

**FACULDADE DE FARMÁCIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA**

LAURA TREVIZAN CORRÊA

**EFEITOS CITOTÓXICOS DE RESOLVINAS DA SÉRIE D
EM GLIOMA MURINO**

**Porto Alegre
2015**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

**EFEITOS CITOTÓXICOS DE RESOLVINAS DA SÉRIE
D EM GLIOMA MURINO.**

LAURA TREVIZAN CORRÊA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Farmacêutica na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Ana Paula Duarte de Souza

Co-orientador: Prof. Rafael Fernandes Zanin

Porto Alegre

2015

Laura Trevizan Corrêa

Dissertação de Mestrado

Efeitos Citotóxicos de Resolvinas da Série D em Glioma Murino

Defesa em 20 de março de 2015

Banca de Defesa:

Prof. Dr. Pablo Machado

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Elizandra Braganhol

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Dr. Fabrício Simão

Harvard University

DEDICATÓRIA

Aos pacientes com Glioma.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos aos profissionais colaboradores e professores que contribuíram no desenvolvimento do trabalho:

Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental, aos professores Dr. Rafael Fernandes Zanin e Dra. Ana Paula Duarte de Souza, e à farmacêutica Deise Nascimento de Freitas.

Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, à professora Dra. Cristina Beatriz Bonorino, e ao auxílio técnico de Taiane Santos Garcia e Rodrigo Dornelles Silva.

Laboratório de Farmacologia Aplicada, à professora Dra. Fernanda Bueno Morrone e ao Ms. Rodrigo Braccini.

Intox, à professora Dra. Maria Martha Campos e à Dra. Natalia Fontanela Nicoletti.

Laboratório de Patologia, da Faculdade de Odontologia da PUCRS, prof. Dr. Fabio Luiz Dal Moro Maito e ao auxílio técnico de Luciana Adolfo Ferreira.

Centro de Modelos Biológicos Experimentais da PUCRS (Cembe-PUCRS), ao veterinário Giordano Cabral de Macedo Braga.

Aos amigos e à família.

EFEITOS CITOTÓXICOS DE RESOLVINAS DA SÉRIE D EM GLIOMA MURINO

RESUMO

Glioblastoma multiforme (GBM) é um tumor altamente agressivo do Sistema Nervoso Central e possui poucas terapias disponíveis. Em GBM, vias de sinalização pró-inflamatórias, como da STAT3 e NF- κ B, são aberrantemente ativadas e associadas com a proliferação celular, sobrevivência, invasão e resistência à quimioterapia. Por conseguinte, a inibição dessas vias pró-inflamatórias tem sido sugerida como uma estratégia para combater as células malignas. As resolvinas da série D promovem resolução da inflamação diminuindo a ativação de NF- κ B. A Resolvina D2 (RvD2) deriva de uma sequência de dupla lipoxigenação do ácido docosahexaenóico, o qual é derivado do ácido graxo essencial Omega-3. Nossa hipótese é que as resolvinas, por inibição direta ou indireta de vias pró-inflamatórias, poderiam comprometer a sobrevivência e o crescimento do glioma. Nosso objetivo consiste em avaliar o papel da RvD2 e de seu precursor 17(R)HDHA (HR17) sobre a proliferação de células tumorais e sobrevivência em um modelo de glioma murino. Para isso, a linhagem de células de glioma murino (GL261) foi tratada *in vitro* com RvD2 e HR17, e morte celular e proliferação foram avaliadas. Além disso, o efeito de RvD2 e HR17 foi avaliado *in vivo* após o implante de GL261 no cérebro, avaliando-se características histopatológicas e a imunohistoquímica para caspase-3 ativada. Verificou-se que RvD2 induz apoptose de GL261 *in vitro*. Além disso, o tratamento de RvD2 e HR17 *in vivo* aumentou o número de células tumorais positivas para caspase-3 ativada, embora não alterassem a área do tumor. Curiosamente, o tratamento HR17 reduz o índice mitótico tumoral *in vivo*. Estes resultados sugerem que RvD2 e HR17 têm um potencial papel na indução de apoptose em células de glioma murino.

Palavras-chave: Glioblastoma, Resolvina, RvD2, 17(R)HDHA.

CYTOTOXIC EFFECTS OF D SERIES RESOLVINS IN MURINE GLIOMA

ABSTRACT

Glioblastoma multiform (GBM) is a highly aggressive tumor of the central nervous system and has a few available therapies. In GBM, proinflammatory signaling pathways, such as STAT3 and NF- κ B are aberrantly activated and associated with cell proliferation, survival, invasion and resistance to chemotherapy. Therefore, inhibition of these pro-inflammatory pathways has been suggested as a strategy to combat malignant cells. Resolvins of D-series promote resolution of inflammation by decreasing the activation of NF- κ B. The Resolvin D2 (RvD2) is derived from a double sequence of docosahexaenoic acid lipoxygenation, which is derived from the essential fatty acid Omega-3. Our hypothesis is that the resolvins, by direct or indirect inhibition of pro-inflammatory pathways, could compromise the survival and growth of glioma. Our goal is to assess the role of RvD2 and its precursor 17 (R) HDHA (HR17) on tumor cell proliferation and survival in murine glioma model. For this, murine glioma cell line (GL261) was treated *in vitro* with RvD2 and HR17, and cell death and proliferation were evaluated. Furthermore, the effect of RvD2 and HR17 was evaluated *in vivo* after GL261 brain implantation; histopathological characteristics and immunohistochemistry for activated caspase-3 were evaluated to. It was found that RvD2 GL261 induces apoptosis *in vitro*. Furthermore, *in vivo* treatment of RvD2 and HR17 increased the number of tumor cells positive for activated caspase-3, although not alter tumor area. Interestingly, the HR17 treatment reduces tumor mitotic index *in vivo*. These results suggest that RvD2 and HR17 have a potential role in the induction of apoptosis in murine glioma cells.

Key words: Glioblastoma, Resolvin, RvD2, 17(R)HDHA.

Sumário

1	Referencial Teórico.....	9
1.1	Glioma	9
1.2	Inflamação e câncer	10
1.3	Vias de sinalização	12
1.4	Mediadores Lipídicos	13
1.5	Resolvinas _ resolvins (Rv; resolution phase interaction products)	14
1.6	Resolvinas da série D	14
2	Hipótese.....	16
3	Objetivos	16
4	Justificativa.....	17
5	Manuscrito.....	18
6	Considerações finais	36
7	Referências	37

1 Referencial Teórico

1.1 Glioma

Tumores do sistema nervoso central (SNC) representam cerca de 1,9% de todas as neoplasias malignas no mundo, somando uma fração alta das mortes por câncer devido ao seu caráter altamente agressivo. Os gliomas são os tipos histológicos mais frequentes e representam cerca de 40% a 60% de todos os tumores primários do SNC, classificado deste modo com grau de 1 a 4 baseados em características histopatológicas e critérios clínicos estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Watters, Schartner et al. 2005, INCA 2014), Essa classificação inclui o astrocitoma pilocítico (grau 1), o astrocitoma difuso (grau 2), o astrocitoma anaplásico (grau 3) e o glioblastoma multiforme ([GBM] grau 4) o qual representa cerca de 15% dos tumores de cérebro, ocorre principalmente em adultos entre 45 e 70 anos. (Louis, Ohgaki et al. 2007, INCA 2014).

A etiologia do glioma ainda é pouco conhecida, alguns estudos sugerem que radiação gerada por radiofrequência, telefonia móvel e telecomunicação possam estar associados, porém esta relação ainda permanece inconclusiva. Durante as últimas décadas, a incidência e a mortalidade dos tumores de SNC aumentaram na maioria dos países desenvolvidos principalmente nas faixas etárias mais avançadas. Parte desse aumento referente à incidência deve-se à melhoria e à introdução de novas tecnologias diagnósticas menos invasivas, por exemplo, a tomografia computadorizada, a ressonância magnética e a tomografia por emissão de pósitrons (PET Scan) (INCA 2014).

Os tumores de SNC no Brasil possuem um risco estimado de casos novos de 5,07/100 mil homens e 4,05/100 mil mulheres, no mundo possui um risco estimado de 3,9/100 mil para homens e 3,0/100 mil para mulheres, e as maiores taxas de incidência encontram-se nos países europeus (INCA 2014). Segundo o Instituto Nacional do Câncer do EUA, estimou-se em 2014 23.380 novos casos, sendo que 14.320 chegaram a óbito, segundo a estimativa (NCI 2014).

Tumores de grau três e quatro são considerados malignos ou gliomas de alto grau (GAG), estes são a forma mais agressiva de tumor primário do cérebro, e sem uma terapia efetiva. Apesar da sua relativa baixa incidência, a qual é de aproximadamente cinco casos por 100,000 pessoas (Laperriere, Zuraw et al. 2002), a natureza de alta agressividade desse tumor continua a ser um desafio para os oncologistas, pois costumam proliferar e invadir extensivamente áreas adjacentes no cérebro produzindo uma expectativa de vida baixa, sendo que para pacientes com glioblastoma

multiforme, a sobrevida média é inferior a um ano (Diaz-Miqueli and Martinez 2013). Assim, para pacientes com glioma, atualmente existe um único tratamento farmacológico, e a barreira hematoencefálica (BHE) limita a entrada dos quimioterápicos no SNC, de modo que apenas fármacos altamente lipofílicos (temozolomida e nitrosuréis) podem ser utilizados (Mousseau, Chauvin et al. 1993).

O padrão de tratamento corrente em GAG consiste em uma combinação de abordagens de cirurgia e radiação, ou combinação de radiação e quimioterapia, dependendo do sítio da doença assim como das condições de saúde do paciente (Koshy, Villano et al. 2012, Hart, Garside et al. 2013). A cirurgia é a primeira escolha de tratamento e a máxima ressecção cirúrgica é indicada sempre que possível. Contudo, devido à sua alta natureza infiltrativa, o GAG não pode ser completamente eliminado cirurgicamente, e a validade da cirurgia em prolongar a sobrevida do paciente é controversa (Nazzaro and Neuwelt 1990, Lorenzoni, Torrico et al. 2008, Wolff, Driever et al. 2010, Oszvald, Guresir et al. 2012).

