MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - Unifal-MG

PAPEL DO WT161, INIBIDOR ESPECÍFICO DA HDAC6, SOBRE A PROGRESSÃO TUMORAL E INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA EM GLIOBLASTOMA

ALFENAS/MG

2025

LEILANE SALES DE OLIVEIRA

PAPEL DO WT161, INIBIDOR ESPECÍFICO DA HDAC6, SOBRE A PROGRESSÃO TUMORAL E INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA EM GLIOBLASTOMA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas-MG como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biociências Aplicadas à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Angel Maurício Castro Gamero
Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Aissa

ALFENAS/MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Oliveira, Leilane Sales de.
Papel do WT161, inibidor específico da hdac6, sobre a progressão tumoral e instabilidade cromossômica em glioblastoma / Leilane Sales de Oliveira. - Alfenas, MG, 2025.
156 f. : il. -

Orientador(a): Angel Mauricio Castro Gamero.
Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.
Bibliografia.

1. Glioblastoma. 2. HDAC6. 3. WT161. 4. Progressão tumoral. 5. Instabilidade Cromossômica. I. Gamero, Angel Mauricio Castro, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

LEILANE SALES DE OLIVEIRA

PAPEL DO WT161, INIBIDOR ESPECÍFICO DA HDAC6, SOBRE A PROGRESSÃO TUMORAL E INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA EM GLIOBLASTOMA

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Saúde

Aprovada em: 07 de fevereiro de 2025.

Prof. Dr. Angel Mauricio Castro Gamero
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade federal de Alfenas
UNIFAL-MG
Profa. Dra.Luciana Maria Silva
Instituição: Fundação Ezequiel Dias
FUNED
Prof. Dr. Társis Antônio Paiva Vieira
Instituição: Universidade Estadual de Campinas
UNICAMP
Profa. Dra. Andreia Machado Leopoldino
Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
USP
Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior
Instituição: Universidade Federal de Uberlândia
UFU

Documento assinado eletronicamente por **Angel Mauricio Castro Gamero, Presidente**, em 10/02/2025, às 08:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1441908** e o código CRC **F4B0385F**.

Dedico este trabalho a minha avó Lurdinha,
meu grande amor, exemplo de doação, zelo e força,
e ao meu avô Odim, quem sempre me chamou de
DOUTORA.

AGRADECIMENTOS

Por mais difícil que seja transformar sentimentos em palavras, não poderia deixar de registrar o quanto serei eternamente grata a vocês pelo estímulo intelectual e emocional imprescindíveis no sucesso deste trabalho.

A **Deus**, por me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos e colocar neles pessoas tão especiais, força para não desistir e proteção para me amparar em todos os momentos.

Em especial, sou inteiramente grata ao Prof. Dr. **Angel Maurício Castro Gamero** pela orientação, sua experiência e sabedoria foram fundamentais nessa conquista. Agradeço não apenas pelos ensinamentos acadêmicos, mas também o sentido de ética, responsabilidade e paixão pela pesquisa, que levarei comigo para além desta etapa. Reconheço a confiança depositada, o apoio e dedicação ao nosso trabalho. Você é uma inspiração pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. **Alexandre Aissa**, gratidão pela co-orientação neste Projeto. Muito obrigada pela disponibilidade e pelo profissionalismo. Seu apoio e sugestões foram muito importantes na elaboração desta Tese.

À Profa. Dra. **Marisa Ionta,** minha sincera admiração e gratidão pelos ensinamentos. Por estar à disposição, respondendo minhas dúvidas, incentivando e contribuindo para o enriquecimento da minha formação científica.

Ao Prof. Dr. **Luiz Gonzaga Tone** por nos ceder as linhagens celulares com as quais realizamos o Projeto.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e paciência em analisar este trabalho, discussões e sugestões que servirão para meu crescimento, aprendizado e incentivo à pesquisa.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde** agradeço a oportunidade e o privilégio que tive em frequentar este Doutorado que muito contribuiu para minha formação.

À secretária do Programa **Adriana Aparecida Pereira** por sua simpatia e atenção na administração dos nossos compromissos, sendo uma profissional extremamente competente e dedicada.

Ao amigo **João Marcos**, com quem dividi as tensões de todos os prazos, padronizações de protocolos e frustrações inerentes ao processo. Obrigada por ser essa pessoa incrível, disposto a ajudar em todos os momentos, na bancada ou emocionalmente, sempre tornando mais agradável qualquer situação.

Ao amigo **Rafa**, pelo suporte incansável e transmissão de confiança em todos os momentos. Você é uma pessoa iluminada, sua amizade e companheirismo diários são bençõs em minha vida.

Aos amigos, **Carlos, Hanna, Carol, Vinícius e Larissa,** pelo carinho, amizade e por tornarem meus dias mais leves e prazerosos e pela parceria no nosso "time", disponibilidade e apoio.

Em especial, aos meus pais, **Dedé** e **Leila**, e irmão **João Victor,** com o coração cheio de amor e reconhecimento, dedico este trabalho a vocês e me desculpo pelas ausências. Foram suas palavras de incentivo, sacrifícios silenciosos e amor incondicional que me deram forças para seguir em frente. Vocês me ensinaram o valor do trabalho duro e da resiliência, lições que levarei comigo para sempre.

Em especial, ao meu marido **Guilherme**, sua paciência, compreensão e encorajamento diários foram fundamentais para que eu pudesse seguir em frente, mesmo nos momentos mais desafiadores. Obrigada por ser meu apoio e por sua serenidade sempre. Que esta conquista seja uma das muitas que construiremos juntos.

À **FAPEMIG** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) agradeço o

incentivo, suporte financeiro e por acreditar no potencial deste estudo.

À **Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG**, agradeço a disponibilidade de instalações físicas e recursos que foram de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho. E minha gratidão se dá de forma especial por ser a instituição onde me graduei, desenvolvi meu mestrado e atualmente, exerço minhas atribuições de Farmacêutico-Bioquímico.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

"O primeiro gole do copo das ciências naturais o tornará um ateu. Mas, no fundo do copo, Deus estará esperando por você."

Werner Heisenberg
(Ganhador do Prêmio Nobel de Física, 1932)

RESUMO

O Glioblastoma (GBM) é considerado a forma mais agressiva e comum de tumores cerebrais em adultos, e de pior prognóstico com uma sobrevida média de cerca de quinze meses. Atualmente, o tratamento do GBM envolve ressecção cirúrgica seguido por radioterapia concomitante à administração de temozolomida (TMZ), porém a heterogeneidade genética e celular e/ou a falha das vias de reparo de DNA nesse tipo tumoral conferem elevada resistência ao quimioterápico. Dessa forma, faz-se necessário o aprimoramento das estratégias das terapias convencionais. O controle epigenético aberrante é um evento precoce da progressão tumoral, na qual a enzima histona desacetilase 6 (HDAC6) desempenha um papel crucial modulando a função de proteínas histônicas, além de proteínas não histônicas e fatores de transcrição tais como E2F, p53, c-Myc, NF-κB. Nesse contexto, surgem os inibidores de HDAC6 como possíveis agentes antitumorais, por exemplo o composto WT161, cujo potencial antiproliferativo tem sido evidenciado em alguns tipos de câncer, como retinoblastoma, osteosarcoma, mieloma múltiplo e câncer de mama. Assim, a presente pesquisa busca investigar a ação antitumoral de WT161 de forma isolada ou combinada com TMZ sobre a progressão tumoral e instabilidade cromossômica (CIN) em linhagens celulares de GBM, U251, U87 (sensíveis à TMZ) e T98G (resistente à TMZ). A avaliação da eficiência antiproliferativa de WT161 se deu utilizando o ensaio com MTT. Na análise de combinação de drogas foram empregadas diferentes estratégias de administração (simultânea e sequencial), baseadas no método de Chou-Talalay. WT161 diminuiu significativamente a proliferação celular das linhagens de GBM de forma isolada, e de forma sinérgica, quando combinado de forma simultânea com TMZ, para todas as células investigadas. Os ensaios de clonogenicidade mostraram que a capacidade das células formarem colônias foi eficientemente inibida pelo tratamento. De forma interessante, esses resultados ainda foram corroborados em modelos de cultura tridimensional (3D) das células U251 e T98G. Além disso, WT161 provocou apoptose e parada do ciclo celular na fase G2/M, além de reduzir significativamente a atividade migratória (2D e 3D) e invasiva das linhagens de GBM. Esses dados foram acompanhados com o aumento da expressão da proteína α-tubulina acetilada comprovando a efetiva inibição de HDAC6, aumento da clivagem da proteína marcadora de apoptose PARP e redução dos níveis de β-catenina, após exposição a WT161. Desde o ponto de vista cromossômico, WT161 induziu aumento significativo da quantidade de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas, metáfases desalinhadas e fusos multipolares, além de promover aneuploidia nas células T98G, identificados pelo ensaio de micronúcleos com bloqueio de citocinese, ensaio de erros

mitóticos, e hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), demonstrando o aumento da CIN dessas células após inibição de HDAC6. Finalmente, WT161 alterou a dinâmica metabólica da linhagem T98G. Destacamos assim, o importante papel biológico de HDAC6 sobre o fenótipo neoplásico, afetando especialmente os perfis de progressão tumoral e CIN, e apontamos o potencial terapêutico de WT161 como promissor agente anti-GBM.

Palavras-chaves: Glioblastoma; HDAC6; WT161; Progressão tumoral; Instabilidade Cromossômica

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is considered the most aggressive and common form of brain tumors in adults, with the worst prognosis, and an average survival of approximately fifteen months. Currently, GBM treatment involves surgical resection followed by radiotherapy concomitant with temozolomide (TMZ) administration. However, the genetic and cellular heterogeneity and/or DNA repair pathway failure in this tumor type confer high resistance to chemotherapy. Thus, improving conventional therapeutic strategies is necessary. Aberrant epigenetic control is an early event in tumor progression, where the histone deacetylase 6 (HDAC6) enzyme plays a crucial role by modulating the function of histone proteins, as well as non-histone proteins and transcription factors such as E2F, p53, c-Myc, and NF-κB. In this context, HDAC6 inhibitors have emerged as potential antitumor agents, such as the compound WT161, whose antiproliferative potential has been demonstrated in certain cancers, including retinoblastoma, osteosarcoma, multiple myeloma, and breast cancer. This research aims to investigate the antitumor effects of WT161, either alone or in combination with TMZ, on tumor progression and chromosomal instability (CIN) in GBM cell lines U251, U87 (TMZ-sensitive), and T98G (TMZ-resistant). The antiproliferative efficiency of WT161 was evaluated using the MTT assay. For drug combination analysis, different administration strategies (simultaneous and sequential) were employed, based on the Chou-Talalay method. WT161 significantly decreased the proliferation of GBM cell lines on its own and synergistically when combined simultaneously with TMZ in all investigated cells. Clonogenic assays showed that the cells' ability to form colonies was efficiently inhibited by the treatment. Interestingly, these results were further supported in three-dimensional (3D) culture models of U251 and T98G cells. Moreover, WT161 induced apoptosis and cell cycle arrest in the G2/M phase, as well as significantly reduced the migratory (2D and 3D) and invasive activity of GBM cell lines. These findings were accompanied by an increase in acetylated α-tubulin protein expression, confirming effective HDAC6 inhibition, an increase in cleaved PARP (a marker of apoptosis), and a reduction in β-catenin levels following WT161 exposure. From a chromosomal perspective, WT161 significantly increased the occurrence of micronuclei, nucleoplasmic bridges, misaligned metaphases, and multipolar spindles, in addition to promoting aneuploidy in T98G cells. These were identified through cytokinesis-block micronucleus assays, mitotic error assays, and fluorescence in situ hybridization (FISH), demonstrating an increase in CIN in these cells after HDAC6 inhibition. Finally, WT161 altered the metabolic dynamics of the T98G cell line. Thus, we highlight the important biological role of HDAC6 in the neoplastic

phenotype, particularly affecting tumor progression and CIN profiles, and point to the therapeutic potential of WT161 as a promising anti-GBM agent.

Keywords: Glioblastoma; HDAC6; WT161; Tumor Progression; Chromosomal Instability

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Frequência dos sintomas relatados aos médicos de clínica geral 6 meses anteriores ao diagnóstico de tumor cerebral 24
Figura 2 - Temozolomida, mecanismo de ação e resistência 27
Figura 3 - Proteína HDAC6 atua como regulador de vias sinalizadoras no câncer 30
Figura 4 - Estrutura química do WT161 e sua ligação com as HDACs 32
Figura 5 - A proteína HDAC6 está superexpressa no GBM 50
Figura 6 - WT161 inibiu a proliferação das linhagens celulares de Glioblastoma 51
Figura 7 - TMZ inibiu a proliferação das linhagens celulares de Glioblastoma 52
Figura 8 - WT161 promove bloqueio do ciclo celular das linhagens de GBM 53
Figura 9 - WT161 reduziu a capacidade de formação de colônias das linhagens de GBM ... 54
Figura 10 - Interações dependentes da sequência de administração entre WT161 e TMZ nas linhagens celulares U251, U87 e T98G 57
Figura 11 - Frequência (%) de células das linhagens U251, U87 e T98G marcadas por Anexina V e/ou IP 60
Figura 12 - WT161 aumentou a expressão de α-tubulina acetilada nas linhagens de GBM 63
Figura 13 - Modulação da expressão de PARP clivada na linhagem U251 64
Figura 14 - Modulação da expressão de PARP clivada na linhagem U87 64
Figura 15 - Modulação da expressão de PARP clivada na linhagem T98G 65
Figura 16 - Influência de WT161 na expressão de β-catenina das linhagens de GBM 65
Figura 17 - WT161 alterou a capacidade migratória das células de Glioblastoma 67
Figura 18 - WT161 alterou a capacidade invasiva das células de Glioblastoma 69
Figura 19 - Efeito inibitório da combinação WT161+TMZ no crescimento de esferóides derivados de U251 de GBM, em modelo 3D 72
Figura 20 - Efeito inibitório da combinação WT161+TMZ no crescimento de esferóides derivados de T98G, em modelo 3D 73
Figura 21 - WT161 inibiu a capacidade migratória dos esferóides derivados de U251 de GBM, em modelo 3D 74
Figura 22 - WT161 inibiu a capacidade migratória dos esferóides derivados de T98G de GBM, em modelo 75
Figura 23 - WT161 promove aumento da frequencia de células metafásicas desalinhadas nas células T98G de GBM 77
Figura 24 - Identificação de metáfases desalinhadas, fusos mutipolares e estruturas anormais

cromossômicas.....78
Figura 25 - WT161 induziu aumento dos marcadores de instabilidade cromossômica na linhagem T98G de Glioblastoma.....79
Figura 26 - Identificação dos marcadores de instabilidade cromossômica em célula de Glioblastoma.....81
Figura 27 - WT161 promoveu perda cromossômica nas células T98G de Glioblastoma.....82
Figura 28 - Metáfase representativa da linhagem T98G.....85
Figura 29 - Cariótipo representativo da linhagem T98G, por bandeamento GTG.....86
Figura 30 - Efeitos metabolômicos do WT161 comparando DMSO vs. 2µM WT161 vs. 4µM WT161.....88
Figura 31 - Efeitos metabolômicos do WT161 comparando frações extracelulares vs. Intracelulares.....89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais mutações encontradas nas linhagens de GBM utilizadas no presente estudo 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Doses de WT161 requeridas para induzir 50% de inibição do crescimento celular (IC50) nas linhagens celulares de GBM 51
Tabela 2 - Doses de TMZ requeridas para induzir o 50% de inibição do crescimento cellular (IC50) nas linhagens celulares de GBM 52
Tabela 3 - Valores de CI e DRI de acordo com as diferentes estratégias de exposição da combinação das drogas WT161 e TMZ nas linhagens celulares de GBM U251, U87 e T98G 58
Tabela 4 - Tabela dos índices de divisão nuclear 79
Tabela 5 - Tabela da frequência de marcadores de CIN caracterizados por sonda pancentromérica e DAPI 81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
5-UF	5-Fluorouracil
ARF	Alternate Reading Frame
ATCC	*American Type Culture Collection*
Aurora A	Aurora Quinase A.
BMI-1	B Lymphoma Mo-MLV Insertion Region 1.
BTZ	Bortezomibe
BubR1	BUB1-related protein 1
CCND2	Cyclin D2
CD	Células dendríticas
Cdc2	Cyclin-Dependent Kinase 1
CFZ	Carfilzomibe
CFZ	Carfilzomibe
Chk1	Checkpoint kinase 1
CIN	Instabilidade cromossômica
CPC	Complexo passageiro cromossômico
CTC	Células Tumorais Circulantes
Cx43	Conexina 43
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico.
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Hibridação Fluorescente *in situ* (uma técnica de laboratório)
GBM	Glioblastoma
HDAC	Histona desacetilase
Hh	Hedgehog (via de sinalização celular)
HSV-1	Vírus herpes simples tipo 1
IDH	Isocitrato desidrogenase
IHC	Imunohistoquímica
IRE1α	Inositol-Requiring Enzyme 1 Alpha
JNK	Jun N-terminal Kinase (Quinase)

LC-MS/MS	Espectrometria de Massa por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem
Mad2	Proteína do ponto de verificação mitótico
MDM2	Murine Double Minute 2
MEC	Matriz extracelular
MGMT	O6-metilguanina metiltransferase
MM	Mieloma múltiplo
MMP	Metaloproteinase de matriz
MMR-DNA	*DNA mismatch repair*
MN	Micronúcleo
mRNA	RNA Mensageiro.
MTIC	Monometil triazenoimidazol carboxamida
N3-MA	N3-metiladenina
N7-MG	N7-metilguanina
NBUD	Brotos nucleares
NBUD	Brotos nucleares
NPB	Pontes nucleoplasmáticas
O6-MG	O6-metilguanina
OMS	Organização mundial de saúde
p21Cip1	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A.
p53	Proteína associada ao gene TP53
PARP	Poli (ADP-Ribose) Polimerase.
PC	Fosfatidilcolina
PDGFR	Receptor do fator do crescimento derivado de plaqueta
PE	Fosfatidiletanolamina
PERK	Protein Kinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PI3K/Akt	Via de Sinalização Fósfatidilinositol 3-quinase/Akt
PLK1	Serine/Threonine Kinase Polo-Like Kinase 1.
RM	Ressonância Magnética
SNC	Sistema nervoso central
TCGA	The Cancer Genome Atlas.
TEM	Transição epitélio mesenquimal
TMZ	Temozolomida
TSA	Tricostatina A

UPR	*Unfolded protein responses*
VPA	Ácido Valproico
Wee1	Proteína envolvida no ciclo celular, um ponto de verificação do ciclo celular
Wnt/ β-catenina	Via de sinalização Wnt/β-catenina
WT161	2,4-difluoro-5-(2-oxopropil)-1,3-dioxolane-4-carboxamida

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**22**
1.1	JUSTIFICATIVA	33
1.2	OBJETIVOS	34
1.2.1	**Objetivo Geral**	**34**
1.2.2	**Objetivos Específicos**	**34**
2	**METODOLOGIA DE TRABALHO**	**35**
2.1	UALCAN AND HPA	35
2.2	LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTURA	36
2.3	DROGAS E DILUIÇÔES	**37**
2.4	PROLIFERAÇÃO CELULAR	**37**
2.5	CICLO CELULAR	**38**
2.6	CAPACIDADE CLONOGÊNICA	**38**
2.7	COMBINAÇÃO DE DROGAS	**38**
2.7.1	**Exposição Simultânea de WT161 e TMZ**	**39**
2.7.2	**Exposição Sequencial de WT161 e TMZ**	**39**
2.8	MORTE CELULAR - APOPTOSE POR ANEXINA V	40
2.9	*WESTERN BLOTTING* (IMMUNOBLOT)	40
2.10	MIGRAÇÃO	**41**
2.11	INVASÃO	**42**
2.12	CULTIVO CELULAR 3D	**42**
2.13	COMBINAÇÃO DE DROGAS EM CULTIVOS CELULARES 3D	**43**
2.14	MIGRAÇÃO EM CULTIVOS CELULARES 3D	**43**
2.15	ERROS DE SEGREGAÇÃO CROMOSSÔMICA	**44**
2.16	ENSAIO CITÔMICO DE MICRONÚCLEOS	**44**
2.17	HIBRIDAÇÃO *IN SITU* COM FLUORESCÊNCIA – FISH	**45**
2.18	CITOGENÉTICA CLÁSSICA	**46**
2.19	ANÁLISE METABOLÔMICA	**47**
2.20	ANÁLISE ESTATÍSTICA	**47**
3	**RESULTADOS**	**49**
3.1	UALCAN AND HPA	**49**
3.2	PROLIFERAÇÃO CELULAR	**50**

3.2.1 WT161 inibe a proliferação de células de GBM..... 50
3.2.2 TMZ inibe a proliferação de células de GBM..... 52
3.3 CICLO CELULAR..... **53**
3.4 CAPACIDADE CLONOGÊNICA..... **54**
3.5 COMBINAÇÃO DE DROGAS..... **56**
3.6 MORTE CELULAR - APOPTOSE POR ANEXINA V..... **60**
3.7 *WESTERN BLOTTING* (IMMUNOBLOT)..... **62**
3.8 MIGRAÇÃO..... **66**
3.9 INVASÃO..... **68**
3.10 COMBINAÇÃO DE DROGAS EM CULTIVOS CELULARES 3D..... **71**
3.11 MIGRAÇÃO CELULAR EM CULTIVOS CELULARES 3D..... **73**
3.12 ERROS DE SEGREGAÇÃO CROMOSSÔMICA..... **76**
3.13 ENSAIO CITÔMICO DE MICRONÚCLEO..... **79**
3.14 HIBRIDAÇÃO *IN SITU* COM FLUORESCÊNCIA – FISH..... **80**
3.15 CITOGENÉTICA CLÁSSICA..... **83**
3.16 ANÁLISE METABOLÔMCA..... **86**
4 DISCUSSÃO..... 90
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 106
REFERÊNCIAS..... 107
APÊNDICES 124
ANEXOS 127

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo e seus fatores de risco são determinantes em sua incidência crescente no século 21. Esses fatores podem ser classificados em exógenos, se referindo ao ambiente externo do hospedeiro como infecções (HPV, vírus Epstein-Barr, Hepatites crônicas), estilo de vida (sedentarismo, obesidade, dieta baseada em alimentos ultraprocessados) e exposições (radiação UV, tabagismo, poluição, bebidas alcoólicas). E fatores de risco endógenos, relacionados às características individuais do hospedeiro, incluindo, por exemplo, respostas imunes, estresse oxidativo, microbioma e metabolismo (Weeden *et al*., 2023).

Hanahan e Weinberg (2000) determinaram que seis fatores iniciadores intrínsecos às células que podem conduzir uma população de células normais tornarem-se neoplásicas. Sendo estas: (i) autossuficiência em sinais proliferativos, (ii) insensibilidade aos sinais anti-proliferativos, (iii) evasão à morte celular programada (apoptose), (iv) infinito potencial replicativo, (v) capacidade de formar vasos sanguíneos (angiogênese), e (vi) invasão tecidual e disseminação sistêmica (metástase). Adicionalmente em 2011, os mesmos autores inseriram características subjacentes a essas marcas tais como instabilidade genômica, mutação e inflamação, e introduziram duas marcas registradas emergentes: reprogramação do metabolismo energético e evasão da destruição imune (Hanahan; Weinberg, 2011). Contudo, evidências recentes apontam novas marcas apresentadas pelos tumores, denominadas características facilitadoras, como o desbloqueio da capacidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, células senescentes e microbiomas polimórficos (Hanahan, 2022).

Nesse contexto, os tumores do sistema nervoso central (SNC) exibem uma elevada heterogeneidade genética e molecular, e consequentemente uma significativa heterogeneidade histopatológica. Entre eles, os tumores de origem glial (gliomas) representam o grupo de tumores mais comum do SNC, sendo classificados de acordo com o tipo de célula glial que dará origem ao tumor (Chen *et al*., 2017). Os gliomas astrocíticos originam-se a partir de astrócitos e sua classificação pela Organização Mundial da Saúde (OMS) segue um sistema baseado em critérios histológicos e moleculares para definir o grau de malignidade do tumor. Na classificação mais recente (5ª edição, 2021) os gliomas são classificados em graus I a IV, refletindo a agressividade biológica do tumor, sendo: Astrocitoma pilocítico (Grau I), Astrocitoma IDH-mutante (Grau II), Astrocitoma IDH-mutante (Grau III) e Glioblastoma IDH-selvagem (Grau IV) (WHO CNS5, 2022).

GLIOBLASTOMA: DEFINIÇÂO, ASPECTOS DIAGNÓSTICOS E CLÍNICOS

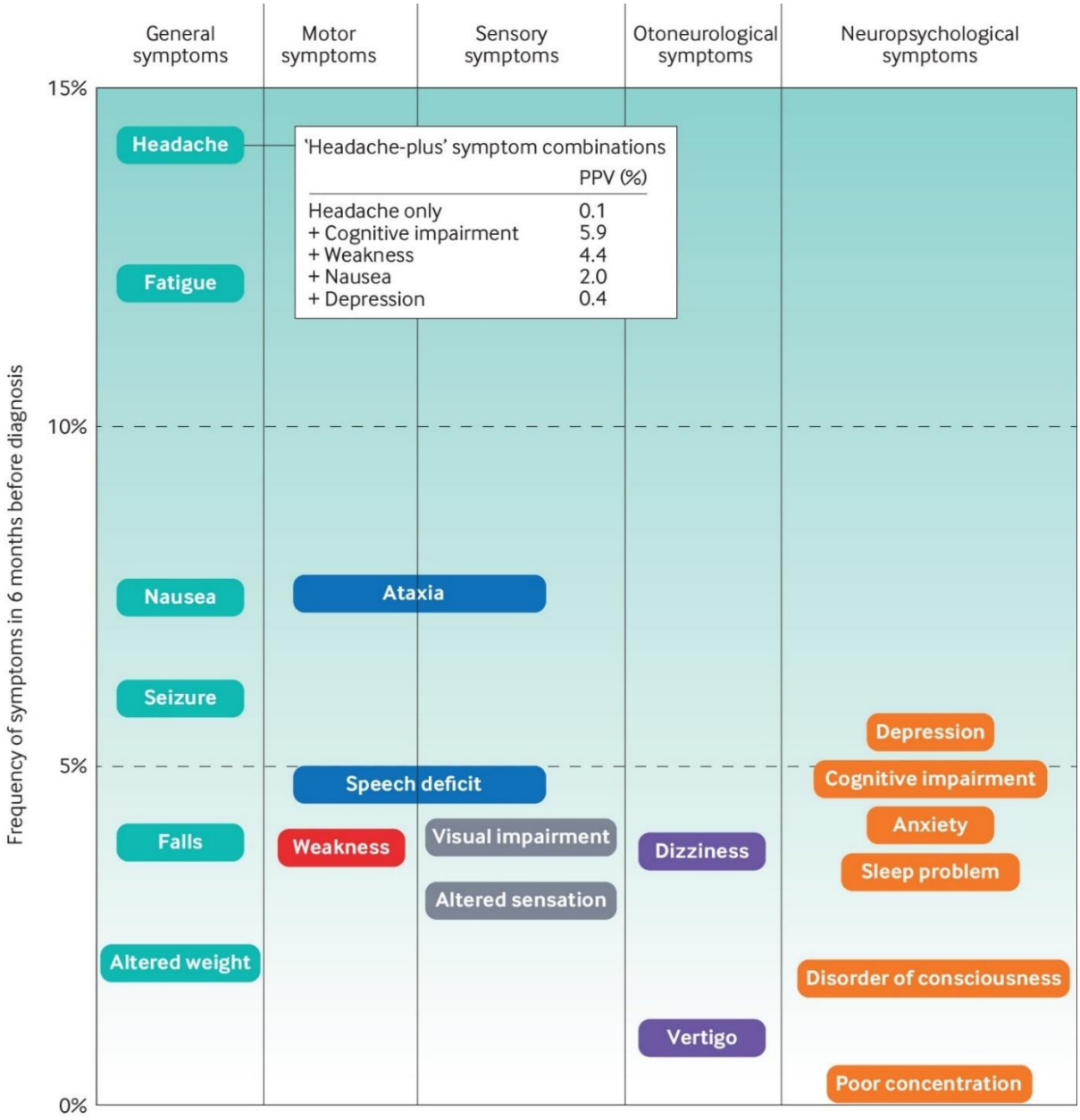
Glioblastoma (GBM) é considerado a forma mais agressiva e comum de glioma em adultos (principalmente homens com mais de 40 anos), correspondendo a 60-70% do total dos tumores cerebrais (LAN; LI; ZHANG, 2024), e de pior prognóstico com uma sobrevida média de oito a quarenta e oito meses (Oster *et al*., 2023). Os casos de GBM são diagnosticados na sua grande maioria (mais de 80% dos casos) de forma primária, ou seja, surgem *de novo* (também chamados de GBM primários). Por outro lado, eles também podem ser o resultado da progressão de tumores de baixo grau para um de maior malignidade (GBM secundário) (Soomro *et al*., 2017).

Histopatologicamente, o GBM é caracterizado por apresentar células pouco diferenciadas, redondas ou pleomórficas, com alta atividade celular e mitótica, núcleo atípico, áreas de necrose, proliferação microvascular (angiogênese) e heterogeneidade intratumoral (Reardon; Wen, 2006; Uddim *et al*., 2012). As células do GBM são altamente invasivas e proliferam difusamente fazendo com que o tumor não possua margens delimitadas, e com isso não seja passível de ressecção completa, sendo uma das principais causas de recidiva (Jackson, *et al*., 2001; Dongre; Weinberg, 2019).

A apresentação inicial de pacientes com esse tumor geralmente não é específica, com sinais e sintomas, que podem durar meses, amplamente semelhantes aos observados em outros tipos de neoplasias cerebrais, assim como em condições neurológicas benignas comuns (Walter *et al*., 2019). Dores de cabeça são os sintomas mais comuns na descoberta do GBM, acometendo cerca de 50% dos pacientes, elas variam com base na localização, tamanho e taxa de crescimento do tumor, e tendem a aumentar em frequência ou gravidade ao longo do tempo (Kirby; Purdy, 2014). Pacientes com tumores de crescimento rápido podem desenvolver aumento da pressão intracraniana e apresentar-se com náuseas, vômitos ou fadiga, e o exame físico revelar papiledema. A pressão aumentada pode também causar perdas episódicas de consciência (ondas de plateau) que muitas vezes são confundidos com convulsões (Schaff; Mellinghoff, 2023).

O desenvolvimento de sintomas ou snais neurológicos adicionais, como convulsões apresentadas aproximadamente por 75% dos pacientes com gliomas (Schaff; Mellinghoff, 2023), combinado com dores de cabeça aumenta significativamente a probabilidade de um tumor cerebral subjacente. Os principais sintomas relatados pelos pacientes foram reunidos na Figura 1 (Mckinnon *et al*., 2021).

Figura 1 – Frequência dos sintomas relatados aos médicos de clínica geral 6 meses anteriores ao diagnóstico de tumor cerebral.



Fonte: Adaptado de Mckinnon *et al.* (2021).

De acordo com Hansen e colaboradores, em 2023, com a progressão da doença os pacientes com GBM experienciam primeiramente eventos adversos psiquiátricos/neurológicos como crise convulsiva, dificuldade de equilíbrio, hemorragia intracraniana, dor de cabeça, declínio no estado funcional, declínio cognitivo, problemas com fala e linguagem, neuropatia periférica, depressão, ansiedade, alterações na visão, dificuldade auditiva e hemiparesia. Em seguida, por eventos adversos cardiovasculares/respiratórios, como edema periférico, trombose venosa profunda, hipoxia, taquicardia, bradicardia, hipotensão, hipertensão, dispneia, embolia

pulmonar e pneumonia. E, por fim, eles apresentam eventos adversos gerais, febre, fadiga, fraqueza geral, leucocitose, trombocitopenia, desidratação, neutropenia, perda de apetite, constipação, náusea, vômito, diarreia, perda anormal de peso e incontinência urinária.

GLIOBLASTOMA: ASPECTOS GENÉTICOS, CLASSIFICAÇÂO E TERAPIA

As anormalidades genéticas no GBM são caracterizadas por três principais processos biológicos: iniciar o crescimento tumoral, evadir a senescência e favorecer o crescimento imortal. As principais alterações genéticas caracterizadas no glioblastoma primário são mutações no promotor da telomerase reverse transcriptase (*TERT*), deleção do gene supressor de tumor (*PTEN)*, a amplificação em alto nível do proto-oncogene receptor de crescimento epidérmico *(EGFR)*. Enquanto as mais comuns no glioblastoma secundário são as mutações em *ATRX* e *TP53*. Outras alterações genéticas importantes relatadas no GBM incluem alterações nos genes *NF1, PDGFRA, PIK3R1, PIK3CA, RB1, CDKN2A/B, MDM2, MDM4, CDK4 e H3F3A (*Lan; Li; Zhang, 2024).

Uma das recentes descobertas mais relevantes, com um grande impacto clínico, foi a descoberta de mutações no gene da isocitrato desidrogenase (IDH), frequentemente encontradas em gliomas. As IDHs desempenham papel fundamental no metabolismo celular, mutações do IDH1 e IDH2 resultam no ganho de função catalítica na produção de hidroxiglutarato (2-HG), um possível oncometabólito que pode influenciar uma variedade de programas celulares envolvidos no controle epigenético e em diversos processos que levam ao desenvolvimento do tumor. Uma observação interessante é a presença da mutação IDH1 na vasta maioria dos glioblastomas secundários, enquanto ela está quase ausente no glioblastoma primário. Portanto essas mutações estão sendo muito usadas como biomarcadores e alvos terapêuticos em câncer, especialmente em GBM (Liu *et al*., 2016).

Avanços na compreensão na oncogênese tumoral, permitiram uma estratificação mais profunda do comportamento biológico das neoplasias. Esse progresso culminou na quinta edição da Classificação de Tumores do Sistema Nervoso Central da OMS, em 2021, que particularmente em relação ao status da IDH, na qual foi atualizada a classificação dos gliomas em adultos em três tipos distintos: astrocitoma, IDH mutante; oligodendroglioma, IDH mutante e com codeleção 1p/19q; e glioblastoma, do tipo selvagem para IDH (WHO CNS5, 2022). Os GBM além de serem do tipo selvagem para IDH e H3 em pacientes adultos, incluem não apenas tumores que apresentam características clássicas, como também aqueles caracterizados por alterações genéticas como deleção homozigótica de CDKN2A/B, aberrações cromossômicas

incluindo o ganho do cromossomo 7 e a perda do cromossomo 10 (De Souza Godoy *et al*., 2023).

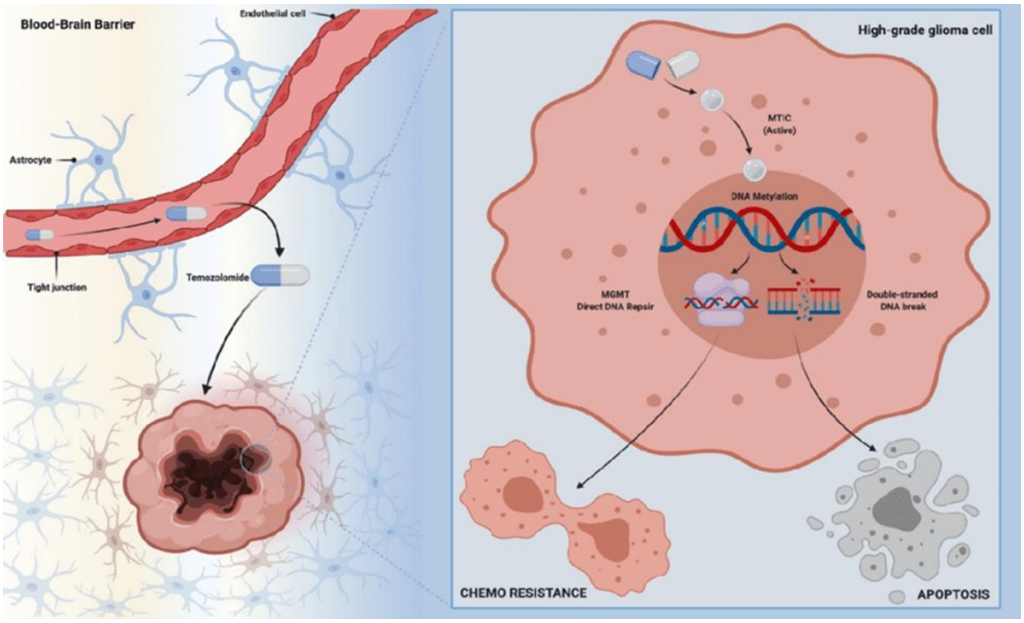
Paralelamente, a modificação epigenética desempenha um papel crucial na transformação de células normais em malignas por meio de interações complexas com alterações genéticas, impactando processos celulares críticos envolvidos na progressão do glioma, como reparo do DNA, apoptose, invasão e proliferação celular, que contribuem profundamente para a transformação catastrófica das células normais, formando células de glioma de alto grau (Hasan *et al.,* 2023). A descoberta de atividades regulatórias de microRNAs na biologia do GBM mostrou que eles desempenham papel vital no início e desenvolvimento desse câncer (Behrooz *et al*., 2023). O microRNA-21, aumentado no GBM, é considerado oncogênico e possui efeito anti-apoptótico, sendo responsável pela inibição de PTEN e p53 e pela ativação de EGFR, Ciclina D1 e AKT-2. Já o microRNA-34a que atua na supressão da proliferação, invasão celular e parada do ciclo celular por meio de alvos como CDK6, NOTCH e EGFR, encontra-se diminuído (Hasan *et al.,* 2023).

Na avaliação dos tumores cerebrais, incluindo o GBM, as alterações moleculares podem ser identificadas utilizando ensaios de imunohistoquímica (IHC), hibridização in situ por fluorescência (FISH) e por meio das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e pirosequenciamento. Por sua vez, os exames de imagem desempenham um papel crítico no diagnóstico e manejo dos tumores, servindo como uma ferramenta indispensável para o planejamento pré-operatório, e dentre eles a ressonância magnética (RM) com contraste é a modalidade de imagem de escolha, idealmente utilizando um protocolo padronizado de imagem de tumor cerebral. No caso do glioblastoma, a RM normalmente mostra realce com contraste em sequências ponderadas em T1, característico do tumor. A sequência T2/FLAIR é útil para visualizar edema cerebral hiperintenso e necrose central, além de outros sinais, como o efeito de massa local. Diferenciando-se dos gliomas de baixo grau, que apresentam um comportamento hipointensos em T1 e hiperintensos em T2/FLAIR. Para confirmar o diagnóstico, é fundamental obter uma biópsia do tecido tumoral, e os pacientes com achados sugestivos de malignidade cerebral devem ser encaminhados para centros com técnicas neurológicas avançadas (Shaff; Mellinghoff, 2023). Nesse sentido, destaca-se a importância de uma estratégia multidisciplinar para um diagnóstico preciso, determinação do prognóstico e tomada de decisão terapêutica.

Atualmente, o tratamento do GBM envolve ressecção cirúrgica seguido por radioterapia concomitante à administração de temozolamida (TMZ), utilizado desde sua aprovação pela FDA (Food and Drug Administration), em março de 2005. Um estudo publicado por Stupp e

colaboradores (2005) mostrou que pacientes com GBM tratados com TMZ e radioterapia, apresentaram melhora significativa da sobrevida comparado aos pacientes tratados somente com radioterapia. Esses resultados têm levado à associação TMZ-radioterapia a ser aceita como protocolo padrão para pacientes com GBM, definido como protocolo Stupp (Jezierzański *et al*., 2024). A TMZ é uma molécula lipofílica que após sua administração oral tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, e em pH fisiológico, esta pro-droga é rapidamente convertida no seu metabólito ativo, a monometil triazenoimidazol carboxamida (MTIC), que é um potente agente metilante de DNA (Marchesi *et al*., 2007; Schreck; Grossman, 2018). A inserção do grupo metil se dá na posição O^6 e N^7 da guanina e na posição N^3 da adenina, durante a replicação do DNA, formando os compostos citotóxicos O6-metilguanina (O6-MG), N7-metilguanina (N7-MG), e N3-metiladenina (N3-MA) (Jiapaer *et al.*, 2018). Entre seus produtos a O6-MG é a principal responsável pela ação da TMZ pois causa erros de pareamento durante os ciclos subsequentes da replicação do DNA causando, consequentemente, quebras das fitas simples e duplas do DNA, parada do ciclo celular e eventualmente morte dessas células (Thomas *et al.*, 2017) (FIGURA 2).

Figura 2 – Temozolomida, mecanismo de ação e resistência.



Fonte: Adaptado de Giotta lucifero; Luzzi (2021).

Muito recentemente, a imunoterapia emergiu como uma estratégia inovadora para desencadear respostas imunológicas do próprio organismo contra o GBM. As células dendríticas (DCs) lideram essas investigações por desempenharem papel crucial no início de respostas imunes antitumorais, e agora as pesquisas estão buscando explorar esse potencial para

melhorar a capacidade natural do organismoem combater o câncer (Yasinjan *et al*., 2023). Outro tratamento imunoterapêutico relevante é o G47Δ, um vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1) oncolítico de terceira geração, aprovado condicionalmente no Japão no combate de gliomas malignos. A eficácia dessas terapias, incluindo a vacina de DCs, DCVax-L, e o G47Δ foi demonstrada em ensaios clínicos de fase II e III (Todo *et al*., 2022; Yasinjan *et al*., 2023). A imunoterapia se destaca ainda pela abordagem altamente personalizada, visto que pode ser adaptada aos antígenos tumorais específicos do paciente e ao desenvolvimento de memória imunológica, proporcionando proteção potencial a longo prazo contra a recorrência do câncer (Srivastava *et al*., 2019).

A diferenças entre os pacientes com relação à carga mutacional tumoral, composição do microambiente tumoral, sistema imunológico periférico, microbioma e ao desenvolvimento de mecanismos de escape imunológico, impede o desenvolvimento de terapias eficazes para todos os indivíduos. Logo, é fundamental a personalização do tratamento com base no panorama molecular, imunológico e/ou metabólico específico de um determinado tumor. Nesse sentido diferentes abordagens devem ser empregadas e combinadas, incluindo principalmente a avaliação individual do tumor por meio de diferentes análises baseadas nas ômicas, como a epigenômica, genômica, proteômica, transcriptômica dentre outros (Massa;Seliger, 2023). No GBM, as abordagens metabolômicas, aliadas a outras plataformas ômicas, são imprescindíveis no estudo das complexidades do metabolismo tumoral e com isso, no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Pal *et al*., 2022). O ensaio metabolômico, permite identificar alterações, vias metabólicas e biomarcadores metabólicos específicos do GBM que podem auxiliar no diagnóstico, monitoramento da progressão tumoral, além do desenvolvimento de terapias personalizadas (Seyfried *et al*., 2011; Mashimo *et al*., 2014).

GLIOBLASTOMA: RESISTÊNCIA TERAPÊUTICA E HDACs

Apesar dos avanços ao longo dos últimos 40 anos na abordagem terapêutica do GBM, nas últimas duas décadas, a maioria dos ensaios clínicos de fase III para esse tipo tumoral não resultaram em uma melhora significativa da sobrevida dos pacientes (Oster *et al*., 2023), e a expectativa de cinco anos continua em menos de 5% de todos os casos (Tran Rosental, 2010; Omuro; Deangelis, 2013). Além disso, menos da metade dos pacientes tratados com TMZ não respondem ao fármaco, o que se deve principalmente à superexpressão de O6-metilguanina metiltransferase (*MGMT*) e pela sua heterogeneidade genética e celular (Jezierzański *et al*., 2024). Hegi *et al*., 2005, afirmaram que a terapia com TMZ foi mais eficiente em pacientes

cujos tumores apresentavam metilação no promotor do gene *MGMT*, evento que suprime a expressão e atividade do *MGMT* e por isso foram sensibilizados à ação de TMZ.

Outro sistema determinante na resistência ao TMZ é a via MMR-DNA (*DNA mismatch repair*) que corrige erros de incompatibilidades de bases de nucleotídeos feitas durante a replicação do DNA (Jiricny; Nyström-lahti, 2000). Mutações nas proteínas MMR geram um sistema ineficaz no reconhecimento e reparo dos fragmentos O6-MG gerados pelo TMZ, tornando-o menos eficaz. Dessa forma, estratégias para superar a resistência à terapia atual também envolvem aprimorar o efeito do sistema MMR (Messaoudi; Clavreul; Lagarce, 2015; Kim *et al*., 2019).

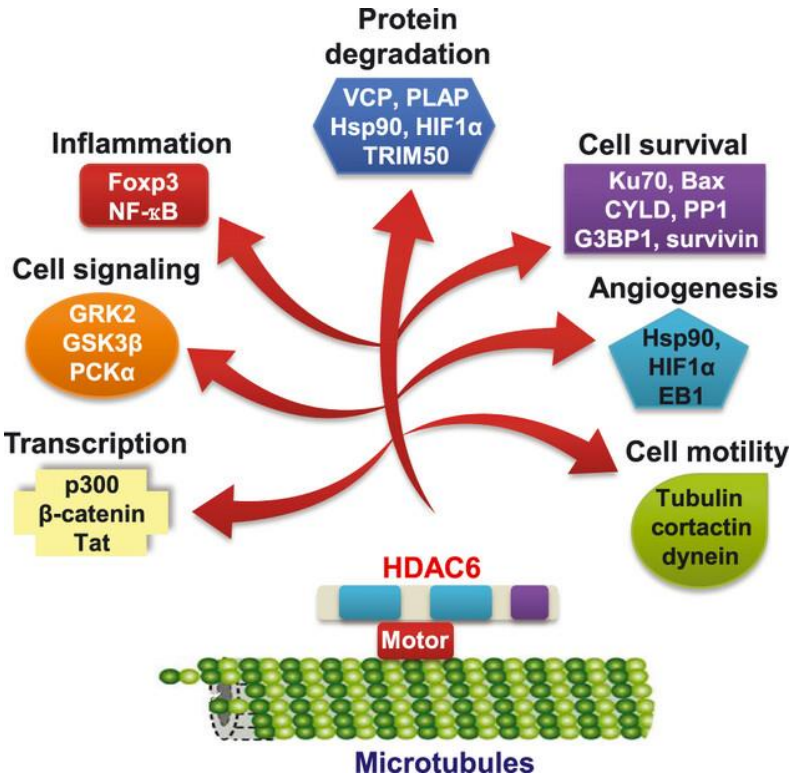
A modulação dos RNAs não codificantes representa uma abordagem inovadora para a terapia do GBM, pois a restauração ou a inibição de sua expressão pode potencialmente reverter a resistência tumoral, alterar o microambiente e afetar a resposta a tratamentos convencionais. Nesse cenário, o MALAT1, microRNA 181 e o microRNA 519a são apontados como principais envolvidos na resistência quimioterápica à temozolomida. Pesquisas *in vivo* indicam ainda que o microRNA519a é capaz de modular a via STAT3/Bcl-2/Beclin-1, aumentando a apoptose e a sensibilidade ao tratamento (Subaiea *et al*., 2024).

De acordo com Huang e colaboradores (2022), as alterações epigenéticas desempenham um papel vital não apenas no desenvolvimento do glioblastoma, mas também em sua resposta a tratamentos quimioterápicos. O controle epigenético aberrante é um evento precoce no início da progressão tumoral, na qual histonas desacetilases (HDACs) desempenham um papel crucial, removendo grupamentos acetila de proteínas histônicas (Kunnimalaiyaan *et al*., 2016). Essas alterações na estrutura da cromatina afetam a transcrição gênica e tem sido associadas ao silenciamento de genes supressores de tumor (Glozak; Seto, 2007). O uso de inibidores de HDAC tem demonstrado restaurar a expressão de genes supressores de tumor e aumentar a morte celular induzida por drogas como a TMZ (Huang *et al*., 2022).

