

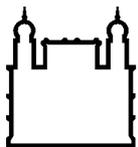
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**ENVOLVIMENTO DE *HEAT SHOCK PROTEIN 90* NA ATIVAÇÃO DE TLR4 EM
CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MURINO**

TAÍZE DE JESUS DUARTE DIAS

**Rio de Janeiro
2019**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

TAÍZE DE JESUS DUARTE DIAS

Envolvimento de *heat shock protein 90* na ativação de TLR4
em células de glioblastoma murino

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof. Dra. Carmen Penido

RIO DE JANEIRO

2019

de Jesus Duarte Dias , Taíze .

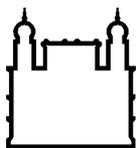
Envolvimento de *heat shock protein 90* na ativação de TLR4 em células de glioblastoma murino / Taíze de Jesus Duarte Dias . - Rio de Janeiro, 2019. 23 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientadora: Carmen Penido.

Bibliografia: f. 42-48

1. Glioblastoma. 2. Proteína de choque térmico 90. 3. Receptor do tipo toll 4. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Taíze de Jesus Duarte Dias

**ENVOLVIMENTO DE *HEAT SHOCK PROTEIN 90* NA ATIVAÇÃO DE TLR4 EM
CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MURINO**

ORIENTADORA: Prof. Dra. Carmen Penido

Aprovada em: 12/09/2019

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Robson Xavier Faria (IOC) - **Presidente**
Prof. Dr. Fausto Klabund Ferraris (INCQS)
Prof. Dra. Ana Luisa Palhares de Miranda (UFRJ)
Prof. Dra. Tatiana Martins Tilli (CDTS) – **Revisora**
Prof. Dra. Claudia Farias Benjamim (UFRJ)

Rio de Janeiro, 12 de setembro de 2019

...

Dedicatória

Ao meu pai que, enquanto esteve no mundo,
me incentivou a sempre buscar por conhecimento.

Agradecimentos

Primeiramente, a Deus por sempre me abençoar, proteger e, principalmente, por ter permitido que eu chegasse até aqui.

À minha orientadora, Dra. Carmen Penido, por ter me orientado de forma brilhante, respeitando minhas singularidades. Obrigada pela confiança e dedicação. Suas sugestões e conselhos contribuíram para a profissional que estou me tornando hoje, mais segura e madura para seguir em frente.

Ao meu (praticamente) orientador, MSc. Thadeu Costa, por todos ensinamentos que, sem dúvida alguma, contribuíram muito para minha formação acadêmica. Obrigada por todas suas sugestões, pela ajuda e pelos conselhos que foram essenciais para elaboração desta dissertação.

Aos meus amigos, Taís e Edward, por toda ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por acreditarem em mim, pelas conversas e conselhos. Sem vocês eu, com certeza, não teria conquistado essa e tantas outras coisas.

À Dra. Tatiana Tilli pela revisão e pelas sugestões que contribuíram de forma enriquecedora para a construção desta dissertação.

À Dra. Maria das Graças Henriques por aceitar a realização deste trabalho em seu laboratório, colaborando com a minha formação acadêmica.

À minha mãe, Tânia, e minha irmã, Tamires, que me incentivam a ir cada vez mais longe. Obrigada por todo apoio durante a elaboração deste trabalho. Sem vocês, eu não teria chegado tão longe.

Ao meu marido, Kevin, com quem compartilhei momentos de desespero, ansiedade, felicidade e conquistas. Obrigada pelas noites em claro só para me fazer companhia ou me ajudar na formatação desta dissertação. Obrigada também pelos cafés, amor e cuidado. Essa conquista é nossa, não tenha dúvidas disso.

Aos meus sogros, Marta e Alexandre, e minha cunhada, Rebecca, por todo apoio e orações. Vocês são a família que tive o prazer de ganhar nesta vida.

Às minhas amigas, Débora, Fernanda e Lídia, por me darem forças nos momentos mais difíceis e de grandes desafios. Obrigada por não me deixarem esquecer o quanto se

orgulham de mim. Saibam que vocês são meus exemplos de mulheres dedicadas e que fazem parte desta conquista.

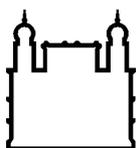
Aos meus amigos, Reynaldo e Lais, que acompanham meu crescimento profissional desde a graduação. Obrigada por todo apoio e conselhos. Agradeço também por sempre me incentivarem a melhorar e buscar pelos meus objetivos. Vocês fazem parte desta conquista.

Ao meu amigo Marcos que me proporcionou momentos de muita felicidade. Obrigada por toda ajuda com os cálculos de estequiometria, por todo carinho e amor.

Às minhas amigas da Biologia Celular UERJ, Andreza, Thayane e Marcella, com quem iniciei minha carreira científica. Obrigada por todos os ensinamentos, ajuda e suporte desde a graduação.

À Dra. Elaine Rosas e Dra. Mariana Conceição de Souza, aos meus colegas do Laboratório de Farmacologia Aplicada, André Candéa, Bruna Teixeira, Erika Cunha, Luana Barbosa, Tatiana Pádua, e equipe de apoio Márcia, Ubirajara, Suellen e Alan por todo suporte, paciência e ajuda. Obrigada por me receberem tão bem no laboratório e por estarem sempre dispostos a ajudar. Em especial, agradeço o Dr. Leonardo Seito pela ajuda com os experimentos de *western blot* e por compartilhar seus conhecimentos comigo.

Ao auxílio financeiro fornecido pela CAPES, CNPq, FAPERJ e FIOCRUZ.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

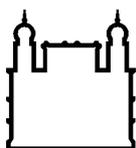
ENVOLVIMENTO DE *HEAT SHOCK PROTEIN 90* NA ATIVAÇÃO DE TLR4 EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MURINO

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Taíze de Jesus Duarte Dias

O glioblastoma é um tumor cerebral altamente invasivo e de mau prognóstico, derivado da transformação maligna de células-tronco neurais, células precursoras de oligodendrócitos e astrócitos. As células de glioblastoma expressam o receptor de reconhecimento de padrões (PRR) do tipo toll (TLR)4, que reconhece ligantes endógenos presentes no microambiente tumoral. A ativação deste receptor induz a produção de mediadores inflamatórios envolvidos na sobrevivência, migração e invasão das células tumorais. A proteína de choque térmico (HSP do inglês, *heat shock protein*) 90 é superexpressa por células tumorais, sendo essencial para o crescimento tumoral. Há relatos que sugerem que a ativação do TLR4 depende da atividade da HSP90, uma vez que esta mantém a integridade do receptor durante o reconhecimento de seu ligante, assim como regula diversas proteínas envolvidas na via de sinalização deste receptor, incluindo oncoproteínas e quinases. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da ativação de TLR4 em células de glioblastoma e o impacto da atividade da HSP90 sobre a ativação e crescimento tumoral *in vitro*. Dados obtidos neste trabalho demonstram que as células de glioblastoma murino GL261 expressam TLR4 funcional. A ativação deste receptor pelo seu ligante, lipopolissacarídeo (LPS), levou ao aumento da expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP do inglês, *glial fibrillary acidic protein*) e da produção de fatores envolvidos na resposta inflamatória e no desenvolvimento tumoral, tais como interleucina (IL)-6 e -10, CCL2 (do inglês *CC chemokine ligand 2*) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF do inglês, *vascular endothelial growth factor*). A ativação de TLR4 também levou à translocação do fator nuclear κ B (NF κ B do inglês, *factor nuclear κ B*) para o núcleo das células. Além disso, observamos que o inibidor seletivo da atividade de HSP90 (17-allylaminogeldanamycin, 17-AAG) modulou negativamente a produção dos mediadores inflamatórios supracitados, a translocação de NF κ B, assim como reduziu proliferação celular, sugerindo que a HSP90 participa da resposta inflamatória induzida pela ativação de TLR4 e do crescimento de células GL261. Neste trabalho, demonstramos que a ativação de TLR4 em células GL261 induz a resposta inflamatória e que a inibição da atividade de HSP90 contribui para a redução deste fenômeno. Considerando a importância da inflamação para o desenvolvimento tumoral, nossos dados podem ainda contribuir para o desenvolvimento futuro de novas abordagens terapêuticas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INVOLVEMENT OF HEAT SHOCK PROTEIN 90 ON TLR4 ACTIVATION IN MURINE GLIOBLASTOMA CELLS

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Taíze de Jesus Duarte Dias

Glioblastoma is a highly invasive brain tumor with poor prognosis, derived from malignant transformation of neural stem cells, oligodendrocyte precursor cells and astrocytes. Glioblastoma cells express the pattern recognition receptor (PRR) toll-like receptor (TLR) 4, which recognizes endogenous ligands present in tumor microenvironment. TLR4 activation triggers the production of inflammatory mediators involved in survival, migration and invasion of tumor cells. Heat shock protein (HSP) 90 is overexpressed in tumor cells and is essential for tumor growth. Reports suggest that TLR4 activation depend on HSP90 activity, since this chaperone maintains TLR4 integrity during ligand recognition, as well as it regulates several proteins involved in signaling pathway of this receptor, including oncoproteins and kinases. Therefore, the aim of the present study was to investigate the role of TLR4 activation in GL261 murine glioblastoma cells and the impact of HSP90 activity on tumor growth *in vitro*. Our data demonstrates that GL261 murine glioblastoma cells express functional TLR4. TLR4 activation by lipopolysaccharide (LPS) induced the increase in glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression and led to increased production of inflammatory mediators involved in tumor development, such as interleukin (IL)-6 e -10, CC chemokine ligand-2 (CCL2) and vascular endothelial growth factor (VEGF). TLR4 activation also led to the translocation of nuclear factor κ B (NF κ B) to the nucleus of cells. Furthermore, we observed that the treatment with the selective inhibitor of HSP90 activity (17-allylaminogeldanamycin, 17-AAG) negatively modulated the production of inflammatory mediators as cited above, NF κ B translocation, as well as reduced cell proliferation, suggesting that HSP90 participates in the inflammatory response induced by TLR4 activation and GL261 cell growth. Together, these data demonstrate that TLR4 activation triggers inflammatory response in GL261 cells and that HSP90 participates in this phenomenon. Considering the relevance of the inflammatory response for tumor development, our data may contribute to future development of new therapeutic approaches.

Sumário

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
1.Introdução.....	1
1.1 Glioblastoma multiforme.....	1
1.1.1 Epidemiologia.....	2
1.1.2 Tratamento.....	3
1.2 Resposta inflamatória no desenvolvimento de tumores.....	4
1.2.1 Via de sinalização de TLR4 e sua expressão em células tumorais.....	6
1.3 HSP90: inflamação e câncer.....	8
1.3.1 Inibidores de HSP90.....	9
2. Objetivo geral.....	11
2.1 Objetivos específicos.....	11
3. Metodologia.....	12
3.1 Cultura de células de glioblastoma murino GL261.....	12
3.2 Tratamento e estímulo de células GL261.....	12
3.3 Ensaio de viabilidade celular.....	13
3.4 Extração de proteínas totais.....	13
3.5 Extração de proteínas nucleares.....	14
3.6 Detecção de proteínas por <i>western blot</i>	14
3.7 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	15
3.8 <i>Enzyme immunoassay</i> (EIA).....	16
3.9 Avaliação da atividade de MMP-2.....	16
3.10 Marcação para citometria de fluxo.....	17
3.11 Ensaio de proliferação celular.....	18

3.12 Análise estatística.....	18
4. Resultados.....	19
4.1 Expressão de TLR4 em células GL261.....	19
4.2 Viabilidades de células GL261 estimuladas com LPS.....	19
4.3 Avaliação da funcionalidade de TLR4.....	20
4.4 Efeito do inibidor de HSP90 sobre a viabilidade de células GL261.....	21
4.5 Efeito do inibidor de HSP90 sobre a expressão de TLR4.....	24
4.6 Produção de fatores envolvidos na resposta inflamatória.....	25
4.7 Produção de fatores envolvidos na invasão tumoral.....	33
4.8 Proliferação de células GL261.....	35
5. Discussão.....	37
6. Conclusão.....	41
7. Referências bibliográficas.....	42

Índice de figuras

Figura 1.1. Microambiente de glioblastoma.....	2
Figura 1.2. <i>Hallmarks</i> do câncer.....	5
Figura 1.3. Via de sinalização de TLR4.....	7
Figura 1.4. HSP90: inflamação e câncer.....	9
Figura 3.1. Estrutura química da 17-AAG.....	12
Figura 4.1 Expressão de TLR4 em células GL261 em repouso.....	19
Figura 4.2. Viabilidade das células GL261 após incubação com LPS.....	20
Figura 4.3. Avaliação da funcionalidade de TLR4 após incubação das células GL261 com LPS.....	21
Figura 4.4. Viabilidade das células GL261 pré-tratadas com 17-AAG e estimuladas com LPS por 24h.....	22
Figura 4.5. Viabilidade das células GL261 pré-tratadas com 17-AAG e estimuladas com LPS 72h.....	23
Figura 4.6. Expressão de TLR4 em células GL261 pré-tratadas com 17-AAG e estimuladas com LPS por 24h.....	24
Figura 4.7. Produção de IL-6 por células GL261 pré-tratadas com 17-AAG e estimuladas com LPS por 24h.....	25
Figura 4.8. Produção de CCL2 e IL-10 por células GL261 pré-tratadas com 17-AAG e estimuladas com LPS por 24h.....	26
Figura 4.9. Produção de PGE ₂ por células GL261 pré-tratadas com 17-AAG e estimuladas com LPS por 24h.....	27
Figura 4.10. Expressão de COX-2 em células GL261 pré-tratadas com 17-AAG e estimuladas com LPS por 24h.....	28
Figura 4.11. Expressão de NFκB nuclear em células GL261 pré-tratadas com 17-AAG e estimuladas com LPS por 1h.....	29

Figura 4.12. Expressão de HSP70 em células GL261 pré-tratadas com 17-AAG e estimuladas com LPS por 24h (<i>western blot</i>).....	30
Figura 4.13. Expressão de HSP70 em células GL261 pré-tratadas com 17-AAG e estimuladas com LPS por 24h (citometria de fluxo).....	31
Figura 4.14. Expressão de GFAP em células pré-tratadas com 17-AAG e estimuladas com LPS por 24h.....	32
Figura 4.15. Avaliação de VEGF produzido por células GL261 pré-tratadas com 17-AAG e estimuladas com LPS 24h.....	33
Figura 4.16. Avaliação da atividade de MMP-2 produzida por células GL261 pré-tratadas com 17-AAG e estimuladas com LPS por 6h.....	34
Figura 4.17. Avaliação da proliferação de células GL261 pré-tratadas com 17-AAG e estimuladas com LPS por 72h pela marcação com CFSE.....	36
Figura 6.1. Esquema de conclusão.....	41

Lista de siglas e abreviaturas

17-AAG	17-alilaminogeldanamicina
ATP	Adenosina trifosfato
CCL2	<i>CC chemokine ligand2</i>
COX	Ciclooxigenase
DAMP	Padrão molecular associado a dano (<i>damage-associated molecular pattern</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
EIA	<i>Enzyme immunoassay assay</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPM	Erro padrão da média
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
HSF1	Fator 1 de transcrição de choque térmico (<i>heat shock factor 1</i>)
HSP	Proteína de choque térmico (<i>heat shock protein</i>)
HSR	Resposta de choque térmico (<i>heat shock response</i>)
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteínas quinase ativada por mitógeno (<i>mitogen activated protein kinase</i>)
MMP	Metaloproteinase de matriz
NFκB	Fator nuclear κB (<i>nuclear factor κB</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrão molecular associado a patógeno (<i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PGE₂	Prostaglandina E ₂
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>)
TAM	Macrófago associado ao tumor (<i>tumor-associated macrophage</i>)
TLR	Receptor do tipo toll (<i>toll-like receptor</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>tumor necrosis factor</i>)
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular (<i>vascular endothelial growth factor</i>)

1. Introdução

1.1 Glioblastoma multiforme

Os gliomas constituem um grupo de tumores do sistema nervoso central que possuem diferentes características histológicas e imuno-histoquímicas (Louis *et al.*, 2016; Ostrom *et al.*, 2018). De acordo com essas características, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica e gradua os gliomas em oligodendroglioma, oligoastrocitoma, astrocitoma (graus II e III) e glioblastoma multiforme (grau IV) (Ceccarelli *et al.*, 2017; Louis *et al.*, 2016). Os pacientes diagnosticados com glioma apresentam mau prognóstico e baixa sobrevida principalmente quando se trata do tipo mais comum, o glioblastoma (Alcantara *et al.*, 2016; Huse e Holland, 2010; Ostrom *et al.*, 2018).

O glioblastoma é derivado da transformação maligna de células-tronco neurais, células precursoras de oligodendrócitos e astrócitos (Yao *et al.*, 2018), podendo ocorrer nos quatro lobos do cérebro: frontal, temporal, parietal e occipital (Davis, 2016). O glioblastoma é classificado como primário, quando surge sem um tumor precursor conhecido, ou secundário, quando um glioma de baixo grau se transforma, ao longo do tempo, em glioblastoma. Entretanto, sua forma primária é a mais frequente e apresenta pior prognóstico quando comparada ao tumor secundário (Hanif *et al.*, 2017). O diagnóstico é obtido pela análise dos sintomas apresentados pelo paciente e através de técnicas de imagem, como tomografia computadorizada e ressonância magnética, que permitem a visualização do tumor. Os pacientes podem apresentar diferentes sintomas que dependem das regiões do cérebro afetadas, como problemas auditivos e visuais, dores de cabeça e até convulsões (Hanif *et al.*, 2017). Sendo assim, o desenvolvimento do glioblastoma leva a um rápido comprometimento neurológico, resultando em incapacitação cognitiva e comportamental (Hanif *et al.*, 2017; Sizoo *et al.*, 2010). Ainda, vale ressaltar que trata-se de um glioma resistente ao tratamento atual empregado, sendo então considerado altamente agressivo e letal (Davis, 2016).

Dentre as características devastadoras intrínsecas ao glioblastoma, estão: células de rápido crescimento, altamente invasivas e resistentes a apoptose, áreas de necrose e angiogênese (Perrin *et al.*, 2019). O microambiente de glioblastoma é altamente heterogêneo e consiste em diferentes tipos celulares além das células tumorais, como micróglia, oligodendrócitos, neurônios, entre outros (**figura 1.1**) (Perrin *et al.*, 2019). Em resposta às condições do tumor, as células produzem mediadores inflamatórios, tais como CCL2 (do

inglês, *CC chemokine ligand 2*), prostaglandina E₂ (PGE₂), interleucina(IL)-6 e IL-10, que favorecem a progressão da doença (Coussens e Werb, 2002; Platten *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2015). O baixo teor de oxigênio da massa tumoral induz as células a produzirem altos níveis do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF do inglês, *vascular endothelial growth factor*), principal fator responsável pelo processo angiogênico (Perrin *et al.*, 2019). Além disso, a comunicação entre os diferentes tipos celulares leva à produção de metaloproteínas de matriz (MMPs), como a MMP-2 (**Figura 1.1**), que degradam a matriz extracelular, possibilitando a invasão das células tumorais para o tecido saudável circundante (Perrin *et al.*, 2019).

