quad A = \{137,97/[1+10^{(3,734\text{Log}C-8,136386)}]\}-69,72 \quad (R^2=0,9238)$$

na qual A corresponde à atividade enzimática (em percentual do controle) e C à concentração de 8-MOP (figura 5B).

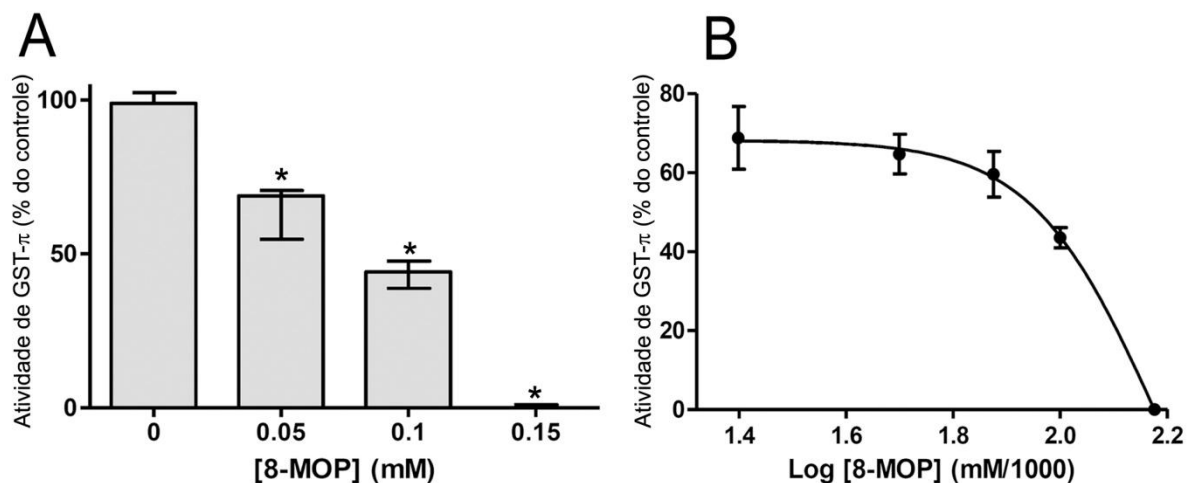


Figura 5. Demonstração da ação inibitória de GST- π do 8-MOP. A - Inibição concentração-dependente da atividade da enzima por 8-MOP mensurada através medida espectrofotométrica da formação do conjugado DNP-SG. $p = 0,0153$ (teste de Kruskal-wallis) * = $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (teste de Dunns; $n=3$). B - Regressão não linear ($R^2 = 0,9238$) usada para calcular o valor da CI_{50} (0,092 mM). Os dados estão expressos em percentual da atividade enzimática (velocidade de formação do produto) no controle, que foi de 11,49 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$.

Para obter informações a respeito da natureza da inibição promovida pelo 8-MOP foi efetuado o estudo de cinética enzimática através da mensuração da atividade de GST- π em concentrações variáveis de substratos na presença e na ausência do inibidor. Quando o CDNB foi o substrato variável, o 8-MOP não promoveu modificação significativa no valor de V_{max} aparente, mas aumentou significativamente, de 0,30 para 0,68 mM, o valor de K_m aparente (figura 6A), fazendo as retas que representam o comportamento da enzima com e sem inibidor se cruzarem no eixo das ordenadas do gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk (figura 6B), o que caracteriza uma inibição do tipo competitiva.

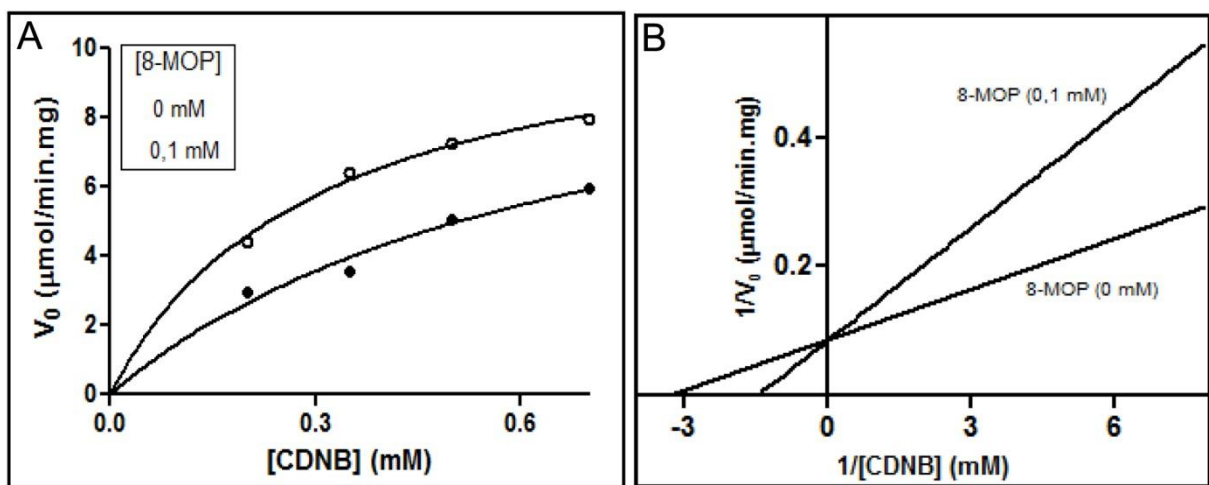


Figura 6. Avaliação de cinética enzimática para GST- π (0,1 U/mL) com GSH como substrato de concentração fixa (1 mM) e CDNB como substrato de concentração variável, na ausência e presença de 0,1 mM de 8-MOP. Os dados foram submetidos à regressão segundo a equação de Michaelis-Mentem ($R^2 = 0,9874$ na ausência e 0,9545 na presença de 8-MOP) (A) para cálculo dos valores de K_m e V_{max} ($0,30 \pm 0,05$ mM e $11,58 \pm 0,77$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, respectivamente, na ausência de 8-MOP e $0,68 \pm 0,04$ mM e $11,71 \pm 3,10$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, respectivamente, na presença da droga). A comparação dos valores indica uma inibição do tipo reversível competitiva, que pode ser facilmente visualizada no gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk (B). Os gráficos representam cinco experimentos individuais.

No entanto, quando o substrato variável foi o GSH, o 8-MOP foi capaz de diminuir significativamente tanto o valor de K_m aparente, de 0,25 para 0,09 mM, quanto o da V_{max} aparente, de 11,36 para 4,70 (figura 7A). No gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk, as retas que representam o comportamento da enzima com e sem inibidor apresentam-se aproximadamente paralelas (figura 7B), o que caracteriza uma inibição do tipo incompetitiva.

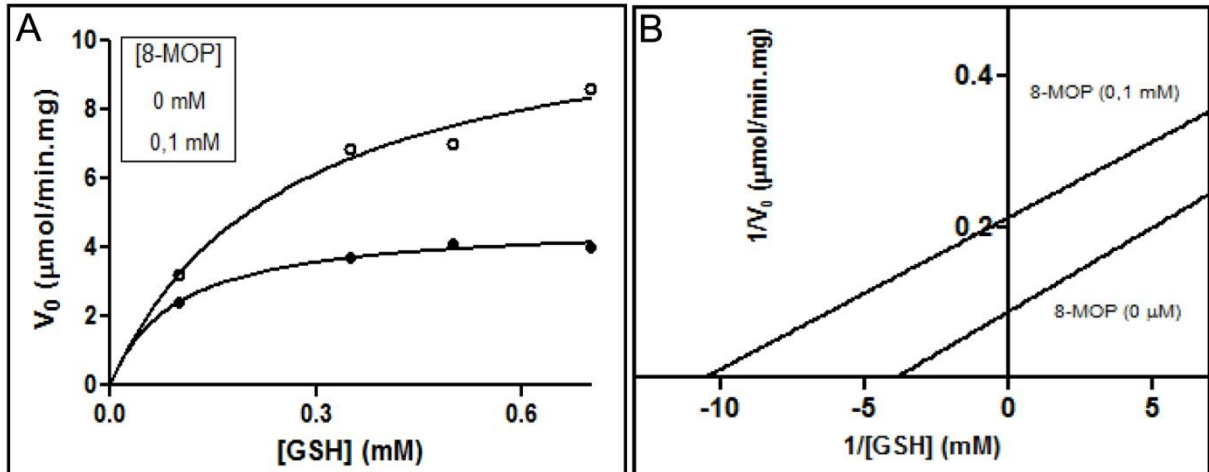


Figura 7. Avaliação de cinética enzimática para GST- π (0,1 U/mL) com CDNB como substrato de concentração fixa (1 mM) e GSH como substrato de concentração variável, na ausência e presença de 0,1 mM de 8-MOP. Os dados foram submetidos à regressão segundo a equação de Michaelis-Menten ($R^2 = 0,9733$ na ausência e $0,9736$ na presença de 8-MOP) (A) para cálculo dos valores de K_m e V_{max} ($0,25 \pm 0,08$ mM e $11,36 \pm 1,31$ $\mu\text{mol}/\text{min.mg}$, respectivamente, na ausência de 8-MOP e $0,09 \pm 0,02$ mM e $4,7 \pm 0,21$ $\mu\text{mol}/\text{min.mg}$, respectivamente, na presença da droga). A comparação dos valores indica uma inibição do tipo reversível incompetitiva, que pode ser facilmente visualizada no gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk (B). Os gráficos representam cinco experimentos individuais.

Assim, é possível afirmar que o 8-MOP age como inibidor competitivo da GST- π , ligando-se na mesma região do sítio ativo da enzima onde se ligam também os substratos hidrofóbicos (sítio H), como o CDNB, e deixando livre o sítio para ligação do GSH (sítio G). Diante dessa constatação, é preciso considerar a possibilidade de que o 8-MOP seja ele próprio um substrato para a enzima, com maior afinidade que o CDNB (figura 8). Se essa hipótese fosse confirmada, o 8-MOP ainda teria potencial uso como inibidor, mas teria sua potência reduzida uma vez que seria consumido na formação de um conjugado com GSH através de reação catalisada pela GST- π . Ainda se esta hipótese fosse verdadeira, seria possível detectar a formação de tal conjugado; dessa forma, uma maneira de investigar se o 8-MOP age como substrato ou exclusivamente como inibidor da enzima seria o estudo da formação do suposto conjugado entre este e o GSH. Tal produto hipotético será aqui chamado de 8-MOP-SG, por analogia ao conjugado formado entre GSH e CDBN (DNP-SG).

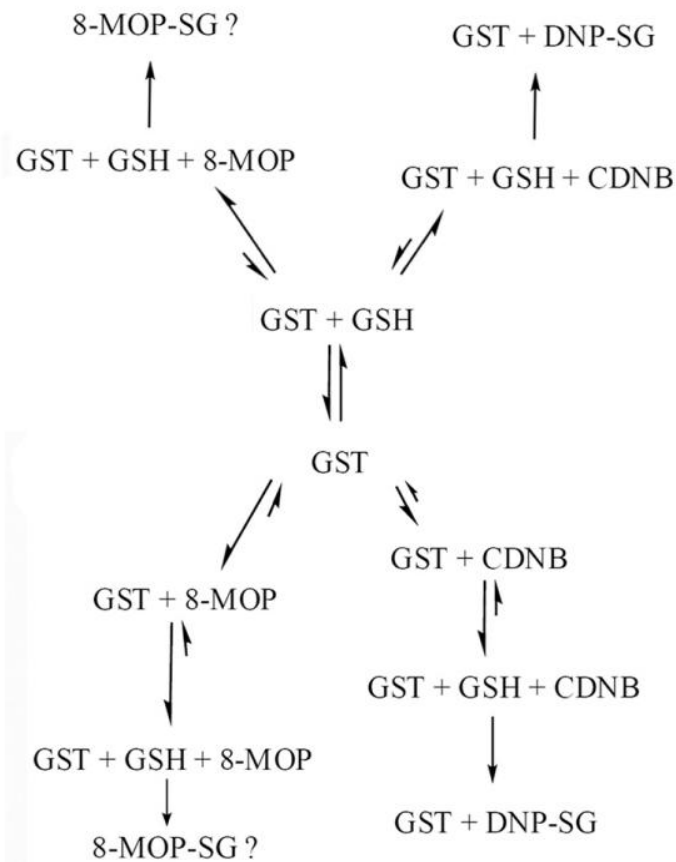


Figura 8. Esquema de dinâmica de reações proposto para explicar o mecanismo de inibição da GST- π pelo 8-MOP. Segundo o esquema, pode ou não haver formação de um conjugado entre 8-MOP e o GSH, pois se o 8-MOP for substrato para a enzima, se comportaria como inibidor competitivo.

O grupo funcional reativo do GSH é o grupo sulfidríla ($-SH$), que reage com carbonos β segundo o mecanismo de adição de Michael (figura 9). Assim, o sistema de ligações duplas conjugadas que se estende também ao anel furano seria comprometido com a reação com GSH, ainda que a reação ocorresse em qualquer outro ponto da molécula que não o carbono β . Esta modificação estrutural promovida pela reação com GSH mudaria o perfil de absorção de energia do 8-MOP (CLAYDEN et al., 2008), que absorve bem na região do ultravioleta justamente devido ao sistema conjugado.

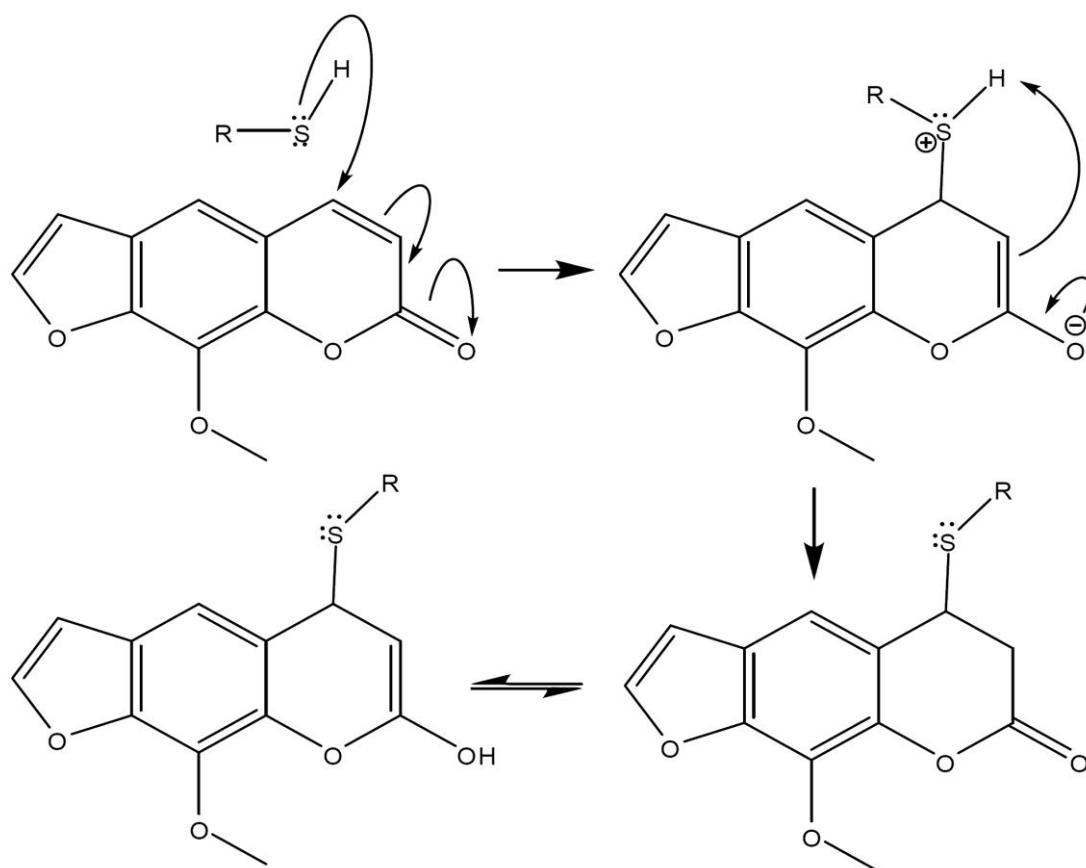


Figura 9. Mecanismo de reação proposto para a formação do conjugado entre 8-MOP e GSH (8-MOP-SG).

Partindo desse pressuposto, a análise dos espectros de absorção na região de ultravioleta e visível foi usada na tentativa de se detectar a formação de 8-MOP-SG. O mesmo experimento foi realizado com o CDNB para validar a metodologia; para este último, a adição de GSH na presença da enzima reduz o pico de absorção em 250 nm (reflexo do consumo desse substrato na reação de conjugação) e faz surgir um novo pico em 340 nm, região de absorção do produto DNP-SG (figura 10A). No entanto, o mesmo não aconteceu com o 8-MOP, que não teve seu espectro de absorção alterado pela adição de GSH e enzima, não apontando evidências da formação de 8-MOP-SG (figura 10B).

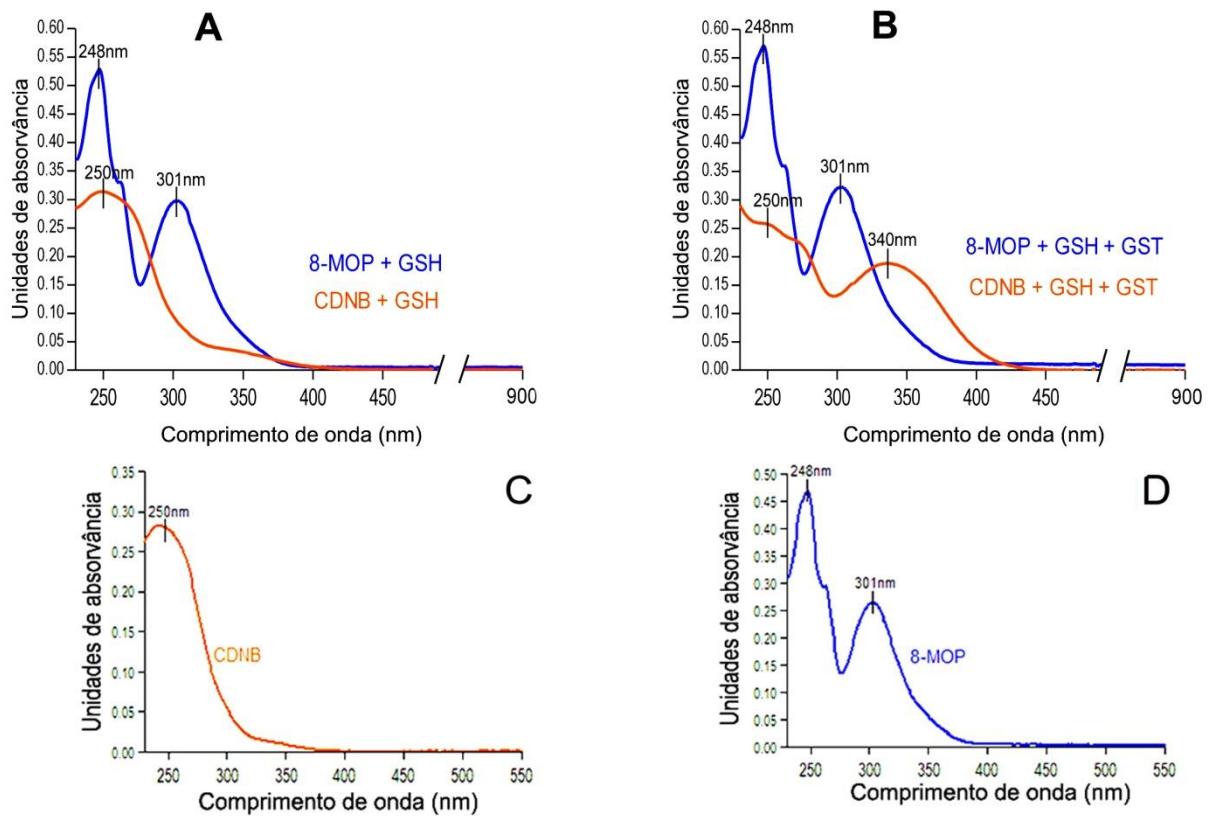


Figura 10. Espectro de absorção UV-Vis das soluções de 8-MOP + GSH (azul) e CDNB + GSH (laranja) na ausência (A) e presença (B) da GST- π a 0,1 U/mL. A adição de GSH não altera o perfil de absorção das drogas, como visto pela comparação com os espectros das soluções de CDNB (C) e 8-MOP (D) em tampão apenas. Já a presença da enzima modifica o padrão de absorção da solução de CDNB + GSH, mas não a de 8-MOP + GSH, sugerindo a formação de um conjugado (Abs = 340 nm) no primeiro caso, mas não no segundo.

As evidências espectrofotométricas são suficientemente consistentes para refutar a hipótese de que o 8-MOP é substrato da GST- π , no entanto, na tentativa de elucidar da forma mais incontestável possível o mecanismo de ação dessa droga, uma nova abordagem foi adotada.

É muito bem estabelecido que nas conjugações de moléculas exógenas com GSH, durante o metabolismo de drogas, por exemplo, os conjugados formados são mais hidrossolúveis que o composto original, o que torna sua eliminação mais fácil. Assim, o 8-MOP-SG, se formado, seria mais hidrofílico que o 8-MOP, o que pode ser constatado pela análise dos valores teóricos de coeficiente de partição n-octanol/água (logP). O mesmo, obviamente, ocorre para o substrato CDNB (figura 11).

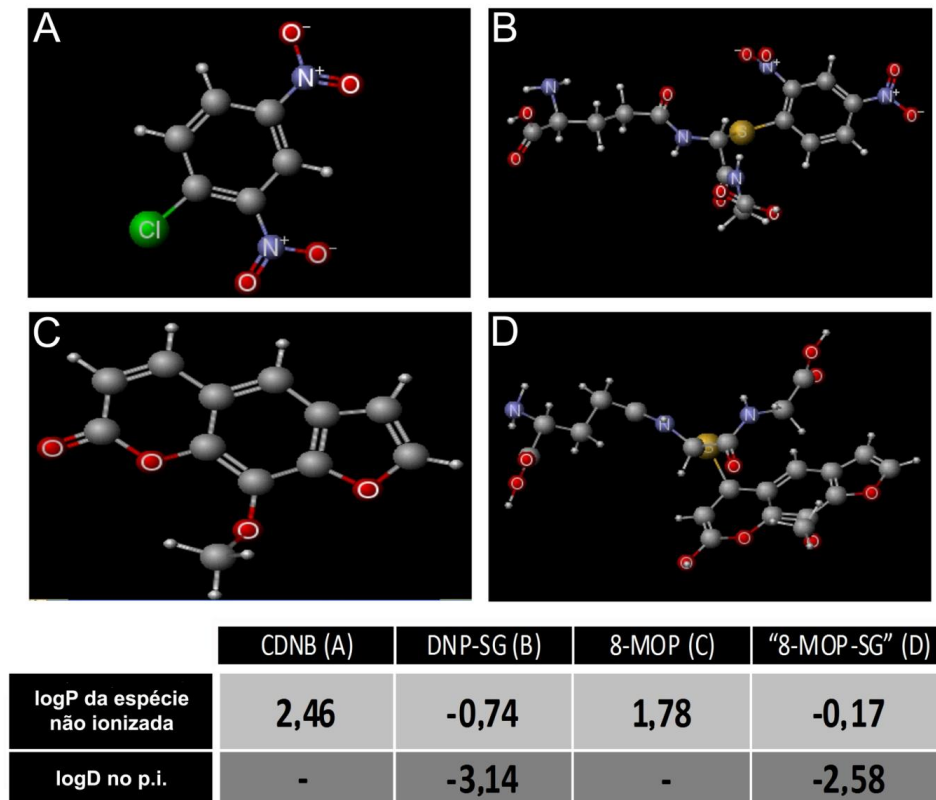


Figura 11. Representação tridimensional dos compostos CDNB (A) e 8-MOP (C) e seus respectivos conjugados com GSH (B e D) com os valores teóricos de logP. A conjugação com GSH, como era esperado, baixou sensivelmente o logP dos compostos, implicando no aumento de sua solubilidade em água. Para as espécies química que possuem ponto isoelétrico os valores de logD estão também representados.

Diante dessa característica de maior hidrofiliçidade dos conjugados, é possível promover a separação destes, numa mistura, por meio de métodos cromatográficos tradicionais, e foi esta a abordagem complementar à espectrofotométrica que permitiu atestar a ausência do 8-MOP-SG no meio reacional. Os experimentos de CLAE mostram claramente o surgimento do pico (com menor tempo de retenção, como era de se esperar) correspondente ao DNP-SG no cromatograma do CDNB em meio contendo GSH e enzima, mas um pico único no cromatograma do 8-MOP, mesmo na presença da GSH e GST- π (figura 12). Uma vez que a mistura (8-MOP+GSH+GST- π) foi ainda incubada por períodos de tempo superiores a um mês e o cromatograma permaneceu inalterado (dados não mostrados), é possível afirmar que se o 8-MOP-SG é mesmo formado, a constante de equilíbrio da reação de formação é tão baixa que o produto é indetectável.

Os dados até então reunidos permitem concluir que o 8-MOP é um inibidor competitivo da GST- π , ao passo em que não é substrato dessa enzima, pois não sofre conjugação com GSH.

No entanto, há que se considerar que um composto que apresenta atividade inibitória de uma enzima isolada, não necessariamente apresentará a mesma atividade no ambiente celular; assim sendo, o mesmo teste de atividade de GST foi realizado com lisado de células tumorais da linhagem GL-15 (glioblastoma humano), partindo-se do pressuposto de que, contendo o lisado além da GST- π , diversos componentes citoplasmáticos, seria um meio reacional mais próximo do intracelular. Os testes, realizados em condições saturantes de substrato (figura 13 A), mostraram atividade concentração-dependente do 8-MOP em inibir atividade de GST (já que o CDNB não é substrato exclusivo da isoforma π) (figura 13 B). Além disso, a marcação imunocitoquímica sugeriu um aumento na expressão de GST- π após tratamento das células com a droga (figura 13 C-D), mas quando foi avaliada a atividade enzimática no lisado de células tratadas por uma hora ou um dia, não foi constatado aumento (figura 13 E). Com estes testes, descartamos a possibilidade de o uso da enzima em sua forma purificada ter favorecido a atividade inibitória do 8-MOP.

Apesar das células tumorais usadas expressarem GST- π (figura 14 A), certamente outras isoformas da enzima também estão presentes, das quais o 8-MOP poderia ser substrato, o que comprometeria sua eficácia. Para avaliar essa hipótese, partiu-se do seguinte princípio: Se o 8-MOP for conjugado com GSH por ação de qualquer GST, a célula será depletada de GSH uma vez que a reação de conjugação é irreversível. O teste do monoclorobimano (MCB) foi então usado para avaliar o conteúdo de GSH intracelular, que reduziu significativamente depois do tratamento das culturas com o substrato CDNB, mas não com 8-MOP, indicando que este não funciona como substrato de qualquer isoforma de GST presente na célula tumoral (figura 14 B-F).

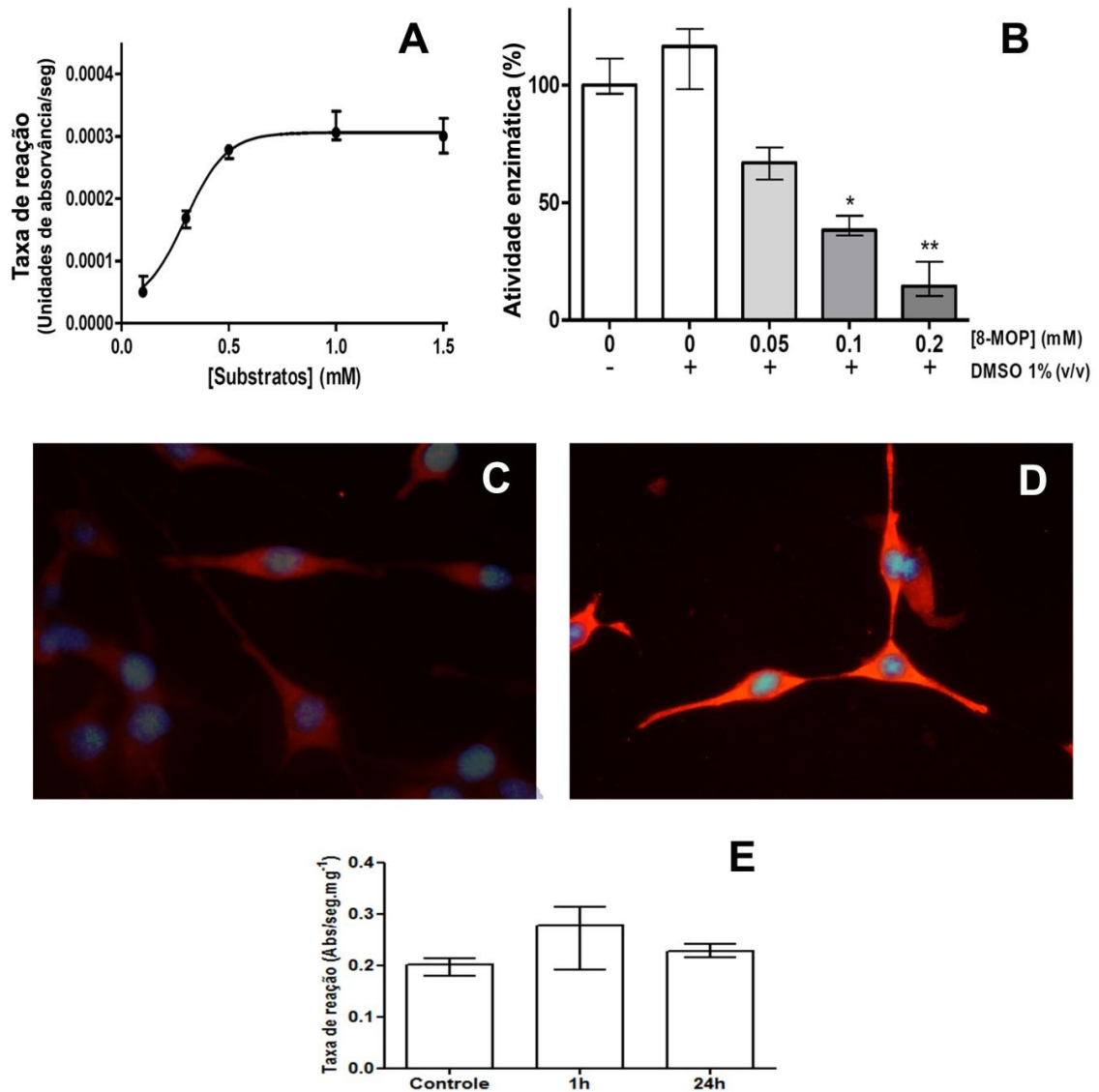


Figura 13. Efeito do 8-MOP na atividade catalítica de GST em lisado de células de glioblastoma humano da linhagem GL-15. A taxa de reação de conjugação entre CDNB e GSH (substratos da GST) aumentou proporcionalmente à concentração dos substratos até saturação (A). A linha representa a regressão não-linear dos dados ($R^2=0,9770$). Os testes de inibição foram feitos em condições saturantes (substratos a 1 mM), e mostraram que o 8-MOP apresenta ação inibitória concentração-dependente também no lisado de células (B). Os dados não apresentaram distribuição normal, sendo assim analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (excluindo-se o primeiro grupo) seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn. * = $p < 0,05$ and ** = $p < 0,01$. Como CDNB não é substrato exclusivo da isoforma π , é possível que a ação do 8-MOP se estenda a outras isoformas, de qualquer maneira, as células marcaram positivamente para GST- π em imunocitoquímica (C), e apesar do tratamento com 8-MOP a 0,1 mM em cultura por 24 horas parecer aumentar a expressão dessa isoforma (D), não houve diferença estatisticamente significativa na atividade de GST de lisados de células tratadas quando comparados com os de células não tratadas (E).

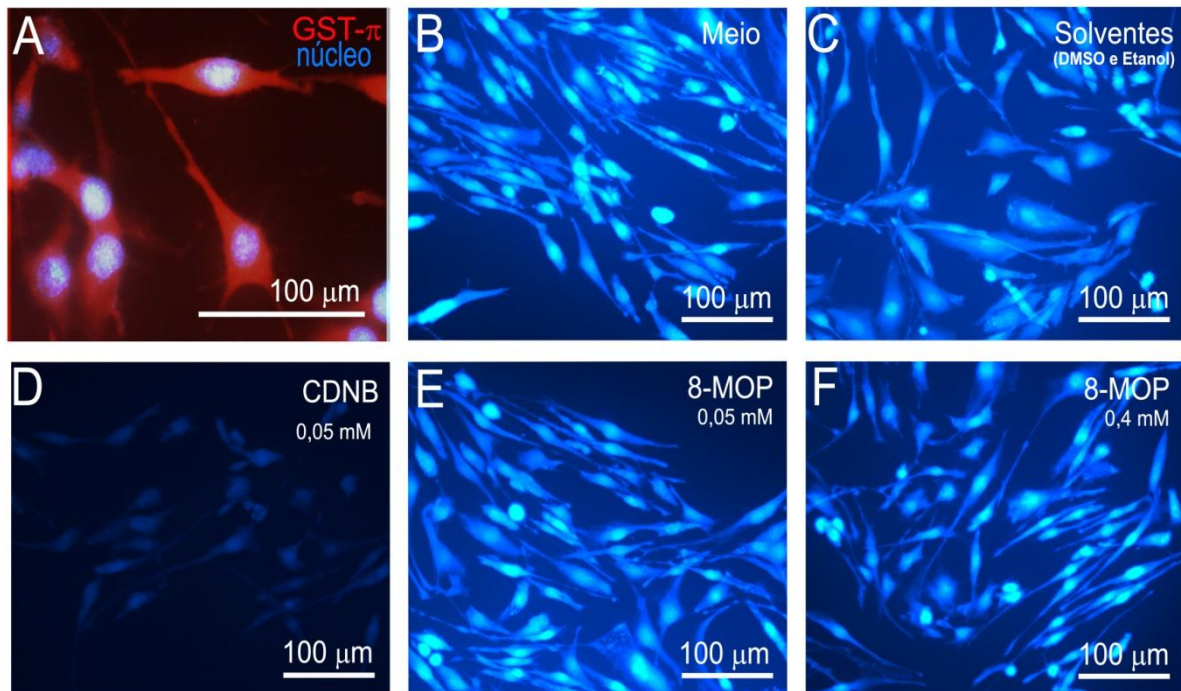


Figura 14. Teste do monoclorobimano (MCB) para detecção de depleção de glutathion reduzido (GSH). As células usadas (GL-15) expressam GST- π (A). Em condições controle (B e C), há abundância de GSH intracelular (fluorescência azul). O tratamento com CDNB, substrato da GST- π , depleta o GSH (D); o mesmo não acontece após tratamento com 8-MOP em concentração equimolar (E) ou oito vezes superior (F).

As células da linhagem GL-15 são extremamente resistentes a diversos quimioterápicos, como é o caso da temozolomida (TMZ) (figura 15), agente alquilante de escolha para o tratamento de gliomas. Por essa razão esta linhagem foi escolhida, afinal, o motivo da busca de um inibidor de GST- π é a possibilidade de usar tal inibidor para aumentar a sensibilidade das células tumorais aos quimioterápicos, dando a este um caráter quimiossensibilizante. Dessa forma, o próximo passo lógico seria a avaliação da ação de quimioterápicos convencionais sobre as células, sozinhos, e quando associados ao 8-MOP. Essa avaliação foi efetuada através da medida de viabilidade celular pelo teste do MTT após os tratamentos, bem como observação do aspecto das culturas por microscopia de contraste de fase. Os resultados apontaram que o 8-MOP age, de fato, como quimiossensibilizante para uma das drogas reconhecidamente substrato da GST- π (etoposídeo), e também para a temozolomida (figura 16).

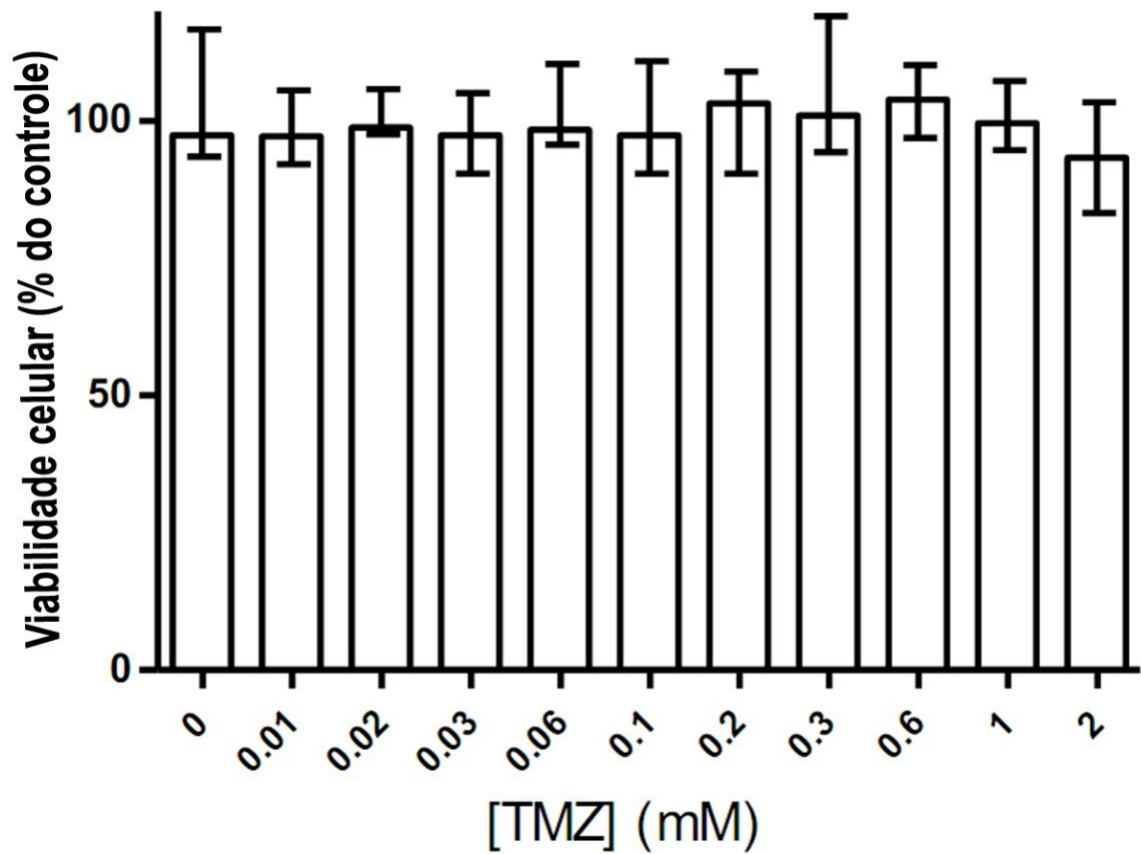


Figura 15. Viabilidade celular (avaliada pelo teste do MTT) de células da linhagem GL-15 após 72 horas de tratamento com TMZ em concentrações crescentes. As células foram resistentes à ação da droga mesmo na elevada concentração de 2 mM. O veículo (DMSO 0,5%) está presente em todos os grupos, incluindo controle, e não alterou a viabilidade celular (dados não mostrados).

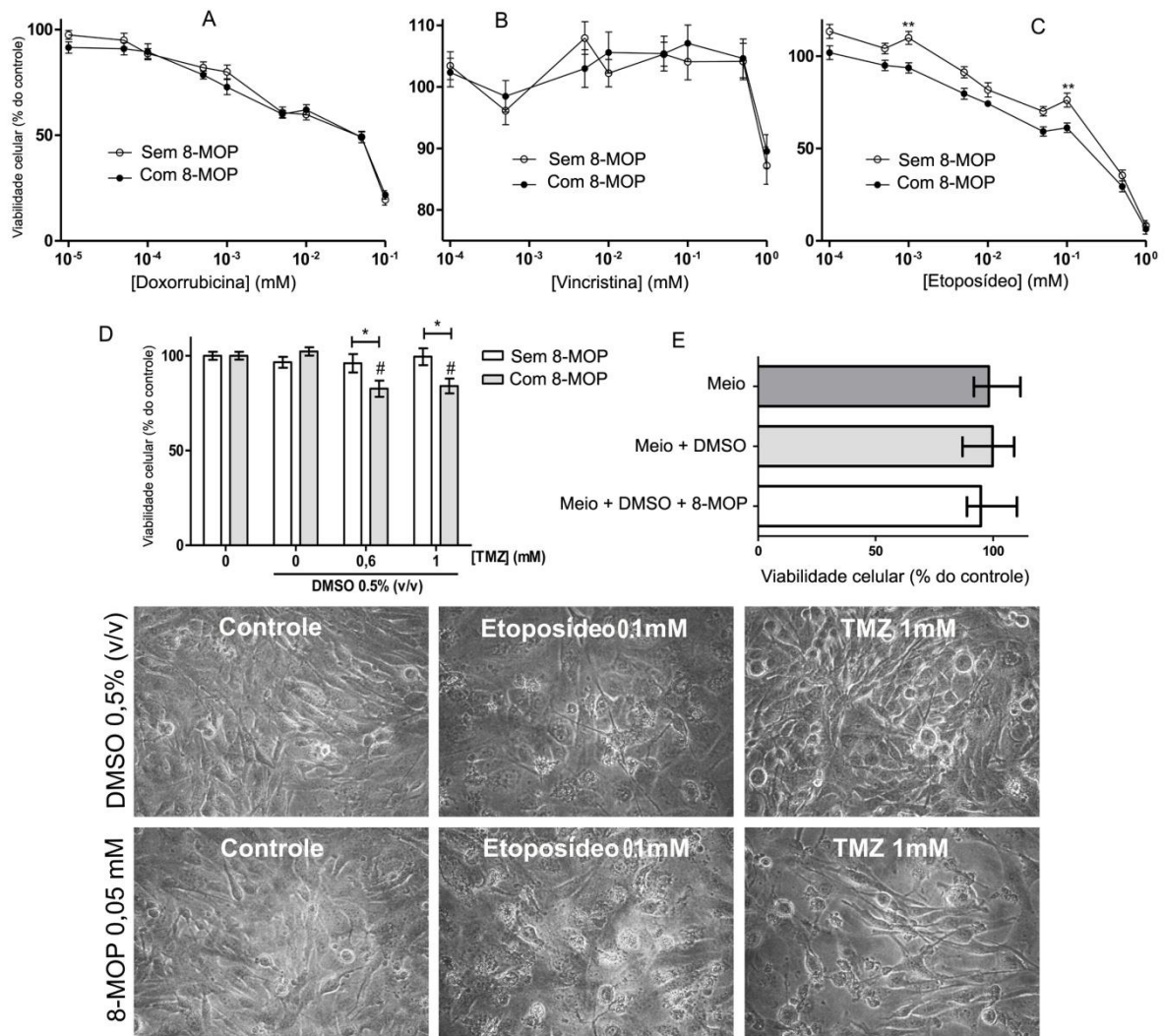


Figura 16. Avaliação da atividade quimiossensibilizante do 8-MOP (avaliada pelo teste do MTT). Dentre as drogas que são reconhecidamente substratos da GST- π , doxorubicina (A) vincristina (B) e etoposídeo (C), apenas o etoposídeo teve a atividade em células GL-15 aumentada pela adição do 8-MOP a 0,05 mM, especialmente nas concentrações de 0,001 e 0,1 mM. 8-MOP também sensibilizou as células à ação de temozolomida (D), que reduziu a viabilidade em 17,4% e 16% nas concentrações de 0,6 e 1 mM, respectivamente. Os dados apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo teste *two-way* ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. * = $p < 0,05$, e ** = $p < 0,01$ para diferenças entre os grupos com e sem 8-MOP com mesma concentração de droga; # = $p < 0,01$ para diferenças entre o grupo analisado e o controle tratado apenas com 8-MOP. O veículo (DMSO 0,5%) puro ou com 8-MOP a 0,05 mM não alteraram a viabilidade celular (E). As fotomicrografias de contraste de fase mostram redução de celularidade e alterações morfológicas nas células tratadas com etoposídeo e TMZ, intensificadas pelo co-tratamento com 8-MOP 0,05 mM.

Como foram efetuados testes prévios com o 8-MOP sozinho a fim de se escolher a concentração que seria utilizada na associação com os quimioterápicos, um efeito de redução na viabilidade celular em concentrações acima de 0,1 mM foi encontrado (dados não mostrados). Uma vez que se tratam, como já foi mencionado, de células altamente refratárias

aos efeitos dos agentes farmacológicos convencionais, esse achado apontou uma possível atividade antitumoral intrínseca do 8-MOP de utilidade terapêutica. Para melhor caracterizar essa atividade, dois outros tipos celulares foram acrescentados ao estudo: células de glioma de rato da linhagem C6 e células astrogliais também de rato, aqui referidas simplesmente como astrócitos, como controle de células normais (já que o uso de um controle adequado desse tipo de células humanas foi impraticável). A primeira avaliação feita foi o impacto do tratamento com 8-MOP em diferentes concentrações e por diferentes períodos de tempo, através do teste do MTT. Os resultados apontaram um efeito citotóxico (ou citostático, já que o teste usado não permite a discriminação) relativamente seletivo, uma vez que as células tumorais das duas linhagens foram sensíveis à ação do 8-MOP em todas as concentrações testadas mesmo com apenas 24 horas de exposição, enquanto redução na viabilidade das culturas de astrócitos só foi vista depois de 48 horas de tratamento na concentração de 0,4 mM. O efeito foi concentração-dependente (figura 17). Além disso, os resultados sugerem que as células de origem humana são mais sensíveis à ação da droga que as de rato, demonstrando, inclusive, uma resposta tempo-dependente que não fica clara para as células C6.

Como a atividade inibitória de GST- π foi comprovada para o 8-MOP, foi investigado se a expressão diferencial dessa enzima nas linhagens usadas era capaz de explicar a seletividade da ação; no entanto, todas elas expressaram GST- π visualmente na mesma intensidade, embora a atividade de GST total tenha sido mais pronunciada nos astrócitos (figura 18).