Numerosas HDACs são capazes também de modular a função de proteínas citoplasmáticas não histônicas (Hsp90, p53, α-tubulina) fatores de transcrição (E2F, p53, c-Myc, NF-κB) e citocinas inflamatórias (TNF-α, IL-1 e IL-6), se tornando importantes reguladores de vias sinalizadoras no câncer (Pulya *et al*., 2021; Yu *et al*., 2023) (FIGURA 3). O tratamento com inibidores de HDAC demonstrou perturbar a localização centromérica do Complexo de Passageiros Cromossômico (CPC) em células tumorais, levando a defeitos mitóticos graves, frequentemente seguidos por apoptose (Unruhe-Knauf; Knauer, 2017). Esse complexo proteico é formado por Aurora kinase B, Borealina, INCENP e Survivina, responsáveis pela regulação da segregação cromossômica, divisão celular e citocinese e,

localiza-se no cinetócoro/centrômero para corrigir erros de ligação do cinetócoro e prevenir a desativação do ponto de checagem. (Sherwin *et al*., 2023).

Figura 3 – Proteína HDAC6 atua como regulador de vias sinalizadoras no câncer.



Fonte: Adaptado de Kim; Bae (2011).

O subtipo HDAC6 vem se destacando como potencial alvo terapêutico no tratamento do GBM, visto que sua hiperexpressão foi observada em diversos casos dessa neoplasia (Li *et al*., 2015) associada à proliferação tumoral e resistência à TMZ, principalmente por estabilizar e ativar EGFR (Wang *et al*., 2016). HDAC6 ainda desacetila e ubiquitina MSH2, proteína da via MMR, promovendo sua degradação e consequente inativação de MutSα e diminição da atividade do complexo MMR, o que está intimamente associado à resistência a TMZ (Mcfaline-Figueroa *et al*., 2015; Stark *et al*., 2015).

GLIOBLASTOMA: HDC6, INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA E OPORTUNIDADES TERAPÊUTICAS

O principal substrato da HDAC6 é a α-tubulina acetilada (Pulya *et al*., 2021), proteína estrutural dos microtúbulos que forma uma variedade de estruturas celulares. A ação dessa proteína resulta na despolimerização dos microtúbulos e interrupção da formação dos cílios

primários, aberração comum em algumas linhagens de GBM e que provavelmente contribui para o fenótipo maligno dessas células (Smith *et al*., 2018). No mesmo ano, Ling e colaboradores, por meio de ensaios de inibição da HDAC6, demonstraram que esta enzima pode ser responsável pela estrutura nuclear do material genético, formação do fuso mitótico e meiótico, assim como movimentação cromossômica. Concordando com esses dados, muito recentemente, o grupo de pesquisa de Ye (2024) revelou que o composto 25202, inibidor seletivo de HDAC6, ao reduzir a expressão dessa proteína provocou além da perturbação da dinâmica dos microtúbulos, a regulação positiva de marcadores mitóticos como ciclinas A e B1, Cdk1 e MPM-2, sugerindo indução do bloqueio mitótico, particularmente nas fases G2/M.

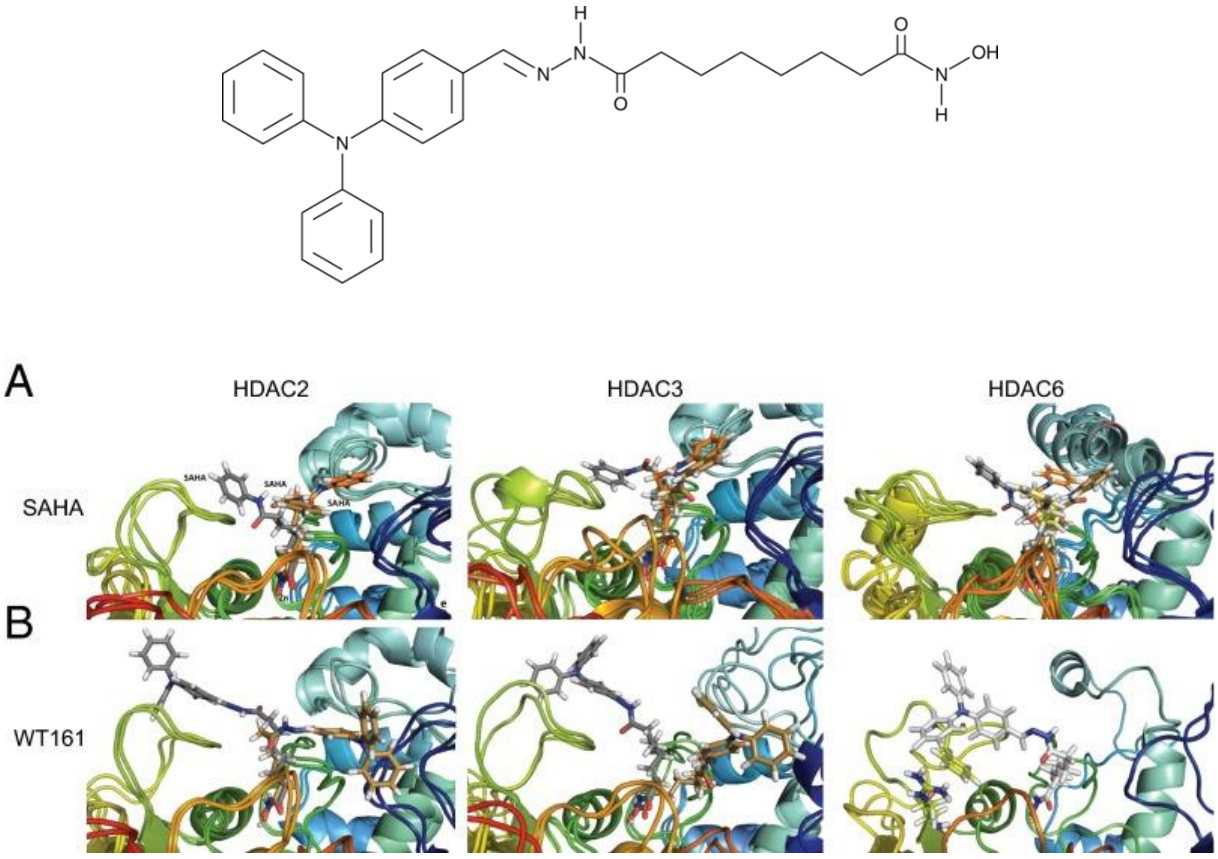
Adicionalmente, Shin e colaboradores (2003) encontraram um aumento da instabilidade cromossômica (CIN) após inibição de HDACs, devido à saída de células aberrantes do ponto de checagem mitótico. Os pesquisadores concluíram que as HDACs possuem um papel muito importante na regulação deste ponto de verificação molecular, e assim, alterações na expressão ou atividade de HDACs pode contribuir com o desenvolvimento de CIN, uma marca registrada do câncer (Shin *et al*., 2003). Porém, todos estes estudos foram realizados com inibidores inespecíficos de HDACs, sendo ausentes estudos com inibidores específicos de HDAC6 sobre a CIN em GBM. É importante ressaltar ainda que os inibidores de HDAC têm a capacidade de influenciar uma variedade de processos, como bloqueio do ciclo celular, angiogênese, modulação imunológica e apoptose, visando proteínas não histonas (Peng; Seto, 2011).

Até o momento, os inibidores não específicos de HDAC aprovados pela FDA, são Vorinostat (SAHA), utilizado para o tratamento de linfoma cutâneo de células T recidivo e refratário (CTCL); Belinostat (PXD-101), terapia de linfoma de células T (PTCL); Panobinostate (LBH589), terapia de mieloma múltiplo; Romidepsin (Istodax), linfoma cutâneo de células T e linfoma periférico de células T (Bondarev *et al*., 2021). E os compostos givinostat (ITF2357), resminostat (4SC201), abexinostat (PCI24781) e quisinostat (JNJ-26481585) em fase de estudos clínicos (RAJAK,et al., 2014). Poucos inibidores de HDACs apresentam eficácia terapêutica com raros efeitos adversos no tratamento do câncer (Gupta *et al*., 2010), uma vez que bloqueiam diferentes isoformas de HDACs, que por sua vez, também atuam como reguladoras de eventos biológicos não oncogênicos (Haberland *et al*., 2009).

Os inibidores específicos de HDAC6 estão em diferentes fases de estudos clínicos (UBA et al., 2024). Dentre os principais inibidores seletivos de HDAC6 que demonstraram atividade antitumoral pré-clínica, encontram-se o ACY-1215 (ricolinostat), ACY-241, CAY10603 e a Tubastatina A, mais largamente estudada no GBM (Kim *et al*., 2019; Auzmendi-Iriarte *et al*., 2020).

O composto sintético WT161 (2,4-difluoro-5-(2-oxopropil)-1,3-dioxolane-4-carboxamida - $C_{27}H_{30}N_4O_3$) (FIGURA 4), inibidor específico de HDAC6, possui três elementos principais em sua estrutura, sendo um domínio de ligação de metal (HDACs de classe I, II e IV são hidrolases dependentes de zinco); um elemento de reconhecimento de superfície; e uma estrutura que interligue estas duas partes distintas. Sua especificidade para HDAC6 é demostrada por meio de ensaios inibitórios bioquímicos, obtendo o resultado de IC50 de 0,40 nM com um intervalo com 95 % de confiança em 0,28-0,55 (Hideshima *et al*., 2016).

Figura 4 – Estrutura química do WT161 e sua ligação com as HDACs.



Fonte: Adaptado de Hideshima *et al*. (2016).

WT161 induz a acetilação de alfa-tubulina e da histona 3 em linhagens celulares de câncer de mama (MCF7, T47D, BT474, MDA-MB231), onde observou-se ainda acentuada ação antiproliferativa e citotóxica do composto, induzindo morte por apoptose dessas linhagens (Hideshima *et al*., 2017). García-Guerreiro e colaboradores, 2020, evidenciaram que WT161 potencializa a expressão de CD38 em linhagens de células de mieloma múltiplo. Posteriormente, foi investigado a atuação dessa molécula em linhagens celulares de osteosarcoma (U20S e MG63), e em concordância com os resultados descritos nos trabalhos

anteriores ratificou-se seu potencial efeito anticâncer (Sun *et al*., 2021). Porém, ainda é desconhecido seu impacto sobre células de glioblastoma.

Dessa forma, se faz imprescindível a investigação de inibidores específicos de HDACs, e a elucidação de suas vias moleculares de atuação, em modelos 2D e 3D, assim como novas estratégias de combinação para superar a quimiorresistência, combater o comportamento agressivo e metastático, aumentar a eficiência do tratamento, reduzir os efeitos adversos da quimioterapia, e consequentemente, otimizar o prognóstico dos pacientes com GBM.

1.1 JUSTIFICATIVA

A baixa sobrevida e elevado índice de recidiva dos pacientes com GBM frente às abordagens terapêuticas atuais, assim como a frequente quimiorresistência ao TMZ são obstáculos no tratamento do GBM. Portanto compostos com novos mecanismos de ação são necessários para superar a quimiorresistência, combater o comportamento agressivo e metastático, aumentar a eficiência do tratamento, reduzir os efeitos adversos da quimioterapia, e consequentemente, otimizar o prognóstico desses pacientes.

Quando investigado o impacto epidemiológico de HDAC6 no glioblastoma, alguns autores identificaram uma expressão mais alta de HDAC6 em amostras de GBM quando comparadas a amostras controle (Li *et al*., 2015; Wang *et al*., 2016). Observou-se que essa enzima apresenta maior relevância na progressão do GBM quando comparado aos outros tipos de HDAC, visto que seu efeito é diretamente proporcional a marcadores de progressão tumoral e menores taxas de sobrevida em pacientes com alta expressão de HDAC6 (Auzmendi-Iriarte *et al*., 2020). Somando-se a isso foi comprovado que essa HDAC confere resistência à TMZ em linhagens celulares de glioblastoma (Wang *et al*., 2016). Portanto, HDAC6 é considerada um alvo promissor no desenvolvimento de novas terapias anticâncer.

No GBM, modificadores epigenéticos, incluindo inibidores de HDACs mostraram resultados promissores em estudos pré-clínicos (Touat *et al*., 2017). Uma vez que, os principais inibidores de HDACs utilizados atualmente na terapia anti-GBM possuem atividade inespecífica, se torna urgente não apenas o desenvolvimento de inibidores alvo-específicos, mas também a investigação das vias de ação molecular da HDAC6 nesta agressiva neoplasia.

Sendo assim, e a presente proposta visa identificar o papel do WT161, inédito e potente inibidor específico de HDAC6, sobre a progressão tumoral e instabilidade cromossômica em células de GBM.

1.2 OBJETIVOS

Seguem discriminados abaixo os objetivos, geral e específicos, do presente trabalho.

1.2.1 Objetivo geral

Identificar os efeitos funcionais, cromossômicos e moleculares envolvidos na ação antitumoral do inibidor específico de HDAC6, WT161, sobre linhagens celulares de GMB, resistentes e sensíveis à TMZ.

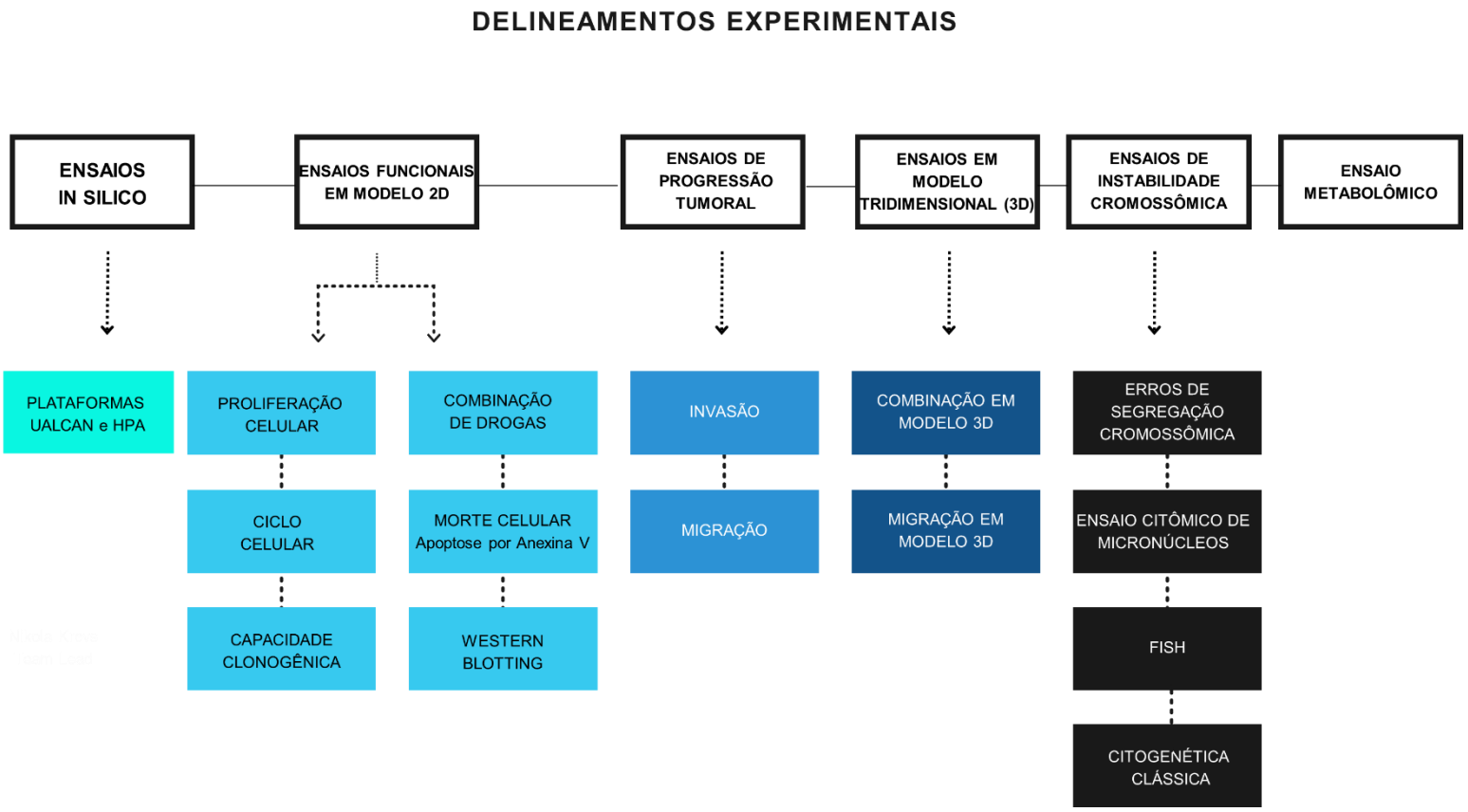
1.2.2 Objetivos específicos

Neste estudo foram determinados os seguintes objetivos específicos:

a) avaliar a eficiência antiproliferativa da inibição da HDAC6 pela ação do WT161, em linhagens de GBM resistentes e sensíveis à TMZ, por meio dos ensaios funcionais de proliferação, capacidade clonogênica, dinâmica do ciclo celular e apoptose;
b) examinar os efeitos da combinação farmacológica do inibidor WT161 com o quimioterápico TMZ sobre a viabilidade de linhagens celulares de GBM;
c) investigar as mudanças da expressão proteica dos alvos moleculares de HDAC6 pela ação do WT161, em linhagens de GBM resistentes e sensíveis à TMZ;
d) determinar o impacto da inibição da HDAC6 sobre a progressão tumoral em linhagens de GBM resistentes e sensíveis à TMZ, especialmente sobre a motilidade migratória e invasiva de células de GBM;
e) analisar o impacto da inibição da HDAC6 sobre o crescimento de esferóides derivados das células de GBM, assim como sobre a capacidade migratória 3D;
f) elucidar os efeitos da inibição da HDAC6 pela ação do WT161 na linhagem resistente a TMZ, T98G, sobre eventos de instabilidade cromossômica (CIN) tais como erros mitóticos, geração de aneuploidia, micronúcleos e análise do número cromossômico;
g) avaliar o efeito da inibição de HDAC6 pela ação do WT161 no equilíbrio metabólico das células de GBM, T98G, por meio de abordagem metabolômica.

2 METODOLOGIA DE TRABALHO

As configurações metodológicas utilizadas neste estudo foram explicitadas abaixo.



ENSAIOS *IN SILICO*

2.1 PLATAFORMAS UALCAN e HPA

O banco de dados UALCAN (http://ualcan.path.uab.edu) contém dados clínicos e de RNA-seq de 31 tipos de câncer. O UALCAN é um portal interativo que permite analisar profundamente a relação entre o nível de expressão de genes alvo no TCGA e os dados clínicos dos pacientes. As condições de triagem definidas neste estudo foram: “Gene: HDAC6”; “Conjunto de dados TCGA: Glioblastoma multiforme”; “Análise de expressão: Normal vs. Tumor primário”; “Perfil de metilação do promotor de HDAC6: Normal vs. Tumor primário”. Para análise proteica, exploramos “Gene: HDAC6” no “Conjunto de dados CPTAC:

Glioblastoma multiforme". Além disso, as alterações nos níveis de expressão da proteína foram avaliadas pelos resultados de coloração imunohistoquímica, utilizando o Human Protein Atlas (HPA, https://www.proteinatlas.org/). O HPA é um programa de pesquisa iniciado em 2003 para mapear todas as proteínas humanas em células, tecidos e órgãos, utilizando uma integração de várias tecnologias ômicas, incluindo imagens baseadas em anticorpos, proteômica por espectrometria de massas, transcriptômica e biologia de sistemas. Neste estudo, o HPA foi utilizado para identificar padrões de expressão de proteínas e realizar imagens imunohistoquímicas, fazendo uma comparação direta da expressão da proteína HDAC6 entre tecidos normais e de glioblastoma. Os anticorpos HPA003714, HPA026321 e CAB004236 foram usados na coloração.

ENSAIOS FUNCIONAIS EM MODELO 2D

2.2 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTURA

Foram utilizadas duas linhagens celulares de GBM sensíveis à TMZ, U87 (RRID: CVCL_0022) e U251 (RRID: CVCL_0021), gentilmente cedidas pelo Profº Dr. Luiz Gonzaga Tone (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP), provenientes do banco de células internacional American Type Culture Collection, USA (ATCC). Ambas as linhagens tiveram a sua autenticação genética realizada no Laboratório de Genética Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), examinando os loci polimórficos CSF1PO, D13S317, D16S539, D5S818, D7S820, THO1, TPOX, e vWA para perfis de repetição em tandem curto (STR) sob a supervisão do Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões, tendo homologia para o 100% dos loci, confirmando assim a sua identidade genética. E ainda as células T98G (RRID: CVCL_0556), que apresentam resistência intrínseca ao tratamento com TMZ, aquirida comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil (BCRJ). A tabela 1 apresenta as principais mutações encontradas nas linhagens utilizadas no presente estudo.

Quadro 1 – Principais mutações encontradas nas linhagens de GBM utilizadas no estudo.

Mutações	U251	U87	T98G
IDH1			
PARD3			
PTEN	✔	✔	✔
TP53	✔		✔
TERT	✔	✔	
NF1		✔	

Fonte: Do autor

As células foram mantidas em garrafas de 25 cm^2 contendo meio DMEM (Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma, CA, USA), suplementado com 1% de estreptomicina (100 mg/mL) associado à penicilina (60 mg/mL) e 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, SP, Brasil; pH 7,2–7,4), em atmosfera úmida contendo 5% CO_2 a 37 ºC. Para manutenção e expansão após confluência, as células foram enzimaticamente desprendidas das garrafas com 0,05 % tripsina (Gibco BRL, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), e a suspensão celular foi subsequentemente aliquotada em novas garrafas de cultura.

2.3 FÁRMACOS E DILUIÇÔES

Os fármacos TMZ (Sigma-Aldrich Brazil) e WT161 (MCE - MedChemExpress) foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) de acordo com as recomendações do fabricante, aliquotados e armazenadas a -20 °C e -80 °C, respectivamente, até o momento do seu uso e diluição em meio de cultura para cada um dos experimentos propostos. Para tanto, as linhagens celulares foram expostas a diferentes concentrações para posterior avaliação dos seus efeitos e obtenção dos seus valores particulares de IC_{50}, IC_{25} ou IC_{10}, em função do objetivo e o grau de letalidade exigido em cada investigação.

2.4 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Suspensões celulares das linhagens U87, U251 e T98G foram semeadas em placas de 96 poços. Decorrido o tempo de 48 h de tratamento determinado (WT161 e/or TMZ), o meio de cultura foi removido e substituído por meio de cultura contendo 10 µL do reagente MTT (3 mg/mL) (Roche Molecular Biochemicals, IN, USA) em cada poço. As placas foram incubadas

por 4 horas a 37°C e então o meio substituído por 100 µL de DMSO para solubilização dos cristais precipitados do formazan. O produto foi quantificado a 570 nm de absorbância utilizando o leitor iMark microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

A partir destes dados foram obtidos os valores de IC_{50} com o uso do programa CalcuSyn (Biosoft, Ferguson, Missouri, USA). Os resultados são apresentados como a média±DP de três experimentos independentes realizados em triplicata.

2.5 CICLO CELULAR

As linhagens U87, U251 e T98G foram semeadas em placas de seis poços e tratadas com WT161 ou DMSO, por 24 horas. Decorrido o tempo de tratamento, as células foram lavadas com PBSA e fixadas em etanol 70%. Foram acrescentados 200 µl da solução PI (Iodeto de propídeo 1 mg/mL, RNAse 50 µg/mL, Nonidet P-40 0,2% - *Guava® Cell Cycle Reagent*, Millipore Corporation, Hayward, CA) e após 30 min de incubação 5000 eventos foram analisados em citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT), utilizando o software GuavaSoft 2.7. Os resultados foram apresentados como a média±DP de três experimentos independentes realizados em triplicata.

2.6 CAPACIDADE CLONOGÊNICA

Suspensões celulares das linhagens U87, U251 e T98G foram semeadas numa densidade de 300 células/poço em placas de seis poços. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com WT161 e incubadas em estufa a 37 °C durante 48 horas. Uma vez terminado o tempo de tratamento, o meio de cultura foi retirado, as células lavadas com 1 X PBS, e meio sem o composto foi acrescentado para permitir o crescimento de colônias durante aproximadamente 7-10 dias a 37 °C.

Após esse tempo, as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol absoluto e coradas com 1 % Giemsa. As colônias com pelo menos 50 células foram contabilizadas com lupa. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes.

2.7 COMBINAÇÃO DE DROGAS

Após a determinação dos valores de IC_{50} para WT161 e TMZ de cada tipo celular, as células foram tratadas com três diferentes modos de exposição de drogas: simultânea

(WT+TMZ), sequencial com WT161 seguido por TMZ (WT/TMZ) e sequencial com TMZ seguido por WT161 (TMZ/WT), usando combinações de drogas de razão constante, como recomendado por Chou Talalay (1984). Células foram plaqueadas em triplicata e expostas a diferentes concentrações de drogas em três experimentos independentes.

2.7.1 Exposição Simultânea de WT161 e TMZ

As linhagens celulares U251, U87 e T98G foram semeadas em placas de 96 poços, como descrito anteriormente, e após 24 horas, tratadas simultaneamente com ambos compostos numa proporção constante de concentração do valor do IC_{50} individual por um tempo de 48 horas. No final deste tempo, a inibição do crescimento foi avaliada pelo ensaio MTT.

2.7.2 Exposição Sequencial de WT161 e TMZ

Utilizando o mesmo esquema experimental descrito anteriormente, após 24 horas do plaqueamento, o meio de cultura foi retirado e substituído por um meio de cultura contendo o primeiro fármaco. Após incubação por 24 horas, o meio foi aspirado, as células lavadas com 1X PBS, e um novo meio de cultura contendo o segundo fármaco adicionado para incubação por mais 24 horas. No final deste tempo, a inibição do crescimento foi avaliada pelo ensaio MTT.

Em todos os casos, os efeitos das interações entre WT161 e TMZ foram analisados usando o programa CalcuSyn. Este programa permite calcular o índice de combinação (CI) para cada ponto de combinação, indicando a existência de uma interação entre as drogas, aditiva se for igual a 1 (CI=1), antagônica se for maior do que 1 (CI>1), ou sinérgica se for menor que 1 (CI<1). O cálculo dos valores de CIs é realizado baseado na fórmula:

$$CI = (D)1/(Dx)1+(D)2/(Dx)2$$

Onde (Dx)1 e (Dx)2 são as concentrações de WT161 ou TMZ como droga única, que induz a x % de inibição do crescimento celular. (D)1 e (D)2 indicam a concentração das substâncias combinadas que inibe o x % do crescimento celular. (Dx)1 e (Dx)2 foram calculados pela equação de Chou e Talalay (CHOU, TALALAY, 1984), que determina a inibição do 50 % do crescimento celular causada pela combinação:

$$Dx = Dm[FA/(1-FA)]1/m$$

Onde, Dm é a dose de combinação necessária para inibir o 50 % do crescimento celular, FA é a fração celular afetada, e m é a inclinação da curva obtida. O programa CalcuSyn também

calcula o Índice de Redução de Dose (DRI), que estima quanto uma determinada dose do agente de uma combinação pode ser reduzida para conseguir o mesmo efeito do que com o agente em tratamento isolado. Combinações de drogas que atuam sinergicamente podem ser identificadas como aquelas que exibem valores de DRI significantes.

2.8 MORTE CELULAR - APOPTOSE POR ANEXINA V

A apoptose foi quantificada utilizando um kit I de detecção de apoptose FITC Anexina V (Cat # 556547; BD Pharmigen; BD Biosciences) de acordo com o protocolo do fabricante. Para verificar se o sinergismo encontrado entre WT161 e TMZ estava associado ao aumento da apoptose, utilizamos as menores concentrações de ambas as drogas, que quando combinadas demonstraram interação sinérgica pelo método Chou-Talalay. Assim, as células U251, U87 e T98G foram expostas a 10 µM, 15 µM e 2 µM de WT161; e 400 µM, 400 µM e 1500 µM de TMZ, respectivamente. Controles DMSO foram utilizados em todos os experimentos. Após 48 horas de incubação a 37°C, as células foram recolhidas e lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, as células foram ressuspensas em 500 µL de tampão de ligação 1x (BD Biosciences Pharmigen, San Jose, CA, EUA) e 3,5 µL de FITC e 3,5 µL de iodeto de propídio (IP) foram adicionados a cada tubo e incubados por 30 min, à temperatura ambiente e protegidos da luz.

Por fim, foram analisadas por citometria de fluxo, utilizando o Guava Easycyte 8HT (Merck Millipore, Burlington, MA, EUA). Os resultados foram apresentados como a média±DP de três experimentos independentes realizados em triplicata.

2.9 *WESTERN BLOTTING* (IMMUNOBLOT)

O inóculo de células foi cultivado em garrafas de 75 cm^2 e tratado, por 48 horas, com WT161. Como tratamento controle cada linhagem foi cultivada com DMSO, em porcentagem proporcional ao encontrado nas células tratadas. Em seguida, lavadas com PBSA gelado e homogeneizadas em tampão RIPA (NaCl 150mM, NP-40 1,0 %, ácido deoxicolato de sódio 1% em Tris-HCL 50 mM, pH= 7,5) contendo inibidores de proteases (Sigma Aldrich, Califórnia, Estados Unidos) e fosfatases (Ortovanadato de sódio 1mM). Após centrifugação a 12000g por 10 min, 4 ºC, o sobrenadante foi coletado e as alíquotas armazenadas a -80º C. A quantificação de proteínas se deu pelo método de BCA (*Bicinchoninic Acid*) com o kit Thermo Scientific™ Pierce™ (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

As amostras foram então diluídas em tampão de amostra 4x (Tris 0,5 M – pH=6,8,

glicerol, SDS 10%, bromofenol blue 1% e betamercaptoetanol 1% em água MiliQ) e desnaturadas por 5 mimutos (100ºC). O fracionamento das proteínas (30 μg) foi realizado em minigel de poliacrilamida 10% (150 min a 100V).

As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, California, Estados Unidos) por 120 min a 250 mA em tampão (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e metanol a 20% em água destilada) e coradas em solução de Ponceau 0,5% por 3 min para verificar a eficiência do processo de transferência. Em seguida, lavadas 3 vezes em TBS (*Tris-buffered saline*) a 0,02 M (10 min cada lavagem). O bloqueio foi realizado com TBS a 0,02 M contendo leite desnatado em pó Molico® (Nestlé, São Paulo, Brasil) a 5% e tween 20 (Sigma Aldrich, Califórnia, Estados Unidos) a 0,05% por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação.

Os anticorpos primários (Cell Signaling Technology®) para α-tubulina (#2144), α-tubulina acetilada (#5335), PARP (#9542), n-caderina (#4061), β-catenina (#9562) foram diluídos em solução de bloqueio (1:1000) e as membranas incubadas com os anticorpos, durante a noite, a 4ºC sob agitação. Após sucessivas lavagens com TBS e T-TBS (Tween20-TBS), as membranas foram incubadas com anticorpos secundários Anti-rabbit IgG (#7074 - Cell Signaling Technology®) diluídos em solução de bloqueio (1:2000), conjugados a peroxidase e as bandas imunorreativas foram detectadas por quimioluminescência (Pierce™ ECL, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

Os resultados foram revelados pelo equipamento de imagem quimioluminescente GeneGenome (Syngene, Cambridge) e apresentados como a média±DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. A quantificação das bandas é realizada usando o programa de domínio público ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Estados Unidos).

ENSAIOS DE PROGRESSÃO TUMORAL

2.10 MIGRAÇÃO

O ensaio de cicatrização de ferida foi realizado de acordo com o protocolo de MARTINOTTI; RANZATO (2020). As células de GBM foram semeadas na densidade de $5{,}0\times10^4$ células por 1000 μL em placas de 24 poços. As células foram mantidas em incubação até atingirem mais de 90% de confluência. Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido, e a ferida (*scratch*) foi realizada utilizando uma ponteira de 10 μL. Posteriormente,

foi adicionado meio de cultura com 1% de FBS contendo 2 μM ou 4 μM de WT161. Imediatamente após o tratamento, dois campos por poço foram fotografados, determinando o tempo zero (0h). Posteriormente, as células foram incubadas por 24 horas na presença do tratamento, e novas imagens foram adquiridas. Cada poço foi registrado no tempo 0; 24; 48 e 72 horas e as análises dos registros feitas no programa ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Estados Unidos), medindo a área da ferida em comparação com o controle (tempo zero). Os resultados foram apresentados como a média±DP de três experimentos independentes realizados em triplicata.

2.11 INVASÃO

Suspensões celulares de U251, U87, T98G foram semeadas em concentração de 1,5 x 10^5 células por 500 μl de meio de cultivo sem soro bovino fetal, pré-tratadas por 30 minutos com WT161, em uma membrana transwell (Corning Incorporated; Corning, NY, EUA), previamente revestidas com Geltrex (Life Technologies). A câmara inferior foi preenchida com 500 ml de meio de crescimento contendo 10% FBS, como quimioatraente. As linhagens foram cultivadas em placas de 24 poços e incubadas em atmosfera úmida contendo 5% CO_2 a 37 ºC, por 24 horas.

As células que não invadiram a matriz, remanescentes no poço superior, foram suavemente raspadas e aquelas aderidas à membrana do inserto foram coradas com cristal violeta a 0,4% (Sigma; St. Louis, MO, EUA). Após a coloração, foram registradas 3 fotografias por poço, utilizando-se do sistema de captura de imagens Axio Cam MRC (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplado ao microscópio invertido (Opton), objetiva de 4x. A análise se deu pelo software Axiovision 3.1 (Carl Zeiss), e mensuração da área invadida foi feita usando o programa de domínio público ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA). Os resultados foram apresentados como a média±DP de três experimentos independentes realizados em triplicata.

ENSAIOS EM MODELO TRIDIMENSIONAL (3D)

2.12 CULTIVO CELULAR EM 3D

Para o estabelecimento do cultivo celular 3D utilizou-se o protocolo de formação de esferóides descrito por Friedrich (2009), com algumas adequações. Nesta metodologia, as

linhagens celulares U251, U87 e T98G foram cultivadas em garrafas de 25 cm², sob condições comuns de cultura em monocamada, até atingir aproximadamente 90% de confluência e então foram preparadas suspensões celulares de 700 células em 200 µl de meio de cultura. As células foram semeadas em placas de 96 poços, previamente revestidas com agarose 1,5% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), que foram mantidas imóveis em atmosfera úmida contendo 5% CO_2 a 37ºC, durante 4 dias a fim de favorecer a formação dos esferóides. Nesse procedimento, apenas um esferóide é formado por poço.

A solução de agarose que dá suporte à formação dos esferóides foi autoclavada por 20 minutos a 121 °C, e em seguida, mantida em agitação e aquecimento constantes. Cada poço da placa recebeu 50 µl dessa solução por meio de um pipetador Multipette® M4 (Eppendorf, Hamburg, Alemanha).

2.13 COMBINAÇÃO DE DROGAS EM CULTURA CELULAR 3D

Seguindo as condições de cultivo 3D detalhadas anteriormente, as células das linhagens U251 e T98G foram incubadas durante 96 horas, período necessário para a formação do seu esferóide. Decorrido esse tempo, antes de iniciar o tratamento, foram capturadas imagens dos esferóides, obtidas pelo sistema de captura de imagens Axio Cam MRC (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplado ao microscópio invertido (Opton), utilizando a objetiva de 4x, e analisadas pelo software Axiovision 3.1 (Carl Zeiss). No tratamento foi adotada a estratégia simultânea de combinação de drogas, além dos tratamentos com os fármacos isolados.

A avaliação da combinação de drogas se deu com a exposição dos esferóides continuamente a WT161 e TMZ de maneira isolada e combinada, utilizando-se as concentrações de 10 e 400 µM para as células U251; 2 e 1500 µM para T98G, respectivamente. As concentrações correspondem ao primeiro ponto de sinergismo obtido no ensaio de Combinação de drogas no modelo 2D, pelo método Chou-Talalay. O tratamento foi realizado durante 6 dias, sendo que a cada três dias era obtida uma nova captura de imagens, seguida pela troca do meio de cultura.

2.14 MIGRAÇÃO EM CULTURA CELULAR 3D

Para avaliar a capacidade migratória de células cultivadas no modelo tridimensional, foram estabelecidos esferóides multicelulares das células U251 e T98G, durante 4 dias. Posteriormente, os mesmos foram individualmente transferidos para uma placa de 96 poços

revestida com Gelatina 0,1% (Sigma, CAS 900-70-8) e fotografados pelo sistema Axio Cam MRC (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) para obtenção do valor de área inicial migrada (tempo zero).

Em seguida os esferóides foram tratados, durante 72 horas, com concentrações 2 e 4 µM de WT161. E a cada 24 horas de exposição ao fármaco, cada esferóide e sua área migrada foram fotografados pelo sistema Axio Cam MRC (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) e a área total migrada medida pelo software Axiovisão 3.1 (Carl Zeiss). Os resultados foram obtidos pela fórmula (área final migrada/área inicial migrada).

ENSAIOS DE INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA

2.15 ERROS DE SEGREGAÇÃO CROMOSSÔMICA

A linhagem celular T98G foi semeada sobre lamínula em placas de Petri de 35mm, com inóculos de $8x10^4$. Após o período de 24 h de adesão celular, as células foram tratadas com WT161, por 24 h, e então lavadas com PBS e expostas a 200 ng/mL de Nocodazol, diluído em DMEM F-12 por 16 horas. Decorrido esse tempo, as culturas foram lavadas 3 vezes com PBS, e meio de cultura foi adicionado para dar continuidade à mitose, para 3 horas depois, as células serem finalmente fixadas com formaldeído na concentração de 3,7% (Sigma-Aldrisch LTDA, Brasil), por 30 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas novamente com PBS, 3 vezes, por 5 minutos e coradas com alaranjado de acridina (100 µg/mL em PBSA), 10 minutos, seguido de nova lavagem com PBS. Na montagem das lâminas, verteu-se as lamínulas sobre 10 µL de PBS depositados nas lâminas e estas foram seladas com esmalte. A análise de no mínimo 100 células (HUANG et al., 2016; JIN et al., 2020) foi realizada por microscopia de fluorescência da Olympus® com filtros de fluorescência adequados, no aumento de 60x, e as imagens capturadas utilizando o software Applied Spectral Imaging (ASI)®.

2.16 ENSAIO CITÔMICO DE MICRONÚCLEOS COM BLOQUEIO DE CITOCINESE - CBMN-Cit

A linhagem T98G foi semeada em placas de 35 mm, tratada com WT161 e DMSO e incubada em estufa CO_2, a 37 ºC, por 48 horas. Terminado o período de tratamento, as placas foram lavadas com PBS e adicionado 2,0 mL de meio de cultura DMEM contendo 20 uL citocalasina B (Cit-B; 3 µg/mL), por 22 horas. Após esse tempo o meio de cultura foi transferido

para um tubo de centrifuga (graduado), a placa lavada com PBS e esse transferido para o mesmo tubo. As células foram tripsinisadas e transferidas para o tubo mencionado anteriormente e homogeneizadas. E então centrifugadas por 5 minutos a 900 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células coletadas tratadas com solução hipotônica de citrato de sódio (1%) a 42°C, fixadas e lavadas com metanol: ácido acético (3:1) gelado.

As preparações citológicas foram então aplicadas sobre lâminas de microscopia e subsequentemente tingidas com uma solução 1 % Giemsa em tampão fosfato. Para análise, primeiramente foram avaliados o Índice de Divisão Nuclear (IDN) do grupo controle da linhagem. Nessa avaliação, as células são classificadas em mononucleadas, binucleadas, trinucleadas ou tetranucleadas. Para obtenção do IDN, foram contadas um total de 500 células.

Após a coleta de dados do IDN, nas mesmas lâminas foram avaliadas 1000 células binucleadas, onde foram classificados o tipo de dano que cada célula apresenta dividindo-os em micronúcleo (MN), ponte nucleoplasmática (P), broto nuclear (B), micronúcleo + ponte nucleoplasmática (MN + P), micronúcleo + broto nuclear (MN + B), ponte nucleoplasmática + broto nuclear (P + B), ou ainda micronúcleo + ponte + broto (MN + P + B).

2.17 HIBRIDAÇÃO *IN SITU* COM FLUORESCÊNCIA – FISH

Após 48 horas de tratamento da linhagem T98G, foi utilizado o kit de sondas *Satellite Enumeration Probes- centromeric specific probe* para os cromossomos 1 e 8 (marca Cytocell Cambridge, Inglaterra) e a sonda pancentromérica (ENPANC) (Live, marca Lexel, Buenos Aires, Argentina). O método utilizado é descrito pelo fabricante, com as seguintes modificações:

a) Preparação e pré-tratamento das lâminas: O material foi pingado em lâminas limpas em álcool e estas permanecerão por uma noite em estufa a 37°C. As lâminas serão observadas ao microscópio para marcar a área onde serão aplicadas a sondas; incubadas em uma solução de 2x SSC (pH 7,0) a 37º C (+/- 1ºC) durante 20 a 60 minutos e desidratadas em uma série de etanóis a 70%, 85% e 100% por 1 minuto cada.

b) Co-desnaturação: Foram aplicados 05 µl da sonda diluída na proporção 1:1, em tampão de hibridação; coberta com lamínula de 11x22 mm e selada com cola especial. As lâminas foram colocadas em uma placa aquecida a 75ºC (+/- 1ºC) por 5 a 10 minutos.

c) Hibridação: As lâminas com a sonda foram colocadas em uma caixa úmida, em estufa a 37°C (+/- 1ºC) por uma noite (de 12 a 16 horas).

d) Pós-hibridação: A lamínula e toda a cola foram removidas e as lâminas colocadas em

uma solução de 2xSSC/0,1% Tween 20 (pH 7,0) por 2 minutos em temperatura ambiente; a seguir em uma solução de 0,4xSSC/0,3% Tween 20 a 72ºC (+/-1ºC) (pH 7,0) por 2 minutos, sem agitação; e por último em uma solução de 2xSSC/0,1% Tween 20 (pH 7,0) por 1 minuto em temperatura ambiente, sem agitação. Após secarem rapidamente em temperatura ambiente, foram aplicados 07 µl de DAPI e a lâmina coberta com uma lamínula de 12x24 mm.

e) Análise: Foram analisados ao menos 200 núcleos interfásicos, em microscópio de fluorescência da Olympus® com filtros de fluorescência adequados e as imagens capturadas utilizando o software Applied Spectral Imaging (ASI)®.

2.18 CITOGENÉTICA CLÁSSICA

A linhagem T98G foi cultivada em garrafa de cultura celular de $75cm^3$ e incubada em estufa CO_2, a 37 ºC atingir cerca de 80% de sua confluência, quando foi tratada com WT161, 1µM, ou DMSO por 24 horas. Terminado o período de tratamento, as garrafas foram lavadas com PBS e adicionado CRA (Chromosome Resolution Additive), por 1 hora seguido de Colchicina por 10 horas. Após esse tempo o meio de cultura foi transferido para um tubo de centrifuga (graduado), a garrafa lavada com PBS e esse transferido para o mesmo tubo. As células foram tripsinisadas e transferidas para o tubo mencionado anteriormente e homogeneizadas. E então centrifugadas por 5 minutos a 1700 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células coletadas homogeneizadas em solução hipotônica de Cloreto de potássio (KCl) a 37°C, por 20 minutos, em seguida foram centrifugadas, 5 minutos a 1700 rpm, lavadas e fixadas com a solução metanol: ácido acético (3:1) gelado, três vezes.

As preparações citológicas foram então aplicadas sobre lâminas de microscopia, previamente lavadas e submersas em álcool absoluto. Após envelhecimento do material, por 72 horas a 56 °C, as preparações foram bandeadas pelo método GTG, utilizando tripsina 1% em tampão fosfato, cerca de 4 segundos, para formação das bandas G e tingidas com uma solução 1% de Giemsa em tampão fosfato.

De acordo com o *International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2016*, a análise de 20 metáfases evidencia a ocorrência de anormalidades cromossômicas, em nosso estudo foram avaliadas cerca de 30 metáfases de cada grupo no microscópio da Olympus® e as imagens capturadas utilizando o software Applied Spectral Imaging (ASI)®, no aumento de 100X.

ENSAIO METABOLÔMICO

2.19 METABOLÔMICA

Após tratamento das células T98G com de WT161, 2 µM e 4 µM, e com o veículo controle (DMSO) por 48 horas, 100 µL das frações intra e extracelular (separadas por centrifugação) foram extraídas utilizando 1000 µL de metanol PA (MERCK, Darmstadt, Alemanha). As amostras foram homogeneizadas em um vortex por 5 minutos, centrifugadas por 15 minutos a 13.000 g, e o sobrenadante transferido para outro Eppendorf onde foi submetido a um concentrador a vácuo por 30 minutos. O material foi ressuspendido em 400 µL de metanol e filtrado através de um filtro de 0,22 micrômetro.

A análise dos metabólitos foi realizada sob responsabilidade da Profa. Dra. Luciana Machado Bastos, do Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, utilizando o espectômetro de massas Agilent Infinity 1260/Q-TOF 6520 B acoplado a uma fonte de ionização por electrospray. A separação foi realizada por uma coluna Agilent Poroshell 120 2.1×50 mm 2.7 µm. Na fase móvel, utilizou-se água acidificada com ácido fórmico (0,1% v/v) (A) e metanol (B), com um gradiente de 2% B - 98% B (0–6 min), e 98% B (6–12 min). Os parâmetros de ionização foram pressão do nebulizador de 20 psi e gás de secagem a 8 L/min a 220 ºC; uma energia de 4,5 kV foi aplicada por capilaridade. O volume de injeção foi de 4 µL.

O software MassHunter Qualitative versão 10.0 foi utilizado para processar os dados brutos. A ferramenta “Molecular Feature Extraction (MFE)” foi usada para extrair os espectros de massa e converter para a extensão CEF. O software Agilent Mass Profiler Professional (MPP) versão B.13.1.1 foi utilizado para filtrar e analisar os compostos moleculares extraídos. Os filtros utilizados foram abundância absoluta mínima de 5.000 contagens e todas as cargas permitidas. Os parâmetros de análise basearam-se na tolerância de tempo de retenção de 0,15 min e janela de massa de 15 ppm + 2 mDa. Os compostos moleculares considerados estavam presentes em 75% das amostras de pelo menos um grupo. Os metabólitos foram identificados utilizando o banco de dados METLIN 2019.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

2.20 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados obtidos foram provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata apresentados como a média ± desvio padrão. E todos os testes incluíram comparações com amostras tratadas com o veículo com o composto em estudo. Os dados foram submetidos a análises de variância ANOVA, one-way, acompanhado do pós-teste não paramétrico de Bonferroni, ou Testes t de Student, paramétrico e não pareado, em situações em que foi utilizada apenas uma concentração de tratamento do composto. Todos os resultados foram apresentados graficamente ou por tabelas cujas análises estatísticas se deram com o uso do programa GraphPadPrism® version 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). A significância estatística foi indicada como *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001. Para os ensaios metabolômicos, as análises estatísticas foram realizadas com valores transformados em log2. O teste T não pareado foi aplicado com um valor de p e uma mudança de dobra ≥ 2,00

3 RESULTADOS

Os resultados obtidos nos experimentos celulares foram detalhados abaixo.