A radioterapia é também frequentemente indicada em pacientes com glioblastoma de forma paliativa, no entanto, com limitações significativas de resultado que incluem resistência intrínseca das células de glioma ao dano induzido pela radiação ionizante (Bao, Wu et al. 2006). Deste modo, uma importante proporção de células de glioma pode sobreviver à irradiação, induzindo a aceleração da proliferação (Ciardiello and Tortora 2008). Sendo assim, torna-se necessário identificar novas alternativas terapêuticas de combate ao tumor, o que propiciaria um aumento na sobrevida e a qualidade de vida desses pacientes.

1.2 Inflamação e câncer

A inflamação é a resposta do organismo para uma injúria local ou para a invasão de microrganismos, ocorre em tecidos vascularizados programados para o tráfico de leucócitos e influxo de plasma. Respostas controladas de fagócitos incluem a eliminação de micróbios invasores e limpeza de sítios com *debris* celulares e leucócitos polimorfonucleares (PMNs) apoptóticos, encaminhando-se então para a resolução do estado inflamatório por meio de sinalização realizada por mediadores pró-resolução. Já em uma resposta do hospedeiro sem controle, ou quando a resposta protetiva é desviada por vias inflamatórias crônicas, PMNs medeiam a injúria tecidual e levam ao dano irreversível do órgão, com a presença de doenças associadas. Em humanos, a

inflamação é associada a muitas doenças que ocorrem amplamente, como doenças cardiovasculares, metabólicas, doenças autoimunes, doenças inflamatórias clássicas, como a artrite e a doença periodontal, e o câncer. O que atualmente representa um importante problema de saúde pública e de encargos financeiros (Serhan 2007, Serhan 2010).

A resolução da inflamação envolve muitos processos celulares e teciduais, incluindo apoptose, fagocitose, perfis de citocinas/ quimiocinas e seus mecanismos de eliminação, assim como a drenagem linfática. No entanto, este processo permanece ainda pouco explorado, e é de grande importância compreender a sua fisiopatologia para então se direcionar novas abordagens terapêuticas. É possível que a estimulação de rotas de resolução da inflamação possa melhorar o tratamento de uma ampla variedade de doenças (Serhan 2007, Merched, Ko et al. 2008, Li, Sun et al. 2009, Serhan 2010, Tabas 2010).

É importante ressaltar que a inflamação é evidente, em alguns casos, nas primeiras fases de progressão neoplásica sendo comprovadamente capaz de promover o desenvolvimento de neoplasias incipientes (de Visser, Eichten et al. 2006, Qian and Pollard 2010). Além disso, as células inflamatórias podem liberar substâncias químicas, principalmente espécies reativas de oxigênio, que são ativamente mutagênicas para células cancerosas próximas, acelerando sua evolução genética para estados de malignidade elevada (Grivennikov, Greten et al. 2010). Como tal, a inflamação pode ser considerada uma característica que permite a aquisição de recursos característicos da sobrevivência e progressão do tumor (Hanahan and Weinberg 2011).

Neste sentido, estudos recentes têm proporcionado novas descobertas sobre vias celulares e moleculares que evidenciam a ligação entre inflamação e câncer (Mantovani 2010, Bonecchi, Locati et al. 2011, Kuraishy, Karin et al. 2011). Estudos clínicos, epidemiológicos e com linhagens de células malignas, têm demonstrado o potencial de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), como agentes farmacológicos com papel benéfico no tratamento e prevenção de vários tipos de câncer – por diminuir a proliferação tumoral ou induzir a morte destas células (Tsuji and DuBois 1995, Howe, Subbaramaiah et al. 2001, Shono, Tofilon et al. 2001). Recentes descobertas têm demonstrado o papel chave de novas classes de mediadores lipídicos sobre a resposta inflamatória. Em particular, foi descoberto que diversos mediadores lipídicos derivados de ácidos graxos poli-insaturados (principalmente ω -3) são endogenamente gerados durante a inflamação e têm potente efeito anti-inflamatório, servindo como mediadores lipídicos especializados capazes de promover a resolução da inflamação.

1.3 Vias de sinalização

A inflamação pode contribuir para múltiplos aspectos biológicos característicos dos tumores, especialmente através do suprimento de moléculas bioativas para o seu microambiente, incluindo fatores de crescimento que podem sustentar a sinalização proliferativa, fatores de sobrevivência que limitam a morte celular, fatores pró-angiogênicos, enzimas modificadoras da matriz extracelular que facilitam a angiogênese, a invasão, e a metástase, e induzem sinais que levam à ativação de programas facilitadores de câncer (Karnoub and Weinberg 2006, DeNardo, Andreu et al. 2010, Grivennikov, Greten et al. 2010, Qian and Pollard 2010).

As citocinas interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa- α (TNF- α), especialmente, estão associadas a vias de sinalização relacionadas com aumento de proliferação, migração e invasão de vários tumores (Grivennikov and Karin 2010). Em gliomas, a remoção de IL-6, de animais que geram espontaneamente o tumor, preveniu a formação tumoral, indicando o papel importante da IL-6 no desenvolvimento e progressão de gliomas (Weissenberger, Loeffler et al. 2004). Neste sentido, o TNF- α também atua na sustentação da progressão tumoral em gliomas produzido através da via ativação de *toll like receptors 4* (TLR4) (Tewari, Choudhury et al. 2012). Entre as vias de sinalização celular que respondem prontamente ao TNF- α e a IL-6, os componentes mais ativados em tumores são os fatores de transcrição *factor nuclear kappa B* (NF- κ B) e *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), respectivamente. Eles têm sido detectados nas suas formas ativas em muitos tipos de tumores, incluindo câncer de mama, cólon, gástrico, pulmão, pele, próstata e glioma entre outros (Lee, Herrmann et al. 2009, Grivennikov and Karin 2010, Zanotto-Filho, Braganhol et al. 2012).

É importante ressaltar que IL-6 e TNF- α são constantemente produzidas no microambiente do tumor, tanto por células tumorais quanto em células imunes infiltrantes, o que resulta em uma ativação crônica de NF- κ B e STAT3 de maneira autócrina e parácrina (Karin 2006, McFarland BC 2013). NF- κ B e STAT3 são importantes fatores de transcrição envolvidos na mediação da resposta inflamatória e imune, também estão ligados a muitos cânceres, incluindo GBM. Em GBM, os fatores de transcrição NF- κ B e STAT3 são aberrantemente ativados e associados com a proliferação celular, sobrevivência invasão e resistência à quimioterapia. Ambos NF- κ B e STAT3 são também rapidamente ativados em resposta a diversos estímulos incluindo estresse e citocinas, apesar de serem regulados por mecanismos de sinalização completamente diferentes. Estes fatores de transcrição, uma vez ativados nas células tumorais, podem controlar a expressão de vários genes

anti-apoptóticos, pró-proliferativos e de resposta imune – como as citocinas IL-10, IL-6, IL-23, IL-21, IL-1 e TNF- α (Karin 2006, Grivennikov and Karin 2010, McFarland BC 2013).

Deste modo, a ativação de NF- κ B e STAT3 representa um importante papel no controle da “comunicação” entre células malignas e microambiente, em especial com células imune/inflamatórias que infiltram o tumor. Como consequência, a inibição de NF- κ B e STAT3 tem sido sugerida como estratégia para combater células malignas. Deste modo, já foi demonstrado em um modelo de glioblastoma em camundongos, que a inibição conjunta de NF- κ B e STAT3 prolongam a sobrevivência dos animais (McFarland BC 2013).

1.4 Mediadores Lipídicos

Mediadores lipídicos pró-resolução possuem estruturas distintas e atuam através de receptores estereoespecíficos ligados à proteína G que sinalizam eventos intracelulares em alvos celulares seletivos, ativando programas pró-resolução enquanto neutralizam a sinalização pró-inflamatória (Fredman and Serhan 2011). E, da mesma forma que outros potentes mediadores lipídicos como lipoxinas, prostaglandinas e leucotrienos, as ações biológicas das resolvinas são mediadas pelos receptores metabotrópicos *lipoxin A/formyl peptide receptor* (ALX/FPR2), *chemerin receptor 23* (chemR23) e *G protein-coupled receptor 32* (GPR32) (Serhan 2007, Krishnamoorthy, Recchiuti et al. 2010).

Serhan e colaboradores (Serhan, Hong et al. 2002) identificaram, caracterizaram e elucidaram as famílias de mediadores lipídicos pró-resolução derivados de ácido graxo ω -3: eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) – resolvinas, protectinas e maresinas; e derivados de ácido araquidônico (AA) – lipoxinas. A geração enzimática dessas famílias ocorre primariamente via biossíntese transcelular, e em alguns casos dentro de um tipo único de célula, via enzimas lipoxigenase. Entre suas principais ações anti-inflamatórias, estão a redução de migração de neutrófilos humanos e de infiltração de neutrófilos em sítios inflamatórios em modelos murinos (Serhan, Chiang et al. 2008, Spite and Serhan 2010). Além disso, também apresentam atividades específicas, como por exemplo a lipoxina A₄ (LXA₄), que quando testada em um modelo de hepatocarcinoma em camundongos provocou a inibição da produção de *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e reduziu os níveis *in vitro* de *hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF1- α),

aumentou a apoptose *in situ* e inibiu a infiltração de macrófagos no tecido tumoral (Chen, Hao et al. 2010).