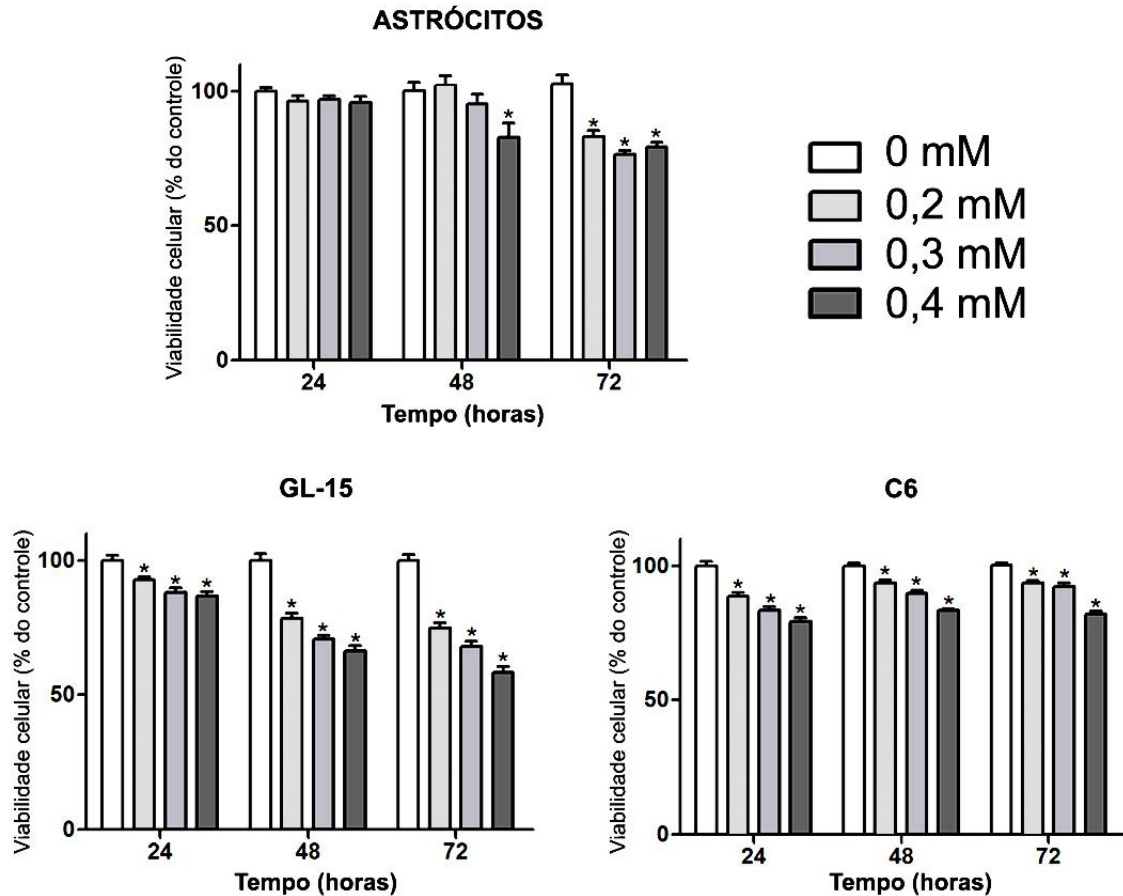


Figura 17. Análise da viabilidade celular (pelo teste do MTT) de células de glioblastoma humano (GL-15), glioma murino (C6) e astrócitos normais de rato após tratamento com 8-MOP em concentrações crescentes em três tempos de exposição. Todas as concentrações testadas reduziram significativamente a viabilidade das células tumorais nos três tempos (24, 48 e 72 horas), enquanto os astrócitos só tiveram sua viabilidade diminuída após 48 horas de exposição a 0,4 mM de 8-MOP. Os dados apresentaram distribuição normal e foram analisados estatisticamente pelo teste *one-way* ANOVA, seguido do teste de Dunnett para múltiplas comparações. * = $P < 0,05$ para comparação com respectivo controle.

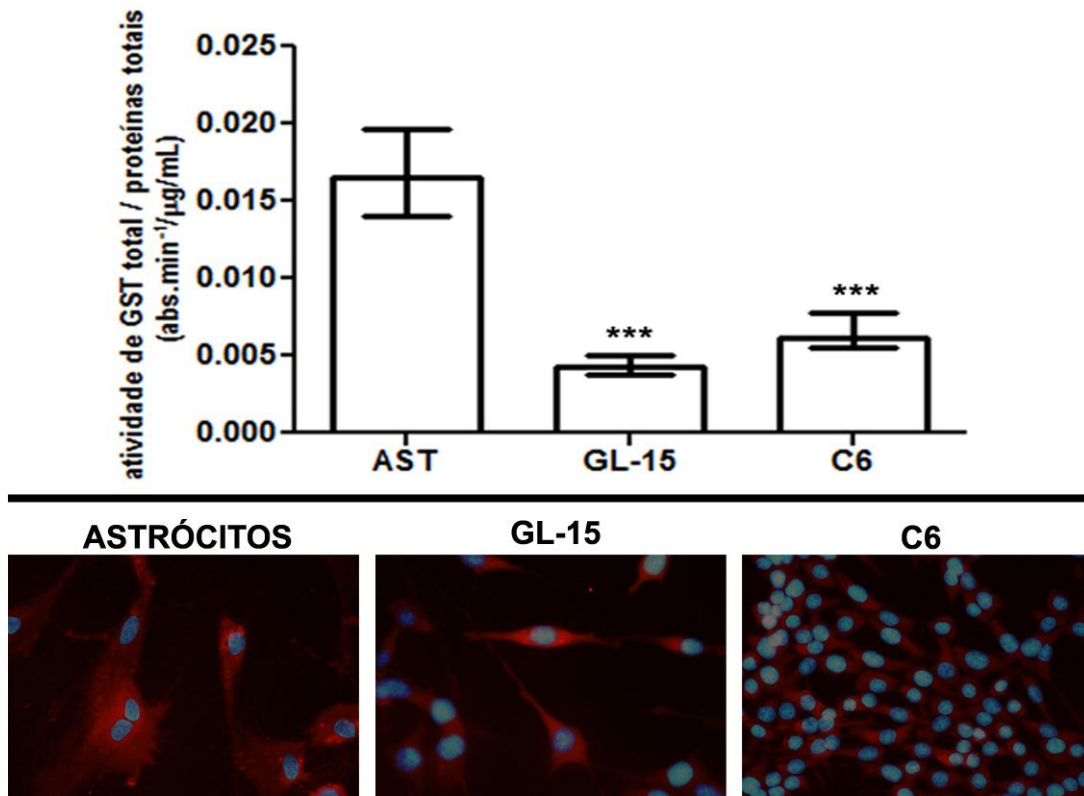


Figura 18. Atividade relativa de GST por tipo celular. A atividade catalítica foi mensurada em lisados de células e expressa em relação ao conteúdo protéico total dos respectivos lisados. Os dados apresentaram distribuição normal e foram analisados por *one-way* ANOVA seguido do teste de Bonferroni para múltiplas comparações. *** = $p < 0,001$ para diferença em relação à atividade nos astrócitos. Não houve diferença significativa entre a atividade de GST em GL-15 e C6. No detalhe, imunocitoquímica para GST- π (marcação em vermelho) e marcação dos núcleos (em azul) nas três linhagens.

Testes adicionais foram realizados com o intuito de investigar a natureza da redução da viabilidade celular promovida pelo 8-MOP. O primeiro deles foi a medida da quantidade de proteínas totais nas placas após o tratamento, por 48 horas, com concentrações crescentes da droga. Tal análise reflete a celularidade (densidade celular) das culturas. Mais uma vez, a ação do 8-MOP foi muito mais evidente para as células tumorais, principalmente as de glioblastoma humano (figura 19).

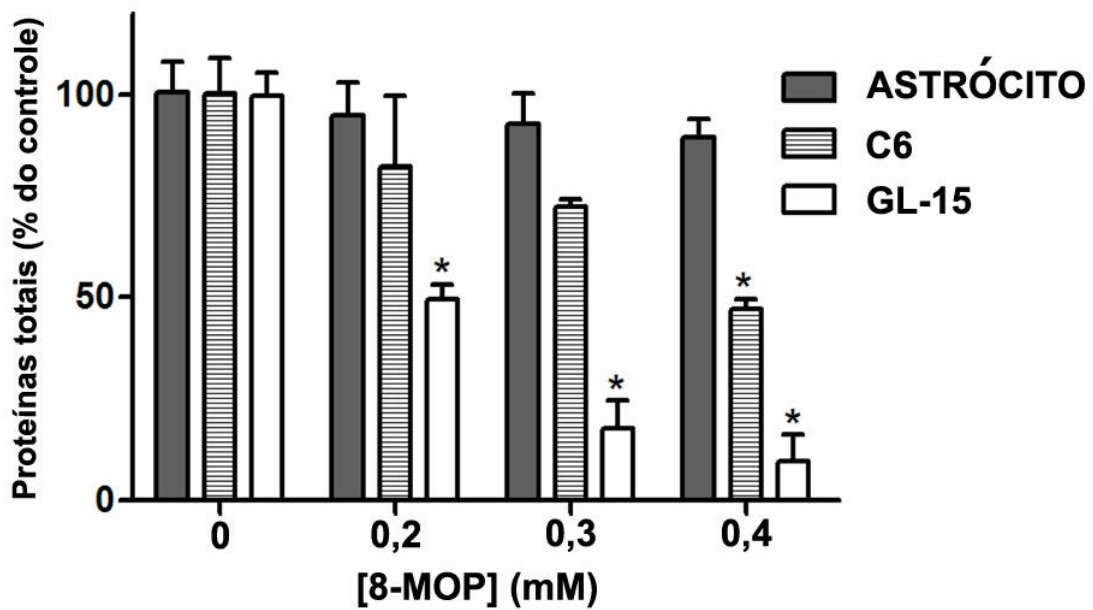


Figura 19. Avaliação do efeito do tratamento com 8-MOP sobre a celularidade através da determinação de proteínas totais. Uma redução concentração-dependente da quantidade de proteínas foi vista nas culturas de células tumorais tratadas com 8-MOP, de forma mais evidente para células GL-15. Nas culturas de astrócitos tratadas não houve redução significativa do conteúdo total de proteínas. Os dados apresentaram distribuição normal e foram analisados estatisticamente por *one-way* ANOVA seguido do teste de Dunnett para múltiplas comparações. * = $p < 0,05$ para comparação com o respectivo controle.

O segundo teste efetuado foi o de contagem direta do número de células viáveis pelo teste de exclusão do corante azul de Tripan. Os resultados apontaram uma redução significativa no número de células tumorais viáveis promovida pelo tratamento com 8-MOP, e mais uma vez não houve impacto sobre as culturas de astrócitos (figura 20 A). Porém, quando foram contadas as células não viáveis não houve diferença significativa entre os grupos controle e tratado, com exceção das células GL-15, mas mesmo nesse caso o pequeno aumento no número de células inviáveis não explica a grande redução no número de viáveis (figura 20 B). Assim, deduz-se que o 8-MOP, apesar de um potencial citotóxico, interfere principalmente na proliferação celular.

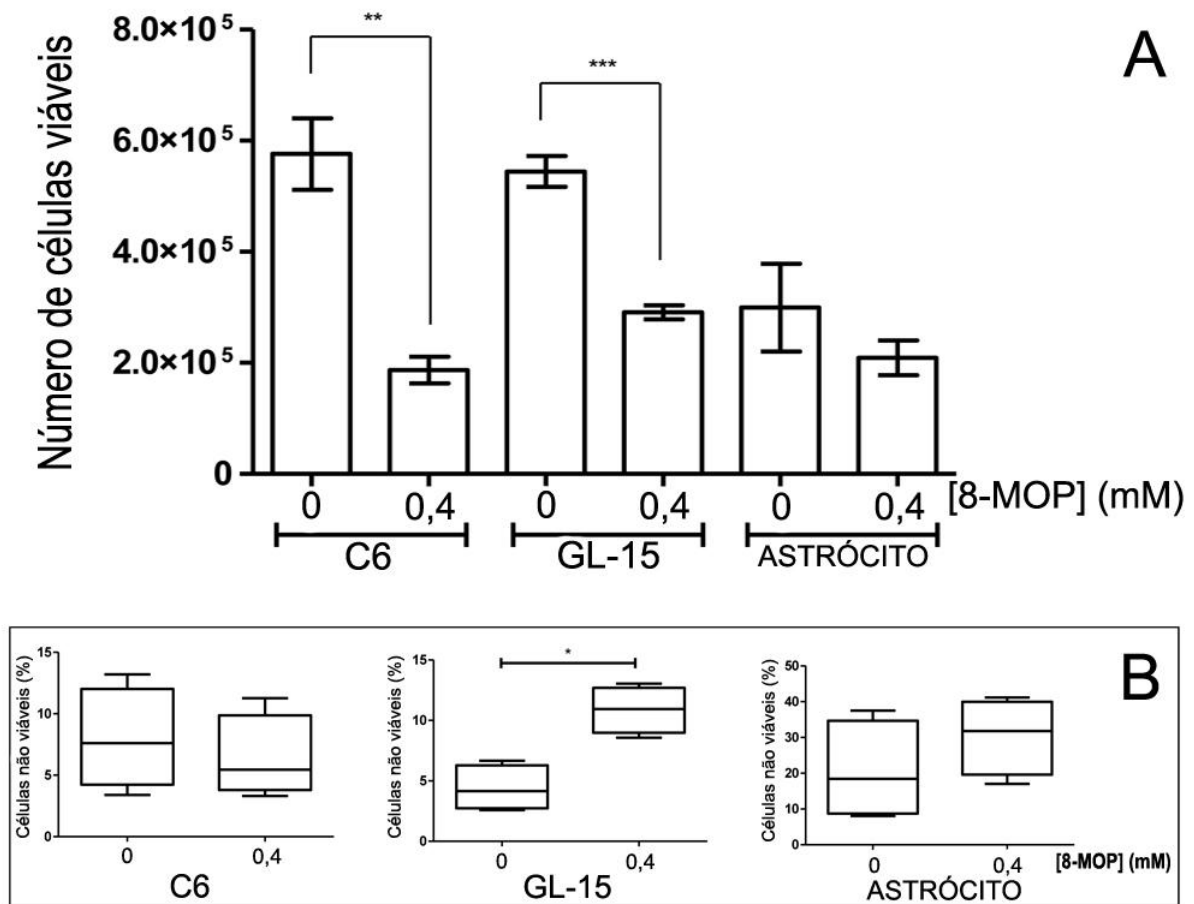


Figura 20. Análise da atividade anti-proliferativa e citotóxica do 8-MOP por teste de exclusão do corante azul de Tripán. 2×10^5 células foram semeadas em cada placa de cultivo e imediatamente tratadas com 8-MOP a 0,4 mM ou DMSO a 0,5% (veículo da droga). A redução da atividade proliferativa indicada pela diminuição do número de células viáveis foi evidenciada nas culturas de células tumorais tratadas com 8-MOP, mas não nas de astrócitos (A). Nas células tumorais humanas o tratamento aumentou também o percentual de células coradas pelo azul de Tripán (B) de 4,1 (2,6 – 6,3)% para 10,9 (9 – 12,7)%. Os dados não apresentaram distribuição normal, sendo portanto analisados pelo teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney. * = $p < 0,05$ para comparação com o respectivo controle.

Como até então apenas concentrações relativamente elevadas haviam sido testadas, foi adotado um novo desenho experimental, usando baixa concentração de 8-MOP adicionada às culturas em intervalos regulares de tempo (48 horas) durante dez dias, no intuito de simular uma situação de terapia real. A ação anti-proliferativa do composto foi novamente avaliada pelo teste de exclusão do Tripán ao final do período e os resultados apontaram que tal ação é preservada mesmo com esse esquema de tratamento, e novamente confirmaram a relativa seletividade do 8-MOP por células tumorais (figura 21).

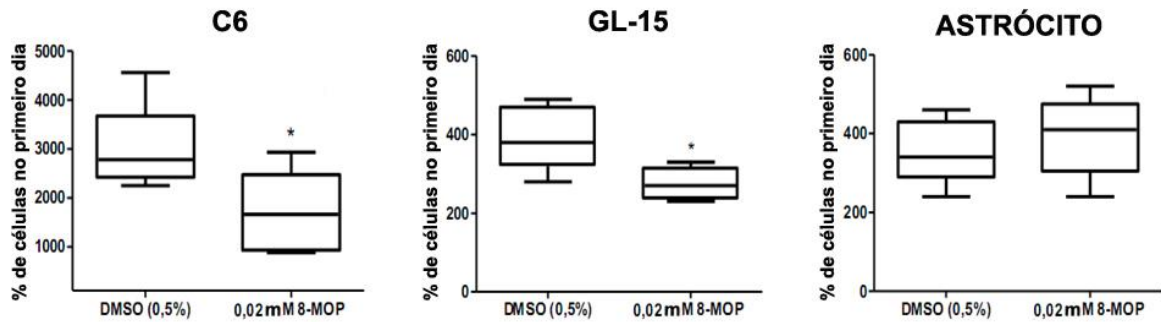


Figura 21. Avaliação do efeito anti-proliferativo do tratamento com 8-MOP a baixa concentração por período estendido. Culturas de células tumorais e de astrócitos foram tratadas por 10 dias com 8-MOP a 0,02 mM (acrescentados à placa a cada 2 dias). O percentual de células em relação ao primeiro dia foi maior nos grupos controle que nos tratamentos com 8-MOP, exceto para as culturas de astrócitos, nas quais o efeito não foi observado. Os dados não apresentaram distribuição normal ($n=5$) sendo, portanto, analisados estatisticamente pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. * = $p < 0,05$ para comparação com o respectivo controle.

Apesar do efeito anti-proliferativo demonstrado (tabela 3), não se pode negligenciar a ação citotóxica do 8-MOP, portanto, partiu-se para a investigação do tipo de morte celular provocada por altas concentrações deste.

	C6		GL-15		ASTRÓCITOS	
	DMSO	8-MOP	DMSO	8-MOP	DMSO	8-MOP
Células Viáveis (dia do lançamento)	10.000	10.000	10.000	10.000	20.000	20.000
Células Viáveis (décimo dia)	278.000 (242.000-367.500)	166.000* (93.000-247.500)	38.000 (32.000-47.000)	27.000* (23.500-31.500)	74.000 (53.000-89.000)	82.000 (61.000-95.000)
Células Viáveis (%) (décimo dia)	89,3 (85,2-93,3)	79 (73,3-92)	97,8 (95,8-100)	100 (92,1-100)	88 (76,3-94,1)	89,6 (87,5-96,6)
Células Inviáveis (décimo dia)	31.000 (17.500-64.000)	27.000 (20.000-43.000)	1.000 (0-2.000)	0 (0-2.500)	10.000 (5.500-16.000)	6.000 (3.000-12.000)
Células Inviáveis (%) (décimo dia)	10,7 (6,7-14,8)	20,9 (8-26,7)	2,2 (0-4,2)	0 (0-7,9)	12 (6-23,6)	10,3 (3,4-12,5)

Tabela 3. Dados do teste de exclusão do azul de Tripán após 10 dias de tratamento com 8-MOP a 0,02 mM. O percentual de inibição de proliferação foi de 57,7%, 40,4% para C6 e GL-15, respectivamente, e -5,2% (não significativo) para astrócitos. Os valores foram representados por mediana com percentis (25%, 75%). * = $p < 0,05$ quando comparado com controle não-tratado (Mann-Whitney test).

O teste utilizado nessa etapa do estudo foi o de dupla marcação com anexina V e iodeto de propídio, e a quantificação por citometria de fluxo mostrou que a pouca morte celular provocada pelo tratamento não ocorre por necrose, mas sim apoptose (figura 22).

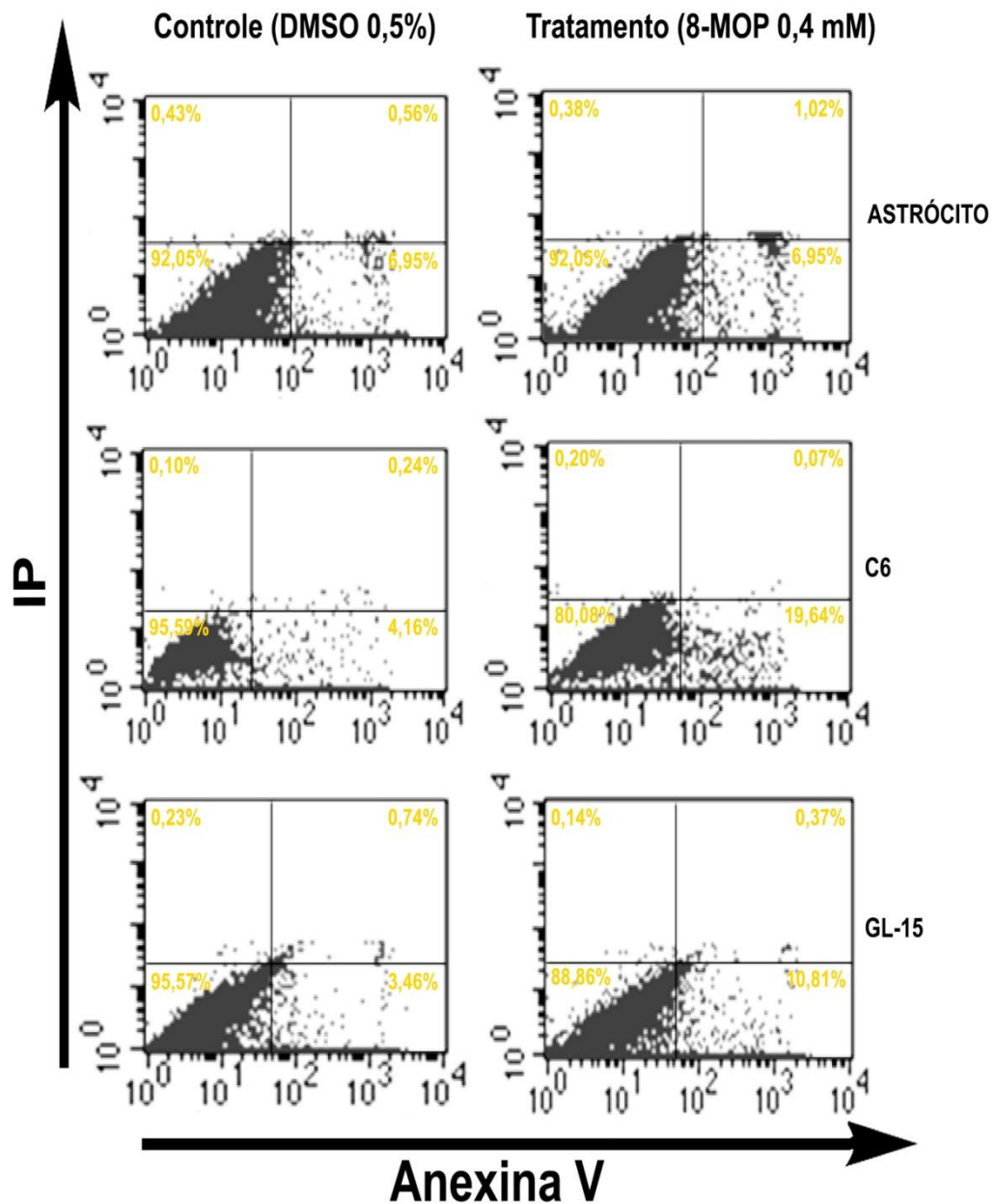


Figura 22. Avaliação do tipo de morte celular promovida pelo tratamento (48 horas) com 8-MOP a 0,4 mM em comparação com o tratamento apenas com o veículo da droga (DMSO 0,5% v/v). Não há evidência de necrose ou apoptose tardia (quadrantes superiores esquerdo e direito, respectivamente), mas um percentual de células morreram por apoptose (quadrante inferior direito) em todos os grupos tratados com a droga.

Alguns achados morfológicos corroboram com esses resultados, como células com *blebbing* (figura 23 A) e núcleos condensados e fragmentados (figura 23 B-G) encontrados, esporadicamente, em todas as culturas tratada com 8-MOP.

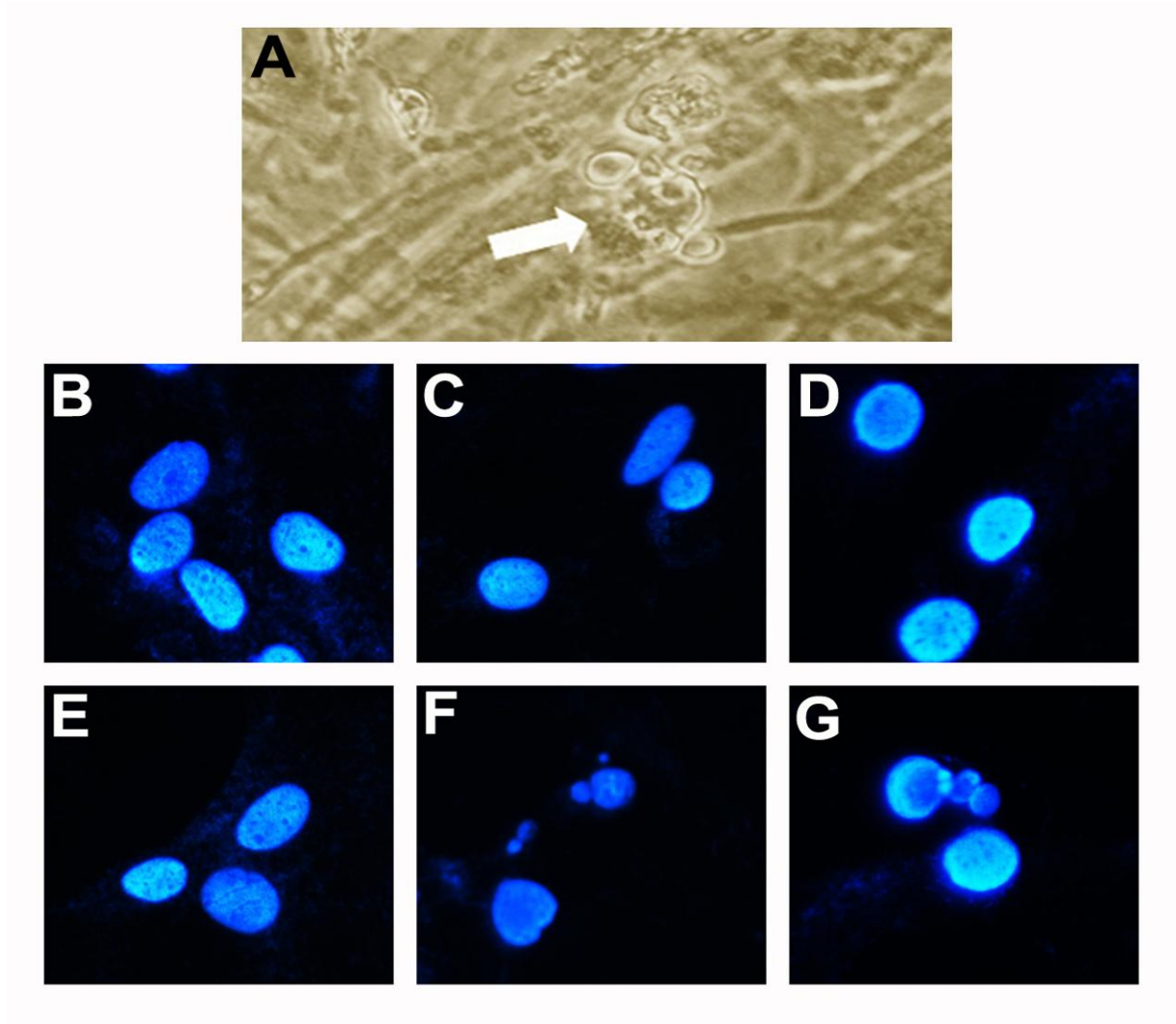


Figura 23. Fotomicrografia de célula (GL-15 tratada com 8-MOP a 0,4 mM por 48 horas) com morfologia tipicamente apoptótica em contraste de fase (A). Células com mesmo aspecto foram encontradas também nas culturas de C6 e astrócitos submetidas ao mesmo tratamento (não mostradas). Em B, C e D, vêem-se os núcleos de astrócitos, C6 e GL-15 (respectivamente), em condições controle, corados com o agente intercalante Hoechst 33258. Em E, F e G, núcleos das mesmas células após o tratamento citado. Não foram encontrados núcleos fragmentados nas culturas de astrócitos tratadas. Tais achados, apesar de presentes nas culturas de células tumorais, foram raros, o que inviabilizou a quantificação.

Identificado o tipo de morte celular promovida pela droga, coube então a análise do efeito antiproliferativo, seja por seu significado terapêutico, seja porque este mostrou se sobrepôr ao efeito citotóxico. Essa análise foi primeiramente feita através da avaliação do percentual de células em cada etapa do ciclo celular em culturas tratadas e em condições controle. Os testes demonstraram que nenhum dos esquemas terapêuticos adotados pararam o ciclo em qualquer de suas fases, pois não há acúmulo de células em nenhuma delas após os tratamentos (figura 24).

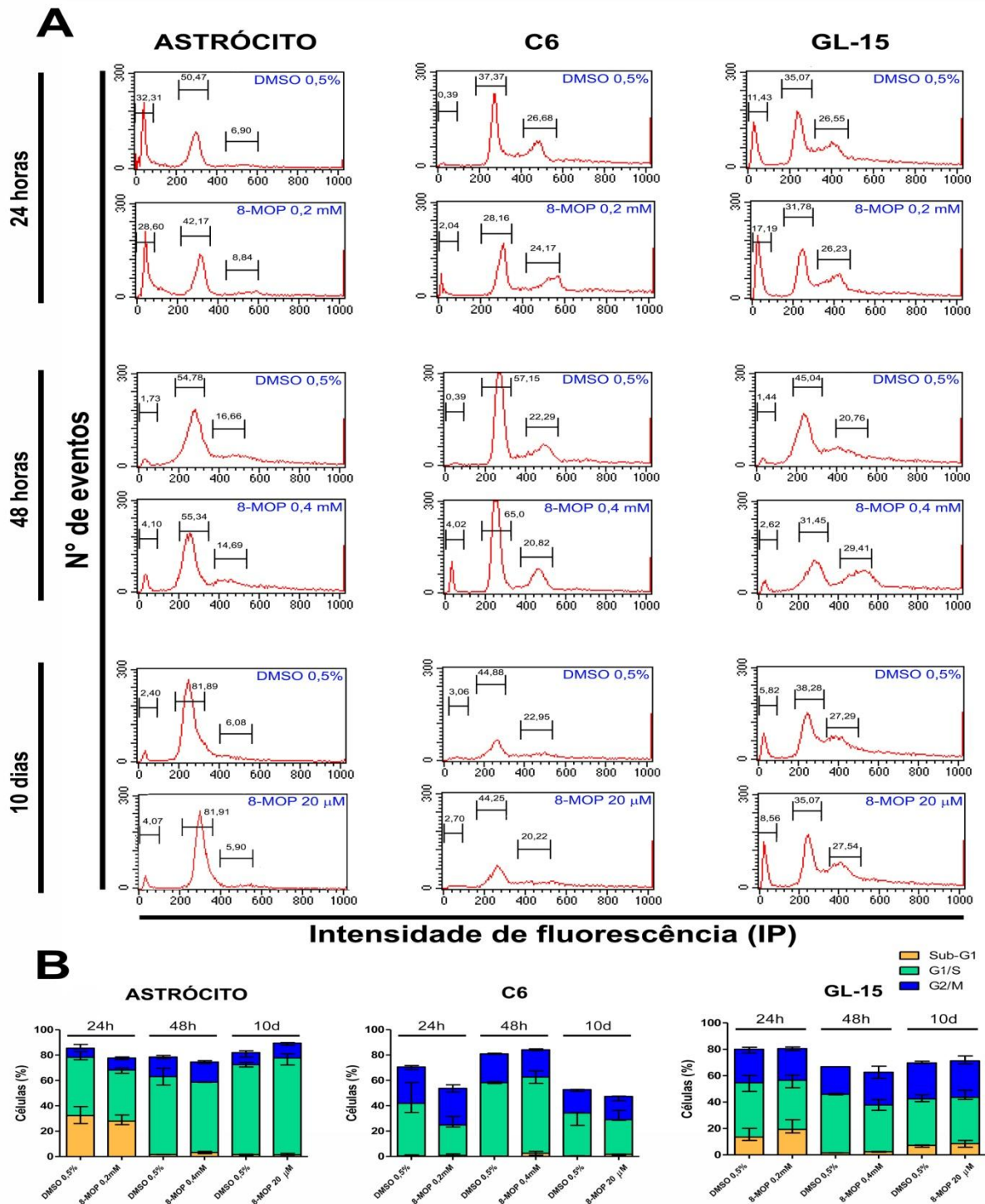


Figura 24. Estudo da distribuição das células nas fases do ciclo celular após tratamento, por crescentes períodos de tempo, com diferentes concentrações de 8-MOP. Em A é possível observar dados representativos dos seis experimentos independentes realizados e a quantificação do percentual de células em Sub-G1, G1/S e G2/M, da esquerda para a direita, respectivamente. O número de eventos registrado pelo equipamento foi interpretado como número de células coradas pelo iodeto de propídeo. Em B, os dados de todos os experimentos reunidos mostrando que não há diferença significativa entre grupo tratado e controle em nenhuma das culturas e tempo utilizados.

Já que, apesar de reduzir sensivelmente a proliferação, o 8-MOP não interrompe o ciclo celular, foi levantada a hipótese de que a droga não impede, mas torna mais lento o processo de divisão celular. Se tal hipótese fosse verdadeira, o efeito da droga deveria ser mais notável na cultura de C6 que na de GL-15, uma vez que a taxa de proliferação da primeira é maior que a da segunda, quando o que foi observado foi justamente o oposto. Porém, há que se levar em consideração que os testes foram feitos em condições que possivelmente mascaram tal efeito, já que as culturas tratadas estavam confluentes, e a redução de espaço para adesão nesse caso pode, por si só, reduzir a proliferação celular, inclusive no grupo controle. Por conta disso, a avaliação de viabilidade celular pelo teste do MTT foi repetida em duas condições distintas: em culturas confluentes (figura 25 A) e em culturas sub-confluentes (figura 25 B), e apresentaram os resultados esperados, fazendo das células C6, de proliferação mais rápida, as mais sensíveis à ação do 8-MOP.

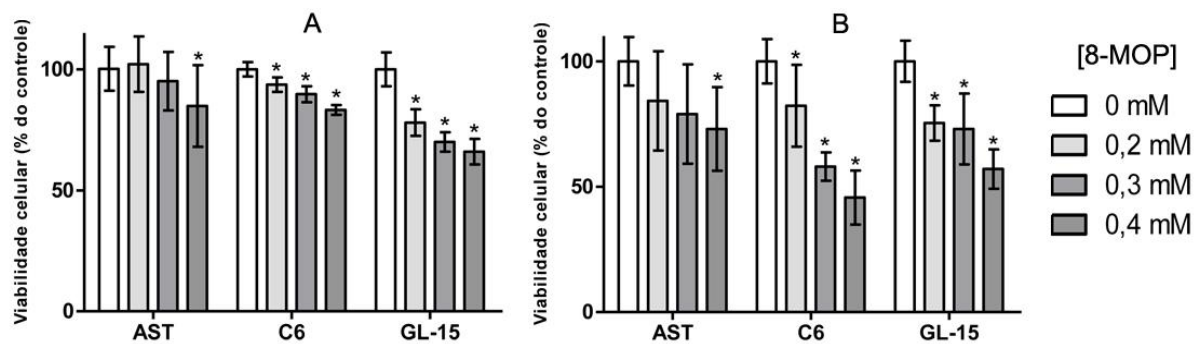


Figura 25. Avaliação da viabilidade celular pelo teste do MTT em culturas tratadas com concentrações crescentes de 8-MOP por 48 horas. Em A, culturas tratadas após 72 horas de lançamento (confluentes). Em B, culturas tratadas após 24 horas de lançamento (sub-confluentes). Os dados apresentaram distribuição normal, assim, foram expressos como média e desvio padrão e analisados estatisticamente pelo teste *one-way* ANOVA, seguido do teste de Dunnett para múltiplas comparações. * = $P < 0,05$ para comparação com respectivo controle.

A redução na proliferação celular ficou ainda mais evidente quando as culturas envolvidas nesse mesmo experimento (em sub-confluência) foram observadas por microscopia de contraste de fase (figura 26).

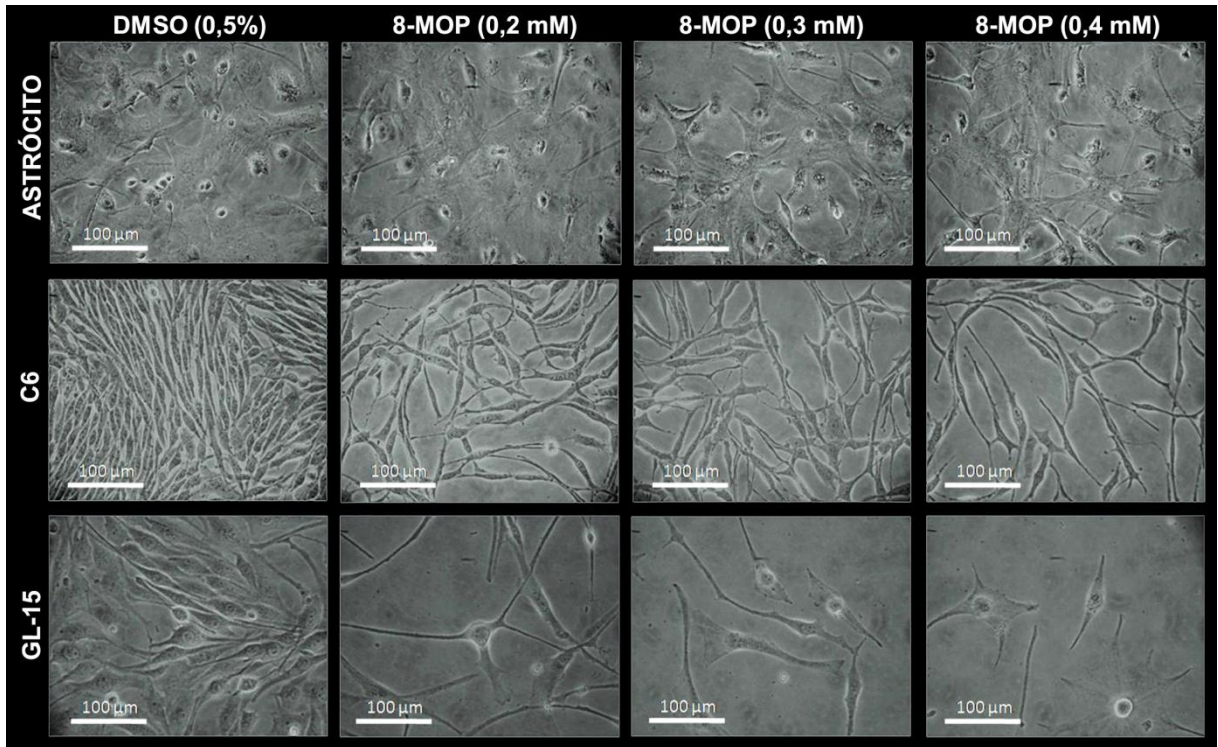


Figura 26. Microscopia de contraste de fase mostrando densidade celular e alterações morfológicas após 48 horas de tratamento de culturas inicialmente sub-confluentes com 8-MOP em diferentes concentrações. Os efeitos são nitidamente mais visíveis nas culturas de células tumorais que nas de células normais.

Como os resultados até então expostos corroboram com a hipótese de que a droga desacelera a divisão celular, sem, contudo, prová-la de fato, decidiu-se, para tal, pelo uso do teste de formação de colônia. O teste foi realizado apenas com as células tumorais murinas (C6), já que as células de origem humana (GL-15) não formaram colônias adequadamente sob as condições experimentais estabelecidas. Os resultados mostraram claramente que o tratamento com 8-MOP não reduz significativamente o número de colônias ao final do período de avaliação, evidenciando ausência de citotoxicidade nas concentrações usadas, mas reduz de forma significativa o tamanho destas, comprovando o efeito antiproliferativo do composto (figura 27).

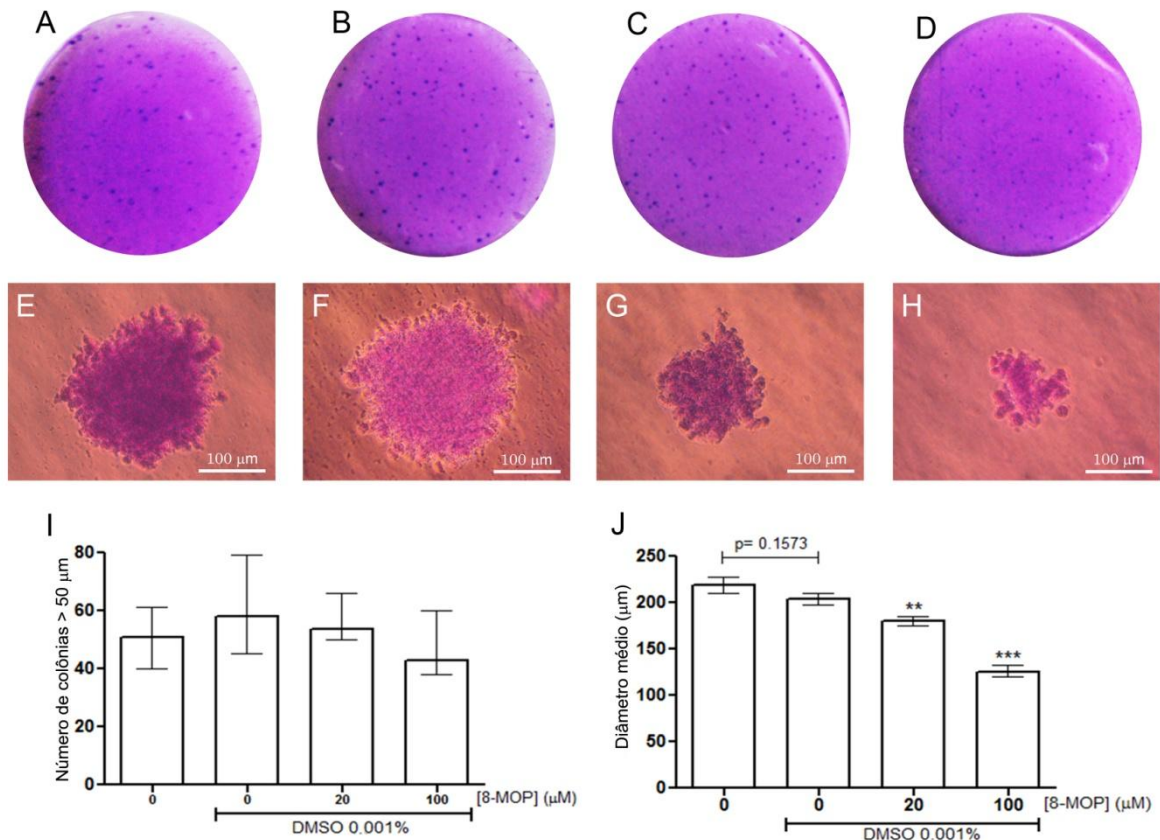


Figura 27. Resultado do teste de formação de colônia com células C6. Em A, B, C e D vêem-se o aspecto macroscópico dos poços sem tratamento e tratados com DMSO 0,001% v/v, 8-MOP a 20 μM e 8-MOP a 0,1 mM, respectivamente. Em E, F, G e H, aspecto microscópico das colônias sob os mesmos tratamentos. Não houve diferença no número de colônias formadas nos grupos tratados em relação ao grupo controle (I), mas o 8-MOP reduziu significativamente o diâmetro médio destas (J). Os dados referentes ao número de colônias não apresentaram distribuição normal, foram portanto representados por mediana e analisados estatisticamente pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (excluindo-se o primeiro grupo) seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn. Já os dados referentes ao diâmetro médio das colônias apresentaram distribuição normal, sendo então representados por média e analisados pelo teste *one-way* ANOVA, seguido do teste de Dunnett para múltiplas comparações. ** = $P < 0,01$ e *** = $P < 0,001$ para comparação com o controle. As diferenças nas colorações das colônias são artefato técnico e não refletem viabilidade celular. Nos grupos tratados com 8-MOP, a concentração de DMSO também foi de 0,001%.

Como pôde ser visto na figura 29, altas concentrações de 8-MOP não apenas reduzem a celularidade nas culturas como também induzem alterações morfológicas nas células remanescentes. A fim de melhor caracterizar tais alterações essas células foram submetidas à análise por microscopia eletrônica de varredura (figura 28), que revelou que a droga promove retração do citoplasma e modificações na membrana plasmática das células tumorais, aumentando nestas a quantidade e extensão de filopódios, sem, contudo, mudar visivelmente a morfologia dos astrócitos. Tais estruturas (filopódios) podem também ser facilmente visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão (figura 29).

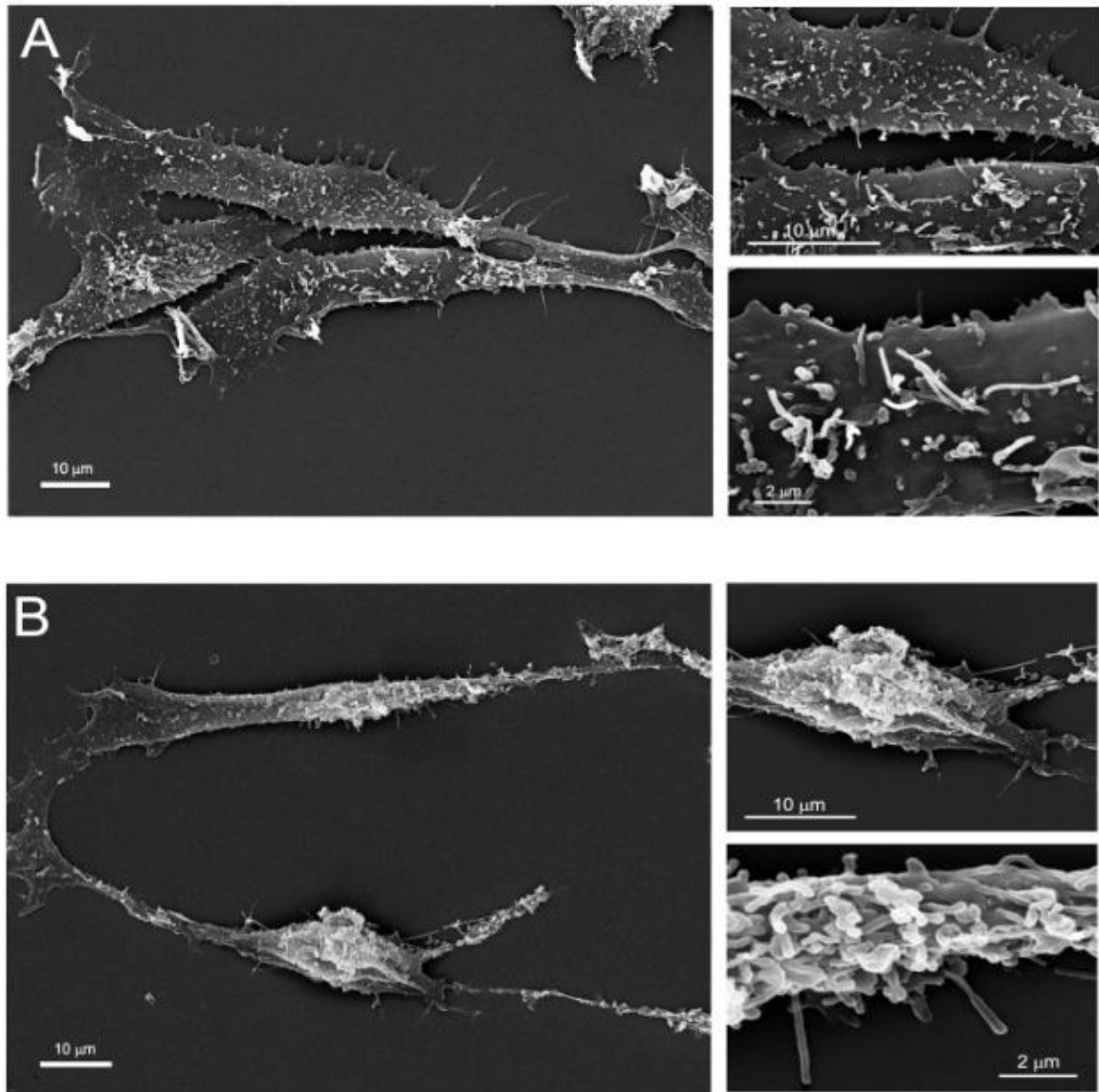


Figura 28. Eletromicrografias de varredura das células C6, GL-15 e dos astrócitos em condições controle e após 48 horas de tratamento com 8-MOP a 0,4 mM. A e B mostram células C6 tratadas apenas com DMSO a 0,5% v/v e 8-MOP, respectivamente. Nos detalhes, aspecto, visto em maior aumento, da superfície e da borda das células aderentes.