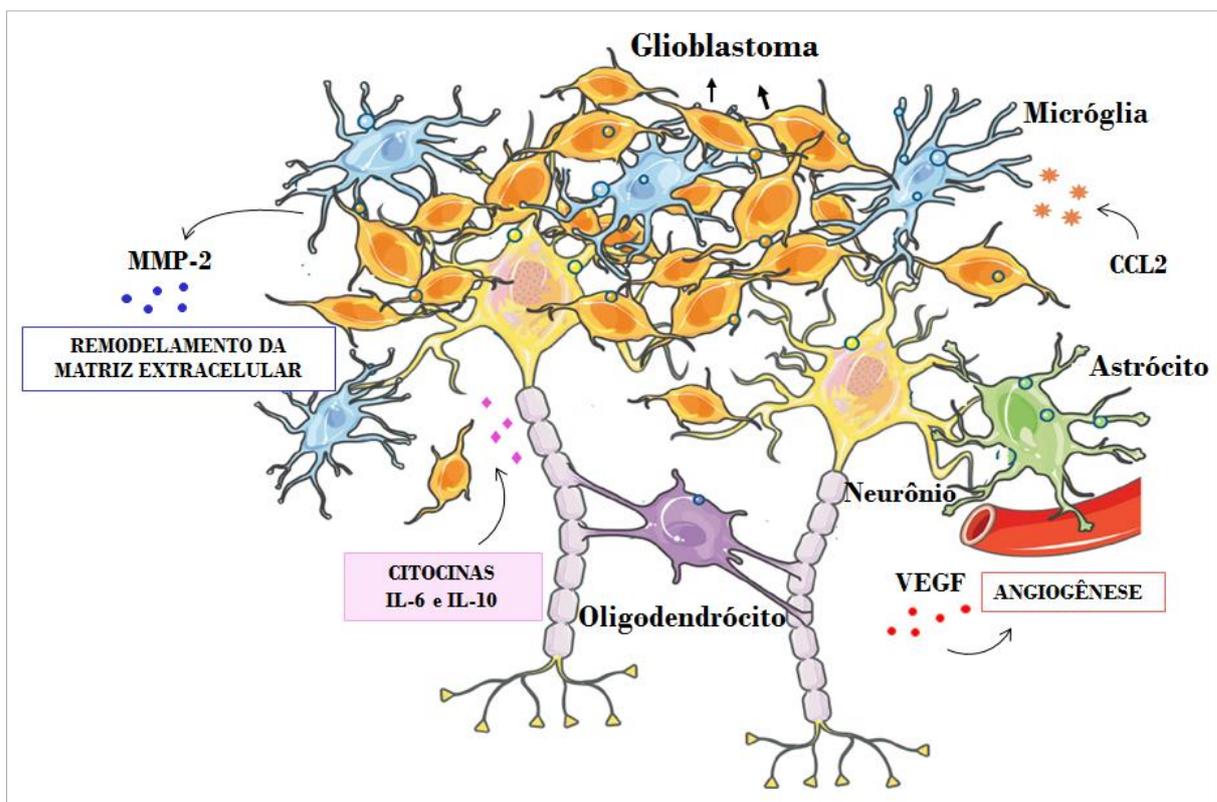


Figura 1.1. Microambiente de glioblastoma. A interação entre células tumorais, micróglia, oligodendrócitos, neurônios e astrócitos, juntamente com mediadores inflamatórios, favorece o crescimento e invasão tumoral ao induzir angiogênese e remodelamento da matriz extracelular. Adaptado de Rajendran *et al.*, 2014.

1.1.1 Epidemiologia

O glioblastoma representa 16% de todas as neoplasias cerebrais primárias (Thakkar *et al.*, 2014) e a incidência mundial deste tumor varia entre 3 a 4 casos por 100.000 pessoas, sendo mais comum em homens do que em mulheres (Davis, 2016; Thakkar *et al.*, 2014; Van

Gool, 2015). Especificamente no Brasil, a incidência é de 6,4 homens e 4,8 mulheres por 100.000 pessoas (Piñeros *et al.*, 2016). Além disso, o glioblastoma pode ocorrer em qualquer faixa etária, mas grande maioria dos casos acometem pessoas com idades compreendidas entre os 55 e 60 anos. Estudos também têm constatado maior incidência do glioblastoma entre os brancos, seguidos pelos negros, asiáticos e índios americanos. Ainda, a exposição à radiação e predisposição genética têm sido relatadas como importantes fatores de risco associados ao surgimento do glioblastoma (Hanif *et al.*, 2017). As estimativas de sobrevida dos pacientes com este tumor são muito baixas, poucos sobrevivem 2,5 anos e menos de 5% dos pacientes sobrevivem 5 anos após o diagnóstico. O mau prognóstico de glioblastoma é influenciado por diferentes fatores, como idade e localização do tumor (Thakkar *et al.*, 2014), e o desenvolvimento desta doença resulta em alta taxa de mortalidade, tornando-o um importante problema de saúde pública.

1.1.2 Tratamento

Atualmente, o tratamento padrão preconizado pela OMS consiste em remoção cirúrgica do glioblastoma, em sua máxima extensão possível e segura, seguida de radioterapia e concomitante quimioterapia com temozolomida (Stupp *et al.*, 2005; Van Gool, 2015). A ressecção cirúrgica é capaz de reduzir a tensão mecânica exercida pelo tumor, aliviando os sintomas da doença, além de ser uma forma de obtenção de tecido para diagnóstico histológico. No entanto, a remoção completa da massa tumoral é extremamente difícil, pois as células invasivas do glioblastoma, muitas vezes, se encontram em áreas do cérebro que controlam a fala, função motora e os sentidos. Por isso, mesmo após cirurgia, há recorrência da doença e sua consequente progressão (Davis, 2016). A temozolomida é administrada por via oral, sendo considerada um agente alquilante de alta toxicidade que é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, induzindo danos no DNA e levando à morte das células (Davis, 2016; Stupp *et al.*, 2005). Ainda, em alguns casos, é realizada a implantação pós-cirúrgica de discos contendo o quimioterápico carmustina que é liberada gradualmente no tecido cerebral afetado, minimizando assim a toxicidade sistêmica (Lin e Kleinberg, 2008). Entretanto, mesmo diante do atual tratamento empregado, a sobrevida dos pacientes permanece baixa, sendo de apenas 15 meses (Thakkar *et al.*, 2014).

Alguns dos problemas recorrentes no tratamento de glioblastoma é a alta toxicidade e o desenvolvimento de resistência ao agente quimioterápico (Davis, 2016; Van Gool, 2015). Além disso, é importante salientar que a baixa eficácia também se deve ao fato de que este

glioma apresenta alta heterogeneidade, natureza invasiva e complexas interações das células tumorais com o seu microambiente (Perrin *et al.*, 2019). Neste contexto, faz-se necessária uma melhor compreensão acerca do microambiente de glioblastoma e a busca por novas abordagens terapêuticas que possam oferecer esperança aos pacientes portadores de glioblastoma e seus familiares.

1.2 Resposta inflamatória no desenvolvimento de tumores

O processo inflamatório é uma resposta imune do organismo frente a invasão de patógenos, lesões teciduais ou estímulos químicos nocivos (Chen *et al.*, 2018). De forma geral, a inflamação aguda é mediada por citocinas e ocorre em um curto período de tempo, além de resultar em um processo de cicatrização, sendo então necessário que haja proliferação celular e formação de novos vasos, pois garantem reparação tecidual adequada (Chenet *et al.*, 2018; Lin e Karin, 2007). Em condições normais, a resposta inflamatória é rigidamente controlada para garantir que a proliferação celular ocorra apenas até que o reparo seja concluído ou até que a infecção seja resolvida (Chenet *et al.*, 2008). Por outro lado, a inflamação crônica é uma resposta prolongada e desregulada que resulta em um microambiente rico em mediadores inflamatórios e fatores de crescimento celular, além de levar à destruição tecidual, estando então associada a diversas doenças, como o câncer (Hanahan e Weinberg, 2011; Lin e Karin, 2007). De fato, a inflamação desempenha um importante papel nos diferentes estágios do desenvolvimento tumoral, desde seu início até proliferação, invasão e metástase (Balkwill e Mantovani, 2012; Dranoff, 2004; Grivennikov *et al.*, 2010).

Durante o desenvolvimento do câncer, as células malignas adquirem uma gama de *hallmarks* que permitem o eficiente estabelecimento e progressão da doença. Dentre estes, estão a resistência a apoptose, imortalidade replicativa, proliferação sustentada, evasão de fatores de supressão de crescimento, indução de angiogênese, evasão do sistema imune e reprogramação do metabolismo celular. Estas múltiplas características adquiridas pelo tumor são promovidas e sustentadas pela instabilidade genômica de células malignas e também pelo processo inflamatório (**figura 1.2**) (Hanahan e Weinberg, 2011). No entanto, vale ressaltar que as interações entre células do sistema imune e tumorais, juntamente com fatores produzidos no microambiente tumoral, são extremamente complexas. A resposta inflamatória, por exemplo, promove o crescimento desordenado de células malignas, pois os mediadores inflamatórios e o estado de ativação de diferentes tipos de células presentes no microambiente favorecem essa resposta (Lin e Karin, 2007).

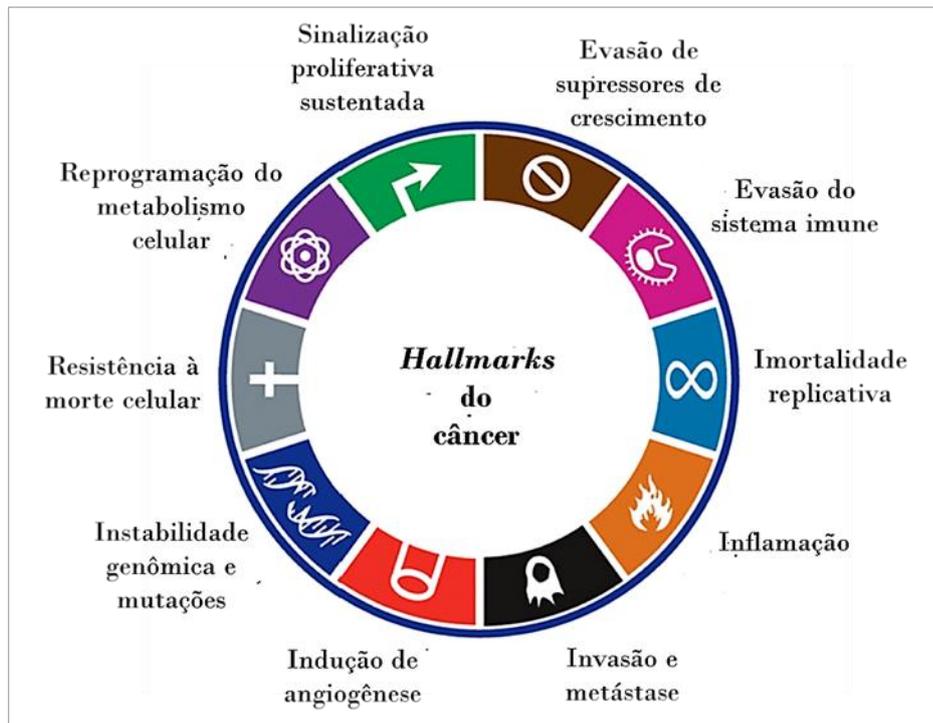


Figura 1.2. Hallmarks do câncer. As características biológicas adquiridas por tumorese que garantem o surgimento, estabelecimento e a progressão. Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

As interações celulares presentes no microambiente tumoral são mediadas por complexos receptores-ligantes (Patidar *et al.*, 2018), dentre os quais os TLRs são um dos responsáveis por ativar a resposta imune. Os TLRs, além de reconhecerem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*), reconhecem também padrões moleculares associados a danos (DAMPs do inglês, *damage-associated molecular patterns*) que são liberados no microambiente tumoral e orquestram de forma dinâmica a produção de mediadores inflamatórios (Patidar *et al.*, 2018; Mollen *et al.*, 2006). Esses receptores constituem uma família de proteínas transmembranares do tipo I composta por 10 diferentes tipos de TLR em humanos e 12 em murinos. Os TLRs podem ser expressos na porção extracelular da bicamada fosfolipídica ou na porção intracelular de diferentes tipos celulares (Kawai e Akira, 2010). Além disso, alguns dos principais domínios que constituem os TLRs são: um domínio extracelular rico em leucinas (LRRs), um transmembranar e um intracelular com alta semelhança com o receptor IL-1 humano, conhecido como TIR (domínios de resistência a Toll/IL-1) (Akira, 2003; Dunne e O'Neill, 2003; Kawai e Akira, 2010).

É importante salientar que as células tumorais podem apresentar características de células do sistema imune, tais como a expressão de receptores de DAMPs e PAMPs. Essas

características permitem que as células tumorais não só escapem, mas também regulem a resposta imune, garantindo sua sobrevivência e crescimento (Che *et al.*, 2017; Jecho *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2006). Neste contexto, podemos destacar o TLR4 que está presente em células tumorais, participando do processo inflamatório, crescimento tumoral e resistência a quimioterapia (Che *et al.*, 2017; Grauer *et al.*, 2008; Niranjana *et al.*, 2013). Por isso, a melhor compreensão acerca do papel da ativação de TLR4 no crescimento de tumores pode contribuir para o desenvolvimento de terapias antitumorais mais eficazes.

1.2.1 Via de sinalização de TLR4 e sua expressão em células tumorais

O TLR4 é conhecido principalmente por reconhecer estruturas microbianas conservadas, como o LPS, uma endotoxina presente na membrana externa de bactérias gram-negativas (Kigerl *et al.*, 2014). No entanto, o TLR4 reconhece diversos ligantes endógenos superexpressos em tumores, incluindo glioblastoma, tais como tenascina-C, proteínas de choque térmico e HMGB1 (do inglês, *high mobility group box 1*). Ainda, a superexpressão destas proteínas é considerada um marcador de mau prognóstico em pacientes (Gupta *et al.*, 2013; Thorsteinsdottir *et al.*, 2017; Xia *et al.*, 2016).

A ativação de TLR4 tem como consequência o recrutamento da proteína adaptadora MAL/MyD88, a qual se associa ao domínio intracelular do receptor através de uma interação hemofílica entre os domínios TIR presentes no TLR4 e na proteína adaptadora. Assim, induz a ativação do fator nuclear κ B (NF κ B) e membros da família de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK do inglês, *mitogen activated protein kinases*) que levam à transcrição de genes associados à resposta inflamatória, como TNF- α (do inglês, *tumor necrosis factor*), CCL2, IL-6 e IL-10 (Chen *et al.*, 2008; Fitzgerald *et al.*, 2003; Gais *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2005). Ainda, a ativação de TLR4 pode induzir uma via mais tardia, que é independente da proteína MAL/MyD88. Após reconhecimento de seu ligante, TLR4 é endocitado e entregue a vesículas intracelulares, formando um complexo com as proteínas adaptadoras TRAM/TRIF (Chen *et al.*, 2008; Visintin *et al.*, 2001; Zarembka *et al.*, 2002) que induz ativação e translocação de NF κ B para o núcleo, onde ocorre a transcrição de genes que codificam a expressão de interferon (IFN) do tipo 1 (**figura 1.3**) (Chen *et al.*, 2008; Fitzgerald *et al.*, 2003; Gais *et al.*, 2010). Além disso, a IL-6 induzida pela ativação de TLR4 pode se ligar no receptor IL-6R e levar à ativação do transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3 do inglês, *signal transducers and activators of transcription 3*) que, por sua vez, leva à

transcrição de genes associados à expressão de ciclooxigenase (COX)-2, VEGF e MMPs (Thompson *et al.*, 2015).

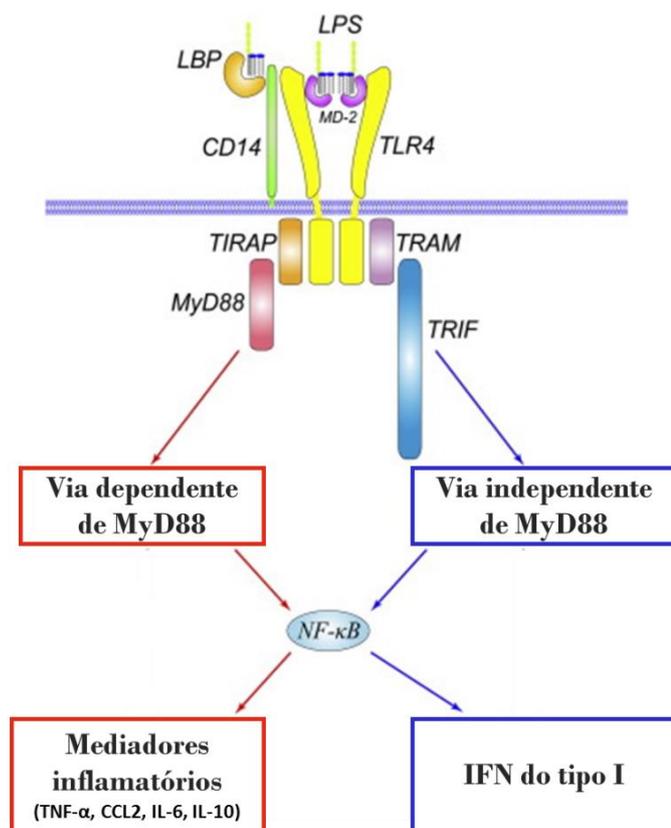


Figura 1.3. Via de sinalização de TLR4. Via de sinalização dependente de MyD88 (aguda) e independente de MyD88 (tardia) induzem a produção de mediadores inflamatórios e de interferon do tipo I, respectivamente. Adaptado de Yong-Chen Lu, Wen-Chen Yeh, 2008.

Sabe-se que a ativação do TLR4 por LPS em células tronco tumorais de pacientes com glioma está envolvida com mecanismos de escape, induzindo a proliferação e reduzindo a apoptose (Che *et al.*, 2017). O estímulo destas células com LPS também leva ao aumento de fatores induzidos pela ativação do TLR4, tais como IL-6, IL-10 e TNF- α (Han *et al.*, 2017). Além disso, os mediadores inflamatórios produzidos no microambiente tumoral contribuem para infiltração de células imunes, como macrófagos associados ao tumor (TAMs do inglês, *tumor-associated macrophages*) que inibem a resposta de linfócitos T citotóxicos (Chen *et al.*, 2008), favorecendo a evasão do sistema imune, invasão e metástase das células tumorais (Chen *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2015).

1.3 HSP90: inflamação e câncer

As proteínas de choque térmico (HSP do inglês, *heat shock proteins*) são chaperonas altamente conservadas presentes em células procariontes e eucariontes. Essas proteínas podem ser expressas de forma constitutiva ou induzida em resposta a diversos estresses, tais como variações bruscas de temperatura e hipóxia. As HSPs apresentam papel fundamental no enovelamento, estabilização e ativação de uma gama de proteínas chamadas de “proteínas clientes” (Schopf *et al.*, 2017). Desta forma, as HSPs exercem papéis cruciais na proteção celular contra danos e manutenção das funções vitais (Hartl *et al.*, 2011). Essas chaperonas são denominadas de acordo com o seu peso molecular e variam de 10kDa a mais de 100 kDa. Dentre elas, podemos destacar a HSP90, que é considerada a chaperona chave responsável pela homeostase de inúmeras proteínas clientes (Maloney e Workman, 2002; Richter e Buchner, 2001; Schopf *et al.*, 2017). Para desempenhar suas atividades, a HSP90 utiliza adenosina trifosfato (ATP) e forma um complexo multiproteico funcional com outras chaperonas e co-chaperonas, tais como HSP70 e HSP40 (Schopf *et al.*, 2017). Quanto à estrutura, a HSP90 é descrita como um homodímero de três diferentes domínios: um domínio N-terminal, onde ocorre a atividade de ATPase; um domínio médio, onde as proteínas clientes se ligam; e, por último, o domínio C-terminal responsável pela dimerização da proteína e onde as co-chaperonas se ligam (Biebl e Buchner, 2011; Pearl e Prodromou, 2000).