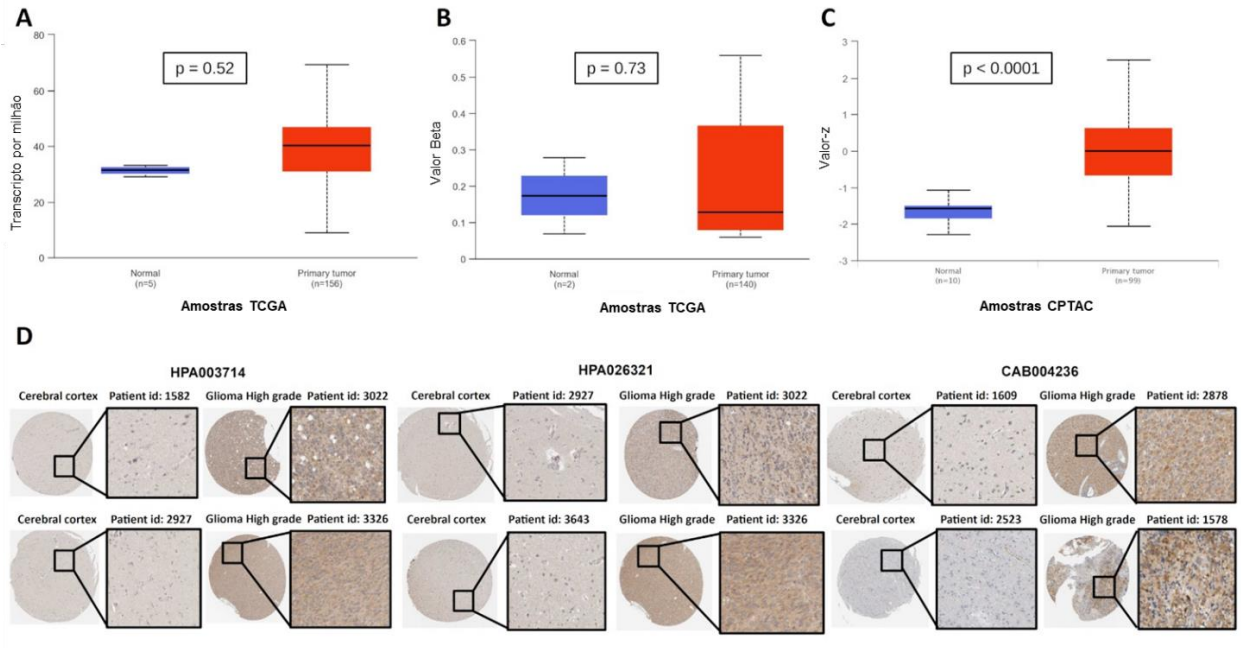
ENSAIO IN SILICO

3.1 PLATAFORMAS UALCAN e HPA

A proteína HDAC6 encontra-se superexpressa no GBM

Alguns autores identificaram uma maior expressão de HDAC6 em amostras de glioblastoma quando comparadas a amostras de controle (Wang *et al*., 2016; Kim *et al*., 2019; Yang *et al*., 2018). A análise UALCAN mostrou que, embora os valores médios tivessem uma tendência a serem mais altos, não houve diferença estatística nos níveis de mRNA (FIGURA 5A) e nos níveis de metilação do promotor de HDAC6 (FIGURA 5B) em amostras de GBM quando comparadas a amostras normais. No entanto, os dados do CPTAC mostraram que o nível de proteína HDAC6 estava significativamente superexpresso em gliomas de GBM quando comparados aos tecidos cerebrais normais (FIGURA 5C). Para investigar mais a fundo a superexpressão de HDAC6 em glioma, observamos as colorações da proteína HDAC6 em gliomas de alto grau e tecidos cerebrais com três anticorpos diferentes. As imagens reforçaram fortemente que a expressão da proteína HDAC6 era muito maior em tumores de GBM do que em tecidos normais (FIGURA 5D).

Figura 5 – A proteína HDAC6 está superexpressa no GBM.



Fonte: Do autor.
Legenda: (A) Expressão gênica da HDAC6 no GBM com base nos tipos de amostra. Boxplots dos níveis de expressão da HDAC6 entre tecidos normais e de GBM (UCEC; projeto TCGA do portal UALCAN). (B) Nível de metilação do promotor da HDAC6 no GBM. O valor Beta indica o nível de metilação do DNA variando de 0 (não metilado) a 1 (totalmente metilado). Diferentes valores de corte Beta foram considerados para indicar hipermetilação [valor Beta: 0,7 - 0,5] ou hipometilação [valor Beta: 0,3 - 0,25]. (C) Nível de expressão da proteína HDAC6 em amostras de GBM. Os valores Z representam desvios padrão em relação à mediana entre as amostras para o tipo de câncer dado. Os valores de razão da contagem espectral Log2 do CPTAC foram inicialmente normalizados dentro de cada perfil de amostra e, em seguida, normalizados entre as amostras. (D) Imagens representativas de coloração de proteína da HDAC6 em glioma e tecidos cerebrais normais, obtidas do Human Protein Atlas (HPA, https://www.proteinatlas.org/), são mostradas.

ENSAIOS FUNCIONAIS EM 2D

3.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Neste trabalho foram analisadas as atividades antiproliferativas do composto WT161 e do fármaco TMZ.

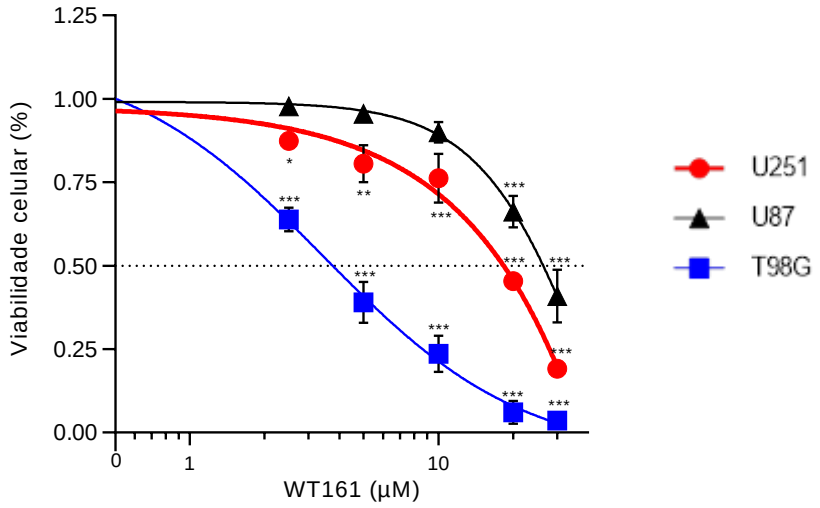
3.2.1 WT161 inibe a proliferação de células de GBM.

O presente estudo investigou o impacto do WT161 na proliferação celular das linhagens U251, U87 e T98G, demonstrando que o composto foi capaz de inibir a proliferação de todas as linhagens celulares de maneira dose dependente ($p < 0,05$), após 48 h de tratamento (FIGURA 4). Visto que este ensaio é pioneiro em células de GBM, com base na literatura as

linhagens de diferentes tipos tumorais apresentam elevada sensibilidade quando expostas ao inibidor WT161, com ICS_{50} em torno de 1 - 7 µM. Portanto, neste trabalho utilizou-se baixas concentrações teste do mesmo, e uma inibição significativa ($p<0,05$) do crescimento das células de GBM foi detectada a partir do tratamento com 2,5 µM de WT161 em U251 e T98G, e 20 µM nas células U87 (FIGURA 6).

A determinação dos valores de IC50-WT161 exibiu a marcada sensibilidade das células de GBM em estudo após 48 horas de exposição ao composto (TABELA 1).

Figura 6 – WT161 inibiu a proliferação das linhagens celulares de Glioblastoma.



Fonte: Do autor.
Legenda: As linhagens celulares de glioblastoma U251, U87 e T98G foram cultivadas em presença de DMSO ou diferentes concentrações de WT161 (0-30µM), por 48h. A proliferação celular foi mensurada pelo ensaio de MTT. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

Tabela 1 – Doses de WT161 requeridas para induzir 50% de inibição do crescimento celular (IC_{50}) nas linhagens celulares de GBM.

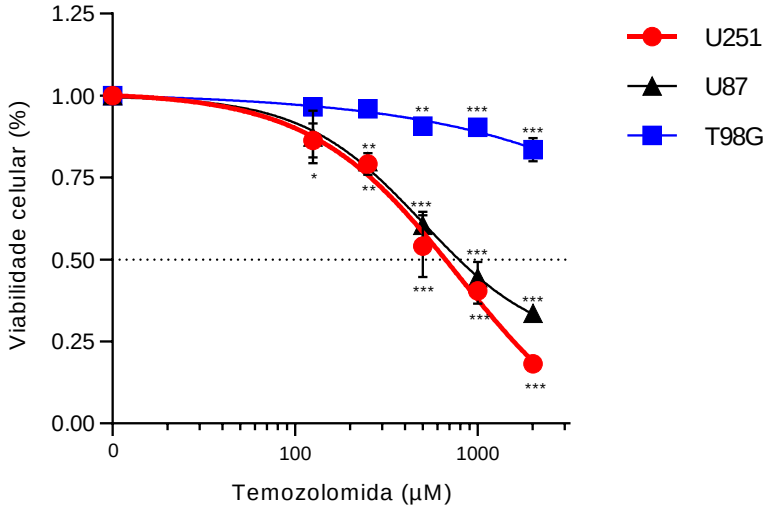
Linhagem Celular	IC50
U251	14,44 ± 0,9
U87	29,58 ± 2,0
T98G	3,84 ± 0,12

Fonte: Do autor.
Legenda: Os valores foram obtidos no programa CalcuSyn para o tratamento com WT161, por 48h. Valores representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

3.2.2 TMZ inibe a proliferação de células de GBM.

Adicionalmente, a quimiosensibilidade das linhagens celulares U251, U87 e T98G à TMZ também foi calculada pelo ensaio de proliferação onde foram tratadas, por 48 horas, com diferentes concentrações do antineoplásico (FIGURA 7). A inibição significativa ($p<0,05$) do crescimento das células de GBM foi detectada a partir do tratamento com 250 µM de TMZ nas duas linhagens estudadas, U251 e U87, e por meio das curvas de dose/resposta e valores obtidos de IC50-TMZ foi possível observar a sensibilidade das mesmas à TMZ. Por outro lado, esses dados apontam a elevada resistência intrínseca das células T98G ao tratamento com o fármaco (TABELA 2).

Figura 7 – TMZ inibiu a proliferação das linhagens celulares de Glioblastoma.



Fonte: Do autor.
Legenda: As linhagens celulares de glioblastoma U251, U87 foram cultivadas em presença de DMSO ou diferentes concentrações de TMZ (0-2000µM), por 48 h. A proliferação celular foi mensurada pelo kit MTT. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

Tabela 2 – Doses de TMZ requeridas para induzir o 50% de inibição do crescimento celular (IC_{50}) nas linhagens celulares de GBM.

Linhagem Celular	IC50
U251	622,91 ± 27
U87	768,93 ± 23
T98G	2.920,00 ± 145

Fonte: Do autor.

Legenda: Os valores foram obtidos no programa Calcusyn para o tratamento com TMZ, por 48h. Valores representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

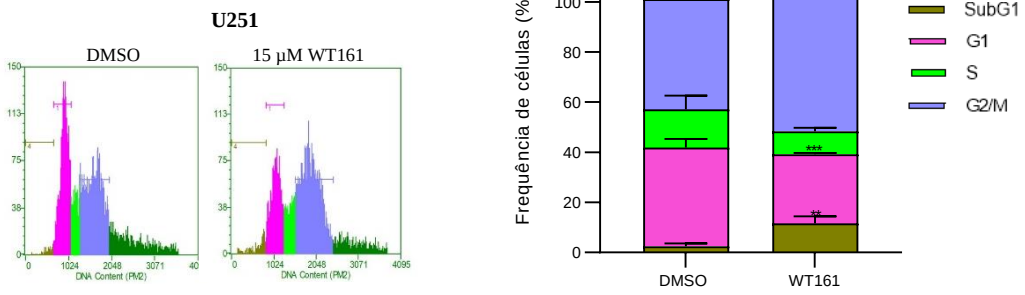
3.3 DINÂMICA DO CICLO CELULAR

WT161 promove bloqueio do ciclo celular das linhagens de glioblastoma.

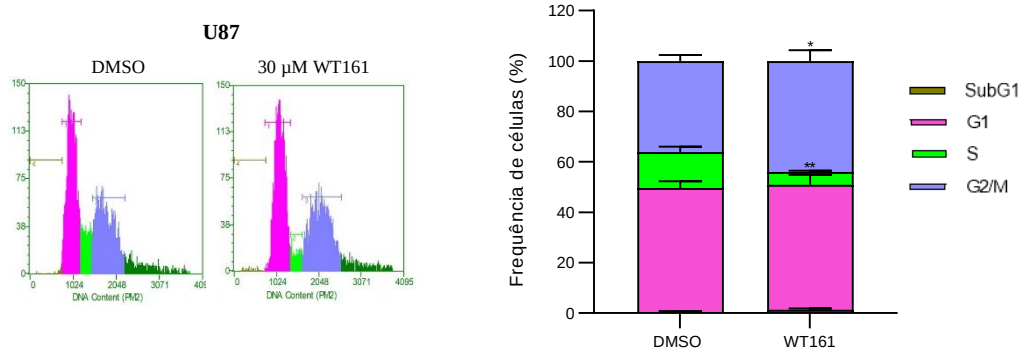
Neste estudo foram avaliados os efeitos de WT161 sobre o ciclo celular das linhagens U251, U87 e T98G. Como demonstra a Figura 8, WT161 induziu significativo incremento no número de células na fase G2/M em todas as linhagens de interesse. Nas células U251 e T98G nota-se ainda aumento da população em sub-G1 acompanhado da diminuição em G1 (FIGURAS 8A e C). Já na linhagem U87 houve diminuição significativa na frequência de células da fase S (FIGURA 8B).

Figura 8 – WT161 promove bloqueio do ciclo celular das linhagens de glioblastoma.

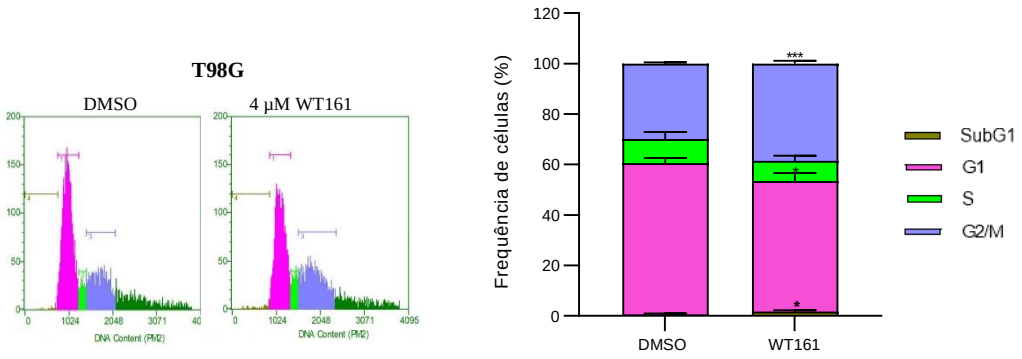
(A)



(B)



(C)



Fonte: Do autor.
Legenda: As células U251(A), U87(B) e T98G(C) foram tratadas com DMSO ou WT161 nas concentrações 15 µM, 30 µM e 4 µM, respectivamente, por 24 h. A porcentagem de células nas diversas fases do ciclo celular foi marcada com iodeto de propídeo e analisada por citometria de fluxo. Os valores são mostrados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001 comparado com o tratamento controle (DMSO).

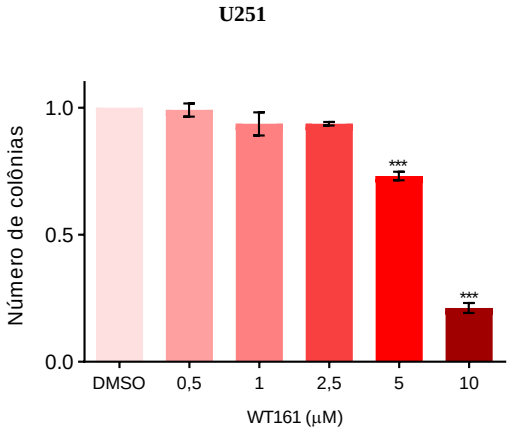
3.4 CAPACIDADE CLONOGÊNICA

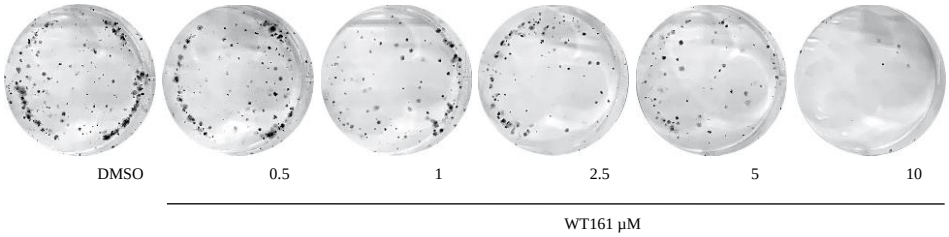
WT161 inibe a capacidade de formação de colônias de células de GBM.

Por meio de experimentos de clonogênicidade, foi determinado que o WT161 diminuiu significativamente a capacidade de formação de colônias provenientes de uma única célula isolada, das três linhagens estudadas U251, U87 e T98G (FIGURA 9). Esse efeito foi evidenciado partir da dose de 0,25 µM de WT161 para as células T98G (p<0,05) (FIGURA 9C) e 0,5 µM para as células U87 (FIGURA 9B).

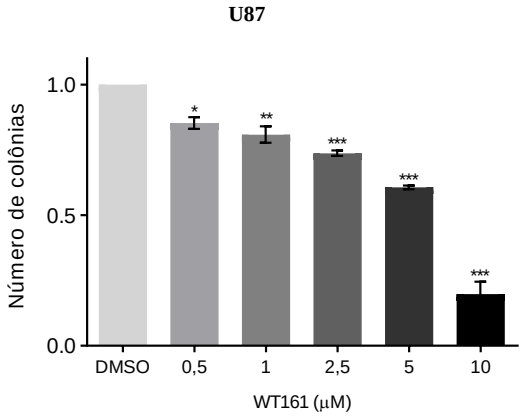
Figura 9. WT161 reduziu a capacidade de formação de colônias das linhagens de GBM.

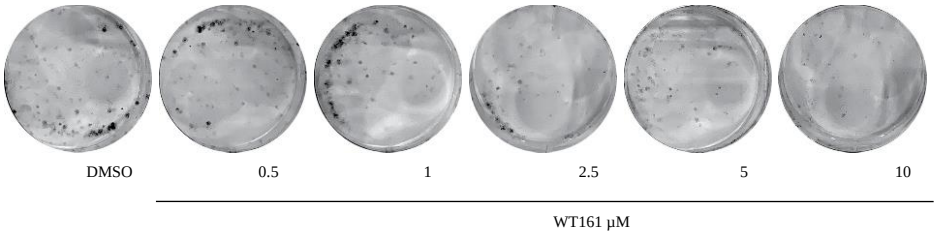
(A)



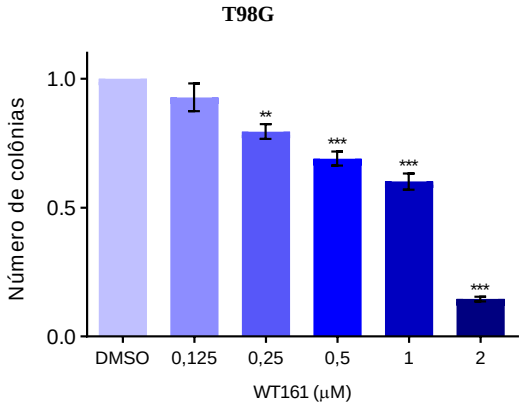

DMSO
0.5
1
2.5
5
10
WT161 µM

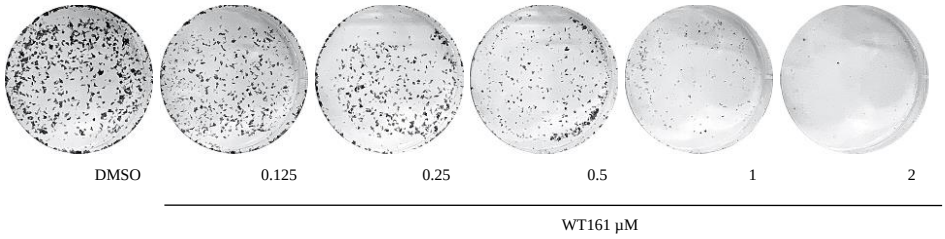
(B)


U87
Número de colônias
1.0
0.5
0.0
*
**
***
***
***
DMSO
0,5
1
2,5
5
10
WT161 (µM)


DMSO
0.5
1
2.5
5
10
WT161 µM

(C)


T98G
Número de colônias
1.0
0.5
0.0
**
***
***
***
DMSO
0,125
0,25
0,5
1
2
WT161 (µM)



Fonte: Do autor.
Legenda: As células U251(A), U87(B) e T98G(C) foram tratadas com DMSO ou diferentes concentrações de WT161, por 48 horas, e incubadas por 7 dias em meio DMEM livre do composto. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001, comparado com o tratamento controle (DMSO). Valores representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

3.5 COMBINAÇÃO DE DROGAS

Atuação sinérgica de WT161 e TMZ atuam sinergicamente sobre células de GBM de forma dependente da estratégia de combinação.

Nesta investigação foram determinados os efeitos da combinação de WT161 e TMZ em linhagens celulares, representados pelo CI, os níveis de dose-efeito da inibição do crescimento (ED50–ED90) e o DRI. Três diferentes estratégias de exposição de drogas foram testadas (exposição simultânea WT161+TMZ, sequencial TMZ→ WT161 e sequencial WT161→TMZ) com índices molares proporcionais aos valores individuais de IC50 como definido previamente (1:40 para U251; 1:25 para U87 e 1:750 para T98G).

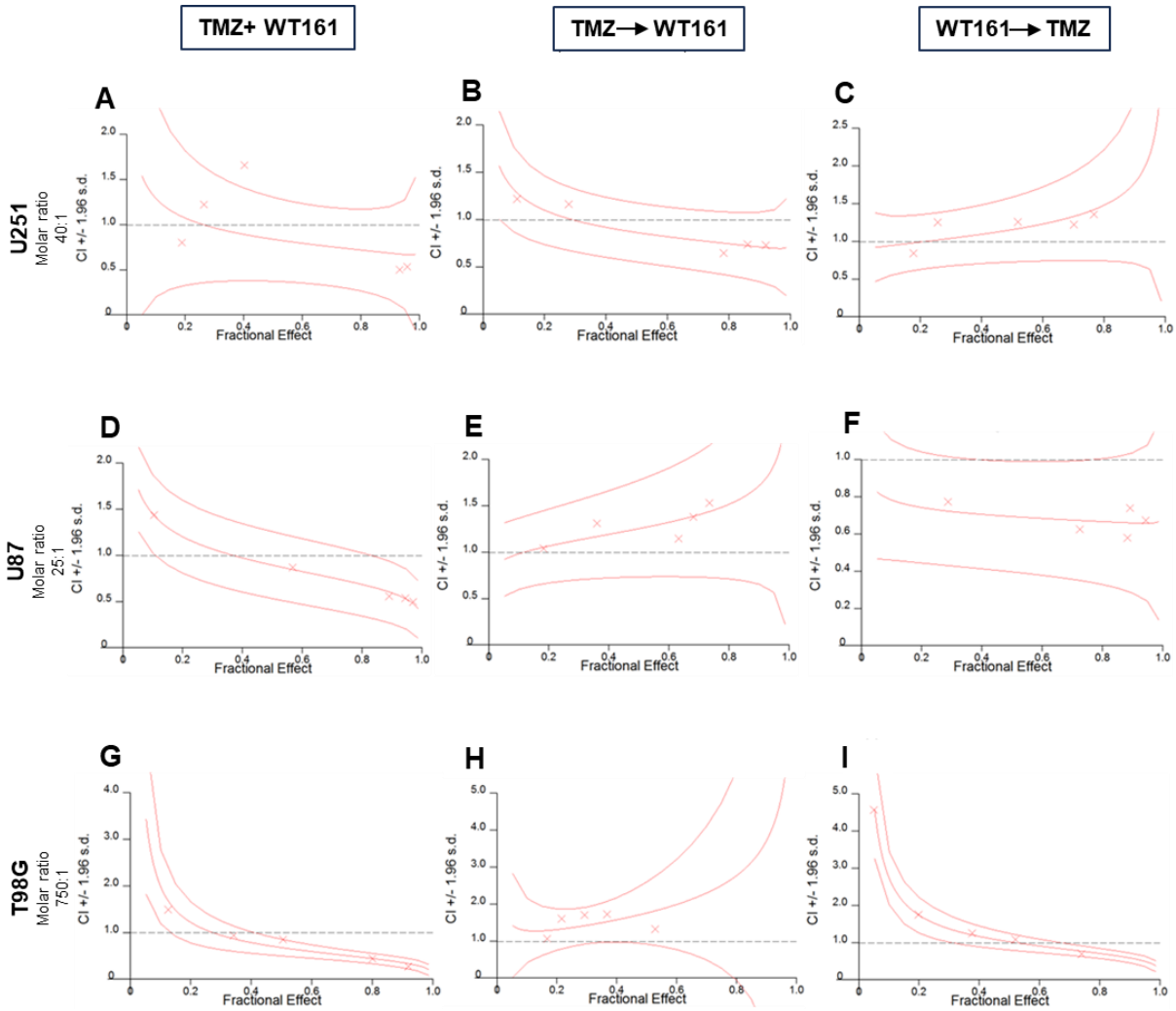
Foi observado nas três linhagens que a administração simultânea de WT161 com TMZ, por 48 h, produziu efeitos sinérgicos, ED50(++); ED75(++); ED90(+++), segundo a classificação do método de índice de combinação baseado no descrito por Chou e Talalay (CHOU; TALALAY, 1984; CHOU, 1991) a partir de cerca de 35% de inibição da proliferação celular (C<1, FIGURA 10A; D; G, TABELA 3).

Quando a sequência de administração TMZ→WT161 foi utilizada, efeitos sinérgicos, ED50(+); ED75(++); ED90(++), foram encontrados a partir de 25% de inibição da proliferação celular para as células U251 (C<1, FIGURA 10B, TABELA 3). Nas células U87 e T98G os efeitos foram antagônicos, ED50(--); ED75(---); ED90(---) e ED50(---); ED75(----); ED90(---) respectivamente, em todos os níveis de inibição da proliferação (C>1, FIGURA 10E; H, TABELA 3).

O contrário ocorreu para o tratamento sequencial WT161 seguido de TMZ (WT161→TMZ), onde foram encontrados efeitos antagônicos na U251, ED50(-); ED75(--);

ED90(---), a partir de 25% de inibição da proliferação celular (C>1, FIGURA 10C, TABELA 3). Enquanto U87 apresentou resultados sinérgicos, ED50(+++); 75(+++); 90(+++), em todos os níveis de inibição da proliferação (C<1, FIGURA 10F, TABELA 3). Nas células T98G por sua vez, o efeito sinérgico com essa sequência de tratamento foi obtido partir de 45% de inibição da proliferação celular ED50(±); ED75(++); ED90(+++) (C<1, FIGURA 10I, TABELA 3).

Figura 10 – Interações dependentes da sequência de administração entre WT161 e TMZ nas linhagens celulares U251, U87 e T98G.



Fonte: Do autor.

Legenda: Determinação dos índices de combinação (CI) nas linhagens celulares de glioblastoma expostas a WT161 e TMZ utilizando três diferentes estratégias de combinação: administração simultânea por 48 h (A; D; G); administração sequencial TMZ→Wt161, 24 h cada droga (B; E; H); e administração sequencial WT161→TMZ, 24 h cada droga (C; F; I). As proporções molares utilizadas na combinação entre as drogas TMZ:WT161 foram de 40:1 para a linhagem U251, 25:1 para U87 e 750:1 para T98G. (---) define o valor de CI=1 e indica aditivismo, CIs superiores ou inferiores indicam antagonismo ou sinergismo, respectivamente. Cruzes representam os valores de CI obtidos experimentalmente e as linhas contínuas representam CIs derivados computadorizadamente nos níveis de efeito desde 0-100% de inibição da proliferação (Fractional Effect) de acordo com o programa Calcusyn.

Tabela 3 – Valores de CI e DRI de acordo com as diferentes estratégias de exposição da combinação das drogas WT161 e TMZ nas linhagens celulares de GBM U251, U87 e T98G.

Linhagem celular	**Estratégia de combinação**	**Drogas e combinações (razão constante)**	**Parâmetros**			**Valores de CI em**			**Valores de DRI em**		
			Dm	***m***	***r***	**ED50**	**ED75**	**ED90**	**ED50**	**ED75**	**ED90**
U 251											
	WT161+TMZ	WT161	14,96	1,25	0,99				**2,34**	**3,48**	**5,16**
		TMZ	619,23	2,79	0,99				**2,42**	**3,47**	**2,03**
		WT161+TMZ (1:40)	255,6	2,28	0,90	**0,84**	**0,739**	**0,69**			
	TMZ→WT161	WT161	14,96	1,25	0,99				**2,27**	**3,36**	**4,96**
		TMZ	619,23	2,79	0,99				**2,35**	**2,14**	**1,96**
		WT161+TMZ (1:40)	263,42	2,66	0,99	**0,87**	**0,76**	**0,71**			
	WT161→TMZ	WT161	14,96	1,25	0,99				**1,70**	**1,84**	**1,99**
		TMZ	619,23	2,79	0,99				**1,76**	**1,17**	0,78
		WT161+TMZ (1:40)	352,42	1,38	0,99	1,1	1,40	1,78			
U87											
	WT161+TMZ	WT161	34,00	1,64	0,98				**2,38**	**3,42**	**4,90**
		TMZ	758,53	2,71	0,99				**2,10**	**2,31**	**2,55**
		WT161+TMZ (1:25)	360,80	3,58	0,99	**0,89**	**0,72**	**0,60**			
	TMZ→WT161	WT161	34,00	1,64	0,98				**1,70**	**1,70**	**1,70**

		TMZ	758,53	2,71	0,99				**1,50**	**1,15**	0,89
		WT161+TMZ (1:25)	505,68	1,64	0,99	1,26	1,46	1,71			
	WT161→TMZ	WT161	34,00	1,64	0,98				**3,07**	**3,68**	**4,42**
		TMZ	758,53	2,71	0,99				**2,71**	**2,50**	**2,30**
		WT161+TMZ (1:25)	279,75	2,26	0,99	**0,69**	**0,67**	**0,66**			
T98G											
	WT161+TMZ	WT161	3,83	1,57	0,99				**1,62**	**2,18**	**2,9**
		TMZ	2 794	0,63	0,97				**15,73**	**59,52**	**225**
		WT161+TMZ (1:750)	1 776	2,61	0,97	**0,68**	**0,49**	**0,36**			
	TMZ→WT161	WT161	3,83	1,57	0,99				0,63	0,41	0,27
		TMZ	2 794	0,63	0,97				**6,85**	**11,52**	**21,80**
		WT161+TMZ (1:750)	4 591	0,98	0,94	1,76	2,52	3,71			
	WT161→TMZ	WT161	3,83	1,57	0,99				**1,16**	**1,36**	**1,71**
		TMZ	2 794	0,63	0,97				**11,30**	**37,85**	**137**
		WT161+TMZ (1:750)	2 472	1,92	0,97	**0,94**	**0,76**	**0,59**			

Fonte: Do autor.

Legenda: Apresentam-se em negrito os valores de CI que indicam efeito sinérgico com uma consequente redução de dose da droga referida nas frações afetadas ED50, ED75 e ED90. Dm, m e r representam a dose de IC50, inclinação da curva obtida (slope) e o coeficiente de correlação linear (conformidade da curva), respectivamente.

3.6 MORTE CELULAR – APOPTOSE POR ANEXINA

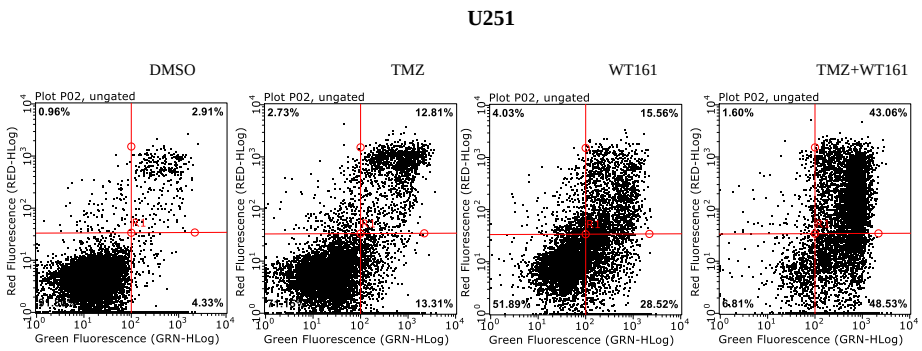
WT161 induz morte celular por apoptose de células de GBM.

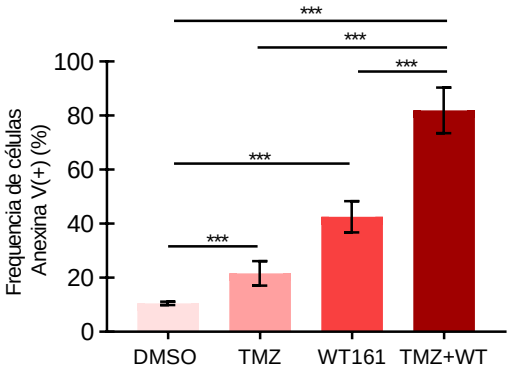
No intuito de verificar os efeitos sobre a morte celular apoptótica induzida pelo tratamento com WT161, isoladamente ou em combinação com TMZ, nas linhagens celulares de GBM U251, U87 e T98G, foi utilizado o ensaio de Anexina V/Iodeto de propídeo. Com esse fim, foram realizadas exposições isoladas e simultâneas das células ao WT161 e TMZ, por 48 h, nas concentrações referentes aos primeiros pontos de sinergismo obtidos para cada linhagem no ensaio de combinação de drogas. Como apresentado na Figura 11, as células controle, tratadas apenas com o veículo DMSO, se mostraram viáveis como esperado, enquanto o número de células apoptóticas (células Anexina V-positivas) aumentaram significativamente após tratamento isolado com WT161, nas três linhagens em estudo. De modo relevante, o tratamento combinado WT161+TMZ causou um efeito apoptótico significativamente maior do que os tratamentos isolados nas três linhagens de GBM investigadas, demonstrando que o sinergismo entre ambas as drogas representa também um efeito potencializador da apoptose dependente de TMZ.

Vale ressaltar a frequência insignificante de células positivas apenas para iodeto de propídeo, indicando a inexistência de possíveis eventos necróticos, o que reforça a atividade pro-apoptótica de WT161 e de sua combinação com TMZ sobre as linhagens estudadas.

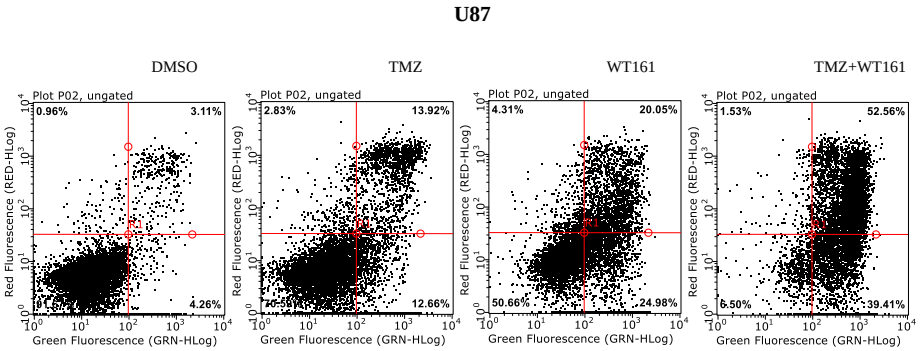
Figura 11 – Frequência (%) de células das linhagens U251, U87 e T98G marcadas por Anexina V e/ou IP, determinada por citometria de fluxo.

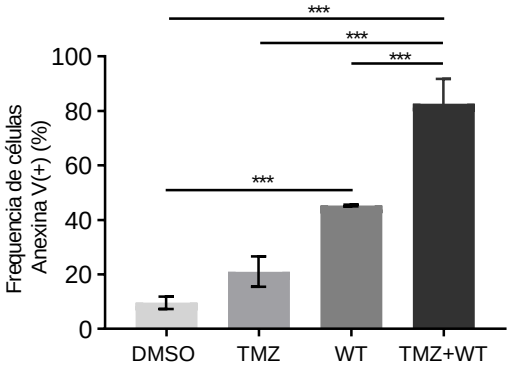
(A)



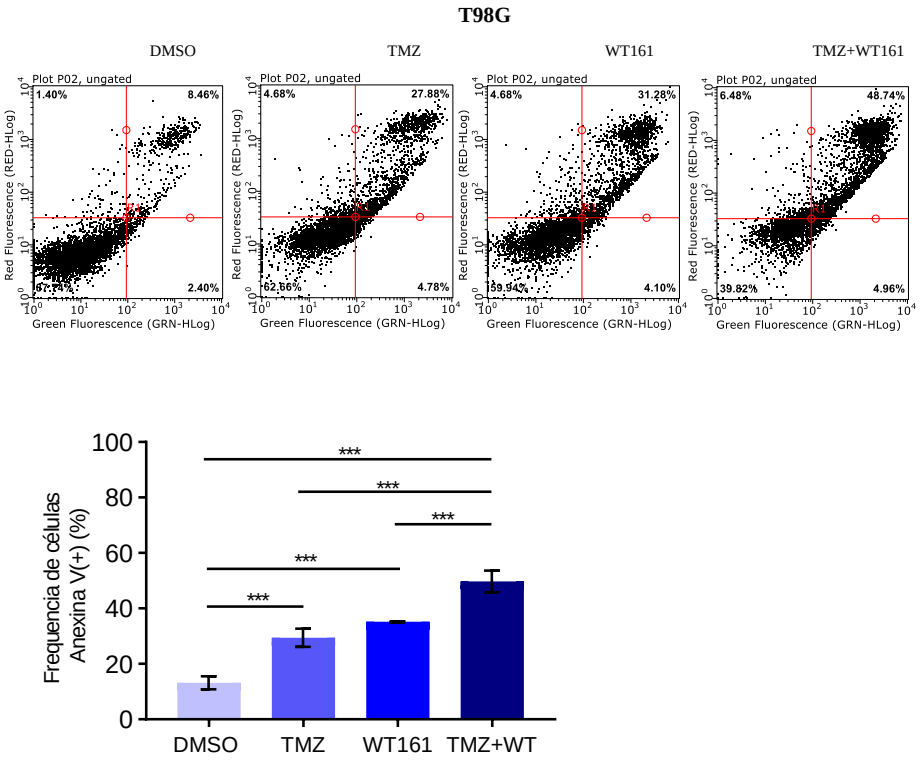

***
***
***
***
***
100
80
60
40
20
0
Frequencia de células
Anexina V(+) (%)
DMSO
TMZ
WT161
TMZ+WT

(B)


U87
DMSO
TMZ
WT161
TMZ+WT161
Plot P02, ungated
0.96%
3.11%
4.26%
2.83%
13.92%
12.66%
4.31%
20.05%
24.98%
1.53%
52.56%
39.41%
Red Fluorescence (RED-HLog)
Green Fluorescence (GRN-HLog)


***
***
***
***
100
80
60
40
20
0
Frequencia de células
Anexina V(+) (%)
DMSO
TMZ
WT
TMZ+WT

(C)



Fonte: Do autor.
Legenda: As células U251(A) foram tratadas, por 48 horas, com DMSO ou concentrações de 400 µM de TMZ e 10 µM de WT161 isoladas e em combinação simultânea; para a U87(B) foram utilizadas 400 µM de TMZ e 15 µM de WT161; para a T98G(C), 1500 µM de TMZ e 2 µM de WT161. Valores representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001 comparado com o tratamento controle (DMSO). Diferenças significantes entre o tratamento combinado e os tratamentos isolados são mostrados com *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001.

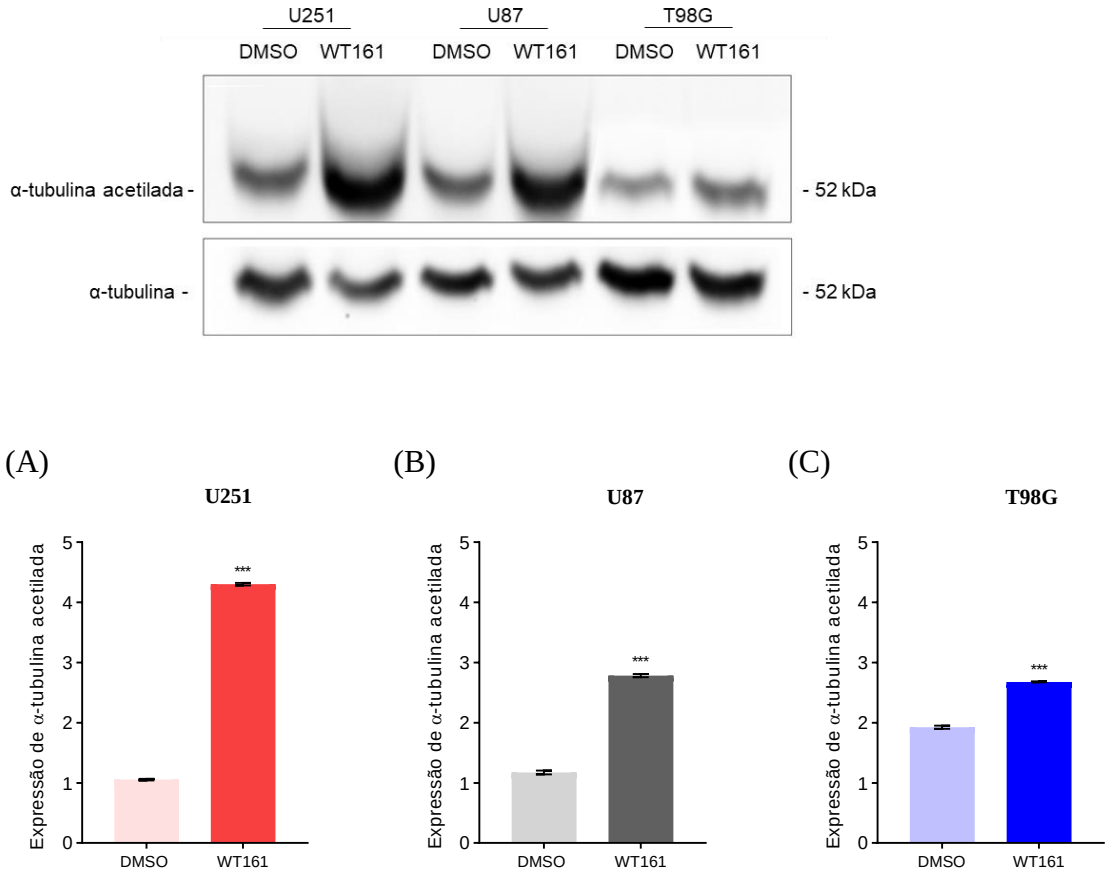
3.7 WESTERN BLOTTING

WT161 altera a expressão das proteínas α-tubulina acetilada, PARP clivada e β-catenina nas linhagens de GBM.

Foi analisada a modulação da expressão das proteínas α-tubulina acetilada, PARP clivada e β-catenina nas linhagens U251, U87 e T98G após tratamento com WT161, 48 horas, por *western blotting*.

Inicialmente neste ensaio, verificou-se o efeito do composto na ampliação significativa do nível de expressão da proteína α-tubulina acetilada em todas as células estudadas de GBM (FIGURA 12). Por se tratar de um dos principais alvos de HDAC6, o aumento da acetilação de α-tubulina indica a ação inibitória de WT161 sobre essa HDAC.

Figura 12 – WT161 aumentou a expressão de α-tubulina acetilada nas linhagens de GBM.

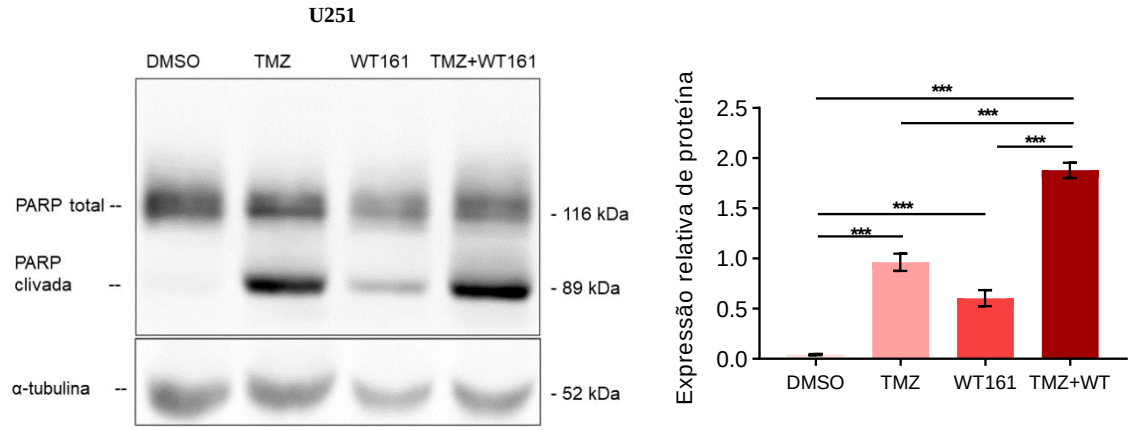


Fonte: do autor.
Legenda: As células U251(A), U87(B) e T98G(C) foram tratadas com DMSO ou 15; 30 e 4 µM de WT161, respectivamente, por 48 horas, no ensaio de *western blotting*. A expressão de α-tubulina foi usada como controle. Os valores são mostrados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001 comparado com o tratamento controle (DMSO).

Em seguida, investigou-se a ação de WT161, isolado e combinado com TMZ, na indução de apoptose nas linhagens de GBM por meio da clivagem de PARP. Os resultados reforçaram o aumento da atividade citotóxica da combinação de WT161 e TMZ, uma vez que elevou significativamente a expressão de PARP clivada, comparada tanto ao controle quanto aos tratamentos isolados nas três células em estudo (FIGURAS 13; 14 e 15). Além disso, a combinação de fármacos foi capaz de vencer a resistência das linhagens U87 e T98G aos tratamentos isolados WT161 e TMZ, onde não houve aumento expressivo da porção clivada de PARP nas condições avaliadas nessa metodologia (FIGURAS 14 e 15). Qualitativamente, as membranas representativas dessas linhagens exibiram bandas mais marcadas nos grupos expostos a WT161 e TMZ quando comparadas ao controle, e menos intensas do que na estratégia de tratamento combinado (FIGURAS 14 e 15).

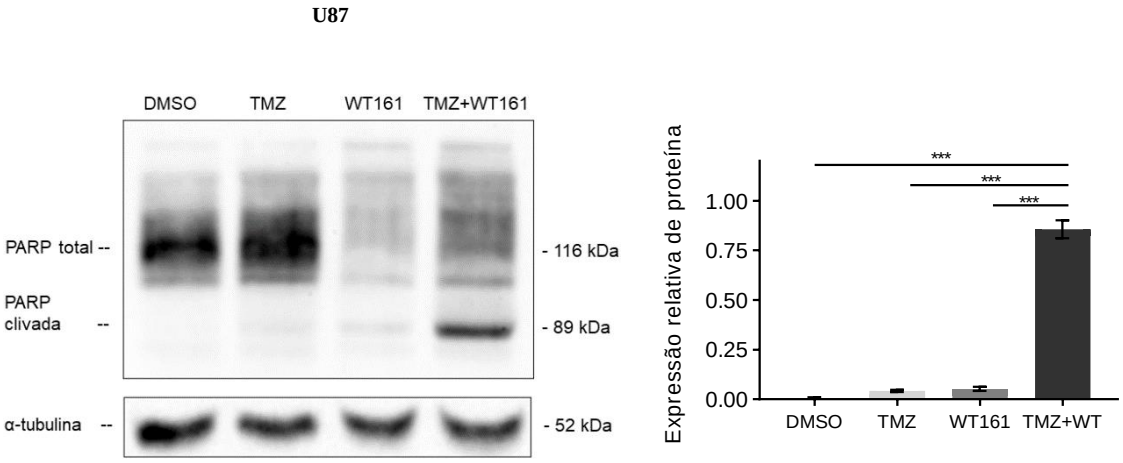
Na linhagem U251, Figura 13, é possível identificar aumento significativo do nível de expressão de PARP clivada na administração de WT161 e TMZ de forma isolada, além da combinação.

Figura 13 – Modulação da expressão de PARP clivada na linhagem U251.



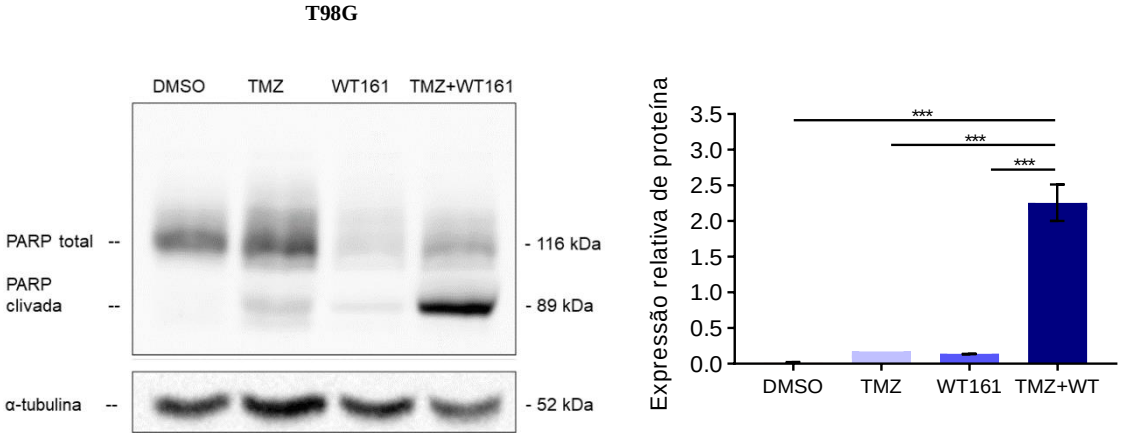
Fonte: do autor.
Legenda: As células foram tratadas com DMSO ou 400 µM de TMZ e 10 µM de WT161 isoladas e em combinação simultânea, por 48 horas, no ensaio de *Western blotting*. A expressão de α-tubulina foi usada como controle. Os valores são mostrados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001.