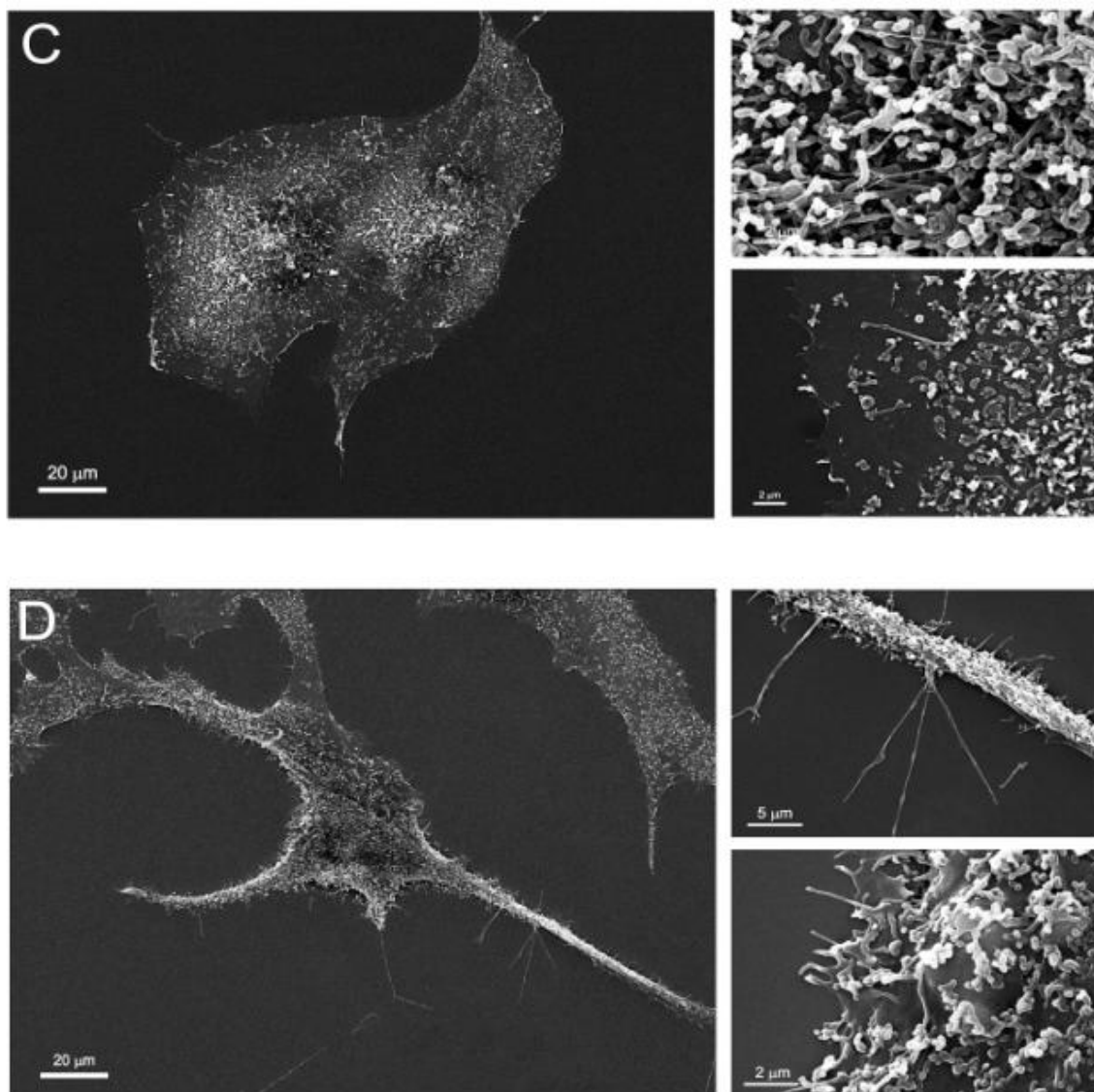


Figura 28. C e D mostram células GL-15 tratadas apenas com DMSO a 0,5% v/v e 8-MOP, respectivamente. Nos detalhes, aspecto, visto em maior aumento, da superfície e da borda das células aderentes.

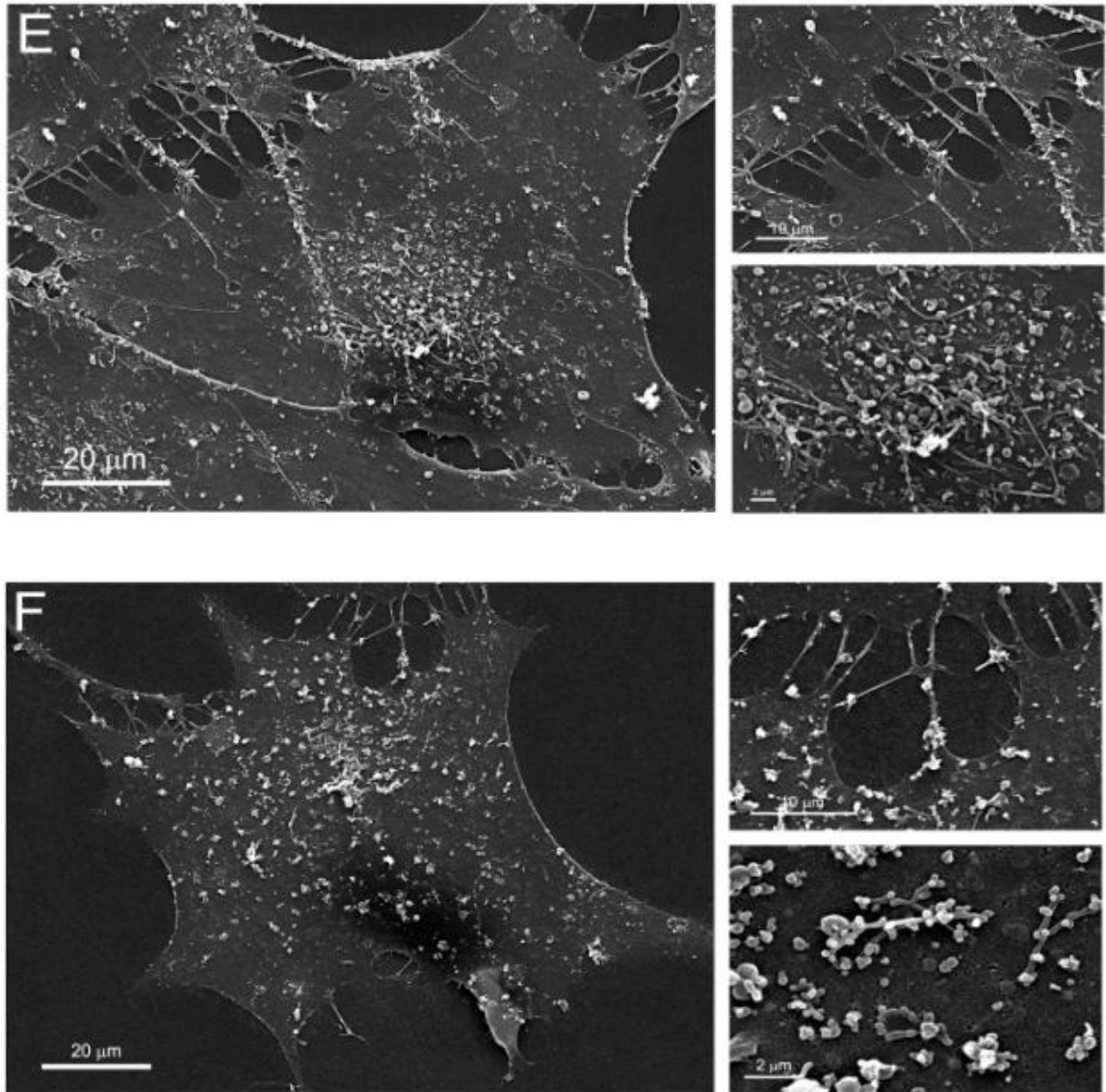


Figura 28. E e F mostram astrócitos tratados apenas com DMSO a 0,5% v/v e 8-MOP, respectivamente. Nos detalhes, aspecto, visto em maior aumento, da superfície e da borda das células aderentes.

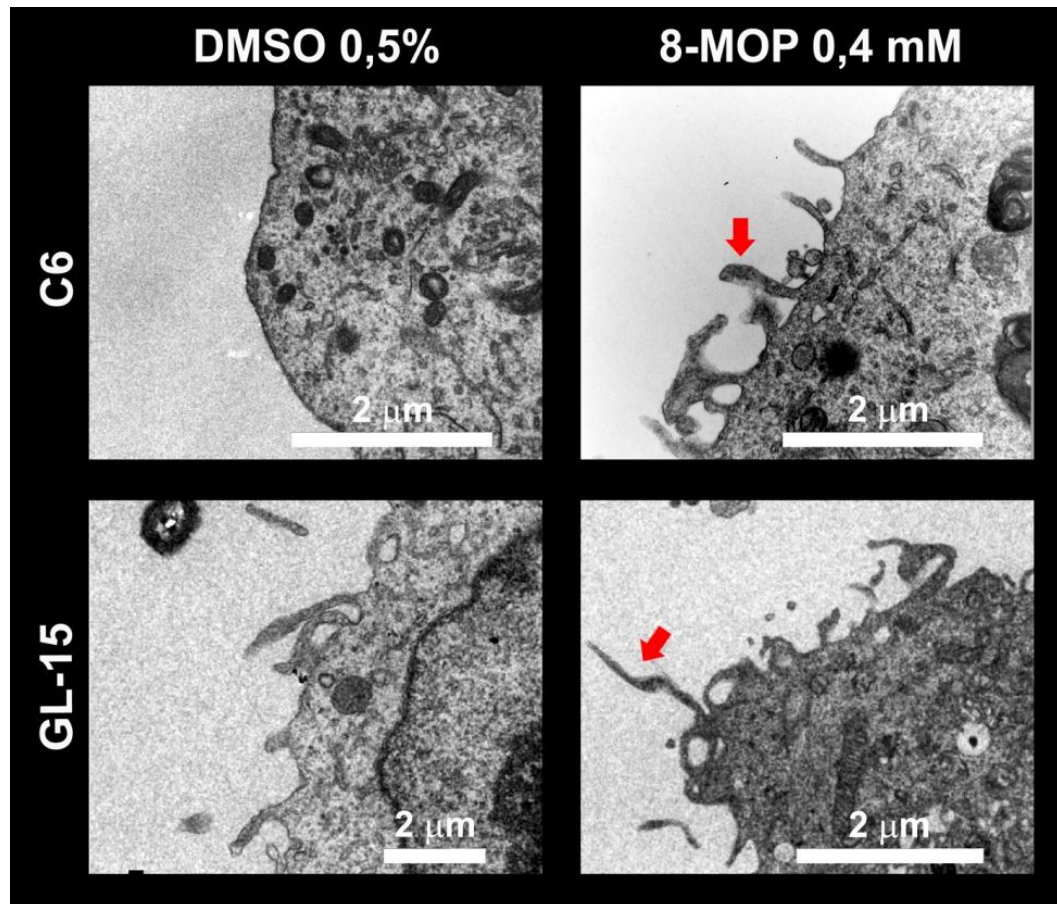


Figura 29. Eletromicrografias de transmissão das células tumorais mostrando alterações na membrana plasmática após tratamento com 8-MOP a 0,4 mM por 48 horas. As setas indicam projeções da membrana plasmática que formam estruturas semelhantes a filopódios; tais estruturas surgem na superfície das células C6 e aumentam em número e extensão na das células GL-15 após tratamento com 8-MOP.

Como os filopódios podem estar envolvidos, dentre outras coisas, no processo de migração celular e, portanto, invasão do tumor, foi imprescindível coletar alguma informação acerca da ação do 8-MOP na capacidade de migração. Inesperadamente, a droga diminuiu o potencial migratório em cultura de ambas as células tumorais (figura 30).

A análise ultra-estrutural revelou ainda que o tratamento com 8-MOP aparentemente aumenta a quantidade de vacúolos autofágicos e figuras de mielina no citoplasma das células. Além disso, foram encontradas algumas células com padrão incomum de compactação de cromatina, o que pode ser indício de processo apoptótico (figura 31).

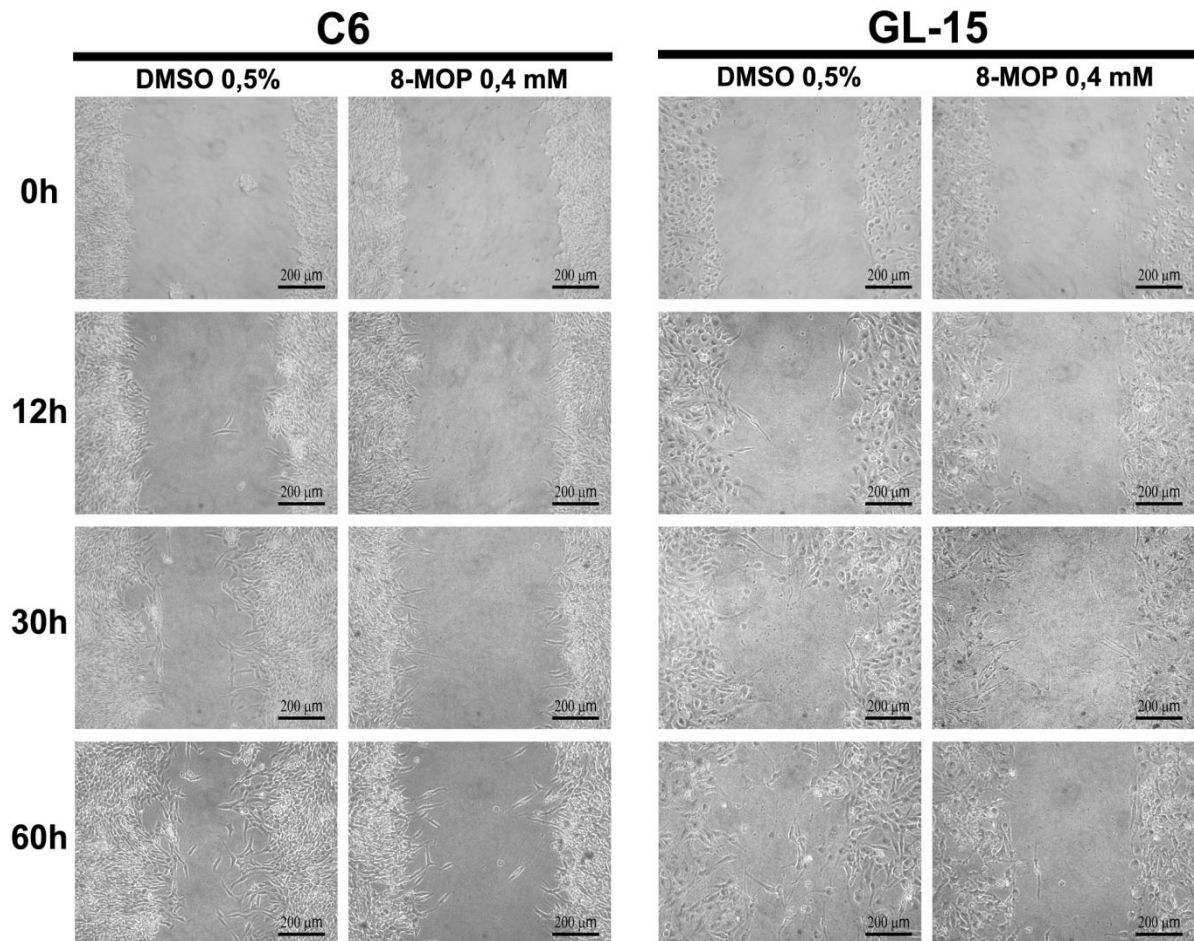


Figura 30. Teste de migração (visualização por microscopia de contraste de fase) em células tumorais tratadas com 8-MOP a 0,4 mM ou veículo (DMSO 0,5%). Não houve diferença entre os grupos controle (meio de cultura apenas) e controle de veículo (DMSO 0,5%). As fotomicrografias são representativas de quatro replicatas.

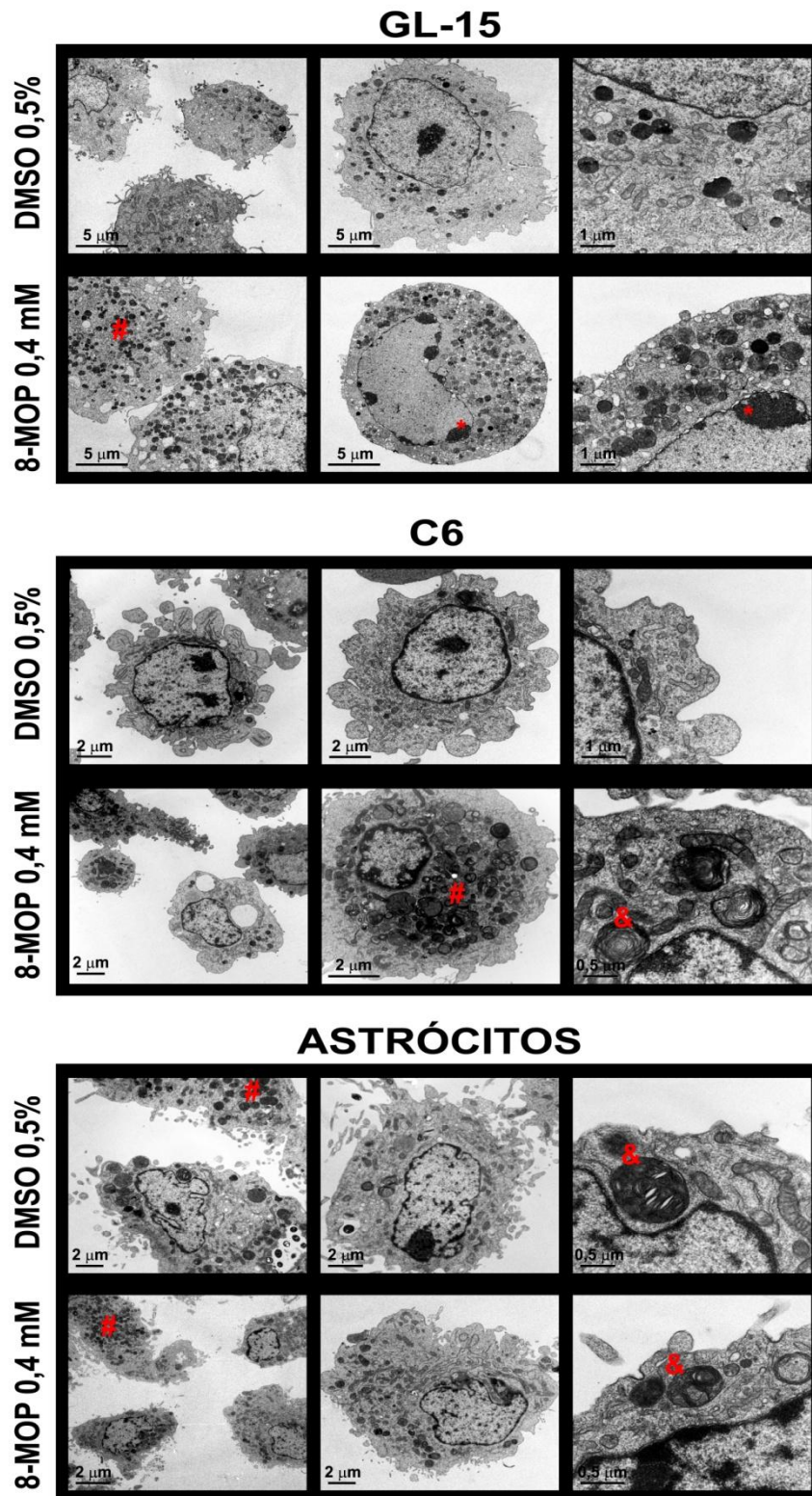


Figura 31. Eletromicrografias de transmissão mostrando modificações ultra-estruturais em células tumorais e normais após tratamento com 8-MOP em comparação com o controle tratado apenas com veículo (DMSO 0,5%). * = padrão alterado de compactação de cromatina, # = vacúolos autofágicos, & = figuras de mielina.

Apesar da microscopia eletrônica de varredura não apontar mudanças morfológicas substanciais nos astrócitos, é preciso levar em consideração a capacidade que têm certas substâncias, principalmente em concentrações elevadas, de promover a ativação astrocitária, uma resposta celular às injúrias teciduais (incluindo aquelas de natureza química) que pode impactar negativamente na possível ação terapêutica do 8-MOP. Astrócitos ativados, dentre outras características (como mudança da morfologia, o que não foi observado), aumentam sua expressão de GFAP (do inglês *glial fibrillary acid protein*). A expressão dessa proteína foi então investigada por meio de imunocitoquímica (figura 32 A-B) e quantificada por *western-blot* seguido de análise densitométrica (figura 32 C), não mostrando alteração após tratamento com a droga.

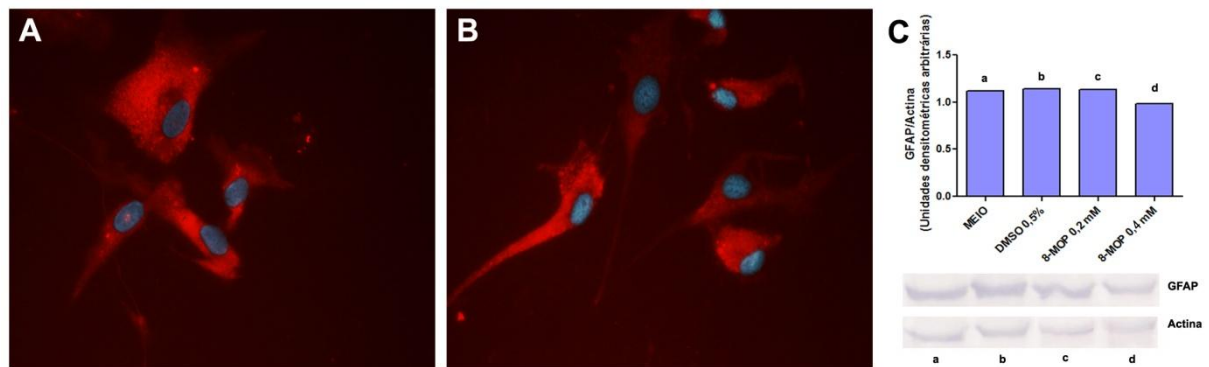


Figura 32. Expressão de GFAP por astrócitos em cultura em condições controle (A) e após tratamento com 8-MOP a 0,4 mM por 48 horas (B). Não houve aumento da expressão da proteína após tratamento com a droga (o que seria indício de ativação astrocitária), como pôde ser confirmado pelo *western blot* (C).

Ainda considerando o potencial do 8-MOP como futuro agente terapêutico de aplicação clínica, outra consideração a se fazer é se esse composto modificaria o perfil de expressão de marcadores de prognóstico da doença, como fazem outras substâncias testadas em modelos *in vitro* semelhantes. Para glioma, três importantes marcadores de prognóstico são as proteínas vimentina, nestina e a própria GFAP. No estudo da expressão desses três marcadores apenas as células de origem humana marcaram positivamente para dois deles (vimentina e GFAP), sendo que apenas um sub-grupo marca positivamente para a vimentina (figura 33).

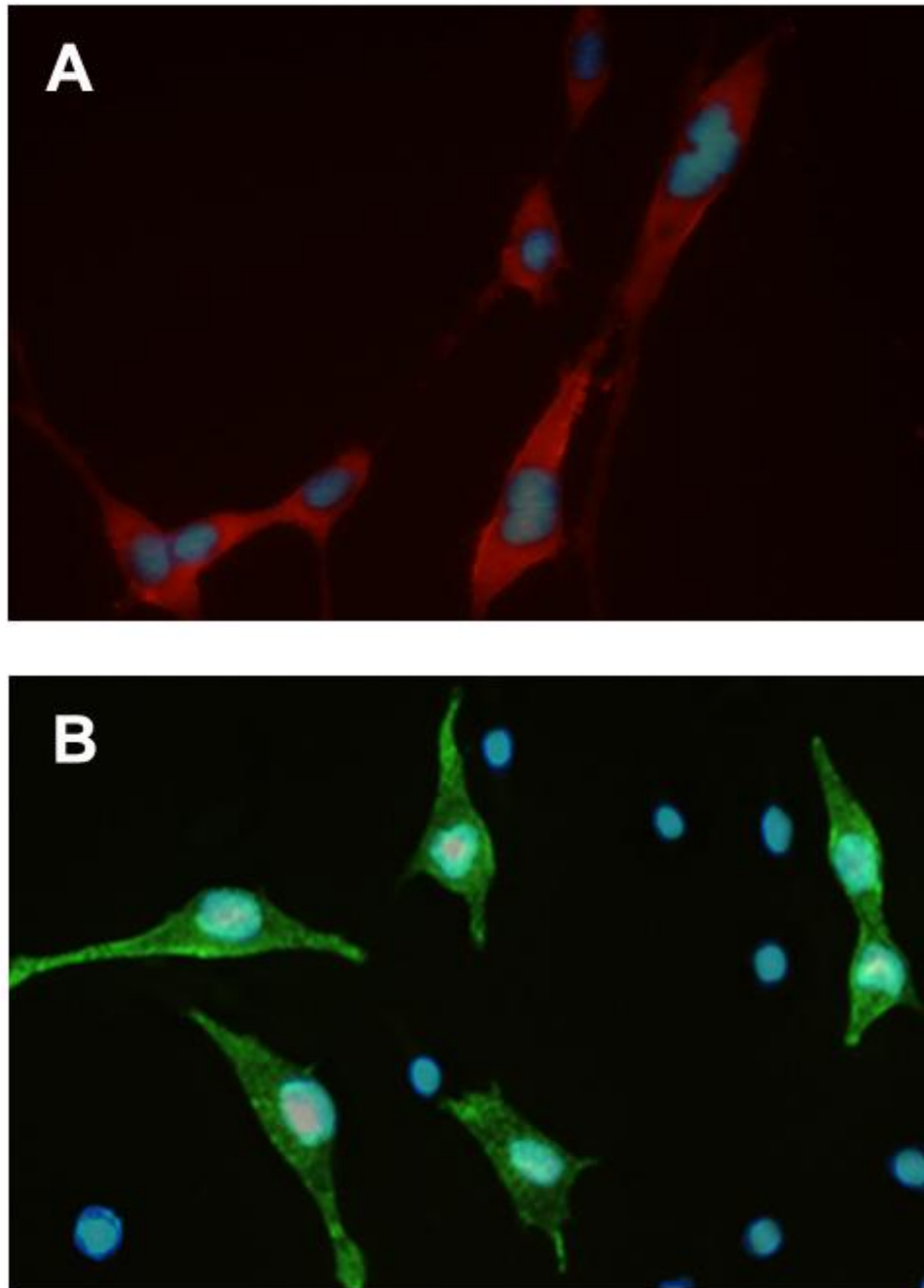


Figura 33. Imunomarcção para vimentina (verde), GFAP (vermelho) e marcação de núcleo (azul) em células GL-15. A proteína vimentina é expressa por um subgrupo de células dessa linhagem (B).

O tratamento, porém, não alterou a expressão de GFAP nessas células (dados não mostrados), mas teve algum efeito sobre as células positivas para vimentina: O 8-MOP não modificou o número de células expressando essa proteína, mas aumentou a quantidade de vimentina expressa por célula, o que foi visualizado através do aumento de intensidade de fluorescência, demonstrado também por citometria de fluxo (figura 34).

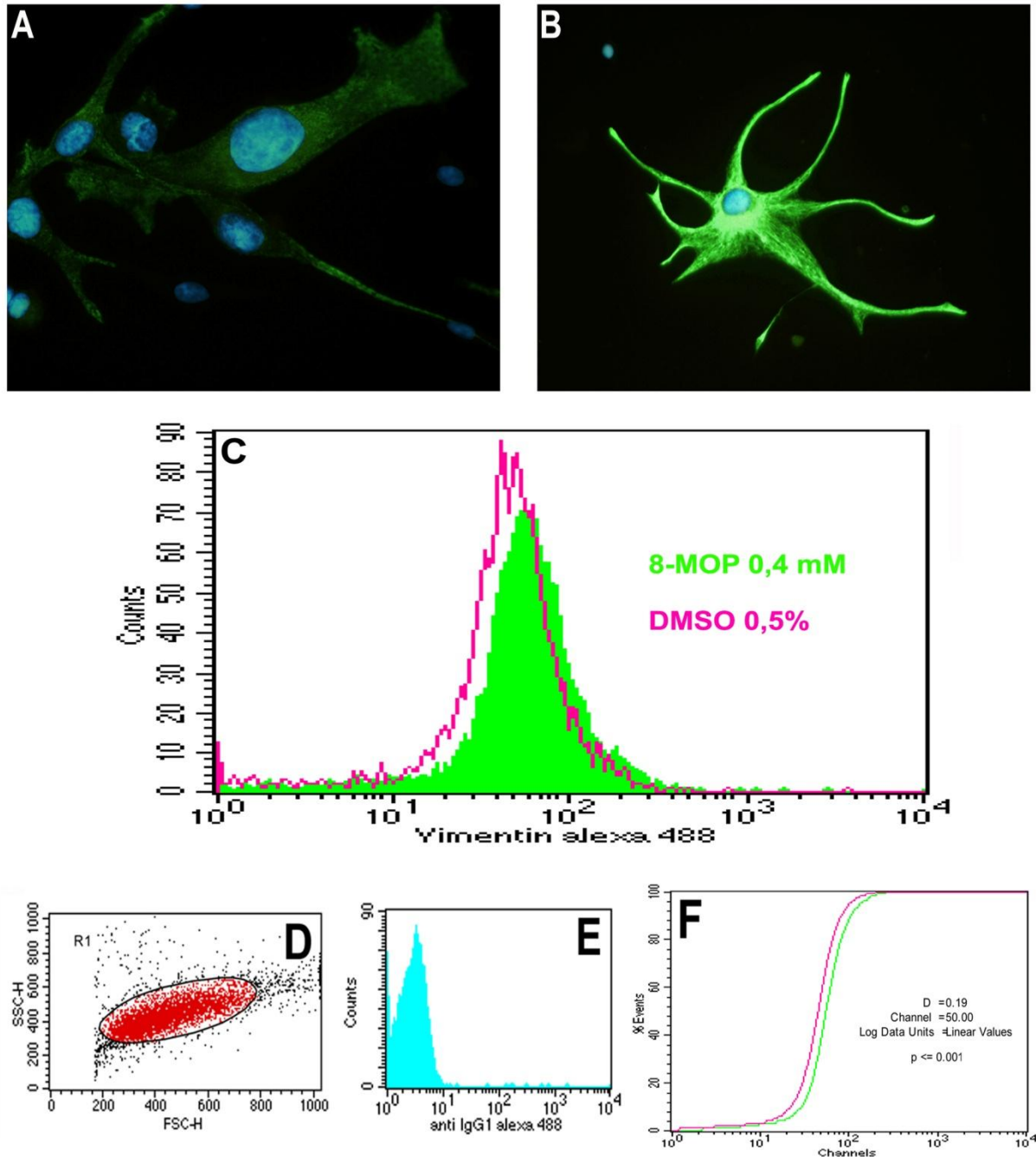


Figura 34. Expressão de vimentina por células GL-15 antes (A) e depois (B) do tratamento com 8-MOP. A análise por citometria de fluxo confirma o aumento na intensidade da marcação sem, contudo, demonstrar aumento no percentual de células marcadas (C). Em D, E e F são mostrados, respectivamente, o *gate* de análise, o controle negativo incubado apenas com o anticorpo secundário e a comparação da intensidade de fluorescência nos grupos controle e tratado.

Uma vez caracterizada a ação do 8-MOP, e já que este demonstrou interessante potencial antitumoral *in vitro*, partiu-se para a investigação da relevância de grupamentos químicos da estrutura molecular dessa droga. Para isso, foram adquiridos comercialmente compostos relacionados ao 8-MOP, mas sem a metoxila no carbono 8 ou sem esta e o anel furano (figura 35 A-B). Foram estudados também compostos de origem natural isolados de *Metrodorea mollis* (figura 35 D-F) não psoralênicos, mas com uma metoxila no carbono 7 que deixa um átomo de oxigênio praticamente na posição daquele do anel furano, e um derivado de psoraleno tri-metilado de uso clínico (figura 35 G). Apesar de estruturalmente relacionados, os compostos divergem em características extremamente relevantes para atividade biológica, como propriedades físico-químicas e mesmo diferentes grupamentos potencialmente farmacofóricos.

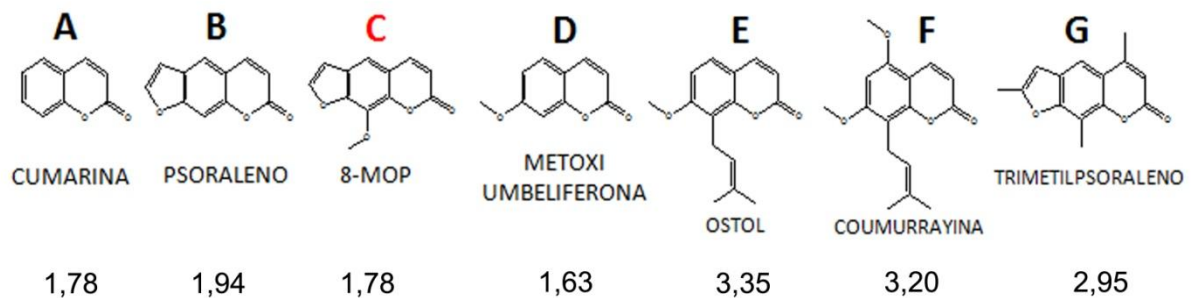


Figura 35. Derivados cumarínicos estruturalmente relacionados ao 8-MOP e valores teóricos de logP para cada composto.

O teste do MTT foi utilizado como triagem de atividade biológica dos compostos, que foram usados em concentrações crescentes por 48 horas em culturas sub-confluentes das três linhagens celulares utilizadas no estudo (figura 36).

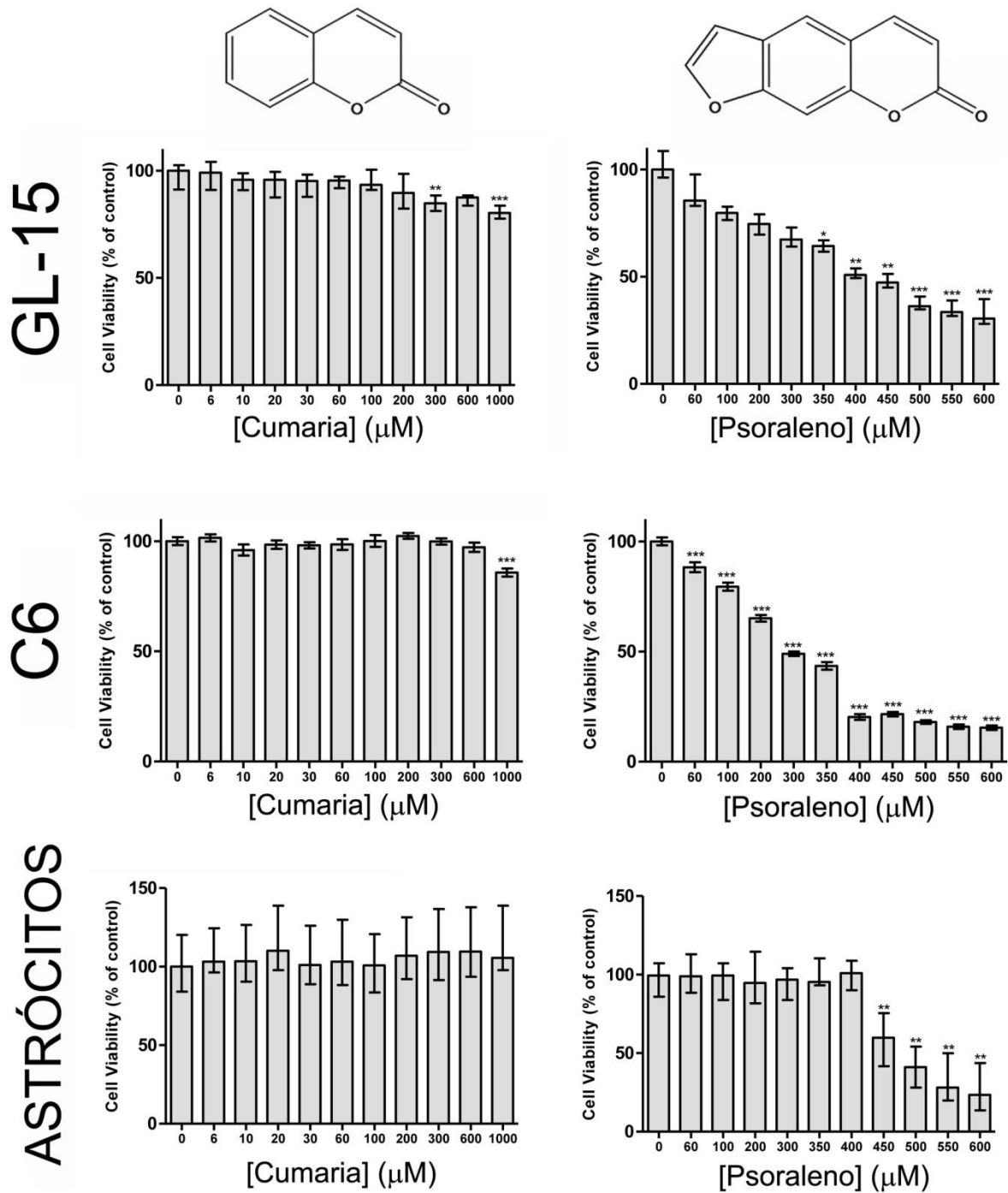


Figura 36. Avaliação da redução de viabilidade de células tumorais e normais medida pelo teste do MTT após tratamento de culturas sub-confluentes com derivados cumarínicos por 48 horas. Resultado dos testes com os compostos cumarina e psoraleno. Os dados estão expressos em média e erro normal padrão ou mediana e percentís, de acordo com a distribuição, e foram analisados por os testes estatísticos adequados para cada caso (ver item 5.2.24). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,001$ para comparação com grupo tratado apenas com veículo (DMSO 0,5%).**

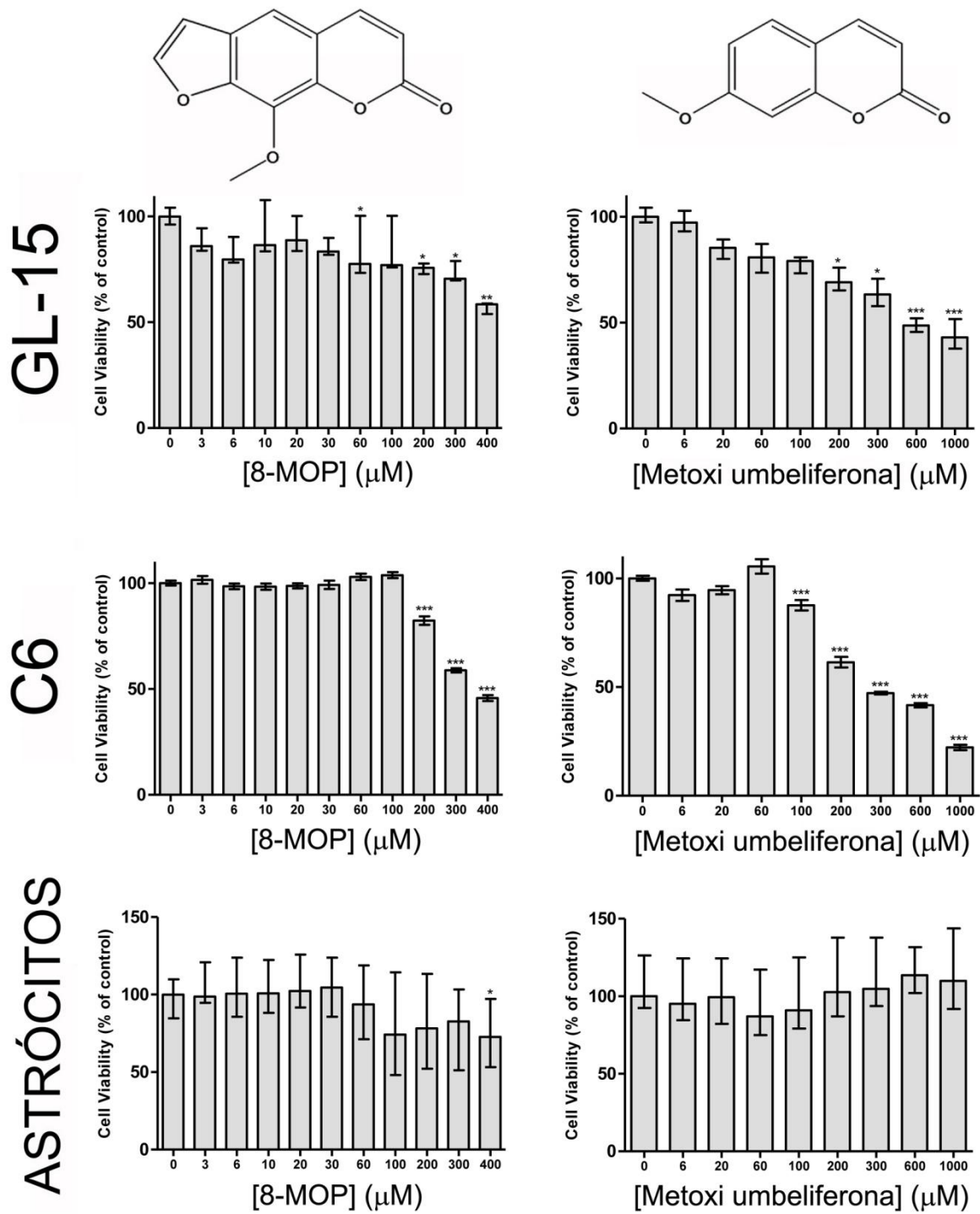


Figura 36. Resultado dos testes com os compostos 8-MOP e metoxi umbeliferona. Os dados estão expressos em média e erro normal padrão ou mediana e percentís, de acordo com a distribuição, e foram analisados por os testes estatísticos adequados para cada caso (ver item 5.2.24). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ para comparação com grupo tratado apenas com veículo (DMSO 0,5%).

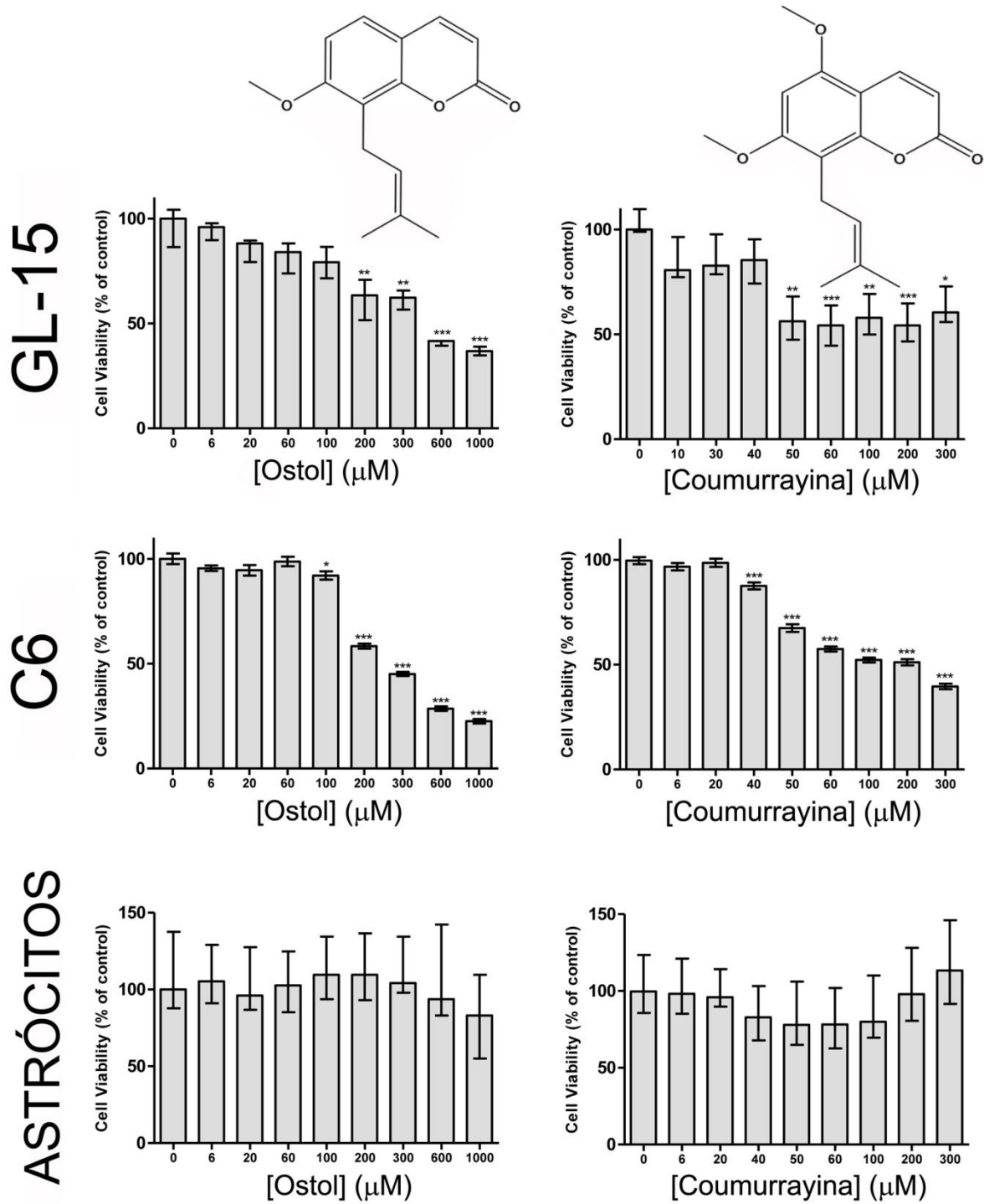


Figura 36. Resultado dos testes com os compostos ostol e coumurrayina. Os dados estão expressos em média e erro normal padrão ou mediana e percentís, de acordo com a distribuição, e foram analisados por os testes estatísticos adequados para cada caso (ver item 5.2.24). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ para comparação com grupo tratado apenas com veículo (DMSO 0,5%).