A HSP90 é superexpressa por uma grande variedade de células tumorais e tem sido associada ao mau prognóstico de pacientes (Ozgun e Tutar, 2014). Dentre as proteínas clientes desta chaperona, encontram-se oncoproteínas e vias de sinalização que são essenciais para o desenvolvimento tumoral (Weinstein, 2002). Sabe-se, ainda, que a HSP90 pode modular receptores associados a motilidade de células tumorais e consequente metástase (Calderwood *et al.*, 2016). Neste sentido, vale ressaltar que HSP90 modula múltiplas vias de sinalização envolvidas com os *hallmarks* do câncer, como proliferação, invasão, angiogênese e resistência a morte celular (**figura 1.4**) (Hanahan e Weinberg, 2011).

Aliado às funções exercidas pela HSP90 no microambiente tumoral supracitadas, podemos também destacar seu importante papel na resposta inflamatória. Em células do sistema imune, sabe-se que a sinalização de TLR4 induzida por LPS é modulada por HSP90, uma vez que a inibição seletiva de sua atividade modula negativamente a ativação de NFκB (Malhotra *et al.*, 2001), reduzindo a produção de mediadores pró-inflamatórios (Shiet *et al.*, 2009). Foi também proposto que HSP90 mantém a integridade estrutural de TLR4 durante reconhecimento do LPS, além de regular membros de MAP quinases que fazem parte da via

de sinalização deste receptor (Triantafidou *et al.*, 2001a; Triantafidou *et al.*, 2001b). Em células de glioblastoma, dados obtidos por Thuringer e colaboradores (2011) demonstraram que a HSP90 extracelular pode se ligar ao TLR4 e levar à fosforilação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR do inglês, *epidermal growth factor receptor*), cuja ativação favorece a migração das células tumorais. Ainda, vale ressaltar que esses são os únicos dados publicados que evidenciam o importante papel da HSP90 na ativação de TLR4 em glioblastoma.

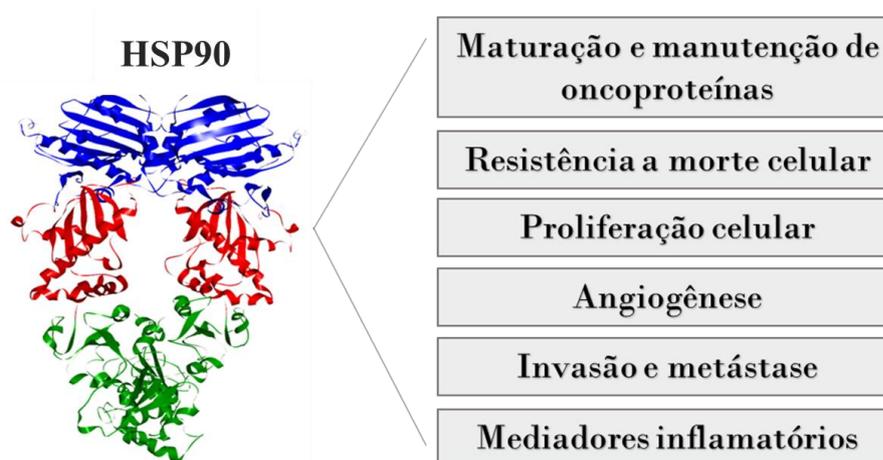


Figura 1.4. HSP90: inflamação e câncer. HSP90 exerce atividade chaperona sobre maturação e manutenção de oncoproteínas, além das múltiplas capacidades adquiridas pelo câncer.

1.3.1 Inibidores de HSP90

Existem diferentes inibidores da atividade de HSP90, de origem natural, sintética e semissintética disponíveis comercialmente e que apresentam mecanismos de ação distintos. Dentre eles, podemos destacar a 17-AAG, também denominada tanespimicina, que inibe seletivamente a HSP90 por se ligar ao domínio N-terminal dessa chaperona, induzindo o fenômeno denominado de resposta de choque térmico (HSR do inglês, *heat shock response*), o qual tem como principal característica a indução da expressão de HSPs, como HSP32 (HO-1) HSP40, HSP70 e HSP90. Este fenômeno inicia com a liberação do fator 1 de transcrição de choque térmico (HSF1 do inglês, *heat shock factor 1*), que geralmente se encontra ligado à HSP90. Posteriormente, ocorre a sua translocação para o núcleo na forma ativada que se liga a regiões promotoras de genes associados à expressão das HSPs (Wang e McAlpine, 2015).

Em ensaios pré-clínicos e clínicos os inibidores de HSP90, incluindo a 17-AAG, demonstraram potente atividade antitumoral contra diferentes tipos de tumores, incluindo melanoma, linfoma e leucemia. Até o momento, estão registrados no banco de dados do *National Institutes of Health* (NIH, EUA), 53 estudos clínicos utilizando 17-AAG e seus análogos como terapia adjuvante para o tratamento de diferentes tipos de tumores. Entretanto, vale ressaltar que não há ensaios clínicos que demonstrem atividade antitumoral dos inibidores de HSP90 contra glioblastoma. Ao inibir atividade da HSP90, a 17-AAG induz a degradação de proteínas envolvidas na proliferação celular, regulação do ciclo celular e apoptose de diferentes tumores, inclusive de glioblastoma, e que são vias de sinalização que estão geralmente desreguladas em células malignas (Hostein *et al.*, 2001; Newcomb *et al.*, 2007). Ainda, dados da literatura demonstraram que inibidores de HSP90 se ligam com mais afinidade aos complexos de HSP90 que estão presentes em células tumorais quando comparado com os complexos de HSP90 de células normais. Os mecanismos que determinam esta afinidade ainda não estão esclarecidos, entretanto, em células em condições de estresse (tais como transformação neoplásica), o complexo HSP90 assume uma conformação distinta, que parece aumentar esta afinidade (Kamal *et al.*, 2003; Rodina *et al.*, 2016). Tendo isso em vista, os inibidores de HSP90 podem ser utilizados como ferramentas para uma melhor compreensão acerca do papel dessa chaperona na progressão tumoral, assim como também são potenciais fármacos para o tratamento desta doença.

2. Objetivo geral

Estudar o efeito da ativação de TLR4 em células de glioblastoma murino GL261 e o impacto da inibição da atividade de HSP90 sobre o crescimento tumoral *in vitro*.

2.1Objetivos específicos

- Avaliar a expressão e a funcionalidade do receptor TLR4 em células GL261;
- Avaliar o efeito da inibição de HSP90 sobre a produção de fatores envolvidos na resposta inflamatória após ativação de TLR4;
- Investigar o efeito da inibição de HSP90 sobre a produção de fatores envolvidos na invasão tumoral após ativação de TLR4;
- Investigar o efeito da inibição de HSP90 sobre a proliferação de células GL261 após ativação de TLR4.

3. Metodologia

3.1 Cultura de células de glioblastoma murino GL261

Células de glioblastoma murino GL261, originadas de neoplasma cerebral de camundongos C57BL/6 (Seligman e Shear, 1939), foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ0299). As células foram cultivadas em garrafas de 75cm² (Corning, EUA) contendo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich, EUA) e 50µg/mL de gentamicina (Gibco/Life Technologies, EUA) mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Para que as células fossem soltas do fundo da garrafa de cultura, as mesmas foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS do inglês *Phosphate Buffered Saline*, Sigma-Aldrich, EUA) e, em seguida, foram incubadas com uma solução de tripsina 0,1%/EDTA 0,01% (Sigma-Aldrich, EUA) por 5 minutos a 37°C. Após este tempo, as células em suspensão foram coletadas e a ação proteolítica da tripsina foi inibida pela adição de DMEM contendo 10% de SFB. A suspensão celular foi centrifugada a 105×g, 20°C, por 10 minutos e o “pellet” de células obtido foi diluído em DMEM suplementado.

3.2 Tratamento e estímulo de células GL261

As células GL261 foram tratadas com 17-AAG (0,01-5µM; **figura 3.1**) em meio DMEM suplementado com 10% de SFB (Sigma-Aldrich, EUA) e 50µg/mL de gentamicina (Gibco/Life Technologies, EUA) e colocadas na estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 1 hora. Em seguida, as células foram estimuladas com LPS (1µg/mL; *Escherichia coli* O55:B5; Sigma-Aldrich, EUA) e mantidas na estufa por 1h, 24h ou 72h, dependendo do ensaio realizado.

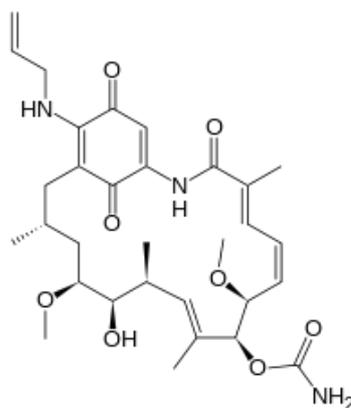


Figura 3.1. Estrutura química da 17-AAG

3.3 Ensaio de viabilidade celular

As células GL261 foram cultivadas (2×10^4 células/poço, em triplicata) em placa de 96 poços preta de fundo chato e transparente (Corning, EUA). O tratamento e estímulo foram realizados conforme descrito no item 3.2, durante 24h. Após 20h de incubação com LPS, foi adicionada uma solução de resazurina (0,1mg/mL; Sigma-Aldrich, EUA) aos poços, que permaneceram por mais 4h na estufa. Células incubadas com DMEM foram utilizadas como controle negativo e, como controle de morte celular, foram utilizadas células tratadas com *Tween-20* (3%). A leitura da fluorescência foi realizada no leitor *GloMax-multidetection system* (Promega, EUA) a $\lambda_{em}580nm$ e $\lambda_{exc}640nm$. Os dados foram apresentados na forma de porcentagem de células viáveis ao serem comparados com os valores obtidos na leitura das células mantidas em meio.

3.4 Extração de proteínas totais

As células GL261 foram cultivadas (1×10^6 células/poço) em placa de 6 poços (Corning, EUA). O tratamento e estímulo foram realizados conforme descrito no item 3.2, durante 24h. Após este período, a placa foi colocada sobre o gelo e os poços foram lavados três vezes com meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI, Gibco, EUA) sem vermelho de fenol e gelado (2mL/poço). Após a última lavagem, o tampão de lise celular *Radio Immuno Precipitation Assay Buffer* (RIPA; Tris 50mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, SDS 0,1%, desoxicólado de sódio 0,5%, PMSF 1mM), juntamente com o coquetel de inibidores de proteases que foi utilizado conforme as recomendações do fabricante (código p2714; Sigma-Aldrich, EUA), foi aplicado sobre toda monocamada de células. A placa permaneceu por 15 minutos sobre o gelo e os poços foram raspados com auxílio de um *cell scraper* para possibilitar o descolamento e lise das células. Em seguida, os lisados celulares foram recolhidos em microtubos individuais e agitados por 5 minutos no sonicador. Após isso, as amostras foram centrifugadas a $18620 \times g$, $4^\circ C$, por 10 minutos para eliminação dos debris celulares. Os sobrenadantes contendo as proteínas solúveis foram coletados e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) em espectrofotômetro (M5 Molecular Devices) a 750nm. As amostras foram guardadas no freezer a $-70^\circ C$.

3.5 Extração de proteínas nucleares

As células GL261 foram cultivadas (1×10^6 células/poço) em placa de 6 poços (Corning, EUA). O tratamento e estímulo foram realizados conforme descrito no item 3.2, durante 1h. Após este período, as placas foram colocadas sobre o gelo e os poços foram lavados três vezes com RPMI (Gibco, EUA) gelado (2mL/poço). Após a última lavagem, o tampão de lise da membrana celular (HEPES 10mM, NaCl 50mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1mM, Triton X-100 0,5%, DTT 1mM, PMSF 1mM; pH 7,9), juntamente com o coquetel de inibidores de proteases que foi utilizado conforme as recomendações do fabricante (código p2714; Sigma-Aldrich, EUA), foi aplicado sobre toda monocamada de células e os poços foram raspados com auxílio de um *cell scraper*. Em seguida, os lisados celulares foram recolhidos em microtubos individuais. Utilizou-se 2 μ l de cada amostra diluídos em 8 μ l de azul de tripan para coloração e conferência da integridade dos núcleos em câmara de Neubauer. As amostras foram centrifugadas a 380 \times g, 4°C, por 10 minutos. O “pellet” contendo o núcleo das células foram ressuspensas em 30 μ l de tampão de lise nuclear (HEPES 10mM, NaCl 50mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1mM, NP-40 0,1%, DTT 1mM, PMSF 1mM; pH 7,9), juntamente com os inibidores de proteases que foi utilizado conforme as recomendações do fabricante. Os microtubos foram agitados para lise dos núcleos e liberação da cromatina. Os microtubos foram mantidos a 4°C por 30 minutos e, em seguida, submetidos a agitação no sonicador por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 18620g, 4°C, por 10 minutos para eliminação dos debris celulares. Os sobrenadantes contendo as proteínas nucleares solúveis foram coletados e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) em espectrofotômetro (M5 Molecular Devices) a 750nm. As amostras foram guardadas no freezer a -70°C.

3.6 Detecção de proteínas por *western blot*

As amostras de proteínas totais e nucleares foram desnaturadas em tampão de amostra *Laemmli* (50 mM de Tris-HCL pH 6,8, SDS 1%, 2-mercaptoetanol 5%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,001%) a 95°C durante 5 minutos. As amostras de proteínas (30 μ g/poço) foram aplicadas no gel de eletroforese SDS-poliacrilamida 8% ou 10% (tampão do gel de separação [Tris 1,5M; SDS 0,4%, acrilamida 30%, bis-acrilamida 1,6%, água deionizada, APS 10%, TEMED]) e tampão de corrida (Tris 125mM, Glicina 1,92M, SDS 1%) a 150V por

1h e 10 minutos. Após isso, as proteínas foram transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF), previamente incubadas com metanol puro e tampão de transferência (Tris 48mM, glicina 39mM). A transferência foi realizada a 15V durante 1h em sistema semi-seco (Trans-Blot Semi Dry, Bio-Rad). Em seguida, as membranas foram bloqueadas com *Tris Buffered Saline-Tween* (TBST; *Tween-20* 0,1%) contendo 5% de leite desnatado durante 2h. Após bloqueio de marcações inespecíficas, as membranas foram incubadas com os anticorpos purificados específicos anti-TLR4 (1:2000; Santa Cruz *Biotechnology*), anti-GFAP (1:5000; Biolegend), anti-HSP70 (1:2000; Santa Cruz *Biotechnology*) ou anti-NFκB (1:2000; Santa Cruz *Biotechnology*). Para marcação de proteína constitutiva, membranas contendo proteínas totais foram incubadas com anti-β-actina (1:2000; *Cell Signaling*). Enquanto as amostras de proteínas nucleares foram incubadas com anti-HDAC1 (1:2000; *Biolegend*), pois HDAC1 é uma proteína expressa de forma constitutiva e específica do núcleo. As membranas incubadas com os anticorpos purificados permaneceram *overnight* na geladeira. Após isso, as membranas foram lavadas 5 vezes de 5 minutos com TBST e incubadas com anticorpos α-cabra, α-camundongo ou α-coelho conjugados a *horse radish peroxidase* (HRP; Santa Cruz *Biotechnology*), de acordo com o animal de origem dos anticorpos purificados, durante 1h em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas 3 vezes de 5 minutos com TBST e 2 vezes com TBS. A detecção das proteínas foi realizada através do sistema ECL (*Enhanced Chemiluminescence, Pico, Prime ou Ultra*) e as membranas expostas ao filme de autorradiografia (*Amersham Biosciences*). As bandas foram quantificadas por densitometria usando o *software Image J* (domínio público).

3.7 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

As células GL261 foram cultivadas (2×10^5 células/poço, em triplicata) em placa de 24 poços (Corning, EUA). O tratamento e estímulo foram realizados conforme descrito no item 3.2, durante 24h. Após este período, o sobrenadante das células foi recolhido e centrifugado a $18620 \times g$, 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para avaliar a concentração de IL-6, IL-10, VEGF e CCL2 produzidos pelas células conforme instruções do fabricante (R&D Systems, EUA). Desta forma, os anticorpos de captura α-IL-6, α-IL-10, α-VEGF e α-CCL2 (R&D Systems, EUA) diluídos em tampão de cobertura (NaH_2PO_4 0,1M; pH 9,0; 50μl/poço) foram adicionados à placa de polipropileno de fundo chato de 96 poços (Maxisorp, EUA), permanecendo a 4°C por 24h. Após a incubação, os poços foram lavados 2 vezes com uma solução de PBS-*Tween* 20 a 0,05%. Em seguida, para realização do bloqueio

de sítios inespecíficos, foram adicionados 200µL/poço de PBS contendo 1% albumina sérica bovina (BSA; Sigma-Aldrich, EUA) por 2h em temperatura ambiente. Posteriormente, a placa foi lavada 4 vezes e incubada com as amostras de sobrenadante (100µL) e com a curva padrão (100µL) a 4°C por 24h. A placa foi lavada 4 vezes e incubada com anticorpos biotinizados α -IL-6, α -IL-10, α -VEGF e α -CCL2(R&D Systems, EUA) diluídos em PBS contendo 1% de BSA (100µL/poço) por 1h em temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada 4 vezes e incubada com a enzima estreptoavidina conjugada a HRP (50µL/poço; Sigma-Aldrich) por 30 minutos em temperatura ambiente. Após isso, 100µL do substrato por poço foi adicionado (tampão perborato 12,15mg/mL e OPD 0,5mg/mL) até a revelação. A reação foi paralisada com 100µL de H₂SO₄ 2M e a leitura realizada em espectrofotômetro (M5 Molecular Devices) a 490nm.

3.8 Enzyme immunoassay assay (EIA)

As células GL261 foram cultivadas (2×10^5 células/poço, em triplicata) em placa de 24 poços (Corning, EUA). O tratamento e estímulo foram realizados conforme descrito no item 3.2, durante 24h. Após esse período, o sobrenadante das células foi recolhido, centrifugado a $18620 \times g$, 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para avaliação de PGE₂ por ensaio imunoenzimático (EIA), de acordo com o protocolo do fabricante (Cayman Chemical, EUA). A absorbância foi determinada a 420nm em espectrofotômetro em leitor multimodal M5 (Molecular Devices, EUA).

3.9 Avaliação da atividade de MMP-2

As células GL261 cultivadas (2×10^5 /poço) em placa de 24 poços foram tratadas com 17-AAG (1µM) em meio DMEM puro e colocadas na estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 1 hora. Em seguida, as células foram estimuladas com LPS (1µg/mL; *Escherichia coli* O55:B5; Sigma-Aldrich, EUA) e mantidas na estufa por 6h. Após esse período, os sobrenadantes das células foram recolhidos e centrifugados a $18620 \times g$, 4°C, por 10 minutos. Em seguida, os sobrenadantes foram liofilizados (Christ Beta 16, Alemanha) por 48h e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) em espectrofotômetro (M5 Molecular Devices) a 750nm. Após isso, a avaliação da atividade da MMP-2 foi realizada por zimografia. Dessa forma, foi adicionado aos sobrenadantes contendo 40µg de proteínas, tampão de amostra *Laemmli* (50 mM de Tris-HCL pH 6,8, SDS 1%, glicerol 10% e

azul de bromofenol 0,001%) e as amostras foram aplicadas em géis de eletroforese SDS-poliacrilamida 7,5% (tampão do gel de separação (Tris 1,5M; SDS 0,4%, acrilamida 30%, bis-acrilamida 1,6%, gelatina porcina 0,4%, água deionizada, APS 10% e TEMED) em tampão de corrida (Tris 125mM, glicina 1,92M, SDS 1%) a 150V por 1h e 10 minutos. Após a corrida, os géis foram lavados 2 vezes de 30 minutos com tampão de lavagem (Tris-HCl 50mM pH 7,5, Triton X-100 2,5%, CaCl₂ 5mM, ZnCl₂ 1μM) para remoção do SDS. Em seguida, foram incubados por 10 minutos com tampão de incubação (Tris-HCl 50mM pH 7,5, Triton X-100 1%, CaCl₂ 5mM, ZnCl₂ 1μM) a 37°C sob agitação. O tampão foi então desprezado e os géis foram incubados *overnight* com tampão de incubação sob agitação a 37°C. No dia seguinte, o tampão de incubação foi desprezado e os géis foram incubados em uma solução corante (metanol puro 40%, ácido acético glacial 10%, *coomassie blue* 5mg/mL) por 30 minutos sob agitação. Após isso, os géis foram descorados em uma solução de metanol puro 40% e ácido acético glacial 10% até que as bandas de degradação ficassem visíveis.