Figura 14 – Modulação da expressão de PARP clivada na linhagem U87.



Fonte: do autor.
Legenda: As células foram tratadas com DMSO ou 400 µM de TMZ e 15 µM de WT161 isoladas e em combinação simultânea, por 48 horas, no ensaio de *Western blotting*. A expressão de α-tubulina foi usada como controle. Os valores são mostrados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001.

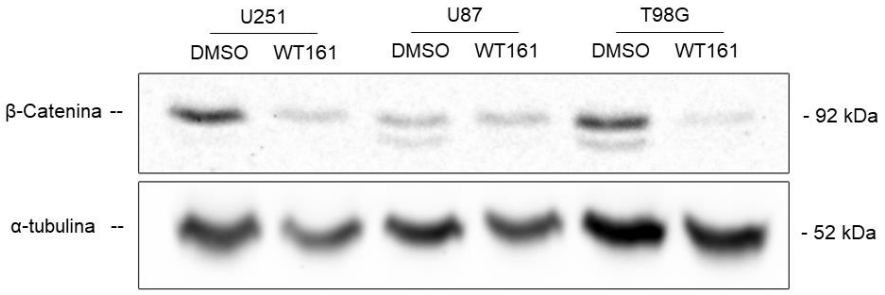
Figura 15 – Modulação da expressão de PARP clivada na linhagem T98G.

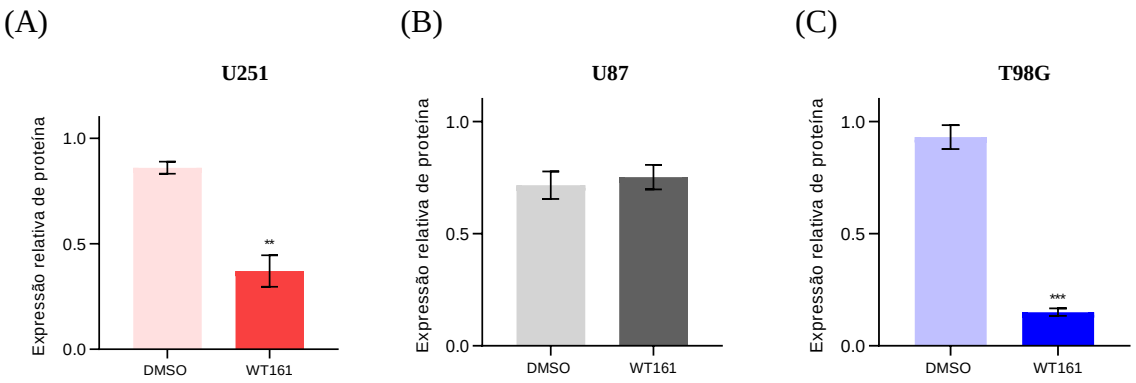


Fonte: do autor.
Legenda: As células foram tratadas com DMSO ou 1500 µM de TMZ e 2 µM de WT161 isoladas e em combinação simultânea, por 48 horas, no ensaio de *western blotting*. A expressão de α-tubulina foi usada como controle. Os valores são mostrados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001.

Por fim, no presente ensaio constatou-se também o efeito do composto WT161 na diminuição significativa da expressão de β-catenina nas células U251 e T98G (FIGURAS 16A e C). Na linhagem U87, o nível dessa proteína não sofreu alteração após tratamento com o composto (FIGURA 16B).

Figura 16 – Influência de WT161 na expressão de β-catenina das linhagens de GBM.





Fonte: do autor.
Legenda: As células U251(A), U87(B) e T98G (C) foram tratadas com DMSO ou 15; 30 e 4 µM de WT161, respectivamente, por 48 horas, no ensaio de *Western blotting*. A expressão de α-tubulina foi usada como controle. Os valores são mostrados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001 comparado com o tratamento controle (DMSO).

ENSAIOS DE PROGRESSÃO TUMORAL

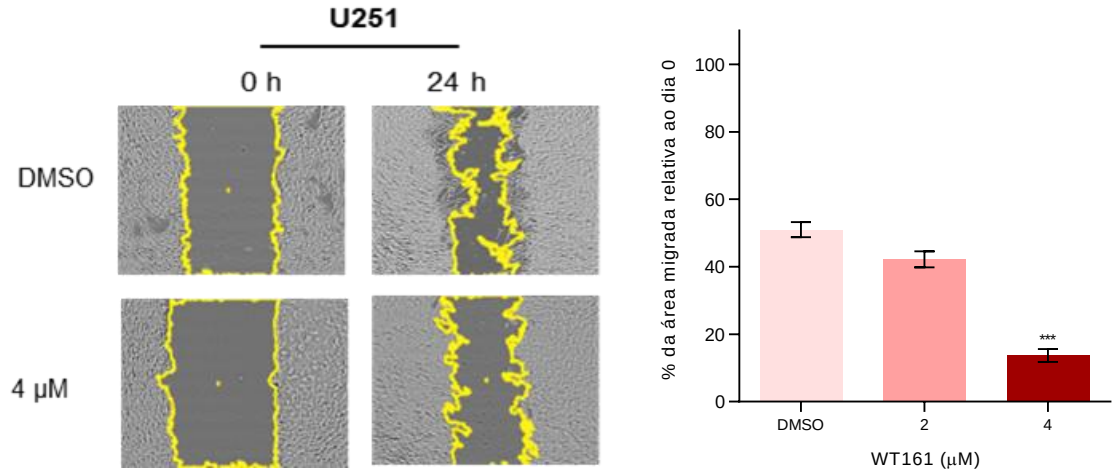
3.8 MIGRAÇÃO

WT161 reduziu a capacidade migratória das linhagens de GBM.

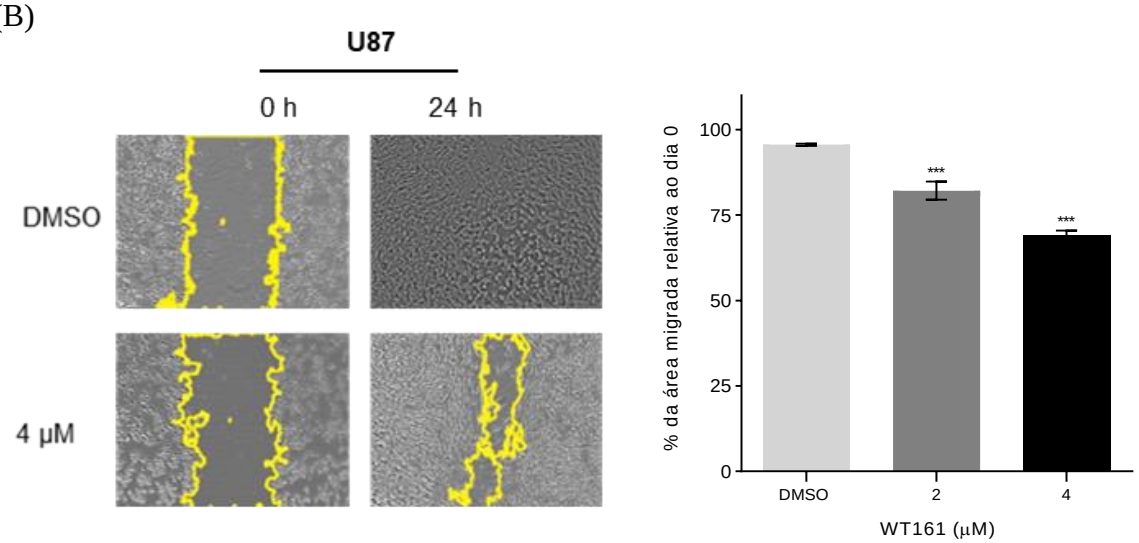
O presente ensaio investigou a capacidade migratória das linhagens U251, U87 e T98G após exposição a WT161. Observou-se redução significativa da atividade migratória das linhagens celulares, após 24 h de tratamento de 4 µM WT161 (FIGURA 17). De forma importante, apenas nas células U87 esse efeito antimigratório foi evidenciado desde o tratamento com a menor concentração, 2 µM WT161 (FIGURA 17B).

Figura 17 – WT161 alterou a capacidade migratória das células de Glioblastoma.

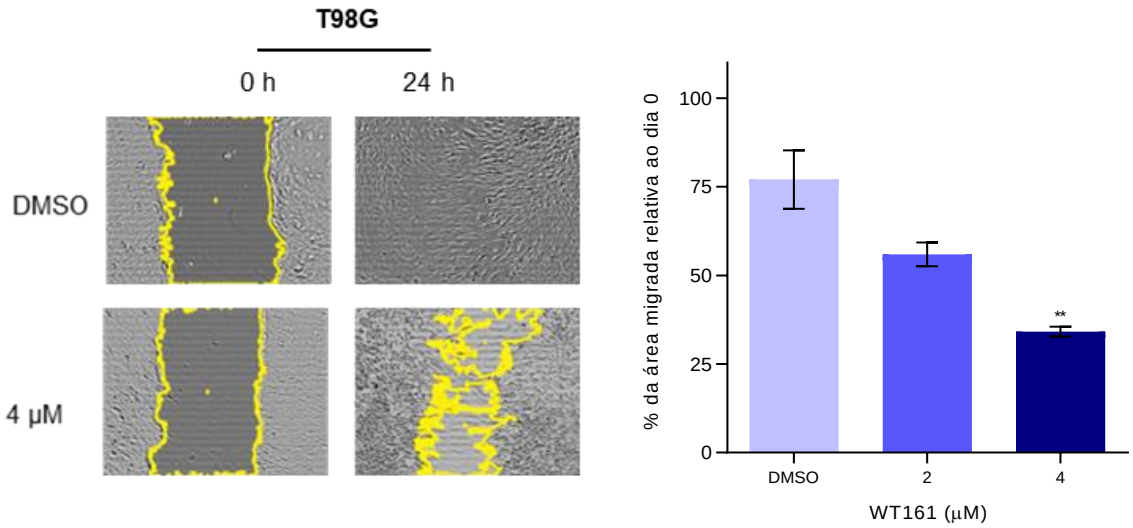
(A)



(B)



(C)



Fonte: Do autor.
Legenda: As linhagens U251(A), U87(B) e T98G (C) foram tratadas com DMSO ou WT161 por 24 h, nas concentrações 2 e 4 µM. Utilizando o método de Scratch, as análises foram feitas por meio da área da ferida. Os valores são mostrados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001 comparado com o tratamento controle (DMSO).

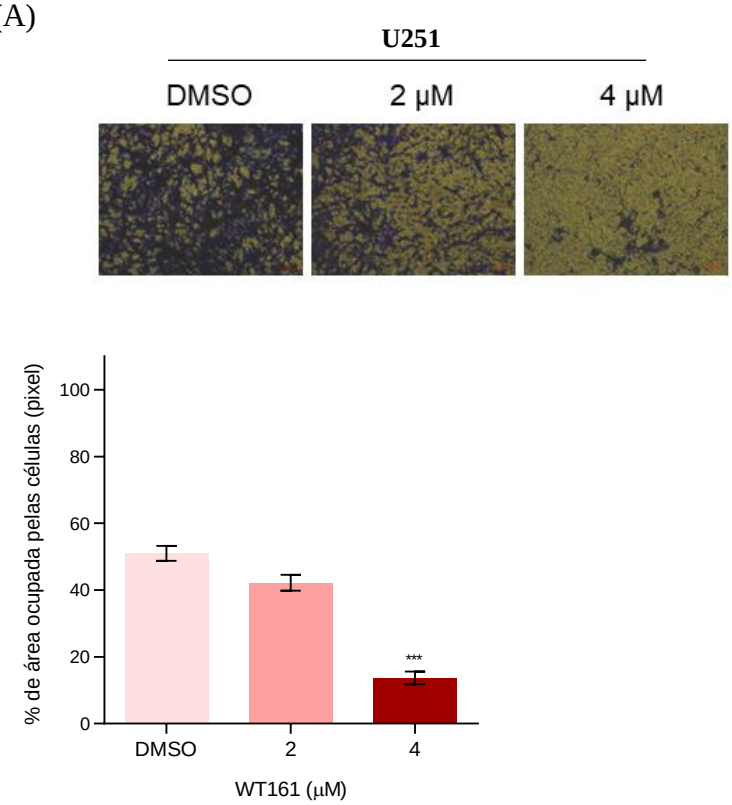
3.9 INVASÃO

WT161 reduz a invasividade das linhagens de GBM.

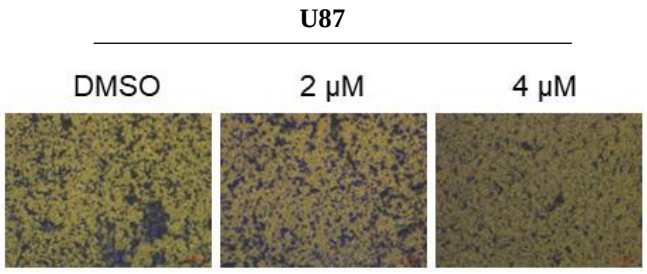
Na avaliação do efeito de WT161 na inibição da invasividade das células U251, U87 e T98G de GBM utilizou-se a técnica de *transwell* onde as análises foram realizadas com a mensuração da área invadida em pixels. Evidenciou-se que o tratamento com a concentração 4 µM WT161 reduziu a invasão celular em 61%, 46% e 74% nas linhagens U251, U87 e T98G respectivamente. Similarmente aos resultados de capacidade migratória, apenas nas células U87 o efeito anti-invasão foi evidenciado desde o tratamento com a menor concentração, 2 µM WT161 (FIGURA 18).

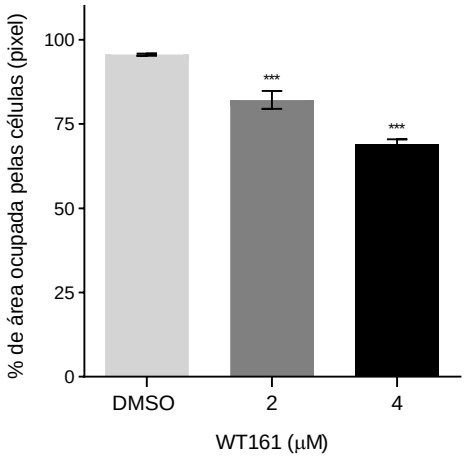
Figura 18 – WT161 alterou a capacidade invasiva das células de Glioblastoma.

(A)

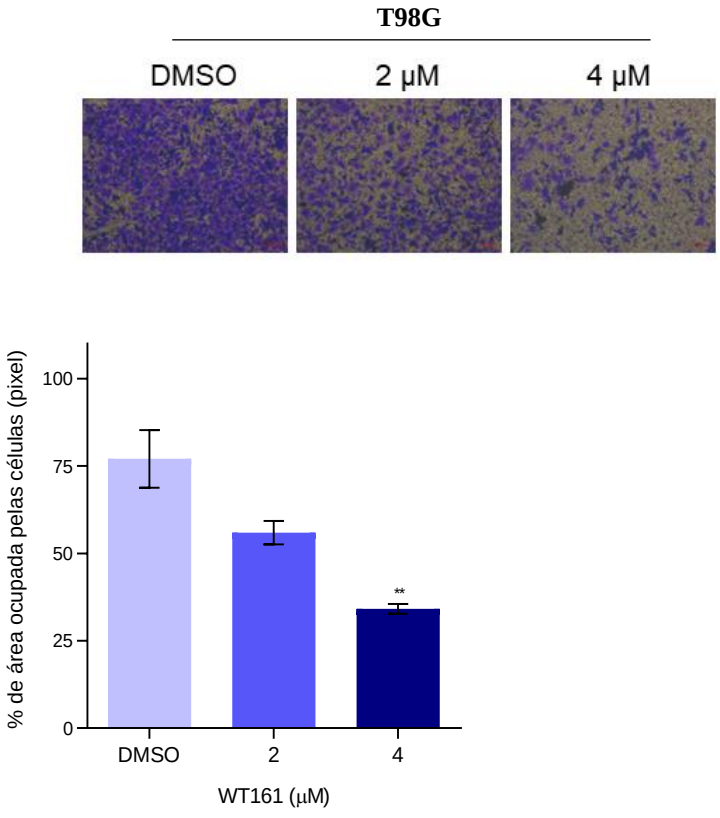


(B)





(C)



Fonte: Do autor.

Legenda: As linhagens U251(A), U87(B) e T98G (C) foram tratadas com DMSO ou WT161 por 24 h, nas concentrações 2 e 4 µM. Utilizando a técnica de Transwell, as análises foram feitas por meio da mensuração da área invadida (ocupada) pelas células, em pixel. Os valores são mostrados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001 comparado com o tratamento controle (DMSO).

ENSAIOS EM MODELO TRIDIMENSIONAL (3D)

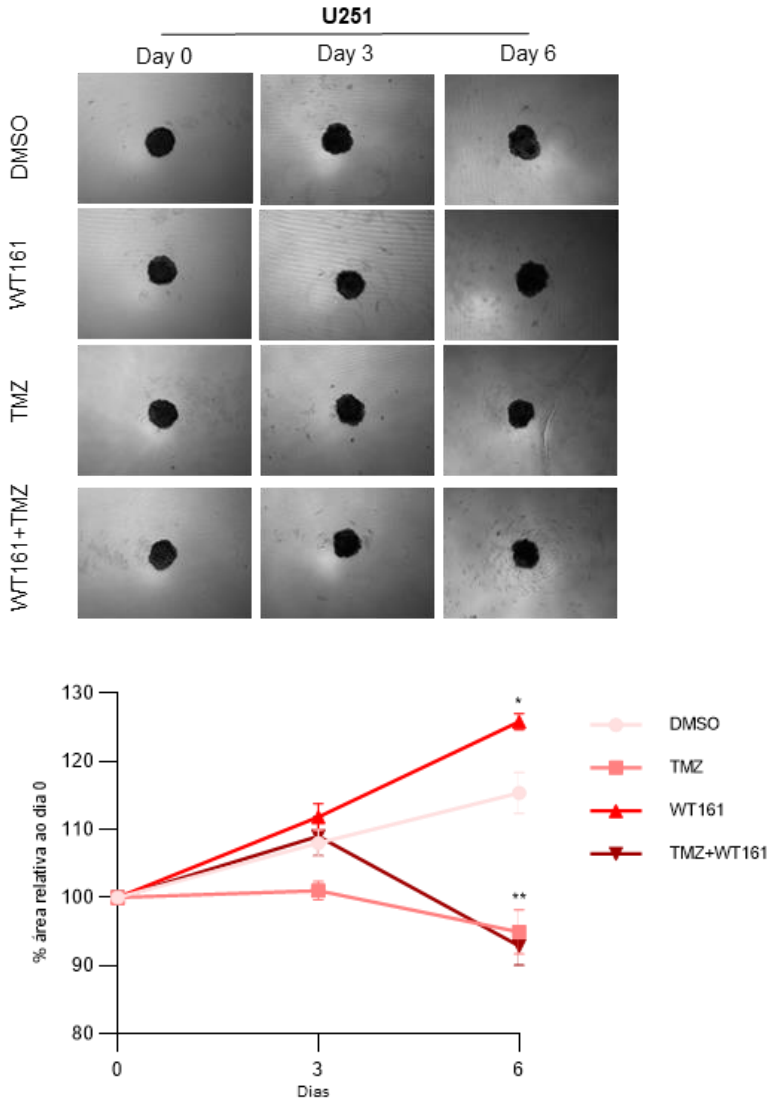
3.10 COMBINAÇÃO DE DROGAS EM CULTURA CELULAR 3D

A combinação de drogas WT161+TMZ inibiu o desenvolvimento de esferóides derivados das linhagens U251 e T98G de GBM.

Investigamos nesse modelo experimental o papel do inibidor de HDAC6 no crescimento de esferóides 3D tumorais derivados das linhagens de GBM. Em nosso modelo, as células U87 não formaram esferóides no tempo previsto e sob as condições testadas no presente estudo, portanto utilizamos os modelos de cultivo tridimensionais das linhagens U251 e T98G. Dessa forma, após estabelecimento dos esferóides multicelulares das linhagens U251 e T98G, com crescimento monitorado por 4 dias, elas foram tratadas com WT161 e TMZ isoladamente e em combinação, por 6 dias. As concentrações utilizadas se basearam nos ensaios prévios em 2D, correspondendo aos valores do primeiro ponto da combinação com efeito sinérgico, obtidos no ensaio de combinação de drogas, 10 µM de WT161 e 400 µM de TMZ para U251; e 2 µM de WT161 e 1500 µM de TMZ para T98G. Mantiveram-se as mesmas razões de combinação 1:40 e 1:750 para as células U251 e T98G, respectivamente, utilizadas no ensaio 2D.

No sexto dia, notou-se o efeito inibitório da combinação simultânea WT161 e TMZ sobre o desenvolvimento dos esferóides de ambas as linhagens de GBM, com redução significativa de sua área em relação ao controle, 19% para U251 (FIGURA 19) e 72% na T98G (FIGURA 20). Os resultados reforçam também o sinergismo dessa combinação nas células T98G, semelhantemente às mesmas células cultivadas em monocamada, visto que a as esferas foram menos sensíveis aos tratamentos isolados com WT161 e TMZ.

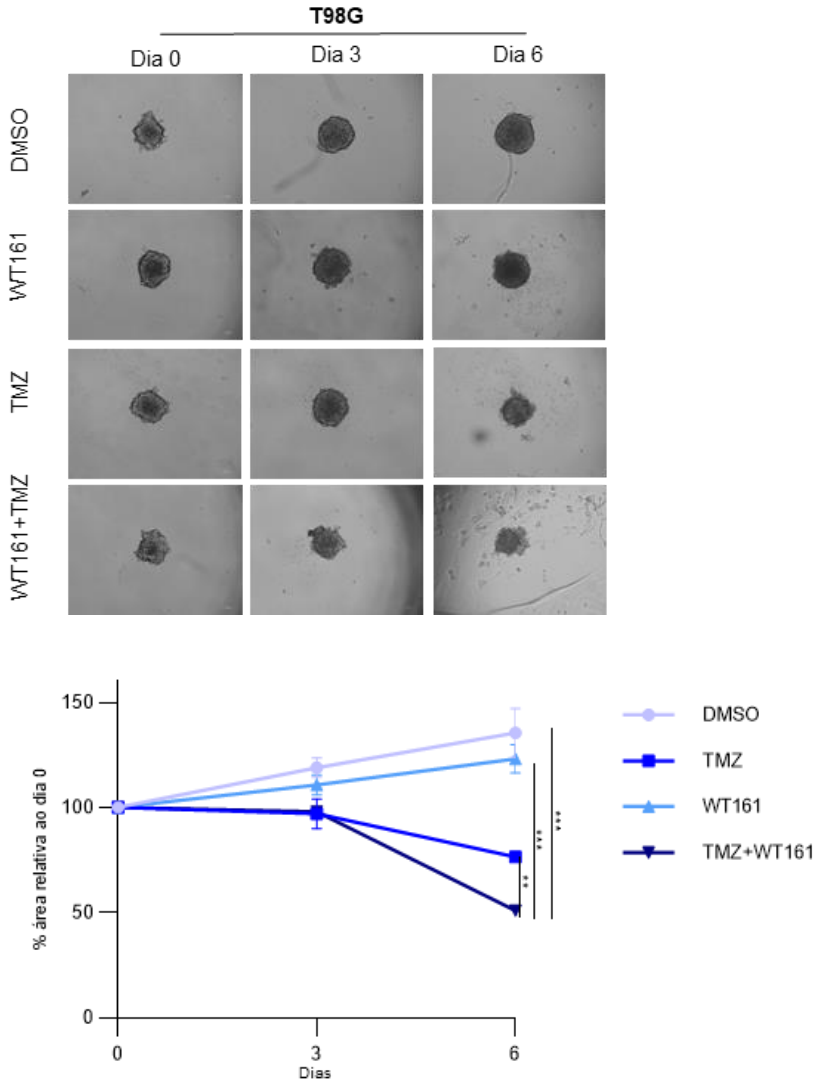
Figura 19 – Efeito inibitório da combinação WT161+TMZ no crescimento de esferóides derivados de U251 de GBM, em modelo 3D.



Fonte: Do autor

Legenda: Os esferóides foram tratados com DMSO ou 10 e 400 µM de WT161 e TMZ, respectivamente, isolados ou em combinação, por 6 dias. A área do esferóide em seu quarto dia de formação foi usada como padrão, no tempo 0 de tratamento. Os valores são mostrados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *P<0,05; **P<0,01, comparado com o tratamento controle (DMSO).

Figura 20 – Efeito inibitório da combinação WT161+TMZ no crescimento de esferóides derivados de T98G de GBM, em modelo 3D.



Fonte: Do autor
Legenda: Os esferóides foram tratados com DMSO ou 2 e 1500 µM de WT161 e TMZ, respectivamente, isolados ou em combinação, por 6 dias. A área do esferóide em seu quarto dia de formação foi usada como padrão, no tempo 0 de tratamento. Os valores são mostrados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001 comparado com o tratamento controle (DMSO).

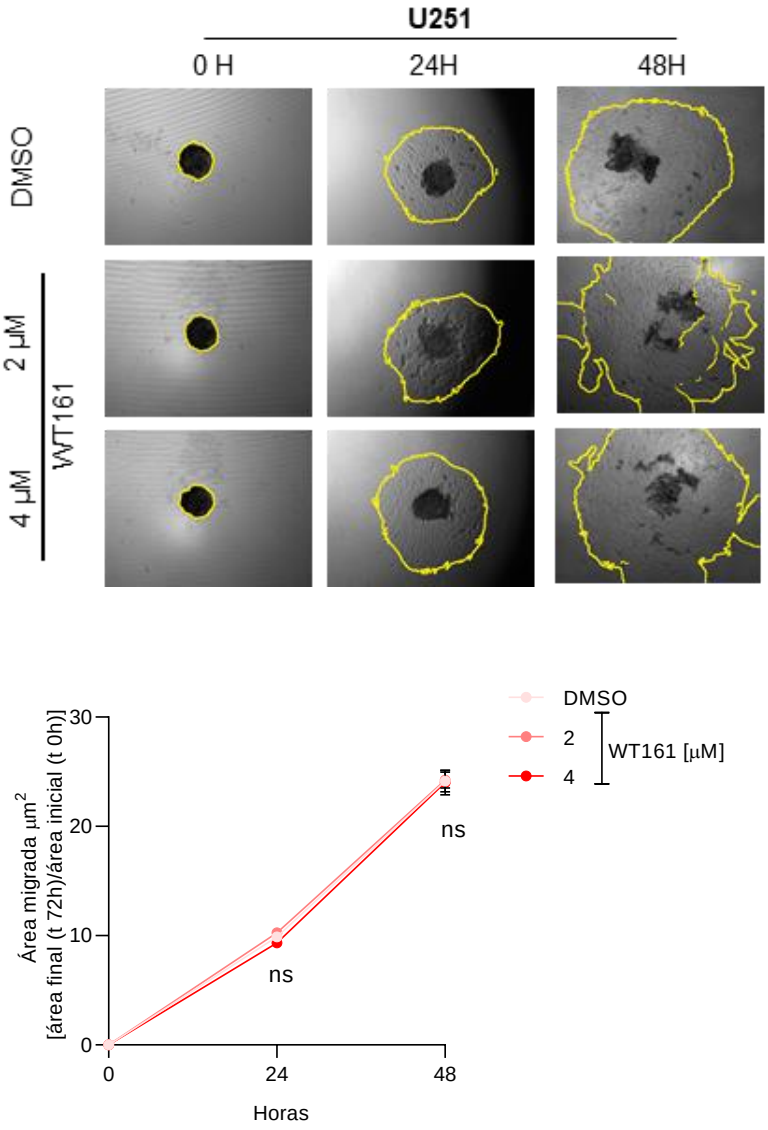
3.11 MIGRAÇÃO EM CULTURA CELULAR 3D

WT161 reduziu a capacidade migratória de esferóides derivados da linhagem T98G de GBM.

Avaliamos ainda o papel de WT161 sobre capacidade migratória das esferas derivadas das linhagens U251 e T98G de GBM. As concentrações utilizadas do composto são referentes

aos valores obtidos no ensaio de migração 2D realizado previamente, sendo 2 µM e 4 µM para ambas as células. WT161 não apresentou efeito sobre a capacidade migratória dos esferóides de U251 (FIGURA 21). Enquanto nas células T98G, os resultados demonstram que WT161 inibiu significativamente a migração desses esferóides sobre o substrato de gelatina, de 6 μm^2 para 2,6 μm^2 de área migrada, após tratamento com 4 µM de WT161 nas primeiras 48 horas de exposição. Essa diferença é ainda maior após 72 horas de tratamento, onde observa-se inibição de cerca de 80% da migração, comparada ao controle DMSO (FIGURA 22).

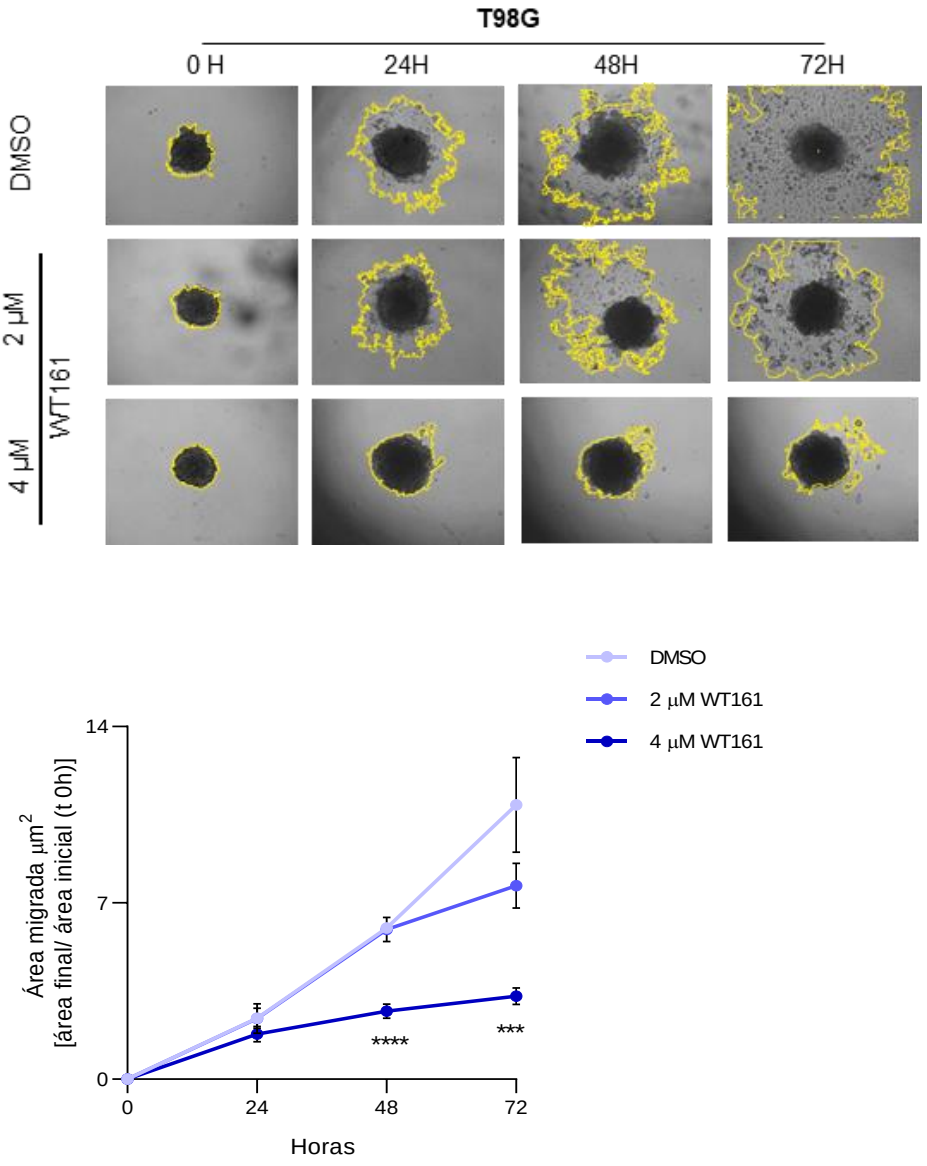
Figura 21 – WT161 não apresentou efeito sobre a capacidade migratória dos esferóides derivados de U251 de GBM, em modelo 3D.



Fonte: Do autor.
Legenda: Os esferóides foram tratados com DMSO ou 2 e 4 µM de WT161, por 24, 48 e 72 horas. Área migrada

é dada pela relação área total do esferóide após 72 horas de tratamento com WT161/área da esfera antes do tratamento (tempo 0). Os valores são mostrados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

Figura 22 – WT161 inibiu a capacidade migratória dos esferóides derivados de T98G de GBM, em modelo 3D.



Fonte: do autor
Legenda: Os esferóides foram tratados com DMSO ou 2 e 4 µM de WT161, por 24, 48 e 72 horas. Área migrada é dada pela relação área total do esferóide após 72 horas de tratamento com WT161/área da esfera antes do tratamento (tempo 0). Os valores são mostrados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001 comparado com o tratamento controle (DMSO).

ENSAIOS DE INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA

Na busca de compreender o impacto da inibição de HDAC6 sobre a instabilidade cromossômica (CIN) de células de GBM, foram realizados vários ensaios que visam mensurar marcadores específicos e apontar para potenciais eventos promotores de CIN HDAC6-dependentes nas células T98G, as quais apresentaram maior sensibilidade ao inibidor, quando comparado às outras linhagens celulares investigadas.

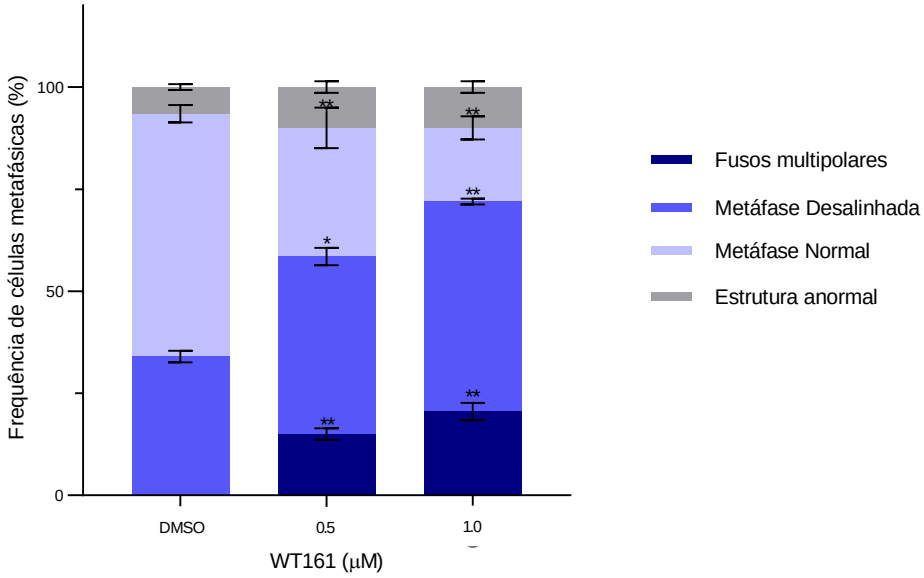
3.12 ERROS DE SEGREGAÇÃO CROMOSSÔMICA

WT161 promoveu erros de segregação mitótica na linhagem T98G de GBM.

Considerando que falhas no processo de alinhamento cromossômico é um indicador de organização cromossômica defeituosa e ligações aberrantes do cinetocoro-microtúbulo, promovendo assim segregação cromossômica incorreta e aneuploidia (MAIATO et al., 2017). Verificou-se a ocorrência de erros de segregação mitótica sobre populações celulares T98G que foram tratadas com WT161 por 24 horas (FIGURA 24). As células que receberam tratamento com WT161, 0,5 µM ou 1 µM, apresentaram aumento significativo de células metafásicas exibindo cromossomos, fora dos limites da placa metafásica, demarcados pelos fusos mitóticos (FIGURA 23), apontando o aumento do desalinhamento cromossômico metafásico em relação ao tratamento controle DMSO.

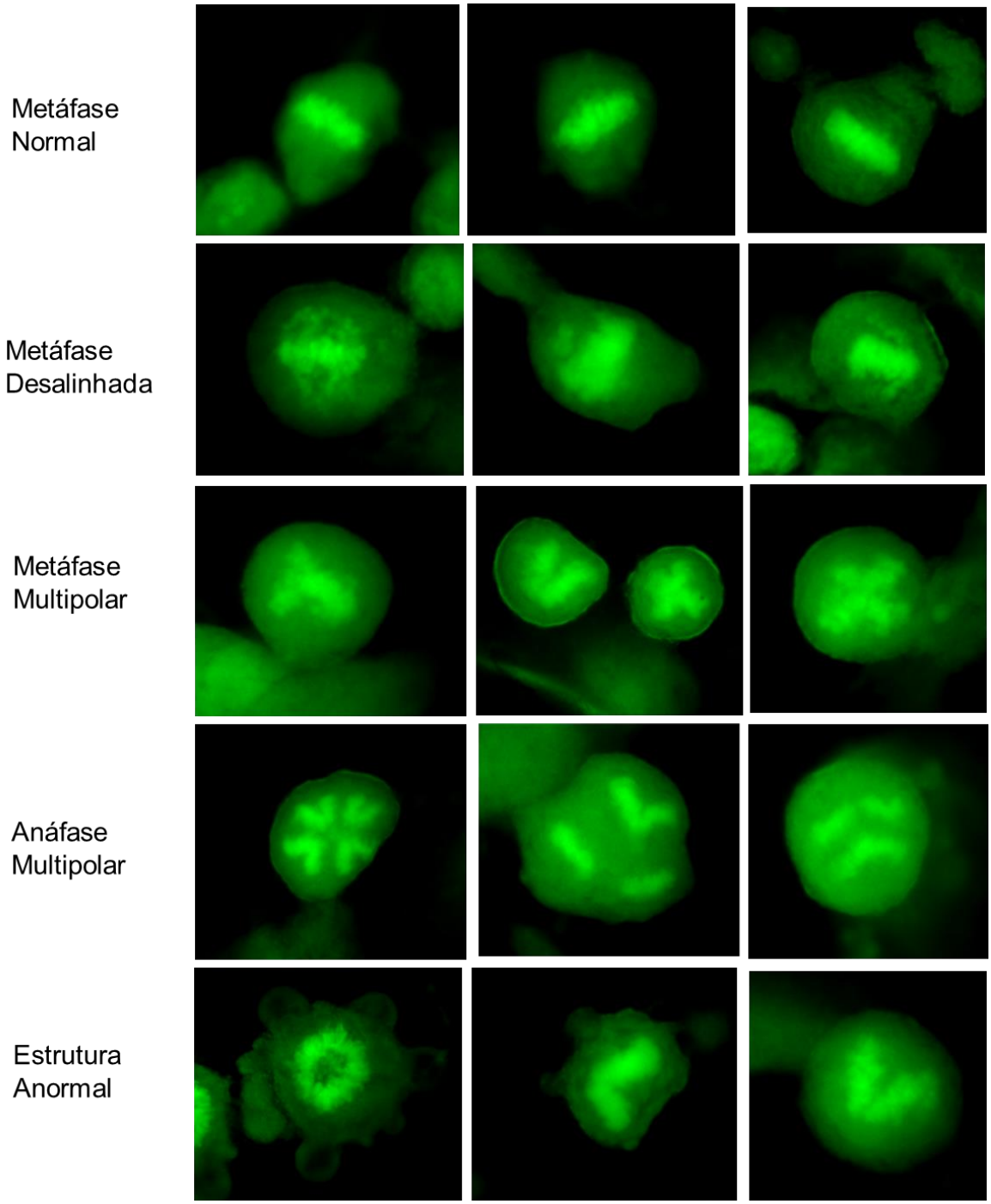
De forma interessante, no mesmo ensaio, também foi identificado aumento significativo de células com organização dos cromossomos metafásicos em formato semelhante a “Y” e/ou “Cruz”, demonstrando a presença de mais de dois feixes de fusos mitóticos em comparação à dinâmica bipolar normal, o que sugere a formação de fusos multipolares (FIGURA 23 e 24), causados provavelmente por amplificação centrossômica. Finalmente, foi constatada ainda a presença de estruturas cromossômicas anormais/defeituosas cuja frequência não foi alterada pelo tratamento com WT161 (FIGURA 24).

Figura 23 – WT161 promove aumento da frequência de células metafásicas desalinhadas nas células T98G de GBM.



Fonte: Do autor.
Legenda: A linhagem foi tratada com DMSO ou WT161, 0,5 e 1,0 μM, 24 horas, e em seguida seu ciclo celular sincronizado na metáfase por ação do nocodazol, 16 horas, no ensaio de metáfase desalinhada. Foram analisadas ao menos 100 células por lâmina correspondente a cada tratamento. Os valores são mostrados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *P<0,05; **P<0,01 comparado com o tratamento controle (DMSO).

Figura 24 – Identificação de metáfases desalinhadas, fusos multipolares e estruturas anormais cromossômicas nas células T98G de GBM, após tratamento com WT161.



Fonte: Do autor.
Legenda: As colônias foram coradas com alaranjado de acridina, após sincronização celular com nocodazol.

3.13 CITÔMICO DE MICRONÚCLEOS COM BLOQUEIO DA CITOCINESE

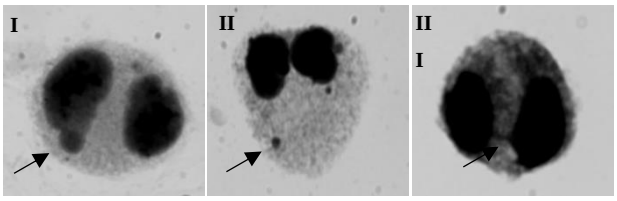
WT161 induziu aumento de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares na linhagem T98G.

Considerando que o desalinhamento cromossômico pode causar erros de segregação mitótica e frequentemente resultam na formação de micronúcleos e consequente promoção da CIN (GOMES et al., 2022), foi realizado o ensaio citômico de micronúcleos com bloqueio da citocinese - CBMN-Cyt, onde buscamos avaliar a influência de WT161 na dinâmica da instabilidade cromossômica (CIN) apresentada pela linhagem de GBM T98G, por meio da identificação dos marcadores do CBMN-Cyt, micronúcleos, brotos nucleares e pontes nucleoplasmáticas (FIGURA 25A). Os resultados apontaram aumento significativamente relevante da quantidade de micronúcleos presentes nas amostras tratadas com o composto, a partir da concentração de 0,95 µM, por 48 horas. A frequência significativamente aumentada de brotos nucleares e pontes nucleoplasmáticas após exposição ao WT161 observou-se desde a primeira concentração utilizada 0,5 µM, referente ao IC_{05} dessa linhagem (FIGURA 25).

Incluímos nesse ensaio o tratamento das mesmas células T98G com o fármaco TMZ, como controle positivo de geração de micronúcleos.

Figura 25 – WT161 induziu aumento dos marcadores de instabilidade cromossômica na linhagem T98G de Glioblastoma.

(A)



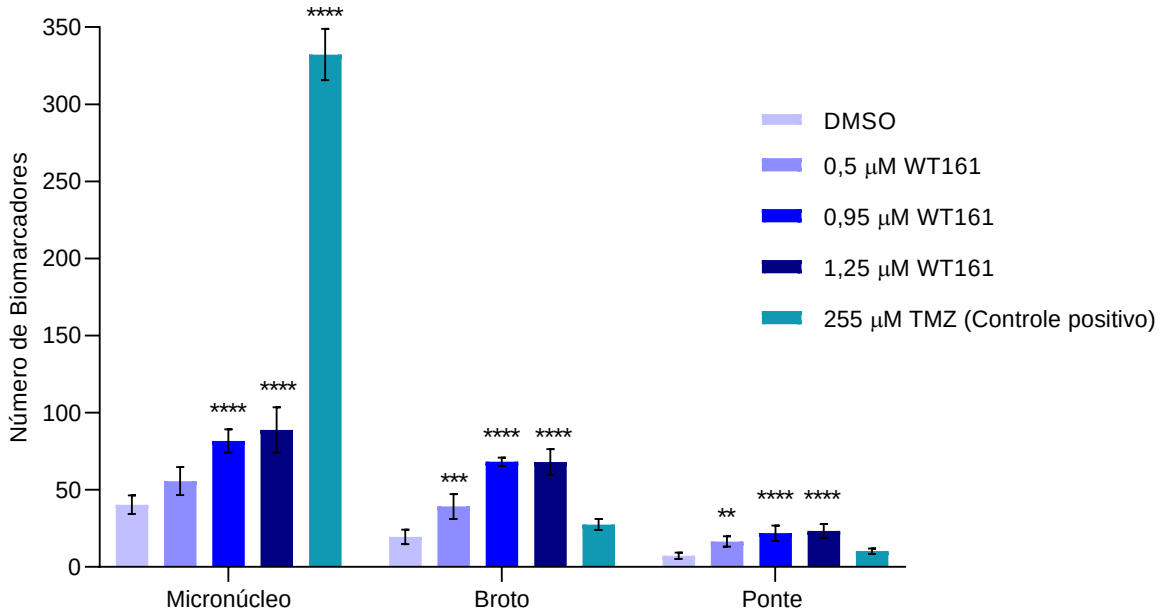
(B)

Tabela 4 – Tabela dos índices de divisão nuclear.

Compostos	Índice de divisão nuclear
DMSO	2,10 ± 0,05
0.5 µM WT161	2,12 ± 0,05
0.95 µM WT161	2,13 ± 0,03
1.25 µM WT161	2,14 ± 0,04
255 µM TMZ (Controle positivo)	2,18 ± 0,03

Fonte: Do autor.

(C)



Fonte: Do autor.
Legenda: (A) Identificação dos marcadores de instabilidade cromossômica por Giemsa. Seta aponta em I - Broto; II – Micronúcleo; III – Ponte. (B) Predominância de células binucleadas determinada pelo índice de divisão nuclear dos controles e tratamentos com WT161, 48 horas. (C) As células foram tratadas com DMSO ou WT161 nas concentrações 0,5; 0,95 e 1,25 µM e, TMZ na concentração 255 µM, por 48 horas, no ensaio de Micronúcleo. Foram analisadas 1000 células por lâmina correspondente a cada tratamento. Os valores são mostrados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001 comparado com o tratamento controle (DMSO).

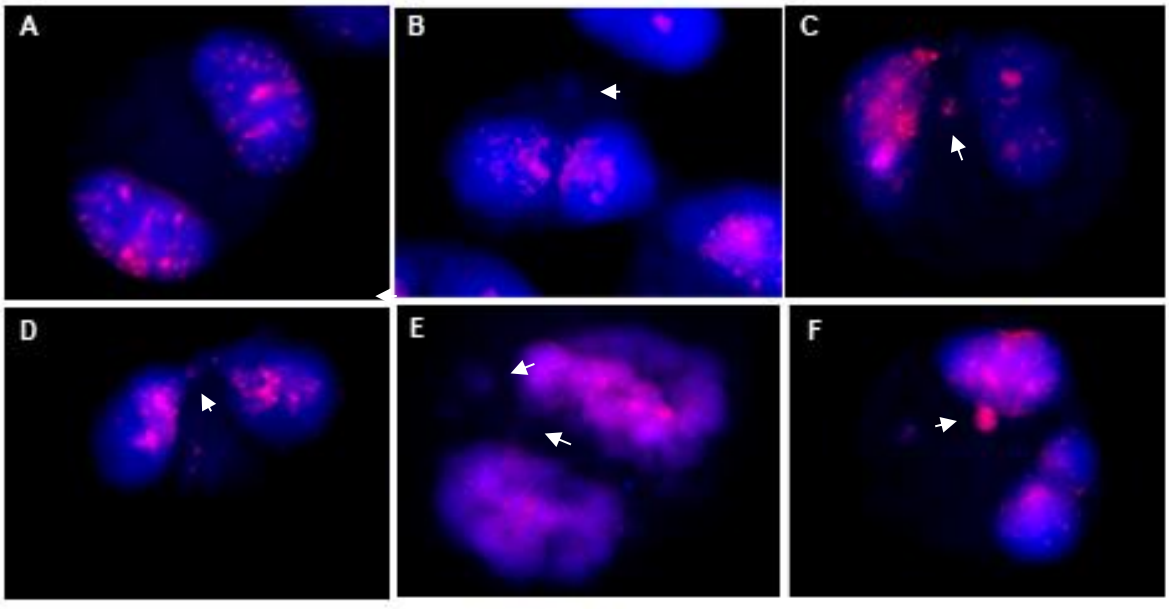
3.14 HIBRIDAÇÃO *IN SITU* COM FLUORESCÊNCIA – FISH

WT161 promoveu aumento dos índices de instabilidade cromossômica na linhagem T98G de GBM.