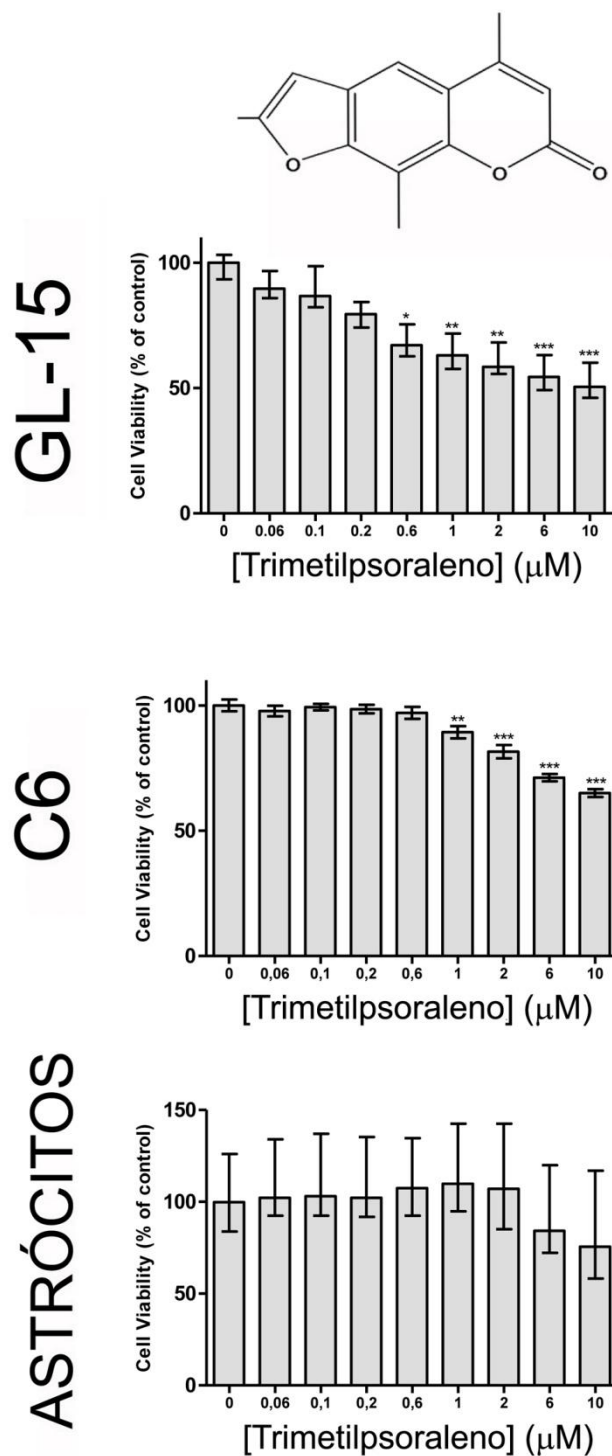


Figura 36. Resultado dos testes com o composto trimetilpsoraleno. Os dados estão expressos em média e erro normal padrão ou mediana e percentís, de acordo com a distribuição, e foram analisados por os testes estatísticos adequados para cada caso (ver item 5.2.24). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ para comparação com grupo tratado apenas com veículo (DMSO 0,5%).

Aparentemente o núcleo cumarínico sozinho não apresenta atividade considerável, ao passo que o psoraleno não metoxilado é ativo tanto para células tumorais como para os astrócitos. Se, no entanto, o anel furano é retirado da estrutura, mas o átomo de oxigênio preservado, como na estrutura da metoxiumbeliferona, a atividade permanece restrita às células tumorais. Além disso, a presença de grupamentos polares, como prenila ou metila, parece potencializar o efeito. Porém, de forma geral, todos os derivados cumarínicos apresentaram atividade mais considerável nas células tumorais que nas normais (figura 37).

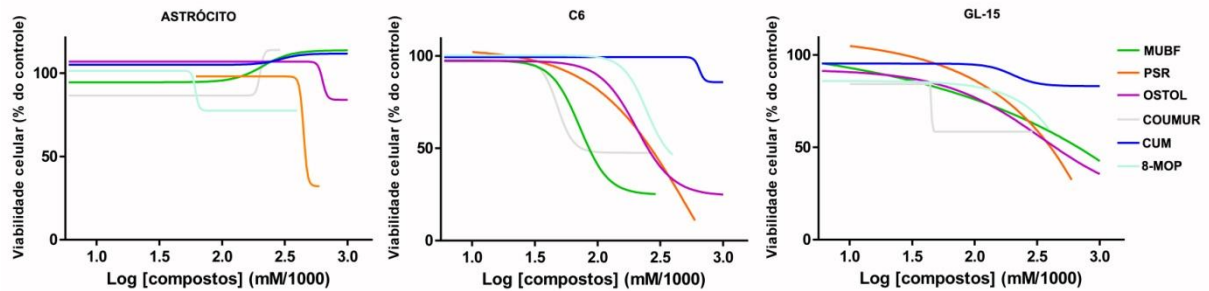


Figura 37. Perfil de toxicidade de derivados cumarínicos nas diferentes linhagens. As curvas são resultado de regressão não linear dos dados apresentados na figura 39. O trimetilpsoraleno não foi representado por apresentar ação em escala de concentração muito inferior à dos demais compostos. Tempo de tratamento: 48 horas (culturas sub-confluentes). MUBF = metoxiumbeliferona, PSR = psoraleno, COUMUR = coumurrayina, CUM = cumarina.

Além da atividade de redução da viabilidade celular (não foi investigado se por ação citotóxica ou citostática), alguns dos compostos também promoveram alterações visíveis na morfologia das células tumorais (figura 38).

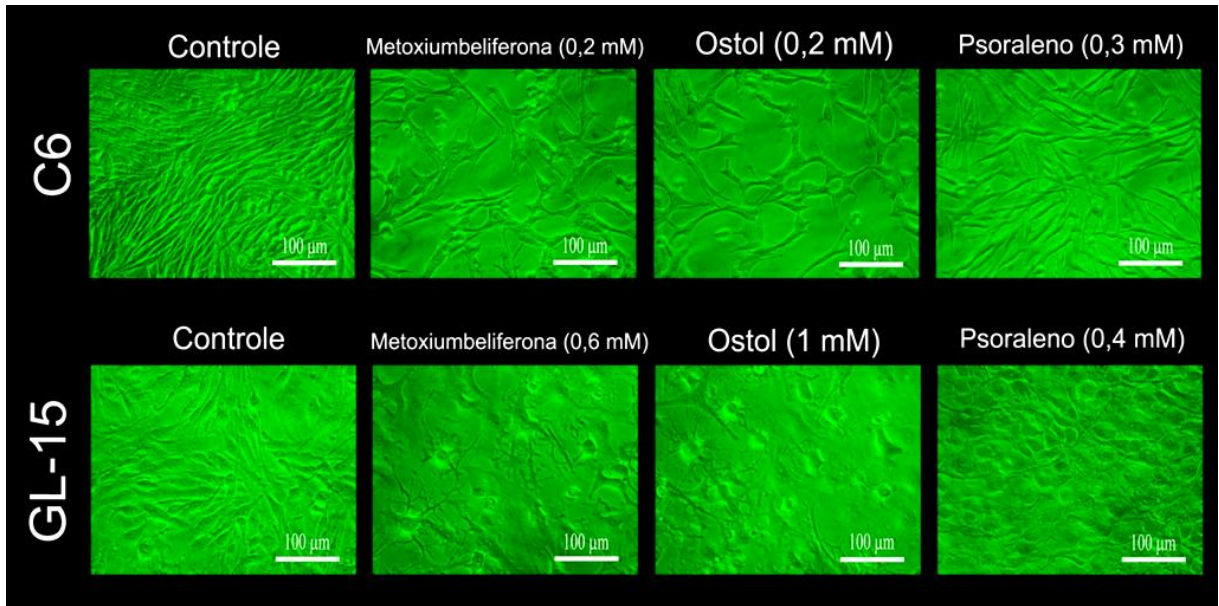


Figura 38. Fotomicrografias de contraste de fase mostrando alterações morfológicas promovidas pelo tratamento de culturas de células tumorais com as drogas metoxiumbeliferona, ostol e psoraleno. Tempo de tratamento: 48 horas (culturas sub-confluentes).

O 8-MOP, portanto, além de apresentar grande potencial para aplicação farmacológica devida a sua propriedade quimiossensibilizante via inibição da GST- π e a sua atividade anti-tumoral intrínseca, com capacidade de, dentre outras coisas, reduzir a taxa de proliferação celular, pode ser um mero representante de toda uma nova classe de derivados cumarínicos com atividades biológicas de grande interesse. A ação mais acentuada de alguns desses derivados testados contra células tumorais aponta, inclusive, para a possibilidade de compostos diferentes do 8-MOP com maior potencial terapêutico.



DISCUSSÃO

A super-expressão de GSTs em muitos tipos de tumores inspira uma série de estudos com pró-fármacos (ativados por GST) na tentativa de uma ação relativamente seletiva contra células tumorais (PEZZOLA et al., 2010; JOHANSSON et al., 2011; KOGIAS et al., 2011), além de agentes capazes de regular negativamente a expressão dessas enzimas (ZHAO et al., 2011) ou, principalmente, possíveis inibidores da atividade catalítica das GSTs, alvejando contornar a resistência à quimioterapia apresentada por estes tumores (CUI et al., 2008; TENTORI et al., 2011). No entanto, atualmente ainda não se tem nenhuma estratégia terapêutica calcada nessa abordagem que se apresente consistente o suficiente para justificar sua implementação na prática clínica. Em um estudo de fase I, por exemplo, a pró-droga ativada por GST conhecida cohosainmo brostalicina demonstrou sérios efeitos colaterais hematológicos (CAPONIGRO et al., 2010). O ácido etacrínico (figura 39), clássico inibidor de algumas isoformas de GST, já chegou a ser utilizado terapêuticamente na sensibilização de tumores à ação citotóxica de agentes alquilantes, mas teve sua utilização clínica desencorajada também devido a efeitos colaterais importantes (QUESADA-SORIANO et al., 2011).

Diante desse cenário, em que se mostra necessária a busca por alternativas no tratamento baseado em GST, este trabalho apresenta o 8-MOP, um composto de estrutura relativamente simples, como um promissor inibidor da isoforma π dessa enzima (isoforma mais frequentemente associada à resistência em tumores), embora não seja descartada a possibilidade dessa substância agir também sobre outras isoformas.

Apesar de ser esta a primeira vez que se descreve atividade inibitória de GST para um derivado de psoraleno, achados recentes já apontavam evidências de tal atividade. Desde meados da última década já se viam na literatura especializada trabalhos propondo algumas pequenas moléculas de origem natural como quimiomoduladores por terem tendência em inibir GSTs (HAYESHI et al., 2007), como é o caso da esculetina, um derivado cumarínico estruturalmente semelhante ao 8-MOP que inibiu GSTs de origem vegetal (HOSSAIN et al., 2009). Outro indício da relação entre psoralenos e GST é o fato do polimorfismo de GSTs influenciar no resultado da terapia PUVA com 8-MOP, embora concentrações plasmáticas da

droga não tenham sido associadas aos diferentes genótipos de GST- π (IBBOTSON et al., 2011).

O 8-MOP reduziu, *in vitro*, a atividade da GST- π humana de forma concentração-dependente, reduzindo também a atividade total de GST em lisado de células de glioblastoma humano. Nestas células, por mais que a droga pareça ter induzido uma expressão mais acentuada da enzima, não houve aumento na atividade da GST total, o que poderia ser explicado pela ação inibitória em si, ou por uma redução proporcional da expressão de outras isoformas. Ainda que esta última hipótese não tenha sido estudada, se o 8-MOP promovesse aumento da atividade da GST- π tornaria as células ainda mais resistentes aos quimioterápicos, e justamente o contrário foi observado; assim, os achados imunocitoquímicos não invalidam o potencial terapêutico do composto.

Estudos de cinética enzimática demonstraram que tal inibição é do tipo reversível competitiva para concentrações fixas de glutation reduzido, o que indica que a droga age no sítio ativo da enzima, ocupando especificamente o sítio H (de ligação de substratos hidrofóbicos), mas apesar disso, não é um substrato, pois não sofre conjugação com GSH, como comprovam os dados espectrofotométricos e cromatográficos.

Testes adicionais apontaram, ainda, que o composto não é substrato de outras isoformas presentes nas células tumorais, pois não promove depleção de GSH intracelular. Em tais testes foi usado o agente monoclorobimano (MCB), que também é substrato de diversas isoformas de GSTs (EKLUND et al., 2002), apresentando fluorescência quando conjugado com o GSH. Assim, a fluorescência observada reflete, não apenas o conteúdo citoplasmático de glutation reduzido, mas também a atividade das GSTs (UBLACKER et al., 1991). Como foi possível observar fluorescência após tratamento com o inibidor 8-MOP, presume-se que essa droga apresente certa seletividade de ação, não inibindo todas as isoformas da enzima, ou simplesmente confirma-se o caráter reversível e competitivo da inibição, pois, após o tratamento, as células são lavadas antes da adição de elevada concentração do MCB.

Não são recentes as pesquisas por inibidores efetivos de GST para uso na terapia do câncer. Há quase duas décadas estudos clínicos já apontavam o potencial do ácido etacrínico como modulador de resistência a drogas (LACRETA et al., 1994). Ao mesmo tempo, o inibidor seletivo da GST- π TER-117 foi sintetizado (LYTTLE et al., 1994), mas não obteve muito sucesso como agente terapêutico, não havendo estudos recentes com esta droga. Algum tempo depois, outros inibidores seletivos de GST- π demonstraram ser capazes de reverter a resistência a drogas em colangiocarcinomas (NAKAJIMA et al., 2003), mas talvez o

composto mais promissor nesse campo seja o NBDHEX (PARKER et al., 2008) (figura 39), um representante da nova classe de derivados do 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD) que apresenta a vantagem de não ter ação GSH-peptideomimética (RICCI et al., 2005). O grande problema dos inibidores com ação GSH-peptideomiméticas é que estes, assim como os conjugados de compostos exógenos com GSH, são reconhecidos e eliminados pelas bombas de efluxo de drogas, principalmente a MRP 1 (*multi-drug resistance protein*), o que reduz sua eficiência terapêutica (DEPEILLE et al., 2005).

O NBDHEX aumentou a eficácia do agente alquilante temozolomida em um modelo *in vivo* de melanoma (TENTORI et al., 2011), revertendo parcialmente também a quimiorresistência em células de osteossarcoma (PASELLO et al., 2008).

Moléculas com comprovada ação inibitória da GST- π (figura 39) comumente compartilham características como peso molecular relativamente baixo e moderada hidrofobicidade, como é o caso do ácido etacrínico, clorambucila, o próprio NBDHEX e a vitamina E, cujo núcleo guarda, inclusive, certa semelhança com o núcleo cumarínico.

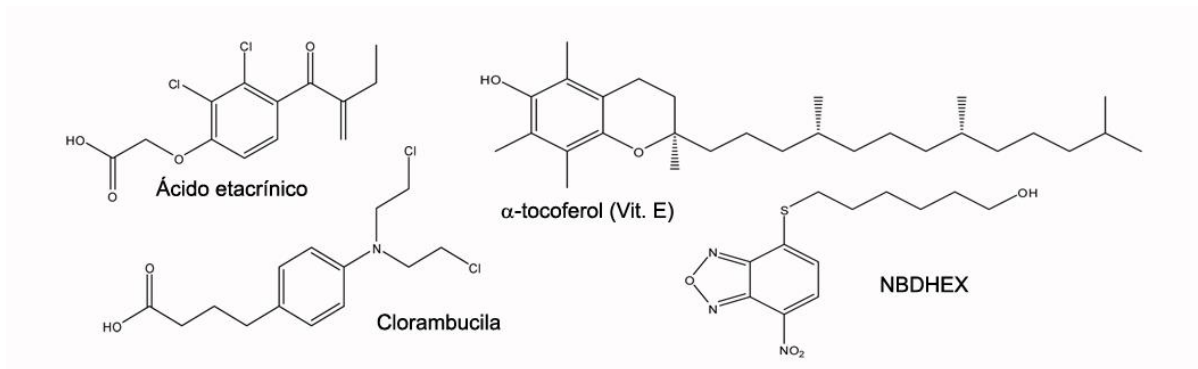


Figura 39. Estrutura molecular de inibidores de GST- π .

Tais características estão também presentes no 8-MOP, e garantem ao composto, que também é um inibidor não peptideomimético, maior facilidade em atravessar membranas biológicas. A simplicidade estrutural fala ainda a favor de uma síntese mais acessível.

Outra vantagem importante do 8-MOP frente aos demais inibidores é a possibilidade de execução de testes em humanos em curto prazo, uma vez que já existem ensaios clínicos com essa droga, ainda que para outras finalidades terapêuticas (BERROETA et al., 2010). De fato, estudos clínicos com derivados do psoraleno são realizados desde os anos 1970, e o perfil de toxicidade de muitos desses compostos em humanos já é bem conhecido (SEHGAL et al., 1975).

Compostos conjugados com GSH, como já mencionado, podem ser eliminados do meio intracelular por ação de bombas de efluxo. Já foi demonstrado que a co-expressão de GST- π e MRP1 está associada à resistência aos agentes quimioterápicos doxorubicina, vincristina e etoposídeo (O'BRIEN et al., 2000; DEPEILLE et al., 2005). A ação quimiossensibilizante do 8-MOP foi testada para cada uma dessas drogas em células de glioblastoma humano, e para TMZ, agente de escolha na quimioterapia desse tipo de câncer, sendo efetivo quando coadministrado com esta última e com o etoposídeo. Uma possível explicação para a ausência da ação com as outras duas drogas pode estar no fato de que o mecanismo de ação quimiossensibilizante se baseia na inibição competitiva da enzima, razão pela qual a efetividade pode não ser observada com drogas para as quais a GST tem menor Km. Assim, uma futura aplicação clínica deve ser precedida de testes com associação com diversos quimioterápicos e em diversos tipos de câncer, a fim de se descrever as condições em que a resposta será satisfatória.

Mais interessante que o esperado efeito de aumentar o potencial citotóxico do etoposídeo, no entanto, foi a sensibilização à ação da TMZ. Este resultado surpreende por duas razões: Primeira, por ter se usado uma linhagem totalmente refratária a essa droga, de forma que o 8-MOP não aumentou uma resposta, mas sim tornou possível um efeito antes inexistente. Segunda, porque não há relatos de que a TMZ seja substrato da GST- π . Tal resultado não é, contudo, contraditório, visto que muitas células que super-expressam essa enzima são realmente resistentes a drogas sobre as quais ela não atua cataliticamente (MCILWAIN et al., 2006; TEW et al., 2011), o que é verdade também para células de glioblastoma (LO et al., 2004). Essas drogas, apesar de não serem substratos para GST, têm seus mecanismos de ação ligados à indução de apoptose por vias específicas que podem ser moduladas negativamente pela GST- π (o que explica a relação entre a expressão dessa e a resistência).

De fato, a GST- π pode ligar-se à proteína c-Jun N-terminal cinase, mais conhecida como JNK, impedindo a fosforilação desta e, conseqüentemente, bloqueando sua atividade cinase sobre c-Jun e toda a via apoptótica (ou de proliferação/diferenciação) dependente deste (TOWNSEND, 2007) (figura 40). A oligomerização da GST- π a desliga da JNK, desbloqueando a via que, tendo sido disparada por estímulos apoptóticos, levará à morte celular (LABORDE, 2010). A formação do dímero influencia negativamente na atividade catalítica da enzima (BERNARDINI et al., 2000), e diversos inibidores da atividade de GST- π , incluindo o próprio ácido etacrínico, também promovem essa oligomerização, de forma reversível ou não, a depender da natureza do inibidor (SÁNCHEZ-GÓMEZ et al., 2010).

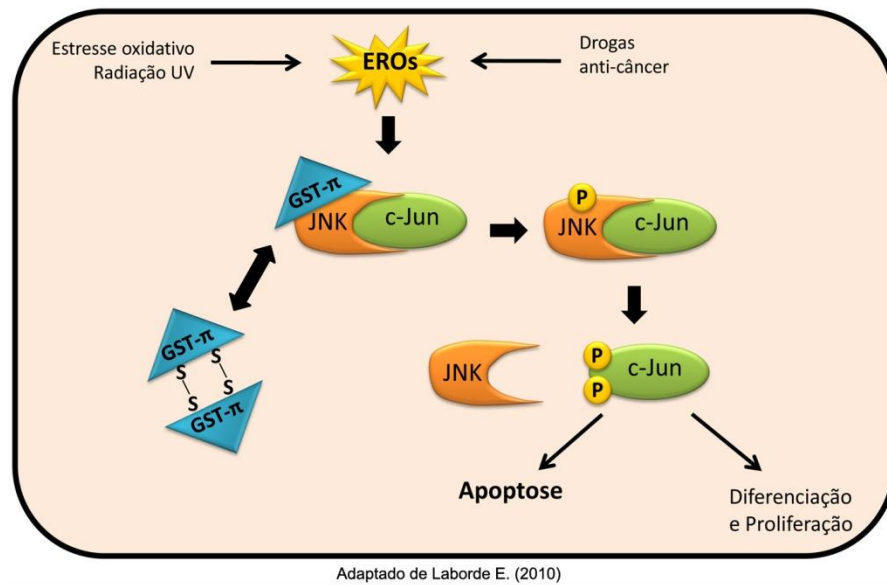


Figura 40. Função não enzimática da GST- π . Esquema demonstrativo do papel regulatório da GST- π na via da JNK para indução de apoptose ou proliferação celular.

Inibidores de GST podem ainda ter outras utilidades terapêuticas além da sensibilização à quimioterapia, seja pela potencial atividade mieloproliferativa, pelas implicações na resposta ao estresse oxidativo, ou até mesmo na melhoria da abordagem terapêutica de doenças infecciosas, já que possivelmente essa enzima tenha um papel importante na resistência a antiparasitários como a cloroquina (MAHAJAN & ATKINS, 2005). A GST pode, ainda, ter importante papel na etiologia de outras doenças, incluindo doenças neurodegenerativas, esclerose múltipla e asma (TEW, 1994; BAEZ et al., 1997; MAPP et al., 2002), e está também envolvida na biossíntese de metabólitos importantes do ácido araquidônico, tais como prostaglandinas e leucotrienos, mediadores inflamatórios, de forma que a modulação desta enzima poderia ainda ser útil no controle dos níveis dessas substâncias (BLADEREN & OMMEN, 1991).

Além da ação inibitória de GST- π , ou talvez por causa dessa ação, o 8-MOP também apresentou outra interessante atividade biológica. Os testes de MTT com placa confluyente e dosagem de proteínas totais deixaram claro que o 8-MOP apresenta um efeito citotóxico que exibiu relativa seletividade para as células tumorais usadas no modelo, e dentre estas, para as de origem humana. Já os resultados do ensaio do azul de Tripan, teste muito utilizado como parâmetro de avaliação tanto de viabilidade quanto de proliferação celular (CAVALIERI et al., 2004; BETTI et al., 2006; AMENDOLA et al., 2009), sugerem que a redução na viabilidade se deve a uma atividade antiproliferativa da droga, que inclusive pôde ser

visualizada em tratamento de longa duração com baixas concentrações, o que fala a favor do uso terapêutico do 8-MOP. Tal interpretação vem do fato de que o pequeno percentual de células mortas encontrado não justificaria a marcante redução no número total de células ao fim do período de tratamento. De qualquer forma, o tipo de morte foi investigado, e percebeu-se que o 8-MOP pode induzir apoptose, não sendo detectada morte por necrose, característica apontada pela literatura corrente como indicativa de potencial antitumoral (CALL et al., 2008), principalmente se a molécula exibe concomitantemente, como é o caso, propriedade antiproliferativa (BERNARDI et al., 2008).

O mecanismo molecular de indução de apoptose quando em altas concentrações pode estar relacionado com a atividade inibitória de GST- π , devido à relação já citada entre esta enzima e vias apoptóticas. Atividade pro apoptótica já foi descrita para outros inibidores de GST (TURELLA et al., 2005). O próprio NBDHEX, por exemplo, demonstrou atividade citotóxica via ativação da via JNK/c-Jun (TREGNO et al., 2009).

Apesar de apresentar maior atividade relativa de GST total, a expressão da isoforma π da enzima nos astrócitos foi comparável a expressão nas células tumorais, o que responde pela ausência de seletividade na promoção de apoptose pela droga. Quando se considera o efeito de inibir a proliferação celular, no entanto, fica claro que as células de glioma são mais susceptíveis, provavelmente por apresentarem ciclo celular mais rápido, com mitoses mais freqüentes que em células normais, o que demonstra, uma vez mais, que o efeito anti-proliferativo do 8-MOP se sobrepõe ao indutor de apoptose.

Corroborando com essa idéia, quando testes em culturas sub-confluentes foram realizados o padrão de citotoxicidade se inverteu, as células de glioma de rato (C6) demonstraram maior sensibilidade ao 8-MOP que as de glioblastoma humano (GL-15), o que pode ser explicado pelo fato de células C6 se multiplicarem mais rapidamente que GL-15, sofrendo assim maior impacto de um composto com atividade anti-proliferativa. Além disso, é comum que linhagens de tumores de rato sejam mais sensíveis a drogas que linhagens de tumores humanos (WOLFF et al., 1999).

O estudo do efeito do 8-MOP sobre a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo, bem como o teste de formação de colônia, sugerem que a droga não interrompe o ciclo celular, mas torna mais lento o processo de multiplicação, o que pode fazer desse composto um quimioterápico mais seguro, já que alguns dos efeitos colaterais das drogas antitumorais vêm do fato de muitas destas promoverem parada do ciclo celular (BRUNTON et al., 2006).

Atividade anti-proliferativa é um interessante efeito biológico que faz de uma substância uma potencial droga anti-câncer, por isso tal efeito é extensivamente pesquisado

em diversas moléculas utilizando-se modelos de culturas de células tumorais, por exemplo, de glioma (BRAGANHOL et al., 2006; PRADO et al., 2007; WANG et al., 2009). Muitos derivados da cumarina já foram apresentados como candidatos a novos agentes para tratamento de câncer (LACY & O'KENNEDY, 2004). Dentre os diversos efeitos atribuídos a estes derivados, o antitumoral aparece em alguns trabalhos (KOSTOVA, 2005; BELLUTI et al., 2010; DEVJI et al., 2011). Furanocumarinas (derivados do psoraleno) isoladas de *Angelica dahurica*, por exemplo, apresentaram atividade anti-proliferativa *in vitro* (KIM et al., 2007), e para o 5-metoxipsoraleno (5-MOP) já foram demonstradas atividades inibitória do crescimento e promotora de apoptose (LEE et al., 2003). Novobicina, outro composto cumarínico, apresentou atividade anticancerígena por se ligar à chaperona Hsp90 (DONNELLY et al., 2008). Além disso, cumarinas vem sendo quimicamente ligadas a oligonucleotídeos *antisense* para aumentar a captação e distribuição celular destes em métodos para tratar tumores (KONG-BELTRAN & WICKRAMASINGHE, 2010).

Apesar do envolvimento direto da GST- π na proliferação celular (HE et al., 2011), mecanismos de ação alternativos podem explicar a ação antiproliferativa do 8-MOP, como ação direta no DNA, por exemplo. Os derivados de psoraleno, como é o caso do 8-MOP, possuem natureza hidrofóbica e estrutura aromática planar que possibilita a intercalação entre pares de bases nitrogenadas no DNA, preferencialmente nos sítios 5'-TA-3' (CAO et al., 2008; WU et al., 2009). A irradiação com ultra-violeta (UVA: 320-400 nm) da molécula intercalada leva a formação de monoaddutos e diadutos (ligações cruzadas entre as fitas de DNA, ou *ICL*, do inglês *interstrand DNA cross-links*) (figura 41) (RODIGHIERO, 1996), além de fotoadutos na membrana fosfolipídica (ZARESBSKA et al., 2000). Esta é a base do mecanismo da terapia PUVA. A formação de ICL também pode ser causada por agentes alquilantes bifuncionais, classe de quimioterápicos usada no tratamento de muitos tipos de câncer (ZHENG et al., 2006).

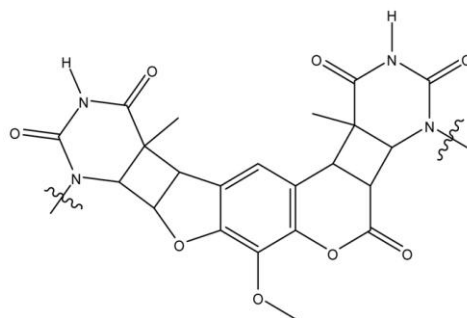


Figura 41. Estrutura de ICL formado pelo 8-MOP após irradiação com ultravioleta ligando as timidinas das duas fitas de DNA. Os anéis de desoxirribose e os grupamentos fosfato foram excluídos do esquema juntamente com o restante das fitas para facilitar visualização (adaptado de CAO et al., 2008).

No entanto, a simples intercalação de moléculas planares, mesmo sem a formação de ICL, pode interferir na conformação helicoidal do DNA, dificultar a implantação da forquilha de replicação e atrapalhar o processo de divisão celular, de forma que agentes intercalantes vem sendo usados farmacologicamente, não apenas como antineoplásicos, mas também antiparasitários, antibióticos e antifúngicos (PALCHAUDHURI & HERGENROTHER, 2007). Isso poderia explicar a atividade apresentada pelo 8-MOP no modelo estudado, que não incluiu radiação ultra-violeta.

De fato, algumas furanocumarinas exibiram atividade biológica, incluindo antiproliferativa, mesmo no escuro (sem irradiação) (RODIGHERO, 1996). Existem, inclusive, evidências de que o próprio 8-MOP interfira na taxa de proliferação de células de linfoma T também na ausência de radiação UV (BARTOSOVÁ et al., 2006). Outros derivados cumarínicos, especialmente pirrolocumarinas, também reduziram a proliferação celular no escuro, mas nesse caso, conjectura-se que devido a interações com a topoisomerase (GUIOTTO et al., 1995; DIWAN & MALPATHAK, 2009).

Se a ação do 8-MOP, medida pelo teste clássico do MTT, for comparada com a ação da temozolomida (TMZ) em células de glioma, vê-se claramente que a resposta das células C6 a esse agente alquilante (DE OLIVEIRA et al., 2009) é menos pronunciada em relação ao 8-MOP. Já as células GL-15 (de origem humana), são totalmente resistentes à ação da TMZ, mas respondem ao tratamento com o derivado psoralênico. Na verdade, o 8-MOP na concentração de 0,2 mM, por exemplo, foi mais efetivo contra GL-15 que a mesma concentração de TMZ, sob mesmas condições de tratamento, foi para células de glioma das linhagens GOS-3 e U-87, sensíveis à droga (PATEL et al., 2008). Além disso, 1 mM de TMZ reduziu em 49,83% (em média) a viabilidade de células de gliomas de seis pacientes (PÉDEBOSCQ et al., 2007), enquanto 0,4 mM de 8-MOP reduziu em 41,68%, sob mesmas condições de tratamento, a viabilidade de GL-15, além de apresentar efeito mesmo em baixa concentração (0,02 mM) quando aumentado o tempo de exposição.

Apesar do melhor resultado, a mais alta concentração de 8-MOP usada (0,4 mM) ainda está abaixo da concentração plasmática que pode ser atingida pela TMZ (2 mM) (FRUEHAUF et al., 2006), e apesar da concentração plasmática do 8-MOP em terapia PUVA estar na ordem de μM e até nM (TEGEDER et al., 2002), estudos de farmacocinética demonstraram que concentrações plasmáticas tão altas quanto 1 mM podem ser alcançadas com segurança (BILLARD et al., 1995). O maior obstáculo farmacocinético imposto contra drogas que agem em tumores cerebrais, porém, não é tanto a concentração plasmática, quanto o acesso ao sítio de localização do tumor, protegido pela barreira hemato-encefálica (BHE)

(NAKAMURA et al., 2011). O gemcitabine (análogo de nucleosídeo), por exemplo, apesar do efeito citotóxico em células C6, possui uma baixa disponibilidade para o tecido cerebral, o que limita seu uso como quimioterápico para tratamento de tumores do SNC (WANG et al., 2009). O valor de logP, comumente usado como preditor da capacidade de um composto em atravessar a BHE (ZERARA et al., 2009), calculado para o 8-MOP fala a favor da boa disponibilidade deste para as células tumorais *in situ*. Além das evidências teóricas, achados experimentais e clínicos também apontam para a capacidade desse composto de vencer a BHE, como a ação anticonvulsivante em modelo animal (ŁUSZCZKI et al., 2010) e distúrbios neurológicos e ações no sistema nervoso central (insônia, depressão, enxaqueca, disfunção visual etc.) em pacientes em uso da droga para outras finalidades terapêuticas (VERNASSIÈRE et al., 2006).

O estudo da morfologia celular demonstrou que a seletividade da ação do 8-MOP em células tumorais não se restringe ao fato destas proliferarem mais rapidamente que as normais; a retração citoplasmática e formação de estruturas de membrana semelhantes a filopódios induzida pela droga parecem ser fenômenos ligados a uma via de sinalização exclusiva, ou preponderante, nas células de glioma, já que tais achados não se reproduziram nos astrócitos. Os filopódios, porém, por mais que dêem informações importantes sobre possíveis vias envolvendo filamentos de actina do citoesqueleto que poderiam sofrer modulação pela droga (SCHÄFER et al., 2010), são frequentemente, mas não necessariamente, associados à capacidade de migração das células (ARJONEN et al., 2011). Para avaliar, portanto, se o 8-MOP poderia aumentar o potencial migratório (e possivelmente a capacidade de invasão do tumor) o teste de migração foi feito com as células tumorais. Surpreendentemente, a droga teve o efeito oposto, dificultando, aparentemente, o movimento das células na placa de cultura.

Esta aparente redução na taxa de migração celular pode estar relacionado com a atividade inibitória de GST- π já demonstrada. Evidências experimentais apontam que esta enzima pode influenciar positivamente, de forma direta, fenômenos como migração e proliferação celular (LABORDE, 2010); em um experimento *in vitro* para avaliar migração de células tumorais utilizando a mesma metodologia aplicada neste trabalho, foi demonstrado que o tratamento das culturas com GST- π exógena aumenta a taxa de migração, no mesmo trabalho verificou-se que as enzimas permanecem ligadas à superfície celular, levando à sugestão da existência de um receptor para GST (HE et al., 2011).

A análise ultra-estrutural, por sua vez, mostrou que o 8-MOP aumenta a taxa de autofagia nas células tumorais. O efeito não foi notado nos astrócitos porque nestes a taxa de

autofagia já estava elevada mesmo em condições controle (o que pode representar um artefato da técnica utilizada, na qual o descolamento das células é feito por tripsinização, procedimento que afeta principalmente células de alto poder aderente, como os astrócitos). Apesar dessa limitação, a comparação entre grupos controle e tratado, entre as células tumorais, chama atenção para mais este efeito do 8-MOP. Já foi demonstrado que a própria TMZ induz formação de autofagossomos (KANZAWA et al., 2004), e inclusive, que compostos que aumentam o potencial dessa droga, aumentam também a taxa de autofagia, como foi demonstrado por análise ultra estrutural para a associação de talidomida e TMZ no tratamento, *in vitro*, de células de glioma da linhagem U251-MG (GAO et al., 2009). Recentemente, vias de autofagia vêm sendo apontadas como alvos interessantes para a busca de novos agentes antitumorais (MESCHINI et al., 2011).

Estes achados reforçam o potencial antitumoral do 8-MOP, mas apesar da ação seletiva demonstrada, outro fenômeno deve ser levado em consideração: a ativação astrocitária.

Astrócitos, como os utilizados nesse estudo, podem tornar-se reativados mediante estímulos lesivos de natureza física ou química, apresentando, quando nesse estado, alta taxa de proliferação (gliose), mudança do perfil metabólico, na morfologia e na expressão de algumas proteínas. Nessas condições, os astrócitos podem interferir na homeostasia do tecido e levar a danos diversos em células normais (HAMBY & SOFRONIEW, 2010). A presença de uma droga pode promover a ativação astrocitária, o que pode ser identificado através da imunomarcção da proteína GFAP (SILVA et al., 2007); assim, essa marcação foi feita em astrócitos tratados com 8-MOP, ainda que os achados de microscopia já sugerissem que tal ativação não ocorresse. A droga não alterou a expressão de GFAP, demonstrando, cada vez mais, um perfil de segurança adequado para futura aplicação *in vivo*.

Além de ser indicativo de ativação das células da glia, GFAP, bem como outras proteínas de filamento intermediário, como vimentina e nestina, são consideradas marcadores de prognóstico. Enquanto a expressão de GFAP indica células menos indiferenciadas e parece proteger da disseminação das células do tumor pelo líquido cefalorraquidiano (MINAMI et al., 1993; MASLEHATY et al., 2011), a marcação positiva para vimentina e nestina, proteínas expressas normalmente por células em estágios iniciais de diferenciação, são indicativos de um desfecho clínico menos favorável (TROG et al., 2006; ZHANG et al., 2008). A modulação dessas proteínas está envolvida não apenas na determinação da morfologia celular, como na capacidade de migração das células tumorais (ZHOU & SKALLI, 2000). O 8-MOP não alterou o padrão de expressão dessas proteínas, com exceção da vimentina em células

GL-15. O aumento na expressão dessa proteína, no entanto, provavelmente deva-se à ação antiproliferativa do 8-MOP, já que a redução da densidade celular na cultura é por si só um estímulo para tal expressão, que ocorre também após tratamento com quimioterápicos clássicos (TROG et al., 2008). As células C6 não expressaram vimentina.

Todos os resultados apresentados fortalecem a hipótese de que o 8-MOP tem grande chance de se tornar um protótipo importante no desenho de novas drogas antitumorais. O efeito dessa droga sob irradiação UV já é bem estabelecido, e apesar de já estarem em estudos pré-clínicos e clínicos o uso de terapia fotodinâmica (ativação de drogas *in situ* por irradiação) em tumores cerebrais (STYLLI & KAYE, 2006; WILSON & PATTERSON, 2008), e até mesmo nano-cintiladores funcionalizados com psoralenos (SCAFFIDI et al., 2011), a descrição de efeito biológico dessas furanocumarinas mesmo sem a irradiação (RODIGHERO et al., 1996) corrobora com a idéia do uso independente da etapa de ativação. Além disso, métodos alternativos de administração *in situ* de drogas podem potencializar ainda mais a ação desses novos agentes terapêuticos (HART et al., 2011; NAKAMURA et al., 2011).

O 8-MOP foi colocado na posição de protótipo uma vez que o entendimento da relação entre estrutura química e atividade biológica pode guiar a síntese ou isolamento de compostos semelhantes com atividade ou característica farmacocinéticas mais adequadas para posteriores testes clínicos. Dalla Via e colaboradores demonstraram que modificações estruturais no 8-MOP originaram compostos com potencial antiproliferativo mais elevado, inclusive na ausência de radiação UV (DALLA VIA et al., 2009). O composto noscapina, que apesar de não ser um derivado cumarínico apresenta semelhanças estruturais com o 8-MOP, também foi capaz de inibir o crescimento de células de glioma resistentes à TMZ (JHAVERI et al., 2011). Diante disso, derivados cumarínicos estruturalmente mais simples que o 8-MOP foram testados quanto à atividade citotóxica em culturas sub-confluentes de células tumorais e normais. Derivados de psoraleno são comumente encontrados em plantas (SANTOS et al., 2008; PARAST et al.; HEINKE et al., 2011), e dado o imenso potencial destas como fontes de novas drogas (LI & VEDERAS, 2009; KARIKAS, 2010), cumarinas isoladas da casca da raiz da planta nativa *Metrodorea mollis* foram incluídas nessas análises.

Os testes mostraram que o anel furano é essencial para a atividade do 8-MOP, pois a benzopirona sozinha não apresentou efeito citotóxico significativo. Além disso, a ausência da metoxila no carbono 8 (formando o psoraleno) torna o composto mais tóxico, mas também menos seletivo, agindo também sobre as células normais, embora nestas, as concentrações necessárias para que se note o efeito sejam mais altas. Os compostos metoxiumbeliferona,

ostol e coumurrayina, de origem natural, apesar de não possuírem o anel furano na estrutura, têm uma metoxila que deixa o oxigênio em posição muito parecida à do oxigênio do furano no psoraleno, sendo que dois deles são prenilados no carbono 8; tais compostos apresentaram atividade em concentrações inferiores às efetivas de 8-MOP, conservando a seletividade por células tumorais, com destaque para o ostol e a metoxiumbeliferona, para os quais a ação concentração-dependente nas células tumorais ficou ainda mais notável. Além disso, os compostos com maior valor de logP apresentaram atividade mais pronunciada, provavelmente devida a maior biodisponibilidade. Dentre estes, o trimetilpsoraleno, que também tem uso clínico regulamentado (JILLSON, 1981) apresentou atividade em concentrações com vezes menor que as do 8-MOP.

Alguns compostos (ostol, metoxiumbeliferona e psoraleno) foram ainda capazes de induzir mudanças morfológicas significativas nas células tumorais em determinadas concentrações. Estudos complementares serão necessários para esclarecer se tais modificações na forma das células são acompanhadas de mudanças fenotípicas quanto ao estado de diferenciação ou expressão de marcadores prognósticos, o que poderia implicar em redução da agressividade do tumor. De qualquer maneira, esses resultados abrem uma perspectiva notável de se descrever não apenas um novo quimioterápico, mas toda uma classe de fármacos derivados de cumarina com atividade antitumoral.

7 CONCLUSÕES

A atividade inibitória de GST- π , aqui pela primeira vez atribuída ao composto 8-metoxipsoraleno, é uma importante ferramenta capaz de auxiliar no tratamento, não apenas de tumores resistentes às terapias convencionais, mas de tantas outras doenças em cujo curso esta enzima tem algum papel relevante. O mesmo composto apresentou, ainda, atividade antitumoral, com potencial para se tornar uma alternativa estratégica aos agentes terapêuticos em uso. Sumariamente, da coleção de dados apresentada, as principais conclusões a que se pode chegar são de que o 8-MOP:

- Inibe, reversível e competitivamente, a GST- π humana, interagindo no sítio H da enzima, não sendo, contudo, metabolizado por esta, o que representa a descoberta de um novo inibidor não GSH-peptidomimético.

- Age como quimiossensibilizante para alguns dos agentes quimioterápicos em uso (temozolomida e etoposídeo), podendo ser associado em concentrações sub-tóxicas a estes para melhorar a resposta de células tumorais.

- Possui ação antiproliferativa *in vitro*, e indutora de apoptose quando em altas concentrações, mostrando ainda ação relativamente seletiva para células de glioma quando comparada com astrócitos normais, além de promover outras alterações celulares restritas às células tumorais.

- Pode representar o primeiro exemplar de uma nova classe de compostos cumarínicos com atividade antitumoral, uma vez que moléculas estruturalmente relacionadas apresentaram indícios de atividade semelhante, ou melhor, quando submetidas a testes *in vitro*.

Vale ressaltar que os efeitos foram encontrados em modelos experimentais que não incluem irradiação com luz ultravioleta (como normalmente é feito em tratamentos que

envolvem derivados de psoraleno), e que o amplo conhecimento que se tem sobre a segurança e os parâmetros farmacocinéticos, não apenas do 8-MOP, mas também de outros derivados de psoraleno, fruto de décadas de uso clínico, deixa esses compostos muito mais próximos de testes em humanos que venham a confirmar a efetividade dos efeitos aqui propostos.

Por fim, usar expressões como “cura” ou “tratamento revolucionário” para se referir a este conjunto de resultados seria, certamente, tão ingênuo quanto irresponsável; mas subestimar o potencial que têm eles de promoverem um avanço real no tratamento de uma série de doenças com histórico de falhas terapêuticas, talvez represente um erro ainda maior. Há, portanto, a perspectiva de aprofundamento dos testes com os derivados cumarínicos a fim de que se chegue ao melhor protótipo para possível melhoramento químico e início de testes em modelos *in vivo*, que se confirmarem a marcante atividade antitumoral aqui proposta, justificarão ensaios clínicos controlados na tentativa de desenvolver um novo produto biotecnológico de grande impacto tanto para os pacientes quanto para a ciência brasileira.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI-OSMAN, F.; BRUNNER, J. M.; KUTLUK, T. M.; HESS, K. **Prognostic significance of glutathione S-transferase π expression and subcellular localization in human gliomas.** *Clinical Cancer Research*, v. 3, p. 2253-2261, 1997a.
- ALI-OSMAN, F.; AKANDE, O.; ANTOUN, G.; MAO, J. X.; BUOLAMWINI, J. **Molecular cloning, characterization, and expression in Escherichia coli of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants - Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 10004-10012, 1997b.
- AMENDOLA, D.; DE SALVO, M.; MARCHESE, R.; FALZACAPPA, C. V.; STIGLIANO, A.; CARICO, E.; BRUNETTI, E.; MOSCARINI, M.; BUCCI, B. **Myc down-regulation affects cyclin D1/cdk4 activity and induces apoptosis via Smac/Diablo pathway in an astrocytoma cell line.** *Cell Proliferation*, v. 42, p. 94-109, 2009.
- ARJONEN, A.; KAUKONEN, R.; IVASKA, J. **Filopodia and adhesion in cancer cell motility.** *Cell Adhesion and Migration*, v. 5, p. 421-430, 2011.
- ARONSON, J. K. **Meyler's side effects of herbal medicines.** Elsevier, Amsterdam. 2009.
- ARRIBAS ALPUENTE, L.; MENÉNDEZ LÓPEZ, A.; YAYÁ TUR, R. **Glioblastoma: changing expectations?** *Clinical and Translational Oncology*, v. 13, p. 240-248, 2011.
- ARRIETA, O.; GUEVARA, P.; TAMARIZ, J.; REMBAO, D.; RIVERA, E.; SOTELO, J. **Antiproliferative effect of thalidomide alone and combined with carmustine against C6 rat glioma.** *International Journal of Experimental Pathology*, v. 83, p. 99-104, 2002.
- BAEZ, S.; SEGURA-AGUILAR, J.; WIDERSTEN, M.; JOHANSSON, A.; MANNERVIK, B. **Glutathione transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes.** *Biochemical Journal*, v. 324, p. 25-28, 1997.
- BARTOSOVÁ, J.; KUZELOVÁ, K.; PLUSKALOVÁ, M.; MARINOV, I.; HALADA, P.; GASOVÁ, Z. **UVA-activated 8-methoxypsoralen (PUVA) causes G2/M cell cycle arrest in Karpas 299 T-lymphoma cells.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, v. 85, p. 39-48, 2006.
- BEIER, D.; RÖHRL, S.; PILLAI, D. R.; SCHWARZ, S.; KUNZ-SCHUGHART, L. A.; LEUKEL, P.; PROESCHOLDT, M.; BRAWANSKI, A.; BOGDHAN, U.; TRAMPE-KIESLICH, A.; GIEBEL, B.; WISCHHUSEN, J.; REIFENBERGER, G.; HAU, P.; BEIER, C.

P. Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Research*, v. 68, p. 5706-5715, 2008.

BELLUTI, F.; FONTANA, G.; DAL BO, L.; CARENINI, N.; GIOMMARELLI, C.; ZUNINO, F. **Design, synthesis and anticancer activities of stilbene-coumarin hybrid compounds: Identification of novel proapoptotic agents.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 18, p. 3543-3550, 2010.

BENBRAHIM-TALLAA, L.; BOUSSOUAR, F.; REY, C.; BENAHMED, M. **Tumor necrosis factor- α inhibits glutathione S-transferase- α expression in cultured porcine Sertoli cells.** *Journal of Endocrinology*, v. 175, p. 803-812, 2002.

BERNARDI, A.; FROZZA, R. L.; JÄGER, E.; FIGUEIRÓ, F.; BAVARESCO, L.; SALBEGO, C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. **Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: An in vitro study.** *European Journal of Pharmacology*, v. 586, p. 24-34, 2008.

BERNARDINI, S.; BERNASSOLA, F.; CORTESE, C.; BALLERINI, S.; MELINO, G.; MOTTI, C.; BELLINCAMPI, L.; IORI, R.; FEDERICI, G. **Modulation of GST P1-1 activity by polymerization during apoptosis.** *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 77, p. 645-653, 2000.

BERROETA, L.; MAN, I.; DAWE, R. S.; FERGUSON, J.; IBBOTSON, S. H. **Randomized double-blind comparative study of 8-methoxypsoralen bath plus UV-A treatment regimens.** *Actas Dermosifiliogr*, v. 101, p. 729-730, 2010.

BETTI, M.; MINELLI, A.; CANONICO, B.; CASTALDO, P.; MAGI, S.; AISA, M.C.; PIRODDI, M.; DI TOMASO, V.; GALLI, F. **Antiproliferative effects of tocopherols (vitamin E) on murine glioma C6 cells: homologue-specific control of PKC/ERK and cyclin signaling.** *Free Radical Biology & Medicine*, v. 41, p. 464-472, 2006.