3.10 Marcação para citometria de fluxo

As células GL261 foram cultivadas (2×10^5 células/poço, em triplicata) em placa de 24 poços (Corning, EUA). O tratamento e estímulo foram realizados conforme descrito no item 3.2, durante 24h. Após este período, as células foram tripsinizadas conforme descrito no item 3.1. A suspensão celular foi centrifugada a $105 \times g$, 20°C por 10 minutos e o “pellet” celular foi lavado com PBS (100μL; $105 \times g$; 10 minutos). As células foram fixadas com paraformaldeído 4% (100μL) a 4°C por 20 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS (100μL; $105 \times g$; 10 minutos) e incubadas com tampão para permeabilização (PBS, azida sódica 0,1%, saponina 0,1%, SFB 10%) a 4°C por 30 minutos. Após isso, as células foram lavadas com PBS (100μL; $105 \times g$; 10 minutos) e incubadas com solução de bloqueio de marcações inespecíficas (PBS, azida sódica 0,1%, SFB 10%) a 4°C por 30 minutos. As células foram lavadas com PBS (100μL; $105 \times g$; 10 minutos) e incubadas com solução de bloqueio (50μL) contendo anticorpos purificados anti-COX-2 (cabra, 1:100; Santa Cruz *Biotechnology*) e anti-HSP70 (cabra, 1:100; Santa Cruz *Biotechnology*) a 4°C por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS (100μL; $105 \times g$; 10 minutos) e incubadas com solução de bloqueio contendo anticorpos secundários anti-cabra IgG conjugado a FITC (1:100; Santa Cruz *Biotechnology*) a 4°C por 30 minutos. Após este período, as células foram lavadas com PBS (100μL; $105 \times g$; 10 minutos), diluídas em PBS e transferidas para tubos próprios para citômetro (poliestireno transparente, fundo redondo, 12x75mm, 5mL). As amostras foram

adquiridas no citômetro de fluxo (FACScalibur; Becton & Dickinson). As análises foram realizadas em gate físico (FSCxSSC) determinado manualmente de acordo com o tamanho e granulosidade, utilizando o software FlowJo® (versão 10) e os dados coletados expressos em uma escala log de intensidade de fluorescência, apresentados como histogramas.

3.11 Ensaio de proliferação celular

As células GL261 ($7,2 \times 10^6$ /mL) foram incubadas com CFSE (5 μ M, Invitrogen, EUA), diluído em PBS, a 37°C por 15 minutos. Após isso, foi adicionado PBS contendo 10% de SFB e as células foram centrifugadas a 105 \times g, 20°C, por 10 minutos. Em seguida, o “pellet” celular foi diluído em PBS e centrifugado a 105 \times g, 20°C, por 10 minutos. As células GL261 foram colocadas (2 $\times 10^5$ células/poço, em triplicata) em placa de 24 poços (Corning, EUA), permanecendo na estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24h para aderência nos poços. O tratamento e estímulo foram realizados conforme descrito no item 3.2, durante 72h. Após este período, as células foram tripsinizadas conforme descrito no item 3.1. A suspensão celular foi centrifugada a 105 \times g, 20°C por 10 minutos e o “pellet” celular foi lavado com PBS (100 μ L; 105 \times g; 10 minutos). Após isso, as células foram ressuspensas em PBS, transferidas para tubos próprios para citômetro (poliestireno transparente, fundo redondo, 12x75mm, 5mL) e adquiridas no citômetro de fluxo (FACScalibur; Becton & Dickinson). As análises foram realizadas conforme descrito no item 3.10.

3.12 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente através do teste de análise da variância (ANOVA), seguido pelo teste de *Newman-Keuls-Student*. Para a comparação entre dois grupos experimentais foi utilizado o teste “t” de *Student*. Valores de *p* inferiores (<) a 0,05 foram considerados significativos (*; #).

4. Resultados

4.1 Expressão de TLR4 em células GL261

A fim de investigar o papel da ativação de TLR4 em glioblastoma, inicialmente verificamos se a linhagem murina GL261 expressa este receptor. Os resultados obtidos, pela técnica de *western blot*, demonstraram que essas células expressam TLR4 constitutivamente (**figura 4.1**).

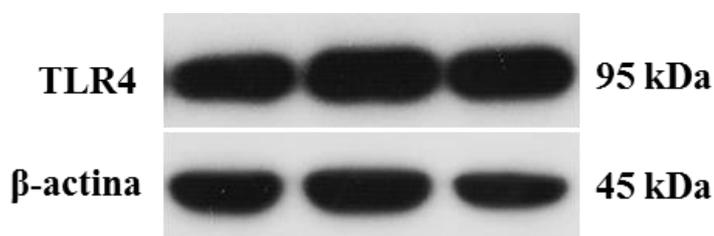


Figura 4.1. Expressão de TLR4 em células GL261 não estimuladas, detectada em extratos celulares por *western blot*. Membrana representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata.

4.2 Viabilidade de células GL261 estimuladas com LPS

A fim de utilizar o LPS como ferramenta para ativação de TLR4, realizamos inicialmente o método de resazurina para verificar a viabilidade das células após incubação com LPS. Este ensaio consiste na avaliação da atividade metabólica mitocondrial que reduz a resazurina não fluorescente em resorufina fluorescente (Brien *et al.*, 2000). Para tal, as células foram incubadas com LPS (1µg/mL) por 24, 48 e 72 horas. Os valores obtidos com a leitura de células incubadas com LPS foram comparados com células incubadas apenas com meio (consideradas 100% viáveis). Os resultados demonstram que a incubação com LPS não reduziu a viabilidade das células em todos os tempos testados (**figura 4.2**), garantindo a confiabilidade dos efeitos da ativação de TLR4 por LPS nos ensaios subsequentes.

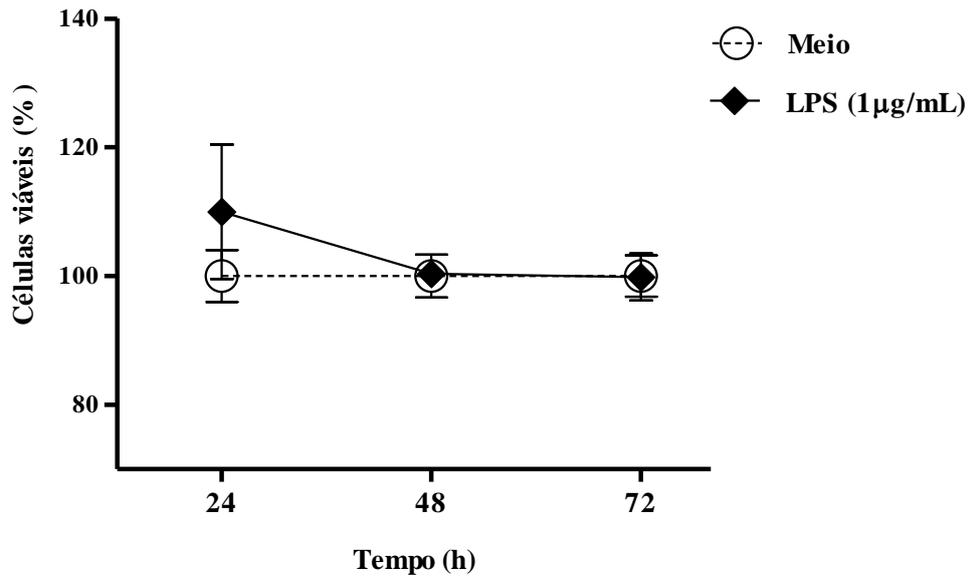


Figura 4.2. Viabilidade das células GL261 após incubação com LPS (1µg/mL) por 24h, 48h e 72h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução da resazurina. A leitura foi realizada em $\lambda_{em}580nm$ e $\lambda_{exc}640nm$ no leitor *Glomax-multi detection system* (Promega, EUA). Resultado de um experimento para cada tempo avaliado, realizado em triplicata por grupo e expresso como média de porcentagem \pm erro padrão da média (EPM).

4.3 Avaliação da funcionalidade de TLR4 em células GL261

Sabendo que as células GL261 expressam TLR4 e permanecem viáveis após estímulo com LPS, investigamos a funcionalidade deste receptor a partir da avaliação da expressão de GFAP e da produção de IL-6. GFAP é uma proteína de filamento intermediário expressa em glioblastoma, cuja expressão aumenta em células ativadas (Brenner, 2014; Niranjan *et al.*, 2013; Yi *et al.*, 2013). Ainda, a ativação de TLR4 induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, em células de glioma (Han *et al.*, 2017; Thompson *et al.*, 2015). Detectamos maior expressão de GFAP em células GL261 estimuladas com LPS quando comparadas a células não estimuladas, apesar de não ter sido um aumento estatisticamente significativo (**figura 4.3A e 4.3B**). Além disso, observamos que células estimuladas com LPS produzem altos níveis de IL-6 ao compararmos com células GL261 não estimuladas, cuja produção não foi detectada (**figura 4.3C**).

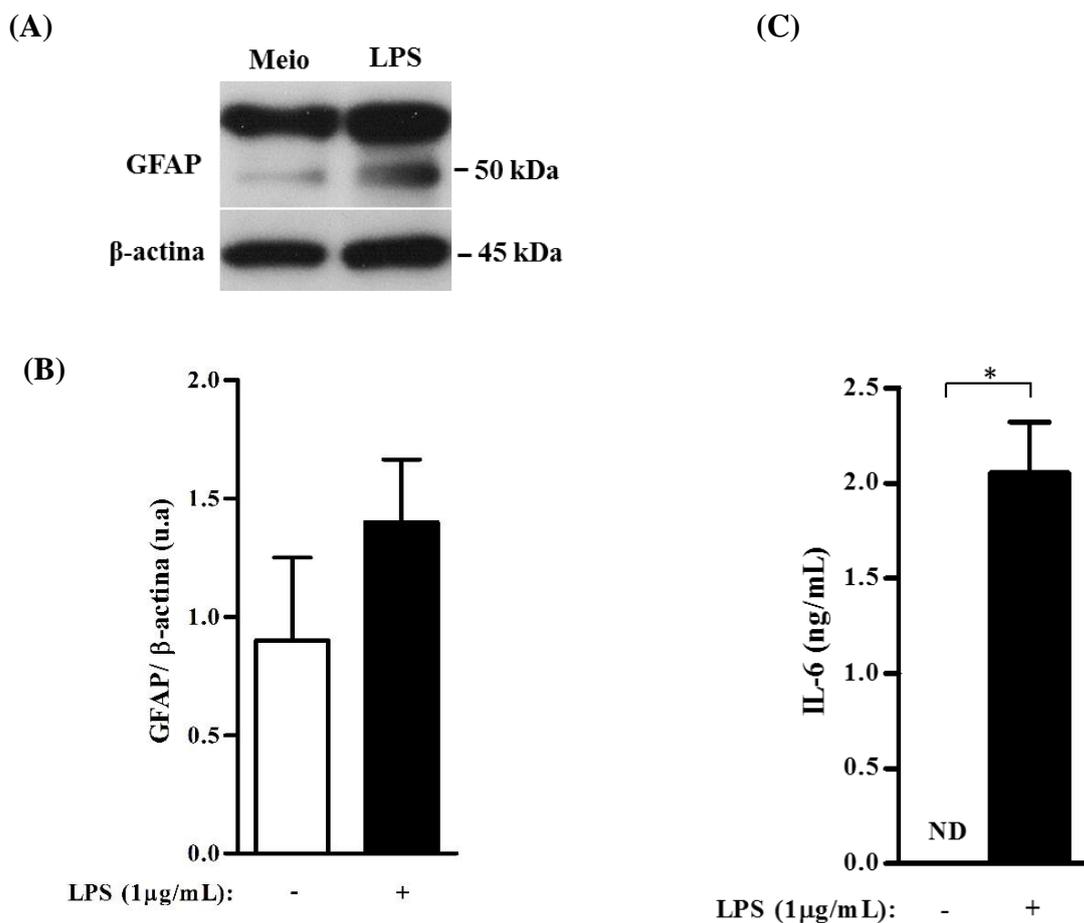


Figura 4.3. Avaliação da funcionalidade de TLR4 após incubação das células GL261 com LPS (1 μ g/mL) por 24h. (A) Detecção de GFAP realizada a partir de extratos celulares por *western blot*. Membrana representativa de três experimentos independentes analisados no programa ImageJ. (B) Quantificações densitométricas (unidades arbitrárias, u.a.). (C) Quantificação de IL-6 no sobrenadante das células realizada por ELISA. Resultados da média de três experimentos independentes expressos como média \pm EPM. Diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos está indicada no gráfico (*). ND: não detectado.

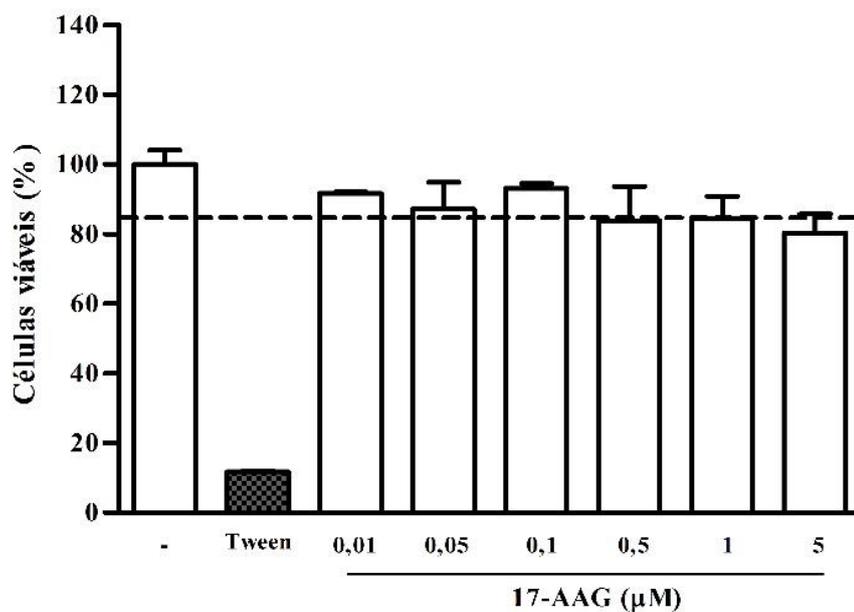
4.4 Efeito do inibidor de HSP90 sobre a viabilidade de células GL261

Dando continuidade, tivemos como objetivo investigar o papel de HSP90 na ativação de TLR4 em células de glioblastoma. Para isso, utilizamos um inibidor seletivo desta chaperona, 17-AAG, e avaliamos seu efeito sobre a viabilidade das células GL261, a fim de determinar a faixa de concentração não tóxica deste inibidor em 24h e 72h. Através do método de redução da resazurina, observamos que, mesmo após o tratamento com a maior concentração de 17-AAG (5 μ M), 80% das células estimuladas (ou não) com LPS permaneceram viáveis em 24h (**figura 4.4A e 4.4B**). Entretanto, em 72h, a 17-AAG induziu a morte de células estimuladas (ou não) com LPS, de forma concentração-dependente (**4.5A e 4.5B**). Considerando que a concentração de 1 μ M de 17-AAG já é utilizada na literatura

(Matei *et al.*, 2007) e que apresentou baixa toxicidade em 24h (viabilidade $\geq 84\%$), esta foi então escolhida como a concentração de uso para ensaios subsequentes.

24h

(A)



(B)

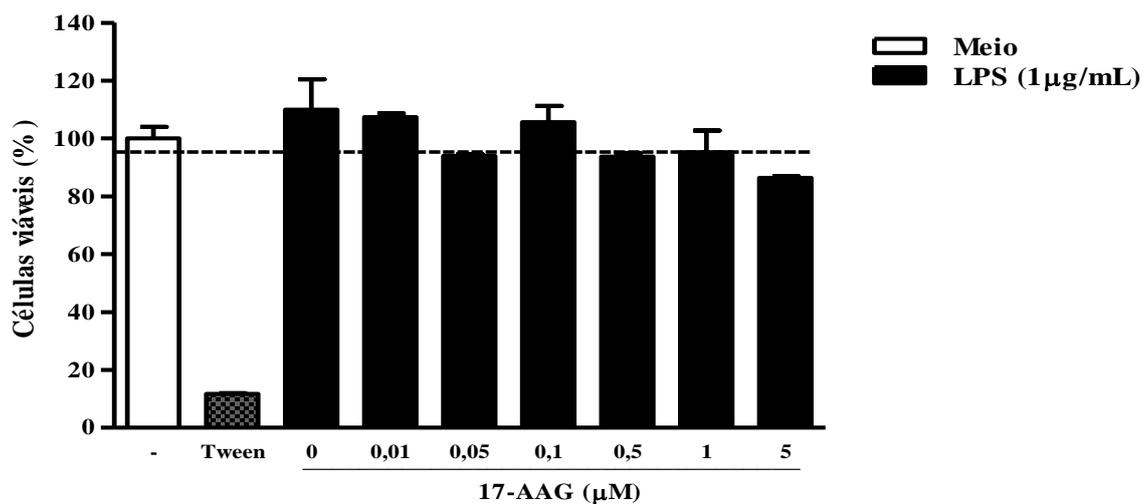
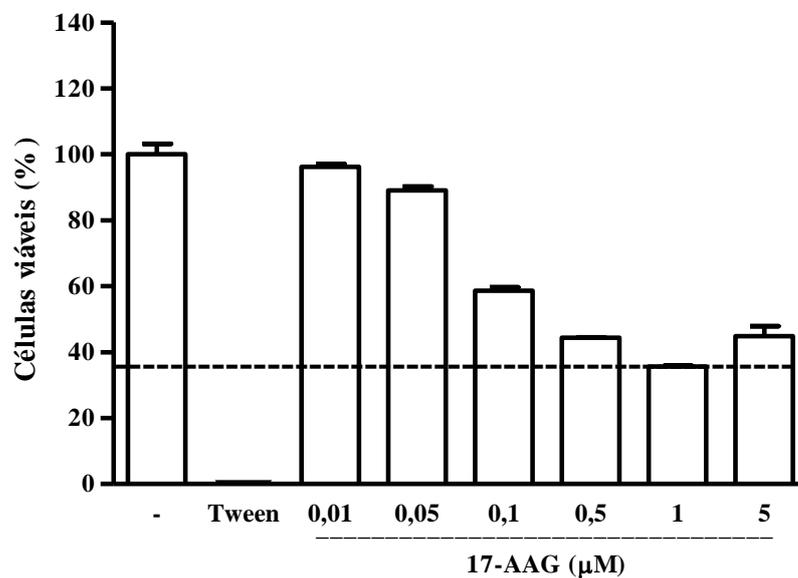


Figura 4.4. Viabilidade das células GL261 pré-tratadas com 17-AAG (0,01-5 μ M) e estimuladas (ou não) com LPS (1 μ g/mL) por 24h. Viabilidade avaliada pelo método de redução de resazurina. (A,B) Células GL261 incubadas com Tween-20 3% foram utilizadas como controle de morte celular. A leitura foi realizada em λ_{em} 580nm e λ_{ex} 640nm no leitor *Glomax-multi detection system* (Promega, EUA). Resultado de um experimento realizado em triplicata expresso como média de porcentagem \pm EPM.