1.5 *Resolvinas* _ *resolvins* (Rv; resolution phase interaction products)

A família das resolvinas, os mediadores lipídicos foco deste trabalho, inclui as da série E (RvE1 e RvE2) derivadas de EPA e as resolvinas da série D (RvD1, RvD2, RvD3, RvD4, RvD5, RvD6) derivadas de DHA. Cada um desses compostos origina-se por rotas biossintéticas similares, mas possuem estruturas distintas e potencialmente ações biológicas adicionais. São geradas a partir de ácido graxo ômega-3 proveniente da dieta, como citado acima, pela via do ácido docosahexaenóico (DHA), do ácido eicosapentaenoico (EPA) ou da cicloxigenase II (COX-2), e também pode ser gerado por um analgésico como a aspirina (Serhan 2009). A adição de aspirina, um precursor de resolvinas, derivada de DHA, para ativar células PMNs humanas também gera resolvinas da série D, destacando-se a importância das interações célula-célula, como ocorre durante a resolução da inflamação. Sendo que o DHA é convertido em resolvinas em todo o sangue humano mesmo na ausência de aspirina. Notavelmente, as resolvinas da série D geradas na ausência de aspirina carregam o álcool para a posição 17 predominantemente na configuração *S*, mais que na configuração *R* (Hong, Gronert et al. 2003, Serhan 2007).

1.6 *Resolvinas da série D*

A conversão biossintética de Ácido Docosahexaenoico (ADH) em resolvinas da série D (RvD1-RvD6) envolve dois passos interativos de lipoxigenação. A conversão inicial de ADH em 17*S*-HpDHA (01) catalisado pela 15-lipoxigenase (15-LO) é seguido de uma segunda lipoxigenação via 15-LO na posição C-7 que resulta em um peróxido intermediário (02) o qual é transformado em 7*S*,8*S*-epóxido (03). A hidrólise enzimática do composto 03 gera produtos trihidroxilados RvD1 (04) e RvD2 (05). Resolvinas 17*R* da série D também podem derivar da aspirina via COX- α acetilada ou via a rota P450 (Serhan and Petasis 2011).

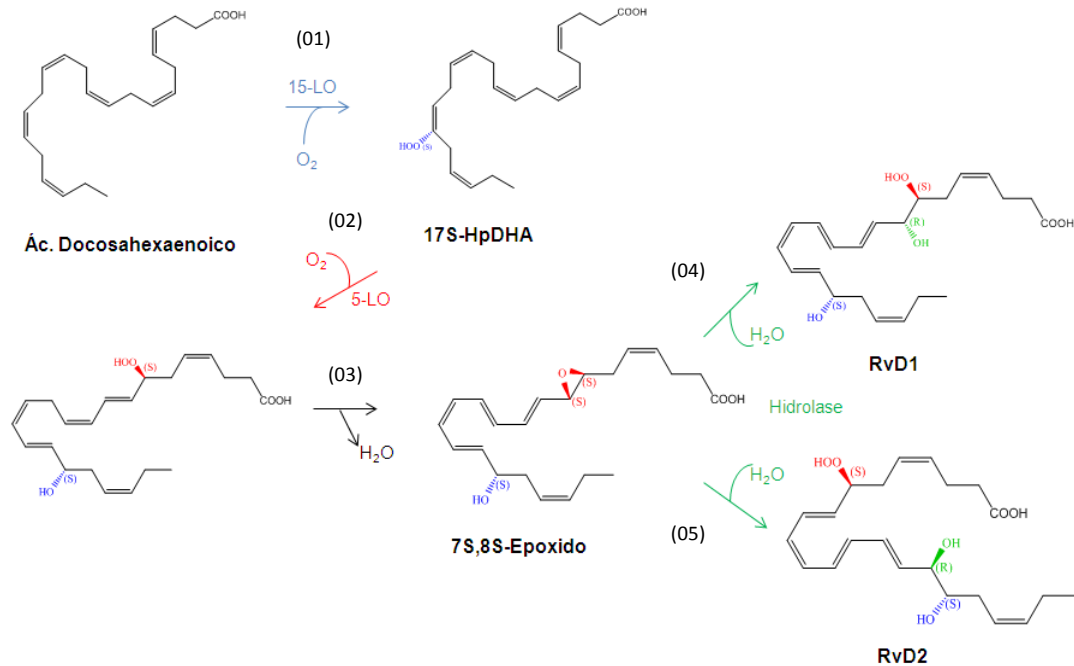


Fig. 1: Síntese resolvinas série D, adaptado (Serhan and Petasis 2011).

Resolvinas da série D possuem múltiplas ações benéficas, tanto *in vivo* quanto em células humanas isoladas. Em particular, elas reduzem a infiltração excessiva de PMN em tecidos com inflamação, diminuem a ativação de PMN e promovem a fagocitose e remoção de células apoptóticas e micróbios. Ações protetivas de resolvinas da série D têm sido observadas em doenças inflamatórias crônicas e agudas, como peritonite, isquemia e sepse. O mecanismo de ação conhecido para resolvinas envolve tanto a limitação da infiltração de PMN e aumento da fagocitose pelos macrófagos que utiliza receptores específicos recentemente identificados em PMNs humanos, monócitos e macrófagos. Esses mediadores anti-inflamatórios também são capazes de reduzir o dano por isquemia/reperfusão e a obesidade induzida por inflamação em tecido adiposo de camundongos (Ishida, Yoshida et al. 2010, Krishnamoorthy, Recchiuti et al. 2010). Coloca-se que as resolvinas mostram resultados benéficos nesses diversos modelos experimentais de inflamação por promover a resolução de alterações inflamatórias por diminuir a ativação de NF- κ B e a secreção de TNF- α e IL-6 (Rahman, Bhattacharya et al. 2008, Ishida, Yoshida et al. 2010, Bento, Claudino et al. 2011, Wang, Gong et al. 2011).

RvD2

A Resolvin D2 (Serhan, Hong et al. 2002) tem sido estudada em diferentes modelos pré-clínicos, apresentando resultados positivos e estimulando fortemente seu potencial terapêutico. Nos modelos de sepse bacteriana apresenta a combinação incomum de atividade antiinflamatória e antimicrobiana, pois provoca a diminuição da produção de citocinas e do infiltrado de leucócitos, estimula o influxo de macrófagos e sua atividade fagocítica facilitando a remoção de células mortas e de micróbios patogênicos, atuando assim via múltiplos alvos celulares, estimulando a resolução da inflamação e da infecção e preservando a imunovigilância (Spite, Norling et al. 2009, Li, Leong et al. 2013). A RvD2 e o precursor 17(R)HDHA, em um modelo animal de colite, também apresentaram efeitos antiinflamatórios como a diminuição do infiltrado de leucócitos, e a diminuição nos níveis de citocinas quimiocinas e moléculas de adesão, além de diminuir a expressão de NF- κ B, com conseqüente melhora dos sinais da doença. Curiosamente, também foi demonstrado que sua ação não depende do receptor ALX/FPR2 *in vitro* e *in vivo* (Bento, Claudino et al. 2011).

A RvD2 também foi descrita num modelo de dano vascular, em que demonstrou reduzir as conseqüências locais do dano ao endotélio vascular, e prevenir a aderência de PMNs à parede dos vasos sanguíneos impedindo a ligação entre as selectinas; num modelo de ratos submetidos a queimaduras, em que restaura a motilidade de neutrófilos e aumenta dramaticamente a sobrevivência do animal, e como um inibidor da dor causada por inflamação (Park, Xu et al. 2011, Kurihara, Jones et al. 2013, Miyahara, Runge et al. 2013).

2 Hipótese

Baseado nas premissas de que o tumor é mantido por um estado pró-inflamatório, as resolvinas RvD2 e 17(R)HDHA, potentes mediadores lipídicos pró-resolução da inflamação, poderiam representar uma alternativa relevante no tratamento dos gliomas. Ademais, considerando a natureza lipofílica destes mediadores, o acesso ao tumor poderia ser bastante favorecido.

3 Objetivos

Geral

Avaliar o potencial antitumoral das resolvinas RvD2, e 17(R)HDHA em glioma de camundongo.

Específicos

1. Avaliar a citotoxicidade *in vitro* das resolvinas em células de glioma murino GL261.
2. Avaliar o tipo de morte envolvido, por apoptose ou necrose.
3. Avaliar a expressão de receptores de resolvinas nas células do tumor *in vitro* e *in vivo*.
4. Observar o comportamento do glioma implantado em camundongos frente à terapia com resolvinas RvD2 e seu precursor 17(R)HDHA.

4 Justificativa

Glioblastoma multiforme é um câncer de baixa sobrevida e possui poucas alternativas de tratamento. As resolvinas seriam um possível novo tratamento a ser desenvolvido para esse câncer.

5 Manuscrito

Resolvin D2 and its precursor 17(R) HDHA induce cell death on murine glioma

Laura Trevizan Corrêa¹, Ana Paula Duarte de Souza¹, Fabio Luiz Dal Moro Maito², Natalia Fontanela Nicolleti³, Rodrigo Braccini³, Rodrigo Dorneles Silva⁴, Maria Martha Campos³, Cristina Beatriz Bonorino⁴ and Rafael Fernandes Zanin⁵.

1 Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil.

2 Laboratório de Patologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil.

3 Laboratório de Farmacologia Aplicada, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil.

4 Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil.

5 Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Unilassale, Canoas, RS, Brasil.

Abstract

Glioblastoma multiform (GBM) is highly aggressive tumor from Central Nervous System and few therapies are available. In GBM, NF- κ B and STAT3 are aberrantly activated and associated with cell proliferation, survival, invasion and chemotherapy resistance. Consequently, inhibition of STAT3 and NF- κ B has been suggested as a strategy to combat malignant cells. Resolvins of D series promoted resolution of inflammatory decreasing the activation of NF- κ B. We hypothesized that resolvins by NF- κ B inhibition could impair glioma growth. Our objective was to evaluate the role of Resolvin D2 (RvD2) and its precursors 17(R)HDHA (HR17) on tumor cell proliferation and survival in a glioma murine model. We found that RvD2 induced apoptosis of GL261 *in vitro*. Furthermore, RvD2 and HR17 *in vivo* treatment increased the number of caspase-3 activated tumor positive cells, though did not affect tumor area. Interestingly, HR17 treatment reduced tumor mitotic index *in vivo*. These results suggested that RvD2 and HR17 have a potential role in inducing apoptosis in murine glioma cells.