BILLARD, V.; GAMBUS, P. L.; BARR, J.; MINTO, C. F.; CORASH, L.; TESSMAN, J. W.; STICKNEY, J. L.; SHAFER, S. L. **The pharmacokinetics of 8-methoxypsoralen following i.v. administration in humans.** *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 40, p. 347-360, 1995.

BLADEREN, P. J. V.; OMMEN, B. V. **The inhibition of glutathione S-transferases: Mechanisms, Toxic consequences and Therapeutic benefits.** *Pharmacology & Therapeutics*, v. 51, p. 35-46, 1991.

BOCCHINI, V.; CASALONE, R.; COLLINI, P.; REBEL, G.; LO CURTO, F. **Changes in glial fibrillary acidic protein and karyotype during culturing of two cell lines established from human glioblastoma multiforme.** *Cell and Tissue Research*, v. 265, p. 73-81, 1991.

BRAGANHOL, E.; ZAMIN, L. L.; CANEDO, A. D.; HORN, F.; TAMAJUSUKU, A. S.; WINK, M. R.; SALBEGO, C.; BATTASTINI, A. M. **Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line.** *Anticancer Drugs*, v. 17, p. 663-671, 2006.

BREDEL, M.; ZENTNER, J. **Brain-tumour drug resistance: the bare essentials.** *Lancet Oncology*, v. 3, p. 397-406, 2002.

BRENNAN, C. **Genomic profiles of glioma.** *Current Neurology and Neurosciences Reports*, v. 11, p. 291-297, 2011.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman e Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica,** Capítulo 51, 11^a edição, Editora Mc Graw Hill Interamericana do Barsil, Rio de Janeiro, 2006.

BRUYÈRE, C.; MADONNA, S.; VAN GOIETSENOVEN, G.; MATHIEU, V.; DESSOLIN, J.; KRAUS, J. L.; LEFRANC, F.; KISS, R. **JLK1486, a Bis 8-Hydroxyquinoline-Substituted Benzylamine, Displays Cytostatic Effects in Experimental Gliomas through MyT1 and STAT1 Activation and, to a Lesser Extent, PPAR γ Activation.** *Translational Oncology*, v. 4, p. 126-137, 2011.

CALATOZZOLO, C.; GELATI, M.; CIUSANI, E.; SCIACCA, F. L.; POLLO, B.; CAJOLA, L.; MARRAS, C.; SILVANI, A.; VITELLARO-ZUCCARELLO, L.; CROCI, D.; BOIARDI, A.; SALMAGGI, A. **Expression of drug resistance proteins Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 AND GST- π in human glioma.** *Journal of Neuro-Oncology*, v. 74, p. 113-121, 2005.

CALL, J. A.; ECKHARDT, S. G.; CAMIDGE, D. R. **Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment.** *Lancet Oncology*, v. 9, p. 1002-1011, 2008.

CAMPOS-ARROYO, D.; MARTÍNEZ-LAZCANO, J. C.; MELENDEZ-ZAJGLA, J. **Probenecid is a chemosensitizer in cancer cell lines.** *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, DOI: 10.1007/s00280-011-1725-6, 2011.

CAO, H.; HEARST, J. E.; CORASH, L.; WANG, Y. **LC-MS/MS for the detection of DNA interstrand cross-links formed by 8-methoxypsoralen and UVA irradiation in human cells.** *Analytical Chemistry*, v. 80, p. 2932-2938, 2008.

CAPONIGRO, F.; LORUSSO, D.; FORNARI, G.; BARONE, C.; MERLANO, M.; AIROLDI, M.; SCHENA, M.; MACARTHUR, R.; WEITMAN, S.; JANNUZZO, M. G.; CRIPPA, S.; FIORENTINI, F.; PETROCCIONE, A.; COMIS, S. **Phase I dose-escalation study of brostallicin, a minor groove binder, in combination with cisplatin in patients with advanced solid tumors.** *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 66, p. 389-394, 2010.

CAVALIERI, E.; MARIOTTO, S.; FABRIZI, C.; PRATI, A. C.; GOTTARDO, R.; LEONE, S.; BERRA, L. V.; LAURO, G. M.; CIAMPA, A. R.; SUZUKI, H. **α -Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 315, p. 589-594, 2004.

CAVALLI, F. **Cancer prevention in the developing world: mission impossible?** *Recent Results in Cancer Research*, v. 181, p. 33-39, 2009.

CLARK, G. A. **The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrate organisms.** *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 92B, p. 419-446, 1989.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. **Deslocalization and Conjugation.** In: *Organic Chemistry* (Oxford University Press), New York, p. 169-170, 2008.

COOKSON, M. R.; PENTREATH, V. W. **Alterations in the glial fibrillary acidic protein content of primary astrocyte cultures for evaluation of glial cell toxicity.** *Toxicology In vitro*, v. 8, p. 351-359, 1994.

COSTA, S. L.; PAILLAUD, E.; FAGES, C.; ROCHETTE-EGLY, C.; PLASSAT, J. L.; JOUAULT, H.; PERZELOVA, A.; TARDY, M. **Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma in vitro: inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation.** *European Journal of Cancer*, v. 37, p. 520-530, 2001.

CUI, H.; SHEN, J.; LU, D.; ZHANG, T.; ZHANG, W.; SUN, D.; WANG, P. G. **4-Aryl-1,3,2-oxathiazolylum-5-olate: a novel GST inhibitor to release JNK and activate c-Jun for cancer therapy.** *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 62, p. 509-515, 2008.

DALLA VIA, L.; GONZÁLEZ-GÓMEZ, J. C.; PÉREZ-MONTOTO, L. G.; SANTANA, L.; URIARTE, E.; MARCIANI MAGNO, S.; GIA, O. **A new psoralen derivative with enlarged antiproliferative properties.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 19, p. 2874-2876, 2009.

DARDALHON, M.; LIN, W.; NICOLAS, A.; AVERBECK, D. **Specific transcriptional responses induced by 8-methoxypsoralen and UVA in yeast.** *FEMS Yeast Research*, v. 7, p. 866-878, 2007.

DASSEUS, J.-L. H.; ONICIU, D. C. **Ketone compounds and compositions for cholesterol management and related uses.** Esperion Therapeutics, Inc. (E. U. A.) U. S. Pat. Appl. 20070155704, 2007.

DATASUS. **Informações de saúde.** Brasília, 2011.
<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sim/cnv/obtuf.def>. Acessado em 10/10/2011 às 12:45h.

DAVID, A. R.; ZIMMERMAN, M. R. **Cancer: an old disease, a new disease or something in between?** *Nature Reviews Cancer*, v. 10, p. 728-733, 2010.

DE BOER, A. G.; GAILLARD, P. J. **Strategies to improve drug delivery across the blood-brain barrier.** *Clinical Pharmacokinetics*, v. 46, p. 553-576, 2007.

DE MELO, M. V. **Reações de detoxicação no desenvolvimento de resistência a quimioterápicos antineoplásicos.** *Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia*. v. 14, p. 32, 1991.

DE OLIVEIRA, M. S.; CECHIM, G.; BRAGANHOL, E.; SANTOS, D. G.; MEURER, L.; CASTRO, C. G. J.; BRUNETTO, A. L.; SCHWARSTMANN, G.; BATTASTINI, A. M.;

LENZ, G.; ROESLER, R. **Anti-proliferative effect of the gastrin-release peptide receptor antagonist RC-3095 plus temozolomide in experimental glioblastoma models.** Journal of Neurooncology, v. 93, p. 191-201, 2009.

DEPEILLE, P.; CUQ, P.; PASSAGNE, I.; EVRARD, A.; VIAN, L. **Combined effects of GSTP1 and MRP1 in melanoma drug resistance.** British Journal of Cancer, v. 93, p. 216-223, 2005.

DEVJI, T.; REDDY, C.; WOO, C.; AWALE, S.; KADOTA, S.; CARRICO-MONIZ, D. **Pancreatic anticancer activity of a novel geranylgeranylated coumarin derivative.** Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, v. 1;21, p. 5770-5773, 2011.

DEVULDER, B.; PLOUVIER, B.; LEMAIRE, P.; HAFTEL, Y.; FRANÇOIS, M.; HATRON, P. Y. **Acute hyperphosphoremia after ethacrinic acid administration.** Nouv LA Nouvelle Presse Médicale, v. 6, p. 4203, 1977.

DI PIETRO, G.; MAGNO, L. A.; RIOS-SANTOS, F. **Glutathione S-transferases: an overview in cancer research.** Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology, v. 6, p. 153-170, 2010.

DIWAN, R.; MALPATHAK, N. **Furanocoumarins: Novel topoisomerase I inhibitors from *Ruta graveolens* L.** Bioorganic and Medicinal Chemistry, v. 17, p. 7052-7055, 2009.

DONNELLY, A. C.; MAYS, J. R.; BURLISON, J. A.; NELSON, J. T.; VIELHAUER, G.; HOLZBEIERLEIN, J.; BLAGG, B. S. **The design, synthesis, and evaluation of coumarin ring derivatives of the novobiocin scaffold that exhibit antiproliferative activity.** Journal of Organic Chemistry, v. 73, p. 8901-8920, 2008.

EDGAR, L.; HOGG, A.; SCOTT, M.; TIMONEY, M.; MC ELNAY, J.; MAIRS, J.; JANKNEGT, R. **ACE inhibitors for the treatment of hypertension drug selection by means of the SOJA method.** Reviews in Recent Clinical Trials, v. 6, p. 69-93, 2011.

EKLUND, B. I.; EDALAT, M.; STENBERG, G.; MANNERVIK, B. **Screening for recombinant glutathione transferases active with monochlorobimane.** Analytical Biochemistry, v. 309, p. 102-108, 2002.

ENGIN, B.; OGUZ, O. **Evaluation of time-dependent response to psoralen plus UVA (PUVA) treatment with topical 8-methoxypsoralen (8-MOP) gel in palmoplantar dermatoses.** International Journal of Dermatology, v. 44, p. 337-339, 2005.

FODALE, V.; PIEROBON, M.; LIOTTA, L.; PETRICOIN, E. **Mechanism of cell adaptation: when and how do cancer cells develop chemoresistance?** Cancer Journal, v. 17, p. 89-95, 2011.

FRUEHAUF, J. P.; BREM, H.; BREM, S.; SLOAN, A.; BARGER, G.; HUANG, W.; PARKER, R. **In vitro drug response and molecular markers associated with drug resistance in malignant gliomas.** Clinical Cancer Research, v. 12, p. 4523-4532, 2006.

FU, J.; LIU, Z. G.; LIU, X. M.; CHEN, F. R.; SHI, H. L.; PANG, J. C. S.; NG, H. K.; CHEN, Z. P. **Glioblastoma stem cells resistant to temozolomide-induced autophagy**. Chinese Medical Journal, v. 122, p. 1255-1259, 2009.

GAO, S.; YANG, X. J.; ZHANG, W. G.; JI Y. W.; PAN, Q. **Mechanism of thalidomide to enhance cytotoxicity of temozolomide in U251-MG glioma cells in vitro**. Chinese Medical Journal (Engl), v. 5;122, p. 1260-1266, 2009.

GERHARDT, D.; HORN, A. P.; GAELZER, M. M.; FROZZA, R. L.; DELGADO-CAÑEDO, A.; PELEGRINI, A. L.; HENRIQUES, A. T.; LENZ, G.; SALBEGO, C. **Boldine: a potential new antiproliferative drug against glioma cell lines**. Investigational New Drugs, v. 27, p. 517-525, 2009.

GOEL, A.; AGGARWAL, B. B. **Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs**. Nutrition and Cancer, v. 62, p. 919-930, 2010.

GOTO, S.; IHARA, Y.; URATA, Y.; IZUMI, S.; ABE, K.; KOJI, T.; KONDO, T. **Doxorubicin-induced DNA intercalation and scavenging by nuclear glutathione S-transferase π** . The FASEB Journal, v. 15, p. 2702-2714, 2001.

GOTO, S.; KAMADA, K.; SOH, Y. IHARA, Y.; KONDO, T. **Significance of nuclear glutathione S-transferase π in resistance to anti-cancer drugs**. Japanese Journal of Cancer Research, v. 93, p. 1047-1056, 2002.

GUIOTTO, A.; CHILIN, A.; MANZINI, P.; DALL'ACQUA, F.; BORDIN, F.; RODIGHIERO, P. **Synthesis and antiproliferative activity of furocoumarin isosters**. Farmaco. v. 50, p. 479-488, 1995.

HAAFTEN, R. I. M. V.; EVELO, C. T. A.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. **α -tocopherol inhibits human glutathione S-transferase π** . Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 280, p. 631-633, 2001.

HALL, A.; ROBSON, C. N.; HICKSON, I. D.; HARRIS, A. L.; PROCTOR, S. J.; CATTAN, A. R. **Possible role of inhibition of glutathione S-transferase in the partial reversal of chlorambucil resistance by indomethacin in a chinese hamster ovary cell line**. Cancer Research, v. 49, p. 6265-6268, 1989.

HAMBY, M. E.; SOFRONIEW, M. V. **Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders**. Neurotherapeutics, v. 7, p. 494-506, 2010.

HART, M. G.; GRANT, R.; GARSIDE, R.; ROGERS, G.; SOMERVILLE, M.; STEIN, K. **Chemotherapy wafers for high grade glioma**. Cochrane Database Systematic Reviews, v. 16, CD007294, 2011.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. **Glutathione transferases**. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, v. 45, p. 51-88, 2005.

HAYESHI, R.; MUTINGWENDE, I.; MAVENGERE, W.; MASIYANISE, V.; MUKANGANYAMA, S. **The inhibition of human glutathione S-transferases activity by plant polyphenolic compounds ellagic acid and curcumin.** Food and Chemical Toxicology, v. 45, p. 286-295, 2007.

HE, S.; LIAO, T. T.; CHEN, Y. T.; KUO, H. M.; LIN, Y. L. **Glutathione-S-transferase enhances proliferation-migration and protects against shikonin-induced cell death in breast cancer cells.** Kaohsiung Journal of Medical Science, v. 27, p. 477-484, 2011.

HEINKE, R.; FRANKE, K.; PORZEL, A.; WESSJOHANN, L. A.; AWADH ALI, N. A.; SCHMIDT, J. **Furanocoumarins from Dorsteniafoetida,** Phytochemistry, DOI:10.1016/j.phytochem.2011.03.008, 2011.

HERFST, M. J.; DE WOLFF, F. A. **Difference in bioavailability between two brands of 8-methoxypsoralen and its impact on the clinical response in psoriatic patients.** British Journal of Clinical Pharmacology, v. 13, 519-522, 1982.

HOSSAIN, M. D.; FUJITAM. **Effect of esculetin on activities of pumpkin glutathione S-transferases and growth of pumpkin seedlings.** Biologia Plantarum, v. 53, p. 565-568, 2009.

IBBOTSON, S. H.; DAWE, R. S.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; WEIDLICH, S.; FARR, P. M.; FERGUSON, J.; WOLF, C. R.; SMITH, G. **Glutathione S-transferase genotype is associated with sensitivity to psoralen-UVA (PUVA) photochemotherapy.** British Journal of Dermatology, DOI: 10.1111/j.1365-2133.2011.10661.x, 2011.

INCA, **Instituto Nacional do Câncer,** Rio de Janeiro – Brasil, 2011. http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=2. Acessado em 20/08/2011 às 14:45h.

IRANSHAHI, M.; KALATEGI, F.; REZAEI, R.; SHAHVERDI, A. R.; ITO, C.; FURUKAWA, H.; TOKUDA, H.; ITOIGAWA, M. **Cancer chemopreventive activity of terpenoid coumarins from Ferula species.** Planta Medica, v. 74, p. 147-150, 2008.

JHAVERI, N.; CHO, H.; TORRES, S.; WANG, W.; SCHÖNTHAL, A. H.; PETASIS, N. A.; LOUIE, S. G.; HOFMAN, F. M.; CHEN, T. C. **Noscapine inhibits tumor growth in TMZ-resistant gliomas.** Cancer Letters, v. 312, p. 245-252, 2011.

JILLSON, O. F. **Treatment of polymorphous light eruption with Trisoralen and natural sunlight.** Cutis, v. 27, p. 592-598, 1981.

JOHANSSON, K.; ITO, M.; SCHOPHUIZEN, C. M.; MATHEW THENGUMTHARAYIL, S.; HEUSER, V. D.; ZHANG, J.; SHIMOJI, M.; VAHTER, M.; ANG, W. H.; DYSON, P. J.; SHIBATA, A.; SHUTO, S.; ITO, Y.; ABE, H.; MORGENSTERN, R. **Characterization of new potential anticancer drugs designed to overcome glutathione transferase mediated resistance.** Molecular Pharmacology, v. 8, p. 1698-1708, 2011.

JOHANSSON, A.; RIDDERSTRO, M.; MANNERVIK, B. **The human glutathione transferase p1-1 specific inhibitor ter 117 designed for overcoming cytostatic-drug resistance is also a strong inhibitor of glyoxalase i.** *Molecular Pharmacology*, v. 57, p. 619-624, 2000.

JOHNSON, J. A.; EL BARBARY, A.; KORNGUTH, S. E.; BRUGGE, J. F.; SIEGEL, F. L. **Glutathione S-transferase isoenzymes in rat brain neurons and glia.** *The Journal of Neuroscience*, v. 73, p. 2013-2023, 1993.

JUILLERAT-JEANNERET, L.; BERNASCONI, C. C.; BRICOD, C.; GROS, S.; TREPEY, S.; BENHATTAR, J.; JANZER, R. C. **Heterogeneity of human glioblastoma: glutathione-S-transferase and methylguanine-methyltransferase.** *Cancer Investigation*, v. 26, p. 597-609, 2008.

KANZAWA, T.; GERMANO, I. M.; KOMATA, T.; ITO, H.; KONDO, Y.; KONDO, S. **Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells.** *Cell Death and Differentiation*, v. 11, p. 448-457, 2004.

KARIKAS, G. A. **Anticancer and chemopreventing natural products: some biochemical and therapeutic aspects.** *Journal of BUON*, v. 15, p. 627-638, 2010.

KAUVAR, L. M.; MORGAN, A. S.; SANDERSON, P. E.; HENNER, W. D. **Glutathione based approaches to improving cancer treatment.** *Chemico-Biological Interactions*, v. 111-112, p. 225-238, 1998.

KILBURN, L.; OKCU, M. F.; WANG, T.; CAO, Y.; RENFRO-SPELMAN, A.; ALDAPE, K. D.; GILBERT, M. R.; BONDY, M. **Glutathione S-transferase polymorphisms are associated with survival in anaplastic glioma patients.** *Cancer*, v. 116, p. 2242-2249, 2010.

KIM, Y. K.; KIM, Y. S.; RYU, S. Y. **Antiproliferative effect of furanocoumarins from the root of *Angelica dahurica* on cultured human tumor cell lines.** *Phytotherapy Research*, v. 21, p. 288-290, 2007.

KING, C. **Methods and compositions for treatment of cancer.** (E. U. A.) U. S. Pat. Appl. 20070161546, 2007.

KOGIAS, E.; OSTERBERG, N.; BAUMER, B.; PSARRAS, N.; KOENTGES, C.; PAPAZOGLU, A.; SAAVEDRA, J. E.; KEEFER, L. K.; WEYERBROCK, A. **Growth-inhibitory and chemosensitizing effects of the glutathione-S-transferase- π -activated nitric oxide donor PABA/NO in malignant gliomas.** *International Journal of Cancer*, DOI: 10.1002/ijc.26106, 2011.

KONG-BELTRAN, M.; WICKRAMASINGHE, D. M. **Methods and compositions for modulating hyperstabilized c-met.** U. S. Pat. Appl. 20100028337, 2010.

KOSTOVA, I. **Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents.** *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*, v. 5, p. 29-46, 2005.

LABORDE E. **Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death.** *Cell Death and Differentiation*, v. 17, p. 1373-1380, 2010.

LACRETA, F. P.; BRENNAN, J. M.; NASH, S. L.; COMIS, R. L.; TEW, K. D.; O'DWYER, P. J. **Pharmakokinetics and bioavailability study of ethacrynic acid as a modulator of drug resistance in patients with cancer.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 270, p. 1186-1191, 1994.

LACY, A.; O'KENNEDY, R. **Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer.** *Current Pharmaceutical Design*, v. 10, p. 3797-3811, 2004.

LEE, Y. M.; WU, T. H.; CHEN, S. F.; CHUNG, J. G.; **Effect of 5-methoxypsoralen (5-MOP) on cell apoptosis and cell cycle in human hepatocellular carcinoma cell line.** *Toxicology In Vitro*, v. 17, p. 279-287, 2003.

LI, J. W.; VEDERAS, J. C. **Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?** *Science*, v. 10;325, 161-165, 2009.

LO, H. W.; ALI-OSMAN, F. **Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance.** *Current Opinion in Pharmacology*, v. 7, p. 367-374, 2007.

LO, H. W.; ALI-OSMAN, F. **Structure of the human allelic glutathione S-transferase- π gene variant, *hGSTP1* C* , cloned from a glioblastoma multiforme cell line.** *Chemico-Biological Interactions*, v. 111-112, p. 91-102, 1998.

LO, H. W.; ANTOUN, G. R.; ALI-OSMAN, F. **The human glutathione S-transferase p1 protein is phosphorylated and its metabolic function enhanced by the ser/thr protein kinases, camp-dependent protein kinase and protein kinase c, in glioblastoma cells.** *Cancer Research*, v. 64, p. 9131-9138, 2004.

LOUIS, D. N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; CAVENEE, W. K.; BURGER, P. C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B. W.; KLEIHUES, P. **The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system.** *Acta Neuropathology*, v. 114, p. 97-109, 2007.

LOUIS, K. S.; SIEGEL, A. C. **Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods.** *Methods in Molecular Biology*, v. 740, p. 7-12, 2011.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, D.; SHI, H. C.; WANG, Z. X.; GU, X. W.; ZENG, Y. J. **Multidrug resistance-associated biomarkers PGP, GST-pi, Topo-II and LRP as prognostic factors in primary ovarian carcinoma.** *British Journal of Biomedical Science*, v. 68, p. 69-74, 2011.

ŁUSZCZKI, J. J.; ANDRES-MACH, M.; GLEŃSK, M.; SKALICKA-WOŹNIAK, K. **Anticonvulsant effects of four linear furanocoumarins, bergapten, imperatorin,**

oxypeucedanin, and xanthotoxin, in the mouse maximal electroshock-induced seizure model: a comparative study. *Pharmacology Reports*, v. 62, p. 1231-6, 2010.

LYTTLE, M. H.; HOCKER, M. D.; HUI, H. C.; CALDWELL, C. G.; AARON, D. T.; ENGQVIST-GOLDSTEIN, A.; FLATGAARD, J. E.; BAUER, K. E. **Isozyme-specific glutathione-S-transferase inhibitors: design and synthesis.** *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 37, p. 189-194, 1994.

MAGNO, L. A.; TALBOT, J.; TALBOT, T.; BORGES SANTOS, A. M.; SOUZA, R. P.; MARIN, L. J.; MORELI, M. L.; DE MELO, P. R.; CORRÊA, R. X.; RIOS SANTOS, F.; DI PIETRO, G. **Glutathione S-transferase variants in a brazilian population.** *Pharmacology*, v. 83, p. 231-236, 2009.

MAHAJAN, S.; ATKINS, W. M. **The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione S transferases.** *Cellular and Molecular Life Science*, v. 62, p. 1221-1233, 2005.

MANNEVIK, B.; GUTHENBERG, C. **Glutathione transferase (Human Placenta).** *Methods in Enzymology*, v. 77, p. 231-235, 1981.

MAPP, C. E.; FRYER, A. A.; DE MARZO, N.; POZZATO, V.; PADOAN, M.; BOSCHETTO, P.; STRANGE, R. C.; HEMMINGSEN, A.; SPITERI, M. A. **Glutathione S-transferase GSTP1 is a susceptibility gene for occupational asthma induced by isocyanates.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 109, p. 867-872, 2002.

MASLEHATY, H.; CORDOVI, S.; HEFTI, M. **Symptomatic spinal metastases of intracranial glioblastoma: clinical characteristics and pathomechanism relating to GFAP expression.** *Journal of Neurooncology*, v. 101, p. 329-333, 2011.

MAZHAR, D.; ANG, R.; WAXMAN, J. **COX inhibitors and breast cancer.** *British Journal of Cancer*, v. 94, p. 346-350, 2006.

MCILWAIN, C. C.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. **Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy.** *Oncogene*, v. 25, p. 1639-1648, 2006.

MESCHINI, S.; CONDELLO, M.; LISTA, P.; ARANCIA, G. **Autophagy: Molecular mechanisms and their implications for anticancer therapies.** *Current Cancer Drug Targets*, v. 11, p. 357-379, 2011.

MINAMI, T.; KAI, T.; HIRABARU, C.; ISHII, E.; UEDA, K.; EGAMI, H.; TAKESHITA, I. **A case of cerebral glioblastoma with extensive cerebrospinal fluid dissemination: diagnostic value of immunohistochemical examination and MR imaging.** *Child's Nervous System*, v. 9, p. 478-480, 1993.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

MRUGALA, M. M.; CHAMBERLAIN, M. C. **Mechanisms of disease: temozolomide and glioblastoma--look to the future.** *Nature Clinical Practice Oncology*, v. 5, p. 476-486, 2008.

MURAKAMI, A.; YAMAYOSHI, A.; IWASE, R.; NISHIDA, J.; YAMAOKA, T.; WAKE, N. **Photodynamic antisense regulation of human cervical carcinoma cell growth using psoralen-conjugated oligo(nucleoside phosphorothioate).** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 13, p. 25-34, 2001.

NAKADA, M.; NAKADA, S.; DEMUTH, T.; TRAN, N. L.; HOELZINGER, D. B.; BERENS, M. E. **Molecular targets of glioma invasion.** *Cellular and Molecular Life Science*, v. 64, p. 458 – 478, 2007.

NAKAJIMA, T.; TAKAYAMA, T.; MIYANISHI, K.; NOBUOKA, A.; HAYASHI, T.; ABE, T.; KATO, J.; SAKON, K.; NANIWA, Y.; TANABE, H.; NIITSU, Y. **Reversal of multiple drug resistance in cholangiocarcinoma by the glutathione S-transferase-pi-specific inhibitor O¹-hexadecyl-gamma-glutamyl-S-benzylcysteinyl-D-phenylglycine ethylester.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 306, p. 861-869, 2003.

NAKAMURA, T.; SAITO, R.; SUGIYAMA, S.; SONODA, Y.; KUMABE, T.; TOMINAGA, T. **Local convection-enhanced delivery of chemotherapeutic agent transiently opens blood-brain barrier and improves efficacy of systemic chemotherapy in intracranial xenograft tumor model.** *Cancer Letters*, v. 310, p. 77-83, 2011.

NAKATSUMA, A.; FUKAMI, T.; SUZUKI, T.; FURUISHI, T.; TOMONO, K.; HIDAKA, S. **Effects of kaempferol on the mechanisms of drug resistance in the human glioblastoma cell line T98G.** *Pharmazie*, v. 65, p. 379-383, 2010.

NELSON, L. D.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**, 5^a edição, W. H. Freeman and Company, Nova York, Estados Unidos da América, 2010.

NIYAZI, M.; SIEFERT, A.; SCHWARZ, S. B.; GANSWINDT, U.; KRETH, F. W.; TONN, J. C.; BELKA, C. **Therapeutic options for recurrent malignant glioma.** *Radiotherapy and Oncology*, v. 98, p. 1-14, 2011.

OAKLEY, A. **Glutathione transferases: a structural perspective.** *Drug Metabolism Reviews*, v. 43, p. 138-151, 2011.

OAKLEY, A. J.; BELLO, M. L.; BATTISTONI, A.; RICCI, G.; ROSSJOHN, J.; VILLAR, H. O.; PARKER, M. W. **The structures of human glutathione transferase P1-1 in complex with glutathione and various inhibitors at high resolution.** *Journal of Molecular Biology*, v. 274, p. 84-100, 1997.

O'BRIEN, M.; KRUH, G. D.; TEW, K. D. **The influence of coordinate overexpression of glutathione phase II detoxification gene products on drug resistance.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 294, p. 480-487, 2000.

OGUNRINU, T. A.; SONTHEIMER, H. **Hypoxia increases the dependence of glioma cells on glutathione.** Journal of Biological Chemistry, v. 285, p. 37716-37724, 2010.

OKCU, M. F.; SELVAN, M.; WANG, L.; STOUT, L.; ERANA, R.; AIREWELE, G.; ADATTO, P.; HESS, K.; ALI-OSMAN, F.; GROVES, M.; YUNG, A. W. K.; LEVIN, V. A.; WEI, Q.; BONDY, M. **Glutathione S-transferase polymorphisms and survival in primary malignant glioma.** Clinical Cancer Research, v. 10, p. 2618–2625, 2004.

OSBORN, A. G.; SALZMAN, K. L.; THURNHER, M. M.; REES, J. H.; CASTILLO, M. **The new world health organization classification of central nervous system tumors: what can the neuroradiologist really say?** AJNR American Journal of Neuroradiology, DOI: 3174/ajnr.A2583, 2001.

PALCHAUDHURI, R.; HERGENROTHER, P.J. **DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action.** Current Opinion Biotechnology, v. 18, p. 497-503, 2007.

PARAST, B. M.; CHETRI, S. K.; SHARMA, K.; AGRAWAL, V. **In vitro isolation, elicitation of psoralen in callus cultures of Psoralea corylifolia and cloning of psoralen synthase gene.** Plant Physiology and Biochemistry, v. 49, p. 1138-46, 2011.

PARK, L. O. **Anticancer or antiviral composition.** (E. U. A.) U. S. Pat. Appl. 20070166401, 2007.

PARKER, L. J.; CICCONE, S.; ITALIANO, L. C.; PRIMAVERA, A.; OAKLEY, A. J.; MORTON, C. J.; HANCOCK, N. C.; BELLO, M. L.; PARKER, M. W. **The anti-cancer drug chlorambucil as a substrate for the human polymorphic enzyme glutathione transferase P1-1: kinetic properties and crystallographic characterisation of allelic variants.** Journal of Molecular Biology, v. 380, p. 131-144, 2008.

PASELLO, M.; MICHELACCI, F.; SCIONTI, I.; HATTINGER, C. M.; ZUNTINI, M.; CACCURI, A. M.; SCOTLANDI, K.; PICCI, P.; SERRA, M. **Overcoming glutathione S-transferase P1-related cisplatin resistance in osteosarcoma.** Cancer Research, v. 68, p. 6661-6668, 2008.

PATEL, S. S.; ATTARD, A.; JACOBSEN, P.; SHERGILL, S. **Acetylcholinesterase Inhibitors (AChEI's) for the treatment of visual hallucinations in schizophrenia: a review of the literature.** BMC Psychiatry, v. 10, p. 69, 2010.

PATEL, R.; SHERVINGTON, L.; LEA, R.; SHERVINGTON, A. **Epigenetic silence of telomerase and a non-alkylating agent as a novel therapeutic approach for glioma.** Brain Research, v. 1188, p. 173-181, 2008.

PATOLE, J.; PADHYE, S.; MOODBIDRI, M.S.; SHIRSAT, N. **Antiproliferative activities of iron and platinum conjugates of salicylaldehyde semi/thiosemicarbazones against C6 glioma cells.** European Journal of Medicinal Chemistry, v. 40, p. 1052-1055, 2005.

PÉDEBOSCQ, S.; L'AZOU, B.; LIGUORO, D.; POMETAN, J.; CAMBAR, J. **Interindividual differences in anticancer drug cytotoxicity in primary human glioblastoma cells.** *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 58, p. 247-253, 2007.

PEZZOLA, S.; ANTONINI, G.; GERONI, C.; BERIA, I.; COLOMBO, M.; BROGGINI, M.; MARCHINI, S.; MONGELLI, N.; LEBOFFE, L.; MACARTHUR, R.; MOZZI, A. F.; FEDERICI, G.; CACCURI, A. M. **Role of glutathione transferases in the mechanism of brostallicin activation.** *Biochemistry*, v. 49, p. 226-235, 2010.

PHILLIPS, H. S.; FORREST III, W. F.; KHARBANDA, S.; WU, T. D. **Method for diagnosing, prognosing and treating glioma.** Genentech, Inc. (E. U. A.) U. S. Pat. Appl. 20070141066, 2007.

POLIGONE, B.; HEALD, P. **Innovative therapy of cutaneous T-cell lymphoma: beyond psoralen and ultraviolet light and nitrogen mustard.** *Dermatologic Clinics*, v. 28, p. 501-510, 2010.

PORTER, K. R.; MCCARTHY, B. J.; FREELS, S.; KIM, Y.; DAVIS, F. G. **Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by age, gender, behavior, and histology.** *Neuro Oncology*, v. 12, p. 520-527, 2010.

PRADO, E. G.; GIMENEZ, M. D. G.; VÁZQUEZ, R. D. P.; SÁNCHEZ, J. L. E.; RODRÍGUEZ, M. T. S. **Antiproliferative effects of mitraphylline, a pentacyclic oxindole alkaloid of *Uncaria tomentosa* on human glioma and neuroblastoma cell lines.** *Phytomedicine*, v. 14, p. 280-284, 2007.

QUESADA-SORIANO, I.; PARKER, L. J.; PRIMAVERA, A.; WIELENS, J.; HOLIEN, J. K.; CASAS-SOLVAS, J. M.; VARGAS-BERENGUEL, A.; AGUILERA, A. M.; NUCCETELLI, M.; MAZZETTI, A. P.; LO BELLO, M.; PARKER, M. W.; GARCÍA-FUENTES, L. **Diuretic drug binding to human glutathione transferase P1-1: potential role of Cys-101 revealed in the double mutant C47S/Y108V.** *Journal of Molecular Recognition*, v. 24, p. 220-234, 2011.

REYES, A. S.; ZAKHARYAN, R. A. **Tocopherol esters inhibit human glutathione S-transferase Omega.** *Acta Biochimica Polonica*, v. 53, p. 547-552, 2006.

RICCI, G.; DE MARIA, F.; ANTONINI, G.; TURELLA, P.; BULLO, A.; STELLA, L.; FILOMENI, G.; FEDERICI, G.; CACCURI, A. M. **7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatives, a new class of suicide inhibitors for glutathione S-transferases. Mechanism of action of potential anticancer drugs.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, p. 26397-26405, 2005.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Fundamentos de Robbins patologia estrutural e funcional.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

RODIGHIERO, P.; GUIOTTO, A.; CHILIN, A.; BORDIN, F.; BACCICHETTI, F.; CARLASSARE, F.; VEDALDI, D.; CAFFIERI, S.; POZZAN, A.; DALL'ACQUA, F. **Angular furoquinolinones, psoralen analogs: novel antiproliferative agents for skin**

diseases. **Synthesis, biological activity, mechanism of action, and computer-aided studies.** Journal of Medicinal Chemistry, v. 39, p. 1293-1302, 1996.

SAGARA, J.; SUGITA, Y. **Characterization of cytosolic glutathione S-transferase in cultured astrocytes.** Brain Research, v. 902, p.190-197, 2001.

SÁNCHEZ-GÓMEZ, F. J.; DíEZ-DACAL, B.; PAJARES, M. A.; LLORCA, O.; PÉREZ-SALA, D. **Cyclopentenone prostaglandins with dienone structure promote cross-linking of the chemoresistance-inducing enzyme glutathione transferase P1-1.** Molecular Pharmacology, v. 78, p. 723-733, 2010.

SANTOS, R. P.; TREVISAN, M. T. S.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. **Composição química e atividade biológica das folhas e frutos de *triphasia trifolia*.** Quimica Nova, v. 31, p. 53-58, 2008.

SATOH K. **The high non-enzymatic conjugation rates of some glutathione S-transferase (GST) substrates at high glutathione concentrations.** Carcinogenesis, v. 16, p. 869-874, 1995.

SAU, A.; PELLIZZARI TREGNO, F.; VALENTINO, F.; FEDERICI, G.; CACCURI, A. M. **Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 500, p. 116-122, 2010.

SCAFFIDI, J. P.; GREGAS, M. K.; LAULY, B.; ZHANG, Y.; VO-DINH, T. **Activity of psoralen-functionalized nanoscintillators against cancer cells upon X-ray excitation.** ACS Nano, v. 5, p. 4679-4687, 2011.

SCHÄFER, C.; BORN, S.; MÖHL, C.; HOUBEN, S.; KIRCHGESSNER, N.; MERKEL, R.; HOFFMANN, B. **The key feature for early migratory processes: Dependence of adhesion, actin bundles, force generation and transmission on filopodia.** Cell Adhesion and Migration, v. 4, p. 215-225, 2010.

SCHULTZ, M.; DUTTA, S.; TEW, K. D. **Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic agents.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 26, p. 91-104, 1997.

SEHGAL, V. N. **A comparative clinical evaluation of trimethylpsoralen, psoralen and 8-methoxypsoralen in treating vitiligo.** International Journal of Dermatology, v. 14, p. 205-208, 1975.

SILVA, A. M. M.; SILVA, A. R.; PINHEIRO, A. M.; FREITAS, S. R. V. B.; SILVA, V. D. A.; SOUZA, C. S.; HUGHES, J. B.; EL-BACHÁ, R. S.; COSTA, M. F. D.; VELOZO, E. S.; TARDY, M.; COSTA, S. L. **Alkaloids from *Prosopis juliflora* leaves induce glial activation, cytotoxicity and stimulate NO production.** Toxicon, v. 49, p. 601-614, 2007.

SILVA, A. R.; PINHEIRO, A. M.; SOUZA, C. S.; FREITAS, S. R. V. B.; VASCONCELLOS, V.; FREIRE, S. M.; VELOZO, E. S.; TARDY, M.; EL-BACHÁ, R. S.; COSTA, M. F. D.; COSTA, S. L. **The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia**

activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures. Cell Biology and Toxicology, v. 24, p. 75-86, 2008.

SINGH, S.; OKAMURA, T.; ALI-OSMAN, F. Serine phosphorylation of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) by PKC α enhances GSTP1-dependent cisplatin metabolism and resistance in human glioma cells. Biochemical Pharmacology, v. 80, p. 1343-1355, 2010.

SOLETTI, R. C.; DE FARIA, G. P.; VERNAL, J.; TERENCEZI, H.; ANDERLUH, G.; BORGES, H. L.; MOURA-NETO, V.; GABILAN, N. H. Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteins in human glioblastoma cells. Anticancer Drugs, v. 19, p. 517-525, 2008.

STERN, R. S.; LAIRD, N. The carcinogenic risk of treatments for severe psoriasis. Photochemotherapy Follow-up Study. Cancer, v. 73, p. 2759-2764, 1994.

STYLLI, S. S.; KAYE, A. H. Photodynamic therapy of cerebral glioma - a review. Part II - clinical studies. Journal of Clinical Neuroscience, v. 13, p. 709-717, 2006.

TEGEDER, I.; BRÄUTIGAM, L.; PODDA, M.; MEIER, S.; KAUFMANN, R.; GEISLINGER, G.; GRUNDMANN-KOLLMANN, M. Time course of 8-methoxypsoralen concentrations in skin and plasma after topical (bath and cream) and oral administration of 8-methoxypsoralen. Clinical Pharmacology and Therapeutics, v. 71, p. 153-161, 2002.

TENTORI, L.; DORIO, A. S.; MAZZON, E.; MUZI, A.; SAU, A.; CUZZOCREA, S.; VERNOLE, P.; FEDERICI, G.; CACCURI, A. M.; GRAZIANI, G. The glutathione transferase inhibitor 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) increases temozolomide efficacy against malignant melanoma. European Journal of Cancer, v. 47, p. 1219-1230, 2011.

TEW, K. D.; TOWNSEND, D. M. Regulatory functions of glutathione S-transferase P1-1 unrelated to detoxification. Drug Metabolism Reviews, v. 43, p. 179-193, 2011.

TEW, K. D. Glutathione-associated Enzymes in Anticancer Drug Resistance. Cancer Research, v. 54, p. 4313-4320, 1994.

THORPE, P. E.; RAN, S. Selected antibody CDRs for binding to aminophospholipids. Board of Regents. The University of Texas System. (E. U. A.) U. S. Pat. 7247303, 2007.

TOWNSEND, D. M. S-glutathionylation: indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response. Molecular Interventions, v. 7, p. 313-324, 2007.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. Oncogene, v. 22, p. 7369-7375, 2003.

TREGNO, F. P.; SAU, A.; PEZZOLA, S.; GERONI, C.; LAPENTA, C.; SPADA, M.; FILOMENI, G.; BONANNO, E.; FEDERICI, G.; CACCURI, A. M. In vitro and in vivo

efficacy of 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) on human melanoma. *European Journal of Cancer*, v. 45, p. 2606-2617, 2009.

TROG, D.; FOUNTOULAKIS, M.; FRIEDLEIN, A.; GOLUBNITSCHAJA, O. **Is current therapy of malignant gliomas beneficial for patients? Proteomics evidence of shifts in glioma cells expression patterns under clinically relevant treatment conditions.** *Proteomics*, v. 6, p. 2924–2930, 2006.

TROG, D.; YEGHIAZARYAN, K.; SCHILD, H. H.; GOLUBNITSCHAJA, O. **Up-regulation of vimentin expression in low-density malignant glioma cells as immediate and late effects under irradiation and temozolomide treatment.** *Amino Acids*, v. 34, p. 539-545, 2008.

TURELLA, P.; CERELLA, C.; FILOMENI, G.; BULLO, A.; DE MARIA, F.; GHIBELLI, L.; CIRIOLO, M. R.; CIANFRIGLIA, M.; MATTEI, M.; FEDERICI, G.; RICCI, G.; CACCURI, A. M. **Proapoptotic activity of new glutathione S-transferase inhibitors.** *Cancer Research*, v. 65, p. 3751-3761, 2005.

TZANEVA, S.; KITTLER, H.; THALLINGER, C.; HÖNIGSMANN, H.; TANEW, A. **Oral vs. bath PUVA using 8-methoxypsoralen for chronic palmoplantar eczema.** *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, v. 25, p. 101-105, 2009.

UBLACKER, G. A.; JOHNSON, J. A.; SIEGEL, F. L.; MULCAHY, R. T. **Influence of glutathione S-transferases on cellular glutathione determination by flow cytometry using monochlorobimane.** *Cancer Research*, v. 51, p. 1783-1788, 1991.

VAIDYA, S. S.; GERK, P. M. **Simultaneous determination of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione and its metabolites for human placental disposition studies by high-performance liquid chromatography.** *Journal of Chromatography B*, v. 859, p. 94–102, 2007.

VAN HAAFTEN, R. I.; DEN HARTOG, G. J.; EVELO, C. T.; HAENEN, G. R.; BAST, A. **Hypochlorous acid is a potent inhibitor of GST P1-1.** *Chemical and Biological Interactions*, v. 138, p. 77-83, 2001.

VAN ZANDEN, J. J.; BEN HAMMAN, O.; VAN IERSEL, M. L.; BOEREN, S.; CNUBBEN, N. H.; LO BELLO, M.; VERVOORT, J.; VAN BLADEREN, P. J.; RIETJENS, I.M. **Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by the flavonoid quercetin.** *Chemical and Biological Interactions*, v. 145, p. 139-148, 2003.

VAN ZANDEN, J. J.; GERAETS, L.; WORTELBOER, H. M.; VAN BLADEREN, P. J.; RIETJENS, I. M.; CNUBBEN, N. H. **Structural requirements for the flavonoid-mediated modulation of glutathione S-transferase P1-1 and GS-X pump activity in MCF7 breast cancer cells.** *Biochemical Pharmacology*, v. 67, p. 1607-1617, 2004.

VERNASSIÈRE, C.; PETITPAIN, N.; MARTIN, S.; TRÉCHOT, P.; BARBAUD, A.; SCHMUTZ, J. L. **8-Methoxypsoralen and neurological disorders: from dysosmia to migraine.** *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*, v. 22, p. 217-218, 2006.

WANG, J.; ZHANG, J.; ZHANG, L.; ZHAO, L.; FAN, S.; YANG, Z.; GAO, F.; KONG, Y.; XIAO, G. G.; WANG, Q. **Expression of P-gp, MRP, LRP, GST- π and TopoII α and intrinsic resistance in human lung cancer cell lines.** *Oncology Reports*, v. 26, p. 1081-1089, 2001.

WANG, K.; LI, J.; ZHEN, C.; ZHOU, J.; XIAO, D.; LIU, J.; LIU, Y.; JIANG, H.; CHEN, C.; WEN, J. **Enhanced invasive and metastatic potential induced by transforming growth factor-beta1 might be correlated with glutathione-S-transferase- π , cofilin and heat shock protein 27 in SGC-7901 gastric cancer cells.** *Acta Biochimica et Biophysica Sin (Shanghai)*, v. 39, p. 520-526, 2007.

WANG, L. H.; JIANG, S. Y. **Simultaneous determination of urinary metabolites of methoxypsoralens in human and Umbelliferae medicines by high-performance liquid chromatography.** *Journal of Chromatographic Science*, v. 44, p. 473-478, 2006.

WANG, C. X.; HUANG, L. S.; HOU, L. B.; JIANG, L.; YAN, Z. T.; WANG, Y. L.; CHEN, Z. L. **Antitumor effects of polysorbate-80 coated gemcitabine polybutylcyanoacrylate nanoparticles in vitro and its pharmacodynamics in vivo on C6 glioma cells of a brain tumor model.** *Brain Research*, v. 1261, p. 91-99, 2009.

WILLIS, R. A. **The spread of tumors in the human body.** London, Butterworth & Co, 1952.

WILSON, B. C.; PATTERSON, M. S. **The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy.** *Physics in Medicine and Biology*, v. 53, p. R61-R109, 2008.

WOLFF, J. E.; TRILLING, T.; MÖLENKAMP, G.; EGELER, R. M.; JÜRGENS, H. **Chemosensitivity of glioma cells in vitro: a meta analysis.** *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 125, p. 481-486, 1999.

WU, J. H.; WILSON, J. B.; WOLFREYS, A. M.; SCOTT, A.; JONES, N. J. **Optimization of the comet assay for the sensitive detection of PUVA-induced DNA interstrand cross-links.** *Mutagenesis*, v. 24, p. 173-181, 2009.

YAMANAKA, R.; SAYA, H. **Molecularly targeted therapies for glioma.** *Annals of Neurology*, v. 66, p. 717-729, 2009.

ZAREBSKA, Z.; WASZKOWSKA, E.; CAFFIERI, S.; DALL'ACQUA, F. **PUVA (psoralen+UVA) photochemotherapy: processes triggered in the cells.** *Farmaco*, v. 55, p. 515-520, 2000.

ZERARA, M.; BRICKMANN, J.; KRETSCHMER, R.; EXNER, T. E. **Parameterization of an empirical model for the prediction of n-octanol, alkane and cyclohexane/water as well as brain/blood partition coefficients.** *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 23, p. 105-111, 2009.

ZHANG, M.; SONG, T.; YANG, L.; CHEN, R.; WU, L.; YANG, Z.; FANG, J. **Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients.** *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, v. 27, p. 85, 2008

ZHAO, D.; JIANG, Y.; DONG, X.; LIU, Z.; QU, B.; ZHANG, Y.; MA, N.; HAN, Q. **Arsenic trioxide reduces drug resistance to adriamycin in leukemic K562/A02 cells via multiple mechanisms.** *Biomedical Pharmacotherapy*, v. 65, p. 354-358, 2011.

ZHENG, H.; WANG, X.; LEGERSKI, R. J.; GLAZER, P. M.; LI, L. **Repair of DNA interstrand cross-links: Interactions between homology-dependent and homology-independent pathways.** *DNA Repair (Amst.)*, v. 5, p. 566-574, 2006.