72h

(A)



(B)

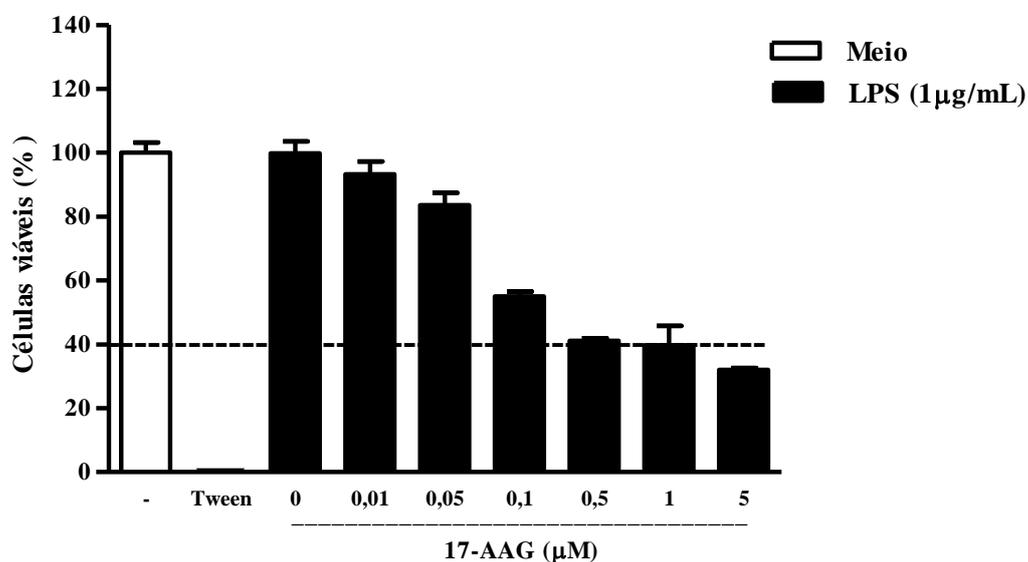


Figura 4.5. Viabilidade das células GL261 pré-tratadas com 17-AAG (0,01-5μM) e estimuladas (ou não) com LPS (1μg/mL) por 72h. Viabilidade avaliada pelo método de redução de resazurina. (A,B) Células GL261 incubadas com Tween-20 3% foram utilizadas como controle de morte celular. A leitura foi realizada em $\lambda_{em}580nm$ e $\lambda_{exc}640nm$ no leitor *Glomax-multi detection system* (Promega, EUA). Resultado de um experimento realizado em triplicata expresso como média de porcentagem \pm EPM.

4.5 Efeito do inibidor de HSP90 sobre expressão de TLR4

Tendo em vista que a HSP90 exerce atividade chaperona sobre proteínas que fazem parte da via de sinalização de TLR4 (Byrd *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 2007; Malhotra *et al.*, 2001), investigamos se a 17-AAG poderia modular a expressão de TLR4 em células de glioblastoma. Os resultados obtidos pela da técnica de *western blot* demonstraram que a 17-AAG não modulou a expressão de TLR4 em células GL261 estimuladas (ou não) com LPS (figura 4.6A e 4.6B).

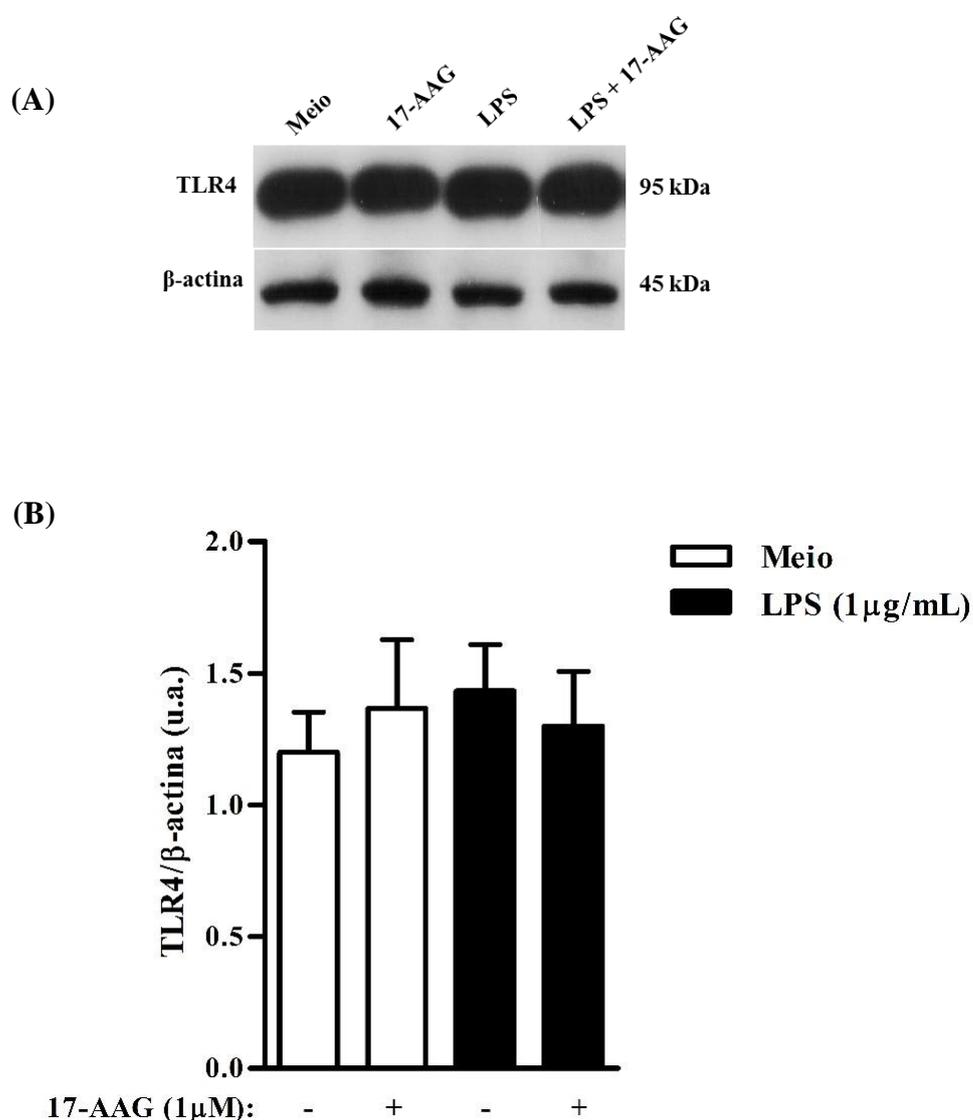


Figura 4.6. Expressão de TLR4 em células GL261 pré-tratadas com 17-AAG (1 μM) e estimuladas com LPS (1 μg/mL) por 24 horas. A expressão de TLR4 foi detectada a partir de extratos celulares por *western blot*. (A) Membrana representativa de três experimentos independentes analisados no programa ImageJ. (B) Quantificações densitométricas (unidades arbitrárias, u.a.) expressas como média ± EPM.

4.6 Fatores envolvidos na resposta inflamatória

Sabendo que a ativação de TLR4 leva à produção da citocina pró-inflamatória IL-6 pelas células GL261 (**figura 4.3C**) e que esta citocina favorece a progressão tumoral ao contribuir para o escape da resposta imune, proliferação e invasão de células malignas (Thompson *et al.*, 2015), avaliamos o efeito da 17-AAG (0,01-5 μ M) sobre a produção de IL-6 em resposta ao LPS. De fato, a 17-AAG diminuiu a produção de IL-6 por células estimuladas com LPS de forma concentração-dependente (78% de inibição em 1 μ M de 17-AAG) (**figura 4.7**). A produção de IL-6 por células tratadas com 17-AAG e não estimuladas com LPS não foi detectada (dados não mostrados).

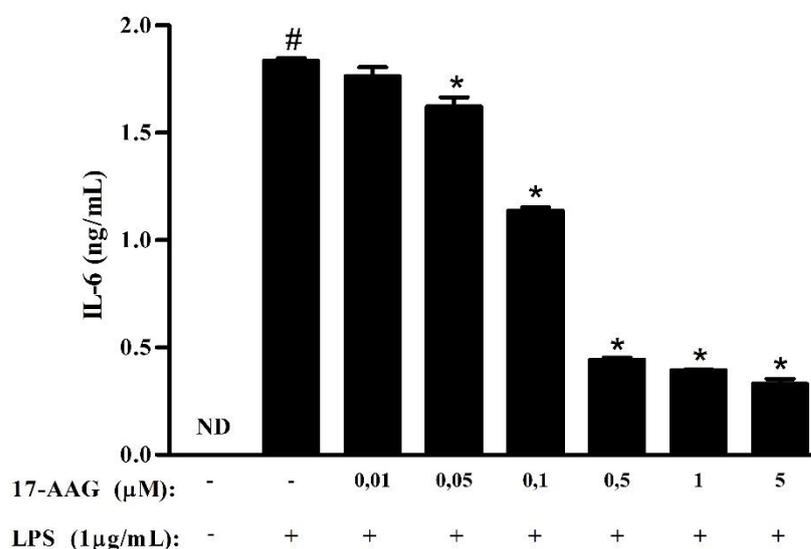


Figura 4.7. Produção de IL-6 por células GL261 pré-tratadas com 17-AAG (0,01-5 μ M) e estimuladas com LPS (1 μ g/mL) por 24h. A quantificação de IL-6 no sobrenadante das células foi realizada por ELISA. Resultado de um experimento realizado em triplicata e expresso como média \pm EPM. Diferença estatística ($P < 0,05$) entre o grupo estimulado e não estimulado com LPS está indicada por (#), e (*) indica diferença estatística entre o grupo estimulado e os grupos pré-tratados com 17-AAG e estimulados. ND: não detectado.

Sabe-se que a ativação de TLR4 também pode induzir a produção dos mediadores inflamatórios CCL2 e IL-10 (Akira, 2003; Han *et al.*, 2017; Thompson *et al.*, 2015). Inclusive, já foi demonstrado que o microambiente tumoral de glioblastoma apresenta altos níveis de CCL2 que estão associados ao fenótipo agressivo do tumor (Platten *et al.*, 2003). Tendo isso em vista, avaliamos a produção desses mediadores por células GL261 estimuladas com LPS e investigamos o efeito da 17-AAG sobre esta produção. Verificamos maior produção de CCL2 em células estimuladas com LPS. Além disso, a 17-AAG modulou

negativamente a produção basal de CCL2 pelas células, mas não alterou a resposta ao LPS (**figura 4.8A**). Nossos resultados mostraram que a produção de IL-10 tende a aumentar em células estimuladas com LPS e o tratamento com 17-AAG parece diminuir esse efeito, não sendo, entretanto, diferentes estatisticamente (**figura 4.8B**).

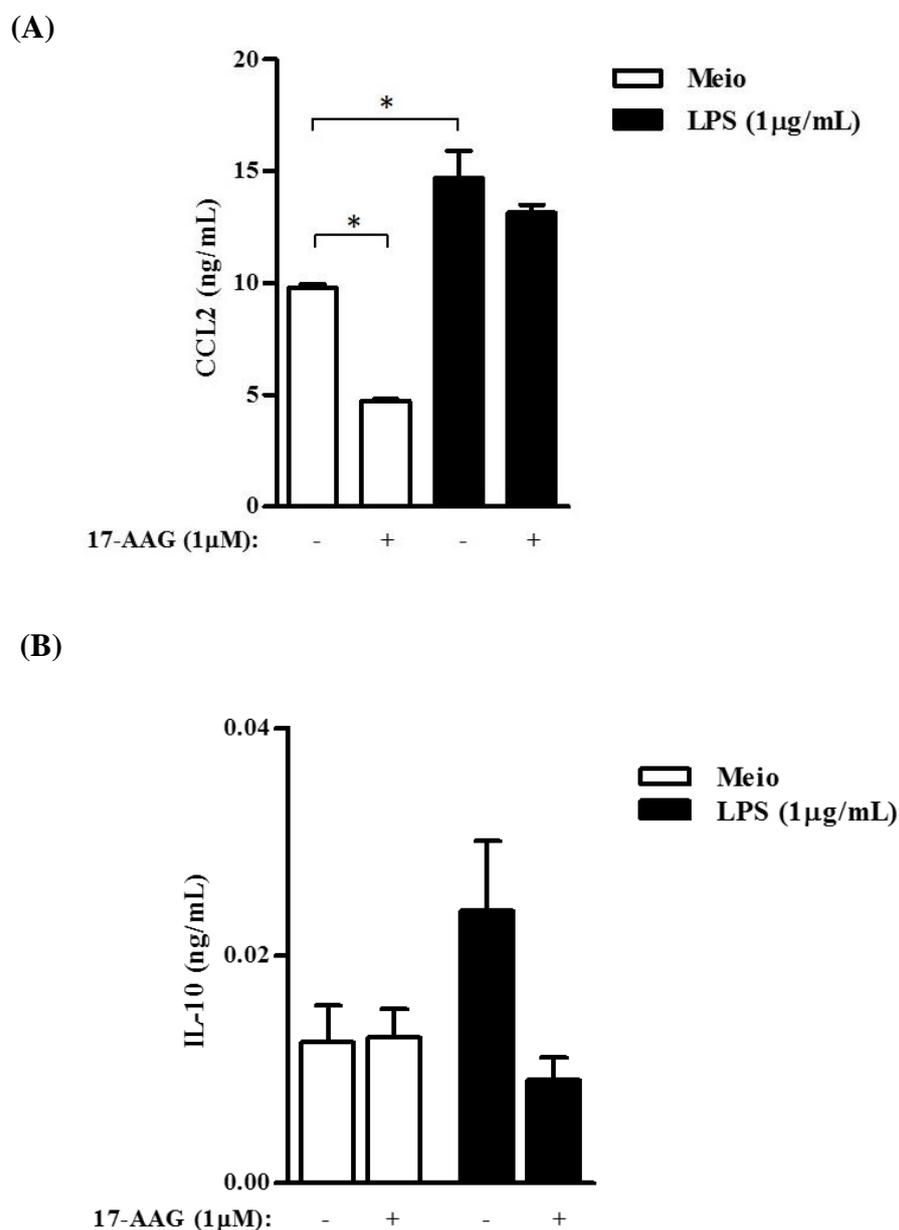


Figura 4.8. Produção de CCL2 e IL-10 por células GL261 pré-tratadas com 17-AAG (1µM) e estimuladas com LPS (1µg/mL) por 24h. CCL2 e IL-10 foram quantificadas no sobrenadante das células por ELISA. (A) Gráfico representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. (B) Gráfico de três experimentos independentes realizados em triplicata. (A,B) Resultados expressos como média ± EPM. Diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos estão indicadas no gráfico (*).

Posteriormente, nos questionamos se a ativação de TLR4 poderia induzir a produção de PGE₂ pelas células GL261, considerando que este mediador é produzido no microambiente de diversos tipos de tumores, incluindo glioblastoma, podendo favorecer o crescimento de células malignas (Bagloli *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2017). Observamos que o estímulo com LPS não levou ao aumento da produção de PGE₂ e que a 17-AAG também não modulou a produção deste mediador por células estimuladas (ou não) com LPS (**figura 4.9**). Em seguida, para confirmação dos resultados, avaliamos a expressão de COX-2, enzima responsável pela produção de PGE₂ (Mohammadi *et al.*, 2016). Verificamos que o LPS não induziu maior expressão de COX-2 e a 17-AAG aumentou essa expressão em células não estimuladas (**figura 4.10A e 4.10B**).

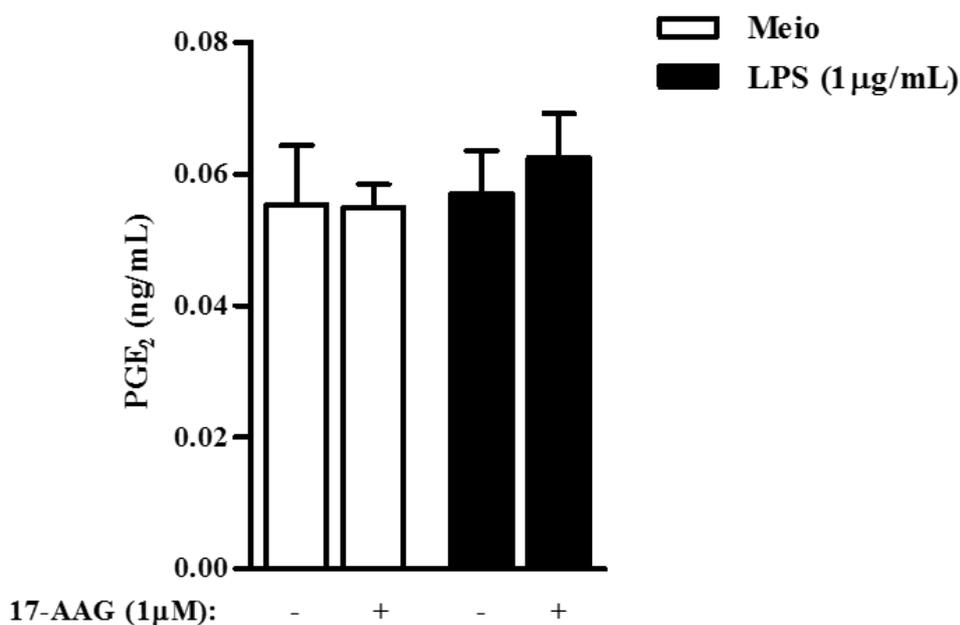
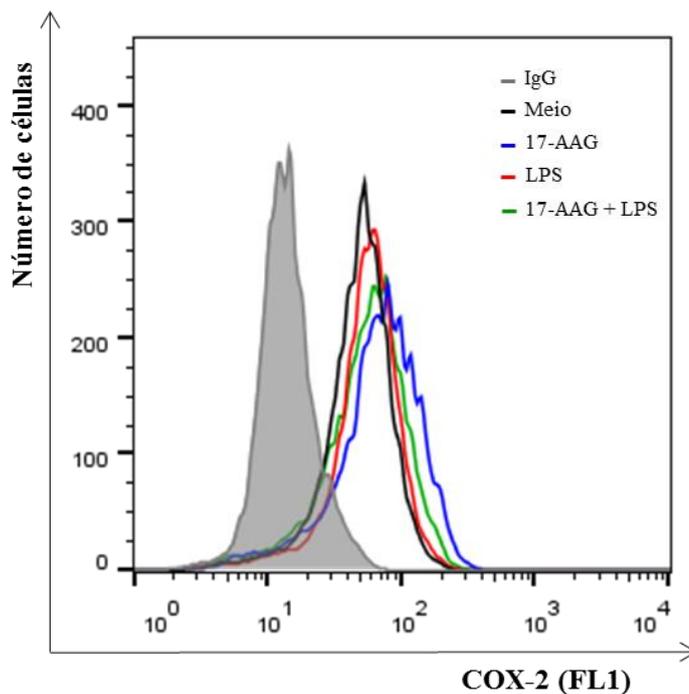


Figura 4.9. Produção de PGE₂ por células GL261 pré-tratadas com 17-AAG (1 μM) e estimuladas com LPS (1 μg/mL) por 24h. Quantificação de PGE₂ no sobrenadante das células realizada por EIA. Resultado de três experimentos independentes realizados em triplicata e expresso como média ± EPM.