Key words: Glioblastoma, Resolvin, RvD2, 17(R)HDHA.

Introduction

Glioma remains a challenge to oncologists in consequence of the highly aggressive nature of the tumor. Patients with Glioblastoma Multiform (GBM) present a low life expectative due to tumor cells proliferative and infiltrative capacity and radiotherapy resistance (Bao, Wu et al. 2006, Ciardiello and Tortora 2008, Oszvald, Guresir et al. 2012, Diaz-Miqueli and Martinez 2013). Therefore, it is necessary to identify new therapies to combat the tumor, increasing patient survival and quality life. Inflammation is evident in some cases in the early stages of neoplastic progression, and is proven to be able to promote the development of incipient neoplasias (de Visser, Eichten et al. 2006, Qian and Pollard 2010). Studies have demonstrated the potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), in the treatment and prevention of various types of cancer, by reducing tumor proliferation or inducing cell death (Tsuji and DuBois 1995, Howe, Subbaramaiah et al. 2001, Shono, Tofilon et al. 2001).

Pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF are associated with signaling pathways related to increased proliferation, migration and invasion of a variety of tumors (Grivennikov and Karin 2010). Among the signaling pathways that respond well to TNF- α and IL-6, the most activated components in tumors are the transcription factors NF- κ B (Lee, Herrmann et al. 2009, Grivennikov and Karin 2010). They have been detected in their active forms in many types of tumors, including breast, colon, gastric, lung, skin, prostate, and glioma among others (Grivennikov and Karin 2010, Zanotto-Filho, Braganhol et al. 2012).

In GBM, the transcription factors NF- κ B and STAT3 are aberrantly activated and associated with cell proliferation, survival, invasion and chemotherapy resistance (McFarland BC 2013). Consequently, inhibition of NF- κ B has been suggested as a strategy to combat malignant cells. In addition, it has been demonstrated in a model of glioblastoma in mice, that inhibition of NF- κ B prolong animal survival (Karin 2006, Grivennikov and Karin 2010, McFarland BC 2013). Resolvins of D series show beneficial results in experimental models of inflammation by promoting resolution of inflammatory decreasing NF- κ B activation and the secretion of TNF- α and IL-6 (Rahman, Bhattacharya et al. 2008, Ishida, Yoshida et al. 2010, Bento, Claudino et al. 2011, Wang, Gong et al. 2011). Therefore, we hypothesized that resolvins by NF- κ B inhibition could impair glioma tumor grow. So, the aim of this study was to evaluate the role of resolvin D2 and its precursors 17(R)HDHA on tumor cell proliferation and survival on glioma mouse model.

Methods

Cell lines

Murine glioma cell line GL261 was kindly provided by Dra. Fernanda Bueno Morrone (Laboratory of Pharmacology – PUCRS). GL261 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Cultilab, Campinas SP-BRA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Laborclin, Pinhais PR-BRA) at 37°C atmosphere of 5% CO₂.

Animals

A total of 24, eight to nine-week-old, male C57BL/6 were used on research. Cembe (Centro de Modelos Biológicos e Experimentais – PCURS) provided the Mice. This study had the consent of Ethics Committee on Animal Research (CEUA-PUCRS) (protocol 14/00394). The model of glioblastoma was obtained by stereotactic surgery where 2.7×10^5 GL261 cells were injected on the striatum of mice brain (2 mm left side, 3 mm below) (Bernardi, Braganhol et al. 2009). Six days after implantation, mice were divided into three treatment groups and two control groups. Resolvins groups of 4 animals were used for each RvD2 and 17(R)HDHA treatment at doses of 80 η g of the compound diluted in ethanol 99,8% (Cayman Chemical Company, USA) every 4 days for 14 days, intrathecally (between L5 and L6). A group of 4 animals was also treated with Temozolamide (Shering-Plough Corporation, USA) (10mg/kg) via i.p., from the 7^o day to 18^o, in alternated days. For the control group, it was injected only the vehicle treatment, absolute ethanol (Synth®, BRA) and PBS1x (Phosphate Buffer Saline 1X) (Dinâmica, BRA), and three animals were destined to *sham* intended. Mice after the cells implantation were monitored daily and euthanized 20 days later. The brains were removed for histological analysis.

In vitro assays

GL261 cells were seeded in 24 well plates (5×10^4 cells/well) in DMEM supplemented with 5% heat-inactivated FBS. After 24hs, the cells were treated with 900 nM of the Resolvin D2 (RvD2) or its precursors 17(R)HDHA (HR17); and with 150 μ M of Temozolamide for positive cell

death control. After 24h, the cells were collected for analysis of cell death. Cell death was analyzed staining the cells with Annexin V-FITC and Propidium Iodide (PI) using the kit ApopNexin™ FITC (Millipore Merck, SP-BRA) following the manufacture instructions. Cells were acquired in FACS Canto II (BD Bioscience) and analyzed in FlowJo software (TreeStar).

Real Time PCR

RNA from treated cells was extracted using RNAeasy kit (Qiagen, EUA). cDNA was obtained using Sensiscript Reverse Transcription kit (Qiagen). Relative Real Time PCR was carried out on the equipment StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems), with StepOne Software 2.3 program, using primers 20x TaqMan® Experimental Gene Assay, for the targets FPR2 (Mm00484464_S1), CmKlr1 (Mm02619757_S1), LTb4R1 (Mm02619879_S1), STAT3 (Mm01219775_m1), NFκB (Mm00476361_m1), and β-actin (4352933 1009033, Applied Biosystems) as constitutive gene for endogenous expression control.

Tumor Histologic Analysis

Tissue was processed, embedded in paraffin, and 5μm sections were cut, and slides spanning the tumor were stained with hematoxylin and eosin (H&E). At least four H&E sections from each animal were analyzed by a pathologist, blinded for the experimental data. Each brain was divided in coronal section on two parts, frontal (A) and distal (B), each part was submitted for two sections of 5μm, with a distance of 400μm. For tumor size quantification, images were captured using a digital camera connected to a microscope (Olympus BX50) and the tumor area (mm²) was determined using Image AxioVision Microscopy Software. The size of the tumor was computed by area analyses (mm²) of slice sections with use of Axiovision 4.7.1 Software (Morrone, Oliveira et al. 2006).

To determinate cell death section were stained with antibodies anti-Activated Caspase 3 (Millipore) (1:200). For analyses of slide stained with anti- Activated Caspase 3, were made photos of 10 independent high-magnifications (x400) fields per microscope slide, and analyzed for each animal counting the percentage of positive glioma cytoplasm cells. Sections of human prostate were used as positive control.

Statistical Analysis

Results are presented as mean \pm standard error of the mean. Data analysis is performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test. P values <0.05 are considered significant.

Results

RvD2 induced apoptosis in GL261 in vitro

In order to test the effect of RvD2 in inducing cell death we treated GL261 *in vitro* with 900 nM of RvD2 for 24h. After the treatment cells demonstrated typical morphology changes of death in comparison with the control (Figure 1A). Subsequently, we asked whether RvD2 was inducing apoptosis in those cells. To confirm that cells were staining with apoptosis the marker Annexin V. Our results demonstrated that RvD2 treatment increased the frequency of GL261 Annexin V positive cells 26-fold against the control (Figure 1B and C) indicating that RvD2 induced apoptosis in those cells. We did not find increased percentage of Propidium Iodide positive cells, suggesting the RvD2 is inducing mainly apoptosis and not necrosis.

GL261 expressed RvD2 receptors

RvD2 could perform its effect binding to different lipid mediator's receptors, which are mostly lipoxin receptor (ALX/FPR2), chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and leukotriene B4 (LTb4R1). We verified the expression of these receptors on GL261 by real time PCR. GL261 indeed expressed all the receptors tested, as demonstrated on Figure 2A. We also compared the expression of the receptors in GL261 with mouse peritoneal macrophages; a common immune cell, which is known to express these receptors and be regulated by them. Our results suggested that GL261 expressed similar RNA amount of ALX/FPR2 and CMKLR1 to macrophages (Figure 2B). Conversely, GL261 expressed 0.8-fold more LTb4R1 compared to macrophages as demonstrated in Figure 2B.

HR-17 reduced mitotic index in vivo

We further investigated if RvD2 reduce tumor grow *in vivo* since it presented an apoptotic effect *in vitro*. Together, we tested the effect of HR17, a precursor in pathway of biosynthesis of D-series resolvins, which can be converted *in vivo* in RvD1 or RvD2 in the presence of hydrolase. We implanted GL261 into the striatum of mice brain and after 6 days we treated intrathecally with 80ng of RvD2 and HR17 every 4 days until 20 days of tumor growth. We also treated with temozolamide

as a positive control. The slides were analyzed blinded by a pathologist and we found that implanted tumors have characteristics similar to human glioblastomas, showing important aggressive markers like: high mitotic index, nuclear pleomorphism, tumor cell infiltration, foci of tumor necrosis and vascular proliferation, as showed on Figure 3A. On Figure 3 B and C is demonstrated the tumor size of a control (B) and a HR17 treated.

Tumor treated with RvD2 and HR17 presented lower necrosis and vascular proliferation comparing to controls as described on Figure 3 D. These data suggested less aggressiveness of these treated tumors. Furthermore, tumors treated with HR17 also presented lower irregular margin and different tumor sites Figure 3 D. Interestingly, tumors treated with HR17 showed a significant reduction of mitotic index comparing to controls. Reduction of mitotic index of the tumor cells caused by HR17 treatment was similar to the reduction caused by temozolamide treatment Figure 3 D. These results indicated that HR17 treatment is reducing tumor cell proliferation. This effect could be associated with RvD2, since HR17 could be converted in RvD2 and RvD1.