ZHOU, R.; SKALLI, O. **TGF- α differentially regulates GFAP, vimentin, and nestin gene expression in U-373 MG glioblastoma cells: correlation with cell shape and motility.** *Experimental Cell Research*, v. 254, p. 269-278, 2000.



Manuscrito a ser submetido para publicação contendo primeira parte dos resultados da tese de Doutorado

TITLE**8-methoxypsoralen: a novel GST- π inhibitor and its potential for glioblastoma therapy****AUTHORS**

Diêgo Madureira de Oliveira [1], Marcel Tavares de Farias MSc [2], André Lacerda Braga Teles MSc [3], Manoelito Coelho dos Santos Junior MSc [3], Martins Dias de Cerqueira MSc, PhD [1], Rute Maria Ferreira Lima MSc [1], Ramon Santos El-Bachá MSc, PhD [1]

[1] *Laboratory of Neurochemistry and Cell Biology, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Brazil*

[2] *Laboratory of Clinical and Toxicological Analysis, São Rafael Hospital, Salvador, Bahia, Brazil*

[3] *Laboratory of Molecular Modeling, State University of Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil*

Corresponding author

Ramon S. El-Bachá

Laboratory of Neurochemistry and Cell Biology, Department of Biochemistry and Biophysics, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, 40110-902, Salvador, Bahia, Brazil

Tel.: +55 7132838916

FAX: +55 7132838927

E-mail address: ramon@ufba.br (alternative e-mail address: ramon.elbacha@pq.cnpq.br)

ABSTRACT

The Glutathione *S*-transferases (GSTs) are multifunctional enzymes which play a key role in cellular detoxification. Because of its ability to promote conjugation between drugs and the tripeptide glutathione, its expression is related to drug resistance, specially the isoform π (GSTP1-1), that plays crucial roles in cancer chemoprevention and chemoresistance and is a key target for anticancer drug development. In this work we presented, for the first time, the 8-methoxypsoralen (8-MOP), a psoralen derivative clinically used in skin diseases treatment, as a novel promising GST- π inhibitor by using association of chemical, biochemical and cellular techniques. 8-MOP inhibited competitively the enzyme activity despite it is not a substrate, and binds to the H-site of GST- π . 8-MOP also increased the effect of the drugs etoposide and temozolomide on cells from human glioblastoma, which is a kind of cancer that represents a challenger for conventional therapy. Additionally, 8-MOP reduced tumor cells viability, showing a potential intrinsic antitumor activity since GST- π is also involved in apoptosis regulation. Then, a new therapeutic use as chemosensitizer, and also possibly as chemotherapeutic agent, is proposed for this old drug.

Keywords: 8-methoxypsoralen, glioblastoma, GST, cancer

INTRODUCTION

The Glutathione *S*-transferases (GSTs; EC 2.5.1.18) are multifunctional enzymes which are mainly involved in phase II metabolism and antioxidant cell systems; they play a key role in cellular detoxification and protecting macromolecules from reactive electrophiles, including reactive oxygen species and environmental carcinogens [1]. Human GSTs are divided into three major families: mitochondrial, peroxisomal/microsomal and cytosolic, that is subdivided into seven distinct classes (α , μ , π , σ , θ , ω and ζ) according to physical structure of the genes, immunological crossreactivity and amino-acid sequences [2]. Special attention has been given to these enzymes since they are strongly associated with drug resistance, remarkable in cancer [3], because of its ability to promote conjugation between drugs and the tripeptide glutathione. It is well known that genetic polymorphism of GST is related to drug resistance [4], and the resistance to several classes of chemotherapeutic agents promoted by GST overexpression were already experimentally demonstrated [5]. There are also many works showing association between GST polymorphisms and predisposition to cancer [1].

Despite virtually all classes of GSTs are involved in chemoresistance, the most highly expressed GST isoenzyme in various human cancerous and precancerous tissues is GST- π [3]. Overexpression of this class of GST was associated with drug resistance in tumors like osteosarcoma [6] and lung cancer [7] and poor prognosis in gastric cancer [8], primary ovarian carcinoma [9] and gliomas [10]. Then, inhibition of Pi-class GST activity or inhibition of its expression, has been shown to increase the tumor sensitivity to many drugs [3]. Indeed, many inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione *S*-transferases have been developed for a long time, but the clinical effectiveness of these molecules are poor and do not justify therapeutic use [11], what leads us to look for new effective inhibitors.

Diffuse gliomas are the most common form of primary brain tumor, and glioblastoma (highest malignant glioma) is the most frequent brain tumor in adults [12]. The glioblastoma (GB) is also the most aggressive brain tumor and represents 2% of all diagnosed cancers, with a median overall survival between 9 and 12 months [13]. The current standard of care in patients with GB involves maximal safe surgical resection, radiation therapy and adjuvant chemotherapy with the alkylating agent temozolomide [14]. Nevertheless the impact of technological advances on clinical outcome has not been satisfactory [15]; one reason for the unsuccessful therapy is chemoresistance. The enzyme O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) is the most frequently associated factor to temozolomide resistance in glioblastomas [14], however, there are experimental observations suggesting that inhibition of GST increases the response of glioblastoma cells to alkylating agents better than the inhibition of MGMT [16]. Association between overexpression of GST- π and drug resistance in malignant glioma cells was already experimentally demonstrated [17]. In fact, expression of GST- π in gliomas, especially glioblastoma, has been extensively shown and this expression is associated with poor prognosis [10, 18, 19]. Despite these evidences, the GSTs inhibition approach has not been tested for this kind of cancer in the current literature.

In this work we presented 8-methoxypsoralen (8-MOP) (Fig. 1), a psoralen derivative clinically used in skin diseases treatment [20], as a novel promising GST- π inhibitor, pointing considerations about its mechanism of action, and showing its potential for cancer therapy by using an *in vitro* model of glioblastoma.

MATERIALS AND METHODS

Assay of glutathione S-transferase activity

GST activity was measured as described by van Haaften [21] with modifications. In short, the reaction of 1 mM GSH with 1 mM CDNB catalyzed by GST (GSTP1-1 at 0.1 U/ml or 0.15 mL of lysate of human glioma cells in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5, at 25°C) was monitored spectrophotometrically by recording the increase in absorbance at 340 nm. Absorbance Units were converted to concentration of DNP-SG (the conjugate of GSH and CDNB) as described by Mannervik and Guthenberg [22]. A correction for the spontaneous reaction was made by monitoring formation of DNP-SG in the absence of enzyme. For inhibitory effect analysis increasing concentrations of 8-MOP were used. In the test with lysate of glioma cells, total protein content was measured (Dc protein assay, Bio-Rad®, Hercules CA USA) and relative GST activity was calculated as reaction rate (Absorbance Units/seg)/mg of protein, and expressed as percentage of control group. 8-MOP was dissolved in DMSO with a final concentration of 0.5% (v/v); this solvent was present in all groups and did not affect GST activity. Effect of each concentration of 8-MOP in spontaneous formation of DNP-SG was also discounted by monitoring the reaction in the presence of the drug and absence of enzyme. For IC₅₀ calculation data were expressed as percentage of activity in control (group with no 8-MOP) and non-linear regression was performed. To study the inhibitory mechanism substrate concentrations (CDNB or GSH) were varied (when GSH concentration was varied the CDNB concentration was kept at 1 mM and vice versa). Five independent experiments were performed with and without 8-MOP at a concentration near the IC₅₀. V_{max} and K_m values were calculated by non-linear regression following the Michaelis-Menten mode and mechanism visualized by Lineweaver-Burk plot.

UV-Vis –spectrophotometry

Electronic absorption spectra of solutions containing CDNB with GSH or 8-MOP with GSH in the presence or absence of GST- π were recorded using a Hewlett-Packard model 8452 A recording spectrophotometer using 1cm quartz cells and compared to CDNB alone and 8-MOP alone spectra. For calculate reaction rate the kinetic mode (pseudo-first order) was selected and increasing of absorption at 340 nm was monitored for 3 min. (time between measurements 10 sec.) in water-jacketed quartz cells, at 30°C, containing reagents for tests of glutathione S-transferase activity. Unit of rate was transformed from absorbance unit/seg to $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$.

High performance liquid chromatography analyses

Chromatographic analyses of CDNB/CDNB-conjugate and 8-MOP/8-MOP-conjugate were performed according to previous description in literature [23, 24] with modifications. Alliance® HPLC system 2695

separations module with the 2487 dual wavelength ultraviolet absorbance detector was used in chromatographic analyses. Data were collected and analyzed by the Empower 2 chromatography data software (Waters). A 3.9 x 150 mm x 5 μm C18 column (XTerra MS - Waters) and a 3.9 x 20 mm pre-column (C18, XTerra MS - Waters) were used. The samples were pre-filtered through cellulose membrane (0.45 μm) and the column temperature was maintained at 25°C. For CDNB/DNP-SG, 1% acetic acid and acetonitrile (80:20, v/v) was used as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min and detection was performed simultaneously at 280 and 340 nm. Determination of 8-MOP/8-MOP-SG was performed with gradient elution as shown (Table 1) at a flow rate of 1 mL/min and detection was performed simultaneously at 248 and 301 nm. A good separation achieved within 12 min under both chromatographic conditions used.

Theoretical logP value calculation

Structures were designed in 2D and converted to 3D by using the softwares ChemDraw 10.0 and Chem3d 10.0, respectively. Theoretical log P and log D values were calculated using on-line tool LogP Calculator available in the University of Massachusetts Boston General Biology web site (<http://intro.bio.umb.edu/111-112/OLLM/111F98/newclogp.html>). For calculation, the method weighted was chosen and the following condition was admitted: $[\text{Cl}^-] = [\text{Na}^+] = [\text{K}^+] = 0.1 \text{ mol/dm}^3$.

Cell culture and preparation of cytosolic protein extract

Human glioblastoma GL-15 cells [25] were cultured at 37°C in Eagle's medium modified by Dulbecco (DMEM), supplemented with 1mM pyruvic acid, 2mM L(+)-glutamine, 44mM NaHCO_3 , 10 % fetal bovine serum, 100 UI/mL penicillin and 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin in a humidified atmosphere of 5 % CO_2 and 95 % air. The culture medium was changed every 2 days. In order to evaluate activity of GST from GL-15 cells, confluent cultures in 10mm dishes were lysated with 1mL of distilled water under vigorous sheik for 30 min. The extract was centrifuged at 5,000 g (10 min) and supernatant stored at -70°C until use in GST activity assays.

Cell viability measurement and microscopic analysis

In order to evaluate the chemosensitizer potential of 8-MOP cells were seeded in 96-well plates at a density of $31 \times 10^3 \text{ cell/cm}^2$, cultured for 24h and treated for 48h with increasing concentrations of chemotherapeutic drugs in the presence or absence of 0.05 mM 8-MOP, which was added 2 hours before treatments. Both drugs and 8-MOP were dissolved in DMSO (final concentration 0.5% v/v). Cell viability was measured by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) method [26]. In short, after treatment the MTT reagent dissolved in PBS was added to each well (1 mg/mL). Following additional 2 h incubation, 100 μL of SDS (50 % DMF and 20 % SDS in water) was added to breach the cells and to dissolve the formazan crystals, the absorbance was then measured at 595 nm of wavelength using a microplate reader

(THERMO PLATE, model TP-reader – type B). Wells without cells were used as blanks and were subtracted as background from each sample. To access cytotoxicity of 8-MOP, GL-15 cells were treated with increasing concentrations of it for 72 hours under the same described conditions and viability also measured by MTT assay. Cell growth after long-term (10 days) exposure to low dose 8-MOP was evaluated by Trypan blue exclusion assay [27] in Petri dishes (35mm in diameter), at low cell density (3.86×10^3), using a hemocytometer to count the viable cells; and expressed as percentage of cells in the first day. DMSO at 0.5% was used as vehicle control. In the long-term experiment 0.02 mM 8-MOP was added during each medium change. Changes in cell morphology were observed by contrast phase microscopy and pictures were taken using a high resolution digital camera.

Immunocytochemistry

GST- π expression in GL-15 cells was attested by immunostaining using anti-GSTP1-1 antibody. The cells were permeabilized in methanol at -20°C for 10 min and incubated with the primary antibody (rabbit polyclonal IgG anti GSTP1/2 – Santa Cruz®, 1:500) for 1 h. Subsequently, cells were rinsed three times with PBS, incubated with the secondary antibody (Conjugated Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit IgG – Invitrogen®, 1:400) and finally observed by fluorescence microscopy (Olympus AX70 microscope – green filter). A 20 \times /0,40 objective was used. For nucleus staining, cells were incubated with 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNA dye Hoechst 33258 in PBS for 10 min at room temperature and rinsed three times with PBS. Then, they were analyzed by fluorescence microscopy (Olympus AX70 microscope – ex/em 340/510 nm). The CoolSNAP-Pro cf color camera and the software Image-Pro Discovery version 4.5.1.29 (both from Media Cybernetics, Inc) were used to take the pictures. For negative control cells were incubated with only secondary antibody under the same conditions exposed above.

Evaluation of content of intracellular reduced glutathione

Monochlorobimane (MCB) assay [28] was used to evaluate GSH depletion. After 30 minutes exposition to 8-MOP (0.05 mM and 0.4 mM) and CDNB (0.05 mM), GL-15 cells were washed three times with PBS and incubated with 1 mM MCB in medium with 1% ethanol for 40 minutes. DMSO at 0.5% (vehicle of 8-MOP) was present in all treated cultures. Control groups were cells treated with vehicle only or not treated at all. After the incubation time, cells were washed again with PBS and observed by fluorescence microscopy (Olympus BX 51 - URA2, San Jose, USA). The fluorescence mirror unit Olympus U-MWU2 was selected to observe cells. This mirror unity excites the fluorochrome in the band between 330 –385 nm, it has a dichromatic mirror (400 nm), and an emission filter of 420 nm. Photographs were taken using an exposure time of 60 msec for all samples by an Olympus BX-2 camera attached to the microscope.

Statistics analysis

The Statistics analyses were performed with the software GraphPad Prism version 5.00 for Windows. Data were showed as mean with SEM or median with range according to their distribution, analyzed by Shapiro-Wilk normality test and Skewness (normal: <1 or >-1) and Kurtosis (normal: <2 or >-2) calculation Also according to the distribution, parametric or non-parametric statistic test were chosen. The most appropriate test for each experiment was used and this information is in the respective captions. At least three independent experiments were done for each assay.

RESULTS

GST- π inhibitory activity of 8-MOP

Glutathione *S*-transferase activity was concentration-dependently inhibited by 8-MOP (Fig. 2a). The inhibitory effect of 8-MOP was fitted to Eq. (1):

$$(1) \quad A = \{137.97/[1+10^{(3.734\text{Log}C-8.136386)}]\}-69.72 \quad (R^2=0.9238)$$

in which A corresponds to GST- π activity (in percentage of control) and C is the 8-MOP concentration (Fig. 2b). The calculated IC₅₀ (concentration of 8-MOP able to inhibit 50% of GST- π activity) was 0.092 mM.

To obtain information on the nature of the inhibition, measurement of GST- π activity was performed with variable concentrations of either CDNB or GSH in the presence of 0.1 mM 8-MOP. The enzyme shows characteristic Michaelis Menten behavior towards both substrates; but the inhibitor presented a double behavior. A competitive inhibition pattern was observed when 0.1 mM 8-MOP was tested toward varying concentrations of CDNB (Fig. 2c-e). The presence of 8-MOP increased calculated Km value from 0.30 mM to 0.68 mM, but it did not change significantly the calculated Vmax value, indicating that both, inhibitor and substrate (CDNB) link to the same region of the active site. However, when 0.1 mM 8-MOP was tested toward varying concentrations of GHS both Km and Vmax values decreased, from 0.25 mM and 11.36 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ to 0.09 mM and 4.70 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$, respectively, what can be interpreted as uncompetitive inhibition (Fig. 2f-h), indicating that inhibitor and substrate (GSH) link to different sites in the enzyme or different regions of the active site.

Mechanism of action

It is well known that GST- π catalyzes conjugation between CDNB (Fig. 3a) and GSH to form DNP-SG (Fig. 3b). Since 8-MOP inhibits competitively the activity of this enzyme, we hypothesized that 8-MOP could be a substrate, just as CDNB. If it is true, a new compound (8-MOP-SG) (Fig. 3d and Supplementary Fig. 1) would

be formed. UV-Vis spectrophotometric analysis clearly showed the generation of DNP-SG (that has a different absorption spectrum when compared to CDNB) by addition of GST- π in presence of GSH. In contrast, addition of enzyme in 8-MOP/GSH containing solution did not change its absorption profile, suggesting no alteration in the 8-MOP structure (Fig. 3e-f). The presence of GSH alone did not modified both CDNB and 8-MOP spectrums (Supplementary Fig. 2).

To certify that 8-MOP-SG is not present in the solution, HPLC was carried out using maximal absorbance values for each solution to detection. Again, DNP-SG was identified in a retention time (RT) lower than CDNB, but a single peak is present in the chromatogram for 8-MOP/GSH plus GST- π , with the same RT of solution without enzyme (Fig. 3g-h), that is the RT of 8-MOP alone. The theoretical log P value for CDNB and log D value for DNP-SG are 2.46 and -3.14, respectively (Supplementary Fig. 3a-b), what justifies the lower RT of DNP-SG. On the other hand, log P value for 8-MOP is 1.78 (justifying its low RT when compared to CDNB) and the log D value for 8-MOP-SG is -2.58 (Supplementary Fig. 3c-d), but no peak in a very low RT, as expected, was visualized in the chromatogram.

Changes in absorption and chromatographic profiles were the same 1 hour (data not shown) and 30 days (Fig. 3e-h) after GST- π addition. Then, the evidences support the idea that 8-MOP-SG is not formed, or it is formed in a very low extent.

Effects of 8-MOP in a cell system

8-MOP was also able to inhibit GST activity in cytosolic protein extract of tumor cells (Fig. 4a-b). First, kinetics parameters of GST activity on cell lysate were accessed (Fig. 4a). Michaelis Menten classic equation could not be used and K_m and V_{max} calculation could not be performed since there were not only one isoform of GST present in the lysate. Then, data was analyzed by non-linear regression and fitted to Eq. (2):

$$(2) \quad R=0,02628 + (0,27962/(1+10^{(1,344554-4,521C)})) \quad (R^2=0.9770)$$

in which R corresponds to reaction rate and C is the concentration of substrates (GSH and CDNB). Substrates concentrations greater than 0.5 mM saturated the enzyme amount present in the volume of lysate used (0.15 mL). Saturating conditions (substrates at 1 mM) were used to investigate GST activity inhibition by 8-MOP, which shows concentration-dependent pattern (Fig. 4b). Immunodetection confirmed expression of GST- π in human glioblastoma GL-15 cells (Fig. 4c). Additionally, treatment with 0.05 mM CDNB for 15 minutes depleted intracellular reduced GSH, as expected, but 8-MOP did not promote GSH depletion even at high concentration (0.4 mM), giving support to our hypothesis that 8-MOP does not conjugate with GSH (Fig. 4d-h).

Pharmacological potential of 8-MOP

To investigate evidences of chemosensitizer action of 8-MOP, cells from human glioblastoma (GL-15) were exposed to some chemotherapeutic agents in the presence or absence of a sub-toxic concentration of 8-

MOP. The drug increased susceptibility for etoposide, which is a recognized substrate for GST- π , but not for doxorubicin and vincristine (Fig. 5a-c). Also, in presence of 8-MOP, high concentrations of temozolomide lead to decreases of cell viability greater than 15% in these cells that are totally resistant to this agent (Fig. 5d and Supplementary Figure 4). 8-MOP alone had not detectable effect (Fig. 5e). The effects, accessed by MTT assay, were clearly visualized by phase contrast microscopy that shows reduction of cellularity and morphological changes promoted by the associations (Fig. 5).

When cultures were treated with 8-MOP for 72 hours, concentrations greater than 0.05 mM promoted reduction of viability that reached 25% (Fig. 6a). A low concentration of this drug was also effective for reducing cell proliferation accessed by trypan blue assay after 10 days exposition (Fig. 6b). Microscopic finds suggest that 8-MOP promotes tumor cell death, possibly through apoptosis (Fig. 6).

DISCUSSION

The overexpression of GSTs in many kinds of tumors encourages studies with agents able to promote down regulation of these enzymes [29], GST-activated pro-drugs aiming selective action [30, 31, 32] and GSTs inhibitors aiming overpass drug resistance [33, 34]. However, nowadays, there is no GST-based approach consistent enough to be adopted as clinical adjuvant therapy. In a phase I clinical study the GST-activated pro-drug brostallicin showed hematologic toxicity [35]. Ethacrynic acid was the first GST inhibitor, acting as substrate of some isoenzymes of GST, it was utilized to sensitize cancer cells to the cytotoxic effect of alkylating agents. However, a number of substantial side effects such as a marked diuresis have discouraged the use of this molecule in clinical practice [36]. We presented 8-methoxypsoralen (8-MOP), a coumarin derivative, as a promising GST- π inhibitor, although we do not exclude the possibility that it inhibits other GSTs. 8-MOP is a known drug that has been orally and topically used for decades in the treatment of skin disease like psoriasis and eczema [37].

8-MOP dose-dependently reduced human GST- π activity *in vitro* and also decreased total GST activity in cytosolic extract of human glioblastoma cells. To access the mechanism of action, enzyme kinetic assays were performed and pointed a competitive pattern of inhibition with 8-MOP occupying the hydrophobic binding site (H-site) of the enzyme, keeping the glutathione binding site (G-site) free. Since inhibition is competitive, 8-MOP could simply act as a substrate. To show that it is not truth, spectrophotometric analyses were carried out. The psoralen is conjugated system in a ring that extends to the aromatic furan ring, including the carbonyl group. With the addition of glutathione, via the sulfur atom, the conjugated system involving the furan ring is lost, affecting the energy of the orbitals involved in the length of links, hence there is a change in the range of absorption in the UV [38]; despite we have predicted the most probable structure for an 8-MOP/GSH conjugate, this phenomenon would occur whatever the atom with the thiol group of GSH reacted with, but no changes in the UV-Vis spectrum was observed. This analysis is enough to prove that there is no detectable formation of 8-MOP-SG, nevertheless we carried out chromatographic analyses that confirmed the find.

Finally, the results from experiment with monochlorobimane (MCB) suggest that 8-MOP does not act as substrate of GST from any class, since no GSH depletion occurred at all. Whereas conjugation of MCB with GSH is catalyzed by many cytosolic GSTs [39], the MCB assay also reflects the GST activity [28], and then the

results also confirm the reversible nature of the inhibition (since after washing it is possible to visualize fluorescence) or suggests that 8-MOP does not inhibit all cytosolic GSTs, presenting any selectivity.

The search for effective GSTs inhibitors for use in cancer therapy is not recent. Almost two decades ago, clinical studies indicate ethacrynic acid as candidate of modulator of drug resistance [40]. At the same time, the selective GST- π inhibitor TER-117 was synthesized [41], but there are no recent studies with this. Other GST- π specific inhibitors were able to revert multiple drug resistance in cholangiocarcinoma [42], but maybe the most promising compound is the non-GSH peptidomimetic 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX), a representative molecule of a new class of 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD) derivatives [43]. The GST- π specific inhibitor NBDHEX increased temozolomide efficacy in an *in vivo* model of malignant melanoma [33] and were also effective in overcoming drug resistance in osteosarcoma cell lines [8]. 8-MOP is a low molecular weight hydrophobic compound that easily crosses the cell membrane; it is also a non-peptidomimetic GST inhibitor, characteristics that made NBDHEX a promising new therapeutic possibility. Also, 8-MOP is structurally simpler than NBDHEX, what facilitates its synthesis. Another advantage of 8-MOP is the possibility of short-term clinical using. There are no clinical trials with NBDHEX, in the other hand, there are a number of clinical trials with 8-MOP, that is already clinically used [44]. In fact, clinical studies with psoralen derivatives, including 8-MOP, were realized since the late 70, and its toxicity in humans is well known [45]. Despite it is the first time that GST inhibitory activity is attributed to a psoralen derivative molecule, there are previous evidences of this activity: Esculetin, a coumarin derivative structurally related to 8-MOP, showed inhibitory activity for some vegetal GSTs [46], and some small natural compounds had been proposed as chemomodulators due to its tendency to inhibit GSTs [47].

GSH conjugates (and also peptidomimetic GST inhibitors) are eliminated by efflux pumps. Co-expression of GST- π and the efflux pump MRP1 (multi-drug resistance protein 1) is associated with resistance to doxorubicin, vincristine and etoposide [5, 48]. 8-MOP was tested as chemosensitizer in cultures of human glioblastoma cells when co-administered with this drugs and the standard agent temozolomide (TMZ), and it was effective for TMZ and etoposide, what is probable due to its GST- π inhibitory action. 8-MOP reduced GST activity in cells lysate, but the substance used in the test (CDNB) is not a GST- π specific substrate, then it is possible that 8-MOP inhibits other isoforms of GST. Immunodetection showed that GL-15 express GST- π anyway. It was documented that GST- π polymorphisms is associated with survival in anaplastic glioma patients; an explanation is that lower activity GST genotypes will allow more prolonged exposure of tumor cells chemotherapeutic agents [49]. The increase in expression and activity of GST-Pi in glioma cells promoted by flavonoid kaempferol is also believed to be the cause of resistance to cisplatin induced by this flavonoid [50].

Besides improve etoposide activity and make GL-15 responsive to temozolomide, 8-MOP showed intrinsic toxic action against these tumor cells. Indeed, besides its active role in the detoxification of antitumor drugs, GSTs ,especially GST- π , are also involved in the regulation of apoptosis through the inhibition of the c-Jun-N-terminal kinase (JNK) signaling pathway, what is responsible for resistance toward drugs which are not substrates for GSTs in tumor cells those overexpress this enzyme [51, 52]. It is also truth for glioblastoma [19]. In fact, intrinsic proapoptotic activity was also described to GST inhibitors [53]. NBDHEX, for example, showed cytotoxic effect by activation of JNK/c-Jun pathway [54]. The toxic effects also suggest that 8-MOP really cross the plasmatic membrane, what was expected seeing log P value predicted for it (1.78). This intrinsic antitumor

activity is now under investigation; the apoptosis promoting activity of 8-MOP was already confirmed (data not shown).

In conclusion, we have shown new application for a well established drug. 8-MOP can represent a molecule of a novel class of GST inhibitors. The therapeutic potential of these inhibitors is not restricted to cancer treatment, these inhibitors could also have application in treatment of infectious diseases since GST activity has been reported in many pathogenic parasites [11]; and ours results also have implications for current treatment using 8-MOP, like PUVA (psoralen plus ultraviolet A) therapy.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by funds from The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). We would also like to thank Zenis Novais da Rocha PhD for allowing the use of the Hewlett-Packard recording spectrophotometer and for her valorous collaboration.

REFERENCES

1. Di Pietro G, Magno LA, Rios-Santos F (2010) Glutathione *S*-transferases: an overview in cancer research. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 6(2):153-170
2. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51-88
3. Sau A, Pellizzari Tregno F, Valentino F, Federici G, Caccuri AM (2010) Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Arch Biochem Biophys* 500(2):116-122
4. Lo HW, Ali-Osman F (2007) Genetic polymorphism and function of glutathione *S*-transferases in tumor drug resistance. *Curr Opin Pharmacol* 7(4):367-374
5. O'Brien M, Kruh GD, Tew KD (2000) The influence of coordinate overexpression of glutathione phase II detoxification gene products on drug resistance. *J Pharmacol Exp Ther* 294(2):480-487
6. Pasello M, Michelacci F, Scionti I, Hattinger CM, Zuntini M, Caccuri AM, Scotlandi K, Picci P, Serra M (2008) Overcoming glutathione *S*-transferase P1-related cisplatin resistance in osteosarcoma. *Cancer Res* 68(16):6661-6668
7. Wang J, Zhang J, Zhang L, Zhao L, Fan S, Yang Z, Gao F, Kong Y, Xiao GG, Wang Q (2011) Expression of P-gp, MRP, LRP, GST- π and TopoII α and intrinsic resistance in human lung cancer cell lines. *Oncol Rep* 26(5):1081-1089
8. Wang K, Li J, Zhen C, Zhou J, Xiao D, Liu J, Liu Y, Jiang H, Chen C, Wen J (2007) Enhanced invasive and metastatic potential induced by transforming growth factor-beta1 might be correlated with glutathione-*S*-

- transferase-pi, cofilin and heat shock protein 27 in SGC-7901 gastric cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 39(7):520-526
9. Lu D, Shi HC, Wang ZX, Gu XW, Zeng YJ (2011) Multidrug resistance-associated biomarkers PGP, GST-pi, Topo-II and LRP as prognostic factors in primary ovarian carcinoma. *Br J Biomed Sci.* 68(2):69-74
 10. Okcu MF, Selvan M, Wang LE, Stout L, Erana R, Airewele G, Adatto P, Hess K, Ali-Osman F, Groves M, Yung AW, Levin VA, Wei Q, Bondy M (2004) Glutathione *S*-transferase polymorphisms and survival in primary malignant glioma. *Clin Cancer Res.* 10(8):2618-2625
 11. Mahajan S, Atkins WM (2005) The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione *S*-transferases. *Cell Mol Life Sci* 62(11):1221-1233
 12. Brennan C (2011) Genomic profiles of glioma. *Curr Neurol Neurosci Rep* 11(3):291-297
 13. Arribas Alpuente L, Menéndez López A, Yayá Tur R (2011) Glioblastoma: changing expectations? *Clin Transl Oncol* 13(4):240-248
 14. Mrugala MM, Chamberlain MC (2008) Mechanisms of disease: temozolomide and glioblastoma--look to the future. *Nat Clin Pract Oncol* 5(8):476-486
 15. Niyazi M, Siefert A, Schwarz SB, Ganswindt U, Kreth FW, Tonn JC, Belka C (2011) Therapeutic options for recurrent malignant glioma. *Radiother Oncol* 98(1):1-14
 16. Juillerat-Jeanneret L, Bernasconi CC, Bricod C, Gros S, Trepey S, Benhattar J, Janzer RC (2008) Heterogeneity of human glioblastoma: glutathione-*S*-transferase and methylguanine-methyltransferase. *Cancer Invest* 26(6):597-609
 17. Fruehauf JP, Brem H, Brem S, Sloan A, Barger G, Huang W, Parker R (2006) In vitro drug response and molecular markers associated with drug resistance in malignant gliomas. *Clin Cancer Res* 12(15):4523-4532
 18. Calatuzzolo C, Gelati M, Ciusani E, Sciacca FL, Pollo B, Cajola L, Marras C, Silvani A, Vitellaro-Zuccarello L, Croci D, Boiardi A, Salmaggi A (2005) Expression of drug resistance proteins Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 and GST-pi in human glioma. *J Neurooncol* 74(2):113-121
 19. Lo HW, Antoun GR, Ali-Osman F (2004) The human glutathione *S*-transferase P1 protein is phosphorylated and its metabolic function enhanced by the Ser/Thr protein kinases, cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C, in glioblastoma cells. *Cancer Res* 64(24):9131-9138
 20. Engin B, Oguz O (2005) Evaluation of time-dependent response to psoralen plus UVA (PUVA) treatment with topical 8-methoxypsoralen (8-MOP) gel in palmoplantar dermatoses. *Int J Dermatol.* 44(4):337-339
 21. van Haaften RI, den Hartog GJ, Evelo CT, Haenen GR, Bast A (2001) Hypochlorous acid is a potent inhibitor of GST P1-1. *Chem Biol Interact* 138(1):77-83

22. Mannervik B, Guthenberg C (1981) Glutathione transferase (Human placenta). *Method Enzymol* 77:231–235
23. Vaidya SS, Gerk PM (2007) Simultaneous determination of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, 2,4-dinitrophenyl-*S*-glutathione and its metabolites for human placental disposition studies by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 859:94–102
24. Wang LH, Jiang SY (2006) Simultaneous determination of urinary metabolites of methoxypsoralens in human and Umbelliferae medicines by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Sci* 44(8):473-478
25. Bocchini V, Casalone R, Collini P, Rebel G, Lo Curto F (1991) Changes in glial fibrillary acidic protein and karyotype during culturing of two cell lines established from human glioblastoma multiforme. *Cell and Tissue Research* 265(1): 73–81
26. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63
27. Louis KS, Siegel AC (2011) Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol Biol* 740:7-12
28. Ublacker GA, Johnson JA, Siegel FL, Mulcahy RT (1991) Influence of glutathione *S*-transferases on cellular glutathione determination by flow cytometry using monochlorobimane. *Cancer Res* 51(7):1783-1788
29. Zhao D, Jiang Y, Dong X, Liu Z, Qu B, Zhang Y, Ma N, Han Q (2011) Arsenic trioxide reduces drug resistance to adriamycin in leukemic K562/A02 cells via multiple mechanisms. *Biomed Pharmacother.* 65(5): 354-358
30. Johansson K, Ito M, Schophuizen CM, Mathew Thengumtharayil S, Heuser VD, Zhang J, Shimoji M, Vahter M, Ang WH, Dyson PJ, Shibata A, Shuto S, Ito Y, Abe H, Morgenstern R (2011) Characterization of New Potential Anticancer Drugs Designed To Overcome Glutathione Transferase Mediated Resistance. *Mol Pharm.* 8(5):1698-1708
31. Kogias E, Osterberg N, Baumer B, Psarras N, Koentges C, Papazoglou A, Saavedra JE, Keefer LK, Weyerbrock A (2011) Growth-inhibitory and chemosensitizing effects of the glutathione-*S*-transferase- π -activated nitric oxide donor PABA/NO in malignant gliomas. *Int J Cancer* doi: 10.1002/ijc.26106
32. Pezzola S, Antonini G, Geroni C, Beria I, Colombo M, Broggin M, Marchini S, Mongelli N, Leboffe L, MacArthur R, Mozzi AF, Federici G, Caccuri AM (2010) Role of glutathione transferases in the mechanism of brostallicin activation. *Biochemistry* 49(1):226-235
33. Tentori L, Dorio AS, Mazzon E, Muzi A, Sau A, Cuzzocrea S, Vernole P, Federici G, Caccuri AM, Graziani G (2011) The glutathione transferase inhibitor 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) increases temozolomide efficacy against malignant melanoma. *Eur J Cancer* 47(8):1219-1230

34. Cui H, Shen J, Lu D, Zhang T, Zhang W, Sun D, Wang PG (2008) 4-Aryl-1,3,2-oxathiazolylum-5-olate: a novel GST inhibitor to release JNK and activate c-Jun for cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 62(3):509-515
35. Caponigro F, Lorusso D, Fornari G, Barone C, Merlano M, Airoidi M, Schena M, MacArthur R, Weitman S, Jannuzzo MG, Crippa S, Fiorentini F, Petroccione A, Comis S (2010) Phase I dose-escalation study of brostallicin, a minor groove binder, in combination with cisplatin in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 66(2):389-394
36. Quesada-Soriano I, Parker LJ, Primavera A, Wielens J, Holien JK, Casas-Solvas JM, Vargas-Berenguel A, Aguilera AM, Nuccetelli M, Mazzetti AP, Lo Bello M, Parker MW, García-Fuentes L (2011) Diuretic drug binding to human glutathione transferase P1-1: potential role of Cys-101 revealed in the double mutant C47S/Y108V. *J Mol Recognit* 24(2):220-234
37. Tzaneva S, Kittler H, Thallinger C, Hönigsmann H, Tanew A (2009) Oral vs. bath PUVA using 8-methoxypsoralen for chronic palmoplantar eczema. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 25(2):101-105
38. Clayden J, Greeves N, Warren S, Wothers P (2008) Deslocalization and Conjugation. In: *Organic Chemistry* (Oxford University Press), New York, pp 169-170
39. Eklund BI, Edalat M, Stenberg G, Mannervik B (2002) Screening for recombinant glutathione transferases active with monochlorobimane. *Anal Biochem* 309(1):102-108
40. Lacreata FP, Brennan JM, Nash SL, Comis RL, Tew KD, O'Dwyer PJ (1994) Pharmacokinetics and bioavailability study of ethacrynic acid as a modulator of drug resistance in patients with cancer. *J Pharmacol Exp Ther* 270(3):1186-1191
41. Lyttle MH, Hocker MD, Hui HC, Caldwell CG, Aaron DT, Engqvist-Goldstein A, Flatgaard JE, Bauer KE (1994) Isozyme-specific glutathione-S-transferase inhibitors: design and synthesis. *J Med Chem* 37(1):189-194
42. Nakajima T, Takayama T, Miyanishi K, Nobuoka A, Hayashi T, Abe T, Kato J, Sakon K, Naniwa Y, Tanabe H, Niitsu Y (2003) Reversal of multiple drug resistance in cholangiocarcinoma by the glutathione S-transferase-pi-specific inhibitor O1-hexadecyl-gamma-glutamyl-S-benzylcysteinyl-D-phenylglycine ethylester. *J Pharmacol Exp Ther* 306(3):861-869
43. Ricci G, De Maria F, Antonini G, Turella P, Bullo A, Stella L, Filomeni G, Federici G, Caccuri AM (2005) 7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatives, a new class of suicide inhibitors for glutathione S-transferases. Mechanism of action of potential anticancer drugs. *J Biol Chem* 280(28):26397-26405
44. Berroeta L, Man I, Dawe RS, Ferguson J, Ibbotson SH (2010) Randomized double-blind comparative study of 8-methoxypsoralen bath plus UV-A treatment regimens. *Actas Dermosifiliogr* 101(8):729-730

45. Sehgal VN (1975) A comparative clinical evaluation of trimethylpsoralen, psoralen and 8-methoxypsoralen in treating vitiligo. *Int J Dermatol* 14(3):205-208
46. Hossain MD, Fujitam (2009) Effect of esculetin on activities of pumpkin glutathione *S*-transferases and growth of pumpkin seedlings. *Biol Plantarum* 53(3):565-568
47. Hayeshi R, Mutingwende I, Mavengere W, Masiyanise V, Mukanganyama S (2007) The inhibition of human glutathione *S*-transferases activity by plant polyphenolic compounds ellagic acid and curcumin. *Food Chem Toxicol* 45(2):286-295
48. Depeille P, Cuq P, Passagne I, Evrard A, Vian L (2005) Combined effects of GSTP1 and MRP1 in melanoma drug resistance. *Br J Cancer* 93(2):216-223
49. Kilburn L, Okcu MF, Wang T, Cao Y, Renfro-Spelman A, Aldape KD, Gilbert MR, Bondy M (2010) Glutathione *S*-transferase polymorphisms are associated with survival in anaplastic glioma patients. *Cancer* 116(9):2242-2249
50. Nakatsuma A, Fukami T, Suzuki T, Furuishi T, Tomono K, Hidaka S (2010) Effects of kaempferol on the mechanisms of drug resistance in the human glioblastoma cell line T98G. *Pharmazie* 65(5):379-383
51. McIlwain CC, Townsend DM, Tew KD (2006) Glutathione *S*-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene* 25(11):1639-1648
52. Tew KD, Townsend DM (2011) Regulatory functions of glutathione *S*-transferase P1-1 unrelated to detoxification. *Drug Metab Rev.* 43(2):179-193
53. Turella P, Cerella C, Filomeni G, Bullo A, De Maria F, Ghibelli L, Ciriolo MR, Cianfriglia M, Mattei M, Federici G, Ricci G, Caccuri AM (2005) Proapoptotic activity of new glutathione *S*-transferase inhibitors. *Cancer Res* 65(9):3751-3761
54. Tregno FP, Sau A, Pezzola S, Geroni C, Lapenta C, Spada M, Filomeni G, Bonanno E, Federici G, Caccuri AM (2009) In vitro and in vivo efficacy of 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) on human melanoma. *Eur J Cancer* 45(14):2606-2617

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1 Molecular structure of 8-methoxypsoralen, a furanocoumarin also called Xanthotoxin

Fig. 2 Dose-dependent inhibition of GST- π activity by 8-MOP (A) and non-linear regression ($R^2=0.9238$) used to calculate IC_{50} (0.092 mM) (B). Michaelis-Mentem ($R^2=0.9874$ without 8-MOP and 0.9545 with 8-MOP) (C) and Lineweaver-Burk (D) plots and reaction dynamics scheme (E) showing competitive inhibition of human GST- π towards CDNB by 8-MOP. The K_m and V_{max} of the enzyme for CDNB were 0.30 mM (SD=0.05) and 11.58 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ (SD=0.77) respectively. After 0.1 mM 8-MOP treatment these values were 0.68 mM (SD=0.06) and 11.71 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ (SD=3.10). Michaelis-Mentem ($R^2=0.9733$ without 8-MOP and 0.9736 with 8-MOP) (F) and Lineweaver-Burk (G) plots and reaction dynamics scheme (H) showing uncompetitive inhibition of human GST- π towards GSH by 8-MOP. The K_m and V_{max} of the enzyme for GSH were 0.25 mM (SD=0.08) and 11.36 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ (SD=1.31) respectively. After the same treatment these values were 0.09 mM (SD=0.02) and 4.70 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ (SD=0.21). The enzyme was used at 0.1 U/mL. The graphs are representative of five individual experiments

Fig. 3 CDNB, DNP-SG and 8-MOP structures (A, B and C, respectively) and the supposed compound generated from conjugation of 8-MOP with GSH, here named 8-MOP-SG (D). The conjugation with GSH in B and D significantly reduced the Log P value calculated to the molecules. Spectrophotometric evidences of presence of DNP-SG, but not 8-MOP-SG, in the absorption spectrums of CDNB plus GSH and 8-MOP plus GSH in the absence (E) and in the presence (F) of GST- π . The maximum absorbance values for the solutions CDNB/GSH/enzyme and 8-MOP/GSH/enzyme (250nm, 340nm and 248nm, 301nm, respectively) were used for chromatographic detection of the conjugates. DNP-SG was detected (G). However, there are no evidences of 8-MOP-SG in the solution (H), leading to the conclusion that 8-MOP-SG is not formed or it is formed in a very low extent, or keeps attached to the active site

Fig. 4 Effect of 8-MOP on catalytic activity of GST from human glioblastoma cells. The rate of the reaction of conjugation between GST substrates CDNB and GSH, in presence of cytosolic protein extract of GL-15 cells, increased according to these substrates concentration until saturation (A). Line represents non-linear regression ($R^2=0.9770$) of the data. Substrate concentrations of 1mM (saturated conditions for the volume of extract used) were chosen to evaluate inhibitory effect of 8-MOP, that showed concentration-dependent pattern (B). Data did not present normal distribution and were analyzed by Kruskal-Wallis nonparametric test (excluding first group) followed by Dunn's Multiple Comparison test * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. GL-15 cells labeled positively to GST- π (C). MCB assay revealed that intracellular reduced GSH was present in control conditions (D,E) and was depleted by addition of CDNB (F), but not by addition of 8-MOP at low (G) or high (H) concentration

Fig. 5 Effect of 8-MOP in the susceptibility of GL-15 cells to chemotherapeutic agents. Among drugs those are classical substrates for GST- π , doxorubicin (A), vincristine (B) and etoposide (C), 8-MOP acted as chemosensitizer only for etoposide, what was statistically significant at 0.001 mM and 0.1 mM. GL-15 cells also become more sensible to high concentrations of temozolomide (TMZ) after treatment with 8-MOP (D), 0.6 mM

and 1 mM TMZ plus 0.05 mM 8-MOP significantly reduced cell viability in 17.4% and 16%, respectively. Data were from MTT assay and presented normal distribution and were analyzed by Two-way ANOVA and Bonferroni post-test. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. # $p < 0.01$ compared to group treated with 8-MOP alone in the experiment with TMZ. Values are means (\pm SEM). Neither vehicle nor 8-MOP alone changed cell viability when compared to non-treated control group (E), these groups were represented separately to avoid compromising statistical analysis. The pictures show reduction of cellularity and morphological changes promoted by the associations. In the graphs, each point denotes the means of eight measurements

Fig. 6 Effects of 8-MOP on human glioblastoma GL-15 cells viability. 72h treatment with 0.05, 0.1 and 0.2 mM 8-MOP promoted a decrease of 16.87% (\pm 3.10), 19.14% (\pm 2.84) and 24.9% (\pm 2.98), respectively, on GL-15 viability evaluated by MTT assay (A). Data presented normal distribution and were analyzed by One-way ANOVA (excluding first group) and Dunnett's Multiple Comparison post-test. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Values are means (\pm SEM). Comparison between controls (white bars), those are statistically equal, were done by using t-test. Long-term exposure to low dose of 8-MOP (10 days, 0.02 mM) also resulted in reduced cell proliferation evaluated by trypan blue exclusion assay (B). The number of cells increased 380% (320,470) in control conditions against 270% (235,315) in 8-MOP treated group. Data did not present normal distribution and were analyzed by Mann Whitney nonparametric test. Values are median (25% percentile, 75% percentile). The pictures (C,D) show morphological changes suggesting apoptotic cells (arrows) in cultures treated with 0.2 mM 8-MOP for 72h

Table 1 Scheme of gradient elution for chromatographic (HPLC) analyses of solutions containing 8-MOP