(A)



(B)

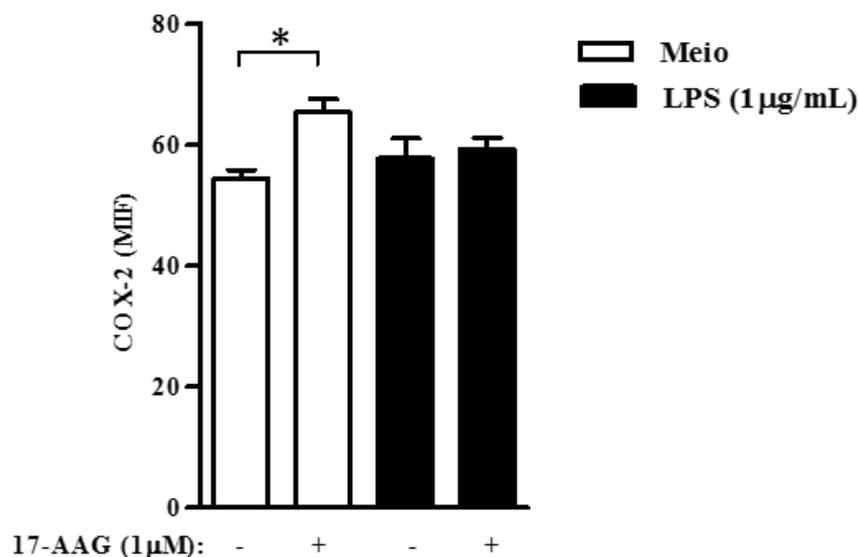


Figura 4.10. Expressão de COX-2 em células GL261 pré-tratadas com 17-AAG (1µM) e estimuladas com LPS (1µg/mL) por 24h. (A) Histograma representativo da expressão intracelular de COX-2 em células GL261. (B) Resultado de dois experimentos independentes realizados em triplicata e expresso como M.I.F. (mediana de intensidade de fluorescência) ± EPM. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) e as análises realizadas no programa FlowJo 10®. Diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos está indicada no gráfico (*).

Após o reconhecimento do LPS, a ativação de TLR4 leva à translocação nuclear de NFκB e à consequente transcrição de genes associados à expressão de IL-6, IL-10, CCL2,

VEGF, entre outros (Akira, 2003; Thompson et al, 2015). Por isso, avaliamos a translocação de NFκB, pela sua detecção no núcleo de células estimuladas com LPS, e investigamos o efeito da 17-AAG sobre tal expressão. Dados obtidos pela da técnica de *western blot* demonstram que células estimuladas com LPS apresentam maior expressão de NFκB nuclear quando comparadas com células não estimuladas. Ainda, a 17-AAG inibiu a translocação de NFκB em células não estimuladas o que não foi detectado em células estimuladas com LPS (figura 4.11A e 4.11B).

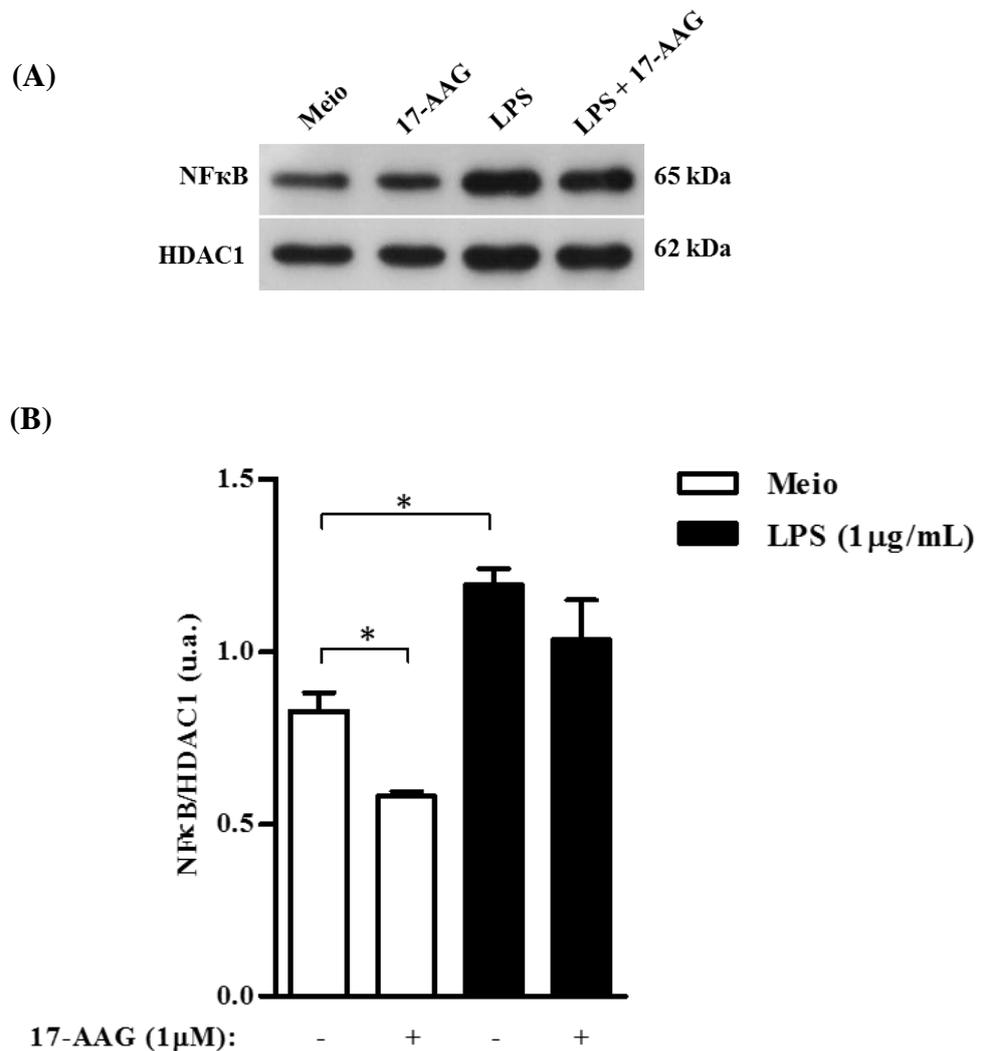


Figura 4.11. Expressão de NFκB nuclear em células GL261 pré-tratadas com 17-AAG (1 μM) e estimuladas com LPS (1 μg/mL) por 24h. A expressão de NFκB foi detectada por *western blot*. (A) Membrana representativa de três experimentos independentes analisados no programa ImageJ. (B) Quantificações densitométricas (unidades arbitrárias, u.a.) expressas como média ± EPM. Diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos estão indicadas no gráfico (*).

Considerando que a resposta inflamatória favorece o desenvolvimento tumoral, os inibidores de HSP90 são fortes candidatos para o tratamento de diferentes tipos de tumores pois, além de seus efeitos citotóxicos, apresentam efeitos anti-inflamatórios, uma vez que induzem a expressão de proteínas anti-inflamatórias, como HSP70 (Dokladnyet *al.*, 2010; Wang & McAlpine, 2015). Por isso, avaliamos o efeito da 17-AAG sobre expressão de HSP70 em células GL261 estimuladas com LPS. Dados obtidos através da técnica de *western blot* demonstraram que células tratadas com 17-AAG expressam mais HSP70 do que células não tratadas (estimuladas ou não com LPS). Entretanto, a maior expressão de HSP70 em células tratadas com 17-AAG e estimuladas com LPS não foi estatisticamente significativa (**figura 4.12A e 4.12B**). Ainda, pela técnica de citometria de fluxo, observamos que células tratadas com 17-AAG expressam mais HSP70 do que células não tratadas (estimuladas ou não com LPS) (**figura 4.13A e 4.13B**).

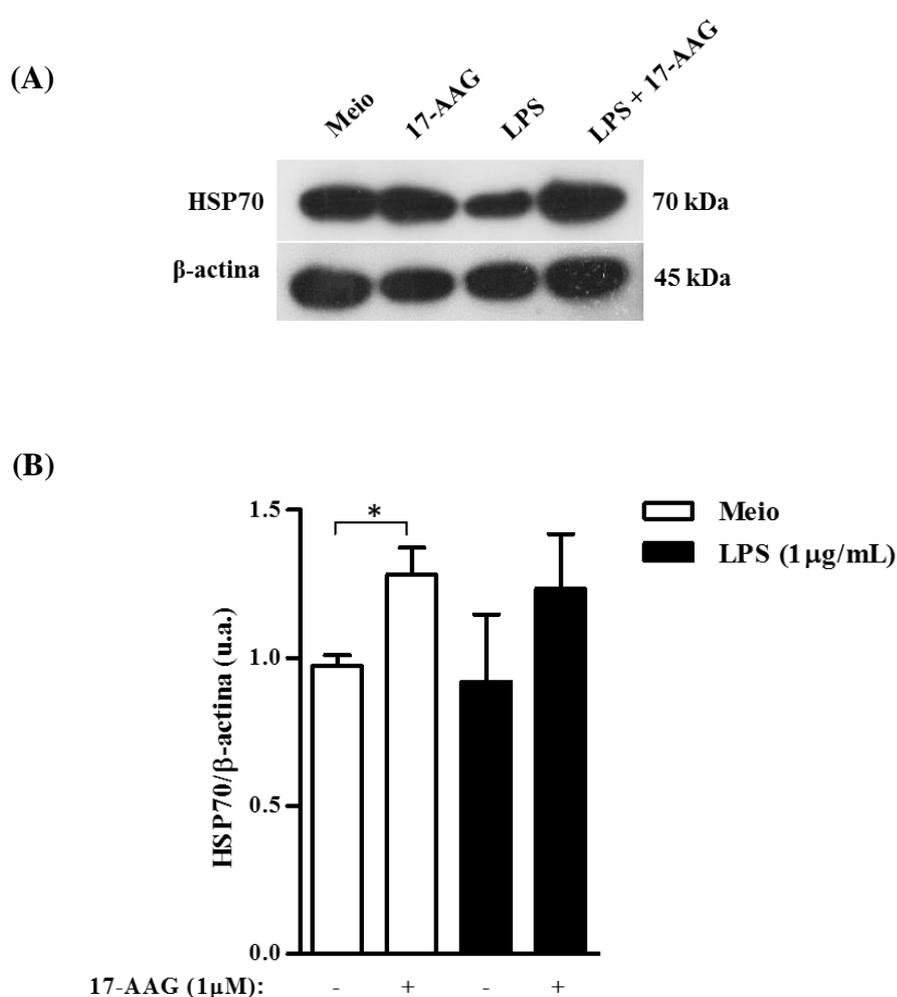
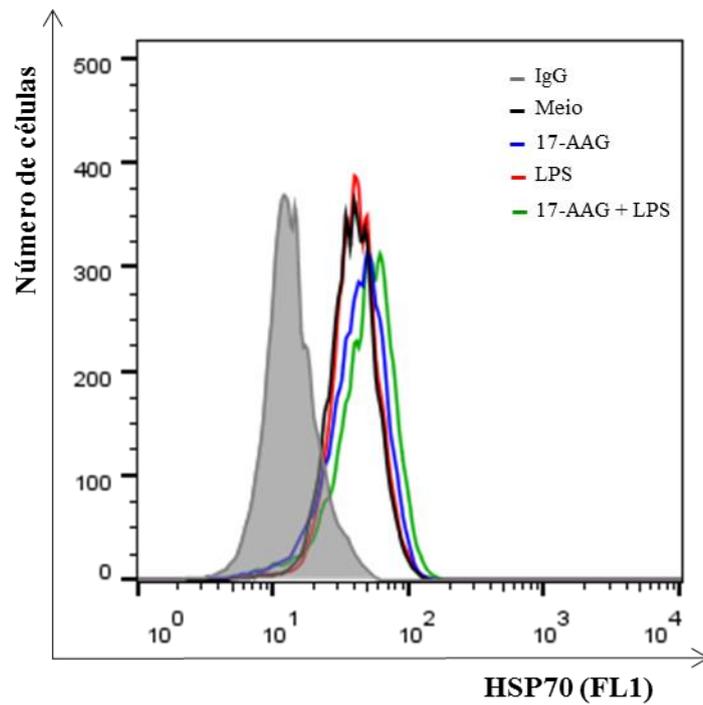


Figura 4.12. Expressão de HSP70 em células GL261 pré-tratadas com 17-AAG (1µM) e estimuladas com LPS (1µg/mL) por 24h. Detecção de HSP70 por *western blot*.(A) Membrana representativa de três experimentos independentes analisados no programa ImageJ. (B) Quantificações densitométricas (unidades arbitrárias, u.a.) expressas como média \pm EPM. Diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos estão indicadas nos gráficos (*).

(A)



(B)

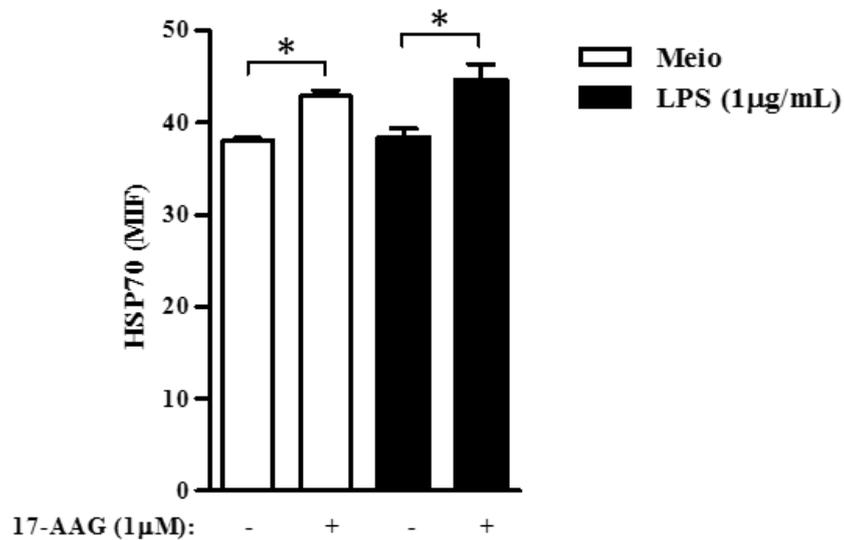


Figura 4.13. Expressão de HSP70 em células GL261 pré-tratadas com 17-AAG (1µM) e estimuladas com LPS (1µg/mL) por 24h. (A) Histograma representativo da expressão de HSP70 em células GL261. (B) Resultado de dois experimentos independentes realizados em triplicata e expresso como MIF (mediana de intensidade de fluorescência) ± EPM. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) e as análises realizadas no programa FlowJo 10®. Diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos estão indicadas nos gráficos (*).

Sabendo que a ativação de TLR4 induz maior expressão de GFAP em células GL261, investigamos se a HSP90 exerce sua atividade sobre a expressão desta proteína. Observamos que a 17-AAG não modulou a expressão de GFAP em células não estimuladas (**figuras 4.14A e 4.14B**), mas parece inibir a expressão de GFAP induzida por LPS (**figura 4.14C e 4.14D**). Entretanto, foi realizado apenas um experimento e, por isso, este resultado deve ser futuramente confirmado.

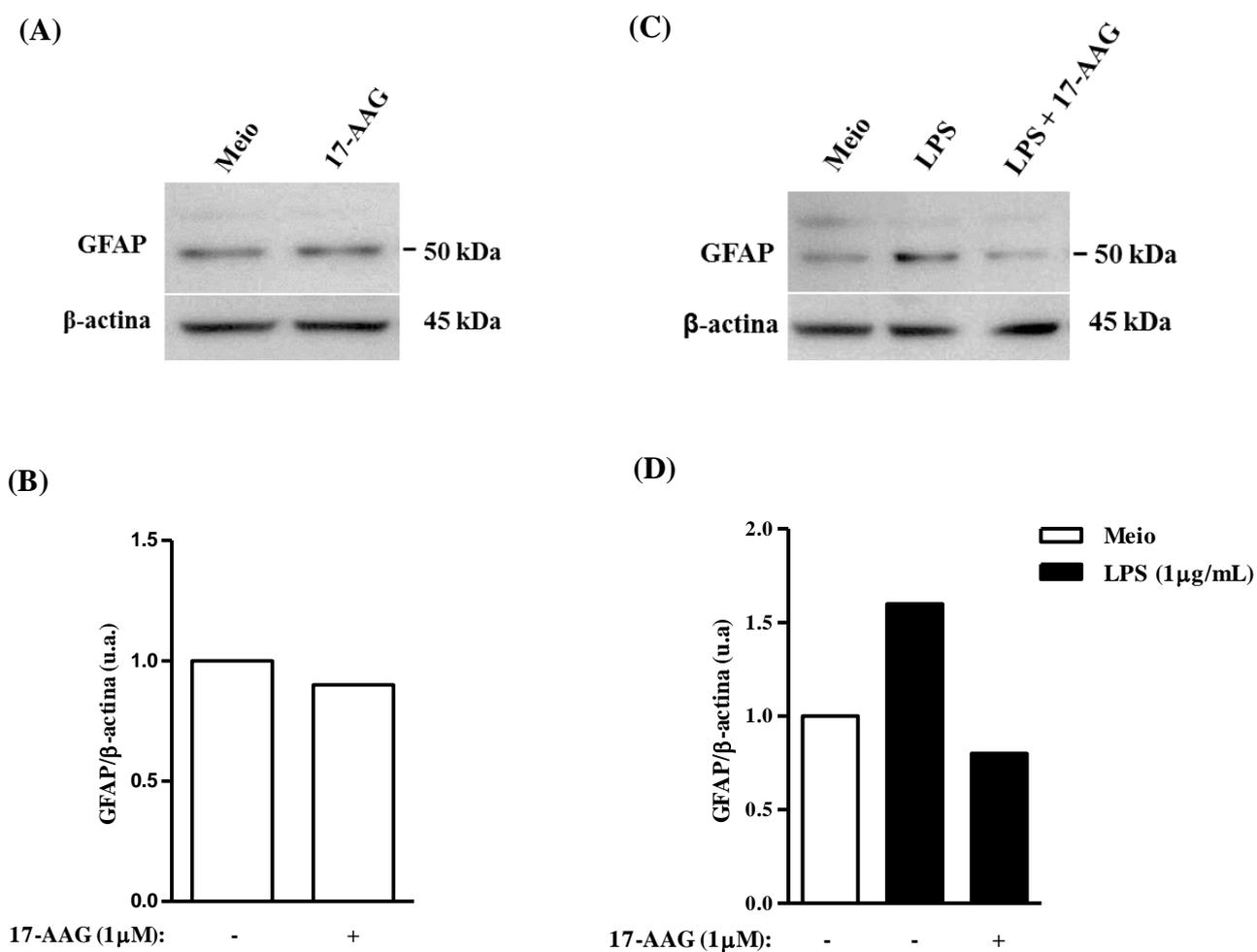


Figura 4.14. Expressão de GFAP em células pré-tratadas com 17-AAG e estimuladas com LPS por 24h. Detecção de GFAP realizada a partir de extratos celulares por *western blot*. (A,C) Membranas de um experimento analisado no programa ImageJ. (B,D) Quantificações densitométricas (unidades arbitrárias, u.a.).

4.7 Fatores envolvidos na invasão tumoral

As células tumorais produzem VEGF e MMP-2, fatores envolvidos com angiogênese e degradação de matriz extracelular, respectivamente (Thompson *et al.*, 2015). Juntos, esses fatores facilitam a invasão tumoral para tecidos saudáveis circundantes, característica marcante do glioblastoma (Iacob & Dinca, 2009; Plate *et al.*, 1994; Shweiki *et al.*, 1992). Neste trabalho, investigamos a produção de VEGF e atividade de MMP-2 produzidos pelas células GL261 após estímulo com LPS. Os resultados obtidos demonstraram que as células incubadas com LPS produziram maiores níveis de VEGF quando comparadas as células não estimuladas e o tratamento com 17-AAG reduziu a produção deste fator por células estimuladas (ou não) com LPS (**figura 4.15**). Detectamos também a atividade gelatinolítica de pro-MMP-2 e MMP-2 produzidas por células GL261 por zimografia. Entretanto, não verificamos diferença na atividade de MMP-2 entre os diferentes grupos em 6h (**figura 4.16A e 4.16B**) e em 24h (dados não mostrados).