It was also analyzed the percentage of the tumor area in relation to the total mice brain area. Unexpectedly, we did not found any significant difference between the treatments and the control regarding the tumor area reduction as showed on Figure 4.

RvD2 and HR17 induced activated caspase-3 in vivo

As RvD2 showed *in vitro* induction of apoptosis, we also investigated if the treatment with RvD2 and its precursor, HR17, cause cell death by apoptosis *in vivo*. In order to verify that, tumor slides were stained with activated caspase-3 antibody. Results showed that RvD2 treatment presented significant higher percentage of activated caspased-3 positive cells comparing to control ($p < 0.05$) (Figure 4 A, B and D). In addition, treatment with HR17 presented an even higher percentage of positive cells comparing to RvD2 treatment and control (Figure 4 C and D). These results suggested that definitely RvD2 induced cell death by apoptosis *in vivo*; however the HR17 is a more efficient treatment to cause this effect.

Discussion

Here we demonstrated that RvD2 induced apoptosis of GL261 *in vitro*. In addition, RvD2 and HR17 treatment *in vivo* increased the number of caspase-3 activated positive tumor cells, though did not affect tumor area. Interestingly, HR17 reduced tumor mitotic index *in vivo*.

Other anti-inflammatory mediators have demonstrated anti-tumor effects, such as lipoxin A4 (LXA4), which increased apoptosis *in situ* and inhibited the infiltration of macrophages in hepatocarcinoma tumor tissue, causing the inhibition of VEGF (vascular endothelial growth factor) and HIF1- α (hypoxia-inducible factor) (Chen, Hao et al. 2010). In our study, we found that RvD2 induced apoptosis of GL261 *in vitro* by increasing Annexin-V positive cells and *in vivo* by increasing Activated caspase-3 positive cells. We believed that RvD2 binding to metabotropic receptors expressed on GL261 mediated these effects. However, still need to be investigated which receptor RvD2 binds on this present model by blocking specifically each one, interestingly, in a colitis model, RvD2 don't show dependence action from ALX/FPR2 receptor, so the action can be by different cellular targets and receptors (Bento, Claudino et al. 2011). HR17 *in vivo* treatment showed more robust increased of activated caspases-3 tumor positive cells comparing to RvD2 and these results could be attributed to a direct effect of HR17 triggering a different target or a synergic effect of RvD1, since HR17 could be converted in RvD2 and RvD1. In addition, HR17 treatment presented reduction of tumor mitotic index, indicating a cell proliferation modulation, which RvD2 treatment did not present. These results suggested that HR17 might have a mechanism of action distinct from RvD2.

Histopathology, tumor biology, molecular profiles, and invasiveness are all important characteristics to preserve in order to replicate glioma behavior *in vivo*. Histological diagnosis is very important to patient prognosis and it is based on strict tumor characteristics: nuclear atypia and mitotic activity (Association 2014, Oh, Fakurnejad et al. 2014). Proliferation rate of glioma, reflected in their mitotic index, increases progressively from low to high grade. (Walker, Baborie et al. 2011). HR17 reduced more number of histological aggressive markers than RvD2, especially tumor mitotic index; this is one of the most important finding in our study. Consequently, we believed HR17 could be a more potential future glioma treatment.

The amount of drug that can be administered to patients is limited by its high systemic toxicity and numerous side effects. In addition, an endothelial cell monolayer, associated with pericytes and astrocytes, known as the blood–brain barrier, separates the blood from the cerebral

parenchyma and limits the penetration of drugs into the CNS (Brigger, Dubernet et al. 2002, Beduneau, Saulnier et al. 2007). Therefore, it is important to study other treatment alternatives. In our study, although RvD2 and HR17 induced apoptosis *in vivo*, it did not reduce the tumor area. The narrow effect of the treatment over the tumor size maybe associated with the low drug dose concentration administrated. However, we could not increase the dose due to volume limitation of the administration route used and to resolvin vehicle, alcohol that has CNS effects. We could choose other systemic drug administration route, however it would difficult to predict the precise amount of resolvins was reaching the CNS. The use of polymeric nanocapsules was described to increased the intratumoral bioavailability of indomethacin and reduce the growth of implanted glioma (Bernardi, Braganhol et al. 2009). So, one solution to optimize the concentration and improve the effect of resolvin treatment might be the use of nanocapsules or other new drug delivery system.

It is demonstrate protective actions of resolvins of the D series in chronic and acute inflammatory diseases such as peritonitis, ischemia and sepsis. These resolvins action involve both limitation of PMN infiltration and increased phagocytosis by macrophages (Krishnamoorthy, Recchiuti et al. 2010). There is an early relation between inflammation and proliferation capacity of the tumor, so we have to find the better time point that predate the formation of pro-tumoral inflammation microenvironment. Maybe the resolvins, like other lipidic mediators, have an exactly time to act with effectiveness within the course of inflammation process. Moreover, tumors are typically infiltrated predominantly by macrophages and lymphocytes, and other immune cells (Wei, Wu et al. 2011, Ye, Xu et al. 2012). This infiltration of immune cells can be analyzed and indicates if it is happening or an antitumor immune response, even if the tumor suppressed the immune response (de Souza and Bonorino 2009). One study showed that M2 phenotype macrophage, an anti-inflammatory cell, accumulate in experimental glioma (Gabrusiewicz, Ellert-Miklaszewska et al. 2011). So, other variable need to be analyzed is the relation resolvin-macrophages-tumor.

NF- κ B is involved in mediating the inflammatory and immune response, are also linked to many cancers, including GBM (McFarland BC 2013). Importantly, IL-6 and TNF- α are constantly produced in the tumor microenvironment, both in tumor cells and infiltrating immune cells, which results in chronic activation of NF- κ B in an autocrine and paracrine manner (Karin 2006, McFarland BC 2013). The action of resolvins through their receptors could modulate this transcription factor. *In vivo* expression of resolvins receptors and the transcription factors may change, and we still need to investigate that in our model.

We concluded based in our findings that RvD2 and HR17 have a potential role in inducing apoptosis in murine glioma cells.

Conflict of interest

We have no conflict of interest to declare.

Acknowledgments

Dra. Fernanda Bueno Morrone, Taiane Santos Garcia, Giordano Cabral de Macedo Braga.

Technical assistance

Luciana Adolfo Ferreira

Figures

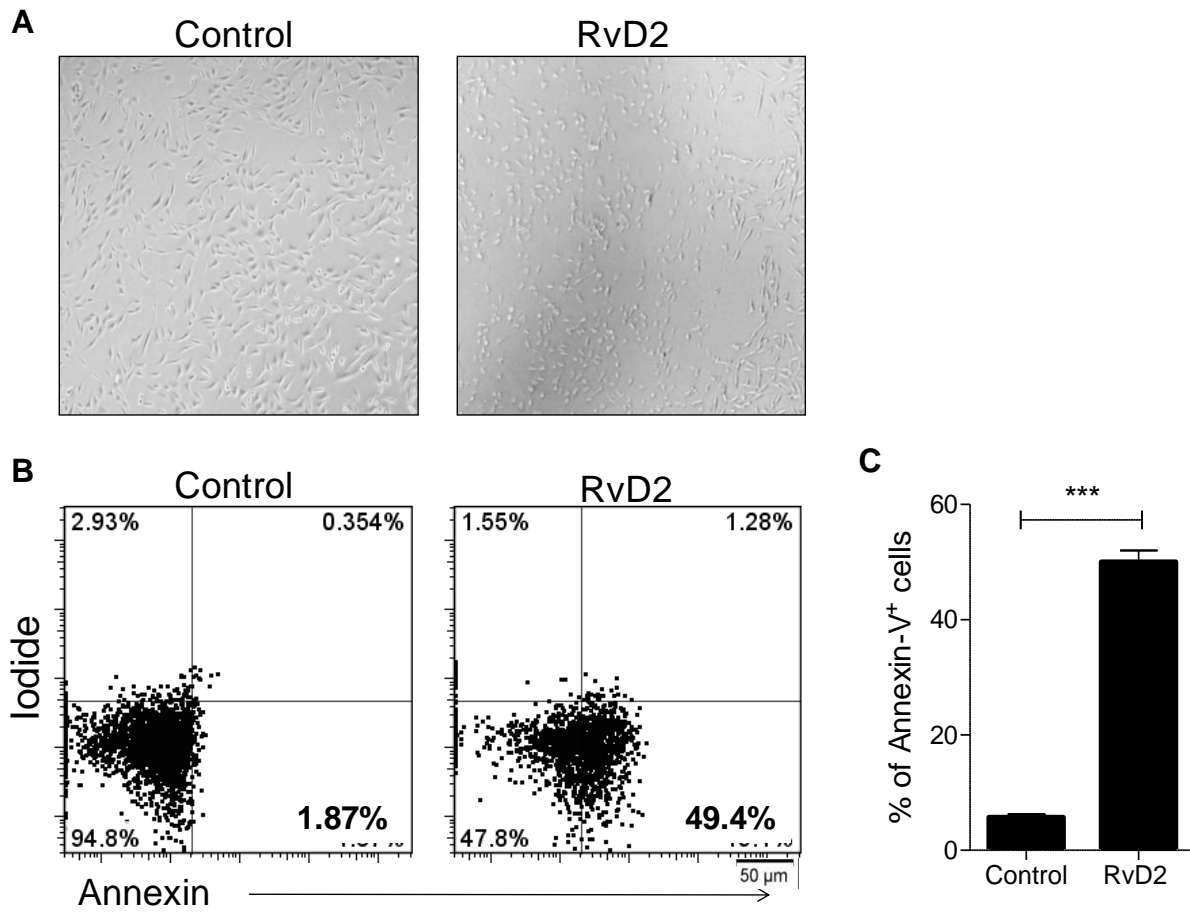


Figure 1: *GL261* Cell death analysis after *in vitro* resolvin treatment. Cells were treated with 900nM of Resolvin D2 (RvD2) for 24h, and then staining with Annexin V and Propidium Iodide (PI). Cells treated showed morphology changes (A); Flow cytometric graphs showing the frequency of Annexin V and PI positive cells (B and C), $p < 0.0001$.