Com o objetivo de verificar a origem aneugênica ou clastogênica dos marcadores de instabilidade cromossômica identificados pelo ensaio CBMN-Cyt, realizamos o ensaio de FISH com sonda pancentromêrica. Células T98G foram tratadas com 0,5 µM e 0,95 µM WT161 por 48 horas, concentrações que provocaram diferenças significativas no ensaio de micronúcleo, para posteriormente realizar a marcação FISH dessas células com sonda pancentromérica. Os resultados corroborraram o aumento signiticativo de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares após o tratamento com 0,95 µM WT161 (FIGURA 26; TABELA 5). Após a quantificação do número de marcadores com sinal positivo de sonda centromérica, verificamos que a proporção/frequência de micronúcleos e pontes nucleplasmática com marcação centromérica positiva diminuiu em função ao controle DMSO (TABELA 5), sugerindo a

ocorrência de eventos clastogênicos associados à inibição de HDAC6.

Figura 26 – Identificação dos marcadores de instabilidade cromossômica em célula de Glioblastoma.



Fonte: Do autor.
Legenda: Marcação da linhagem T98G por sonda pancentromérica vermelha no ensaio de Hibridação *in situ* com fluorescência, FISH após tratamento com WT161, 0,5 e 0,95 µM, por 48 horas. DNA nuclear foi corado com DAPI (azul). Seta branca indica: (A) Célula binucleada normal; (B) Micronúcleo não apresentando marcação com a sonda (-); (C) Micronúcleo marcado com a sonda (+); (D) Ponte (+); (E) Ponte e micronúcleo (-); (F) Broto (+).

Tabela 5 – Tabela da frequência de marcadores de CIN caracterizados por sonda pancentromérica e DAPI.

Controle/ WT161	MN total/ Frequência (%)	Frequência (%) MN sinal (+)	Frequência (%) MN sinal (-)	NPB total/ Frequência (%)	Frequência (%) NPB sinal (+)	Frequência (%) NPB sinal (-)	Nbud total/ Frequência (%)	Frequência (%) NBud (+)
DMSO	14 (2,8)	79	21	02 (0,4)	100	0	06 (1,2)	100
0.2 µM	19 (3,8)***	79	21	07 (1,4)***	100	0	15 (3,0)***	100
0.5 µM	36 (7,2)***	67***	33***	10 (2,0)***	80***	20***	29 (5,8)***	100

Fonte: Do autor.
Legenda: Os valores são mostrados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. ***P<0,001 comparado com o tratamento controle (DMSO).

Posteriormente, ainda com o ensaio de FISH, utilizamos a enumeração de sondas centroméricas específicas alfa-satélite para os cromossomos autossômicos 1 e 8, com o objetivo de mensurar as taxas de má-segregação cromossômica após inibição de HDAC6, seguindo o protocolo de Godek et al. (2019). Considerando que a segregação incorreta dos cromossomos

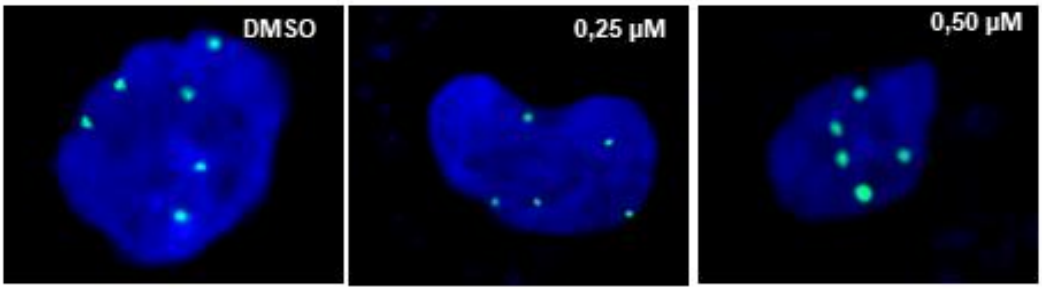
é aleatória em relação a quais cromossomos são segregados incorretamente, por isso escolhemos sondas que abrangessem uma ampla faixa de tamanhos cromossômicos para determinar o número modal de cópias cromossômicas e a porcentagem da população que se desvia dessa moda, índice quantitativo de CIN (LENGAUER et al., 1997), para cada cromossomo analisado. O resultado desse ensaio evidenciou que WT161 promoveu erros de segregação cromossômica nas células T98G, culminando na perda dos cromossomos analisados (quadros ressaltados em vermelho) (FIGURA 27).

Quando analisamos os sinais do cromossomo 1, verificamos que no tratamento com DMSO, são observados predominantemente 6 sinais fluorescentes por núcleo (90% das células), caracterizando seu número modal. A taxa de células com sinais fora da moda nesse grupo é de 10%, enquanto após tratamento com WT161 a população de células com sinais fora da moda aumenta para 42-46%. Além disso, destacamos a população de células fora da moda que apresentaram apenas 5 sinais centroméricos positivos, ou seja, um sinal a menos (perda de um cromossomo 1) em relação ao controle (FIGURA 27A).

Para o cromossomo 8, o número modal foi determinado por 7 sinais centroméricos por núcleo (50% dos núcleos analisados). A presença de 8 sinais centroméricos para esse cromossomo autossômico também foi expressiva (39 % dos núcleos analisados). Ainda assim, nota-se aumento na frequência de células com 6 sinais centroméricos (de 07 para 44 sinais), denotando a geração de perdas cromossômicas em relação ao controle, destacado em vermelho na Figura 27B.

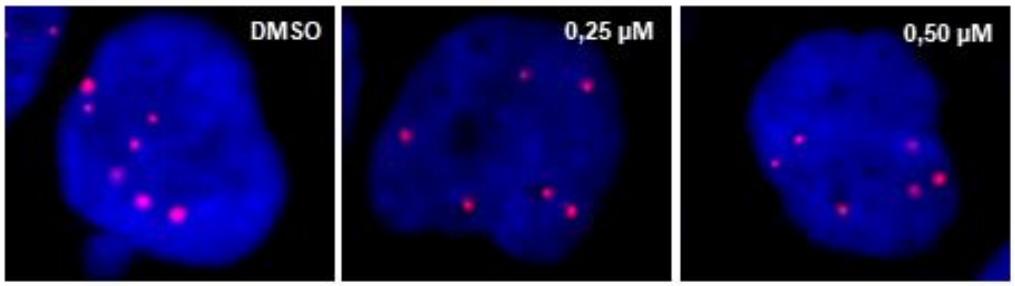
Figura 27 – WT161 promoveu perda cromossômica nas células T98G de Glioblastoma.

(A)



Cromossomo 1	Número de sinais FISH por célula			% de células fora da moda
	5	6	7	
DMSO	07	90	03	10
0,25 µM	37	58	05	42
0,50 µM	44	54	02	46

(B)



Cromossomo 8	Número de sinais FISH por célula			% de células fora da moda
	6	7	8	
DMSO	11	50	39	50
0,25 µM	32	51	17	49
0,50 µM	26	50	24	50

Fonte: Do autor.
Legenda: A linhagem foi tratada com DMSO ou WT161 no ensaio de Hibridação *in situ* com fluorescência, FISH. (A) T98G foi marcada com sonda centromérica verde específica para o cromossomo 1. (B) T98G foi marcada com sonda centromérica vermelha específica para o cromossomo 8. DNA nuclear foi corado com DAPI (azul). Foram analisadas ao menos 200 células por tratamento e seus sinais fluorescentes contabilizados. População de células não modais representando 5% ou mais do total estão destacados em vermelho (perdas cromossômicas). A fração total de células fora da moda é dada na coluna da extrema direita.

3.15 CITOGENÉTICA CLÁSSICA

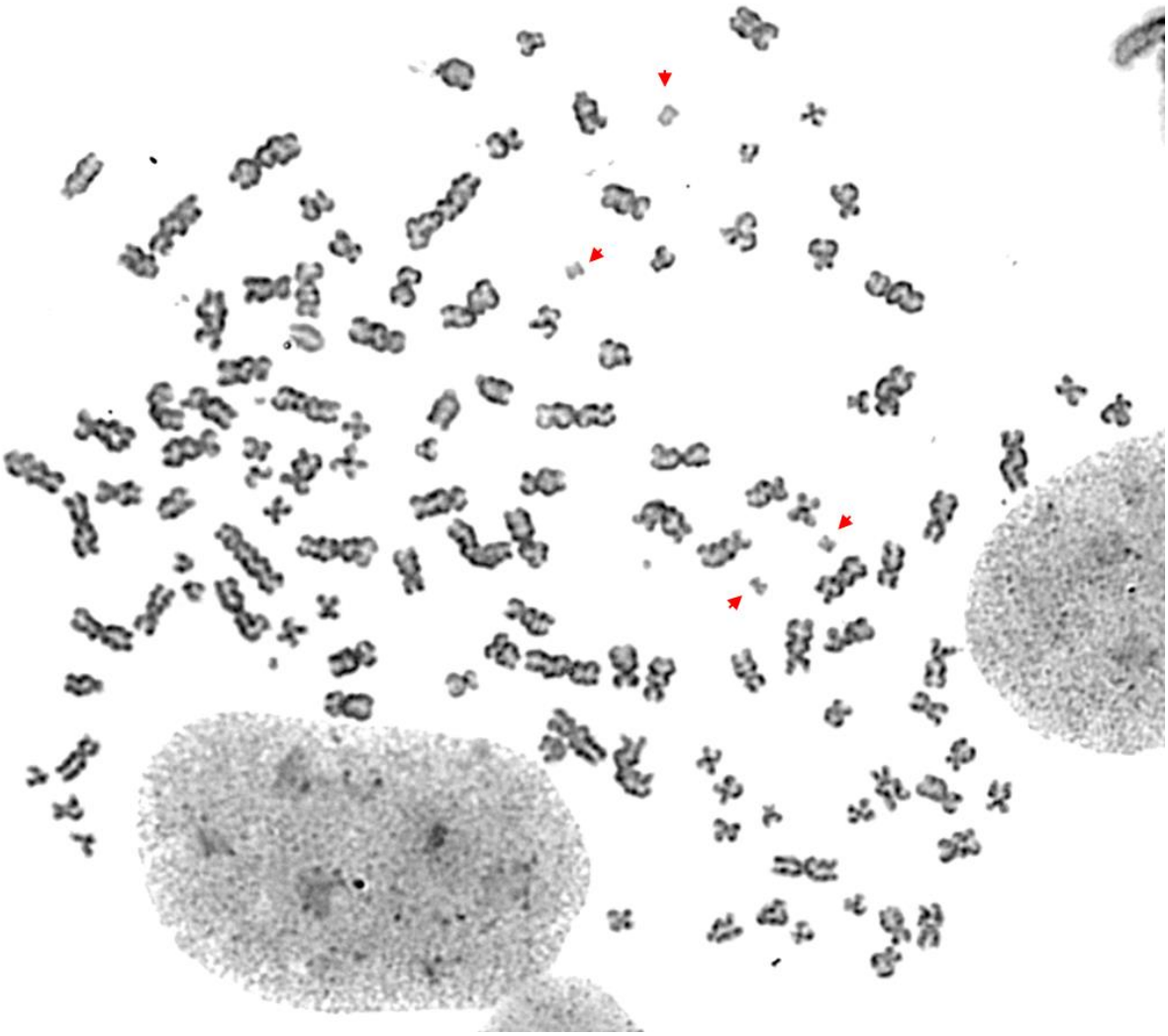
WT161 não alterou o número cromossômico modal total de células T98G de glioblastoma

Diante dos resultados obtidos, e considerando a possibilidade de perdas cromossômicas globais causadas pela inibição de HDAC6, procedemos a realizar o ensaio de ploidia da linhagem T98G, após tratamento com WT161 ou com veículo DMSO como controle. Foi constatado um número modal de 120 ± 2,2 cromossomos para a T98G, sendo o número mais

frequente de cromossomos encontrado nas metáfases analisadas. Nosso resultado concorda com a ploidia descrita pelo banco de células da *American Type Culture Collection* (ATCC), que considera a linhagem T98G hiperpentaploide, tendo mais de cinco conjuntos completos de cromossomos humanos (ploidia = 23). Foi identificado ainda em todas as metáfases analisadas 04 *double minutes*, fragmentos de DNA extracromossômico, marcadores de resistência terapêutica e CIN, apontados na seta da figura 28. O cariótipo representativo da linhagem é exibido a seguir (FIGURA 29).

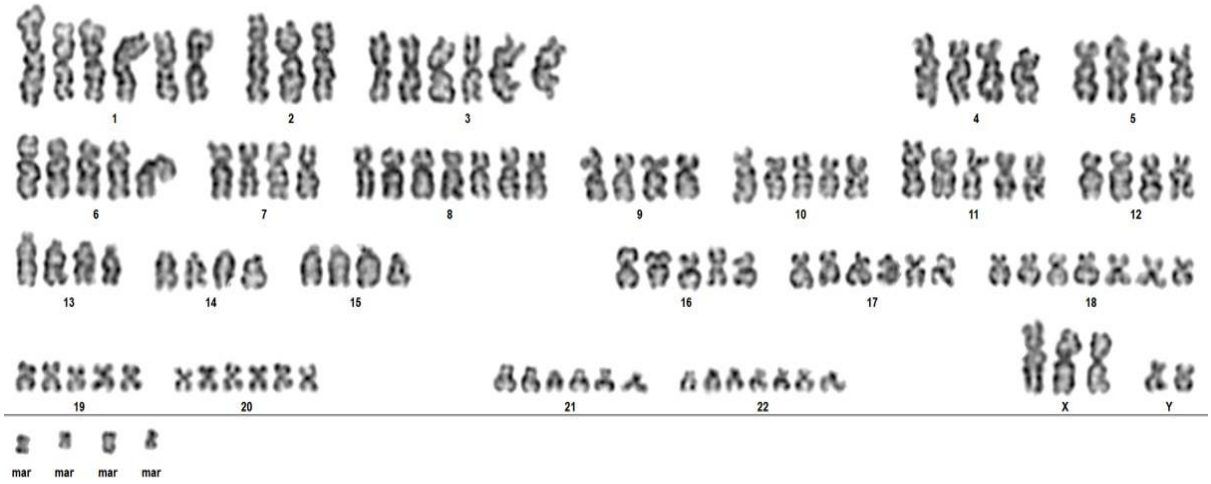
No presente ensaio não foi observada interferência de WT161 no número modal global das células T98G, após tratamento. Acreditamos que a análise estrutural dos cromossomos, através de bandeamento GTG e/técnicas de FISH com sondas *painting* elucidará melhor os efeitos de WT161 sobre essas células, e essa etapa está em fase de análise pelo nosso grupo de trabalho.

Figura 28 – Metáfase representativa da linhagem T98G.



Fonte: Do autor.
Legenda: Metáfase composta por 120 cromossomos, incluindo 04 minutes.

Figura 29 – Cariótipo representativo da linhagem T98G, por bandeamento GTG.



Fonte: Do autor.
Legenda: Cariótipo 120 XXXYY, +1,-2,-2,+3,-4,-5,-7,+7+8,+8,-9,-12,-13,-14,-15,+17,+18,+18,+20, +21, +22,+22, +4mar.

ENSAIO METABOLÔMICO

3.16 ANÁLISE METABOLÔMICA

WT161 desregula a dinâmica metabólica da célula T98G de GBM.

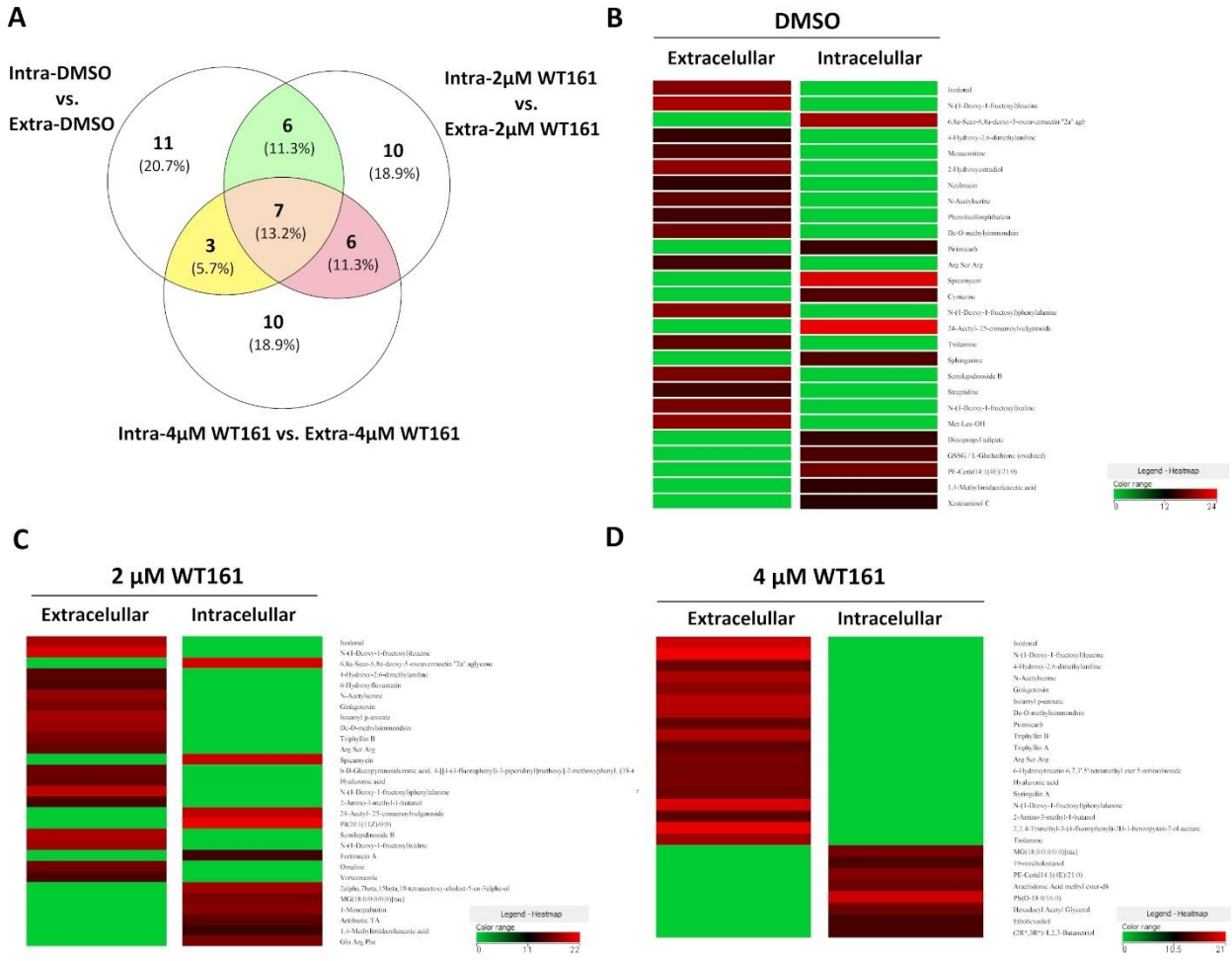
Finalmente, considerando que modificações pós-traducionais promovidas por HDAC6, tais como lactilação de tubulina (SUN et al., 2024) e desacetilação de diversas proteínas não histônicas (JUNG et al., 2018) podem modular o metabolismo celular, propusemos identificar a interferência de WT161 nos processos metabólicos globais das células T98G. Assim, foram realizadas comparações entre os tratamentos com 2 μM e 4 μM de WT161 e o veículo DMSO, entre as frações extracelular e intracelular. Ao analisar as diferenças entre os tratamentos, identificamos 53 metabólitos diferencialmente expressos: 11 apenas no controle DMSO, 10 apenas no tratamento com 2 μM de WT161, 10 apenas no tratamento com 4 μM de WT161, 6 em ambos os grupos DMSO e 2 μM de WT161, 6 nos grupos 2 μM e 4 μM de WT161, 3 nos grupos DMSO e 4 μM de WT161, e 7 metabólitos diferentemente expressos simultaneamente nos três grupos (FIGURA 30A). Desses, 24 metabolitos foram negativamente regulados e 29 foram positivamente regulados em todos os grupos.

Ao analisar as diferenças entre as frações intracelular e extracelular para cada tratamento, identificamos 27 metabólitos diferencialmente expressos entre as frações para o tratamento com DMSO (FIGURA 30B), 29 diferencialmente expressos para o tratamento com 2 μM de WT161 (FIGURA 30C), e 26 diferencialmente expressos para o tratamento com 4 μM de WT161 (FIGURA 30D).

Os metabólitos individuais diferencialmente expressos entre as frações intra e extracelular em cada grupo de tratamento, DMSO, 2 μM e 4 μM de WT161, estão detalhados no Apêndice 1 - Dados Suplementares (TABELAS 1, 2 e 3), mostrando a modulação metabolômica causada pelo WT161 nas células de GBM.

Adicionalmente, comparamos os metabólitos diferencialmente expressos entre os tratamentos DMSO vs. 2 μM e vs. 4 μM de WT161, em cada fração (extracelular ou intracelular). Identificamos 5 metabólitos diferencialmente expressos: 2 na fração extracelular e 3 na comparação intracelular. Os metabólitos individuais diferencialmente expressos em cada fração são apresentados na figura 31. Assim, após o tratamento com WT161, foi observado um aumento significativo de pirimicarb e 6-Hidroxitricetina 6,7,3',5'-tetrametileter 5-robinobiosídeo na fração extracelular. Simultaneamente, observou-se aumento de PE(P-18:0/16:0) e etohexadiol, e redução de 24-Acetil-25-cinamoilvulgarosídeo na fração intracelular (FIGURA 31).

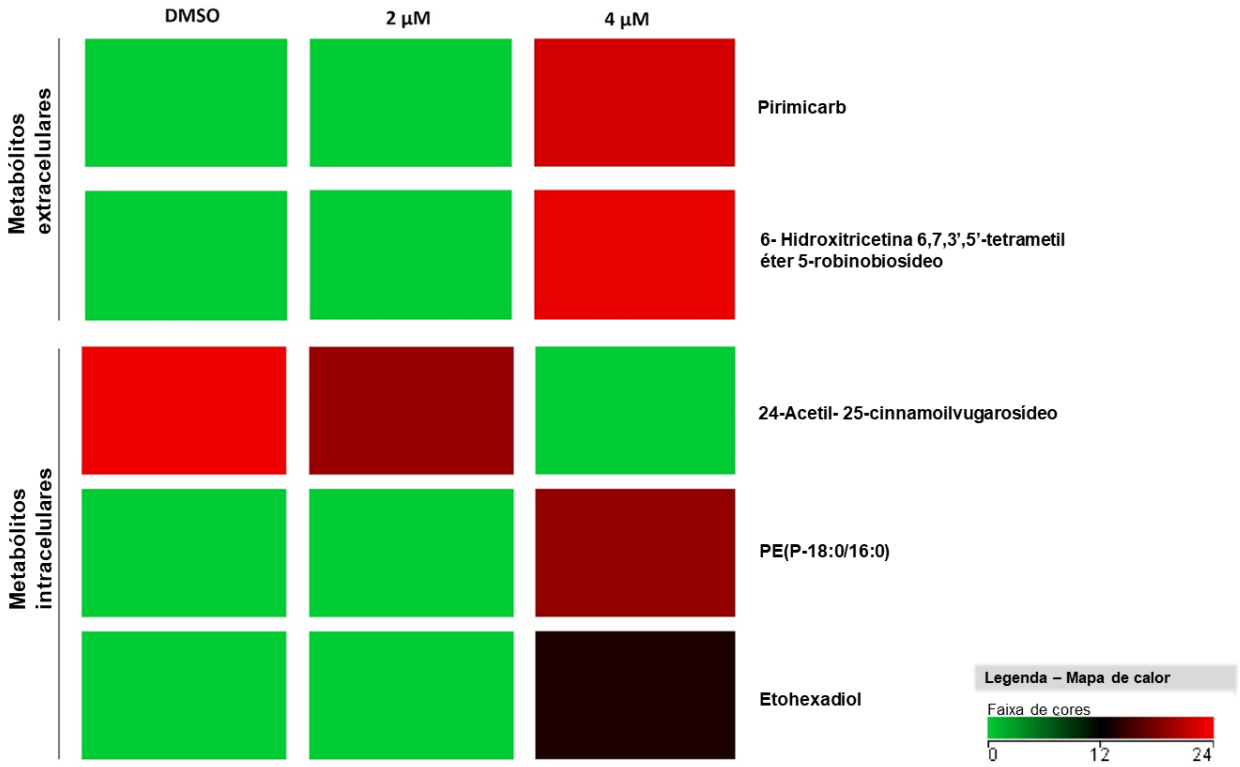
Figura 30 – Efeitos metabolômicos do WT161, comparando DMSO vs. 2µM WT161 vs. 4µM.



Fonte: Do autor.

Legenda: (A) Diagrama de Venn; (B) Mapa de calor das mudanças quantitativas nos metabolitos diferencialmente expressos entre as frações extracelular e intracelular após o tratamento com DMSO. (C) Mapa de calor das mudanças quantitativas nos metabolitos diferencialmente expressos entre as frações extracelular e intracelular após 2µM de WT161. (D) Mapa de calor das mudanças quantitativas nos metabolitos diferencialmente expressos entre as frações extracelular e intracelular após 4µM de WT161. Os mais abundantes são mostrados em vermelho e os menos abundantes em verde. Consideramos compostos moleculares presentes em 75% das amostras de pelo menos um grupo. Alteração de dobra > 2,00: 22 compostos. Teste t não pareado; $p < 0,05$.

Figura 31 – Efeitos metabolômicos do WT161 comparando frações extracelulares vs. intracelulares.



Fonte: Do autor.

Legenda: Mapa de calor das alterações quantitativas nos metabolitos diferencialmente expressos entre os tratamentos DMSO, 2µM WT161 e 4µM WT161 mostrados em cada fração. Os mais abundantes são mostrados em vermelho e os menos abundantes em verde. Foram considerados compostos moleculares presentes em 75% das amostras de pelo menos um grupo. Mudança de razão > 2,00: 22 compostos. Teste T não pareado; $p < 0,05$.

4 DISCUSSÃO

O glioblastoma é um tipo tumoral de agressiva malignidade com opções limitadas de tratamento eficaz, o que torna imprescindível o desenvolvimento de novas terapias com mecanismos de ação inovadores (Tan *et al*., 2020; Ostrom *et al*., 2020). Atualmente, moléculas que são diferencialmente expressas no câncer e que intersectam múltiplas vias moleculares essenciais para a manutenção do tumor são consideradas melhores candidatas para terapias direcionadas no tratamento do câncer (Lee *et al*., 2018).

Nesse contexto, a HDAC6 se destaca por ser o único membro da família das HDACs que possui um repertório diversificado de substratos e desempenha papéis tanto em eventos metabólicos essenciais, incluindo a proliferação celular, apoptose, motilidade, senescência, resposta ao dano no DNA e estabilidade genômica, bem como na tumorigênese pois modula a dinâmica do citoesqueleto, a morfologia celular, adesão e migração, interações célula-célula imunomediadas, invasão/metástase, além da reversão da transição epitélio-mesenquimal (TEM) de células tumorais (Drazic *et al*., 2016; Hideshima *et al*., 2016, Urdiciain *et al*., 2021). Além disso, a HDAC6 é altamente expressa em diversos tumores sólidos, incluindo o GBM (Zheng *et al*., 2023), destacando-se como potencial alvo em terapias anticâncer.

Em nosso estudo, inicialmente confirmamos a relevância biológica da HDAC6 no GBM devido à sua expressão proteica significativamente mais alta nas amostras tumorais em relação aos tecidos normais. No entanto, não observamos essas diferenças ao avaliar a abundância de mRNA ou os níveis de metilação do promotor de HDAC6. Em contraste, Li *et al*. (2015) encontraram níveis mais altos de mRNA de HDAC6 em amostras de GBM em comparação com amostras normais. Esses resultados conflitantes também foram observados por Stetson *et al*., 2020, que avaliaram a correlação entre os dados de LC-MS/MS e os dados de RNA-seq em amostras emparelhadas de GBM.

Yanovich e colaboradores, 2021, destacaram que essas discrepâncias entre RNA e proteína representam uma camada adicional de heterogeneidade intertumoral no GBM no nível da expressão gênica. Eles apontaram ainda que o perfil proteico está mais significativamente associado à sobrevida dos pacientes do que o perfil de RNA isoladamente, oferecendo uma melhor oportunidade para entender os maus resultados de sobrevida desses pacientes. Diversos estudos apoiam e corroboram a hipótese de Yanovich quando a expressão de HDAC6 é avaliada tanto nos níveis de proteína quanto de mRNA. Com a investigação da expressão global de HDAC, encontrou-se uma correlação negativa entre a expressão de mRNA da família de genes

HDAC e o grau de glioma, observando que os níveis de mRNA das HDACs das classes II e IV, incluindo HDAC6, são mais baixos no GBM (Lucio-Eterovic *et al.*, 2008).

De forma interessante, Marampon *et al*. (2017) identificaram que a expressão proteica de HDAC6, ao invés dos níveis de mRNA, está intimamente relacionada a respostas mais baixas ao tratamento combinado com temozolomida (TMZ) e radioterapia, bem como a uma menor sobrevida global em pacientes com GBM. De forma similar, a análise imuno-histoquímica mostrou que os níveis de HDAC6 são significativamente mais altos em pacientes com menor sobrevida global. Dado seu papel crucial como enzima desacetilase, particularmente para alvos citoplasmáticos, são necessárias mais pesquisas para explorar os mecanismos de controle translacional de HDAC6 e sua dinâmica mRNA-proteína no nível molecular (Sferra *et al*., 2017). Isso aprimorará nossa compreensão de seu impacto nos processos de sinalização celular e na progressão tumoral.

O WT161 tem sido apontado como um excelente inibidor de HDAC6, seletivo e de alta biodisponibilidade, uma vez que, foi constatada diminuição significativa do crescimento celular e elevada citotoxicidade em linhagens de osteosarcoma, mieloma múltiplo e tumor de mama após sua administração (Hideshima *et al*., 2016; 2017; garcía-guerrero *et al*., 2021; Sun *et al*., 2021). No presente trabalho, a ação desse inibidor foi investigada de forma inédita em linhagens de GBM, onde encontrou-se que WT161 inibiu eficientemente a proliferação celular tanto das linhagens sensíveis ao tratamento com TMZ, U251 e U87, como da linhagem resistente T98G.

Esses resultados são correspondentes com o descrito pela literatura em relação ao efeito do inibidor na diminuição do crescimento celular de outras linhagens tumorais (Hideshima *et al*., 2016; 2017; García-Guerrero *et al*., 2021; Sun *et al*., 2021). Além disso, foi observado ainda aumento na expressão da proteína α-tubulina acetilada, principal substrato da HDAC6, após tratamento com WT161 admitindo a inibição dessa enzima pelo WT161 nas três linhagens celulares de GBM em estudo. O mesmo efeito sobre a expressão da proteína α-tubulina acetilada foi evidenciado previamente em células de glioma sob ação de outros inibidores de HDAC6, como Tubastatina A e JW-1 (Singh *et al*., 2018; Ho *et al*., 2018).

Por outro lado, o tratamento com Temozolomida (TMZ) é a estratégia quimioterápica padrão em pacientes com glioblastoma (Kao *et al*., 2023). Por isso, confirmamos também a eficácia de TMZ na redução da atividade proliferativa das linhagens de glioblastoma utilizadas neste estudo, U251 e U87, sensíveis à TMZ. Embora ocorra melhora na sobrevida geral dos pacientes com GBM, um dos maiores obstáculos no tratamento é devido a processos de evolução de resistência contra TMZ, onde a maioria ainda desenvolve recorrência em meses

(Yan *et al*., 2024; Karachi *et al*., 2018). Dado que a expressão proteica de O(6)-metilguanina-DNAmetiltransferase (MGMT) é o determinante mais importante de resistência ao TMZ, o presente estudo também utilizou células T98G, intrinsecamente resistentes a esse fármaco por possuírem elevada atividade de MGMT (Huang *et al*, 2012; Jiapaer *et al.*, 2018). E como esperado, os resultados obtidos apontaram ineficácia de TMZ em conter a atividade proliferativa dessas células nas concentrações usuais.

Uma vez estabelecidos os níveis de resposta a esses fármacos, foi investigado o efeito do inibidor WT161 sobre a dinâmica do ciclo celular das células de GBM, U251, U87 e T98G. WT161 promoveu aumento significativo da população celular na fase G2/M, para todas as células investigadas. A parada em G2/M já havia sido evidenciada em células de GBM, com os inibidores ACY-1215, ACY-738, considerados indutores de morte, além de interromperem seu crescimento na fase G2/M do ciclo celular (Shi *et al*., 2021). Outros inibidores específicos de HDAC6 também apresentaram a mesma ação, como TC24, em células de câncer gástrico (Dong *et al.*, 2018) e MPT0B451, em leucemia mielóide aguda e tumor de próstata (Wu *et al*., 2018), e o quimioterápico preconizado pela FDA Vincristina, muito utilizado no linfoma de Hodgkin, cujo bloqueio do ciclo celular em G2/M é dado via despolimerização de microtúbulos (Kaur *et al.*, 2014; Lee *et al*., 2017).

A nível molecular, Wu e colaboradores, 2018, avaliaram ainda a expressão das proteínas reguladoras de G2/M, após tratamento com MPT0B451, observando aumento da expressão de MPM2 fosforilado específico da mitose, ciclina B1, aurora quinase A (Aurora A), Aurora A p-Thr288, *serine/threonine kinase polo-like kinase 1* (PLK1) e PLK1 p-Thr210, e diminuição da expressão de Cdc2 p-Tyr15 e Cdc25c. Suportando nossos achados, esses trabalhos mostram a ação do composto na modulação das proteínas de transição G2/M, promovendo bloqueio do ciclo celular nessa fase. Muito recentemente, foram identificados mais de mil genes cuja expressão é significativamente alterada por ação de um inibidor seletivo de HDAC6, JOC1, em células de glioblastoma. Em geral, os caminhos canônicos dentro das redes reguladas positivamente foram associados à diferenciação e morte celular enquanto vias ligadas ao ciclo celular, divisão celular e a regulação transcricional foram reguladas negativamente, como exemplo, MKP1, clivagem de PARP e α-tubulina acetilada foram elevados, enquanto o BMI-1 foi reduzido nessas amostras celulares. Além disso, foi observada uma forte correlação positiva entre os níveis de mRNA de HDAC6 e vários marcadores de células-tronco e ativadores do ciclo celular em amostras de GBM da coorte TCGA, incluindo p21Cip1, CCND2 e EGFR. Esses dados revelam uma visão mecanicista avançada da funcionalidade do inibidor de HDAC6

(Auzmendi-Iriarte *et al*., 2020).

A atividade antitumoral dos inibidores de HDAC está intimamente associada à catástrofe mitótica, mecanismo oncosupressor que impede a sobrevivência de células incapazes de completar a mitose devido a defeitos no aparato mitótico, danos no DNA e erros no ponto de verificação mitótica (Vitale *et al*., 2011). A ação desses inibidores é mediada por alterações na expressão ou deslocamento de subunidades do complexo passageiro cromossômico (CPC), como Aurora kinase B, Borealina, INCENP e Survivina, resultando na separação imprópria de centríolos, defeitos na maturação centrossomal na fase G2, orientação anormal dos cromossomos, perturbação da montagem do fuso e falhas da citocinese. Além de promoverem instabilidade cromossômica (CIN) devido à regulação negativa de proteínas importantes da fase M, como Aurora A e Aurora B, e desregulação do ponto de checagem mitótico com saída de células aberrantes desse ponto de verificação (Shin *et al*., 2003; Biran *et al*., 2011). Esses subsídios reforçam ainda mais nossos resultados da ação de WT161 no bloqueio do ciclo em G2/M para as linhagens de GBM em estudo. Além disso, esses dados e evidências prévias da relação entre HDAC6 e CIN, reforçaram a necessidade de explorarmos a capacidade de modulação da CIN dependente de WT161 em células de GBM, com resultados que serão discutidos mais adiante.

Sob outra ótica, considerando que a habilidade de uma única célula tumoral formar colônias é requisito essencial relacionado à proliferação e viabilidade, é sabido que a redução dessa capacidade após o tratamento é um importante regulador do fenótipo maligno de células tumorais, determinando a eficácia dos agentes citotóxicos (Franken *et al*., 2006). Portanto, dada as características do ensaio de capacidade clonogênica, constatou-se que WT161 reduziu significativamente a capacidade das linhagens U251, U87 e T98G formarem colônias, demonstrando importantes efeitos farmacológicos com doses reduzidas e com efeitos a longo prazo, mesmo após a remoção do tratamento. Similarmente, um estudo recente de Sun e colaboradores (2021) demonstrou que WT161 inibiu a capacidade das células de osteosarcoma MG63, de formarem colônias de uma maneira dose-dependente, concordando com os nossos resultados.

Atualmente, a comunidade científica tem discutido intensamente formas de aprimoramento da eficácia terapêutica anticâncer com o emprego de estratégias de combinação de drogas. A terapia de combinação farmacológica tem o potencial de inibir simultaneamente duas ou mais vias moleculares críticas, implicadas na resistência aos medicamentos usuais e na sobrevivência celular. Além do aumento da eficiência terapêutica, essas terapias combinadas

reduzem os efeitos colaterais de doses elevadas de drogas únicas, além de aumentar a absorção das mesmas (Jonnalagadda; Arockiasamy; Krishnamoorthy, 2020).

Nesse contexto, estudos demonstraram que WT161 apresenta importantes níveis de sinergismo com vários agentes quimioterápicos, tais como com Bortezomibe (BTZ), aumentando a citotoxicidade de BTZ em linhagens celulares de mieloma múltiplo (MM) e câncer de mama, além de superar a resistência conferida por BTZ a essas linhagens celulares. Nas células cancerígenas de mama, mais resistentes ao bortezomibe do que as de MM, WT161 atuou desencadeando estresse celular seguido por morte celular apoptótica (Hideshima *et al.*, 2017). Nesse contexto, já foi evidenciado, *in vivo*, o sinergismo do efeito de WT161 com o 5-Fluorouracil (5-FU) em células de osteosarcoma. A combinação induziu morte celular mediada pela hiperexpressão de PTEN e inibição da via de sinalização PI3K/Akt, resultando na inibição do crescimento e peso do tumor em modelos de xenoenxerto de camundongo (Sergi, 2021).

A fim de testar a o potencial sinergismo entre WT161 e TMZ, foram realizados ensaios de combinação de drogas entre ambos fármacos utilizando três diferentes estratégias de administração, nas linhagens de GBM, U251, U87 e T98G. Observamos que a administração simultânea de WT161 com TMZ exibiu efeitos sinérgicos nas três linhagens estudadas, inclusive na T98G, linhagem celular altamente resistente ao tratamento isolado com TMZ, confirmando o efeito quimiosensibilizante do WT161 também nas células de GBM. WANG e pesquisadores, 2016, atribuíram a resistência ao tratamento com TMZ à hiperexpressão de HDAC6, em linhagens de GBM. Os resultados desse trabalho mostraram que a inibição de HDAC6 sensibilizou as células ao TMZ via desestabilização de EGFR e inativação dessa via.

Nas células de GBM sensíveis a TMZ, quando a sequência de administração TMZ→WT161 foi utilizada, efeitos sinérgicos foram encontrados na linhagem U251 enquanto foram antagônicos nas células U87. O efeito exatamente contrário ocorreu para o tratamento sequencial WT161 seguido de TMZ (WT161→TMZ), onde foram encontrados resultados sinérgicos para a linhagem U87, enquanto em U251 produziu efeitos antagônicos.

As diferenças de ativação de resistência celular provocada pela exposição inicial à TMZ podem influenciar no sinergismo registrado de maneira inversa após os tratamentos sequenciais. Alguns mecanismos de ação que foram, recentemente, associados à resistência à TMZ no tratamento do GBM se diferem de acordo com as células tumorais afetadas (Towner *et al*., 2019). Por exemplo, a sinalização Hedgehog (Hh), que é desregulado no GBM, foi associada à ineficiência de TMZ apenas nas células U87 (Melamed *et al*., 2018), enquanto as conexinas, particularmente a proteína de junção de hiato Conexina 43 (Cx43), desempenham

papel fundamental no microambiente dos gliomas malignos e são responsáveis por tornar as células U251 resistentes a quimioterápicos, como TMZ (Grek *et al*., 2018).

Outra provável explicação para essa discrepância de resultados na combinação sequencial dos compostos entre as linhagens estudadas se baseia em suas diferenças moleculares, sendo de extrema importância o status de TP53 (Fisher *et al*., 2007), selvagem nas células U87 e mutado na linhagem U251. Avanços constantes na pesquisa envolvendo esse gene revelaram papéis adicionais além da regulação transcricional genética e proteção da integridade genômica, como sua importância na regulação do metabolismo celular, *stemness*, autofagia, invasão, metástase, microambiente e imunidade (Zhang *et al*., 2018).

Por outro lado, TP53 encontra-se mutado em cerca de 50% dos casos de tumores sólidos em humanos, sendo considerado marcador de mau prognóstico (Chen *et al*., 2022). No GBM, a via p53-ARF-MDM2 está desregulada em 94% das linhagens celulares (Zhang *et al*., 2018). No trabalho de Yu e colaboradores (2020), o inibidor da HDAC Baicalein e os tradicionais VPA e PCI-34051 aumentaram significativamente a indução de apoptose em células T de linfoma cutâneo TP53 selvagens, porém esse feito foi leve quando as células eram deficientes de TP53, confirmando a interferência desse perfil na atividade dos inibidores de HDAC.

Outro achado notável investigando o papel citotóxico de inibidores de HDAC descreveu seu efeito desestabilizador apenas na proteína p53 do tipo mutante, não no tipo nulo ou selvagem, por poliubiquitinação e degradação proteassomal, tornando as células mais sensíveis aos inibidores de HDAC, conforme exemplificado pelo tratamento com TSA, FR901228 ou SAHA (inibidor de HDAC6) (Mrakovcic *et al*., 2018). Esses dados corroboram ainda nossos resultados iniciais de resposta proliferativa onde encontramos expressiva diferença de sensibilidade das linhagens de GBM quando expostas ao tratamento com WT161, sendo U87 cerca de duas e nove vezes mais resistente ao composto quando comparada à U251 e T98G, respectivamente, nossos exemplares p53 mutados.

Com relação às células T98G, em nossos resultados as administrações simultânea e sequencial (WT161 seguido de TMZ) potencializaram o efeito antiproliferativo das substâncias isoladas. O mesmo foi observado em outros trabalhos onde combinou-se TMZ com resveratrol e AZD346 (Huang *et al*., 2012), assim como utilizando inibidores de HDAC6, A452 e ACY-1215, onde ficou evidente a diminuição da viabilidade das células T98G e aumento da indução à apoptose (Bagca *et al*., 2020). Recentemente, a superação da resistência de T98G ao tratamento com TMZ mediada pela exposição combinada à inibidores de HDAC6 foi associada à regulação negativa da expressão de MGMT (Kim *et al*., 2019; Yu *et al*., 2021).

O tratamento sequencial TMZ seguido de WT161 (TMZ→WT161) gerou efeito antagônico nessas células, promovendo possivelmente ativação de vias de quimiorresistência altamente dependentes de MGMT, provocada pela exposição inicial à TMZ, nas células T98G (Yu *et al.*, 2021; Singh *et al*., 2021). Dessa forma, se faz imprescindível identificar os diferentes perfis de expressão gênica e heterogeneidade molecular das linhagens tumorais estudadas para obter uma melhor compreensão das bases genéticas subjacentes às sequências de administração de drogas mais eficientes com verdadeiro potencial translacional para GBM (Shah; Schwartz, 2000; 2001).

Por outra perspectiva, além da diminuição da viabilidade celular, é importante que um agente farmacológico com potencial efeito antitumoral apresente dentre outras características capacidade de indução de apoptose. A presente investigação demonstrou que WT161 induz morte celular apoptótica em todas as linhagens celulares de glioblastoma estudadas. O mesmo efeito do composto foi identificado em outras linhagens tumorais como retinoblastoma, osteosarcoma, mieloma múltiplo (MM) e câncer de mama, onde além do ensaio de apoptose por Anexina V, esse efeito foi confirmado por meio da avaliação da expressão das proteínas Caspase 3 e PARP, e suas derivadas clivadas, reconhecidos marcadores desse tipo de morte celular. A ação citotóxica desse inibidor de HDAC6 foi associada à diminuição da expressão de EGFR, HER2 e ERα e bloqueio de suas vias de sinalização (Sun *et al*., 2019; 2021; Hideshima *et al*., 2016; 2017; Sergi, 2021). Porém, a atividade promotora de apoptose de WT161 não havia sido analisada previamente em GBM até a obtenção dos nossos resultados.

Observou-se ainda que nas linhagens de GBM o efeito apoptótico de WT161 foi potencializado quando administrado simultaneamente com TMZ, em relação aos tratamentos isolados dos dois fármacos. Esse efeito também foi confirmado com o aumento significativo da expressão de PARP após tratamento combinado de WT161 e TMZ, reforçando o sinergismo obtido na análise de combinação da ação antiproliferativa dessas substâncias. Igualmente, pesquisas anteriores demonstraram sinergismo de efeito das combinações WT161 com Bortezomib (BTZ) e com Carfilzomibe (CFZ) utilizados no tratamento do MM (Hideshima *et al*., 2016) e WT161 com OTX015, em células de osteosarcoma (Yu *et al*., 2019) que coincidiram com o aumento da taxa de morte celular quando associadas e ainda revogaram a resistência conferida pelo microambiente e adquirida pela exposição ao BTZ, nas células derivadas de MM.

Urdiciain e colaboradores, 2019, demonstraram que o tratamento com Tubastatina A em linhagens de glioblastoma, além de induzir apoptose de forma isolada, quando combinado com

TMZ foi responsável por potencializar e acelerar a taxa de morte celular apoptótica gerada por esse fármaco isolado, inclusive na linhagem TMZ-resistente T98G. De forma semelhante, KIM e colaboradores, 2019, encontraram combinações sinérgicas entre TMZ e inibidores específicos de HDAC6, A452 e ACY-1215, observando expressivo aumento de apoptose em linhagens de GBM e superação da resistência a TMZ das células T98G. Os autores demonstraram que a desestabilização de MutSα e estabilização da MGMT contribuem para o papel oncogênico de HDAC6 na resistência do GBM à terapia com TMZ (Kim *et al*., 2019).

Metástase é um fator crítico que afeta o tratamento do câncer, sendo considerada a principal causa de morte entre seus pacientes. Nos gliomas humanos, a capacidade metastática e invasividade das células foram associadas aos níveis elevados de metaloproteinases de matriz (MMP) na matriz extracelular (MEC) e membranas basais, as quais desempenham papel importante na degradação da MEC em diversas condições fisiológicas e patológicas (Nakada; Okada; Yamashita, 2003). O que permite a invasão e proliferação dos gliomas em locais distantes do SNC, como pulmões e pleura, linfonodos regionais, ossos e fígado (Lawrence; Majeed, 2019; Müller Bark *et al*., 2020). As "marcas da metástase" foram redefinidas incluindo motilidade e invasão dentre as características principais das células metastáticas (Müller Bark *et al*., 2020), e como células cancerígenas mais agressivas resultam em metástases distantes, a inibição de transição epitélio mesenquimal (TEM) se torna uma estratégia importante para aumentar do tempo de sobrevida do paciente com câncer (Yu *et al*., 2022).