Figure 1

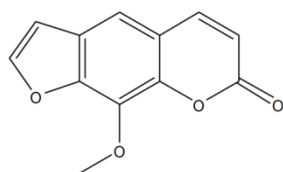


Figure 2

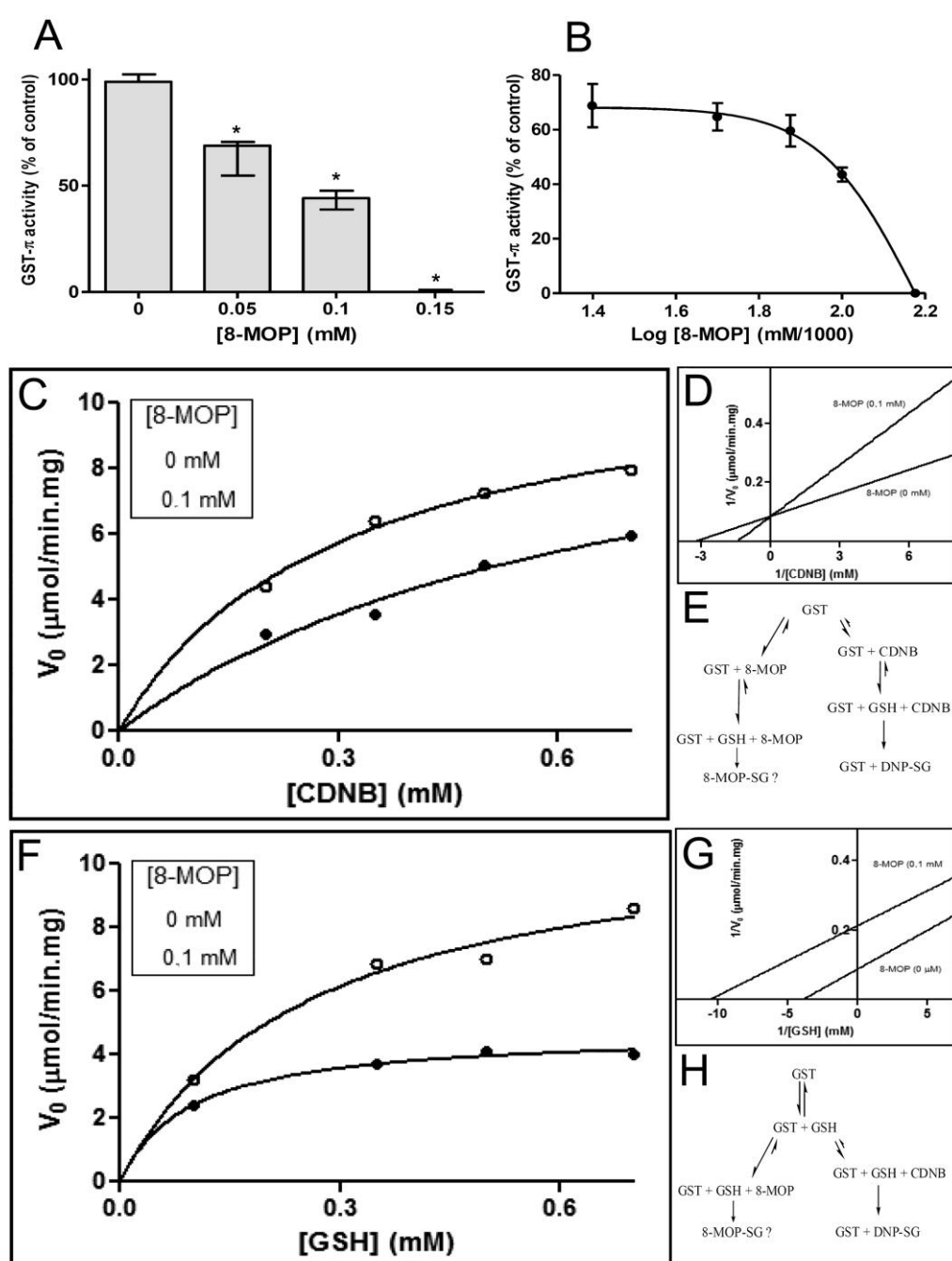


Figure 3

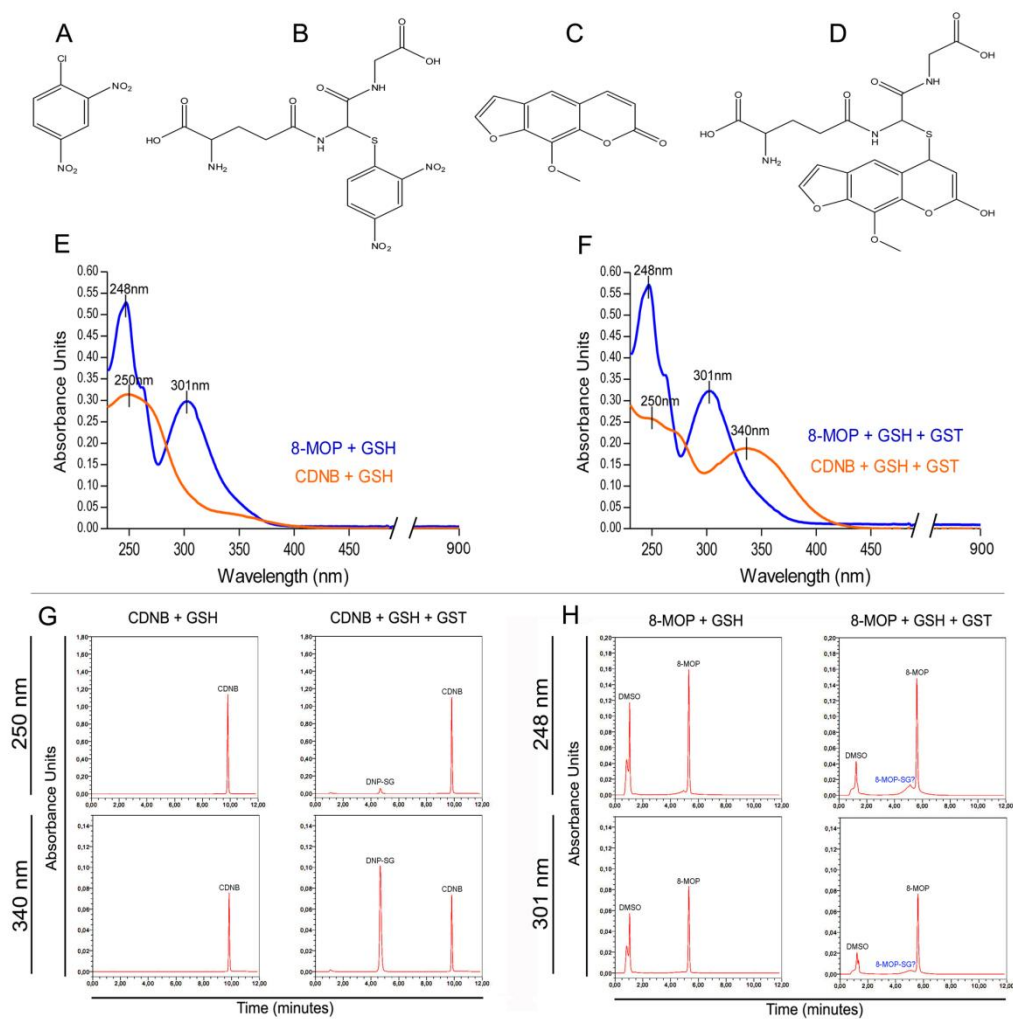


Figure 4

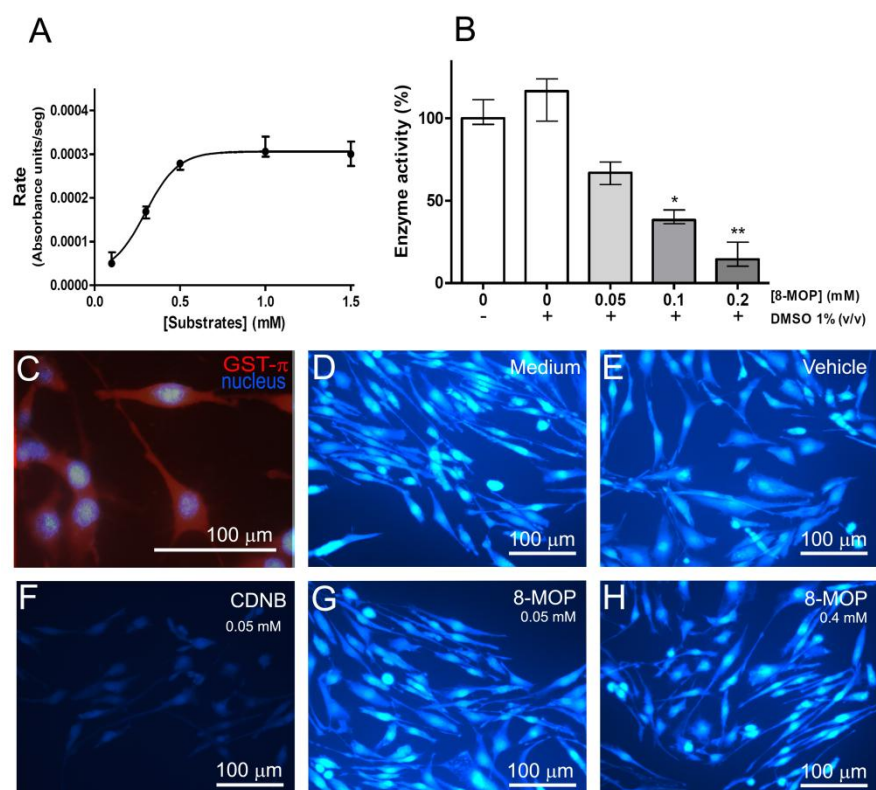


Figure 5

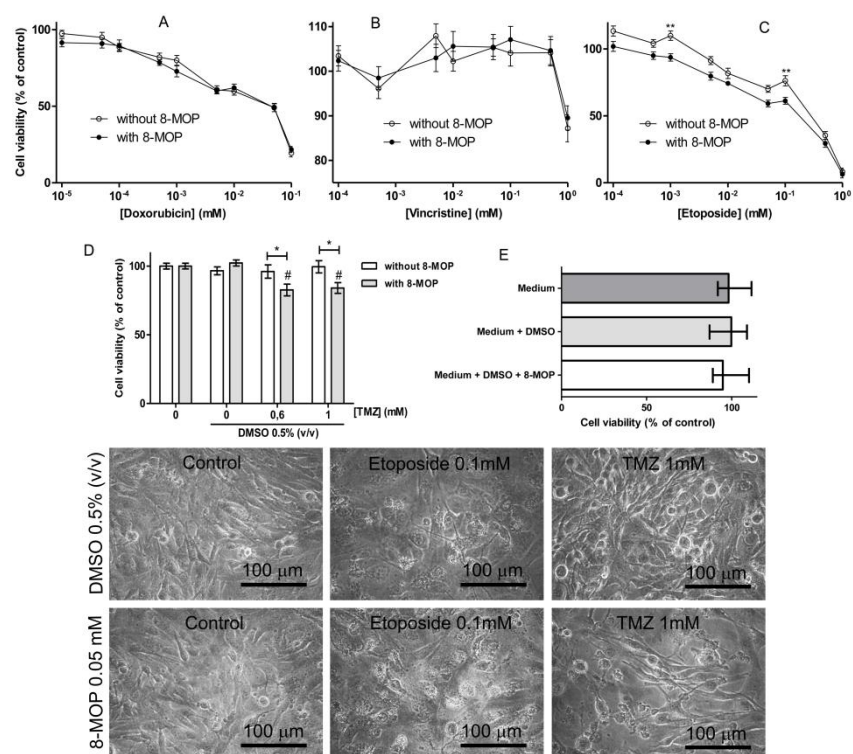


Figure 6

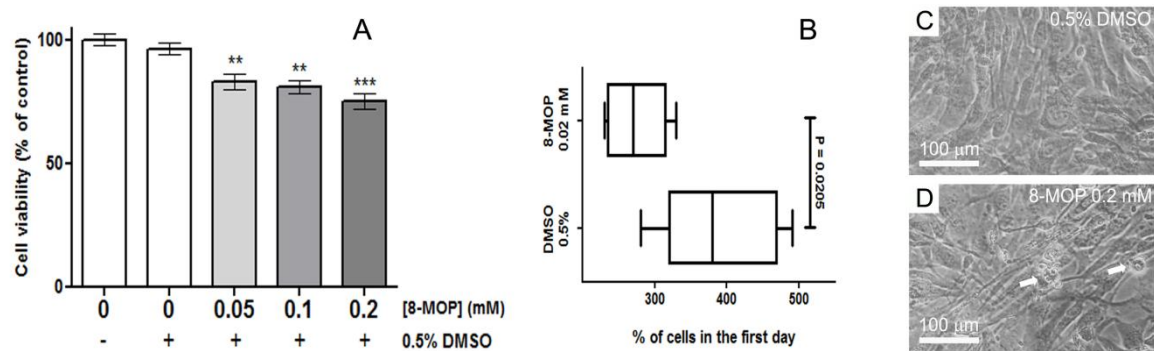
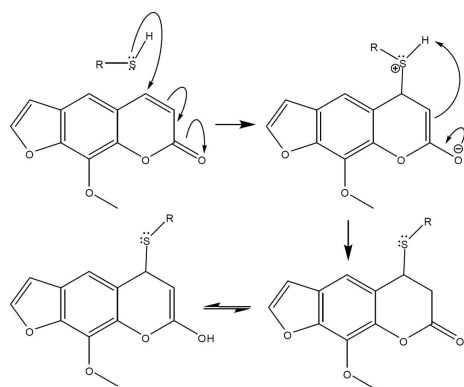


Table 1

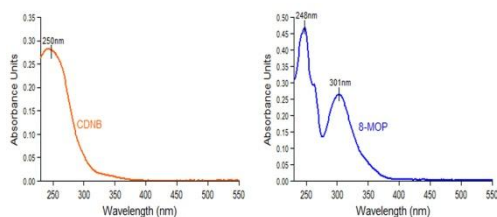
Time	ACN (%)	MeOH (%)	H2O (%)
0	5	15	80
2	5	30	65
3	5	70	25
6	5	15	80

SUPPLEMENTARY MATERIAL



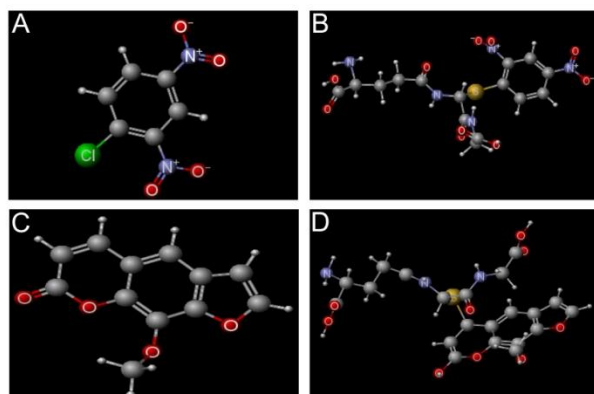
Supplementary Figure 1

Mechanism of reaction proposed to formation of the compound 8-MOP-SG. The business end of glutathione is the thiol (SH) group, which is added to the β -carbons in carbonyl compounds by Michael addition. Molecules present absorption peak on ultraviolet radiation only if the energies of possible electronic transitions are in the same order of magnitude as the UV region. As the extent of conjugation increases, decreases the energy difference between HOMO (highest occupied molecular orbital) and LUMO (lowest unoccupied molecular orbital), thus increasing the range of wavelengths in the spectrum in the UV region. The psoralen is conjugated system in a ring that extends to the aromatic furan ring, including the carbonyl group. With the addition of glutathione, via the sulfur atom, the conjugated system involving the furan ring is lost; affecting the energy of the orbitals involved in the length of links, hence there is a change in the range of absorption in the UV, which was not observed in our experiments.



Supplementary Figure 2

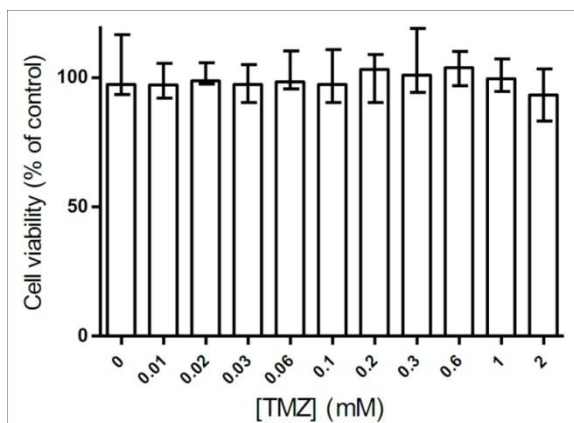
Absorption spectra of CDNB and 8-MOP in the absence of GSH.



Supplementary Figure 3

Molecular modeling for theoretical log P calculation for CDNB, 8-MOP, DNP-SG and the supposed 8-MOP-SG. The conjugation with GSH lowered the log P values, as expected, resulting in increased water solubility.

	CDNB (A)	DNP-SG (B)	8-MOP (C)	"8-MOP-SG" (D)
log P of nonionic specie	2.46	-0.74	1.78	-0.17
log D at p.i		-3.14		-2.58



Supplementary Figure 4

Cell viability (assessed by MTT assay) of GL-15 cells after 72 hours of treatment with TMZ at increasing concentrations. The cells presented extreme resistance toward the drug even at the high concentration of 2 mM. The vehicle (DMSO 0.5% v/v) is present in all groups, including control, but did not affected cell viability (data not shown).

Manuscrito a ser submetido para publicação contendo segunda parte dos resultados da tese de Doutorado

TITLE**Antitumor action of 8-methoxypsoralen without UV light irradiation in glioma cell lines: A new potential for an old drug****AUTHORS**

Diêgo Madureira de Oliveira [1], Rute Maria Ferreira Lima MSc [1], Silvia Lima Costa MSc, PhD [1], Bruno Penas Seara Pitanga MSc [1], Jorge Clarencio MSC, PhD [2], Eudes da Silva Velozo MSc, PhD [3], Ilza Alves de Amorim [3], Maria Lúcia Vieira Moreno [2], Ramon Santos El-Bachá MSc, PhD [1]

[1] *Laboratory of Neurochemistry and Cell Biology, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Brazil*

[2] *Gonçalo Moniz Research Center - Fiocruz - Bahia - Brazil*

[3] *LAPEMM, Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia, Brazil*

Corresponding author

Ramon S. El-Bachá

Laboratory of Neurochemistry and Cell Biology, Department of Biochemistry and Biophysics, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, 40110-902, Salvador, Bahia, Brazil

Tel.: +55 7132838916; FAX: +55 7132838927

E-mail address: ramon@ufba.br (alternative e-mail address: ramon.elbacha@pq.cnpq.br)

ABSTRACT

Cancer is an important cause of mortality around the world. Gliomas are the most common and lethal primary malignant brain tumors, and have been studied for a long time. Nevertheless, the usual drugs are not able to provide significant increase on the survival of patients. Then, researches to find new drugs are necessary. The purpose of this study was to evaluate the antiproliferative and apoptosis-inducing activities of the furanocoumarin-derivative 8-methoxypsoralen (8-MOP) against glioma cell lines without photoactivation. This compound is commonly used in the treatment of skin diseases combined with UV light irradiation. Rat glioma C6 cells and human glioblastoma GL-15 cells were used in tests, as well as rat astrocytes for comparison. Cell viability was measured by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay; changes on cellularity were evaluated by phase contrast microscopy and quantified by total protein content measurement. The trypan blue dye exclusion assay and colony formation test were used to analyze cell proliferation. Flow cytometry was used for elucidation of the kind of cell death and for cell cycle analyses. Morphological changes were accessed by electron microscopy and proteins expression was studied using immunolabeling techniques. 8-MOP reduced cell viability and cellularity, time- and dose-dependently, more efficiently in tumor than in normal cells. The compound also showed considerable antiproliferative effect against tumor cells and induced cell death by apoptosis. However, 8-MOP did not interfere in the cell cycle and also did not promote increase of markers associated to bad prognostic. No necrosis was observed. Coumarin derivatives structurally related to 8-MOP were screened for its antitumor potential and presented different patterns of biological activity, from these experiments it is possible to suggest the relevance of each part of 8-MOP molecular structure for antiproliferative action. Therefore, 8-MOP is a good prototype of new anti-glioma drug. Furthermore, its effect was demonstrated in the absence of UV irradiation, which leads to a perspective of more safe treatments with psoralen derivatives. The results also point coumarin derivatives as a possible new source of anticancer agents.

Keywords: coumarins, glioblastoma, glioma, 8-methoxypsoralen

INTRODUCTION

Gliomas, tumors of neuroepithelial tissue, are the most common primary brain tumors in adults. They are currently classified as astrocytic, oligodendroglial, ependymal or choroid plexus tumors, according to morphological appearance. Grading is performed using a scale, from low (I) to high (IV, or glioblastoma multiforme), according to hallmarks of the tumor histological aberrations (Nakada et al., 2007). This kind of tumors has been studied for a long time; nevertheless the impact of technological advances on clinical outcome has not been satisfactory. Usual drugs are not able to provide significant increase on the 5-year survival rates (2% to 5%) (Fruehauf et al., 2006). The 2-year observed survival rate for gliomas was 35% in the United States based on follow-up data of cancer registry cases diagnosed from 1985 to 2005 (Porter et al., 2010).

Suppression of antitumoral immune surveillance, neovascularization, resistance toward apoptotic stimuli, excessive proliferation and disseminated tumor growth significantly contribute to the malignant phenotype of human gliomas (de Oliveira et al., 2009). The drug resistance is also an important cause of poor clinical outcomes (Bredel et al., 2002), and then new therapeutic approaches, treatments and drugs are necessary. This reality has been a motivation to a large number of publications, many of these using *in vivo* and, mainly, *in vitro* (using cell culture) models (Costa et al., 2001; Arrieta et al., 2002; Patole et al., 2005). Assessment of *in vitro* drug response may assist the clinician in stratifying patient treatment regimens (Fruehauf et al., 2006). In addition, cytotoxic/antiproliferative screening models provide important preliminary data to select possible new antitumor drugs. Improved understanding of the biochemical and molecular determinants of glioma has provided valuable insights into the underlying biological features of the disease, as well as illuminating possible new therapeutic targets (Yamanaka and Saya, 2009).

Several herbal medicines contain a wide variety of coumarins that have been used to treat vitiligo, and have many different pharmacological effects *in vivo*, including hypoglycemic effects, antischistosomal effects, and inhibition of nephrolithiasis (Aronson, 2009). The 8-methoxypsoralen (8-MOP), also called xanthotoxin, is a furanocoumarin (derivative of psoralen) that has been widely employed for many years, combined with irradiation with long-wavelength UV light (PUVA), to treat patients with vitiligo and psoriasis. FDA also approved it for the treatment of cutaneous T cell lymphoma (Cao et al., 2008). Photosensitizers and photodynamic therapy have been used in both pre-clinical and clinical studies for the treatment of brain tumors (Wilson and Patterson, 2008). However, there are descriptions of biological activity of some derivatives of psoralen even without UV irradiation (Rodighiero, 1996). Moreover, cytotoxic and antiproliferative effects have been attributed to furanocoumarins (Kim et al., 2007). Actually, some coumarins are known to exert anti-tumor effects and to change significantly cell growth and differentiation (Lacy and O'Kennedy, 2004). Furanocoumarins, such as 8-MOP, were identified as novel, potent topoisomerase I inhibitors (Diwan and Malpathak, 2009). Taken together, these data suggest that 8-MOP is a candidate to be tested as a new agent on glioma chemotherapy.

Several reports describe the effects of potential and known anti-tumor drugs against C6 line, from rat glioma, and cell lines from human glioma (Wolff et al., 1999; de Oliveira et al., 2009). In this work, C6 cells, as well as GL-15, an established and well characterized cell line from human glioblastoma (Bocchini et al., 1991), were used to evaluate the antiproliferative and apoptosis-inducing potential of 8-MOP. Another serious problem in cancer chemotherapy is nonspecific toxicity against normal and tumoral cells, and so there is a current

tendency to use normal cells as part of these in vitro models to search new prototypes of medicines (Cavalieri et al., 2004; Bernardi et al., 2008; Soletti et al., 2008; Gerhardt et al., 2009). Therefore, the effects of 8-MOP were also studied on rat primary cultures of astrocytes to compare results.

METHODOLOGY

Cell cultures

Human glioblastoma GL-15 cells and rat glioma C6 cells were cultured at 37 °C in DMEM, supplemented with 1 mM pyruvic acid, 2 mM L(+)-glutamine, 44 mM NaHCO₃, 10 % fetal bovine serum, 100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. Primary cultures of astrocytes from Wistar rats were performed according to a previously described method (Silva et al., 2008), and kept under same conditions. The culture medium was changed every 2 days. All the used cultures did not differ in more than six passages. The cells were seeded in Petri dishes of 35 mm in diameter or 96-well plates (according to the used test), at a density of 3.1×10^4 cells/cm², 72 h prior to treatments, except for proliferation assays using Trypan blue dye and phase contrast microscopy analysis, in which 8-MOP and DMSO were added during the seeding of cells. The study was conducted according to guidelines of the institutional animal ethics committee (Federal University of Bahia – Brazil), and the animals were from the in-house colony of the Laboratory of Neurosciences, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia – Brazil).

Cell viability analysis by the MTT assay

Cell viability was measured by the classic MTT method. Cells were cultured in 96-well plates, submitted to the treatment with 0.2, 0.3, and 0.4 mM 8-MOP or with 0.5 % DMSO (vehicle) and incubated for 24, 48, or 72 h. Concentrations above 0.4 mM are greater than the solubility of the compound in the culture medium. Thereafter, the MTT reagent dissolved in PBS was added to each well (1 mg/mL final concentration). Following additional 2-h incubation in a humidified atmosphere of 5 % CO₂ and 95 % air, 100 µL of 20 % SDS in 50 % DMF was added to lyse cells and to dissolve formazan crystals. The absorbance was then measured at 540 nm using a microplate reader (THERMO PLATE, model TP-reader – type B). Wells without cells were used as blanks. The 8-MOP does not interfere with this technique since it was not able to convert MTT to formazan (data not shown). Results were expressed as a percentage of controls.

Phase contrast microscopy

Cells were seeded in Petri dishes (35 mm in diameter), and 0.5% DMSO or 8-MOP (0.2 - 0.4 mM) were immediately added. After 72 h the medium was changed to improve the visibility. Cells in culture were observed after treatments using an inverted phase contrast microscope (NIKON Eclipse TS100) and

photographed with a digital camera (Coolpix 4300, 4.0 megapixels, NIKON, Japan) to perform a qualitative analysis of cellularity. A 20× objective was used.

Measurement of total proteins

Total protein content in culture is directly related to the number of cells. In order to perform the measurement of total proteins after a 48h-exposure to 8-MOP, cells were cultured in Petri dishes (35 mm in diameter) and were treated with 0.2, 0.3, or 0.4 mM 8-MOP. The vehicle (0.5% DMSO) was present in all groups, including the control. After treatment, cells were rinsed twice with PBS and dissolved in 0.5 mL of 1 M NaOH for 20 min at room temperature with gentle shaking. The amount of total proteins in an aliquot of the extract was determined by the method of Lowry (Lowry et al., 1951) with a DC protein assay reagent kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The experiments were performed in triplicate and results were expressed as a percentage of control.

Analysis of cell proliferation by Trypan blue dye exclusion assay

Cell counting is a direct way to evaluate proliferation. This technique was carried out by trypan blue dye exclusion assay in order to distinguish viable and unviable cells. In these experiments cells were seeded in Petri dishes (35 mm in diameter) and treated with 400 μM 8-MOP for 48 h, or 20 μM 8-MOP every two days for 10 days (low cell density, n = 5), 0.5 % DMSO was used as control. After treatments, the culture medium was collected, and cells were removed from plates using 0.05 % trypsin, 20 % EDTA in PBS for five minutes. Cells were harvested and centrifuged at 168 g for six minutes. Then, the supernatant was discarded, the pellet was suspended and mixed with culture medium, and 0.05% trypan blue was added. Ten minutes after, the cells were observed, using an optical microscope, and counted in a hemocytometer (Optik Labor Frischknecht – Hauptstrasse, Balgach). Since the percentage of unviable cells varied between treated and control groups, the percentages of inhibition of proliferation after the long-term exposure were calculated according to equation [1]

$$\{\Delta V_c - [\Delta V_t + (U_t - U_c)] / \Delta V_c\} 100 \quad [1]$$

in which ΔV_c = variation on number of viable control cells between first and tenth days; ΔV_t = variation on number of viable treated cells between first and tenth days; U_t = unviable treated cells on the tenth day; U_c = unviable control cells on the tenth day.

Analysis of GFAP expression

GFAP expression was investigated by immunocytochemistry (ICQ) and evaluated by western blotting (WB) followed by densitometry. For ICQ cells were seeded on Petri dishes (35 mm in diameter) and exposed to

0.4 mM 8-MOP or 0.5 % DMSO for 48 hours. GFAP was detected using primary rabbit polyclonal IgG anti GFAP (Santa Cruz®) in a 1:400 dilution for 1 hour. Subsequently, cells were rinsed three times with PBS, and incubated with the secondary antibody (conjugated Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit IgG - Invitrogen®) in the same dilution. Nuclei were stained by 2.5 µg/mL Hoechst 33258 in PBS. Cells were observed under fluorescence microscopy. For WB the same groups of cells were washed twice with PBS, harvested, and then dissolved in 2% (w/v) SDS, 2 mM ethylene glycolbis(2-aminoethylether)-N,N,N0,N0-tetraacetic acid, 4 M urea, 0.5% (v/v) triton X-100, and 62.5 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8) supplemented with 0.1% (v/v) of a mixture of protease inhibitors. The amount of total protein in an aliquot of the extract was determined by using a DC protein assay reagent kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Forty microgram protein samples were separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene fluoride membranes. Membranes were incubated with 5% powdered skimmed milk in 20 mM Tris buffered saline (pH 7.5) with 0.05% Tween-20 (TBS-T) for 1 hour. After this, membranes were incubated with 1:1000 dilution of the same primary antibody at room temperature for 1 hour. Membranes were then washed three times with TBS-T and probed with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG at a 1:5000 dilution. Equal protein loading was confirmed by staining membranes with Ponceau red or re-probing the original membranes with b-actin antibody. Immunoreactive bands were detected according to manufacturer's instructions and densitometric analysis was performed using the ImageJ 1.33u software.

Cell cycle analysis

Flow cytometry analysis of DNA content was performed to assess the cell cycle phase distribution. After treatment with 8-MOP at variable concentrations and time, cells were harvested by trypsinization, fixed with cold ethanol, and stained with propidium iodide (PI). A fluorescence-activated flow cytometer (Becton-Dickinson, FranklinLakes, NJ, USA) was used for analysis. The software Cell Quest™ 3.1 was used to generate histograms and determine the cell cycle phase distribution. Experiments were performed in triplicates.

Colony formation assay

For the colony formation assay, 24-well plates were used. In each well was deposited a basal layer of solid medium (0.2 mL of DMEM with 0.5% low melting point agarose), an intermediate semi-solid (0.2 mL of DMEM with 0.35% low melting point agarose at 38°C) in which the cells were dispersed (400/well), and a third layer of liquid medium containing the drug (8-MOP) or the vehicle (0.001% DMSO). The liquid layer containing drug or vehicle was replaced every two days. After two weeks of incubation, the colonies were stained with 10% gentian violet for observation under an optical microscope. Pictures were taken with a high-resolution camera attached to the microscope. The number of colonies was counted in six wells for group. The maximum diameter and its perpendicular for each colony were measured and the final diameter was the mean of these values. A total of ten random fields in each well was photographed for this procedure.

Determination of cell death

Cells were cultured in Petri dishes (35 mm in diameter) and exposed to 0.4 mM 8-MOP or 0.5 % DMSO for 48h. They were trypsinized, centrifuged at 103 g for 3 min, resuspended in 300 μ L of PBS and incubated with fluorescein-5-isothiocyanate (FITC)-Annexin V and propidium iodide (PI) for 15 min according to manufacturer (annexin-V FITC-Kit, BioSource, Camarillo, U.S.A.). A fluorescence activated flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, U.S.A.) was used to examine cells (3×10^4). FITC-Annexin V, which has a high affinity for phosphatidylserine on the outer membrane of apoptotic cells, exhibits fluorescence that is measured in the green channel (FL-1) on flow cytometers. PI, which binds to DNA of necrotic cells or during the late stage of apoptosis, is measured in the red channel (FL-2) on flow cytometers. Non-apoptotic cells are not stained. Annexin V labels early apoptotic cells, but PI does not stain them. Necrotic cells or late apoptotic cells are double stained. Cells stained only by PI are considered as necrotic ones.

Ultra-structural analysis

Ultra-structural analyses of both surface and cytoplasm of normal and tumor cells treated with 8-MOP were performed. For transmission electron microscopy, the cells were fixed, after 48h treatment with 8-MOP or vehicle, in 4% paraformaldehyde (Polysciences) and 2.5% glutaraldehyde (Polysciences) in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4, postfixed in 1% osmium tetroxide (Polysciences) and 0.08% potassium ferricyanide in the same buffer, dehydrated in acetone series, and embedded in Polybed resin (Polysciences). The sections were observed under a Zeiss EM109 transmission electron microscope (TEM). For scanning electron microscopy, the cells were cultured on poly-l-lysine treated coverslips and, after same treatments, fixed and postfixed as described above, dehydrated in ethanol series, dried by the critical point method in a Balzers apparatus, mounted on stubs, and covered with a 20 nm-thick gold layer. Cells were observed in a JSM 6390 LV Low Vacuum - JEOL (EUA) scanning electron microscope (SEM).

Migration assay

Migratory capacity of the tumor cells was evaluated by Wound-healing assays. The cells were seeded in the plate wells with or without 8-MOP and grown to 100% confluency. Then, the cell layer was scratched in the middle of the wells using yellow tips, washed three times with PBS and the cells were grown further in serum-free medium at 37° C. The wounded monolayer of culture was recorded under inverted microscope at 0 hour, 12 hours, 30 hours, and 60 hours.

Analysis of nestin and vimentin expression

Nestin and vimentin expression after treatment with 8-MOP was evaluated by ICQ (as described for GFAP detection). The rabbit polyclonal IgG anti nestin and the mouse polyclonal IgG anti vimentin (Santa Cruz®) were used as primary antibodies in dilutions of 1:500 and 1:400, respectively. Secondary antibodies were the conjugated Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit IgG and the conjugated Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (Invitrogen®) in dilutions of 1:400 and 1:500, respectively. The intensity of staining for vimentin was quantified by flow cytometry. Cells were harvested by trypsinization, permeabilized with methanol at -20°C (10 min), centrifuged at 103 g for 3 min, resuspended in 300 µL of PBS and incubated with primary and secondary antibodies, consecutively, as described for ICQ. Centrifugation and washing with PBS preceded each incubation. A fluorescence activated flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, U.S.A.) was used to examine cells.

Statistics analysis

Data were tested for normal distribution by the D'Agostino and Pearson omnibus normality test. Data were expressed as the mean \pm SEM or median and ranges according to the distribution. The statistic analysis was performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA. The most appropriate statistic test for each experiment was used (the used test is indicated in illustration legends). Data were expressed as absolute or relative (percentage) values, according to the nature of the assay. Experiments were performed at least in triplicate. Probability values of $p < 0.05$ were accepted as indication of statistically significant difference.

RESULTS

8-MOP reduced cell viability and cellularity more efficiently in tumor than in normal cells

The MTT test showed a significant decrease in cell viability on three cell types, the crescent order of susceptibility to 8-MOP was astrocytes, C6 and GL-15 (Fig 2 A). After 24h exposure to 0.2 mM 8-MOP, it was noted a significant decrease on viability of GL-15 and C6 cells of $7.4 \pm 1.2\%$ and $11.5 \pm 1.5\%$, respectively, and the toxicity increased in a dose-dependent manner. However, no significant decrease was observed in astrocytes. After 48h exposure, toxicity against astrocytes became evident on cells treated with 0.4 mM. At this time, the effect on GL-15 cells was more evident. A 72h exposure promoted a maximum effect in the human glioblastoma GL-15 cells. However, the three tested concentrations also decreased the cell viability of astrocytes after 72 hours. The total protein content measurement suggested that reduction of cell viability are, in this case, resulted from reduction of cellularity (Fig 2 B).

Trypan blue dye exclusion assay confirmed the reduction on cell growth after treatment (Fig 2 C). After 48 hours, the number of GL-15 cells increased $172 \pm 14\%$ in control conditions and only $46 \pm 6\%$ in the treated group. For C6 cells, it increased $188 \pm 32\%$ in control conditions, while no apparent increase occurred in treated ones. In astrocytes, an apparent mild effect was observed, but it was not significant. However, the cytotoxic effect of 8-MOP (C bottom), indicated by the percentage of unviable relative to total cells, was observed only on GL-15 cells, since its percentage increased from 4.1 (2.6-6.3) % under control conditions to 10.9 (9-12.7) % after treatment. Then, the cytotoxic effect cannot explain the reduction on cellularity. Taken together, these results suggest that 8-MOP presents anti-proliferative action, and the treatment with this drug do not affect normal cells to the same extent that it affected tumor ones.

The 10-days exposure to 8-MOP showed that its effect is time-dependent, since 20 μM 8-MOP was not able to inhibit significantly cell growth after a 48h exposure (data not shown), but it was inhibited after 10 days in glioma cell cultures (Fig 2 D). After this long-time exposure, the percentage of inhibition was calculated related to the proliferation measured on control conditions (Table 1). These values were 47.7%, 40.4% for C6 and GL-15 cells, respectively, and -5.2% (not significant) for astrocytes. Therefore, the tumor cells had proliferation inhibited, while normal cells were apparently not sensible to this long-time/low-dose treatment.

Antiproliferative effect of 8-MOP is not related to cell cycle arrest at any phase

Since the effect of 8-MOP is milder in confluent cultures (Fig 3 A) than in sub-confluent ones (Fig 3 B), it is probable that antiproliferative action of 8-MOP is more important than cytotoxicity of this compound (the proliferation rate is greater in sub-confluent cultures), and is the main responsible for reduction of cultures viability accessed by MTT assay. Under sub-confluence, C6 cells, those have high mitosis rate, were more susceptible than GL-15 cells. Phase contrast microscopy clearly showed a decrease on cellularity of tumor cell in sub-confluent cultures treated with 8-MOP after 48 h (Fig 3 - pictures). Furthermore, the same was not observed in astrocyte cultures. The largest susceptibility of GL-15 cells to 8-MOP was visually evident. Moreover, changes in cell morphology was observed. It was more outstanding in GL-15 cells. There was no astrocytes activation since the expression of GFAP did not change after treatment (Fig 3 C).

However, despite the antiproliferative action, 8-MOP did not influence the cell cycle (Fig 4 A and Supl Fig 1). In fact, there was no difference in number of colonies between vehicle and drug treated C6 cells, but treatment with the drug slowed cell division, resulting in smaller colonies, although the proportion of cells in each phase of the cycle has remained (Fig 4 B-F). The mean diameter of colonies are so different between the groups that it could be observed macroscopically (Supl Fig 2). GL-15 cells did not form colonies.

8-MOP at high concentration induced cell death by apoptosis, changes in cell morphology and migratory partner in tumor cells and increased vimentin expression in GL-15 cells

Considering the cytotoxic effect of 8-MOP, beyond its antiproliferative activity, flow cytometry was performed in order to determine the type of cell death promoted by this agent (Fig 5). Results show that 0.4 mM

8-MOP induced apoptosis in all kinds of tested cells after 48 h. The number of necrotic cells was not significant in all groups. Flow cytometry confirmed the toxic effect of acute administration of 8-MOP at high concentration on astrocytes. Additional finds suggesting apoptotic cells were also documented (Supl Fig 3). The changes in cellular morphology visualized by phase contrast microscopy were confirmed by SEM in the tumor cells, but were not evident in astrocytes (Fig 6 A-F). Increasing of filopodia-like structures could be observed in the surface of tumor cells treated with 8-MOP (Fig 6 G), however, the migratory capacity of these cells was not affected (Fig 6 H). Autophagic vacuoles and myelin figures were also increased in tumor cells after treatment, but astrocytes presented these finds even at control conditions (Supl Fig 4).

The 8-MOP was also able to change vimentin expression in GL-15 cells (Fig 7). The increase in the expression of this proteins was significant (Supl Fig 5). C6 cells did not stained positively to vimentin.

Coumarin derivatives structurally related to 8-MOP presented different patterns of biological activity.

The MTT assay after 48 hours treatment of sub-confluent cultures was used as screening technique in order to investigate the antitumor potential of coumarin derivatives structurally related to 8-MOP. In general, all coumarin derivatives showed more significant activity in tumor cells than in normal ones (Fig 8 and Supl Fig 6). The coumarin core alone did not show considerable activity, while the non-methoxylated psoralen was toxic for both tumor cells and astrocytes. If, however, the furan ring is removed from the structure, but the oxygen atom preserved, as in the structure of metoxiumbelifera, the activity remains restricted to tumor cells. Moreover, the presence of polar groups such as methyl or prenyl seems potentiate the effect. Besides decreased cell viability, some compounds also promoted visible changes in the morphology of tumor cells (Supl Fig 6 - pictures).

DISCUSSION

Antiproliferative activity is an interesting biological effect that makes substances potential antitumoral drugs, and then this effect has been extensively investigated in tumor cell cultures, like glioma cells (Braganhol et al., 2006; Prado et al., 2007; Wang et al., 2009). In this work, the antiproliferative activity of 8-MOP was first demonstrated by the MTT method. A dose-dependent effect was observed against rat glioma C6 cells, human glioblastoma GL-15 cells and normal rat astrocytes, but it was most strong in tumor cells. Based on data found for 8-MOP-induced cytotoxicity to C6 cells after 24 h, it seems to be less cytotoxic than gemcitabine, but this pyrimidine nucleoside analogue has an apparent low availability to the brain tissue, which limits its use (Wang et al., 2009). In this study, the dose-effect for cell viability by 8-MOP in C6 rat glioma cells also seems to be lesser when compared to the main agent currently used in the glioma therapy, temozolomide (TMZ), after 48 h (de Oliveira et al., 2009). However, the existence of a small fraction of human glioblastoma stem cells, which display strong capability of tumor resistance to TMZ, may be related to the chemoresistance observed in human gliomas (Fu et al., 2009). TMZ even at 0.5 mM was unable to induce cell death and to reduce the number of metabolic active glioblastoma stem cells after 4 days of treatment in vitro (Beier et al., 2008). Indeed, in this

study GL-15 human glioblastoma cell line was more responsive to the *in vitro* treatment with 0.2 mM 8-MOP for 48 h than the GOS-3 and U-87 MG glioma cell lines were responsive to the treatment with 0.2 mM TMZ also for 48 h (Patel et al., 2008). In fact, GL-15 cells are extremely resistant to TMZ (Supl Fig 7), but 8-MOP could act on it.

Despite MTT assay is the most frequently used test to determine drug efficacy *in vitro* (Wolff et al., 1999), this method provides a quantitative measure of the number of cells with metabolically active mitochondria, and this metabolic parameter of analysis may represent a bias when data are used to study cell proliferation, even when experiments using both confluent and sub-confluent cultures are carried out. Then, microscopic analyses were performed to give qualitative information about cellularity, which was confirmed by total protein content measurement and trypan blue dye exclusion test. All these tests pointed the antiproliferative action of 8-MOP. Results from the 10 days exposure (simulating a hypothetical clinic treatment) suggest that administration of the drug for a long time, even at low concentration, acts on cancer cells. This effect was not evident for normal astrocytes. Globally, the 8-MOP acted better against tumor than normal cells. Taking account that astrocytes are not in constant proliferation under physiological situation, tumor cells are more susceptible to antiproliferative agents than them.

The detailed mechanism of action of 8-MOP remains under investigation, but the studies of cell cycle distribution and the colony formation test suggest that the drug does not interrupt the cell cycle, but slows down the multiplication process, which can make this compound a safer agent for chemotherapy, since many of the side effects of antitumor drugs exists because these drugs promote cell cycle arrest (Brunton et al., 2006).

Psoralens, like 8-MOP, have a hydrophobic nature and a planar aromatic structure, which enables them to intercalate between DNA base pairs, preferentially at 5'-TA-3' sites (Cao et al., 2008; Wu et al., 2009). The irradiation of psoralens intercalated inside the duplex molecule of DNA with UVA (320–400 nm) leads to formation of monoadducts, diadducts and interstrand DNA cross-links (ICL) (Rodighiero, 1996). Others photoproducts are generated from interaction between 8-MOP and membrane phospholipids (Zaresbska et al., 2000). Bifunctional alkylating agents, which constitute a class of compounds used often in cancer chemotherapy, act by generating ICL (Zheng et al., 2006), that are also believed to be the principal element in PUVA therapy. However, ICL are not the unique possible mechanism of action; intercalation itself results in a decrease in the DNA helical twist and lengthening of the DNA. In fact, intercalators have been used extensively as antitumor, antineoplastic, antimalarial, antibiotic, and antifungal agents (Palchaudhuri and Hergenrother, 2007).

Other mechanisms may also explain antiproliferative effects of psoralens. There are, for example, multiple mechanisms involved in the growth-inhibitory and apoptosis-inducing effects of 5-methoxypsoralen (Lee et al., 2003). Despite its application on PUVA therapy, some furanocoumarins exhibit biological activity, including antiproliferative action even in the dark (Rodighiero, 1996), and other coumarins derivatives, specifically pyrrolocoumarins, strongly induce antiproliferative effects in the dark, probably by an interaction with topoisomerases (Guiotto et al., 1995; Diwan and Malpathak, 2009).

Additionally, 1000 μ M TMZ after a 72-h incubation promoted death in 24 - 81% (mean: 49.83%) of glioma cells from six patients, when analyzed by the MTT assay (Pédeboscq et al., 2007). Although we found that a 72-h incubation with 0.4 mM 8-MOP promoted death on 41.68% of human glioblastoma GL-15 cells, a low dose-experiment was executed, but for a longer time of exposure, simulating a chronic treatment. A chronic treatment with low concentrations could prevent toxic effects of an acute high dose administration. Data from

this experiment showed antiproliferative effects against tumor cells even at low concentration, which suggests that a clinical therapeutic scheme with 8-MOP could be designed. Moreover, pharmacokinetic studies demonstrated that plasma concentrations of 8-MOP as high as 1 mM can be achieved safely (Billard et al., 1995). Also, 8-MOP did not change GFAP expression in astrocytes. The presence of a drug can promote astrocyte activation, which can be identified by GFAP immunostaining (Silva et al., 2007), under these conditions, astrocytes may interfere with tissue homeostasis and lead to various damage in normal cells (Sofroniew and Hamby, 2010).

Another important finding is the apoptosis promoting effect, as well as the absence of necrotic promoting activity. The literature reports that apoptosis inducers can be useful in the treatment of cancer (Call et al., 2008). Moreover, compounds able to induce antiproliferative effects in tumor cells without promoting a necrotic cell death are considered as promising antitumor drugs (Bernardi et al., 2008). In fact, our experimental model showed more efficient apoptosis induction by 8-MOP in astrocytes, but it occurred at high concentration, and it is already known that normal cells are usually more sensitive than tumor ones. Many mechanisms are possible to explain apoptosis induction by 8-MOP, especially if the transcriptional responses, gene inactivation, and topoisomerase I inhibitory activity induced by it are considered (Murakami et al., 2001; Dardalhon et al., 2007; Diwan and Malpathak, 2009), but it is important to take account that the form of induced cell death is dependent on the cell type (Bartosová et al., 2006).

8-MOP also promoted morphological changes in tumor cells. The induction of filopodia-like structures, for example, indicates possible pathways involving the actin cytoskeleton that could suffer modulation by drugs (Schäfer et al., 2010). These structures are often, but not necessarily, associated with the migration capability of cells (Arjonen et al., 2011), however, In this case 8-MOP did not increased cell migration. Ultra-structurally, there was increasing of myelin figures and autophagosomes after treatment. It has been shown that TMZ induces formation of autophagosomes (Kanzawa et al., 2004), moreover, compounds that increase the potential of this drug also increase the rate of autophagy, as demonstrated by treatment of glioma cell line U251-MG with the association thalidomide/TMZ (Gao et al., 2009). Recently, the process of autophagy has been identified as interesting targets for anticancer research (Meschini et al., 2001). Because of morphological changes, expression of the markers GFAP, vimentin and nestin were evaluated. Vimentin and nestin expression are associated to bad clinical outcome (Trog et al., 2006 and Zhang et al., 2008). C6 cells did not express any marker, GL-15 stained positively for GFAP, that was not changed for 8-MOP treatment (data not shown), and vimentin, which increased its expression after treatment. This effect probably due to the antiproliferative action of 8-MOP, since the reduction of cell density culture is itself a stimulus for vimentin expression, which also occurs after treatment with traditional chemotherapy (Trog et al., 2008).

Many neurological effects of 8-MOP, as insomnia, headache and dysosmia (Vernassière et al., 2006) suggest that this substance is able to cross the brain-blood barrier. This is another favorable argument for the use of this agent in glioma therapy. 8-MOP (2.3 μ M) in the dark slightly affected the cell proliferation of T-lymphoma cells, and despite the low concentration, this effect was clearly stronger after UV light irradiation (Bartosová et al., 2006). From this information it is possible to suppose that since an effect was observed in dark, 8-MOP could be much more effective after photoactivation, which opens another perspective for application of 8-MOP in glioma treatment: photodynamic therapy (PDT). Several different techniques have been used to deliver light to sensitized glioma tissue for PDT (Stylli et al., 2006). In malignant brain tumors, there have been

several clinical trials of PDT as an adjunctive therapy, including randomized prospective trials in both primary and recurrent tumors (Wilson and Patterson, 2008).