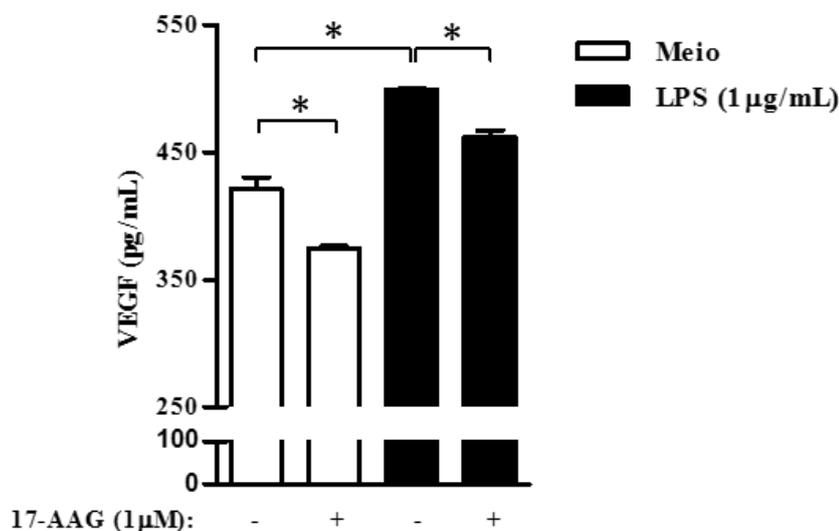
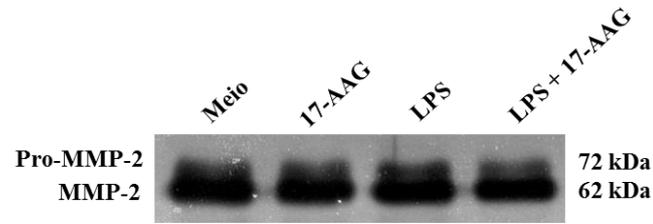


Figura 4.15. Avaliação de VEGF produzido por células GL261 pré-tratadas com 17-AAG (1µM) e estimuladas com LPS (1µg/mL) por 24h. Quantificação de VEGF no sobrenadante das células realizada por ELISA. Gráfico de três experimentos independentes realizados em triplicata expressos como média ± EPM. Diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos estão indicadas no gráfico (*).

(A)



(B)

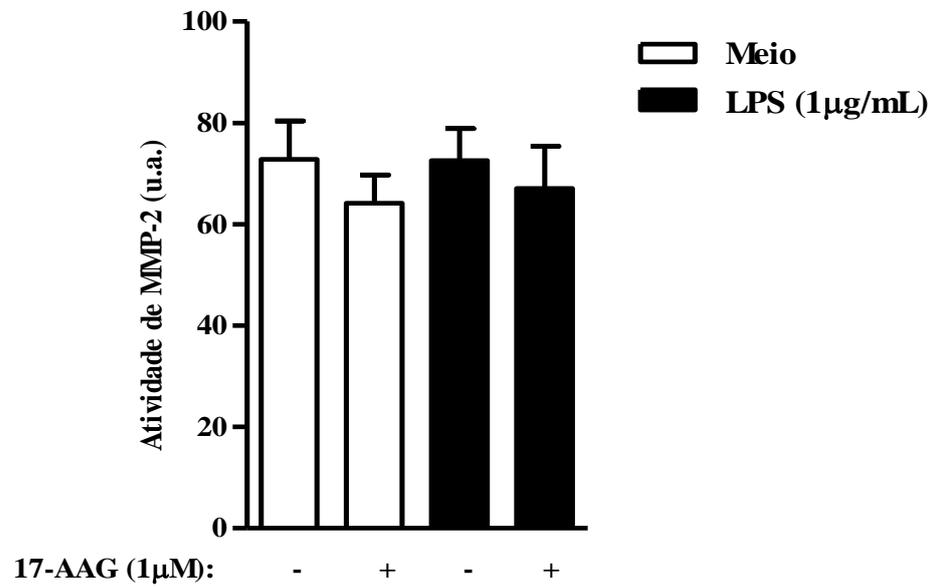
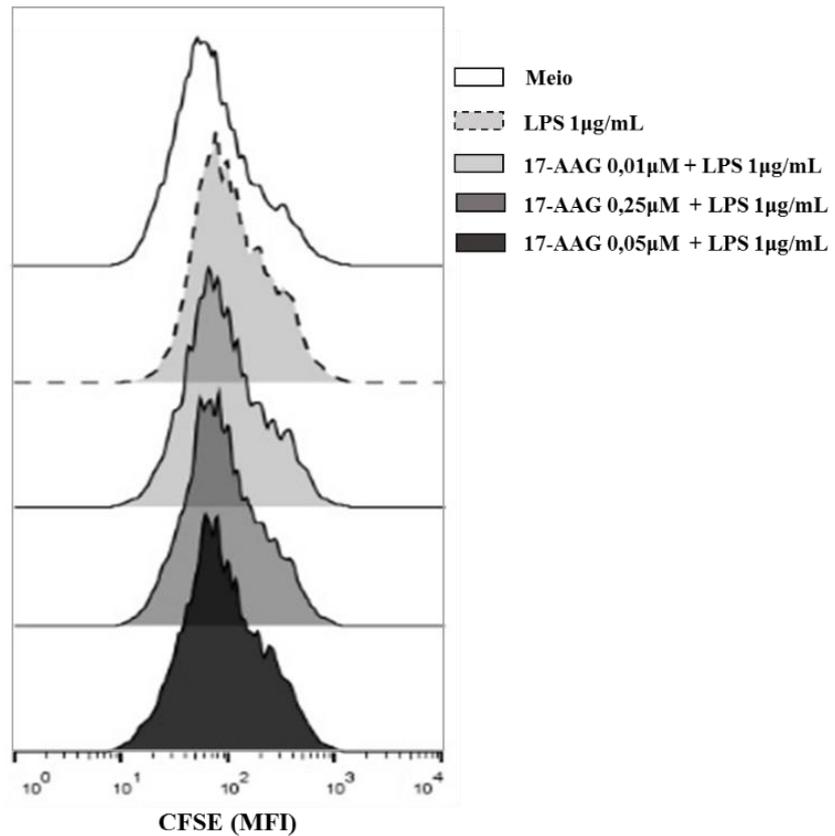


Figura 4.16. Avaliação da atividade de MMP-2 produzida por células GL261 pré-tratadas com 17-AAG (1µM) e estimuladas com LPS (1µg/mL) por 6h. Avaliação da atividade gelatinolítica MMP-2 presente no sobrenadante das células realizada por zimografia. (A) Membrana representativa de três experimentos independentes analisados no programa ImageJ. (B) Quantificações densitométricas (unidades arbitrárias, u.a.) expressas como média ± EPM.

4.8 Proliferação de células GL261

Considerando que dados da literatura demonstraram que a ativação de TLR4 induz o crescimento de células de glioma *in vitro* (Han *et al.*, 2017) e que a HSP90 exerce sua atividade chaperona sobre proteínas envolvidas na proliferação celular (Maloney & Workman, 2002), avaliamos a proliferação das células GL261 tratadas com 17-AAG e estimuladas com LPS através da marcação com CFSE, cuja fluorescência é reduzida após proliferação. De forma interessante, células estimuladas com LPS proliferaram menos do que células não estimuladas. Além disso, a 17-AAG, em todas as concentrações utilizadas (0,01-0,05 μ M), também reduziu a proliferação das células estimuladas, mas em menor intensidade que o LPS (**figuras 4.17A e 4.17B**). Entretanto, a 17-AAG não modulou a proliferação de células GL261 não estimuladas (dados não mostrados).

(A)



(B)

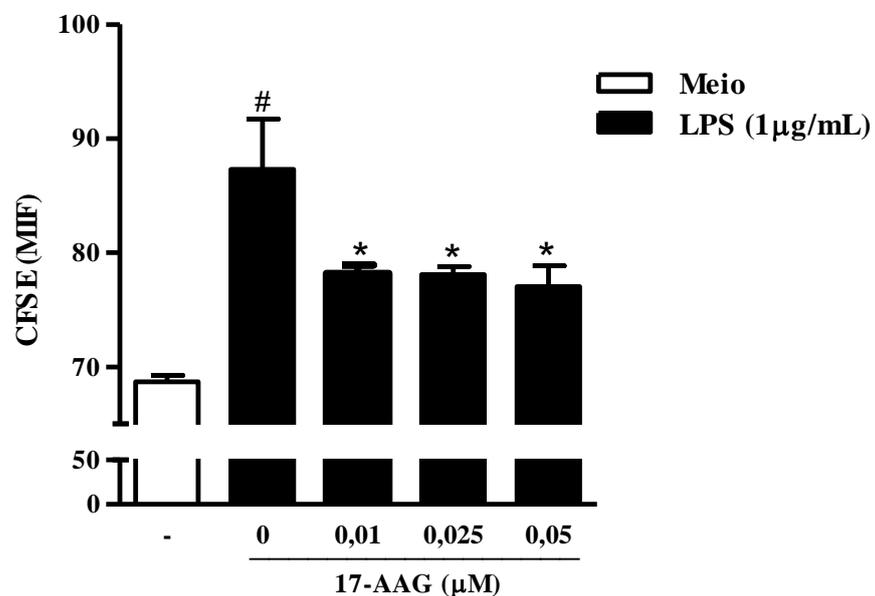


Figura 4.17. Avaliação da proliferação de células GL261 pré-tratadas com 17-AAG (0,01-0,05 μ M) e estimuladas com LPS (1 μ g/mL) por 72h pela marcação com CFSE (5 μ M). (A) Histograma representativo da intensidade de fluorescência de CFSE. (B) O gráfico corresponde aos dados obtidos em dois experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como MIF (mediana de intensidade de fluorescência) \pm EPM. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) e as análises realizadas no programa FlowJo 10[®]. Diferença estatística ($P < 0,05$) entre o grupo estimulado e não estimulado com LPS está indicada por (#), e (*) indica diferença estatística entre o grupo estimulado e os grupos tratados com 17-AAG e estimulados.

5. Discussão

Os TLRs são expressos principalmente por células do sistema imune, nas quais induzem diferentes parâmetros de ativação (Kigerl *et al.*, 2014). Entretanto, estes receptores também são expressos por células malignas e sua ativação pode estar associada ao desenvolvimento tumoral (Che *et al.*, 2017). Dentre estes receptores, podemos destacar o TLR4 que está presente em células de gliomas e reconhece ligantes endógenos presentes no microambiente tumoral (Che *et al.*, 2017; Tewari *et al.*, 2012). Além disso, sabe-se que a ativação do TLR4 depende da HSP90, pois tanto este receptor quanto as proteínas envolvidas em sua via de sinalização são clientes desta chaperona (Picard, 2002; Triantafilou *et al.*, 2001a; Triantafilou *et al.*, 2001b). No entanto, existem poucos dados na literatura que evidenciam o envolvimento da HSP90 na via de sinalização de TLR4 em glioblastoma.

Neste trabalho, mostramos que a linhagem de glioblastoma murino GL261 expressa TLR4, conforme dados obtidos por Grauer e colaboradores (2008). Por isso, utilizamos o LPS como ferramenta de ativação deste receptor e observamos que células GL261 produzem altos níveis de IL-6 quando estimuladas. De fato, células tronco tumorais de glioma, estimuladas com LPS, produzem maiores níveis de fatores induzidos pela ativação de TLR4, tais como IL-6, IL-10 e TNF- α quando comparadas a células não estimuladas (Han *et al.*, 2017). Inclusive, Tewari e colaboradores (2012) mostraram que o TNF- α induz o aumento da expressão de TLR4, contribuindo para a produção de mediadores inflamatórios, incluindo IL-6, por células de glioblastoma humano. De forma complementar, as células de glioblastoma, quando estimuladas, aumentam a expressão de GFAP, que é considerado um parâmetro de ativação (Middeldorp e Hol, 2011; Niranjana *et al.*, 2013). Resultados semelhantes foram obtidos no nosso trabalho, entretanto, o aumento da expressão de GFAP não foi significativo, o que pode estar relacionado com a heterogeneidade da linhagem GL261 ou com o tempo em que foi realizada a análise.

Considerando que os inibidores de HSP90 têm sido testados para o tratamento de diversos tipos de tumores em ensaios pré-clínicos e clínicos, devido à sua atividade citotóxica, antiproliferativa e anti-inflamatória (Garcia-Carbonero & Carnero, 2013; Mellatyar *et al.*, 2018; Maloney & Workman, 2002), utilizamos um inibidor seletivo de HSP90 (17-AAG) para investigar o papel desta chaperona na resposta induzida pela ativação de TLR4 em glioblastoma. Constatamos que esta chaperona participa da produção ou maturação de IL-6 em células de glioblastoma ativadas, visto que a 17-AAG inibiu este fenômeno, de forma concentração-dependente. Contudo, a 17-AAG não alterou a expressão TLR4 em células

estimuladas com LPS, sugerindo que o seu efeito sobre a síntese de IL-6 esteja ocorrendo após o reconhecimento do LPS por este receptor, uma vez que sua ativação desencadeia vias de sinalização que são reguladas pela HSP90, como proteína quinase ativada por mitógeno (p38), JNK (do inglês, *C-Jun N-terminal kinase*) e NFκB, todas envolvidas na síntese de IL-6 (Akira, 2003; Chen *et al.*, 2018; O'Neill *et al.*, 2015; Picard, 2002). A translocação de NFκB para o núcleo leva à transcrição de genes associados a fatores envolvidos na resposta inflamatória, entre eles IL-6, IL-10, CCL2 e VEGF (Akira, 2003; Thompson *et al.*, 2015), investigados neste trabalho. Dados da literatura sugerem que a inibição seletiva da atividade de HSP90 impede a ativação e consequente translocação de NFκB para o núcleo (Hsu *et al.*, 2006). De acordo, observamos que a 17-AAG diminuiu a expressão de NFκB no núcleo de células não estimuladas.

Investigamos também a produção de outros mediadores envolvidos na resposta inflamatória. Sabe-se que os altos níveis de quimiocinas produzidos no microambiente tumoral podem contribuir para a inflamação crônica e malignidade (Balkwill, 2004; Lim *et al.*, 2016; Zlotnik, 2006). Em glioblastoma, a quimiocina CCL2, por exemplo, medeia a migração de monócitos, contribuindo para a infiltração de macrófagos associados ao tumor (TAM), os quais favorecem a manutenção do microambiente tumoral ao inibirem a resposta de células T citotóxicas (Chen *et al.*, 2017). Apesar de termos observado aumento na produção de CCL2 por células GL261 ativadas, a 17-AAG não modulou essa resposta, sugerindo que a produção de CCL2 induzida por LPS não é regulada pela HSP90.

É importante ressaltar que, ao mesmo tempo que a ativação do receptor TLR4 induz uma resposta inflamatória, ocorre também a produção de fatores, como a IL-10 e PGE₂, que estão associados a modulação negativa de outras células do sistema imune, como os linfócitos T citotóxicos (Den Haan *et al.*, 2007), o que pode favorecer o desenvolvimento tumoral. Ainda, a IL-6 contribui para a inibição da resposta imune ao induzir a produção tanto de IL-10 quanto PGE₂ (Thompson *et al.*, 2015). De fato, observamos que a ativação de TLR4 parece induzir maior produção de IL-10 pelas células GL261. No entanto, a inibição da HSP90 parece contribuir também para a produção deste mediador, já que uma ligeira redução em sua produção pôde ser observada em células ativadas. O mesmo não se pôde inferir sobre a produção de PGE₂. Resolvemos, então, investigar a expressão de COX-2, enzima responsável pela produção de PGE₂, em células GL261, a fim de confirmar esses resultados. Constatamos que a 17-AAG não modulou a expressão dessa proteína em células estimuladas com LPS, o qual também não induziu maior expressão de COX-2, confirmando assim os resultados de detecção de PGE₂. No entanto, de forma interessante, observamos que a inibição

da atividade de HSP90 pela 17-AAG induziu maior expressão de COX-2 em células GL261 em repouso. Isto pode ser explicado pelo fato que a 17-AAG inibe a HSP90 e induz a resposta ao choque térmico (HSR), que se inicia com a liberação do HSF1 do complexo HSP90-HSF1. Posteriormente, ocorre a sua translocação para o núcleo na forma ativada e esse fator se liga à região promotora do gene que codifica a expressão de COX-2 (Rossi *et al.*, 2012). Dessa forma, os achados de Rossi e colaboradores (2012) podem explicar, em parte, os resultados relacionados à expressão de COX-2 observados em nosso estudo. Acreditamos, assim, que a 17-AAG, ao induzir a HSR, aumente a expressão de COX-2 em células GL261 em repouso. Sabemos ainda que, a HSR induz aumento da expressão de HSPs, dentre elas a HSP70, conforme observado neste trabalho, o que está associada a um efeito anti-inflamatório (Wang & McAlpine, 2015).

Reconhecendo que os filamentos intermediários, como GFAP, fazem parte do citoesqueleto celular e regulam diferentes atividades celulares, como migração e proliferação celular (Pearl e Prodromou, 2000; Rutka *et al.*, 1994) e que a ativação de TLR4 induz aumento na expressão de GFAP em células de glioblastoma. Buscamos avaliar a modulação da expressão desta proteína frente à inibição de HSP90. Evidenciamos, neste estudo, que a HSP90 pode apresentar um papel importante na expressão desta proteína induzida pela ativação de TLR4, uma vez que a 17-AAG modulou negativamente a expressão de GFAP por células GL261 ativadas.

Sabe-se que a natureza invasiva do glioblastoma é favorecida pela angiogênese e pela atividade de MMPs, o que limita a remoção cirúrgica do tumor (Hu *et al.*, 2017; Iacob & Dianca, 2009; Newcomb *et al.*, 2007). Ainda, após ativação de TLR4 em células imunes e a consequente produção de IL-6, tanto VEGF quanto MMP-2 podem ser produzidos, pois são induzidos pela via autócrina de IL-6 (Thompson *et al.* 2015). De acordo, mostramos que a ativação de TLR4, de fato, induz maior produção de VEGF pelas células GL261. Além disso, a 17-AAG leva a uma pequena diminuição na produção deste fator, sugerindo que a produção de VEGF em células ativadas não é regulada apenas pela HSP90. Entretanto, em relação a MMP-2, dados obtidos por Newcomb e colaboradores (2007) mostraram que a 17-AAG não modula a atividade dessa proteína produzida por células GL261. Da mesma forma, observamos neste estudo que a 17-AAG não modulou a atividade de MMP-2 produzida por células estimuladas (ou não) com LPS, sugerindo que a HSP90 não regula a atividade de MMP-2. Dados obtidos por Thuringer e colaboradores (2011) sugerem que a HSP90 extracelular pode se ligar no TLR4 e levar à transativação do EGFR em células de glioblastoma humano, favorecendo assim a proliferação, migração e invasão. Por isso,

avaliamos a proliferação de células GL261 e observamos que a 17-AAG reduziu a proliferação dessas células. Entretanto, de forma interessante, observamos que a ativação de TLR4 por LPS também reduziu a proliferação de células GL261, sugerindo que a ativação desse receptor em células tumorais pode apresentar papéis controversos que, inclusive, também já foram constatados em outros trabalhos publicados na literatura (Grauer *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2017; Niranjana *et al.*, 2013).

Desta forma, os dados obtidos neste trabalho geram conhecimento sobre o processo inflamatório associado ao glioblastoma, o que pode contribuir para a imunoterapia no tratamento do câncer, por meio da inibição de mecanismos imunossupressores disparados pelas células tumorais. Evidenciamos o papel da ativação do TLR4 no processo inflamatório do microambiente tumoral, o que pode favorecer o escape da resposta imune e o crescimento do tumor. Demonstramos, ainda, que a HSP90 é um alvo promissor para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes contra o glioblastoma, já que essa chaperona está envolvida em múltiplas vias de sinalização importantes na sobrevivência das células tumorais. Ressaltamos o potencial uso de inibidores de HSP90 na clínica como uma boa estratégia terapêutica, uma vez que esses inibidores apresentam maior afinidade pela HSP90 expressa por células tumorais.