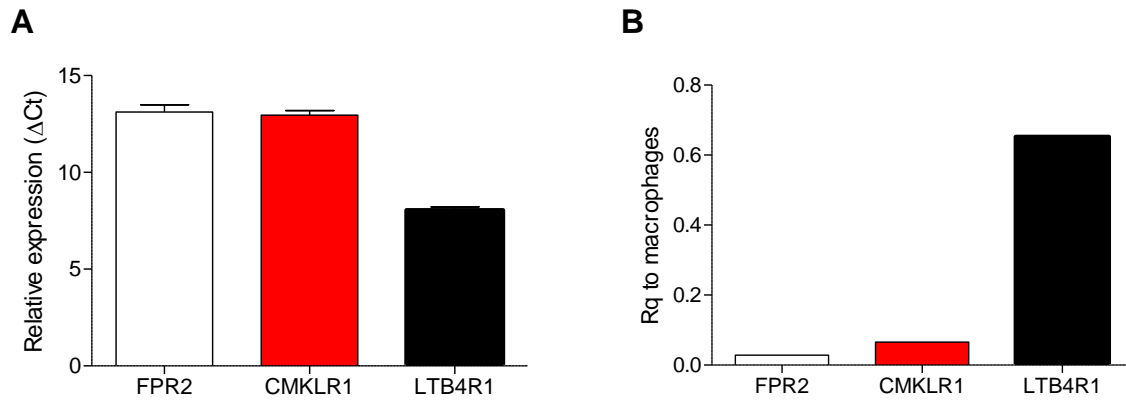
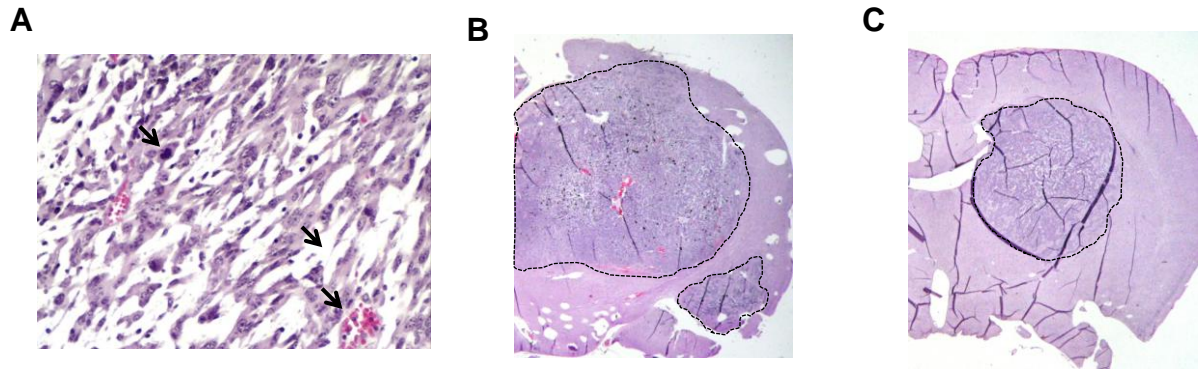


Figure 2: *Resolvin receptors expression in GL261 and macrophages.* (A) relative expression of FPR2, CMKLR1 and LTB4R1 mRNA. (C) Comparative expression of the receptors between GL261 and macrophages.



D

	Control (n=4)	RvD2 (n=4)	HR17 (n=4)	Temozolamide (n=4)
Irregular margin	02/04 (50%)	02/04 (50%)	01/04 (25%)	02/04 (50%)
Necrosis	04/04 (100%)	03/04 (75%)	03/04 (75%)	02/04 (50%)
Vascular proliferation	04/04 (100%)	02/04 (50%)	01/04 (25%)	02/04 (50%)
Diferent tumor sites	02/04 (50%)	02/04 (50%)	01/04 (25%)	01/04 (25%)
Mitotic index	6.85 ±1.605	5.60 ±0.739	4.32 ±1.072*	3.70 ±0.559**

Figure 3: Histopathological characteristics of mouse glioblastoma. Representative slide of tumor histopathological characteristic: atypical mitosis, necrosis and vascular proliferation (A). Tumor size on control (B) and on HR17 treated tumor (C). The histological variables (irregular margin, necrosis, vascular proliferation and different sites) were regarded as present or absent. Mitosis was counted in ten high power field (HPF) of the periphery of the tumor, and the average of this counting was used as mitotic index (mean ±S.D) (D). *Significant different from the control ($p < 0.005$). **Significant different from the control ($p < 0.005$).

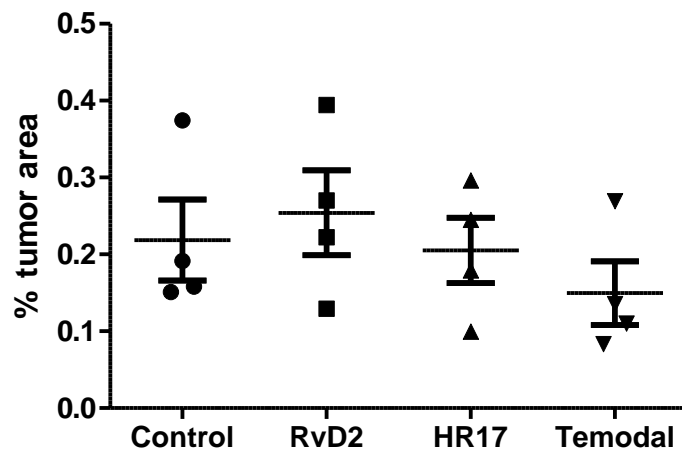


Figure 4: *Tumor size.* Measured as described methods section; One way Anova $p=0,5148$.

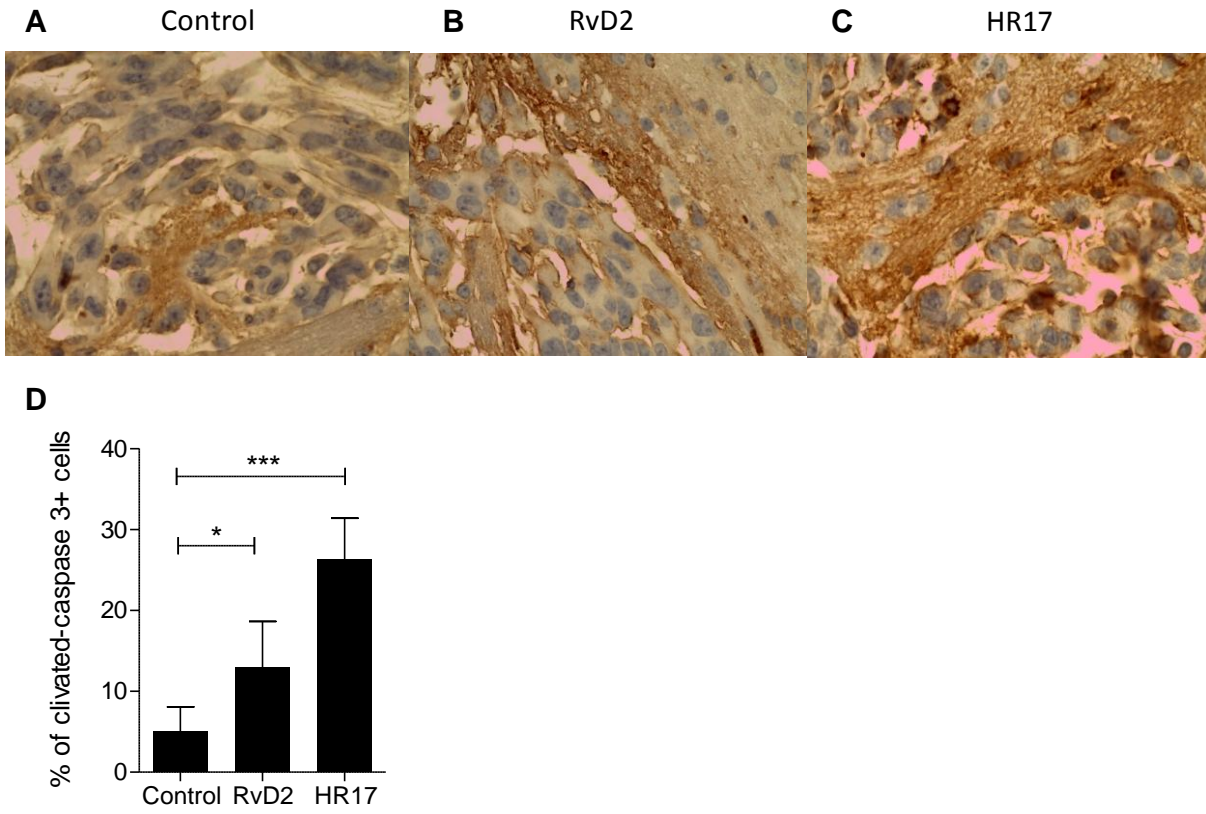


Figure 5: *Immunohistochemical staining of activated caspases-3 in implanted gliomas.* The sections of implanted mouse glioma were stained with activated caspases-3, as described. Intense staining of activated caspases-3 is seen in the cytoplasm of tumor cells. Representative pictures of immunohistochemical analysis in mouse implanted with gliomas (control group) (a) and in mouse implanted with gliomas and treated with RvD2 (B) and HR17(C); quantification of staining (D); One way ANOVA, $p < 0.0001$.