No GBM, metástase é considerada um evento raro (0,4–0,5%), provavelmente devido à barreira hematoencefálica que dificulta a penetração das células tumorais na circulação fora do SNC ou mesmo a baixas taxas de sobrevida dos pacientes (Lawrence; Majeed, 2019; Müller Bark *et al*., 2020). Entretanto, um dos marcadores do GBM é sua infiltração no parênquima cerebral, por exemplo ao longo dos vasos sanguíneos, na substância branca ou no espaço subaracnóideo (Vollmann-Zwerenz *et al*., 2020).

A elevada infiltração celular no GBM é desencadeada por processos semelhantes a TEM. Os fatores de transcrição envolvidos nesses processos são análogos aos dos carcinomas, Slug, Snail1 e Snail2, Zeb1 e Zeb2 e Twist (Vollmann-Zwerenz *et al*., 2020). O silenciamento genético do SNAIL reduz a invasão, migração e proliferação de células do GBM, enquanto ZEB1 e ZEB2 promovem a regulação positiva de proteínas relacionadas ao fenótipo mesenquimal, como N-caderina, vimentina e fibronectina, e a regulação negativa de proteínas relacionadas ao fenótipo epitelial, por exemplo, E-caderina, claudinas, ocludinas e citoqueratina. Esses fatores de transcrição de TEM se correlacionam com o fenótipo invasivo,

grau do tumor, resistência ao tratamento e baixa sobrevida de pacientes com GBM (Colella; Faienza; Di Bartolomeo, 2019).

Isso posto, a segunda fase de ensaios deste trabalho pretendeu averiguar o impacto de WT161 frente à progressão metastática nas linhagens de GBM, U251, U87 e T98G. O inibidor WT161 reduziu eficientemente a capacidade migratória e invasiva de todas as células de GBM em estudo. A hiperexpressão de HDAC6 também é responsável pela promoção da migração de células normais e tumorais, além de contribuir para o fenótipo invasivo (Saji *et al*., 2005; Kaluza *et al*., 2011; Rey *et al*., 2011). Apoiando nossos resultados, foi identificada a supressão da atividade migratória e invasiva tumoral após inibição de HDAC6, mediada pela redução na expressão de MMP, em carcinoma espinocelular, câncer de pulmão e mama (Yuan *et al*., 2012; Castro-Castro *et al*., 2012; Pai *et al*., 2020). E mais recentemente, Yu e coautores (2022) evidenciaram a mesma ação de WT161 em células de osteosarcoma, juntamente com a regulação da expressão das proteínas N-caderina e E-caderina, perfis de expressão relacionados à supressão de TEM. Esses resultados demonstram a atuação de WT161 no bloqueio da progressão tumoral.

Propusemos então investigar o nível de expressão da proteína β-catenina nas linhagens celulares em estudo e a interferência do tratamento com WT161 nessas vias. Interessantemente, os efeitos antimigratórios e antinvasivos mais intensos foram observados nas células de GBM que exibiram uma redução significativa nos níveis de β-catenina, U251 e T98G. Wnt e β-catenina são altamente expressos em tecidos do GBM e estão associados a mau prognóstico nos pacientes uma vez que, a sinalização Wnt/β-catenina está envolvida na invasão e transição epitélio mesenquimal de células de glioma. A β-catenina acumulada se transloca para o núcleo e ativa a transcrição de genes-alvo, incluindo Twist1/2, MMP7 e Survivina (Jin *et al*., 2011; Gong, 2012; Yang *et al*., 2019). Além disso, a alta expressão de MGMT está significativamente relacionada à sinalização Wnt aberrante em GBM. O uso de inibidores tradicionais da sinalização Wnt (celecoxib, salinomicina, Wnt-C59 e *shRNA* específico) comprovaram suprimir a expressão de MGMT em células quimiorresistentes (Jiapaer *et al*., 2018).

Khan e pesquisadores (2019) evidenciaram a relação entre a inativação de HDAC6 e o bloqueio da via Wnt/β-catenina. O trabalho comprovou que o inibidor de HDAC6, Aspirina®, promoveu aumento da acetilação de β-catenina, induzindo sua fosforilação e consequente degradação citoplasmática. Esses eventos culminaram na interrupção da sinalização da via Wnt/β-catenina em células de câncer de mama (Khan *et al*., 2019).

Aprofundando esse achado, Mak e colaboradores, descobriram que a glicoproteína de

membrana CD133, comumente usada como marcador molecular para células-tronco e células-tronco cancerígenas, pode se associar fisicamente tanto à HDAC6 quanto à β-catenina para formar um complexo ternário. A redução de CD133 ou HDAC6 resulta em aumento da acetilação e degradação da β-catenina, o que se correlaciona com a diminuição da proliferação *in vitro* e crescimento reduzido de xenoenxertos tumorais *in vivo*. Nossos resultados são corroborados por essas descobertas, visto que demonstram a redução de β-catenina mediada pela inativação de HDAC6 e consequente redução no fenótipo metastático, particularmente em relação ao comportamento migratório e invasivo nas células de GBM. No entanto, as implicâncias da inibição de HDAC6 dependentes de WT161 e sua possível atividade regulatória sobre CD133 em células de GBM abre uma porta de possibilidades que deverão ser pesquisadas futuramente.

Durante décadas, a maioria das pesquisas que utilizam linhagens celulares ou culturas primárias, realizam seus ensaios mantendo as células em culturas de monocamada em superfícies plásticas, amplamente conhecidas como culturas 2D. Todavia, esse modelo apresenta algumas limitações, como exemplo, o fato da superfície plástica não fisiológica desencadear a diferenciação celular e a significativa perda das características do microambiente celular (Pelissier *et al.*, 2014). A fim de superar esses obstáculos foram desenvolvidos modelos de cultura tridimensional (3D). A morfologia complexa dos esferóides contribui para avaliar melhor a penetração, resposta e resistência aos agentes farmacológicos (Desoize; Jardillier, 2000). Além disso, a ocorrência de reações metabólicas compensatórias e observação de núcleos necrosados mimetizam a arquitetura multicelular, fisiopatologia e a heterogeneidade dos tumores *in vivo*, portanto é considerada uma técnica confiável e mais relevante na avaliação pré-clínica de tumores sólidos (Hickman *et al*., 2014; Ishiguro *et al*., 2017), incluindo o agressivo GBM (Hirschhaeuser, 2010; Corbet; Ferono, 2017).

Procurando aperfeiçoar nossos resultados, propusemos o desenvolvimento de esferóides 3D derivados das linhagens de GBM. Os dados comprovaram a forte ação inibitória da combinação de WT161 com TMZ sobre as esferas derivadas das células U251 e T98G de GBM, além do sinergismo dessa combinação, capaz de potencializar significativamente o efeito de ambos os compostos isolados, mesmo em modelo de cultura tridimensional. Esses resultados são confirmados por Wang e pesquisadores (2016), eles demonstraram que a inibição molecular de HDAC6, com siRNA, diminui a capacidade das células de glioblastoma formarem esferóides. Os autores concluíram que HDAC6 contribui para a formação dessas esferas no GBM.

Além disso, WT161 atuou na expressiva redução da capacidade migratória dos esferóides de T98G, assim como observado no cultivo dessas células em monocamada. Os dados confirmam nossos achados dos ensaios 2D e tornam mais robusta nossa avaliação da atividade de WT161 sobre o desenvolvimento e progressão tumoral no GBM.

A migração observada em modelo celular 3D, imita parcialmente a capacidade das células de invadir o parênquima, já que o ensaio exige que as células se movam em um meio semissólido, sem a presença de fatores quimioatrativos. Além disso, embora o GBM invada o parênquima circundante, ele normalmente não escapa do sistema nervoso central (Carvalho *et al*., 2019). Isso destaca a importância de avaliar a capacidade de migração de forma mais detalhada do que a invasão em nosso ensaio de migração 3D, já que esse tumor raramente metastatiza sistemicamente. Portanto, concluímos que a inibição dependente de WT161 da migração 3D é uma estratégia muito significativa e informativa, visto que a capacidade migratória pode prejudicar a infiltração do parênquima pelas células de GBM no ambiente in vivo, o que é uma das principais razões para a recorrência da doença após a ressecção tumoral (Bernardo *et al*., 2020).

Na linhagem U251, não foi evidenciada a ação de WT161 sobre a atividade migratória dos seus esferóides, porém supomos tratar-se de ajuste nas concentrações administradas, uma vez que, além dessas células serem mais resistentes que a T98G ao tratamento com WT161, seus esferóides apresentam estruturas mais robustas e rígidas do que o modelo em monocamada, e por isso podem exigir concentrações de tratamento diferentes daqueles obtidos nos ensaios 2D, onde as células estão em monocamada. Novos ensaios serão realizados para ajuste das particularidades de cada linhagem.

No Glioblastoma, a resistência à terapia e mau prognóstico tem sido associado à sua alta instabilidade cromossômica (CIN) (Balzano *et al*., 2022), onde observa-se aneuploidias complexas e poliploidia resultantes da duplicação do genoma completo, características de diversos tipos tumorais com predileção por metástase, resistência ao tratamento e diminuição da sobrevida geral (Taylor *et al*., 2018). A CIN é amplamente reconhecida como um fator essencial na tumorigênese e progressão maligna (Richardson *et al*., 2022), gerando uma heterogeneidade contínua no cariótipo das células tumorais, que fornece substratos para a seleção e evolução nos tumores (Godek *et al*., 2016). Estima-se que 60-80% dos cânceres humanos apresentem alterações cromossômicas sugestivas de CIN (Bakhoum; Cantley, 2018).

CIN foi muito associada a mutações em genes de checkpoint ou diminuição dos níveis de proteínas componentes dos pontos de verificação do ciclo celular (Wang *et al*., 2002; Shichiri

et al., 2002.; Wang *et al*., 2000). Mais recentemente, identificou-se múltiplos defeitos que induzem essa instabilidade no câncer, mas uma significativa proporção converge para um fenótipo mitótico como a sinalização oncogênica, estresse de replicação pré-mitótica e, defeitos na replicação do centrossoma, na coesão das cromátides-irmãs, na sinalização dos pontos de verificação do ciclo celular, ou por erros de segregação cromossômica (Thompson; Compton, 2008; Bakhoum; Cantley, 2018). Esses erros contribuem para aneuploidias cromossômicas e alterações cromossômicas estruturais devido a danos no DNA ocorridos no cromossomo atrasado durante a citocinese (Janssen *et al*., 2011; Levine; Holland, 2018).

Existem dois tipos principais de erros de segregação cromossômica: o desalinhamento cromossômico durante a metáfase e cromossomos atrasados durante a anáfase (Sasai *et al*., 2008; Mogessie; Schuh, 2017). E a gravidade deles varia de leve, onde o cromossomo se desvia alguns micrômetros dos demais, a grave, com formação de micronúcleos (Mashiko *et al*., 2020). Micronúcleos (MN) e outras anomalias nucleares, como pontes nucleoplasmáticas (NPB) e brotos nucleares (NBUD) são biomarcadores bem estabelecidos de eventos genotóxicos e CIN.

Portanto, avaliamos a influência de WT161 na dinâmica da CIN apresentada pela linhagem de GBM T98G, a mais sensível à inibição de HDAC6 dentre as células em estudo. Inicialmente, foi possível demonstrar que WT161 causa aumento expressivo na frequência de células metafásicas com material genético extrapolando os limites normais demarcados pelos fusos mitóticos, caracterizando metáfases desalinhadas, além da formação de fusos multipolares (metáfases e anáfases multipolares). A entrada em anáfase na presença de cromossomos desalinhados é um fator que contribui para a CIN, uma vez que, o desalinhamento cromossômico compromete a segregação correta dos cromossomos durante a divisão celular, causando erros que levam à aneuploidia e, por consequência, à CIN (Gomes *et al.*, 2022).

Corroborando esses achados, um estudo com o inibidor específico de HDAC6, ACY-241, apontou que seu tratamento combinado com paclitaxel reduziu a progressão do ciclo celular e promoveu o surgimento de figuras mitóticas aberrantes. Os autores consideraram que esses elementos podem ter contornado o ponto de controle de montagem do fuso e progredido pela mitose, resultando em morte celular ou células filhas com conteúdo de DNA e morfologia nuclear anormais. Concluiu-se então, que a ação do inibidor de HDAC6 potencializou o efeito do paclitaxel na supressão da instabilidade dinâmica dos microtúbulos (Huang *et al*., 2016). O paclitaxel, agente quimioterápico aprovado pela FDA largamente conhecido como estabilizador de microtúbulos, aumenta a formação de fusos multipolares e subsequentemente a taxa de mitoses aberrantes e morte celular (Zasadil *et al*., 2014). Em concordância, Asthana e

colaboradores (2013) atribuíram o impacto da inibição de HDAC6 na estabilidade dos microtúbulos à hiperacetilação de α-tubulina.

Trabalhos anteriores mostraram que a inibição das HDACs pode enfraquecer a função dos pontos de controle de montagem do fuso ao aumentar a acetilação das histonas, seguida pelo deslocamento das proteínas do complexo de passageiros cromossômicos (CPC), prejudicando potencialmente a ligação dos microtúbulos ao centrômero, o que promove aumento de mitoses multipolares (Stevens *et al*., 2008; Ma *et al*., 2008).

Os MNs são de grande importância por sua relação com a cromotripsia, fenômeno mutacional generalizado caracterizado por grandes rearranjos genômicos (Fenech *et al*., 2011; 2020), que por sua vez, foi implicada na evolução tumoral, resistência adquirida a medicamentos e ativação de oncogene, bem como uma possível causa de doenças congênitas (Crasta *et al*., 2012; Zhang *et al*., 2015; Shoshani *et al*., 2021). E, recentemente, Richardson e colaboradores (2022) apontaram a alta frequência de micronúcleos em alguns subgrupos de glioblastoma, característica associada à CIN em outros cânceres sólidos.

Deste modo, investigamos em seguida, a severidade dos erros de segregação cromossômica gerados pelo WT161 com o ensaio de micronúcleo, onde foi obtido aumento significativo na quantidade de brotos nucleares, pontes nucleoplasmáticas e micronúcleos após tratamento dessa linhagem com o inibidor de HDAC6. No ensaio de FISH, a marcação das mesmas células com sonda pancentromérica evidenciou a presença de micronúcleos e pontes marcados positivamente e outros sem marcação, ou seja, tratavam-se de estruturas originadas por cromossomos inteiros ou fragmentos acêntricos.

Ainda no ensaio de FISH, utilizamos também marcações centroméricas específicas e independentes para os cromossomos 1 e 8, onde ficou evidente que WT161 promoveu aumento da população não modal e perda cromossômica nos núcleos analisados, indicativos de CIN (Bakhoum *et al*., 2012). Hipotetizamos que a aneuploidia apresentada pela linhagem T98G após tratamento com WT161, onde as células apresentam apenas perdas cromossômicas, possa ser justificada pela ocorrência de cromossomos desalinhados que micronuclearam posteriormente (marcados positivamente para a sonda pancentromérica), os quais poderiam ser formados também pelos cromossomos perdidos e então expulsos (fenômeno de extrusão) ou degradados nas próprias células. A extrusão é considerada uma alternativa de eliminação de micronúcleos, sinalizada pela ocorrência de DNA extracelular e bolhas na membrana das células (Shimizu, 2009), enquanto a degradação dos MNs baseia-se na destruição enzimática de DNA e outros materiais micronucleares que pode ocorrer por processos semelhantes à apoptose, restritos ao

micronúcleo, ou por autofagia (Hintzsche *et al*., 2017).

Células micronucleadas também constituem um forte sinal apoptótico. Trabalhos prévios provaram que células com micronúcleos positivos para centrômero eram mais frequentes na fração apoptótica do que na fração viável, ou seja, micronúcleos constituídos por cromossomos inteiros podem representar uma via para eliminação de células potencialmente aneuplóides (Decordier; Cundari; Kirsch-Volders, 2005; Decordier; Cundari; Kirsch-Volders, 2008).

Por fim, obtivemos metáfases da linhagem T98G, com e sem tratamento com WT161, onde não foi observada interferência do composto no cariótipo hiperpentaplóides apresentado por essas células, confirmado pelo banco de células ATCC e demonstrado em outros trabalhos com a mesma linhagem (Stepanenko *et al*., 2016). E concordando com nossos resultados prévios, identificamos a presença de quatro minutes, fragmentos de DNA extracromossômico, frequentes em células com CIN e associados à resistência terapêutica (Sanborn *et al*., 2013), em ambos os grupos. A indução de alterações cromossômicas estruturais após tratamento com WT161, será analisada em ensaios futuros da nossa equipe. A associação dos dados obtidos com os ensaios de instabilidade cromossômica comprova a interferência de WT161 na homeostasia genômica das células T98G promovida pelo aumento da instabilidade cromossômica e diversidade fenotípica, como provado também em nossos ensaios funcionais.

Visto que anormalidades mitóticas levam à instabilidade genômica e tumorigênese, reguladores mitóticos, como inibidores de HDACs, podem ser considerados alvos terapêuticos úteis no tratamento do câncer. Foi demonstrado por Kops; Foltz; Cleveland (2004), em células de glioblastoma (inclusive T98G) e câncer cervical humano, que a inibição das proteínas de checkpoint, BubR1 ou Mad2, promoveu perda cromossômica grave, além de não serem observados ganhos e perdas equivalentes de cromossomos assim como em nossos achados. Ao contrário, notou-se uma proporção maior de células com conteúdo de DNA <2N, certamente refletindo cromossomos desvinculados ou aberrantemente ligados perdidos de ambas as células-filhas durante a citocinese. A deficiência de checkpoints mitóticos promoveu diminuição da proliferação celular em decorrência da rápida perda de cromossomos codificantes de genes essenciais na manutenção da viabilidade das células durante a citocinese, e foi induzida a execução de vias de morte celular que culminaram na ativação de caspase 3. Os autores concluíram que a supressão da sinalização de pontos de verificação é invariavelmente letal como consequência de massiva perda cromossômica, tendo implicações na inibição da proliferação de células tumorais.

Já mencionamos a íntima relação entre a atividade antitumoral dos inibidores de HDAC e a catástrofe mitótica. O estudo de Cornago e pesquisadores, 2014, explica essa observação com base em seus resultados com células de GBM, confirmando que os inibidores de HDAC reduzem significativamente a expressão dos reguladores do checkpoint G2, Wee1 e Chk1, além de outras proteínas envolvidas na segregação cromossômica, reparo de DNA e formação do fuso mitótico. Portanto, células de glioma tratadas com esses compostos morrem devido ao mecanismo de catástrofe mitótica, envolvendo a ativação da caspase-2 e a via mitocondrial pelo acúmulo de danos no DNA e à disfunção do checkpoint G2.

Por muito tempo, a apoptose, senescência, autofagia e a necroptose foram consideradas consequências da catástrofe mitótica. Porém, a catástrofe mitótica se trata de outro tipo de morte celular, apresentando apenas algumas características morfológicas e bioquímicas parciais da apoptose e necroptose, e que podem coexistir e se associar em algumas circunstâncias. Como muitas células cancerígenas são capazes de desenvolver resistência às terapias baseadas em apoptose, por apresentar defeitos em sua maquinaria, direcionar outras formas de morte celular pode oferecer benefícios terapêuticos nessas células, tornando a indução à catástrofe mitótica uma alternativa imprescindível na eficácia do tratamento do câncer (Bai *et al*., 2023). Exemplo disso, o derivado de tieno[2,3-d]pirimidina, 6j, e o composto ZML superaram a resistência à apoptose nas células de câncer de cólon e A549/Taxol, respectivamente, induzindo catástrofe mitótica como um mecanismo alternativo de morte celular (Amawi *et al*., 2017; Bai *et al*., 2017).

Park e pesquisadores (2008) asseguraram que a inibição de HDAC6, em linhagens de adenocarcinoma gástrico, câncer cervical humano, de mama e cólon, resultou na degradação proteassomal da Aurora-A, reguladora da segregação cromossômica durante a mitose, e consequentemente gerou erros de segregação cromossômica nessas células. Além do seu papel na modulação da estabilidade do microtúbulo favorecendo a correta disjunção cromossômica (Steinhaeuser *et al*., 2017). Concordando com nossos resultados, os estudiosos atribuíram a citotoxicidade dos inibidores de HDAC6 à indução de defeitos mitóticos e aumento de CIN.

Atualmente, em comparação com a genômica e proteômica, a metabolômica reflete mudanças no fenótipo que estão mais próximas do status fisiológico final e, portanto, pode permitir a identificação de novas assinaturas metabolômicas em GBM dependente de HDAC6 (Ahmed; Chinnaiyan, 2014). Notavelmente, após o ensaio metabolômico, encontramos um enriquecimento do lipídio PE(P-18:0/16:0) na fração intracelular após o tratamento com WT161. Essa fosfatidiletanolamina (PE) é precursora de fosfatidilcolina (PC) e está envolvida

no transporte de lipídios e na autofagia (Calzada; Onguka; Claypool, 2016). No entanto, PE e PC são os lipídios mais críticos para a peroxidação lipídica e a ferroptose, uma forma não apoptótica de morte celular, induzida pelo acúmulo excessivo de peroxidação lipídica (Dixon *et al*., 2012; Doll *et al*., 2017; Kagan *et al*., 2017). Recentemente, Liu *et al.* (2023) descobriram que a Tubastatina A, inibidor de HDAC6, induziu ferroptose em células cancerígenas, embora de forma independente de HDAC6.

Curiosamente, o rastreamento metabolômico encontrou uma regulação negativa do metabólito 24-Acetil-25-cinnamoilvulgarosídeo, que pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como sesterterpenóides cheilantanos e atua como estabilizador de membrana, localizado preferencialmente no citoplasma e na membrana celular, estando envolvido na peroxidação lipídica, no metabolismo de ácidos graxos, na sinalização celular e nas vias de metabolismo lipídico (HMDB, 2024). Assim, com base em nossos resultados metabolômicos, e como sugerido por outros autores (Orlicka-Plocka *et al*., 2021; Nie *et al*., 2023), hipotetizamos que a desregulação metabólica dependente de HDAC6 afeta principalmente eventos de peroxidação lipídica, e pode favorecer o efeito citotóxico de WT161, por provocar ferroptose nas células de glioblastoma T98G. Mais estudos são necessários para confirmar esses dados.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados apresentados neste estudo, confirmou-se que:

a) WT161 reduziu significativamente a viabilidade e a capacidade de formação de colônias das linhagens de Glioblastoma, sendo T98G as células mais sensíveis ao composto em relação à U251 e U87. E sua atividade antiproliferativa se dá por meio do bloqueio do ciclo celular na fase G2/M. Além disso, WT161 é um potente indutor de morte celular por apoptose em linhagens de GBM;

b) WT161 combinado simultaneamente com TMZ tem efeito sinérgico em relação à atividade antiproliferativa e citotóxica dos compostos isolados em células de GBM;

c) WT161 comprovou sua atuação em linhagens de GBM por meio do expressivo aumento da acetilação da α-tubulina, seu principal substrato;

d) WT161 inibe a atividade migratória das células de GBM, em modelos 2D e 3D, e diminui a capacidade invasiva dessas linhagens, associados à diminuição da expressão da proteína β-catenina nas linhagens U251 e T98G.

e) Em modelo 3D, a combinação simultânea WT161+TMZ inibiu sinergicamente o crescimento dos esferóides derivados das células U251 e T98G de GBM.

f) WT161 induz aumento da frequência de marcadores de instabilidade cromossômica, como metáfases desalinhadas, fusos multipolares, micronúcleos e pontes citoplasmáticas, e promove perda cromossômica na linhagem T98G de GBM.

g) WT161 alterou a dinâmica metabólica das células T98G de GBM.

Portanto, concluímos que o composto WT161 impacta uma ampla gama de fatores biológicos funcionais por meio da modulação de múltiplas vias de sinalização. Com isso, representa um promissor agente antitumoral sobre as linhagens de Glioblastoma. Além de sua associação com a temozolomida ser uma possível estratégia na superação da resistência ao tratamento padrão com esse fármaco, potencializando seus resultados citotóxicos.

REFERÊNCIAS

AHMED, Kamran A.; CHINNAIYAN, Prakash. Applying metabolomics to understand the aggressive phenotype and identify novel therapeutic targets in glioblastoma. **Metabolites**, v. 4, n. 3, p. 740-750, 2014.

ALIFIERIS, Constantinos; TRAFALIS, Dimitrios T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 152, p. 63-82, 2015.

ANASTAS, J. N.; MOON, R. T. Signalling pathways as therapeutic targets in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 13, p. 11–26, 2013.

ASTHANA, Jayant *et al*. Inhibition of HDAC6 deacetylase activity increases its binding with microtubules and suppresses microtubule dynamic instability in MCF-7 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 31, p. 22516-22526, 2013.

AUZMENDI-IRIARTE, Jaione *et al*. Characterization of a new small-molecule inhibitor of HDAC6 in glioblastoma. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 6, p. 1-14, 2020.

BAGCA, Bakiye Goker *et al*. Temozolomide treatment combined with AZD3463 shows synergistic effect in glioblastoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 533, n. 4, p. 1497-1504, 2020.

BAI, Zhaoshi *et al*. Perspectives and mechanisms for targeting mitotic catastrophe in cancer treatment. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 17, p. 188965, 2023.

BAKHOUM, Samuel F. *et al*. Chromosomal instability and cancer: a complex relationship with therapeutic potential. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 4, p. 1138-1143, 2012.

BAKHOUM, Samuel F.; CANTLEY, Lewis C. The multifaceted role of chromosomal instability in cancer and its microenvironment. **Cell**, v. 174, n. 6, p. 1347-1360, 2018.

BALZANO, Elisa *et al*. Characterization of chromosomal instability in glioblastoma. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 810793, 2022.

BANELLI, Barbara *et al*. The histone demethylase KDM5A is a key factor for the resistance to temozolomide in glioblastoma. **Cell Cycle**, v. 14, n. 21, p. 3418-3429, 2015.

BANIK, Debarati *et al*. HDAC6 plays a noncanonical role in the regulation of antitumor immune responses, dissemination, and invasiveness of breast cancer. **Cancer Research**, v. 80, n. 17, p. 3649-3662, 2020.

BATASH, Ron *et al*. Glioblastoma multiforme, diagnosis and treatment; recent literature review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 27, p. 3002-3009, 2017.

BEHROOZ, Amir Barzegar *et al*. Molecular mechanisms of microRNAs in glioblastoma

pathogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1870, n. 6, p. 119482, 2023.

BEIER, Dagmar *et al*. Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. **Cancer Research**, v. 68, n. 14, p. 5706-5715, 2008.

BEN-DAVID, Uri; AMON, Angelika. Context is everything: aneuploidy in cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 21, n. 1, p. 44-62, 2020.

BERNARDO, Paula Sabbo *et al*. LQB-118 compound inhibits migration and induces cell death in glioblastoma cells. **Oncology Reports**, v. 43, n. 1, p. 346-357, 2020.

BIRAN, Anat *et al*. Downregulation of survivin and aurora A by histone deacetylase and RAS inhibitors: a new drug combination for cancer therapy. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 3, p. 691-701, 2011.

BONDAREV, Andrey D. *et al*. Recent developments of HDAC inhibitors: Emerging indications and novel molecules. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 87, n. 12, p. 4577-4597, 2021.

CALZADA, Elizabeth; ONGUKA, Ouma; CLAYPOOL, M. Phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 321, p. 29-88, 2016.

CARVALHO, Juliana Arcangelo Di Vita *et al*. Systemic dissemination of glioblastoma: literature review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 65, n. 3, p. 460-468, 2019.

CASTRO-CASTRO, Antonio *et al*. ATAT1/MEC-17 acetyltransferase and HDAC6 deacetylase control a balance of acetylation of alpha-tubulin and cortactin and regulate MT1-MMP trafficking and breast tumor cell invasion. **European Journal of Cell Biology**, v. 91, n. 11-12, p. 950-960, 2012.

CASTRO-GAMERO, Angel Mauricio *et al*. Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid, an inhibitor of Sp1-mediated survivin transcription, induces apoptosis and acts synergistically with chemo-radiotherapy in glioblastoma cells. **Investigational New Drugs**, v. 31, n. 4, p. 858-870, 2013.

CHEN, Ricky *et al*. Glioma subclassifications and their clinical significance. **Neurotherapeutics**, v. 14, n. 2, p. 284-297, 2017.

CHEN, Xiaohua *et al*. Mutant p53 in cancer: from molecular mechanism to therapeutic modulation. **Cell Death & Disease**, v. 13, n. 11, p. 974, 2022.

CHOU, Ting-Chao. The median-effect principle and the combination index for quantitation of synergism and antagonism. **Synergism and Antagonism in Chemotherapy**, p. 61-102, 1991.

CHOU, Ting-Chao; TALALAY, Paul. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 22, p. 27-55, 1984.

CHUA, Jason; NAFZIGER, Elizabeth; LEUNG, Denise. Evidence-based practice: temozolomide beyond glioblastoma. **Current Oncology Reports**, v. 21, n. 4, p. 1-9, 2019.

CLEVERS, Hans. Wnt/β-catenin signaling in development and disease. **Cell**, v. 127, n. 3, p. 469-480, 2006.

COLELLA, Barbara; FAIENZA, Fiorella; DI BARTOLOMEO, Sabrina. EMT regulation by autophagy: a new perspective in glioblastoma biology. **Cancers**, v. 11, n. 3, p. 312, 2019.

CONDORELLI, F. *et al*. Inhibitors of histone deacetylase (HDAC) restore the p53 pathway in neuroblastoma cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 4, p. 657-668, 2008.

COOTHANKANDASWAMY, Veena *et al*. The plasma membrane transporter SLC5A8 suppresses tumour progression through depletion of survivin without involving its transport function. **Biochemical Journal**, v. 450, n. 1, p. 169-178, 2013.

CORBET, Cyril; FERON, Olivier. Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 10, p. 577-593, 2017.

CORNAGO, M. *et al*. Histone deacetylase inhibitors promote glioma cell death by G2 checkpoint abrogation leading to mitotic catastrophe. **Cell Death & Disease**, v. 5, n. 10, p. e1435-e1435, 2014.

CRASTA, Karen *et al*. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. **Nature**, v. 482, n. 7383, p. 53-58, 2012.

DE GROOT, John; MILANO, Vanessa. Improving the prognosis for patients with glioblastoma: the rationale for targeting Src. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 95, n. 2, p. 151-163, 2009.

DE SOUZA GODOY, Luis Filipe *et al*. Advances in diffuse glial tumors diagnosis. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 81, n. 12, p. 1134-1145, 2023.

DECORDIER, Ilse; CUNDARI, Enrico; KIRSCH-VOLDERS, Micheline. Influence of caspase activity on micronuclei detection: a possible role for caspase-3 in micronucleation. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 20, n. 3, p. 173-179, 2005.

DECORDIER, Ilse; CUNDARI, Enrico; KIRSCH-VOLDERS, Micheline. Survival of aneuploid, micronucleated and/or polyploid cells: crosstalk between ploidy control and apoptosis. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 651, n. 1-2, p. 30-39, 2008.

DESOIZE, Bernard; JARDILLIER, Jean-Claude. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 36, n. 2-3, p. 193-207, 2000.

DIXON, Scott J. *et al*. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. **Cell**, v.

149, n. 5, p. 1060-1072, 2012.

DONG, Jing *et al*. A novel HDAC6 inhibitor exerts an anti-cancer effect by triggering cell cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. **European Journal of Pharmacology**, v. 828, p. 67-79, 2018.

DONGRE, Anushka; WEINBERG, Robert A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 2, p. 69-84, 2019.

DRAZIC, Adrian *et al*. The world of protein acetylation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 10, p. 1372-1401, 2016.

DUESBERG, P. *et al*. How aneuploidy may cause cancer and genetic instability. **Anticancer Research,** v. 19, n. 6A, p. 4887-4906, 1999.

ECKSCHLAGER, Tomas *et al*. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1414, 2017.

EROGLU, M.; DERRY, W. B. Your neighbours matter–non-autonomous control of apoptosis in development and disease. **Cell Death & Differentiation**, v. 23, p. 2876-2903, 2016.

FENECH, Michael *et al*. Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 786, p. 108342, 2020.

FENECH, Michael *et al*. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.

FISHER, Tamar *et al*. Mechanisms operative in the antitumor activity of temozolomide in glioblastoma multiforme. **The Cancer Journal**, v. 13, n. 5, p. 335-344, 2007.

FRANKEN, Nicolaas AP *et al*. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.

FU, Jin *et al*. Xihuang pill potentiates the anti-tumor effects of temozolomide in glioblastoma xenografts through the Akt/mTOR-dependent pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 261, p. 113071, 2020.

GARCÍA-GUERRERO, Estefanía *et al*. Upregulation of CD38 expression on multiple myeloma cells by novel HDAC6 inhibitors is a class effect and augments the efficacy of daratumumab. **Leukemia**, v. 35, n. 1, p. 201-214, 2021.

GARMPIS, Nikolaos *et al*. Histone deacetylases as new therapeutic targets in triple-negative breast cancer: Progress and promises. **Cancer Genomics-Proteomics**, v. 14, n. 5, p. 299-313, 2017.

GLOZAK, M. A.; SETO, E. Histone deasetylases and cancer. **Oncogene**. v. 26, p. 5420-5432,

2007.

GODEK, Kristina M. *et al*. Chromosomal instability affects the tumorigenicity of glioblastoma tumor-initiating cells. **Cancer Discovery**, v. 6, n. 5, p. 532-545, 2016.

GOMES, Ana Margarida *et al*. Micronuclei from misaligned chromosomes that satisfy the spindle assembly checkpoint in cancer cells. **Current Biology**, v. 32, n. 19, p. 4240-4254. e5, 2022.

GONG, A. Huang S. FoxM1 and Wntβ-catenin Signaling in Glioma Stem Cells. **Cancer Res**, v. 72, n. 22, p. 5658-62, 2012.

GRAHAM, Trevor A.; SOTTORIVA, Andrea. Measuring cancer evolution from the genome. **The Journal of Pathology**, v. 241, n. 2, p. 183-191, 2017.

GRAHOVAC, Gordan *et al*. Cerebellar glioblastomas: pathophysiology, clinical presentation and management. **Acta Neurochirurgica**, v. 151, n. 6, p. 653-657, 2009.

GREK, Christina L. *et al*. Novel approach to temozolomide resistance in malignant glioma: connexin43-directed therapeutics. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 41, p. 79-88, 2018.

GUPTA, Praveer K. *et al*. Inhibitors selective for HDAC6 in enzymes and cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 23, p. 7067-7070, 2010.

HABERLAND, M. *et al.* The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. **Nat. Rev. Genet**., v. 10, p. 32–42, 2009.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANSEN, Allison L. *et al*. The clinical progression of patients with glioblastoma. **Interdisciplinary Neurosurgery**, v. 32, p. 101756, 2023.

HASAN, Hera *et al*. A Comprehensive Review of miRNAs and Their Epigenetic Effects in Glioblastoma. **Cells**, v. 12, n. 12, p. 1578, 2023.

HICKMAN, John A. *et al*. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 9, p. 1115-1128, 2014.

HIDESHIMA, Teru *et al*. Discovery of selective small-molecule HDAC6 inhibitor for overcoming proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 46, p. 13162-13167, 2016.

HIDESHIMA, Teru *et al*. HDAC6 inhibitor WT161 downregulates growth factor receptors in breast cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 46, p. 80109, 2017.

HINTZSCHE, Henning *et al*. Fate of micronuclei and micronucleated cells. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 771, p. 85-98, 2017.

HIRSCHHAEUSER, Franziska *et al*. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. **Journal of Biotechnology**, v. 148, n. 1, p. 3-15, 2010.

HO, Yi-Hsun *et al*. A highly HDAC6-selective inhibitor acts as a fluorescent probe. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 16, n. 42, p. 7820-7832, 2018.

HUANG, Huiyong *et al*. Resveratrol reverses temozolomide resistance by downregulation of MGMT in T98G glioblastoma cells by the NF-κB-dependent pathway. **Oncology Reports**, v. 27, n. 6, p. 2050-2056, 2012.

HUANG, Pengyu *et al*. Selective HDAC inhibition by ACY-241 enhances the activity of paclitaxel in solid tumor models. **Oncotarget**, v. 8, n. 2, p. 2694, 2016.

IACONELLI, Jonathan *et al*. HDAC6 inhibitors modulate Lys49 acetylation and membrane localization of β-catenin in human iPSC-derived neuronal cells. **ACS Chemical Biology**, v. 10, n. 3, p. 883-890, 2015.

ISHIGURO, Tatsuya *et al*. Tumor-derived spheroids: relevance to cancer stem cells and clinical applications. **Cancer Science**, v. 108, n. 3, p. 283-289, 2017.

JACKSON, Robert J. *et al*. Limitations of stereotactic biopsy in the initial management of gliomas. **Neuro-Oncology**, v. 3, n. 3, p. 193-200, 2001.

JANSSEN, Aniek *et al*. Chromosome segregation errors as a cause of DNA damage and structural chromosome aberrations. **Science**, v. 333, n. 6051, p. 1895-1898, 2011.

JEZIERZAŃSKI, Marcin *et al*. Temozolomide (TMZ) in the treatment of glioblastoma multiforme—A literature review and clinical outcomes. **Current Oncology**, v. 31, n. 7, p. 3994-4002, 2024.

JIAPAER, Shabierjiang *et al*. Potential strategies overcoming the temozolomide resistance for glioblastoma. **Neurologia Medico-Chirurgica**, v. 58, n. 10, p. 405, 2018.

JIN, Li-Yan *et al*. LKB1 inactivation leads to centromere defects and genome instability via p53-dependent upregulation of survivin. **Aging (Albany NY)**, v. 12, n. 14, p. 14341, 2020.

JIN, Xun *et al*. Frizzled 4 Regulates Stemness and Invasiveness of Migrating Glioma Cells Established by Serial Intracranial TransplantationFrizzled 4 and Glioma Invasiveness. **Cancer Research**, v. 71, n. 8, p. 3066-3075, 2011.

JOHNSTONE, R.W. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. **Nat Rev Drug Discov 1**, v. 25, p. 287-299, 2002.

JONNALAGADDA, Bhavana; AROCKIASAMY, Sumathy; KRISHNAMOORTHY, Sriram. Cellular growth factors as prospective therapeutic targets for combination therapy in androgen

independent prostate cancer (AIPC). **Life Sciences**, p. 118208, 2020.

KAGAN, Valerian E. *et al*. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. **Nature Chemical Biology**, v. 13, n. 1, p. 81-90, 2017.

KALUZA, David *et al*. Class IIb HDAC6 regulates endothelial cell migration and angiogenesis by deacetylation of cortactin. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 20, p. 4142-4156, 2011.

KAO, Tzu-Jen *et al*. Dysregulated lipid metabolism in TMZ-resistant glioblastoma: Pathways, proteins, metabolites and therapeutic opportunities. **Lipids in Health and Disease**, v. 22, n. 1, p. 114, 2023.

KARACHI, Aida *et al*. Temozolomide for immunomodulation in the treatment of glioblastoma. **Neuro-Oncology**, v. 20, n. 12, p. 1566-1572, 2018.

KASTENHUBER, Edward R.; LOWE, Scott W. Putting p53 in context. **Cell**, v. 170, n. 6, p. 1062-1078, 2017.

KHAN, Fahim Ullah *et al*. Wnt/β-catenin pathway-regulated fibromodulin expression is crucial for breast cancer metastasis and inhibited by aspirin. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1308, 2019.

KIM, Go Woon *et al*. Temozolomide-resistant glioblastoma depends on HDAC6 activity through regulation of DNA mismatch repair. **Anticancer Research**, v. 39, n. 12, p. 6731-6741, 2019.

KIM, Hyun-Jung; BAE, Suk-Chul. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. **American Journal of Translational Research**, v. 3, n. 2, p. 166, 2011.

KIRBY, Sarah; PURDY, R. Allan. Headaches and brain tumors. **Neurologic Clinics**, v. 32, n. 2, p. 423-432, 2014.

KITANGE, Gaspar J. *et al*. Induction of MGMT expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts. **Neuro-Oncology**, v. 11, n. 3, p. 281-291, 2009.

KONG, Dejuan *et al*. Cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-phenotypic cells: are they cousins or twins? **Cancers**, v. 3, n. 1, p. 716-729, 2011.

KOPS, Geert JPL; FOLTZ, Daniel R.; CLEVELAND, Don W. Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 23, p. 8699-8704, 2004.

KUNNIMALAIYAAN, S. *et al*. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, alters multiple signaling pathways in hepatocellular carcinoma cell lines. **The American Journal of Surgery**, p. 1-7, 2016.

LAI, Sheng-Wei *et al*. Differential characterization of temozolomide-resistant human glioma

cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 127, 2018.

LAN, Zhong; LI, Xin; ZHANG, Xiaoqin. Glioblastoma: An Update in Pathology, Molecular Mechanisms and Biomarkers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 5, p. 3040, 2024.

LARUE, Lionel; BELLACOSA, Alfonso. Epithelial–mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3′ kinase/AKT pathways. **Oncogene**, v. 24, n. 50, p. 7443-7454, 2005.

LEE, H. Y., Lee, J. F., Kumar, S., Wu, Y. W., HuangFu, W. C., Lai, M. J. *et al*. 3-Aroylindoles display antitumor activity in vitro and in vivo: effects of N1-substituents on biological activity. **Eur. J. Med. Chem**. v. 125, p. 1268–1278, 2017.

LEE, Yeuan Ting; TAN, Yi Jer; OON, Chern Ein. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. **European Journal of Pharmacology**, v. 834, p. 188-196, 2018.

LENGAUER, Christoph; KINZLER, Kenneth W.; VOGELSTEIN, Bert. Genetic instability in colorectal cancers. **Nature**, v. 386, n. 6625, p. 623-627, 1997.

LEVINE, Michelle S.; HOLLAND, Andrew J. The impact of mitotic errors on cell proliferation and tumorigenesis. **Genes & Development**, v. 32, n. 9-10, p. 620-638, 2018.

LI, Shun *et al*. Histone deacetylase 6 promotes growth of glioblastoma through inhibition of SMAD2 signaling. **Tumor Biology**, v. 36, n. 12, p. 9661-9665, 2015.

LI, Xiaoyang *et al*. Class I HDAC inhibitors display different antitumor mechanism in leukemia and prostatic cancer cells depending on their p53 status. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 6, p. 2589-2603, 2018.

LI, Yu *et al*. HDAC6 is required for epidermal growth factor-induced β-catenin nuclear localization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 19, p. 12686-12690, 2008.

LING L, Hu F, Ying X, Ge J, Wang Q. HDAC6 inhibition disrupts maturational progression and meiotic apparatus assembly in mouse oocytes. **Cell Cycle**, v. 17, n. 5, p. 550-556, 2018.

LIU, Aizhen *et al*. Genetics and epigenetics of glioblastoma: applications and overall incidence of IDH1 mutation. **Frontiers in Oncology**, v. 6, p. 16, 2016.

LIU, Guo *et al*. Genome chaos: survival strategy during crisis. **Cell Cycle**, v. 13, n. 4, p. 528-537, 2014.

LIU, Ting; LIU, Xin; LI, Wenhua. Tetrandrine, a Chinese plant-derived alkaloid, is a potential candidate for cancer chemotherapy. **Oncotarget**, v. 7, n. 26, p. 40800, 2016.

LÓPEZ-VALERO, Israel *et al*. Targeting Glioma Initiating Cells with A combined therapy of cannabinoids and temozolomide. **Biochemical Pharmacology**, v. 157, p. 266-274, 2018.

LOUIS, David N. *et al*. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous

system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97-109, 2007.

LOUIS, David N. *et al*. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803-820, 2016.

LUCIO-ETEROVIC, Agda KB *et al*. Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hypoexpressed in glioblastomas. **BMC Cancer**, v. 8, p. 1-10, 2008.

Ma Y, Cai S, Lu Q, Lu X, Jiang Q, Zhou J, Zhang C. Inhibition of protein deacetylation by trichostatin A impairs microtubule-kinetochore attachment. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, p. 3100–3109, 2008.

MAIATO, Helder *et al*. Mechanisms of chromosome congression during mitosis. **Biology**, v. 6, n. 1, p. 13, 2017.

MAK, Anthony B. *et al*. Regulation of CD133 by HDAC6 promotes β-catenin signaling to suppress cancer cell differentiation. **Cell Reports**, v. 2, n. 4, p. 951-963, 2012.

MARAMPON, Francesco *et al*. HDAC4 and HDAC6 sustain DNA double strand break repair and stem-like phenotype by promoting radioresistance in glioblastoma cells. **Cancer Letters**, v. 397, p. 1-11, 2017.

MARKS, Paul A. *et al*. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, n. 3, p. 194-202, 2001.

MASHIKO, Daisuke *et al*. Chromosome segregation error during early cleavage in mouse pre-implantation embryo does not necessarily cause developmental failure after blastocyst stage. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 854, 2020.

MASHIMO, Tomoyuki *et al*. Acetate is a bioenergetic substrate for human glioblastoma and brain metastases. **Cell**, v. 159, n. 7, p. 1603-1614, 2014.

MASSA, Chiara; SELIGER, Barbara. Combination of multiple omics techniques for a personalized therapy or treatment selection. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1258013, 2023.

MCDERMOTT, Martina *et al*. In vitro development of chemotherapy and targeted therapy drug-resistant cancer cell lines: a practical guide with case studies. **Frontiers in Oncology**, v. 4, p. 40, 2014.

MCFALINE-FIGUEROA, José L. *et al*. Minor changes in expression of the mismatch repair protein MSH2 exert a major impact on glioblastoma response to temozolomide. **Cancer Research**, v. 75, n. 15, p. 3127-3138, 2015.

MCKINNON, Chris *et al*. Glioblastoma: clinical presentation, diagnosis, and management. **BMJ**, v. 374, 2021.

MELAMED, Jilian R. *et al*. Investigating the role of Hedgehog/GLI1 signaling in

glioblastoma cell response to temozolomide. **Oncotarget**, v. 9, n. 43, p. 27000, 2018.

MESSAOUDI, Khaled; CLAVREUL, Anne; LAGARCE, Frédéric. Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 7, p. 899-905, 2015.

MOGESSIE, Binyam; SCHUH, Melina. Actin protects mammalian eggs against chromosome segregation errors. **Science**, v. 357, n. 6353, p. 1647, 2017.

MONTANI, Maria Saveria Gilardini *et al*. Histone deacetylase inhibitors VPA and TSA induce apoptosis and autophagy in pancreatic cancer cells. **Cellular Oncology**, v. 40, n. 2, p. 167-180, 2017.

MRAKOVCIC, Maria *et al*. Epigenetic targeting of autophagy via HDAC inhibition in tumor cells: role of p53. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 3952, 2018.

MÜLLER BARK, Juliana *et al*. Circulating biomarkers in patients with glioblastoma. **British Journal of Cancer**, v. 122, n. 3, p. 295-305, 2020.

MUNOZ, J. L. *et al*. Temozolomide resistance in glioblastoma cells occurs partly through epidermal growth factor receptor-mediated induction of connexin 43. **Cell Death & Disease**, v. 5, n. 3, p. e1145-e1145, 2014.

MURPHY, Patrick JM *et al*. Regulation of the dynamics of hsp90 action on the glucocorticoid receptor by acetylation/deacetylation of the chaperone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 40, p. 33792-33799, 2005.

NAKADA, Mitsutoshi; OKADA, Yasunori; YAMASHITA, Junkoh. The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 8, n. 5, p. 261-269, 2003.

NIE, Qi *et al*. Iron oxide nanoparticles induce ferroptosis via the autophagic pathway by synergistic bundling with paclitaxel. **Molecular Medicine Reports**, v. 28, n. 4, p. 1-13, 2023.

NOWICKI, Michal O. *et al*. Proteomic analysis implicates vimentin in glioblastoma cell migration. **Cancers**, v. 11, n. 4, p. 466, 2019.

OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, p. 1133-1143, 2020.

OHGAKI, Hiroko; KLEIHUES, Paul. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. **Cancer Science**, v. 100, n. 12, p. 2235-2241, 2009.

OHGAKI, Hiroko; KLEIHUES, Paul. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 5, p. 1445-1453, 2007.