Our data also pointed coumarin derivatives as a possible new class of antiproliferative agents. In fact, many classes of coumarin derivatives may be potential candidates for the treatment of cancer (Lacy and O’Kennedy, 2004). Among the many actions of coumarins, antiproliferative effects stand out (Kostova, 2005). Furanocoumarins (psoralen derivatives) from *Angelica dahurica*, for example, demonstrated antiproliferative activity in vitro (Kim et al., 2007). Novobiocin, another coumarin derivative, exhibited antitumor activity by binding the molecular chaperone Hsp90 (Donnelly et al., 2008). The compound noscapine, which is not a coumarin derivative but has structural similarities to the 8-MOP, was also able to inhibit the growth of glioma cells resistant to TMZ (Jhaveri et al., 2011). Furthermore, coumarins have been used as conjugates groups chemically linked to modify antisense oligonucleotides in order to enhance their activity, cellular distribution, or uptake in methods of treating tumors (Kong-Beltran and Wickramasinghe, 2010).

In conclusion, the antiproliferative activity of 8-MOP in glioma cell lines, demonstrated for the first time in this work, confirm that this substance is a good candidate as new chemotherapeutic agent on glioma therapy, bringing new perspectives on the use of psoralen derivatives against this serious brain pathology.

REFERENCES

- Arjonen, A., Kaukonen, R., Ivaska, J., 2011. Filopodia and adhesion in cancer cell motility. *Cell Adhesion and Migration*. 5(5), 421-430.
- Aronson, J.K., 2009, *Meyler’s side effects of herbal medicines*. Elsevier, Amsterdam.
- Arrieta, O., Guevara, P., Tamariz, J., Rembao, D., Rivera, E., Sotelo, J., 2002. Antiproliferative effect of thalidomide alone and combined with carmustine against C6 rat glioma. *Int. J. Exp. Pathol.* 83, 99-104.
- Bartosová, J., Kuzelová, K., Pluskalová, M., Marinov, I., Halada, P., Gasová, Z., 2006. UVA-activated 8-methoxypsoralen (PUVA) causes G2/M cell cycle arrest in Karpas 299 T-lymphoma cells. *J. Photochem. Photobiol. B* 85, 39-48.
- Beier, D., Röhrli, S., Pillai, D. R., Schwarz, S., Kunz-Schughart, L. A., Leukel, P., Proescholdt, M., Brawanski, A., Bogdhan, U., Trampe-Kieslich, A., Giebel, B., Wischhusen, J., Reifenberger, G., Hau, P., Beier, C. P., 2008. Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res.* 68, 5706-5715
- Bernardi, A., Frozza, R.L., Jäger, E., Figueiró, F., Bavaresco, L., Salbego, C., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Battastini, A.M., 2008. Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: An in vitro study. *Eur. J. Pharmacol.* 586, 24-34.
- Billard, V., Gambus, P. L., Barr, J., Minto, C. F., Corash, L., Tessman, J. W., Stickney, J. L., Shafer, S. L., 1995. The pharmacokinetics of 8-methoxypsoralen following i.v. administration in humans. *British Journal of Clinical Pharmacology.* 40(4), 347-360.
- Bocchini, V., Casalone, R., Collini, P., Rebel, G., Lo Curto, F., 1991. Changes in glial fibrillary acidic protein and karyotype during culturing of two cell lines established from human glioblastoma multiforme. *Cell Tissue Res.* 265, 73-81.

- Braganhol, E., Zamin, L.L., Canedo, A.D., Horn, F., Tamajusuku, A.S., Wink, M.R., Salbego, C., Battastini, A.M., 2006. Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anticancer Drugs*. 17, 663-671.
- Bredel, M., Zentner, J., 2002. Brain-tumour drug resistance: the bare essentials. *Lancet Oncol.* 3, 397-406.
- Brunton, L. L., Lazo, J. S., Parker, K. L., 2006. Goodman e Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica, Cap. 51, 11ª edition, Editora Mc Graw Hill Interamericana do Barsil, Rio de Janeiro.
- Call, J.A., Eckhardt, S.G., Camidge, D.R., 2008. Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. *Lancet Oncol.* 9, 1002-1011.
- Cao, H., Hearst, J.E., Corash, L., Wang, Y., 2008. LC-MS/MS for the detection of DNA interstrand cross-links formed by 8-methoxypsoralen and UVA irradiation in human cells. *Anal. Chem.* 80, 2932-2938.
- Cavalieri, E., Mariotto, S., Fabrizi, C., de Prati, A.C., Gottardo, R., Leone, S., Berra, L.V., Lauro, G.M., Ciampa, A.R., Suzuki, H., 2004. *alpha*-Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, 589-594.
- Costa, S.L., Paillaud, E., Fages, C., Rochette-Egly, C., Plassat, J.L., Jouault, H., Perzelova, A., Tardy, M., 2001. Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma in vitro: inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation. *Eur. J. Cancer* 37, 520-530.
- Dardalhon, M., Lin, W., Nicolas, A., Averbek, D., 2007. Specific transcriptional responses induced by 8-methoxypsoralen and UVA in yeast. *FEMS Yeast Res.* 7, 866-878.
- de Oliveira, M.S., Cechim, G., Braganhol, E., Santos, D.G., Meurer, L., Castro, C.G.J., Brunetto, A.L., Schwarstmann, G., Battastini, A.M., Lenz, G., Roesler, R., 2009. Anti-proliferative effect of the gastrin-release peptide receptor antagonist RC-3095 plus temozolomide in experimental glioblastoma models. *J. Neurooncol.* 93, 191-201.
- Diwan, R., Malpathak, N., 2009. Furanocoumarins: Novel topoisomerase I inhibitors from *Ruta graveolens* L. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 7052-7055.
- Donnelly, A.C., Mays, J.R., Burlison, J.A., Nelson, J.T., Vielhauer, G., Holzbeierlein, J., Blagg, B.S., 2008. The design, synthesis, and evaluation of coumarin ring derivatives of the novobiocin scaffold that exhibit antiproliferative activity. *J. Org. Chem.* 73, 8901-8920.
- Fruehauf, J.P., Brem, H., Brem, S., Sloan, A., Barger, G., Huang, W., Parker, R., 2006. In vitro drug response and molecular markers associated with drug resistance in malignant gliomas. *Clin. Cancer Res.* 12, 4523-4532.
- Fu, J., Liu, Z.-G., Liu, X.-M., Chen, F.-R., Shi, H.-L., Pang, J. C.-S., Ng, H.-K., Chen, Z.-P., 2009. Glioblastoma stem cells resistant to temozolomide-induced autophagy. *Chin. Med. J.* 122, 1255-1259.
- Gao, S., Yang, X. J., Zhang, W. G., Ji Y. W., Pan, Q., 2009. Mechanism of thalidomide to enhance cytotoxicity of temozolomide in U251-MG glioma cells in vitro. *Chinese Medical Journal (Engl).* 122(11), 1260-1266.
- Gerhardt, D., Horn, A.P., Gaelzer, M.M., Frozza, R.L., Delgado-Cañedo, A., Pelegrini, A.L., Henriques, A.T., Lenz, G., Salbego, C., 2009. Boldine: a potential new antiproliferative drug against glioma cell lines. *Invest. New Drugs.* 27, 517-525.
- Guiotto, A., Chilin, A., Manzini, P., Dall'Acqua, F., Bordin, F., Rodighiero, P., 1995. Synthesis and antiproliferative activity of furocoumarin isosters. *Farmaco.* 50, 479-488.

- Jhaveri, N., Cho, H., Torres, S., Wang, W., Schönthal, A. H., Petasis, N. A., Louie, S. G., Hofman, F. M., Chen, T. C., 2011. Noscipine inhibits tumor growth in TMZ-resistant gliomas. *Cancer Letters*. 312(2), 245-252.
- Kanzawa, T., Germano, I. M., Komata, T., Ito, H., Kondo, Y., Kondo, S., 2004. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death and Differentiation*. 11(4), 448-457.
- Kim, Y.K., Kim, Y.S., Ryu, S.Y., 2007. Antiproliferative effect of furanocoumarins from the root of *Angelica dahurica* on cultured human tumor cell lines. *Phytother. Res.* 21, 288-290.
- Kong-Beltran, M., Wickramasinghe, D.M., 2010. Methods and compositions for modulating hyperstabilized c-met. U. S. Pat. Appl. 20100028337.
- Kostova, I., 2005. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* 5, 29-46.
- Lacy, A., O'Kennedy, R., 2004. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Curr. Pharm. Des.* 10, 3797-3811.
- Lee, Y.M., Wu, T.H., Chen, S.F., Chung, J.G., 2003. Effect of 5-methoxypsoralen (5-MOP) on cell apoptosis and cell cycle in human hepatocellular carcinoma cell line. *Toxicol. In Vitro* 17, 279-287.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Meschini, S., Condello, M., Lista, P., Arancia, G., 2011. Autophagy: Molecular mechanisms and their implications for anticancer therapies. *Current Cancer Drug Targets*. 11(3), 357-379.
- Murakami, A., Yamayoshi, A., Iwase, R., Nishida, J., Yamaoka, T., Wake, N., 2001. Photodynamic antisense regulation of human cervical carcinoma cell growth using psoralen-conjugated oligo(nucleoside phosphorothioate). *Eur. J. Pharm. Sci.* 13, 25-34.
- Nakada, M., Nakada, S., Demuth, T., Tran, N.L., Hoelzinger, D.B., Berens, M.E., 2007. Molecular targets of glioma invasion. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 458-478.
- Palchaudhuri, R., Hergenrother, P.J., 2007. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 497-503.
- Patel, R., Shervington, L., Lea, R., Shervington, A., 2008. Epigenetic silence of telomerase and a non-alkylating agent as a novel therapeutic approach for glioma. *Brain Res.* 1188, 173-181.
- Patole, J., Padhye, S., Moodbidri, M.S., Shirsat, N., 2005. Antiproliferative activities of iron and platinum conjugates of salicylaldehyde semi/thiosemicarbazones against C6 glioma cells. *Eur. J. Med. Chem.* 40, 1052-1055.
- Pédebosq, S., L'Azou, B., Liguoro, D., Pometan, J.P., Cambar, J., 2007. Interindividual differences in anticancer drug cytotoxicity in primary human glioblastoma cells. *Exp. Toxicol. Pathol.* 58, 247-253.
- Porter, K.R., McCarthy, B.J., Freels, S., Kim, Y., Davis, F.G., 2010. Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by age, gender, behavior, and histology. *Neuro Oncol.* 12, 520-527.
- Prado, E.G., Gimenez, M.D.G., Vázquez, R.D.P., Sánchez, J.L.E., Rodríguez, M.T.S., 2007. Antiproliferative effects of mitraphylline, a pentacyclic oxindole alkaloid of *Uncaria tomentosa* on human glioma and neuroblastoma cell lines. *Phytotherapy*. 14, 280-284.

- Rodighiero, P., Guiotto, A., Chilin, A., Bordin, F., Baccichetti, F., Carlassare, F., Vedaldi, D., Caffieri, S., Pozzan, A., Dall'Acqua, F., 1996. Angular furoquinolinones, psoralen analogs: novel antiproliferative agents for skin diseases. Synthesis, biological activity, mechanism of action, and computer-aided studies. *J. Med. Chem.* 39, 1293-1302.
- Schäfer, C., Born, S., Möhl, C., Houben, S., Kirchgessner, N., Merkel, R., Hoffmann, B., 2010. The key feature for early migratory processes: Dependence of adhesion, actin bundles, force generation and transmission on filopodia. *Cell Adhesion and Migration.* 4(2), 215-225.
- Silva, A. M. M., Silva, A. R., Pinheiro, A. M., Freitas, S. R. V. B., Silva, V. D. A., Souza, C. S., Hughes, J. B., El-Bachá, R. S., Costa, M. F. D., Velozo, E. S., Tardy, M., Costa, S. L., 2007. Alkaloids from *Prosopis juliflora* leaves induce glial activation, cytotoxicity and stimulate NO production. *Toxicol.* 49, 601-614.
- Silva, A.R., Pinheiro, A.M., Souza, C.S., Freitas, S.R., Vasconcellos, V., Freire, S.M., Velozo, E.S., Tardy, M., El-Bachá, R.S., Costa, M.F., Costa, S.L., 2008. The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures. *Cell Biol. Toxicol.* 24, 75-86.
- Soletti, R.C., de Faria, G.P., Vernal, J., Terenzi, H., Anderluh, G., Borges, H.L., Moura-Neto, V., Gabilan, N.H., 2008. Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteins in human glioblastoma cells. *Anticancer Drugs* 19, 517-525.
- Stylli, S.S., Kaye, A.H., 2006. Photodynamic therapy of cerebral glioma - a review. Part II - clinical studies. *J. Clin. Neurosci.* 13, 709-717.
- Trog, D., Fountoulakis, M., Friedlein, A., Golubnitschaja, O., 2006. Is current therapy of malignant gliomas beneficial for patients? Proteomics evidence of shifts in glioma cells expression patterns under clinically relevant treatment conditions. *Proteomics.* 6, 2924-2930.
- TROG, D., Yeghiazaryan, K., Schild, H. H., Golubnitschaja, O., 2008. Up-regulation of vimentin expression in low-density malignant glioma cells as immediate and late effects under irradiation and temozolomide treatment. *Amino Acids.* 34(4), 539-545.
- Vernassière, C., Petitpain, N., Martin, S., Tréchet, P., Barbaud, A., Schmutz, J.L., 2006. 8-Methoxypsoralen and neurological disorders: from dysosmia to migraine. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 22, 217-218.
- Wang, C.X., Huang, L.S., Hou, L.B., Jiang, L., Yan, Z.T., Wang, Y.L., Chen, Z.L., 2009. Antitumor effects of polysorbate-80 coated gemcitabine polybutylcyanoacrylate nanoparticles in vitro and its pharmacodynamics in vivo on C6 glioma cells of a brain tumor model. *Brain Res.* 1261, 91-99.
- Wilson, B.C., Patterson, M.S., 2008. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol.* 53, R61-R109.
- Wolff, J.E., Trilling, T., Mölenkamp, G., Egeler, R.M., Jürgens, H., 1999. Chemosensitivity of glioma cells in vitro: a meta analysis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 125, 481-486.
- Wu, J.H., Wilson, J.B., Wolfreys, A.M., Scott, A., Jones, N.J., 2009. Optimization of the comet assay for the sensitive detection of PUVA-induced DNA interstrand cross-links. *Mutagenesis* 24, 173-181.
- Yamanaka, R., Saya, H., 2009. Molecularly targeted therapies for glioma. *Ann. Neurol.* 66, 717-729.
- Zarebska, Z., Waszkowska, E., Caffieri, S., Dall'Acqua, F., 2000. PUVA (psoralen+UVA) photochemotherapy: processes triggered in the cells. *Farmacol.* 55, 515-520.

Zhang, M., Song, T., Yang, L., Chen, R., Wu, L., Yang, Z., Fang, J., 2008. Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 27(1), 85.

Zheng, H., Wang, X., Legerski, R.J., Glazer, P.M., Li, L., 2006. Repair of DNA interstrand cross-links: Interactions between homology-dependent and homology-independent pathways. *DNA Repair (Amst.)* 5, 566-574.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Molecular structure of 8-methoxypsoralen, a furanocoumarin also called Xanthotoxin

Figure 2. Analysis of cell viability, performed by MTT assay, after treatment with 8-MOP at increasing concentrations and times of exposure (A) showed that it promoted a decrease on cell viability in tumor cells after exposures to 200 μ M for 24 h. Toxicity against normal astrocytes was evident only at 400 μ M after 48 h. The protein content measurement confirmed the reduction on cellularity (B). The effect was dose-dependent. *, $P < 0.05$ compared to respective controls (One-way ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison test). The analysis of the antiproliferative effect of 8-MOP was performed by the Trypan blue dye exclusion assay (C top), the inhibition of proliferation was evident on C6 and GL-15 cells, after 48 hours, but it was not significant on astrocytes (unpaired t-test was used in each case). The cytotoxic effect of 8-MOP (C bottom), indicated by the percentage of unviable relative to total cells, was observed only for GL-15 cells. *, $P < 0.05$ compared to respective controls (Mann-Whitney test). Evaluation of the treatment with 20 μ M 8-MOP every 2 days for 10 days on the cell proliferation, also performed by Trypan blue assay (D), showed no significant effect on astrocytes. However, the drug reduced proliferation of both glioma cell lines. *, $P < 0.05$ compared to respective controls (Mann-Whitney test).

Figure 3. Analysis of cell viability, performed by MTT assay, after 48 h exposure of confluent (A) and sub-confluent (B) cultures to 8-MOP at increasing concentrations. *, $P < 0.05$ compared to respective controls (One-way ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison test). The treatment with 8-MOP did not increase GFAP expression in astrocytes (C). Phase contrast microscopy showed a decrease in cellularity and changes in cell morphology after treatment with 8-MOP for 48 h (pictures), what was more evident in tumor cells than in normal ones.

Figure 4. Distribution of the cells in phases of cell cycle after treatments with 8-MOP (A) showing that the drug does not alter this parameter (there is no significant difference between treated and respective control groups). The C6 cells formed colonies in medium treated with 0.001% DMSO (B), 20 μ M 8-MOP (C) and 0.1 mM 8-MOP (D). The total number of colonies were equal in all groups (E), but the mean diameter of them reduced concentration dependently after treatment with 8-MOP (F) **, $P < 0,01$ and ***, $P < 0,001$ compared to respective controls (One-way ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison test).

Figure 5. Flow cytometry analysis of cell death after treatment with 0.4 mM 8-MOP for 48 h. The percentage of cells counted in each quadrant (% Gated) is shown. Quadrants: lower left – non-labeled alive cells; lower right – cells labeled only with annexin V (apoptosis); upper left – cells labeled only with PI (necrosis); upper right – double stained cells (necrosis or late apoptosis). Results suggest discrete increasing of apoptotic cells after treatment in all cell types.

Figure 6. Electromicrography by scanning electron microscopy of C6 and GL-15 cells and normal astrocytes under control conditions (A, C and E, respectively) and after 48 h treatment with 0.4 mM 8-MOP (B, D and F, respectively). It is also showed the zoom of surface and edge of each cell type. The treatment leads to generation of structures those look like filopodia in the tumor cells, also visible by transmission electronic microscopy (G), but the 8-MOP did not increased cell migration (H).

Figure 7. Vimentin expression (by immunocytochemistry) in GL-15 cells before (A) and after (B) treatment with 0.4 mM 8-MOP.

Figure 8. Cell viability (by MTT assay) in normal and tumor sub-confluent cultures after 48h treatment with coumarin derivatives. Data are expressed in mean \pm SEM or median and range, according to their distribution, and were analyzed by One-way ANOVA followed by Dunnett's Mutiple Comparison test and Kruskal-Wallis followed by Dunns Comparison test, respectively. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ compared to respective controls (0.5% DMSO)

Table 1. Data from 10-days exposition experiment (mean (SEM), N = 5). The percentage of inhibition of proliferation was 42.4%, 39.4% and -4.9% (not significant) for C6, GL-15 and astrocytes, respectively.

Figure 1

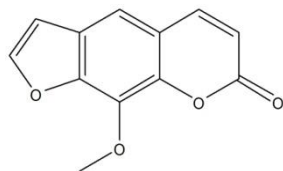


Figure 2

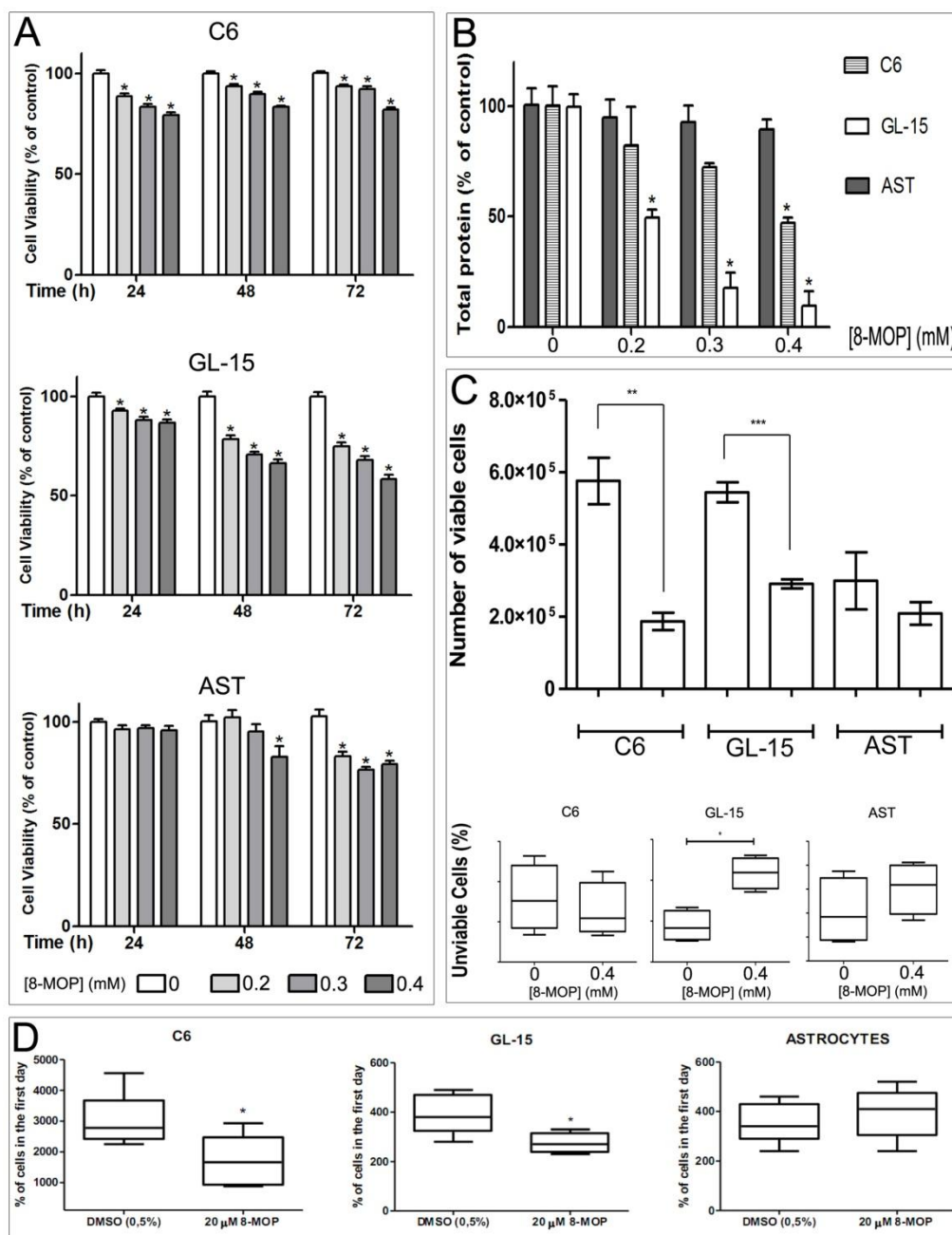


Figure 3

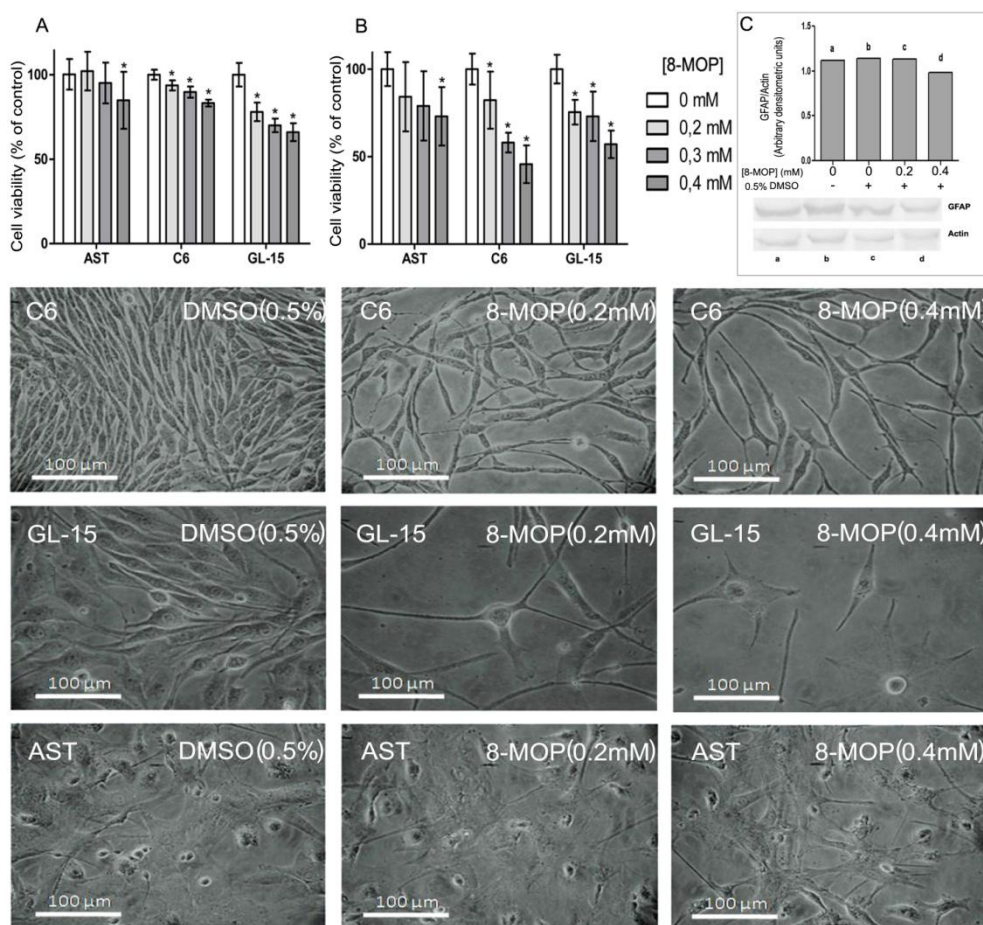


Figure 4

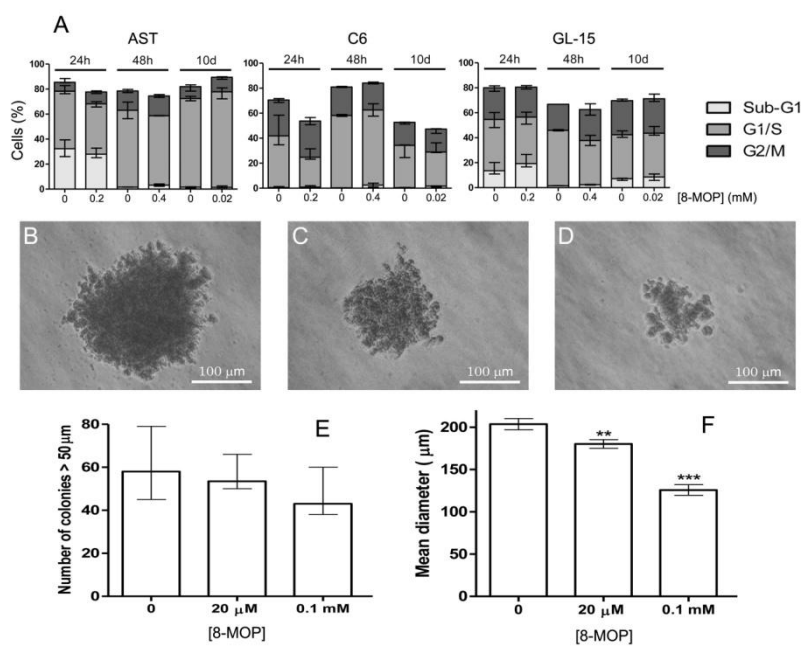


Figure 5

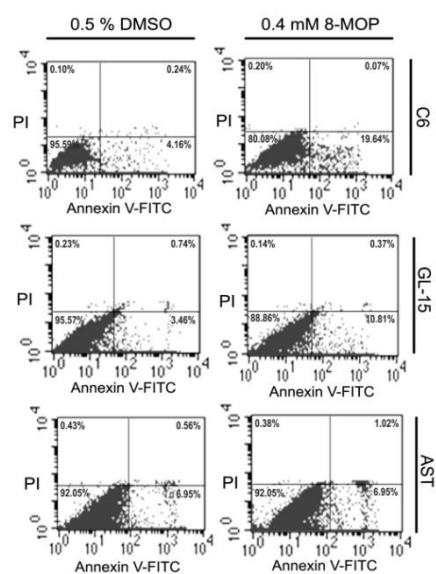


Figure 6

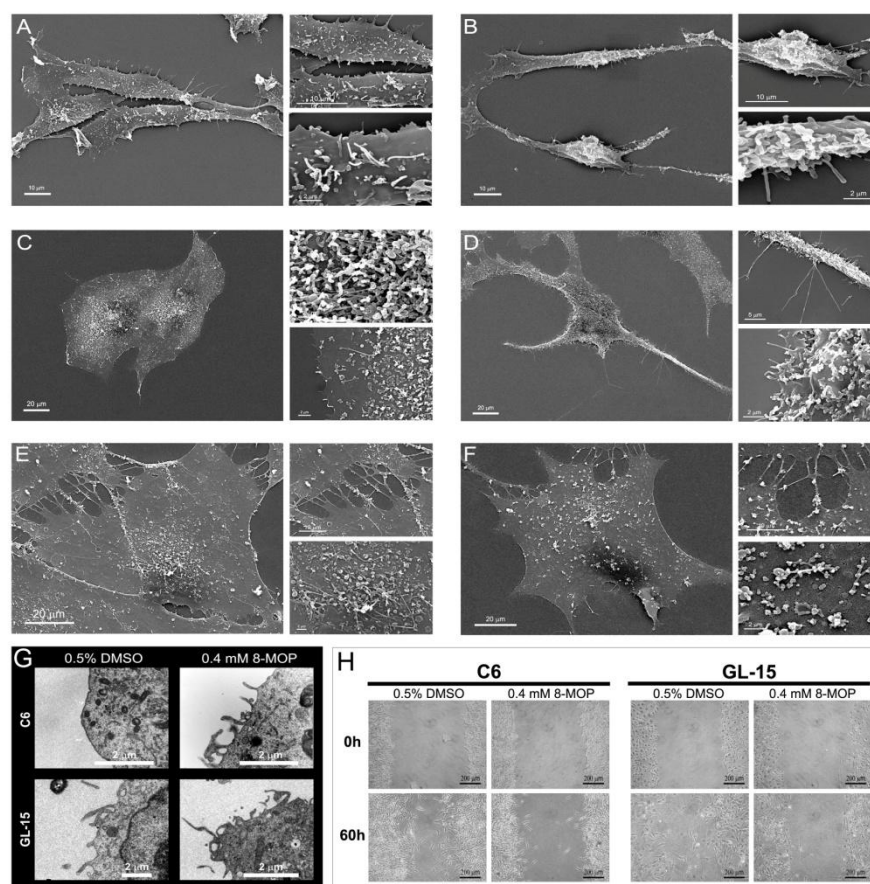


Figure 7

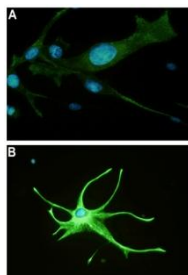


Figure 8

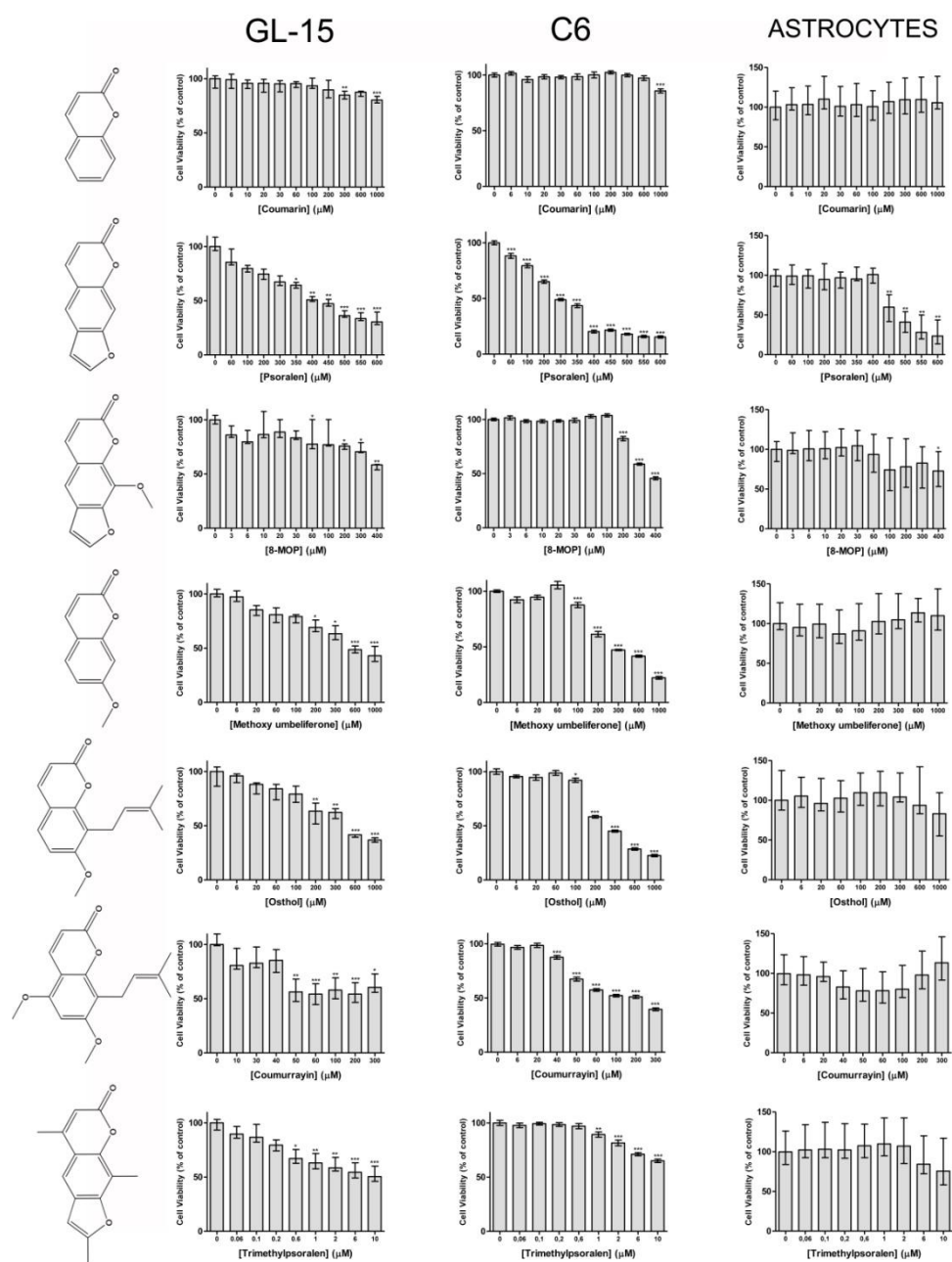
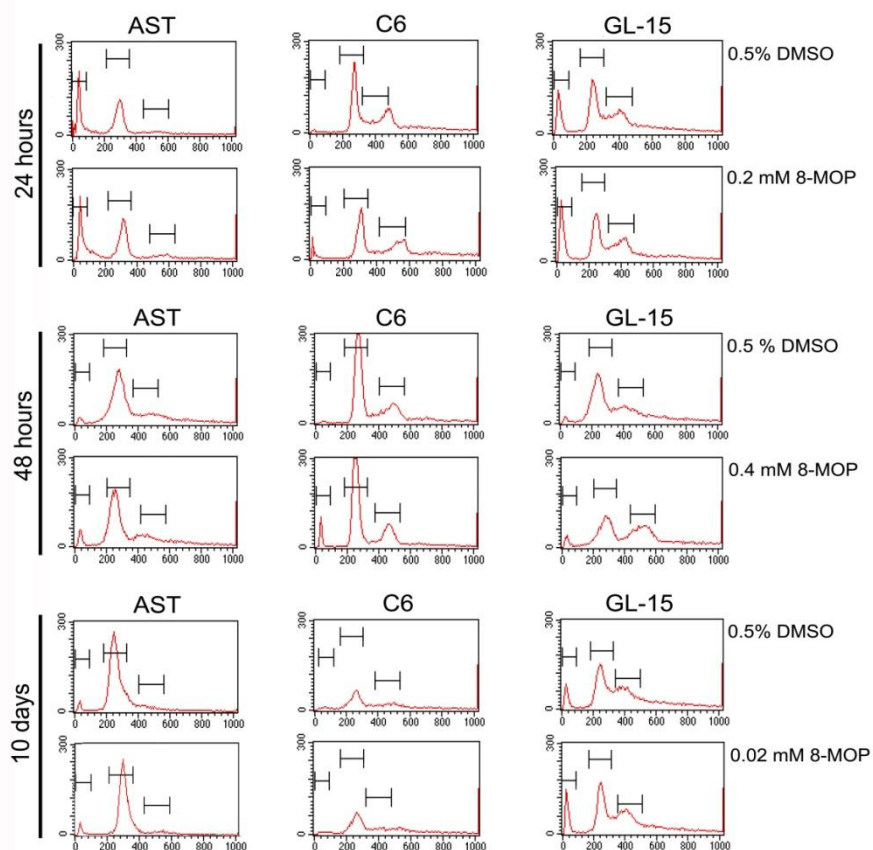


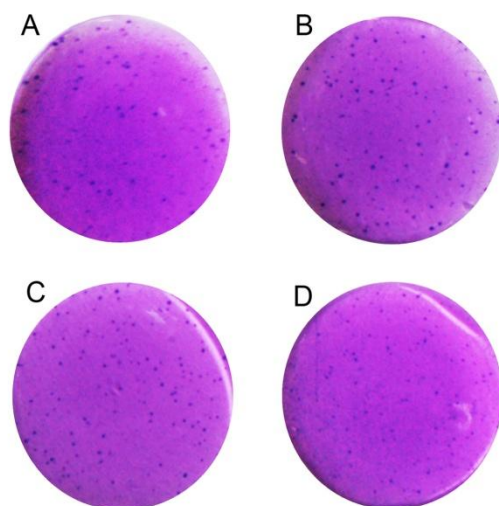
Table 1

	C6		GL-15		ASTROCYTES	
	DMSO	8-MOP	DMSO	8-MOP	DMSO	8-MOP
Viable cells (day 1)	10,000	10,000	10,000	10,000	20,000	20,000
Total Viable cells (day 10)	278,000 (242,000-367,500)	166,000* (93,000-247,500)	38,000 (32,000-47,000)	27,000* (23,500-31,500)	74,000 (53,000-89,000)	82,000 (61,000-95,000)
% of Viable cells (day 10)	89.3 (85.2-93.3)	79 (73.3-92)	97.8 (95.8-100)	100 (92.1-100)	88 (76.3-94.1)	89.6 (87.5-96.6)
Total unviable cells (day 10)	31,000 (17,500-64,000)	27,000 (20,000-43,000)	1,000 (0-2,000)	0 (0-2,500)	10,000 (5,500-16,000)	6,000 (3,000-12,000)
% of unviable cells (day 10)	10.7 (6.7-14.8)	20.9 (8-26.7)	2.2 (0-4.2)	0 (0-7.9)	12 (6-23.6)	10.3 (3.4-12.5)

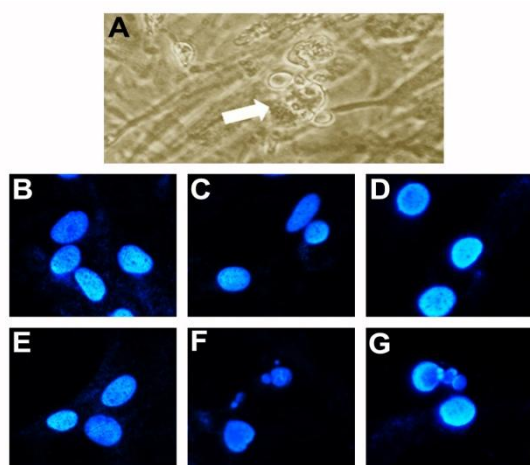
SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Supplementary****Figure 1**

Cell cycle analyses of cultures treated with 8-MOP. Values in vertical and horizontal axis represent number of cells and IP intensity, respectively. The bar inside the graphs, from left to right, mark cells in the Sub-G1, G1/S and G2/M phases. No difference was noted between control and treated groups.

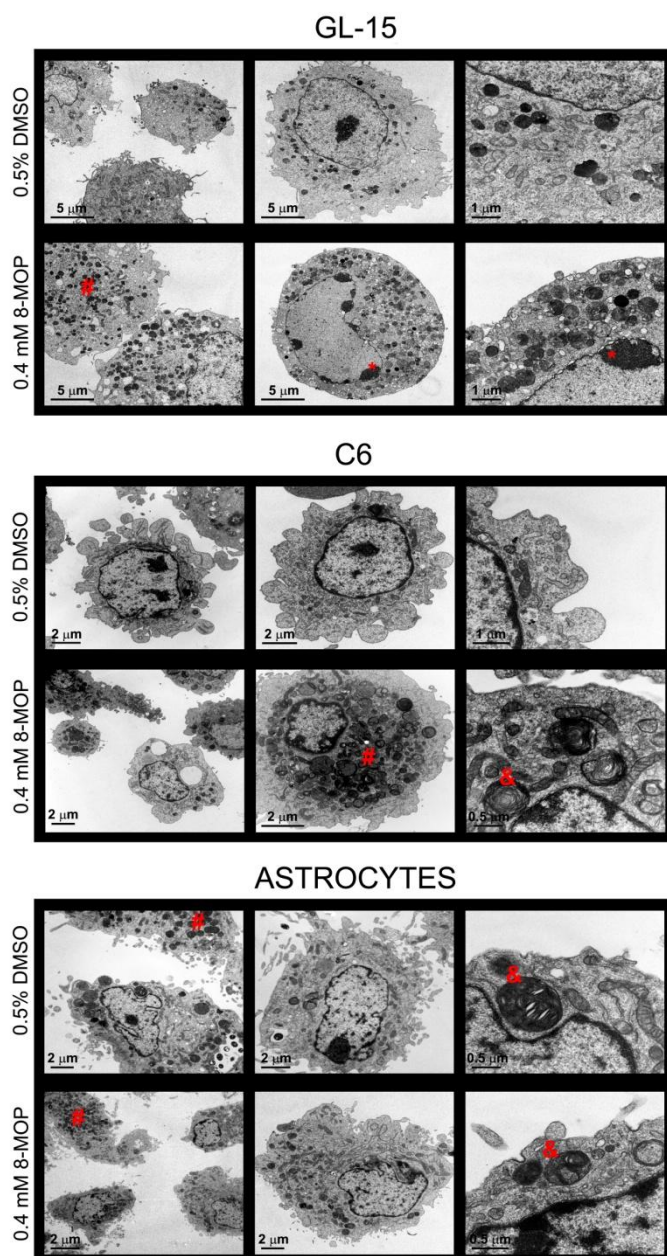
**Supplementary Figure 2**

Macroscopic aspect of C6 cells colonies in medium control conditions (A), vehicle (0.001% DMSO) control conditions (B) and after treatment with 20 μ M 8-MOP (C) and 0.1 mM 8-MOP (D).



Supplementary Figure 3

Photomicrograph of GL-15 cell after 48h treatment with 0.4 mM 8-MOP showing morphological changes those suggest apoptosis (A), these alterations were also visualized in C6 and astrocytes cultures treated with the same concentration of 8-MOP. The nucleus were stained with Hoechst 33258 and exhibit normal aspect in cultures of astrocytes, C6 and GL-15 (B, C and D, respectively) at control conditions, but fragmentation is present after 48h treatment with 0.4 mM 8-MOP in tumor cells (F and G, C6 and GL-15 respectively).

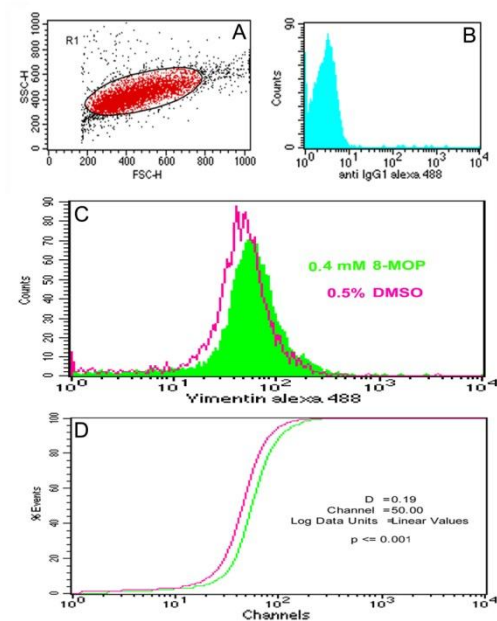


Supplementary Figure 4

Electric Photomicrograph showing ultra-structural changes in normal and tumor cells after treatment with 8-MOP.

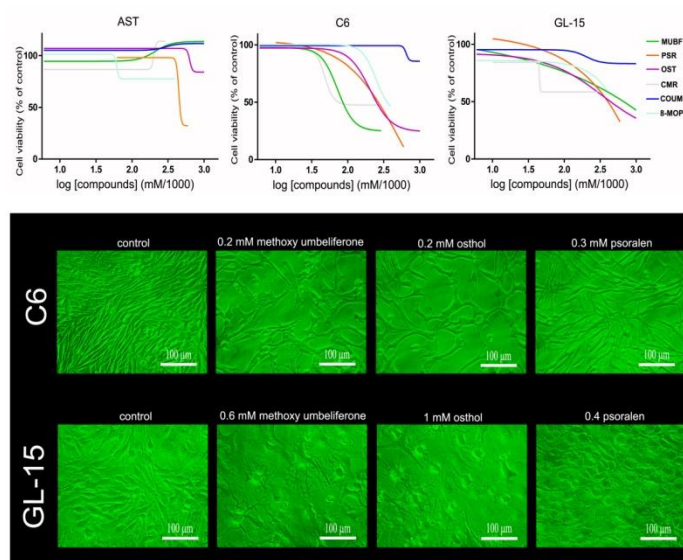
* = odd pattern of chromatin compaction;

= autophagic vacuoles;
& = myelin figures.



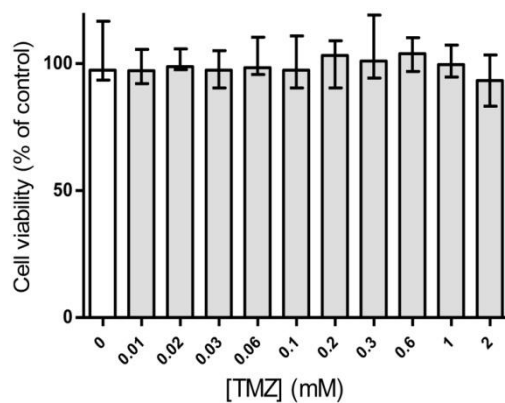
Supplementary Figure 5

Vimentin expression in GL-15 cells (by flow cytometry) before (pink) and after (green) treatment with 8-MOP. In A and B are gate for analyses and control for secondary antibody alone, respectively. Despite no increase in percentage of labeled cells, the fluorescence intensity increased after treatment (C). Since the values are in logarithmical scale, the difference between the mean of fluorescence in the groups was significant (D).



Supplementary Figure 6

Biological activity of coumarin derivatives structurally related to 8-MOP. The graphs show toxic profile of the compounds in tumor and normal cells. Data are from MTT experiments after non-linear regression (MUBF=methoxy umbeliferone, PSR=psoralen, OST=osthol, CMR=coumurrayin, COUM=coumarin). The pictures show changes in cell morphology promoted by 48h treatment with methoxy umbeliferone, osthol and psoralen at different concentrations in tumor cells (control=0.05% DMSO).



Supplementary Figure 7

Cellviability (by MTT assay) of GL-15 cells after 72 hours of treatment with TMZ at increasing concentrations. The cells presented extreme resistance toward the drug even at the high concentration of 2mM. The vehicle (0.5% DMSO) is present in all groups, including control, but did not affected cell viability at this concentration.