Reference

1. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756-60.
2. Ciardiello F, Tortora G. Drug therapy: EGFR antagonists in cancer treatment. *New Engl J Med*. 2008;358(11):1160-74.
3. Oszvald A, Guresir E, Setzer M, Vatter H, Senft C, Seifert V, et al. Glioblastoma therapy in the elderly and the importance of the extent of resection regardless of age. *J Neurosurg*. 2012;116(2):357-64.
4. Diaz-Miqueli A, Martinez GS. Nimotuzumab as a radiosensitizing agent in the treatment of high grade glioma: challenges and opportunities. *Oncotargets Ther*. 2013;6:931-42.
5. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51.
6. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(1):24-37.
7. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*. 1995;83(3):493-501.
8. Howe LR, Subbaramaiah K, Brown AM, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocrine-related cancer*. 2001;8(2):97-114.
9. Shono T, Tofilon PJ, Bruner JM, Owolabi O, Lang FF. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: Prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res*. 2001;61(11):4375-81.
10. Grivennikov SI, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine & growth factor reviews*. 2010;21(1):11-9.
11. Lee H, Herrmann A, Deng JH, Kujawski M, Niu G, Li Z, et al. Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer Cell*. 2009;15(4):283-93.
12. Zanutto-Filho A, Braganhol E, Edelweiss MI, Behr GA, Zanin R, Schroder R, et al. The curry spice curcumin selectively inhibits cancer cells growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2012;23(6):591-601.
13. McFarland BC HS, Rajbhandari R, Twitty Jr. GB, Gray GK, Yu H, ETTY N. Benveniste, Susan E. Nozell. NF-kB-Induced IL-6 Ensures STAT3 Activation and Tumor Aggressiveness in Glioblastoma. *Plos One*. 2013;8(11):12.
14. Karin M. NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets. *Mol Carcinog*. 2006;45(6):355-61.
15. Wang B, Gong X, Wan JY, Zhang L, Zhang Z, Li HZ, et al. Resolvin D1 protects mice from LPS-induced acute lung injury. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2011;24(4):434-41.
16. Ishida T, Yoshida M, Arita M, Nishitani Y, Nishiumi S, Masuda A, et al. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium-induced colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2010;16(1):87-95.
17. Rahman MM, Bhattacharya A, Fernandes G. Docosahexaenoic acid is more potent inhibitor of osteoclast differentiation in RAW 264.7 cells than eicosapentaenoic acid. *J Cell Physiol*. 2008;214(1):201-9.
18. Bento AF, Claudino RF, Dutra RC, Marcon R, Calixto JB. Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice. *J Immunol*. 2011;187(4):1957-69.
19. Bernardi A, Braganhol E, Jager E, Figueiro F, Edelweiss MI, Pohlmann AR, et al. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer letters*. 2009;281(1):53-63.

20. Morrone FB, Oliveira DL, Gamermann P, Stella J, Wofchuk S, Wink MR, et al. In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC cancer*. 2006;6:226.
21. Chen Y, Hao H, He S, Cai L, Li Y, Hu S, et al. Lipoxin A4 and its analogue suppress the tumor growth of transplanted H22 in mice: the role of antiangiogenesis. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(8):2164-74.
22. Oh T, Fakurnejad S, Sayegh ET, Clark AJ, Ivan ME, Sun MZ, et al. Immunocompetent murine models for the study of glioblastoma immunotherapy. *Journal of translational medicine*. 2014;12:107.
23. Association ABT. *Glioblastoma and Malignant Astrocytoma*. 2014.
24. Walker C, Baborie A, Crooks D, Wilkins S, Jenkinson MD. Biology, genetics and imaging of glial cell tumours. *The British journal of radiology*. 2011;84 Spec No 2:S90-106.
25. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced drug delivery reviews*. 2002;54(5):631-51.
26. Beduneau A, Saulnier P, Benoit JP. Active targeting of brain tumors using nanocarriers. *Biomaterials*. 2007;28(33):4947-67.
27. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Yacoubian S, Lee CH, Yang R, et al. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(4):1660-5.
28. Ye XZ, Xu SL, Xin YH, Yu SC, Ping YF, Chen L, et al. Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF-beta1 signaling pathway. *Journal of immunology*. 2012;189(1):444-53.
29. Wei J, Wu A, Kong LY, Wang Y, Fuller G, Fokt I, et al. Hypoxia potentiates glioma-mediated immunosuppression. *Plos One*. 2011;6(1):e16195.
30. de Souza AP, Bonorino C. Tumor immunosuppressive environment: effects on tumor-specific and nontumor antigen immune responses. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2009;9(9):1317-32.
31. Gabrusiewicz K, Ellert-Miklaszewska A, Lipko M, Sielska M, Frankowska M, Kaminska B. Characteristics of the alternative phenotype of microglia/macrophages and its modulation in experimental gliomas. *Plos One*. 2011;6(8):e23902.

6 Considerações finais

Segundo a literatura, a origem celular de gliomas continua sendo um tema aberto. Uma hipótese é que surgem a partir da transformação neoplásica e da diferenciação de células maduras da glia, oligodendrócitos, astrócitos e células ependimais, dando origem a tumores que se assemelham a estas células. Atualmente, nenhuma classificação histopatológica nem caracterização genética molecular tem sido capaz de prever ou explicar a resistência apresentada pela maior parte dos gliomas à radioterapia e quimioterapia, e ainda a recidiva precoce daqueles que não respondem à terapia.

Neste estudo demonstramos o papel da resolvina RvD2 e de seu precursor HR17 na indução da apoptose das células de glioma. Um dos resultados mais promissores do estudo foi a redução dos

marcadores histológicos de agressividade do tumor em consequência do tratamento com HR17, especialmente o índice mitótico.

Desta forma, nós podemos propor o uso de resolvinas e seu precursor HR17 como um tratamento para uso após ressecção cirúrgica para inibir o crescimento de células resistentes. E para comprovar a ação antitumoral das resolvinas da série D, devem-se realizar testes com maior n de animais de experimento.

7 Referências

Association, A. B. T. (2014). Glioblastoma and Malignant Astrocytoma.

Bao, S., Q. Wu, R. E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A. B. Hjelmeland, M. W. Dewhirst, D. D. Bigner and J. N. Rich (2006). "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response." *Nature* **444**(7120): 756-760.

Beduneau, A., P. Saulnier and J. P. Benoit (2007). "Active targeting of brain tumors using nanocarriers." *Biomaterials* **28**(33): 4947-4967.

Bento, A. F., R. F. Claudino, R. C. Dutra, R. Marcon and J. B. Calixto (2011). "Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice." *J Immunol* **187**(4): 1957-1969.

Bernardi, A., E. Braganhol, E. Jager, F. Figueiro, M. I. Edelweiss, A. R. Pohlmann, S. S. Guterres and A. M. Battastini (2009). "Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model." *Cancer Lett* **281**(1): 53-63.

Bonecchi, R., M. Locati and A. Mantovani (2011). "Chemokines and Cancer: A Fatal Attraction." *Cancer Cell* **19**(4): 434-435.

Brigger, I., C. Dubernet and P. Couvreur (2002). "Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis." *Adv Drug Deliv Rev* **54**(5): 631-651.

Chen, Y., H. Hao, S. He, L. Cai, Y. Li, S. Hu, D. Ye, J. Hoidal, P. Wu and X. Chen (2010). "Lipoxin A4 and its analogue suppress the tumor growth of transplanted H22 in mice: the role of antiangiogenesis." *Mol Cancer Ther* **9**(8): 2164-2174.

Ciardello, F. and G. Tortora (2008). "Drug therapy: EGFR antagonists in cancer treatment." *New England Journal of Medicine* **358**(11): 1160-1174.

de Souza, A. P. and C. Bonorino (2009). "Tumor immunosuppressive environment: effects on tumor-specific and nontumor antigen immune responses." *Expert Rev Anticancer Ther* **9**(9): 1317-1332.

- de Visser, K. E., A. Eichten and L. M. Coussens (2006). "Paradoxical roles of the immune system during cancer development." Nature Reviews Cancer **6**(1): 24-37.
- DeNardo, D. G., P. Andreu and L. M. Coussens (2010). "Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity." Cancer Metastasis Rev **29**(2): 309-316.
- Diaz-Miqueli, A. and G. S. Martinez (2013). "Nimotuzumab as a radiosensitizing agent in the treatment of high grade glioma: challenges and opportunities." Oncotargets and Therapy **6**: 931-942.
- Fredman, G. and C. N. Serhan (2011). "Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution." Biochem J **437**(2): 185-197.
- Gabrusiewicz, K., A. Ellert-Miklaszewska, M. Lipko, M. Sielska, M. Frankowska and B. Kaminska (2011). "Characteristics of the alternative phenotype of microglia/macrophages and its modulation in experimental gliomas." PLoS One **6**(8): e23902.
- Grivennikov, S. I., F. R. Greten and M. Karin (2010). "Immunity, inflammation, and cancer." Cell **140**(6): 883-899.
- Grivennikov, S. I. and M. Karin (2010). "Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer." Cytokine Growth Factor Rev **21**(1): 11-19.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Hart, M. G., R. Garside, G. Rogers, K. Stein and R. Grant (2013). "Temozolomide for high grade glioma." Cochrane Database Syst Rev **4**: CD007415.
- Hong, S., K. Gronert, P. R. Devchand, R. L. Moussignac and C. N. Serhan (2003). "Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation." J Biol Chem **278**(17): 14677-14687.
- Howe, L. R., K. Subbaramaiah, A. M. Brown and A. J. Dannenberg (2001). "Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer." Endocr Relat Cancer **8**(2): 97-114.
- INCA, I. N. d. C. (2014). "Incidência de Câncer no Brasil, Estimativa 2014." from <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>
- Ishida, T., M. Yoshida, M. Arita, Y. Nishitani, S. Nishiumi, A. Masuda, S. Mizuno, T. Takagawa, Y. Morita, H. Kutsumi, H. Inokuchi, C. N. Serhan, R. S. Blumberg and T. Azuma (2010). "Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium-induced colitis." Inflamm Bowel Dis **16**(1): 87-95.
- Karin, M. (2006). "NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets." Mol Carcinog **45**(6): 355-361.
- Karnoub, A. E. and R. A. Weinberg (2006). "Chemokine networks and breast cancer metastasis." Breast Dis **26**: 75-85.