OMURO, Antonio; DEANGELIS, Lisa M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. **Jama**, v. 310, n. 17, p. 1842-1850, 2013.

ORLICKA-PŁOCKA, Marta *et al*. Implications of oxidative stress in glioblastoma multiforme following treatment with purine derivatives. **Antioxidants**, v. 10, n. 6, p. 950, 2021.

OSTER, Christoph *et al*. Are we providing best-available care to newly diagnosed glioblastoma patients? Systematic review of phase III trials in newly diagnosed glioblastoma 2005–2022. **Neuro-Oncology Advances**, v. 5, n. 1, p. vdad105, 2023.

OSTROM, Quinn T. *et al*. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013–2017. **Neuro-Oncology**, v. 22, n. Supplement_1, p. iv1-iv96, 2020.

OSTROM, Quinn T. *et al*. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. **Neuro-Oncology**, v. 16, n. 7, p. 896-913, 2014.

PAI, Jih-Tung *et al*. Suppressing migration and invasion of H1299 lung cancer cells by honokiol through disrupting expression of an HDAC6-mediated matrix metalloproteinase 9. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 1534-1545, 2020.

PAL, Soumik *et al*. Targeting cancer-specific metabolic pathways for developing novel cancer therapeutics. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 955476, 2022.

PARK, Jung-Hyun *et al*. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective cytotoxicity through modulating Aurora-A kinase. **Journal of molecular medicine**, v. 86, p. 117-128, 2008.

PELISSIER, Fanny A. *et al*. Age-related dysfunction in mechanotransduction impairs differentiation of human mammary epithelial progenitors. **Cell reports**, v. 7, n. 6, p. 1926-1939, 2014.

PENG, Jian *et al*. Constitutive β-catenin overexpression represses lncRNA MIR100HG transcription via HDAC6-mediated histone modification in colorectal cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 20, n. 6, p. 949-959, 2022.

PENG, Lirong; SETO, Edward. Deacetylation of nonhistone proteins by HDACs and the implications in cancer. In: Histone Deacetylases: the Biology and Clinical Implication. **Springer**, v. 14, p. 39-56, 2011.

PIHAN, German A. Centrosome dysfunction contributes to chromosome instability, chromoanagenesis, and genome reprograming in cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 3, p. 277, 2013.

PULYA, Sravani *et al*. HDAC6 as privileged target in drug discovery: A perspective. **Pharmacological Research**, v. 163, p. 105274, 2021.

QI, Xu-chen *et al*. LRIG1 dictates the chemo-sensitivity of temozolomide (TMZ) in U251 glioblastoma cells via down-regulation of EGFR/topoisomerase-2/Bcl-2. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 437, n. 4, p. 565-572, 2013.

QIU, Zhi-Kun *et al*. Enhanced MGMT expression contributes to temozolomide resistance in glioma stem-like cells. **Chinese Journal of Cancer**, v. 33, n. 2, p. 115, 2014.

RABÉ, Marion *et al*. Identification of a transient state during the acquisition of temozolomide resistance in glioblastoma. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2020.

RAJAK, H. *et al*. A structural insight into hydroxamic acid based histone deacetylase inhibitors for the presence of anticancer activity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 23, p. 2642-2664, 2014.

RICH, Jeremy N. Cancer stem cells in radiation resistance. **Cancer Research**, v. 67, n. 19, p. 8980-8984, 2007.

RICHARDSON, Timothy E. *et al*. Chromosomal instability in adult-type diffuse gliomas. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 10, n. 1, p. 115, 2022.

ROY, Roopali; YANG, Jiang; MOSES, Marsha A. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 31, p. 5287, 2009.

RYU, Hyun-Wook *et al*. HDAC6 deacetylates p53 at lysines 381/382 and differentially coordinates p53-induced apoptosis. **Cancer Letters**, v. 391, p. 162-171, 2017.

SANBORN, J. Zachary *et al*. Double minute chromosomes in glioblastoma multiforme are revealed by precise reconstruction of oncogenic amplicons. **Cancer Research**, v. 73, n. 19, p. 6036-6045, 2013.

SASAI, K. *et al*. Targeted disruption of Aurora A causes abnormal mitotic spindle assembly, chromosome misalignment and embryonic lethality. **Oncogene**, v. 27, n. 29, p. 4122-4127, 2008.

SCHAFF, Lauren R.; MELLINGHOFF, Ingo K. Glioblastoma and other primary brain malignancies in adults: a review. **Jama**, v. 329, n. 7, p. 574-587, 2023.

SCHRECK, Karisa C.; GROSSMAN, Stuart A. Role of temozolomide in the treatment of cancers involving the central nervous system. **Oncology**, v. 32, n. 11, 2018.

SEIDEL, Carole *et al*. Histone deacetylase 6 in health and disease. **Epigenomics**, v. 7, n. 1, p. 103-118, 2015.

SERGI, Consolato M. Targeting the ‘garbage-bin’to fight cancer: HDAC6 inhibitor WT161 has an anti-tumor effect on osteosarcoma and synergistically interacts with 5-FU. **Bioscience Reports**, v. 41, n. 8, p. 245- 267, 2021.

SFERRA, Roberta *et al*. The possible prognostic role of histone deacetylase and transforming growth factor β/Smad signaling in high grade gliomas treated by radio-chemotherapy: A preliminary immunohistochemical study. **European journal of histochemistry: EJH**, v. 61, n. 2, p. 567-589, 2017.

SHAH, Manish A.; SCHWARTZ, Gary K. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 7, n. 8, p. 2168-2181, 2001.

SHAH, Manish A.; SCHWARTZ, Gary K. The relevance of drug sequence in combination chemotherapy. **Drug Resistance Updates**, v. 3, n. 6, p. 335-356, 2000.

SHERWIN, Delaney *et al.* A new layer of regulation of chromosomal passenger complex (CPC) translocation in budding yeast. **Molecular Biology of the Cell**, v. 34, n. 10, p. ar97, 2023.

SHI, Yehui *et al*. Romidepsin (FK228) regulates the expression of the immune checkpoint ligand PD-L1 and suppresses cellular immune functions in colon cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 70, p. 61-73, 2021.

SHICHIRI, Masayoshi *et al*. Genetic and epigenetic inactivation of mitotic checkpoint genes hBUB1 and hBUBR1 and their relationship to survival. **Cancer research**, v. 62, n. 1, p. 13-17, 2002.

SHIMIZU, Noriaki. Extrachromosomal double minutes and chromosomal homogeneously staining regions as probes for chromosome research. **Cytogenetic and genome research**, v. 124, n. 3-4, p. 312-326, 2009.

SHIN HJ, Baek KH, Jeon AH, Kim SJ, Jang KL, Sung YC, Kim CM, Lee CW. Inhibition of histone deacetylase activity increases chromosomal instability by the aberrant regulation of mitotic checkpoint activation. **Oncogene**, v. 22, n. 25, p. 3853-8, 2003.

SHOSHANI, Ofer *et al*. Chromothripsis drives the evolution of gene amplification in cancer. **Nature**, v. 591, n. 7848, p. 137-141, 2021.

SILK, Alain D. *et al*. Chromosome missegregation rate predicts whether aneuploidy will promote or suppress tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 44, p. E4134-E4141, 2013.

SINGH, Harinder *et al.* Disruption of lipid-raft localized Gαs/tubulin complexes by antidepressants: a unique feature of HDAC6 inhibitors, SSRI and tricyclic compounds. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 7, p. 1481-1491, 2018.

SINGH, Neha *et al*. Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma-a comprehensive review. **Cancer Drug Resistance**, v. 4, n. 1, p. 17, 2021.

SOOMRO, Shahid Hussain *et al*. Molecular biology of glioblastoma: Classification and mutational locations. **J. Pak. Med. Assoc**, v. 67, p. 1410-1414, 2017.

SRIVASTAVA, Siddhartha *et al*. A characterization of dendritic cells and their role in immunotherapy in glioblastoma: from preclinical studies to clinical trials. **Cancers**, v. 11, n. 4, p. 537, 2019.

STARK, Andreas M. *et al*. Expression of DNA mismatch repair proteins MLH1, MSH2, and

MSH6 in recurrent glioblastoma. **Neurological Research**, v. 37, n. 2, p. 95-105, 2015.

STEINHAEUSER, Kerstin *et al*. Deficiency of RITA results in multiple mitotic defects by affecting microtubule dynamics. **Oncogene**, v. 36, n. 15, p. 2146-2159, 2017.
STEPANENKO, A. A. *et al*. mTOR inhibitor temsirolimus and MEK1/2 inhibitor U0126 promote chromosomal instability and cell type-dependent phenotype changes of glioblastoma cells. **Gene**, v. 579, n. 1, p. 58-68, 2016.

STEPANENKO, A. A.; VASSETZKY, Y. S.; KAVSAN, V. M. Antagonistic functional duality of cancer genes. **Gene**, v. 529, n. 2, p. 199-207, 2013.

STEPANENKO, Aleksei *et al*. Step-wise and punctuated genome evolution drive phenotype changes of tumor cells. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 771, p. 56-69, 2015.

STEPANENKO, Alexey A.; KAVSAN, Vadym M. Karyotypically distinct U251, U373, and SNB19 glioma cell lines are of the same origin but have different drug treatment sensitivities. **Gene**, v. 540, n. 2, p. 263-265, 2014.

STETSON, L. C. *et al*. Proteins inform survival-based differences in patients with glioblastoma. **Neuro-Oncology Advances**, v. 2, n. 1, p. vdaa039, 2020.

STEVENS, F. E. *et al.* Histone deacetylase inhibitors induce mitotic slippage. **Oncogene**, v. 27, n. 10, p. 1345-1354, 2008.

STUPP *et al*. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med**, v. 352, n. 10, p. 987-96, 2005.

SUBAIEA, Gehad Mohammed *et al*. Non-coding RNAs (ncRNAs) and multidrug resistance in glioblastoma: Therapeutic challenges and opportunities. **Pathology-Research and Practice**, v. 253, p. 155022, 2024.

SUN, Jun *et al.* HDAC6 inhibitor WT161 induces apoptosis in retinoblastoma cells and synergistically interacts with cisplatin. **Translational Cancer Research**, v. 8, n. 8, p. 2759, 2019.

SUN, Jun *et al*. HDAC6 inhibitor WT161 performs anti-tumor effect on osteosarcoma and synergistically interacts with 5-FU. **Bioscience Reports**, v. 41, n. 4, p. BSR20203905, 2021.

SUN, Shuangshuang *et al*. Metabolic regulation of cytoskeleton functions by HDAC6-catalyzed α-tubulin lactylation. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 8377, 2024.

TAN, Aaron C. *et al*. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. **A Cancer Journal For Clinicians**, v. 70, n. 4, p. 299-312, 2020.

TAYLOR, Alison M. *et al*. Genomic and functional approaches to understanding cancer aneuploidy. **Cancer Cell**, v. 33, n. 4, p. 676-689. e3, 2018.

THE HUMAN METABOLOME DATABASE. **Metabolites**. [S. L.]: HMDB, 2013.

Disponível em: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0041368. Acessado em: 15 set. 2024.

THOMAS, Anish et al. Temozolomide in the era of precision medicine. **Cancer Research**, v. 77, n. 4, p. 823-826, 2017.

THOMPSON, Sarah L.; COMPTON, Duane A. Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 180, n. 4, p. 665-672, 2008.

TODO, Tomoki *et al*. Intratumoral oncolytic herpes virus G47Δ for residual or recurrent glioblastoma: a phase 2 trial. **Nature Medicine**, v. 28, n. 8, p. 1630-1639, 2022.

TORP, Sverre H.; SOLHEIM, Ole; SKJULSVIK, Anne J. The WHO 2021 Classification of Central Nervous System tumours: a practical update on what neurosurgeons need to know - a minireview. **Acta Neurochirurgica**, v. 164, n. 9, p. 2453-2464, 2022.

TORRE, Lindsey A. *et al*. Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 25, n. 1, p. 16-27, 2016.

TOUAT, M. *et al*. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. **Annals of Oncology**, v. 28, n. 7, p. 1457-1472, 2017.

TOWNER, Rheal A. *et al*. OKN-007 increases temozolomide (TMZ) sensitivity and suppresses TMZ-resistant glioblastoma (GBM) tumor growth. **Translational Oncology**, v. 12, n. 2, p. 320-335, 2019.

UBA, Abdullahi Ibrahim *et al*. Discovery of novel inhibitors of histone deacetylase 6: Structure-based virtual screening, molecular dynamics simulation, enzyme inhibition and cell viability assays. **Life Sciences**, v. 338, p. 122395, 2024.

UNRUHE-KNAUF, Britta; KNAUER, Shirley K. Analysis of HDACi-Induced Changes in Chromosomal Passenger Complex Localization. **HDAC/HAT Function Assessment and Inhibitor Development: Methods and Protocols**, p. 47-59, 2017.

URDICIAIN, Alejandro *et al*. Tubastatin A, an inhibitor of HDAC6, enhances temozolomide-induced apoptosis and reverses the malignant phenotype of glioblastoma cells. **International Journal of Oncology**, v. 54, n. 5, p. 1797-1808, 2019.

VITALE, Ilio *et al*. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 6, p. 385-392, 2011.

VOLLMANN-ZWERENZ, Arabel *et al*. Tumor cell invasion in glioblastoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, p. 1932, 2020.

WALTER, Fiona M. *et al*. Missed opportunities for diagnosing brain tumours in primary care: a qualitative study of patient experiences. **British Journal of General Practice**, v. 69, n. 681, p. e224-e235, 2019.

WANG, Xianghong *et al*. Correlation of defective mitotic checkpoint with aberrantly reduced

expression of MAD2 protein in nasopharyngeal carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 12, p. 2293-2297, 2000.

WANG, Xianghong *et al*. Significance of MAD2 expression to mitotic checkpoint control in ovarian cancer cells. **Cancer Research**, v. 62, n. 6, p. 1662-1668, 2002.

WANG, Zhifei *et al*. Tubastatin A, an HDAC6 inhibitor, alleviates stroke-induced brain infarction and functional deficits: potential roles of α-tubulin acetylation and FGF-21 up-regulation. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2016.

WANG, Zhihao *et al*. HDAC6 promotes cell proliferation and confers resistance to temozolomide in glioblastoma. **Cancer Letters**, v. 379, n. 1, p. 134-142, 2016.

WEEDEN, Clare E. *et al*. Impact of risk factors on early cancer evolution. **Cell**, v. 186, n. 8, p. 1541-1563, 2023.

WELCH, Danny R.; HURST, Douglas R. Defining the hallmarks of metastasis. **Cancer Research**, v. 79, n. 12, p. 3011-3027, 2019.

WU, Yi-Wen *et al*. A novel dual HDAC6 and tubulin inhibitor, MPT0B451, displays anti-tumor ability in human cancer cells in vitro and in vivo. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 205, 2018.

YAMAMOTO, Yutaro *et al*. Intracellular cholesterol level regulates sensitivity of glioblastoma cells against temozolomide-induced cell death by modulation of caspase-8 activation via death receptor 5-accumulation and activation in the plasma membrane lipid raft. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 495, n. 1, p. 1292-1299, 2018.

YAN, Yuanliang *et al*. Suppression of ITPKB degradation by Trim25 confers TMZ resistance in glioblastoma through ROS homeostasis. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, p. 58, 2024.

YANG, Wei *et al*. Sortilin promotes glioblastoma invasion and mesenchymal transition through GSK-3β/β-catenin/twist pathway. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 3, p. 1-15, 2019.

YANO, Mitsutake *et al*. Clinicopathological correlation of ARID1A status with HDAC6 and its related factors in ovarian clear cell carcinoma. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

YANOVICH-ARAD, Gali *et al*. Proteogenomics of glioblastoma associates molecular patterns with survival. **Cell Reports**, v. 34, n. 9, 2021.

YASINJAN, Feroza *et al*. Immunotherapy: a promising approach for glioma treatment. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1255611, 2023.

YE, Pei-Chen *et al*. A novel HDAC6 inhibitor interferes microtubule dynamics and spindle assembly checkpoint and sensitizes cisplatin-induced apoptosis in castration-resistant prostate cancer. **The Prostate**, v. 84, n. 6, p. 605-619, 2024.

YU, Bo *et al*. The synergistic anticancer effect of the bromodomain inhibitor OTX015 and histone deacetylase 6 inhibitor WT-161 in osteosarcoma. **Cancer Cell International**, v. 22, n. 1, p. 1-13, 2022.

YU, Hanming *et al.* A narrative review of the role of HDAC6 in idiopathic pulmonary fibrosis. **Journal of Thoracic Disease**, v. 16, n. 1, p. 688, 2023.

YU, Xiaoxuan *et al*. Involvement of p53 Acetylation in Growth Suppression of Cutaneous T-Cell Lymphomas Induced by HDAC Inhibition. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 140, n. 10, p. 2009-2022. e4, 2020.

YU, Yawen *et al*. Synthesis and characterization of a series of temozolomide esters and its anti-glioma study. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 110, n. 10, p. 3431-3438, 2021.

YUAN, L. L. *et al*. Effects of downregulation of HDAC6 expression on cell cycle, proliferation and migration of laryngeal squamous cell carcinoma. Zhonghua Zhong liu za zhi. **Chinese Journal of Oncology**, v. 34, n. 6, p. 430-435, 2012.

ZASADIL, Lauren M. *et al*. Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 229, p. 229ra43-229ra43, 2014.

Zhang Y, Li N, Caron C, *et al*. HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. **EMBO J**, v. 22, n. 5, p. 1168–1179, 2003.

ZHANG, Cheng-Zhong *et al*. Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. **Nature**, v. 522, n. 7555, p. 179-184, 2015.

ZHANG, Hui *et al*. Histone deacetylases function as novel potential therapeutic targets for cancer. **Hepatology Research**, v. 47, n. 2, p. 149-159, 2017.

ZHAO, Jiaxin *et al*. High expression of vimentin is associated with progression and a poor outcome in glioblastoma. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 26, n. 5, p. 337-344, 2018.

ZHENG, Yi-Chao *et al*. Curriculum vitae of HDAC6 in solid tumors. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 230, p. 123219, 2023.

APÊNDICE – DADOS SUPLEMENTARES

Tabela 1 – Metabólitos expressos entre as frações intra e extracelular das células T98 tratadas com DMSO.

Compound	p	p (Corr)	FC (abs)	Regulation	Abund Diff (Raw)	Abund Diff (Log2)	[Extra, DMSO] (normalized)	[Intra, DMSO] (normalized)
Isodonal	6,55E-02	2,91E+00	305563.6	up	305562.6	18.221.107	18.221.113	0.0
N-(1-Deoxy-1-fructosyl)leucine	6,23E-01	1,25E+01	971592.44	up	971591.44	1.988.999	19.889.992	0.0
6,8a-Seco-6,8a-deoxy-5-oxoavermectin ''2a'' aglycone	2,27E+00	6,20E-02	893165.5	down	-893164.5	-19.768.566	0.0	19.768.568
4-Hydroxy-2,6-dimethylaniline	6,02E+00	1,25E+01	24.159.688	up	24.158.688	14.560.254	14.560.314	0.0
Mesaconitine	1,20E+01	2,09E+01	53.964.383	up	53.963.383	15.719.693	1.571.972	0.0
2-Hydroxyestradiol	0.0010070	0.0014918	436863.22	up	436862.22	18.736.818	18.736.822	0.0
Netilmicin	3,92E+00	9,80E-01	18.369.402	up	18.368.402	14.164.939	14.165.017	0.0
N-Acetylserine	1,30E+01	2,17E+02	91396.47	up	91395.47	16.479.836	1.647.985	0.0
Phenolsulfonphthalein	1,53E-02	1,02E+00	36983.52	up	36982.52	15.174.556	15.174.595	0.0
De-O-methylsimmondsin	2,02E+00	6,20E-02	149951.03	up	149950.03	17.194.122	17.194.132	0.0
Pirimicarb	2,58E-02	5,16E-01	26.010.082	down	-26.009.082	-14.666.728	0.0	14.666.783
Arg Ser Arg	5,49E+00	1,25E+01	36.165.785	up	36.164.785	15.142.298	15.142.338	0.0
Spicamycin	3,73E-01	2,13E+00	5603846.0	down	-5603845.0	-22.417.986	0.0	22.417.986
Cymarine	2,31E+00	6,20E-02	57774.1	down	-57773.1	-1.581.811	0.0	15.818.135
N-(1-Deoxy-1-fructosyl)phenylalanine	5,72E-01	1,25E+01	374630.3	up	374629.3	18.515.104	18.515.108	0.0
24-Acetyl- 25-cinnamoylvulgaroside	1,44E-01	1,02E+00	9513818.0	down	-9513817.0	-23.181.593	0.0	23.181.593
Trolamine	1,38E+03	2,21E+02	87849.74	up	87848.74	16.422.733	1.642.275	0.0
Sphinganine	8,54E-02	3,41E+00	57.376.914	down	-57.375.914	-15.808.158	0.0	15.808.183
Semilepidinoside B	8,03E+00	1,50E+01	240620.81	up	240619.81	17.876.396	17.876.402	0.0
Streptidine	8,26E-01	1,50E+01	33.693.242	up	33.692.242	15.040.129	15.040.172	0.0
N-(1-Deoxy-1-fructosyl)valine	2,32E+00	6,20E-02	199945.22	up	199944.22	17.609.238	17.609.245	0.0
Met-Leu-OH	1,01E-01	1,01E+00	415474.4	up	415473.4	18.664.396	186.644	0.0
Diisopropyl adipate	1,14E-02	4,54E-01	22.876.123	down	-22.875.123	-14.481.492	0.0	14.481.555
GSSG / L-Gluthathione (oxidized)	5,25E-01	2,63E-01	49.739.758	down	-49.738.758	-15.602.083	0.0	15.602.112
PE-Cer(d14:1(4E)/21:0)	3,69E+03	5,68E+02	148515.89	down	-148514.89	-17.180.248	0.0	17.180.258
1,4-Methylimidazoleacetic acid	4,74E-02	6,32E-02	18.930.846	down	-18.929.846	-14.208.375	0.0	14.208.451
Xestoaminol C	2,09E+00	6,20E-02	15.722.887	down	-15.721.887	-13.940.487	0.0	13.940.578

Fonte: Do autor.

Tabela 2 – Metabólitos expressos entre as frações intra e extracelular das células T98G tratadas com 2 µM de WT161.

Compound	p	p (Corr)	FC (abs)	Regulation	Abund Diff (Raw)	Abund Diff (Log2)	[Extra, 2 UM] (normalized)	[Intra, 2 UM] (normalized)
Isodonal	6,08E-01	1,22E+01	321564.44	up	321563.44	18.294.744	18.294.748	0.0
N-(1-Deoxy-1-fructosyl)leucine	4,87E-04	5,11E-02	1343358.0	up	1343357.0	2.035.741	20.357.412	0.0
6,8a-Seco-6,8a-deoxy-5-oxoavermectin ''2a'' aglycone	9,70E+00	1,80E+02	1287101.5	down	-1287100.5	-20.295.692	0.0	20.295.694
4-Hydroxy-2,6-dimethylaniline	5,86E-02	2,46E-01	31.995.807	up	31.994.807	1.496.555	14.965.595	0.0
6-Hydroxyfluvastatin	4,96E+01	1,04E+03	19.875.674	up	19.874.674	14.278.644	14.278.716	0.0
N-Acetylserine	6,25E-02	1,88E+00	170719.64	up	170718.64	17.381.262	1.738.127	0.0
Ginkgotoxin	2,04E-01	7,13E-02	79676.47	up	79675.47	16.281.849	16.281.866	0.0
Isoamyl p-anisate	9,88E+00	1,80E+02	283060.0	up	283059.0	18.110.743	18.110.748	0.0
De-O-methylsimmondsin	8,56E-04	7,17E-03	204775.89	up	204774.89	17.643.679	17.643.686	0.0
Triphyllin B	3,48E+01	5,85E+02	81389.73	up	81388.73	16.312.542	1.631.256	0.0
Arg Ser Arg	5,48E-03	2,46E-01	44344.9	up	44343.9	15.436.448	154.364.805	0.0
Spicamycin	3,23E+02	4,68E+03	884491.06	down	-884490.06	-19.754.486	0.0	19.754.488
b-D-Glucopyranosiduronic acid, 4-[[4-(4-fluorophenyl)-3-piperidinyl]methoxy]-2-methoxyphenyl, (3S-tr	1,06E-01	4,04E-02	56.006.434	up	56.005.434	15.773.279	15.773.305	0.0
Hyaluronic acid	1,38E-03	8,30E-03	44308.36	up	44307.36	15.435.259	15.435.291	0.0
N-(1-Deoxy-1-fructosyl)phenylalanine	1,02E-02	7,17E-03	606619.4	up	606618.4	1.921.043	19.210.432	0.0
2-Amino-3-methyl-1-butanol	4,42E-02	2,32E-01	17.769.729	up	17.768.729	14.117.053	14.117.134	0.0
24-Acetyl- 25-cinnamoylvulgaroside	2,86E+02	4,28E+03	596774.6	down	-596773.6	-19.186.825	0.0	19.186.827
PI(20:1(11Z)/0:0)	1,99E+02	3,48E+02	2576102.8	down	-2576101.8	-21.296.759	0.0	21.296.759
Semilepidinoside B	1,86E+00	5,20E-01	329427.03	up	329426.03	18.329.596	183.296	0.0
N-(1-Deoxy-1-fructosyl)valine	3,46E-04	4,84E-03	261425.5	up	261424.5	17.996.035	1.799.604	0.0
Fortimicin A	2,28E-01	7,38E-02	15.454.119	down	-15.453.119	-1.391.561	0.0	13.915.704
Ornaline	6,27E+02	1,01E+01	66.214.875	up	66.213.875	16.014.847	16.014.868	0.0
Voriconazole	4,62E-04	1,94E-02	20775.3	up	20774.3	14.342.512	14.342.582	0.0
2alpha,7beta,15beta,18-tetraacetoxy-cholest-5-en-3alpha-ol	6,93E+02	1,08E+04	244696.31	down	-244695.31	-17.900.627	0.0	17.900.633
MG(18:0/0:0/0:0)[rac]	2,70E+00	6,67E+00	75155.14	down	-75154.14	-16.197.565	0.0	16.197.584
1-Monopalmitin	3,23E+01	7,53E+00	111516.32	down	-111515.32	-16.766.882	0.0	16.766.895
Antibiotic TA	1,21E-03	2,53E-02	31.721.107	down	-31.720.107	-1.495.311	0.0	149.531.555
1,4-Methylimidazoleacetic acid	2,77E+00	7,26E-01	12.953.442	down	-12.952.442	-13.660.936	0.0	13.661.048
Gln Arg Phe	3,50E+01	7,73E+01	70951.14	down	-70950.14	-16.114.517	0.0	16.114.538

Fonte: Do autor.

Tabela 3 – Metabólitos expressos entre as frações intra e extracelular das células T98G tratadas com 4 µM de WT161.

Compound	p	p (Corr)	FC (abs)	Regulation	Abund Diff (Raw)	Abund Diff (Log2)	[Extra, 4 UM] (normalized)	[Intra, 4 UM] (normalized)
Isodonal	9,96E-03	3,88E-03	530829.5	up	530828.5	19.017.887	19.017.889	0.0
N-(1-Deoxy-1-fructosyl)leucine	1,36E-03	3,37E-02	1426382.8	up	1426381.8	2.044.393	2.044.393	0.0
4-Hydroxy-2,6-dimethylaniline	2,35E-02	1,53E-01	32.459.559	up	32.458.559	14.986.311	14.986.356	0.0
N-Acetylserine	5,56E-02	2,49E-01	196567.23	up	196566.23	17.584.656	17.584.663	0.0
Ginkgotoxin	4,18E-03	5,43E-02	79835.58	up	79834.58	16.284.725	16.284.744	0.0
Isoamyl p-anisate	1,16E+02	2,15E+02	274110.44	up	274109.44	18.064.392	18.064.398	0.0
De-O-methylsimmondsin	5,74E-02	2,49E-01	222190.9	up	222189.9	17.761.435	1.776.144	0.0
Pirimicarb	5,85E-01	1,63E-01	25.234.883	up	25.233.883	14.623.075	14.623.132	0.0
Triphyllin B	2,03E+01	4,17E+00	196746.9	up	196745.9	17.585.974	17.585.981	0.0
Triphyllin A	1,25E+00	2,88E+01	22.323.473	up	22.322.473	14.446.209	14.446.274	0.0
Arg Ser Arg	2,23E-03	1,53E-01	45651.83	up	45650.83	154.783.535	15.478.385	0.0
6-Hydroxytricetin 6,7,3',5'-tetramethyl eter 5-robinobioside	1,21E+00	2,96E-01	40392.39	up	40391.39	1.530.176	15.301.796	0.0
Hyaluronic acid	2,85E-01	8,72E-02	44733.44	up	44732.44	15.449.034	15.449.066	0.0
Syringolin A	1,76E+01	3,81E+01	32843.12	up	32842.12	1.500.326	15.003.304	0.0
N-(1-Deoxy-1-fructosyl)phenylalanine	1,73E-03	3,37E-02	691439.0	up	691438.0	1.939.924	19.399.242	0.0
2-Amino-3-methyl-1-butanol	6,77E-02	1,76E+00	21527.16	up	21526.16	14.393.804	1.439.387	0.0
2,2,4-Trimethyl-3-(4-fluorophenyl)-2H-1-benzopyran-7-ol acetate	9,25E+00	1,80E+02	1184202.0	up	1184201.0	20.175.482	20.175.484	0.0
Trolamine	1,81E-02	6,43E-02	134871.27	up	134870.27	17.041.212	17.041.224	0.0
MG(18:0/0:0/0:0)[rac]	1,57E+02	2,35E+03	43846.92	down	-43845.92	-15.420.155	0.0	15.420.188
19-norcholestanol	2,91E-01	8,72E-02	13.293.399	down	-13.292.399	-13.698.314	0.0	13.698.422
PE-Cer(d14:1(4E)/21:0)	1,16E+02	1,81E+03	62.608.363	down	-62.607.363	-15.934.045	0.0	15.934.068
Arachidonic Acid methyl ester-d8	1,55E+02	2,74E+02	31.751.254	down	-31.750.254	-1.495.448	0.0	14.954.526
PS(O-18:0/16:0)	4,79E+02	8,11E+02	501578.25	down	-501577.25	-18.936.111	0.0	18.936.115
Hexadecyl Acetyl Glycerol	6,39E+02	1,04E+03	31378.35	down	-31377.35	-14.937.436	0.0	14.937.482
Ethohexadiol	2,83E-03	1,58E-01	10.614.928	down	-10.613.928	-13.373.671	0.0	13.373.807
(2R*,3R*)-1,2,3-Butanetriol	1,09E-03	1,06E-01	12.273.147	down	-12.272.147	-135.831	0.0	13.583.218

Fonte: Do autor.

ANEXO - MANUSCRITO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO
À REVISTA "*INVESTIGATIONAL NEW DRUGS"*

HDAC6 inhibition through WT161 synergizes with temozolomide, induces apoptosis, reduces cell motility, and decreases β-catenin levels in glioblastoma cells

Leilane Sales Oliveira (OLIVEIRA, LS)[1,5]; João Marcos Oliveira-Silva (OLIVEIRA-SILVA, JM)[1,5], Hebreia Oliveira Almeida-Souza (ALMEIDA-SOUZA, HO)[2]; Mario Machado Martins (MARTINS, MM)[2], Carolina Berraut Chiminazo (CHIMINAZO, CB)[1]; Rafael Fonseca Miranda (MIRANDA, RF)[3]; Carlos Vinicius Expedito de Souza (SOUZA, CVE)[1]; Alexandre Ferro Aissa (AISSA, AF)[4,5]; Luciana Machado Bastos (BASTOS, ML)[2]; Marisa Ionta (IONTA, M)[3]; Graziela Domingues de Almeida Lima (LIMA, GDA)[3,5]; Angel Mauricio Castro-Gamero (CASTRO-GAMERO, AM)[1,5,*].

Affiliations:

[1]Human Genetics Laboratory, Institute of Natural Sciences, Federal University of Alfenas (UNIFAL-MG), Alfenas 37130-001, MG, Brazil.

[2]Laboratory of Nanobiotechnology Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia 38400-902, MG, Brazil

[3]Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Alfenas (UNIFAL-MG), Alfenas 37130-001, MG, Brazil.

[4]Division of Genetics, Department of Morphology and Genetics, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

[5]Postgraduate Program in Biosciences Applied to Health (PPGB), Federal University of Alfenas (UNIFAL-MG), Alfenas 37130-001, MG, Brazil.

***Corresponding author:** Angel Mauricio Castro-Gamero

E-mail: mauricio.castro@unifal-mg.edu.br / amcgen@gmail.com

Human Genetics Laboratory, Institute of Natural Sciences, Federal University of Alfenas (UNIFAL-MG), Alfenas 37130-001, MG, Brazil

Fone number: +55 35 37019772

ORCID Numbers:

Hebreia Oliveira Almeida-Souza (ORCID 0009-0007-6319-2598)

Mario Machado Martins (ORCID 0000-0001-7381-2788)

Alexandre Ferro Aissa (ORCID 0000-0002-0759-4011)

Luciana Machado Bastos (ORCID 0000-0002-6637-0149)

Marisa Ionta (ORCID 0000-0001-8796-1426)

Graziela Domingues de Almeida Lima (ORCID 0000-0001-5954-3606)

Angel Mauricio Castro-Gamero (ORCID 0000-0002-3857-3862)

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) accounts for 70% of all primary malignancies of the central nervous system. Current treatment strategies involve surgery followed by chemotherapy with temozolomide (TMZ); however, the median survival after treatment is approximately 15 months. Many GBM cases develop resistance to TMZ, resulting in a poor prognosis for patients, which underscores the urgent need for novel therapeutic approaches. One promising avenue is the inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6), an enzyme that deacetylates α-tubulin and is increasingly recognized as a potential pharmacological target in cancer. In GBM specifically, HDAC6 overexpression has been linked to poor prognosis and chemoresistance. In this study, we demonstrate that HDAC6 protein levels are elevated in GBM and evaluate the effects of the novel selective HDAC6 inhibitor, WT161, on U251, U87, and T98G cells to assess its potential to revert the malignant phenotype. Our results show a significant increase in acetylated α-tubulin levels, suppression of cell growth, cell cycle arrest at the G2/M phase, and decreased clonogenicity of 2D-cultured GBM cells. Additionally, WT161 acted synergistically with TMZ, induced apoptosis and enhanced TMZ-induced apoptosis. Notably, HDAC6 inhibition resulted in reduced cell migration and invasion, associated with decreased β-catenin levels. When cultured in 3D conditions, WT161-treated T98G spheroids were sensitized to TMZ and exhibited reduced migration. Finally, HDAC6 inhibition altered the metabolome, particularly affecting metabolites associated with lipid peroxidation. In conclusion, our data reveal, for the first time, the efficacy of the selective HDAC6 inhibitor WT161 in a preclinical GBM setting.

Keywords: Glioblastoma; HDAC6 inhibition; tumor progression, TMZ resistance, metabolome

Highlights:

- HDAC6 inhibition by WT161 decreased the growth of GBM cells, induced cell cycle arrest at the G2/M phase, and reduced clonogenicity.
- WT161 overcame temozolomide resistance, induced apoptosis, and enhanced TMZ-induced apoptosis.
- HDAC6 inhibition decreased cell migration and invasion, in association with decreased β-catenin levels.
- WT161-treated T98G spheroids were sensitized to TMZ and exhibited reduced migration.
- HDAC6 inhibition altered the metabolome, particularly affecting metabolites associated with lipid peroxidation.

1. INTRODUCTION

Glioblastoma (GBM) is the most common and aggressive type of malignant brain tumor and one of the deadliest tumors, with a median overall survival (mOS) ranging from 8 to 48 months [1]. Currently, maximum-safe tumor resection, in combination with radiotherapy (RT) and treatment with the alkylant prodrug temozolomide (TMZ), represents the standard of care in patients younger than 70 years of age with newly diagnosed GBM [2] . Despite incremental advances over the last 40 years in the therapeutic approach to GBM, phase III clinical trials for glioblastoma conducted over the last 2 decades showed that the majority of trials did not result in a significant improvement in OS [1].

Histone deacetylases (HDACs) are primarily involved in the deacetylation of histones [3], but some HDACs, such as HDAC6 can also affect predominantly the function cytoplasmic nonhistone proteins, becoming key regulators of cell signaling pathways[4], including cellular proliferation ([5], cell cycle progression [6], cell motility [7], apoptosis [8], and aggresome formation [9] . The aberrant expressions and abnormal functions of HDAC6 are intimately associated with various human diseases, including cancer [4].

HDAC6 is overexpressed in GBM tissues and cell lines, and their deacetylase function promotes cell proliferation and (3D) GBM spheroid formation [10]. Importantly, HDAC6 sustains radio- and chemoresistance of GBM cells [10-12] and their overexpression remarkably impairs TMZ-induced apoptosis [10]. For these reasons, many authors support that inhibition of HDAC6 is a promising strategy for GBM treatment [10, 13-15].

WT161 is a recently discovered HDAC6 inhibitor that shows antitumor effects on myeloma multiple [16, 17] retinoblastoma [18], breast cancer [19] , and osteosarcoma [20, 21]. Moreover, WT161 shows synergistic antitumor effects when combined with bortezomib [17, 19], cisplatin [18] , 5-Fluorouracil (5-FU) [20] . In this study, we sought to understand the role of WT161 in GBM and we found that WT161 suppressed the 2D- and 3D-cell growth, induces cell cycle arrest in the G2/M phase, enhanced TMZ-induced apoptosis, and synergistically interacted with TMZ in GBM. Moreover, HDAC6 inhibition caused impaired motility and profound metabolomic changes.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 UALCAN and HPA analysis

UALCAN database (http://ualcan.path.uab.edu) contains 31 types of cancer patients with clinical and RNA-seq data. UALCAN is an interactive portal, which can deeply analyse the relationship between the expression level of target genes in TCGA and the clinical data of patients. The screening conditions set in this study are: “Gene: HDAC6”; “TCGA dataset: Glioblastoma multiforme”; “Expression analysis: Normal vs. Primary tumor”; “HDAC6 promoter methylation profile: Normal vs. Primary tumor”. For protein analysis, we explored “Gene: HDAC6” into “CPTAC dataset: Glioblastoma multiforme”. Additionally, changes in the protein expression levels were evaluated by immunohistochemical staining results taking advantage of the Human Protein Atlas (HPA, https://www.proteinatlas.org/). HAP is a research program initiated in 2003 to map all the human proteins in cells, tissues and organs using an integration of various omics technologies, including antibody-based imaging, mass spectrometry-based proteomics, transcriptomics and systems biology. In this study, HPA was leveraged to identify protein expression patterns and to perform immunohistochemistry image a direct comparison of the HDAC6

protein expression between normal and glioblastoma tissues. Antibodies HPA003714, HPA026321, and CAB004236 were used in the staining.

2.2 Cell Lines and cell culture conditions

U251 and U87 GBM cell lines were provided from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) and T98G human GBM cell line was obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (Rio de Janeiro, Brazil). Cells were maintained cultured under monolayer or two-dimensional (2D) conditions in 25 cm² bottles using DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, Gibco) containing 1% streptomycin (100 mg/mL) and penicillin (60 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 10% fetal bovine serum (FBS, Cultilab, Campinas, SP, Brazil; pH 7.2 - 7.4) and were incubated in a CO2 incubator with 5% CO2 at 37ºC. To study the effects of drugs on cells cultured in three dimensions (3D), we developed the multicellular tumor spheroids (MCTs) according protocol proposed by Friedrich et al. (2009) [22] with some modifications. T98G cells were cultured under normal monolayer conditions in 25 cm² bottles until they reached approximately 90% confluence. A cell suspension was prepared at a concentration of 700 cells in 200µL and then seeded in 96-well plates, previously coated with 1.5% agarose. These plates were kept immobile in a humid atmosphere containing 5% CO2 at 37ºC for 72 h until the formation of spheroids. In this procedure, only one MCT is formed per well, and for experiments, only MCTs with a diameter above 200 µm were used. The first image of each spheroid was obtained with the Axio Cam MRc image capture system (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), using the 4x objective, 96 h after the inoculated cells (Day 0).

2.3 Reagents

WT161 was purchased from MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA, Cat# HY-100871). WT161 was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Cat# 472301) at 5 mM. TMZ (Sigma-Aldrich, Cat# PHR1437) was also diluted in DMSO at 200 mM and 100 mM stock concentrations, respectively. Stock solutions were kept at − 20 °C and dissolved in culture medium immediately before the experiments at a final DMSO concentration of 1%.

2.4 Growth inhibition assays

Growth inhibition was determined by two assays: MTT assay for 2D cultures and measuring of spheroid area for 3D cultures. For the MTT assay, each GBM cell line was seeded at its respective density (7×10^3 CHL-1, 4×10^3 SK-MEL-147, and 10×10^3 WM1366) in 96-well culture plates for 18-24h. Then, the cells were treated independently with serial doses of WT161 and TMZ for 48 h. An equal volume of DMSO was added as a solvent control. After that, 0.45 mg/mL of Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT, Sigma-Aldrich, Cat# M5655) solution was added to each well and incubated for 4 h. A microplate reader (iMark™, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used to capture the absorbance at 570 nm from each well. Cell viability percentages of the treated groups were compared with the control group, which was considered 100% viability. Posteriorly, IC50 (the drug concentration that inhibits cell proliferation by 50 % compared with controls) was calculated using CalcuSyn® software (Biosoft, Ferguson, Missouri, USA). In all cases, three independent experiments in triplicate were performed.

For the 3D growth analysis of U251 and T98G cells, MCTs at day 0 were treated with TMZ or WT161. The treatments were administered by replacing 50% (100 µL) of the culture medium in each well with fresh medium containing the drugs at 2x concentration. Microscopic images were captured every 72 hours, with a culture medium change at each interval, until the 6th day. The area occupied by the spheroids at each time point was measured in µm² using ZEN software version 2.6 (Carl Zeiss). Three independent experiments were conducted, each in quintuplicate.

2.5 Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was performed according to Lamartine-Hanemann et al. (2020) [23]. Briefly, cells were seeded into 35 mm Petri plates at a density of 2 $\times 10^5$ cells/plate and cultured by 24 h. Then, U251, U87, and T98G cells were treated with 15µM, 30µM, and 4µM WT161 (IC_{50} concentrations of WT161) for 24 h. Cells were collected, fixed with 75% ethanol at 4°C overnight, rinsed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS), and homogenized in dye solution [PBS containing 90 µg.mL−1 propidium iodide (PI) and 1,5 mg. ML−1 RNAase]. DNA was quantified 1 h after staining. Analysis was performed using a Guava easyCyte 8HT (Hayward, CA, USA). Results are presented as mean ± SD of three independent experiments.

2.6 Clonogenic Assay

The clonogenic assay was carried out according to Franken et al. (2006) [24]. Briefly, GBM cells were seeded into 6-well plates at a density of 300 cells/well. After 24h, the cells were treated independently for 48 h with WT161. After that, the medium with the drug was removed, and the cells were maintained for 7-10 days in a medium with no drug. Then, the cells were fixed with methanol for 20 min, colored with Giemsa for 5 min, and the colonies containing more than 50 cells were counted. In all cases, three independent experiments in triplicate were performed.

2.7 Combination drug analysis

The interactions between WT161 with TMZ were analyzed using CalcuSyn® (Biosoft, Ferguson, Missouri, USA). For the analyses of combinations, increasing concentrations of each drug were used according to their equipotent molar ratio for each cell line through three different exposure schedules: simultaneous (TMZ+WT161), sequential with TMZ before WT161 (TMZ→WT161), and sequential with WT161 before TMZ (WT161→TMZ). For the 2D combination assays, simultaneous exposure TMZ+WT161 was conducted continuously for 48 hours. For sequential exposure, each drug was administered for 24 hours: first TMZ followed by WT161, and vice versa, for all cell lines. We used molar ratios proportional to IC50 values as 1:40 (WT161:TMZ) for U251, 1:25 (WT161:TMZ) for U87, and 1:750 (WT161:TMZ) for T98G. Combination indexes (CIs) were generated for each set of combinations and synergistic (CI < 1), additive (CI = 1), or antagonistic effects (CI > 1) using the Chou-Talalay method based on the median-effect equation [25] with CalcuSyn® software. The concentration reduction index (DRI) represents the measure of how much the concentration of each drug in a synergistic combination may be reduced at a given effect level compared with the concentration of each drug alone [25, 26]. For 3D combination assays, we used simultaneous treatment with TMZ and WT161 (TMZ+WT161), respecting the molar ratios previously defined in the 2D assays in both U252 and T98G spheroids. Thus, U251 MTCs were treated with 10

μM and 400 μM of WT161 and TMZ, respectively (1:40); and T98G MTCs were treated with 2 μM and 1500 μM of WT161 and TMZ, respectively (1:750).

2.8 Apoptosis detection

Apoptosis was quantified using a FITC Annexin V Apoptosis Detection kit I (Cat# 556547; BD Pharmigen; BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol. To verify whether the synergism found between WT161 and TMZ was associated with an increase in apoptosis, we used the lowest concentrations of both drugs, which when combined, demonstrated a synergistic interaction using Chou-Talalay method. Thus, U251, U87 and T98G cells were exposed to 10μM, 15μM and 2μM of WT161; and 400μM, 400μM and 1500μM of TMZ, respectively. DMSO controls were used in all experiments. After 48 h at 37°C of incubation, cells were collected and washed twice with PBS. Then, cells were resuspended in 500 μL 1x binding buffer (BD Biosciences Pharmigen, San Jose, CA, USA), and 3.5 μL of FITC and 3.5 μL of propidium iodide (PI) were added to each tube and incubated for 30 min at room temperature in the dark before measurement by flow cytometry (Guava easyCyte 8HT, Merck Millipore, Burlington, MA, USA). In all cases, three independent experiments in triplicate were performed.

2.9 2D and 3D Migration Assays

The wound-healing assay for 2D cultured cell was performed according to the protocol of Martinotti & E. Ranzato (2020) [27]. Briefly, GBM cells were seeded at 5.0×10^4 cells per 1000 μL in 24-well plates. Cells were kept in incubation until they reached above 90% confluence. After the incubation period, the culture medium was removed, the wound (scratch) was performed using a 10μL tip, and the medium with 1% FBS containing 2 μM or 4 μM of WT161 was added. Immediately after treatment, two fields per well were photographed, thus determining time zero (0h). Subsequently, the cells were incubated for 24 hours in the presence of the treatment, and new images were acquired. The images were evaluated using the ImageJ software [28], measuring the scratch area compared with the control (time zero).

The migration assay for 3D spheroids was performed according to the protocol by Vinci et al. (2013) [29]. Briefly, after the 4th day of MCTs formation from T98G cells, the spheroids were transferred for a 96-well plate coated with 0,1% gelatin (Sigma, CAS 900-70-8 G9391). Subsequently, DMEM/F12 medium containing 2 μM or 4 μM of WT161 was added. Immediately after treatment, two fields per well were photographed, thus determining time zero (0h). Posteriorly, MCTs were incubated at 37° and 5% CO_2 for 72 hours in the presence of the treatment. The migration of cells was assessed after 24, 48, and 72 h post treatment. In order to reduce proliferation that can confound the result analysis, the experiments were carried out in culture medium containing 2% FBS. Tridimensional structures were imaged using an inverted microscope coupled with system Axio Cam MRc (Carl Zeiss, Göttingen, Germany). The total area migrated was measured by software AxioVision 3.1 (Carl Zeiss). The migration index was quantified using the ImageJ software by measuring the area of cells migrating outwards the 3D structure divided by the corresponding area at 0 h [final area migrated / initial area migrated].

2.10 Invasion assay

Cell invasion assays were performed at 37°C for 24h using 8 μm pore-sized transwell chambers (Corning, Cat# 3422) coated with 60 μL of Geltrex™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA; Cat# A1413202). Cells

(2×10^4) suspended in 200 µL of serum-free medium or serum-free medium plus WT161 were seeded into the upper chamber, and 600 µL of DMEM/F12 medium supplemented with 10% FBS were added in the lower chamber. After 24h, the cells on the filter side of the upper chamber were removed using a cotton swab. The migrated cells attached to the bottom of the chamber were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min and stained for 20 min with crystal violet. The number of fixed cells was observed under a microscope. Finally, 5 fields/chamber were selected for cell counting at 20× magnification. The area of every field was counted by ImageJ [28].