6. Conclusão

Em conjunto, os dados obtidos neste estudo demonstram que a ativação de TLR4 em células de glioblastoma GL261 induz a translocação nuclear de NFκB e a produção dos fatores envolvidos na resposta inflamatória, IL-6, IL-10, CCL2 e VEGF, que favorecem o desenvolvimento tumoral. Além disso, demonstramos que a chaperona HSP90 contribui para a produção dos fatores supracitados, além de ser importante para a expressão do filamento intermediário GFAP e para a proliferação das células GL261. Desta forma, o presente trabalho gera conhecimento sobre o processo inflamatório associado ao glioblastoma, o que pode contribuir para o desenvolvimento de terapias mais eficazes.

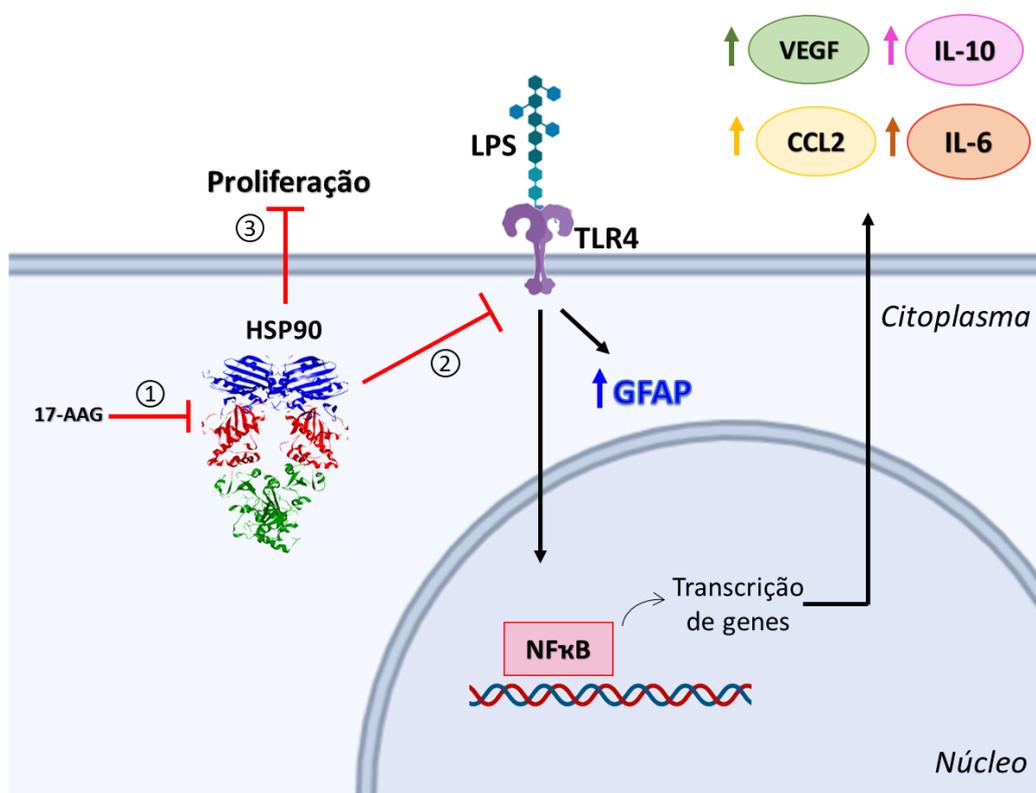


Figura 6.1. Esquema de conclusão. O tratamento das células GL261 com 17-AAG (1) modula negativamente a ativação de TLR4 induzida por LPS (2), inibindo a translocação nuclear de NFκB, a consequente produção de mediadores inflamatórios e a expressão de GFAP. A inibição da atividade de HSP90 também inibe a proliferação destas células (3).

7. Referências bibliográficas

- Alcantara Llaguno SR, Parada LF. Cell of origin of glioma: biological and clinical implications. *British Journal of Cancer*. 2016; 115:1445–1450.
- Akira, S. Toll-like Receptor Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278: 38105–38108.
- Bagloli CJ, Ray DM, Bernstein SH, Feldon SE, Smith TJ, Sime PJ, Phipps R P. More than structural cells, fibroblasts create and orchestrate the tumor microenvironment. *Immunol. Invest*. 2006; 35: 297–325.
- Balkwill FR, Mantovani A. Cancer-related inflammation: Common themes and therapeutic opportunities. *Seminars in Cancer Biology*. 2012; 22: 33–40.
- Brenner M. Role of GFAP in CNS injuries. *Neurosci Lett*. 2014; 565:7–13.
- Biebl MM, Buchner J. Structure, Function, and Regulation of the Hsp90 Machinery. *Cold Spring Harb Perspect. Biol*. 2019; pii: a034017.
- Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem*. 2000; 267:5421-5426.
- Byrd CA, Bornmann W, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pavletich N, Rosen N, et al. Heat shock protein 90 mediates macrophage activation by Taxol and bacterial lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999; 96:5645-50.
- Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell*. 2016;164: 550-63.
- Calderwood SK, Gong J, Murshid A. Extracellular HSPs: The Complicated Roles of Extracellular HSPs in Immunity. *Front Immunol*. 2016; 7: 159.
- Che F, Yin J, Quan Y, Xie X, Heng X, Du Y, Wang L. TLR4 interaction with LPS in glioma CD133+ cancer stem cells induces cell proliferation, resistance to chemotherapy and evasion from cytotoxic T lymphocyte-induced cytotoxicity. *Oncotarget*. 2017; 8: 53495–53507.
- Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Yinglun L, Xun W, Zhao, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2018; 9: 7204-7218.
- Chen R, Alvero AB, Silasi DA, Steffensen KD, Mor G. Cancers take their Toll—the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. *Oncogene*. 2008; 27:225–233.
- Chen Z, Feng X, Herting CJ, et al. Cellular and molecular identity of tumor-associated macrophages in glioblastoma. *Cancer research*. 2017; 77:2266-2278.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420: 860–867

- Davis ME. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs*. 2016; 20:S2–S8.
- Den Haan JM, Kraal G, Bevan MJ. Cutting edge: lipopolysaccharide induces IL-10-producing regulatory CD4⁺ T cells that suppress the CD8⁺ T cell response. *J. Immunol*. 2007; 178: 5429–543.
- Dokladny K, Lobb R, Wharton W, Ma TY, and Moseley PL. LPS-induced cytokine levels are repressed by elevated expression of HSP70 in rats: possible role of NF-kappaB. *Cell Stress Chaperones*. 2010;15: 153-163.
- Dranoff, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2004; 4: 11–22.
- Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE*. 2003; 171:re3.
- Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in Immunology*. 2007; 28:138-45.
- Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med*. 2003; 198:1043-1055.
- Gais P, Tiedje C, Altmayr F, Gaestel M, Weighardt H, Holzmann B. TRIF signaling stimulates translation of TNF-alpha mRNA via prolonged activation of MK2, *Journal of immunology*. 2010; 184:5842-8.
- Garcia-Carbonero R, Carnero A, Paz-Ares L. Inhibition of HSP90 molecular chaperones: moving into the clinic. *The lancet oncology*. 2013; 14:e358-69.
- Grauer OM, Molling JW, Bennink E, Toonen LW, Suttmuller RP, Nierkens S, Adema GJ. TLR ligands in the local treatment of established intracerebral murine gliomas. *The Journal of Immunology*. 2008; 181:6720-9.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140:883–899.
- Gupta P, Ghosh S, Nagarajan A, Mehta VS, Sen E. Beta-defensin-3 negatively regulates TLR4-HMGB1 axis mediated HLA-G expression in IL-1beta treated glioma cells. *Cell. Signal*. 2013; 25: 682–689.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144:646-74.
- Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee ShU. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017;18:3–9.
- Han S, Wang C, Qin X, Xia J, Wu A. LPS alters the immuno-phenotype of glioma and glioma stem-like cells and induces in vivo antitumor immunity via TLR4. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2017;36:83.

- Han S, Wang C, Qin X, Xia J, Wu A. LPS alters the immuno-phenotype of glioma and glioma stem-like cells and induces in vivo antitumor immunity via TLR4. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2017;36:83.
- Hartl, FU, Bracher, A, Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 2011; 475: 324-32.
- Hostein I, Robertson D, DiStefano F, Workman P, Clarke PA. Inhibition of signal transduction by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin results in cytostasis and apoptosis. *Cancer Res*. 2001; 61, 4003–4009
- Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: Advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nature Reviews Cancer*. 2010; 10:319–331.
- Hsu HY, Wu HL, Tan SK, Li VP, Wang WT, Hsu J, Cheng CH. Geldanamycin interferes with the 90-kDa heat shock protein, affecting lipopolysaccharide-mediated interleukin-1 expression and apoptosis within macrophages. *Molecular pharmacology*. 2006; 71:344-56.
- Hu Y, Li Y, Wu C, Zhou L, Han X, Wang Q, Xie X, Zhou Y, Du Z. MicroRNA-140-5p inhibits cell proliferation and invasion by regulating VEGFA/MMP2 signaling in glioma. *Tumor Biology*. 2017; 39: 1010428317697558.
- Iacob G, Dinca EB. Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *J Med Life*. 2009; 2: 386-393.
- Jego G, Bataille R, Geffroy-Luseau A, Descamps G, Pellat-Deceunynck C. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia*. 2006; 20: 1130–1137.
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*. 2010; 11: 373–384
- Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature*. 2003; 425, 407–410.
- Kelly MG, Alvero AB, Chen R, Silasi DA, Abrahams VM, Chan S, Visintin I, Rutherford T, Mor G. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2006; 66: 3859–3868.
- Kigerl KA, de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Popovich PG, Keane RW. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Experimental neurology*. 2014; 258:5-16.
- Li C, Zienkiewicz J, Hawiger J. Interactive sites in the MyD88 Toll/interleukin (IL) 1 receptor domain responsible for coupling to the IL1beta signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2005; 280: 26152-9.
- Lim SY, Yuzhalin, AE, Gordon-Weeks AN, Muschel RJ. Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. *Oncotarget*. 2016; 7: 28697-710.
- Lin SH, Kleinberg LR. Carmustine wafers: localized delivery of chemotherapeutic agents in CNS malignancies. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2008; 8: 343-59.

Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007;117: 1175–1183.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016; 131: 803-20.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193: 265-276.

Malhotra V, Shanley TP, Pittet JF, Welch WJ, Wong HR. Geldanamycin inhibits NF-kappaB activation and interleukin-8 gene expression in cultured human respiratory epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2001; 25: 92-7.

Maloney A, Workman P. HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2002; 2: 3–24.

Matei D, Satpathy M, Cao L, Lai YC, Nakshatri H, Donner DB. The platelet-derived growth factor receptor alpha is destabilized by geldanamycins in cancer cells. *J Biol Chem*. 2007; 282:445-53.

Mellatyar H, Talaei S, Pilehvar-Soltanahmadi Y, Barzegar A, Akbarzadeh A, Shahabi A, Barekati-Mowahedf M, Zarghami N. Targeted cancer therapy through 17-DMAG as an Hsp90 inhibitor: Overview and current state of the art. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018; 102: 608–617.

Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*. 2011; 93(3):421-43.

Mohammadi A, Yaghoobi MM, Gholamhoseinian Najar A, Kalantari-Khandani B, Sharifi H, Saravani M. HSP90 Inhibition Suppresses PGE2 Production via Modulating COX-2 and 15-PGDH Expression in HT-29 Colorectal Cancer Cells. *Inflammation*. 2016; 39(3):1116-23.

Mollen KP, Anand RJ, Tsung A, Prince JM, Levy RM, Billiar T. R. Emerging paradigm: tolllike receptor 4 sentinel for the detection of tissue damage. *Shock*. 2006; 26, 430–437.

National Institutes of Health. Clinical Trials. Estados Unidos da América: NIH. Disponível em: <www.clinicaltrials.gov> Acesso em: 19 de agosto de 2019.

Newcomb EW, Lukyanov Y, Schnee T, Esencay M, Fischer I, Hong D, Shao Y, Zagzag D. The geldanamycin analogue 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin inhibits the growth of GL261 glioma cells in vitro and in vivo. *Anticancer Drugs* 2007, 18:875e882

Niranjan R, Nagarajan R, Hanif K, Nath C, Shukla R. LPS induces mediators of neuroinflammation, cell proliferation, and GFAP expression in human astrocytoma cells U373MG: the anti-inflammatory and anti-proliferative effect of guggulipid. *Neurol Sci*. 2013; 35:409-14.

O'Neill S, Humphries D, Tse G, Marson LP, Dhaliwal K, Hughes J, et al. Heat shock protein 90 inhibition abrogates TLR4-mediated NF-κB activity and reduces renal ischemia-reperfusion injury. *Scientific Reports*. 2015; 5:12958.

- Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. *Neuro Oncol.* 2018; 19:v1-v88.
- Ozgun A, Tutar Y. Heat Shock Protein 90 Inhibitors in Oncology. *Current Proteomics.* 2014; 11:2-16.
- Weinstein, IB. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science.* 2002; 297: 63-4.
- Patidar A, Selvaraj S, Sarode A, Chauhan P, Chattopadhyay D, Saha B. DAMP-TLR-cytokine axis dictates the fate of tumor Cytokine. 2018 Apr;104:114-123
- Pearl LH, Prodromou C. Structure and *in vivo* function of Hsp90. *Curr Opin Struct Biol* 2000; 10: 46–51.
- Perrin SL, Samuel MS, Koszyca B, Brown MP, Ebert LM, Oksdath M, et al. Glioblastoma heterogeneity and the tumour microenvironment: implications for preclinical research and development of new treatments. *Biochem Soc Trans.* 2019; 47: 625-638.
- Picard D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59:1640–1648.
- Piñeros M, Sierra MS, Izarzugaza MI, Forman D. Descriptive epidemiology of brain and central nervous system cancers in central and South America. *Cancer Epidemiol.* 2016; 44:S141–S9.
- Plate KH, Breier G, Weich HA, Mennel HD, Risau W. Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible *in vivo* regulatory mechanisms. *Int J Cancer.* 1994; 59:520–529.
- Platten M, Kretz A, Naumann U, Aulwurm S, Egashira K, Isenmann S, Weller M. Monocyte chemo-attractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas. *Ann Neurol* 2003; 54:388–392.
- Qiu J, Shi Z, Jiang J. Cyclooxygenase-2 in glioblastoma multiforme. *Drug discovery today.* 2017; 22: 148-156.
- Rajendran L, Bali J, Barr MM, Court FA, Krämer-Albers EM, Picou F, Raposo G, et al. Emerging roles of extracellular vesicles in the nervous system. *J Neurosci.* 2014; 34: 15482-9.
- Richter K, Buchner J. Hsp90: Chaperoning signal transduction. *J. Cell Physiol.* 2001; 188, 281–290.
- Rodina A, Wang T, Yan P, Gomes ED, Dunphy MP, Pillarsetty N, et al. The epichaperome is an integrated chaperome network that facilitates tumour survival. *Nature.* 2016; 538: 397–401.
- Rossi A, Coccia M, Trotta E, Angelini M, Santoro MG. Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression by Heat: A Novel Aspect of Heat Shock Factor 1 Function in Human Cells. *PLoS ONE.* 2012; 7: e31304.

Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, Akira S. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NFkappaB and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *Journal of immunology*. 2003; 171: 4304-10.

Seligman AM, Shear M. Studies in Carcinogenesis. Experimental Production of Brain Tumors in Mice with Methylcholanthrene. *Am. J. Cancer*. 1939; 37: 364-395.

Singleton KD, Wischmeyer PE. Effects of HSP70.1/3 gene knockout on acute respiratory distress syndrome and the inflammatory response following sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006; 290: L956-61.

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992; 359:843–845.22.

Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4, *The Journal of experimental medicine*. 1999; 189: 1777-82.

Shi L, Zhang Z, Fang S, Xu J, Liu J, Shen J, Fang F, Luo L, Yin Z. Heat shock protein 90 (Hsp90) regulates the stability of transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1) in interleukin-1beta induced cell signaling. *Mol Immunol*. 2009; 46: 541-550.

Schopf FH, Biebl MM, Buchner J. The HSP90 chaperone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017; 18: 345-60.

Sizoo EM, Braam L, Postma TJ, Pasman HR, Heimans JJ, Klein M, et al. Symptoms and problems in the end-of-life phase of high-grade glioma patients. *Neuro Oncol*. 2010;12: 1162-6.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The new england journal of medicine*. 2005; 352: 987-96.

Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Quinn T, Ostrom, Donita D. Lightner, Jill S. Barnholtz-Sloan, et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23: 1985–1996.

Tewari R, Choudhury SR, Ghosh S, Mehta V S, Sem E. Involvement of TNFalpha-induced TLR4-NF-kappaB and TLR4-HIF-1alpha feed-forward loops in the regulation of inflammatory responses in gliomas. *Journal of Molecular Medicine*. 2012; 90: 67-80.

Thompson PA, Khatami M, Baglolle CJ, Sun J, Harris SA, Moon EY, et al. Environmental immune disruptors, inflammation and cancer risk. *Carcinogenesis*. 2015; 36:232-53.

Thorsteinsdottir J, Stangl S, Fu P, Guo K, Albrecht V, Eigenbrod S, Erl J, Gehrmann, Tonn J C, Multhoff G, Schichor C. Overexpression of cytosolic, plasma membrane bound and extracellular heat shock protein 70 (Hsp70) in primary glioblastomas. *Journal of Neuro-Oncolog*. 2017; 3: 443–452.

- Thuringer D, Hammann A, Benikhlef N, et al. Transactivation of the epidermal growth factor receptor by heat shock protein 90 via Toll-like receptor 4 contributes to the migration of glioblastoma cells. *J Biol Chem*. 2011;286: 3418–3428
- Triantafilou K, Triantafilou M, Ladha S, Mackie A, Dedrick RL, Fernandez N and Cherry R. Fluorescence recovery after photobleaching reveals that LPS rapidly transfers from CD14 to hsp70 and hsp90 on the cell membrane. *Journal of cell science*. 2001a; 114: 2535-2545.
- Triantafilou K, Triantafilou M, Dedrick RL. A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nature Immunology*. 2001b;2: 338-45.
- Van Gool SW. Brain Tumor Immunotherapy: What have We Learned so Far?. *Front Oncol*. 2015;5:98.
- Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol*. 2001; 166: 249-255.
- Wang Y, McAlpine SR. N-terminal and C-terminal modulation of Hsp90 produce dissimilar phenotypes. *Chem. Commun*. 2015; 51:1410-1413.
- Xia S, Lal B, Tung B, Wang S, Goodwin C R, Laterra J. Tumor microenvironment tenascin-C promotes glioblastoma invasion and negatively regulates tumor proliferation. *Neuro Oncol*. 2016;18: 507-17.
- Yao M, Li S, Wu X, et al. Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy. *Cell Mol Immunol*. 2018;15:737–739.
- Yi L, Zhou C, Wang B, Chen T, Xu M, Xu L, Feng H. Implantation of GL261 neurospheres into C57/BL6 mice: A more reliable syngeneic graft model for research on glioma-initiating cells. *International Journal of Oncology*. 2013; 477-484.
- Yong-Chen Lu, Wen-Chen Yeh, Pamela S. Ohashi, LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008; 42:145–151.
- Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol*. 2002; 168: 554-561.
- Zlotnik A. Chemokines and cancer. *Int J Cancer*. 2006; 119: 2026-9.