- Koshy, M., J. L. Villano, T. A. Dolecek, A. Howard, U. Mahmood, S. J. Chmura, R. R. Weichselbaum and B. J. McCarthy (2012). "Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries." J Neurooncol **107**(1): 207-212.
- Krishnamoorthy, S., A. Recchiuti, N. Chiang, S. Yacoubian, C. H. Lee, R. Yang, N. A. Petasis and C. N. Serhan (2010). "Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(4): 1660-1665.
- Kuraishy, A., M. Karin and S. I. Grivennikov (2011). "Tumor Promotion via Injury- and Death-Induced Inflammation." Immunity **35**(4): 467-477.
- Kurihara, T., C. N. Jones, Y. M. Yu, A. J. Fischman, S. Watada, R. G. Tompkins, S. P. Fagan and D. Irimia (2013). "Resolvin D2 restores neutrophil directionality and improves survival after burns." FASEB J **27**(6): 2270-2281.
- Laperriere, N., L. Zuraw, G. Cairncross and G. Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site (2002). "Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review." Radiother Oncol **64**(3): 259-273.
- Lee, H., A. Herrmann, J. H. Deng, M. Kujawski, G. Niu, Z. Li, S. Forman, R. Jove, D. M. Pardoll and H. Yu (2009). "Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors." Cancer Cell **15**(4): 283-293.
- Li, J., M. M. Leong, A. Stewart and M. A. Rizzacasa (2013). "Total synthesis of the endogenous inflammation resolving lipid resolvin D2 using a common lynchpin." Beilstein J Org Chem **9**: 2762-2766.
- Li, S., Y. Sun, C. P. Liang, E. B. Thorp, S. Han, A. W. Jehle, V. Saraswathi, B. Pridgen, J. E. Kanter, R. Li, C. L. Welch, A. H. Hasty, K. E. Bornfeldt, J. L. Breslow, I. Tabas and A. R. Tall (2009). "Defective phagocytosis of apoptotic cells by macrophages in atherosclerotic lesions of ob/ob mice and reversal by a fish oil diet." Circ Res **105**(11): 1072-1082.
- Lorenzoni, J., A. Torricco, P. Villanueva, A. Gederlini and G. Torrealba (2008). "Surgery for high-grade gliomas in a developing country: survival estimation using a simple stratification system." Surg Neurol **70**(6): 591-597; discussion 597.
- Louis, D. N., H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer and P. Kleihues (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." Acta Neuropathol **114**(2): 97-109.
- Mantovani, A. (2010). "Molecular Pathways Linking Inflammation and Cancer." Current Molecular Medicine **10**(4): 369-373.
- McFarland BC, H. S., Rajbhandari R, Twitty Jr. GB, Gray GK, Yu H, Eddy N. Benveniste, Susan E. Nozell (2013). "NF-kB-Induced IL-6 Ensures STAT3 Activation and Tumor Aggressiveness in Glioblastoma." PLOS ONE **8**(11): 12.
- Merched, A. J., K. Ko, K. H. Gotlinger, C. N. Serhan and L. Chan (2008). "Atherosclerosis: evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators." FASEB J **22**(10): 3595-3606.

- Miyahara, T., S. Runge, A. Chatterjee, M. Chen, G. Mottola, J. M. Fitzgerald, C. N. Serhan and M. S. Conte (2013). "D-series resolvins attenuates vascular smooth muscle cell activation and neointimal hyperplasia following vascular injury." *FASEB J* **27**(6): 2220-2232.
- Morrone, F. B., D. L. Oliveira, P. Gamermann, J. Stella, S. Wofchuk, M. R. Wink, L. Meurer, M. I. Edelweiss, G. Lenz and A. M. Battastini (2006). "In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model." *BMC Cancer* **6**: 226.
- Mousseau, M., C. Chauvin, M. F. Nissou, M. Chaffanet, D. Plantaz, B. Pasquier, R. Schaerer and A. Benabid (1993). "A study of the expression of four chemoresistance-related genes in human primary and metastatic brain tumours." *Eur J Cancer* **29A**(5): 753-759.
- Nazzaro, J. M. and E. A. Neuwelt (1990). "The role of surgery in the management of supratentorial intermediate and high-grade astrocytomas in adults." *J Neurosurg* **73**(3): 331-344.
- NCI, N. C. I. (2014). "SEER Stat Fact Sheets: Brain and other Nervous System Cancer.", from <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/brain.html#risk>.
- Oh, T., S. Fakurnejad, E. T. Sayegh, A. J. Clark, M. E. Ivan, M. Z. Sun, M. Safaei, O. Bloch, C. D. James and A. T. Parsa (2014). "Immunocompetent murine models for the study of glioblastoma immunotherapy." *J Transl Med* **12**: 107.
- Oszwald, A., E. Guresir, M. Setzer, H. Vatter, C. Senft, V. Seifert and K. Franz (2012). "Glioblastoma therapy in the elderly and the importance of the extent of resection regardless of age." *Journal of Neurosurgery* **116**(2): 357-364.
- Park, C. K., Z. Z. Xu, T. Liu, N. Lu, C. N. Serhan and R. R. Ji (2011). "Resolvin D2 is a potent endogenous inhibitor for transient receptor potential subtype V1/A1, inflammatory pain, and spinal cord synaptic plasticity in mice: distinct roles of resolvin D1, D2, and E1." *J Neurosci* **31**(50): 18433-18438.
- Qian, B. Z. and J. W. Pollard (2010). "Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis." *Cell* **141**(1): 39-51.
- Rahman, M. M., A. Bhattacharya and G. Fernandes (2008). "Docosahexaenoic acid is more potent inhibitor of osteoclast differentiation in RAW 264.7 cells than eicosapentaenoic acid." *J Cell Physiol* **214**(1): 201-209.
- Serhan, C. N. (2007). "Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways." *Annu Rev Immunol* **25**: 101-137.
- Serhan, C. N. (2009). Resolvins: Biotemplates for novel therapeutic interventions, Google Patents.
- Serhan, C. N. (2010). "Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not?" *Am J Pathol* **177**(4): 1576-1591.
- Serhan, C. N., N. Chiang and T. E. Van Dyke (2008). "Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators." *Nat Rev Immunol* **8**(5): 349-361.

Serhan, C. N., S. Hong, K. Gronert, S. P. Colgan, P. R. Devchand, G. Mirick and R. L. Moussignac (2002). "Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals." J Exp Med **196**(8): 1025-1037.

Serhan, C. N. and N. A. Petasis (2011). "Resolvins and protectins in inflammation resolution." Chem Rev **111**(10): 5922-5943.

Shono, T., P. J. Tofilon, J. M. Bruner, O. Owolabi and F. F. Lang (2001). "Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: Prognostic significance and molecular correlations." Cancer Research **61**(11): 4375-4381.

Spite, M., L. V. Norling, L. Summers, R. Yang, D. Cooper, N. A. Petasis, R. J. Flower, M. Perretti and C. N. Serhan (2009). "Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis." Nature **461**(7268): 1287-1291.

Spite, M. and C. N. Serhan (2010). "Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins." Circ Res **107**(10): 1170-1184.

Tabas, I. (2010). "Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis." Nat Rev Immunol **10**(1): 36-46.

Tewari, R., S. R. Choudhury, S. Ghosh, V. S. Mehta and E. Sen (2012). "Involvement of TNFalpha-induced TLR4-NF-kappaB and TLR4-HIF-1alpha feed-forward loops in the regulation of inflammatory responses in glioma." J Mol Med (Berl) **90**(1): 67-80.

Tsuji, M. and R. N. DuBois (1995). "Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2." Cell **83**(3): 493-501.

Walker, C., A. Baborie, D. Crooks, S. Wilkins and M. D. Jenkinson (2011). "Biology, genetics and imaging of glial cell tumours." Br J Radiol **84 Spec No 2**: S90-106.

Wang, B., X. Gong, J. Y. Wan, L. Zhang, Z. Zhang, H. Z. Li and S. Min (2011). "Resolvin D1 protects mice from LPS-induced acute lung injury." Pulm Pharmacol Ther **24**(4): 434-441.

Watters, J. J., J. M. Schartner and B. Badie (2005). "Microglia function in brain tumors." J Neurosci Res **81**(3): 447-455.

Wei, J., A. Wu, L. Y. Kong, Y. Wang, G. Fuller, I. Fokt, G. Melillo, W. Priebe and A. B. Heimberger (2011). "Hypoxia potentiates glioma-mediated immunosuppression." PLoS One **6**(1): e16195.

Weissenberger, J., S. Loeffler, A. Kappeler, M. Kopf, A. Lukes, T. A. Afanasieva, A. Aguzzi and J. Weis (2004). "IL-6 is required for glioma development in a mouse model." Oncogene **23**(19): 3308-3316.

Wolff, J. E., P. H. Driever, B. Erdlenbruch, R. D. Kortmann, S. Rutkowski, T. Pietsch, C. Parker, M. W. Metz, A. Gnekow and C. M. Kramm (2010). "Intensive chemotherapy improves survival in pediatric high-grade glioma after gross total resection: results of the HIT-GBM-C protocol." Cancer **116**(3): 705-712.

Ye, X. Z., S. L. Xu, Y. H. Xin, S. C. Yu, Y. F. Ping, L. Chen, H. L. Xiao, B. Wang, L. Yi, Q. L. Wang, X. F. Jiang, L. Yang, P. Zhang, C. Qian, Y. H. Cui, X. Zhang and X. W. Bian (2012). "Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF-beta1 signaling pathway." J Immunol **189**(1): 444-453.

Zanotto-Filho, A., E. Braganhol, M. I. Edelweiss, G. A. Behr, R. Zanin, R. Schroder, A. Simoes-Pires, A. M. Battastini and J. C. Moreira (2012). "The curry spice curcumin selectively inhibits cancer cells growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma." J Nutr Biochem **23**(6): 591-601.