2.11 Western blot analysis

Total proteins were extracted with RIPA buffer (150mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % sodium deoxycholate acid in 50 mM Tris-HCL, pH 7.5) containing protease inhibitors (Sigma-Aldrich Cat# P8340) and phosphatases (1 mM sodium orthovanadate – Sigma-Aldrich Cat# S6508). After centrifugation at 12,000 × g for 10 min, the supernatant was collected. The aliquots were stored at -80º C. Protein quantification was performed using the BCA (Bicinchoninic Acid) method with the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific).

The samples were diluted in 4x sample buffer (0.5 M Tris – pH 6.8, 40% glycerol, 10% SDS, 1% bromophenol blue, and 1% 2-mercaptoethanol in ddH2O) and denatured for 5 minutes at 100ºC. Protein fractionation (30 µg) was performed on a 12% polyacrylamide gel (2.5 hours at 100V). The proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham, GE HealthCare Chicago, IL, USA) for 2 h at 200 mA in transfer buffer (0.025 M Tris, 0.192 M glycine, and 20% methanol in distilled water) and stained in Ponceau solution 0.5% for 3 min to check the efficiency of the transfer process. Then, they were washed 3 times in TBS (Tris-buffered saline) at 0.02 M (10 min each wash). The blockade was performed with 0.02 M TBS containing 5% Molico® skimmed milk powder (Nestle, São Paulo, SP, Brazil) and 0.05% tween 20 (Sigma-Aldrich) for 1 h at room temperature under stirring.

Primary antibodies alpha-tubulin (cat# 2144) and acetylated alpha-tubulin (cat# 5335), PARP (cat# 9542), and beta-catenin (cat# 9562), all from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), were diluted 1:1000 in blocking solution. Membranes were incubated with the antibodies overnight at 4°C with shaking. After three successive washes with T-TBS (Tween20-TBS), the membranes were incubated for 1h at room temperature with a secondary anti-rabbit IGG antibody (Cat# 7074S, Cell Signaling Technology) conjugated to peroxidase and immunoreactive bands were detected by chemiluminescence (ECL®, Amersham, GE HealthCare). Band quantification from three independent experiments was performed using the ImageJ [28] and presented as the mean ± SD. We used all three cell lines to analyze acetylated alpha-tubulin, beta-catenin, and PARP.

2.12 Metabolomic analysis

After separation by centrifugation 100 µL of the intra- (pellet) and extracellular (supernatant) fractions of T98G cells treated with 2µM and 4µM WT-161 and the control vehicle (DMSO) were extracted using 1000 µL of spectroscopic grade methanol which were added to the material. Samples were homogeneized in a vortex for 5 minutes, centrifuged for 15 min at 13,000 g and the supernatant was transferred to another Eppendorf, which was subjected to a vacuum concentrator for 30 minutes. The material was resuspended in 400 µL of methanol and filtered through a 0.22 micrometer filter.

Metabolite analysis was performed using an Agilent Infinity 1260/Q-TOF 6520 B coupled to an ionization source electrospray. Separation was provided by a column Agilent Poroshell 120 2.1×50 mm 2.7 μm. In the mobile phase, we used water acidified with formic acid (0.1% vv) (A) and methanol (B), with a gradient of 2% B - 98% B (0–6 min), and 98% B (6–12 min). Ionization parameters were nebulizer pressure of 20 psi and drying gas at 8 L/min at 220 ºC; energy of 4.5 KV was applied to the capillary. The injection volume was 4 μL. MassHunter Qualitative software version 10.0 was used to process the raw data. A "Molecular feature extraction (MFE)" tool was used to extract the mass spectra and convert to CEF extension. Agilent Mass Profiler Professional (MPP) software version B.13.1.1 was used to filter and analyze the extracted molecule compounds. The filters used were minimum absolute abundance of 5,000 counts and all allowable charges. Analysis parameters were retention time tolerance of 0.15 min and mass window 15 ppm+2 mDa. The molecular compounds considered were those present in 75% of samples from at least one group. Metabolites were identified using the METLIN 2019 database.

2.13 Statistical analysis

All of the experiments were repeated at least three times (n=3), and the data are expressed as the mean ± SD. We used Student´s *t*-test to compare two groups. For three or more groups, we used ANOVA followed by Tukey´s or Dunnet´s multiple comparison test. P values < 0.05 were considered to be statistically significant. For metabolomic assays, statistical analyses were performed with log2 transformed values. The unpaired T test was applied with a p-value and fold change ≥ 2.00.

3. RESULTS

3.1 HDAC6 protein is overexpressed in GBM

Some authors have identified higher HDAC6 expression in glioblastoma samples when compared to control samples [10, 13]. UALCAN analysis showed that although the mean values showed a tendency to be higher, there was no statistical difference in mRNA levels (Fig. 1A) and HDAC6 promoter methylation levels (Fig. 1B) in GBM samples when compared to normal samples. However, the CPTAC data showed that HDAC6 protein level was significantly overexpressed in GBM glioma when compared with normal brain tisues (Fig 1C). To further investigate the overexpression of HDAC6 in glioma, we observed the stainings of HDAC6 protein in high-grade glioma and brain tissues with three different antibodies. The images strongly reinforced that HDAC6 protein expression was much higher in GBM tumors than that in normal tissues (Fig. 1D).

3.2 WT161 suppressed cell growth, inhibited HDAC6, altered cell cycle and decreased clonogenicity of 2D-cultured GBM cells

The U251, U87, and T98G cell lines were sensitive to WT161, showing decreased growth in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). This effect became maximal with 30μM WT161 being that growth reduction was more than 59%, 80%, and 96% in U87, U251, and T98G cell lines, respectively (Fig. 2A). It is remarkable the sensibility of T98G cells to WT161 showing the lowest IC50 value (3.8μM WT161) (Fig. 2C-top table). Thus, our results demonstrate that WT161 was efficient in inhibiting the 2D growth of GBM cells. Additionally, the chemosensitivity of GBM cells to TMZ was determined for subsequent drug combination assays. The IC50 values

obtained showed high sensitivity to TMZ of U251 and U87 cells and relative resistance of T98G cells (Fig. 2B). The effect maximal was achieved at 2000μM TMZ, when proliferation was reduced by more than 81% and 66% in U251 and U87 cell lines, and only 16% proliferation reduction in T98G cells (Fig. 1B).Thus, T98G cells exhibited the highest IC50 value for TMZ (2920.0 μM) among the GBM cell lines (see Fig. 1C and the table below). Interestingly, these T98G cells are simultaneously the most resistant to TMZ and the most sensitive to WT161.

To verify whether the WT161-mediated cell growth reduction was associated with HDAC6 inhibition, we assayed the enhancement of Lys40-Ac-α-tubulin level in GBM cell lines, when treated by 48 h with WT161-IC50 values. Our results indicated the efficiency of WT161 in inducing significant acetylation of α-tubulin in the three GBM cell lines ($p < 0.05$), confirming HDAC6 pharmacological inhibition in U251, U87 and T98G cells (Fig. 2D).

In this context, cell cycle distribution analyses were performed to determine whether alterations in the progression of the cell cycle were responsible for observed antiproliferative effects associated to HDAC6 inhibition. Thus, GBM cells treated by 24 h with WT161-IC50 values showed a significant increase in the number of cells in G2/M phase in U251, U87 and T98G cell lines (21.3%, 21.9% and 28.9% increase), and decreasing of percentage of cells in the S phase (29%, 63%, and 17%, respectively). Furthermore, although the proportion of cells in the sub-G1 phase in the DMSO-treated groups is a minority, there was a significant increase of this population of U251, U87 and T98G cells, corresponding, when compared to control groups, to a 290%, 260% and 269% increase, respectively. These findings support the previous results and clarify HDAC6-dependent mechanisms responsible for 2D antiproliferative effects of WT161 ocurrs via inducing cell cycle arrest at G2/M phase, and suggest so far, a possible WT161-mediated apoptotic induction (Fig. 2E).

Additionally, since WT161 decreased the growth of GBM cells cultured under 2D conditions concomitantly with G2/M cycle arrest, we evaluated whether WT161-dependent HDAC6 inhibition could affect clonogenic growth. For this purpose, we exposed the GBM cell lines to increasing concentrations of WT161 (Fig. 2F). WT161 significantly decreased the clonogenic capacity of all three GBM cells, and once again, T98G cells were the most sensitive showed a significant difference starting at 0.25μM ($p<0.05$); while U251 and U87 cells were relatively less sensitive to treatment (Figure 2F). These results show that in addition to decreasing the viability of GBM cells and cell cycle arrest in G2/M, WT161 also decreases the clonogenic capacity of these cells, in a manner associated with HDAC6 inhibition.

3.3 WT161 acts synergistically with TMZ in GBM cells.

To determine whether WT161 sensitizes GBM cell lines to TMZ conventional chemotherapy, we evaluated the effects of combined treatments and assessed the optimal treatment schedule using either simultaneous or sequential drug exposures. Figure 3 demonstrates the broad synergism between WT161 and TMZ in GBM cells. With the simultaneous combination strategy (TMZ+WT161), drug combinations resulted in moderate synergism (++, CI=0.7-0.85) in both U251 and U87 cell lines, and strong synergism (++++, CI=0.3-0.7) in T98G cells, across all ranges of affected fractions (Fig. 3A, D,G). Notably, T98G cells, which exhibited the highest sensitivity to WT161 and the greatest resistance to TMZ, showed the most synergistic combinatorial effect, with the lowest CI value (CI=0.3 at ED95) and the highest DRI value (557.2) compared to the other cell lines. Similarly, it was found a moderate synergism (++) when TMZ→WT161 sequential treatment was used in U251 cells (Fig. 3B), and strong

synergism (++++) when WT161→TMZ sequential treatment was used in both U87 and T98G cell lines (Fig. 3F, I). The effects were represented by the CI, the concentration-effect levels of cell growth inhibition (ED_{50}–ED_{95}), and the DRI (Plots in Figure 3 and data summarized in Supplementary Data Table S1).

3.4 WT161 induced apoptosis and enhanced TMZ-induced apoptosis in GBM cells.

To determine whether WT161 induces apoptosis in GBM cells, we used the annexin V/propidium iodide assay. As indicated in Fig. 4A, DMSO-treated control cells, as expected, were viable, whereas U251, U87 and T98G cells treated with WT161 showed a number of apoptotic cells significantly increased (annexin-V-positive cells) in 4, 4.7, and 2.7 times, respectively. These results shows that WT161 induces apoptosis in GBM cells.

Given the significant synergistic effect observed between WT161 and TMZ in proliferation assays, and the finding that the simultaneous combination was the most effective drug administration schedule for 2D-cultured GBM cells, we evaluated apoptosis under these same conditions. For each GBM cell line, we used the lowest concentrations of both drugs that had previously shown a synergistic interaction when combined, as determined by the Chou-Talalay method.

As shown in Fig. 4A, simultaneous combination of WT161 and TMZ significantly increased the percentage of apoptotic cells when compared with each drug alone in all three GBM cell lines. To quantify the enhancement of apoptosis caused by WT161, we calculated the ratio of the number of apoptotic cells obtained by combinatorial treatment versus the number of apoptotic cell obtained by treatment with each drug alone in each cell line. The most intense effect was observed in U87 cells when apoptosis achieved 83% of total cell population, being enhanced 3.9 and 1.8 times when compared with the effect of TMZ and WT161 alone, respectively. Similarly, an important effect was observed in U251 cells when apoptosis achieved 82% of total cell population, being enhanced 3.8 and 1.9 times compared with the effect of TMZ and WT161 alone, respectively.

During apoptosis, Caspase-3 is activated universally to cleave several key proteins required for cellular function, including PARP-1 that facilitates cellular disassembly and serves as a marker of cells undergoing apoptosis. Thus, to verify our apoptosis results, measurement of protein expression of cleaved PARP, under the same treatment conditions for GBM cell lines described before, was performed by western blot assays. In our study, the 89 kD fragmentation of PARP was notably increased with simultaneous treatment (TMZ+WT161) compared to treatments with each drug alone (Fig. 4B). These results indicated that TMZ+WT161 combination is involved in enhanced apoptosis mediated by cleavage of PARP-1, probably through caspase-3 activation.

3.5 WT161-treated GBM cells reveal attenuated cell mobility and decreased β-catenin levels.

We evaluated the effects of the HDAC6 inhibitor WT161 on migration and invasion in U251, U87, and T98G cell lines. Cell migration was assessed using the 2D scratch wound-healing assay. Cells were treated with 2 μM and 4 μM WT161, and migration was monitored at two time points: 0 and 24 hours. At a concentration of 4 μM, WT161 significantly reduced cell migration in all three GBM cell lines (see Fig. 5A). The inhibitory effect was most pronounced in U251 and T98G cells, where migration was reduced by 73% and 55%, respectively, compared to DMSO-treated controls.

To evaluate the effect of WT161 on cell invasion, we performed a transwell cell invasion assay, in which cells were required to invade through an extracellular matrix (Geltrex™) toward a serum gradient. At a concentration

of 4 μM, WT161 significantly reduced cell invasion across all three GBM cell lines (see Fig. 5B). Notably, these effects were more pronounced in U251 and T98G cells, with significant reductions in invasion starting at 2 μM and reaching maximum inhibition of 61% and 73%, respectively, when treated with 4 μM WT161 (Fig. 5B). Additionally, to investigate pathways closely related to glioma cell invasion, we observed that WT161 reduced β-catenin protein levels in both U251 and T98G cells, but not in the U87 cell line (Fig. 5C).

In conclusion, WT161 reduced the migration and invasion abilities of GBM cell lines, with more pronounced effects observed in U251 and T98G cells. Intriguingly, both of these cell lines showed a significant reduction in β-catenin levels when treated with WT161.

3.6 WT-161 sensitizes to TMZ and decreased migration of 3D-cultured T98G cells.

Multicellular tumor spheroids (MCTs) have been at the forefront of cancer research, designed to mimic tumor-like developmental patterns in vivo. In our study, U251 and T98G spheroids treated with the DMSO vehicle exhibited progressive growth (Fig. 6A). Surprisingly, unlike the 2D growth assays, where we observed significant differences between WT161 treatment and DMSO controls, there was no significant difference in the 3D growth reduction of U251 and T98G spheroids treated with 2 μM WT161 over 6 days of continuous treatment compared to those treated with DMSO (Fig. 6A). When drug combination assays in MCTs were performed, we used simultaneous treatment with TMZ and WT161, respecting the molar ratios previously defined in the 2D assays. We found that 2 μM WT161 sensitized only T98G spheroids to TMZ, significantly reducing 3D tumor growth compared to TMZ alone ($p < 0.05$). This finding corroborates the 2D synergism previously observed in this TMZ-resistant cell line (Fig. 6A). Conversely, unlike the 2D drug combination assays, no significant differences were observed in U251 spheroids treated with the TMZ+WT161 combination compared to spheroids treated with TMZ alone (Fig. 6A).

To verify the effects of WT161 on cell motility under 3D culture conditions, we measured the radial migration of cells from multicellular tumor spheroids (MCTs). U251 and T98G spheroids were treated with 2 μM or 4 μM WT161. The area of cells migrating outward from the 3D structure was measured at 24, 48, and 72 hours. As shown in Fig. 6B, T98G MCTs treated with the DMSO vehicle exhibited sustained migration over 72 hours. In contrast, 4 μM WT161 significantly reduced migration, with a notable decrease observed after 24 hours. This reduction became significant at 48 hours and reached a maximum impairment of 71% at 72 hours (Fig. 6B). Nevertheless, unlike the 2D migration assays, no significant differences were observed in the migration of U251 MCTs treated with 2 μM or 4 μM WT161 compared to those treated with DMSO.

3.7 WT161 deregulate metabolome of GBM cells

Comparisons were performed to identify differences among treatments 2μM WT161, 4μM WT161, and vehicle DMSO; and between fractions extracelullar and intracelullar.

When analize differences among treatments, we identified 53 differentially expressed metabolites: 11 only in control DMSO, 10 metabolites only in 2μM WT161 treatment, 10 metabolites only in 4μM WT161 treatment, 6 in both groups DMSO and 2μM WT161, 6 in both groups 2μM and 4μM WT161, 3 in both groups DMSO and 4μM WT161, and 7 metabolites simultaneously differed in all three groups (Fig. 7A). Regarding, twenty-four metabolites were negatively regulated and twenty-nine were positively regulated in all groups.

When analyzing the differences between intracellular and extracellular fractions for each treatment, we identified 27 differentially expressed metabolites between fractions for the DMSO treatment (Fig. 7B), 29 differentially expressed metabolites for the 2 μM WT161 treatment (Fig. 7C), and 26 differentially expressed metabolites for the 4 μM WT161 treatment (Fig. 7D).

The individual metabolites differentially expressed between intra- and extracellular fractions in each treatment group (DMSO, 2μM and 4μM WT161) are detailed in Supplementary Data Tables S2, S3, S4, S5, and S6, showing tha metabolomic modulation caused by WT161 in GBM cells.

Additionally, we compared differentially expressed metabolites among treatments DMSO vs. 2μM WT161 vs. 4μM WT161, into of each fraction (extracellular or intracellular). We identified 5 differentially expressed metabolites: 2 metabolites in extracellular and 3 metabolites in intracelullar comparison. The individual metabolites differentially expressed in each fraction are presented in Fig. 8A. Thus, after WT161 treatment, it was found a significantly increase of pirimicarb and 6-Hydroxytricetin 6,7,3',5'-tetramethyl eter 5-robinobioside at extracelullar fraction. Simultaneously, we found increase of PE(P-18:0/16:0) and ethohexadiol, and reduction of 24-Acetyl- 25-cinnamoylvulgaroside at intracellular fraction (Fig. 8).

4. DISCUSSION

GBM is an aggressive malignancy with limited effective treatment options, making the development of new therapies with novel mechanisms of action urgently needed [30, 31]. Currently, molecules that are differentially expressed in cancer and intersect multiple pathways essential for tumor maintenance are considered better candidates for targeted cancer therapy [32]. In this context, HDAC6 stands out because it is the only member of the HDAC family primarily located in the cytoplasm, where it has a diverse substrate repertoire and plays crucial roles in processes such as cell proliferation, apoptosis, motility, senescence, DNA damage response, and genomic stability. Additionally, HDAC6 is highly expressed in various solid tumors, including GBM [33], highlighting its potential as an important target for anticancer therapy.

In our study, we initially confirmed the biological relevance of HDAC6 in GBM due to its significantly higher protein expression in tumor samples compared to normal tissues. However, we did not observe these differences when evaluating mRNA abundance or HDAC6 promoter methylation levels. In contrast, Li et al. (2015) [13] found higher levels of HDAC6 mRNA in GBM samples compared to normal samples. These conflicting results were also noted by Stetson et al. (2020) [34], who assessed the correlation between LC-MS/MS data and RNA-seq data in paired GBM samples. Furthermore, Yanovich et al. (2021) [35] highlighted that these RNA-protein discrepancies represent another layer of inter-tumor heterogeneity in GBM at the gene expression level. They also pointed out that the protein profile is more significantly associated with patient survival than the RNA profile alone, offering a better opportunity to understand the poor survival outcomes in these patients. Several studies support and corroborate Yanovich's hypothesis when HDAC6 expression is evaluated at both protein and mRNA levels. Lucio-Eterovic et al. (2008) [36] investigated global HDAC expression and found a negative correlation between the mRNA expression of the HDAC gene family and glioma grade, observing that the mRNA levels of class II and IV HDACs, including HDAC6, are lower in GBM. However, Marampon et al. (2017) [37] identified that HDAC6 protein expression, rather than mRNA levels, is closely related to poor responses to temozolomide (TMZ) and radiotherapy (RT) combined treatment, as well as to lower overall survival (OS) in GBM patients.

Similarly, Sferra et al. (2017) [38] used immunohistochemical analysis to show that HDAC6 levels were significantly higher in patients with low overall survival. Given its crucial role as a deacetylase enzyme, particularly for cytoplasmic targets, further research is needed to explore the translational control mechanisms of HDAC6 and its mRNA-protein dynamics at the molecular level. This will enhance our understanding of its impact on cell signaling processes and tumor progression.

Therapeutically, the currently available pan-HDAC inhibitor Vorinostat (SAHA) [39] and HDAC6 inhibitors such as Tubastatin A have demonstrated strong preclinical antitumor activity in glioblastoma (GBM) [40, 41]. In the present study, we describe, for the first time, the effects of WT161, a highly selective HDAC6 inhibitor, on GBM cells. This selectivity was confirmed by significant α-tubulin acetylation, which was associated with the inhibition of 2D GBM cell growth, cell cycle arrest and a significant reduction in clonogenicity.

Over the past several years, HDAC6 inhibitors have been shown to inhibit GBM growth by inducing cell cycle arrest at the G2/M phase and/or apoptosis through various mechanisms. TC24 was demonstrated to induce G2/M phase arrest and loss of mitochondrial membrane potential in GBM cells [42]. Both ACY-1215 and ACY-738 inhibitors have been reported to induce cell death in patient-derived and murine GBM cells and to arrest their growth in the G2/M cell cycle phase [43]. The HDAC6-dependent cell cycle arrest at the G2/M phase may be explained by microarray gene expression analysis performed after HDAC6 inhibition with JOC1 in a GBM patient-derived stem cell line [40]. This analysis revealed downregulated pathways related to cell cycle processes, such as chromosome organization and segregation, mitotic cell cycle, cell division, mitotic nuclear division, and chromatin organization. Furthermore, a strong positive correlation was observed between mRNA HDAC6 levels and several stem cell markers and cell-cycle activators in GBM samples from the TCGA cohort, including p21Cip1, CCND2, and EGFR [40]. Consistent with these studies, we found that WT161 treatment reduced both GBM cell growth and clonogenicity by inducing cell cycle arrest at the G2/M phase in all GBM cell lines. The growth-inhibitory effects of WT161 on cancer cell lines and various xenograft tumors have been reported elsewhere [16-21]. Therefore, our study suggests that GBM represents an additional promising target for WT161 therapy.

Current therapy for GBM consisting on radiotherapy and chemotherapy with TMZ displays little effectiveness, being necessary overcome two major challenges in the clinical management of GBM, particularly after TMZ resistance has developed, are rapid TMZ-resistant cell proliferation and widespread local migration or invasion [44]. In our study, we explore these two biological behaviors through drug combination assays and progression tumor in vitro assays, respectively.

HDAC6 overexpression confers resistance to temozolomide (TMZ)-mediated inhibition of cell proliferation by activating the EGFR pathway [10], Sp1 deacetylation [45], regulating DNA mismatch repair [11], as well as several other DNA damage response and repair (DDR) genes [46]. In this context, several authors indicate that HDAC6 selective inhibition may be a promising strategy against TMZ-resistance of GBM cells [11, 46]. Here, we performed drug combination assays between WT161 and TMZ using three different strategies of administration schedule in GBM cell lines. We observed that simultaneous combination (WT161 + TMZ) exhibited synergistic effects in all cell lines, mainly in TMZ-resistant T98G GBM cells. This findings demonstrated that WT161 may overcome TMZ resistance of GBM cells, and representing a promising drug for the treatment of GBM and specially overcoming TMZ resistance.

Furthermore, this combinatorial efficiency of WT161 has also been observed when combined with other chemotherapeutics and drugs, including Cisplatin [18], Bortezomib [17, 19], Daratumumab [16], Birabresib (OTX015) [21], and 5-Fluorouracil (5-FU) [20].

On the other hand, although resistance to apoptosis is intrinsically characteristic of GBM [47-49], WT161 was able to induce apoptosis and enhance TMZ-induced apoptosis in all GBM cell lines, mainly in the TMZ-resistant T98G cells. Recently, several in vitro and xenograft studies have shown that WT161 treatment results in induction of apoptosis [17-21]. However, our study is the first to verify not only the induction of apoptosis in GBM cells but also the apoptosis-enhancing capacity of WT161 as a result of its combination with a chemotherapy drug such as TMZ. These findings support its chemosensitizing capacity, synergistic potential, and ability to enhance apoptosis when combined with other drugs.

As described above, another important challenge to overcome in the clinic context is the widespread local migration or invasion of GBM cells. Our results showed that WT161 was able to impair cell mobility, reducing both migration and invasion of GBM cells. The anti-migration/invasion potential of HDAC6 inhibition by WT161 was recently demonstrated by Yu et al. (2022) [21] in osteosarcoma cells involving changes in several classical survival signaling pathways, including the WNT, mTOR, NF-kB, JAK-STAT, and MAPK pathways [21]. It is known that HDAC6 could mediates migration and invasion capabilities through deacetylase-dependent and/or -independent mechanisms [50]. HDAC6 is a regulator of actin polymerization-based cellular mobility through modulation of the acetylation status of cortactin [7]. Urdiciain et al. (2021) [51] demonstrated that HDAC6 is the most overexpressed of all HDACs isoforms in GBM tumors samples and cell lines, and HDAC6 silencing inhibited proliferation, migration, and clonogenicity of GBM cells, besides of cilium restoration, epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) reversion, and autophagy inhibition in these cells.

Interestingly, the most intense antimigratory and anti-invasion effects were observed only in GBM cells that exhibited a significant reduction in β-catenin levels, U251 and T98G cells. β-catenin is a multifunctional protein that plays critical roles in Wnt-signaling, tissue organization [52], the structural and functional organization of the adherens junction and cell-cell adhesion [53]. In GBM, β-catenin is a commonly overexpressed protein associated with glioma initiation, proliferation, and invasion [54]. Several authors appointed what downregulated β-catenin in GBM causes reduction of migration and invasion, descreased of marker of epithelial-mesenchymal transition, and reducing of Cancer Stem-Cell-Like (CSC) properties [54-57].

However, the relationship between HDAC6 and β-catenin is not well understood. It is known that HDAC6 deacetylates β-catenin at lysine 49 and inhibits β-catenin phosphorylation at serine 45 [58]. Additionally, Mak et al. (2012) [59] found that the pentaspan membrane glycoprotein CD133, commonly used as a molecular marker for stem cells and cancer stem cells, can physically associate with both HDAC6 and β-catenin to form a ternary complex. This association stabilizes β-catenin via HDAC6 deacetylase activity, leading to the activation of β-catenin signaling targets. Downregulation of either CD133 or HDAC6 results in increased β-catenin acetylation and degradation, which correlates with decreased proliferation in vitro and reduced tumor xenograft growth in vivo [59]. Our results, showing that WT161-mediated inhibition of HDAC6 deacetylase activity induces β-catenin degradation and promotes a reduction in the neoplastic phenotype, particularly with respect to migratory and invasive behavior in GBM cells, corroborate these findings. Further studies are needed to investigate which β-

catenin-dependent signaling pathways are affected by this degradation and to assess their potential impact on the reduction of cancer stem cell (CSC) populations in GBM.

On the other hand, most assays performed to assess the biological activity of novel inhibitors rely on traditional two-dimensional (2D) cell culture, having experimental limitations. The three-dimensional (3D) architecture creates a biological model with oxygen and nutrient gradients that ultimately alters gene expression, resembling the tumor gene profile and microenvironment [60, 61]. This model bridges traditional 2D cultures and animal experiments and is crucial for drug sensitivity studies in translational medicine and further research in tumor biology [62, 63].

In this study, we developed a three-dimensional (3D) GBM cell culture model with the objective of more accurately replicating tumor characteristics and cell-cell interactions. This model was used to assess the effects of HDAC6 inhibition in a 3D cellular context for GBM. WT161 maintained the cytotoxic effect observed in 2D cultures when assessed in T98G spheroids. Furthermore, combination between WT161 and TMZ drugs was synergistic and showed more reduced growth than isolated treatments in TMZ-resistant T98G cells. Moreover, WT161 was able to reduce the migration of spheroids as observed in a 2D conformation. These data support the relevant effect of WT161 on cell migration of GBM cells. Migration, as observed in a 3D cell model, partially mimics the capacity of cells to invade the parenchyma, since the assay requires cells to move in a semisolid medium without any chemoattractive factors. Additionally, while GBM invades the surrounding parenchyma, it does not typically escape the central nervous system [64]. This underscores the importance of evaluating migration capacity more thoroughly than invasion in our 3D migration assay, as this tumor rarely metastasize systemically [65, 66]. Therefore, we conclude that WT161-dependent inhibition of 3D migration is a significant strategy that could impair parenchyma infiltration by GBM cells in the in vivo environment, which is a primary reason for disease recurrence after tumor resection [65].

Considering the WT161-dependent anti-glioblastoma effects observed in T98G cells, both in 2D and 3D conditions—including reduced growth, increased chemosensitivity, enhanced apoptosis, and impaired motility in both 2D and 3D environments—it is crucial to understand the complex functional signaling pathways that, on a large scale, determine the response of these TMZ-resistant cells to HDAC6 inhibition. Currently, compared to genomics and proteomics, metabolomics reflects changes in the phenotype that are closer to the final physiological status and, therefore, could enable the identification of novel metabolomic signatures in HDAC6-dependent GBM [67].

Notably, we found an enrichment of the lipid PE(P-18:0/16:0) in the intracellular fraction after WT161 treatment. This phosphatidylethanolamine is involved in phosphatidylethanolamine biosynthesis, lipid transport and autophagy [68]. However, according to Doll et al. (2017) [69] and Kagan et al. (2017) [70], phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylcholine (PC), are the most critical lipids for lipid peroxidation and ferroptosis. Ferroptosis is a nonapoptotic form of regulated cell death, is driven by excessive accumulation of lipid peroxidation [71]. Recently, Liu et al. (2023) [72] found that Tubastatin A, an HDAC6 inhibitor, induced ferroptosis in cancer cells, however, of independent way of HDAC6 [72]. Interestingly, metabolomic screening found down-regulated the metabolite 24-Acetyl-25-cinnamoylvulgaroside, which belongs to the class of organic compounds known as cheilanthane sesterterpenoids and acts as a membrane stabilizer, preferentially located in cytoplasm and cell membrane, involved in lipid peroxidation, fatty acid metabolism, cell signaling and lipid

metabolism pathway [73]. Thus, based on our metabolomic results, and as suggested by other authors [74, 75], we hypothesize that HDAC6-dependent metabolic dysregulation mainly affects lipid peroxidation events, probably causing ferroptosis in T98G glioblastoma cells. Further studies are needed to confirm these data.

5. CONCLUSION

In conclusion, we demonstrated the important role of WT161 in GBM. Our results showed that WT161 inhibits the cell growth and clonogenecity, arrest cell cycle at G2/M and induce apoptosis of GBM cells. In addition, WT161 shows synergistic inhibitory effects on GBM cells combined with TMZ, and enhancing the apoptotic effect. WT161 also reduced cell motility capacity associated with reduction the protein expression of β-catenin, and desregulate GBM metabolome affecting mainly lipid peroxidation. Our findings provide evidence that WT161 might be a promising agent against GBM.

6. GLOSARY

- Birabresib: OTX-015
- Cancer stem cell: CSC
- Catenin beta-1: β-catenin
- Cell cycle transition bewteen G2 phase and M phase: G2/M
- Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium: CPTAC
- Concentration reduction index: DRI
- Combination index: CI
- Cyclin D2: CCND2
- Cyclin-dependent kinase inhibitor 1: p21Cip1
- DNA damage response and repair: DDR
- Epidermal growth factor receptor: EGFR
- Epithelial-to-mesenchymal transition: EMT
- Human Protein Atlas: HPA
- Histone deacetylase 6: HDAC6
- Janus kinase/signal transducers and activators of transcription: JAK-STAT
- Mammalian target of rapamycin: mTOR
- Median overall survival: mOS
- Mitogen-activated protein kinase: MAPK
- Multicellular tumor spheroids: MCTs
- Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells: NF-kB
- Prominin-1: CD133
- Radiotherapy: RT
- Temozolomide: TMZ
- Three dimensions: 3D
- Two dimensions: 2D
- University of ALabama at Birmingham CANcer data analysis Portal: UALCAN
- Wingless and Int-1: WNT

7. Author Contributions

Investigation, Material preparation, data collection and analysis were performed by L.S.O., J.M.O.S., H.O.A-S., M.M.M.; C.B.C., R.F.M., C.V.E.S., A.F.A., L.M.B., M.I., and G.D.A.L.

Validation, Writing - Original Draft, Review & Editing were performed by L.S.O. and A.M.C.G

Conceptualization, Funding acquisition and Writing - Review & Editing was performed by A.M.C.G.
All authors reviewed the manuscript.

8. Funding sources

APQ-02291-18 / Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG)
88887.799640/2022-00 / Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES)
88881.708989/2022-01 / Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES)

9. Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

10. REFERENCES

[1] C. Oster *et al.*, "Are we providing best-available care to newly diagnosed glioblastoma patients? Systematic review of phase III trials in newly diagnosed glioblastoma 2005–2022", *Neuro-Oncol. Adv.*, vol. 5, nº 1, p. vdad105, 2023, doi: 10.1093/noajnl/vdad105.

[2] R. Stupp *et al.*, "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma", *N. Engl. J. Med.*, vol. 352, nº 10, p. 987–996, 2005, doi: 10.1056/NEJMoa043330.

[3] C. M. Grozinger, C. A. Hassig, e S. L. Schreiber, "Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, nº 9, p. 4868–4873, 1999, doi: 10.1073/pnas.96.9.4868.

[4] G. I. Aldana-Masangkay e K. M. Sakamoto, "The Role of HDAC6 in Cancer", *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2011, p. 875824, 2011, doi: 10.1155/2011/875824.

[5] K. A. Williams *et al.*, "Extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylates histone deacetylase 6 (HDAC6) at serine 1035 to stimulate cell migration", *J. Biol. Chem.*, vol. 288, nº 46, p. 33156–33170, 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.472506.

[6] S. A. Wickström, K. C. Masoumi, S. Khochbin, R. Fässler, e R. Massoumi, "CYLD negatively regulates cell-cycle progression by inactivating HDAC6 and increasing the levels of acetylated tubulin", *EMBO J.*, vol. 29, nº 1, p. 131–144, 2010, doi: 10.1038/emboj.2009.317.

[7] X. Zhang *et al.*, "HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin", *Mol. Cell*, vol. 27, nº 2, p. 197–213, 2007, doi: 10.1016/j.molcel.2007.05.033.

[8] C. Subramanian, J. A. Jarzembowski, A. W. Opipari, V. P. Castle, e R. P. S. Kwok, "HDAC6 deacetylates Ku70 and regulates Ku70-Bax binding in neuroblastoma", *Neoplasia N. Y. N*, vol. 13, nº 8, p. 726–734, 2011, doi: 10.1593/neo.11558.

[9] C. Boyault *et al.*, "HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates", *Genes Dev.*, vol. 21, nº 17, p. 2172–2181, 2007, doi: 10.1101/gad.436407.

[10] Z. Wang *et al.*, "HDAC6 promotes cell proliferation and confers resistance to temozolomide in glioblastoma", *Cancer Lett.*, vol. 379, nº 1, p. 134–142, 2016, doi: 10.1016/j.canlet.2016.06.001.

[11] G. W. Kim *et al.*, "Temozolomide-resistant Glioblastoma Depends on HDAC6 Activity Through Regulation of DNA Mismatch Repair", *Anticancer Res.*, vol. 39, nº 12, p. 6731–6741, 2019, doi: 10.21873/anticanres.13888.

[12] W. Yang, Y. Liu, R. Gao, H. Yu, e T. Sun, "HDAC6 inhibition induces glioma stem cells differentiation and enhances cellular radiation sensitivity through the SHH/Gli1 signaling pathway", *Cancer Lett.*, vol. 415, p. 164–176, 2018, doi: 10.1016/j.canlet.2017.12.005.

[13] S. Li, X. Liu, X. Chen, L. Zhang, e X. Wang, "Histone deacetylase 6 promotes growth of glioblastoma through inhibition of SMAD2 signaling", *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.*, vol. 36, nº 12, p. 9661–9665, 2015, doi: 10.1007/s13277-015-3747-x.

[14] J.-R. Liu, C.-W. Yu, P.-Y. Hung, L.-W. Hsin, e J.-W. Chern, “High-selective HDAC6 inhibitor promotes HDAC6 degradation following autophagy modulation and enhanced antitumor immunity in glioblastoma”, *Biochem. Pharmacol.*, vol. 163, p. 458–471, 2019, doi: 10.1016/j.bcp.2019.03.023.

[15] S. Pulya, S. A. Amin, N. Adhikari, S. Biswas, T. Jha, e B. Ghosh, “HDAC6 as privileged target in drug discovery: A perspective”, *Pharmacol. Res.*, vol. 163, p. 105274, 2021, doi: 10.1016/j.phrs.2020.105274.

[16] E. García-Guerrero *et al.*, “Upregulation of CD38 expression on multiple myeloma cells by novel HDAC6 inhibitors is a class effect and augments the efficacy of daratumumab”, *Leukemia*, vol. 35, nº 1, p. 201–214, 2021, doi: 10.1038/s41375-020-0840-y.

[17] T. Hideshima *et al.*, “Discovery of selective small-molecule HDAC6 inhibitor for overcoming proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, nº 46, p. 13162–13167, 2016, doi: 10.1073/pnas.1608067113.

[18] J. Sun *et al.*, “HDAC6 inhibitor WT161 induces apoptosis in retinoblastoma cells and synergistically interacts with cisplatin”, *Transl. Cancer Res.*, vol. 8, nº 8, p. 2759–2768, 2019, doi: 10.21037/tcr.2019.10.30.

[19] T. Hideshima *et al.*, “HDAC6 inhibitor WT161 downregulates growth factor receptors in breast cancer”, *Oncotarget*, vol. 8, nº 46, p. 80109–80123, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.19019.

[20] J. Sun *et al.*, “HDAC6 inhibitor WT161 performs anti-tumor effect on osteosarcoma and synergistically interacts with 5-FU”, *Biosci. Rep.*, vol. 41, nº 4, p. BSR20203905, 2021, doi: 10.1042/BSR20203905.

[21] B. Yu *et al.*, “The synergistic anticancer effect of the bromodomain inhibitor OTX015 and histone deacetylase 6 inhibitor WT-161 in osteosarcoma”, *Cancer Cell Int.*, vol. 22, nº 1, p. 64, 022, doi: 10.1186/s12935-022-02443-y.

[22] J. Friedrich, C. Seidel, R. Ebner, e L. A. Kunz-Schughart, “Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach”, *Nat. Protoc.*, vol. 4, nº 3, p. 309–324, 2009, doi: 10.1038/nprot.2008.226.

[23] S. da S. Lamartine-Hanemann *et al.*, “A tetraprenylated benzophenone 7-epiclusianone induces cell cycle arrest at G1/S transition by modulating critical regulators of cell cycle in breast cancer cell lines”, *Toxicol. In Vitro*, vol. 68, p. 104927, 2020, doi: 10.1016/j.tiv.2020.104927.

[24] N. A. P. Franken, H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, e C. van Bree, “Clonogenic assay of cells in vitro”, *Nat. Protoc.*, vol. 1, nº 5, p. 2315–2319, 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.339.

[25] T. C. Chou e P. Talalay, “Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors”, *Adv. Enzyme Regul.*, vol. 22, p. 27–55, 1984, doi: 10.1016/0065-2571(84)90007-4.

[26] T. C. Chou, “Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method”, *Cancer Res.*, vol. 70, nº 2, p. 440–446, 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.

[27] S. Martinotti & E. Ranzato, “Scratch Wound Healing Assay”, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 2109, p. 225–229, 2020, doi: 10.1007/7651_2019_259.

[28] C. A. Schneider, W. S. Rasband, e K. W. Eliceiri, “NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis”, *Nat. Methods*, vol. 9, nº 7, p. 671–675, 2012, doi: 10.1038/nmeth.2089.

[29] M. Vinci, C. Box, M. Zimmermann, e S. A. Eccles, “Tumor spheroid-based migration assays for evaluation of therapeutic agents”, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 986, p. 253–266, 2013, doi: 10.1007/978-1-62703-311-4_16.

[30] Q. T. Ostrom, N. Patil, G. Cioffi, K. Waite, C. Kruchko, e J. S. Barnholtz-Sloan, “CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013–2017”, *Neuro-Oncol.*, vol. 22, nº Suppl 1, p. iv1–iv96, 2020, doi: 10.1093/neuonc/noaa200.

[31] A. C. Tan, D. M. Ashley, G. Y. López, M. Malinzak, H. S. Friedman, e M. Khasraw, “Management of glioblastoma: State of the art and future directions”, *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 70, nº 4, p. 299–312, 2020, doi: 10.3322/caac.21613.

[32] Y. T. Lee, Y. J. Tan, e C. E. Oon, “Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity”, *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 834, p. 188–196, 2018, doi: 10.1016/j.ejphar.2018.07.034.

[33] Y.-C. Zheng *et al.*, “Curriculum vitae of HDAC6 in solid tumors”, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 230, p. 123219, 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123219.

[34] L. C. Stetson *et al.*, “Proteins inform survival-based differences in patients with glioblastoma”, *Neuro-Oncol. Adv.*, vol. 2, nº 1, p. vdaa039, 2020, doi: 10.1093/noajnl/vdaa039.

[35] G. Yanovich-Arad *et al.*, “Proteogenomics of glioblastoma associates molecular patterns with survival”, *Cell Rep.*, vol. 34, nº 9, p. 108787, 2021, doi: 10.1016/j.celrep.2021.108787.

[36] A. K. Lucio-Eterovic *et al.*, "Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hypoexpressed in glioblastomas", *BMC Cancer*, vol. 8, nº 1, p. 243, 2008, doi: 10.1186/1471-2407-8-243.

[37] F. Marampon *et al.*, "HDAC4 and HDAC6 sustain DNA double strand break repair and stem-like phenotype by promoting radioresistance in glioblastoma cells", *Cancer Lett.*, vol. 397, p. 1–11, 2017, doi: 10.1016/j.canlet.2017.03.028.

[38] R. Sferra *et al.*, "The possible prognostic role of histone deacetylase and transforming growth factor β/Smad signaling in high grade gliomas treated by radio-chemotherapy: a preliminary immunohistochemical study", *Eur. J. Histochem. EJH*, vol. 61, nº 2, p. 2732, 2017, doi: 10.4081/ejh.2017.2732.

[39] E. Galanis *et al.*, "Phase I/II trial of vorinostat combined with temozolomide and radiation therapy for newly diagnosed glioblastoma: results of Alliance N0874/ABTC 02", *Neuro-Oncol.*, vol. 20, nº 4, p. 546–556, 2018, doi: 10.1093/neuonc/nox161.

[40] J. Auzmendi-Iriarte *et al.*, "Characterization of a new small-molecule inhibitor of HDAC6 in glioblastoma", *Cell Death Dis.*, vol. 11, nº 6, p. 417, 2020, doi: 10.1038/s41419-020-2586-x.

[41] Z.-Y. Li *et al.*, "A novel HDAC6 inhibitor Tubastatin A: Controls HDAC6-p97/VCP-mediated ubiquitination-autophagy turnover and reverses Temozolomide-induced ER stress-tolerance in GBM cells", *Cancer Lett.*, vol. 391, p. 89–99, 2017, doi: 10.1016/j.canlet.2017.01.025.

[42] J. Dong *et al.*, "A novel HDAC6 inhibitor exerts an anti-cancer effect by triggering cell cycle arrest and apoptosis in gastric cancer", *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 828, p. 67–79, 2018, doi: 10.1016/j.ejphar.2018.03.026.

[43] Y. Shi *et al.*, "Romidepsin (FK228) regulates the expression of the immune checkpoint ligand PD-L1 and suppresses cellular immune functions in colon cancer", *Cancer Immunol. Immunother. CII*, vol. 70, nº 1, p. 61–73, 2021, doi: 10.1007/s00262-020-02653-1.

[44] A. Giese, R. Bjerkvig, M. E. Berens, e M. Westphal, "Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment", *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 21, nº 8, p. 1624–1636, 2003, doi: 10.1200/JCO.2003.05.063.

[45] W.-B. Yang *et al.*, "Increased activation of HDAC1/2/6 and Sp1 underlies therapeutic resistance and tumor growth in glioblastoma", *Neuro-Oncol.*, vol. 22, nº 10, p. 1439–1451, 2020, doi: 10.1093/neuonc/noaa103.

[46] W.-B. Yang *et al.*, "Histone deacetylase 6 acts upstream of DNA damage response activation to support the survival of glioblastoma cells", *Cell Death Dis.*, vol. 12, nº 10, p. 884, 2021, doi: 10.1038/s41419-021-04182-w.

[47] G. Eisele e M. Weller, "Targeting apoptosis pathways in glioblastoma", *Cancer Lett.*, vol. 332, nº 2, p. 335–345, 2013, doi: 10.1016/j.canlet.2010.12.012.

[48] M. Khasraw e A. B. Lassman, "Advances in the treatment of malignant gliomas", *Curr. Oncol. Rep.*, vol. 12, nº 1, p. 26–33, 2010, doi: 10.1007/s11912-009-0077-4.

[49] A. Sgorbissa, A. Tomasella, H. Potu, I. Manini, e C. Brancolini, "Type I IFNs signaling and apoptosis resistance in glioblastoma cells", *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death*, vol. 16, nº 12, p. 1229–1244, 2011, doi: 10.1007/s10495-011-0639-4.

[50] A. Valenzuela-Fernández, J. R. Cabrero, J. M. Serrador, e F. Sánchez-Madrid, "HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions", *Trends Cell Biol.*, vol. 18, nº 6, p. 291–297, 2008, doi: 10.1016/j.tcb.2008.04.003.

[51] A. Urdiciain *et al.*, "Silencing of Histone Deacetylase 6 Decreases Cellular Malignancy and Contributes to Primary Cilium Restoration, Epithelial-to-Mesenchymal Transition Reversion, and Autophagy Inhibition in Glioblastoma Cell Lines", *Biology*, vol. 10, nº 6, p. 467, 2021, doi: 10.3390/biology10060467.

[52] B. C. Mbom, W. J. Nelson, e A. Barth, "β-catenin: A multi-functional protein's role at the centrosome and implications for a broader role in cell division", *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.*, vol. 35, nº 9, p. 804–809, 2013, doi: 10.1002/bies.201300045.

[53] W. I. Weis e W. J. Nelson, "Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum", *J. Biol. Chem.*, vol. 281, nº 47, p. 35593–35597, 2006, doi: 10.1074/jbc.R600027200.

[54] M. Nager, D. Bhardwaj, C. Cantí, L. Medina, P. Nogués, e J. Herreros, "β-Catenin Signalling in Glioblastoma Multiforme and Glioma-Initiating Cells", *Chemother. Res. Pract.*, vol. 2012, p. 192362, 2012, doi: 10.1155/2012/192362.

[55] J. Y.-C. Lee *et al.*, "Inhibition of HDAC3- and HDAC6-Promoted Survivin Expression Plays an Important Role in SAHA-Induced Autophagy and Viability Reduction in Breast Cancer Cells", *Front. Pharmacol.*, vol. 7, p. 81, 2016, doi: 10.3389/fphar.2016.00081.

[56] H.-W. Liu *et al.*, "The Disruption of the β-Catenin/TCF-1/STAT3 Signaling Axis by 4-Acetylantroquinonol B Inhibits the Tumorigenesis and Cancer Stem-Cell-Like Properties of Glioblastoma Cells, In Vitro and In Vivo", *Cancers*, vol. 10, nº 12, p. 491, 2018, doi: 10.3390/cancers10120491.
[57] E.-J. Yun, D. Kim, S. Kim, J.-T. Hsieh, e S. T. Baek, "Targeting Wnt/β-catenin-mediated upregulation of oncogenic NLGN3 suppresses cancer stem cells in glioblastoma", *Cell Death Dis.*, vol. 14, nº 7, p. 423, 2023, doi: 10.1038/s41419-023-05967-x.
[58] Y. Li, X. Zhang, R. D. Polakiewicz, T.-P. Yao, e M. J. Comb, "HDAC6 is required for epidermal growth factor-induced beta-catenin nuclear localization", *J. Biol. Chem.*, vol. 283, nº 19, p. 12686–12690, 2008, doi: 10.1074/jbc.C700185200.
[59] A. B. Mak *et al.*, "Regulation of CD133 by HDAC6 promotes β-catenin signaling to suppress cancer cell differentiation", *Cell Rep.*, vol. 2, nº 4, p. 951–963, 2012, doi: 10.1016/j.celrep.2012.09.016.
[60] J. V. Joseph, M. S. Blaavand, T. Daubon, F. A. Kruyt, e M. K. Thomsen, "Three-dimensional culture models to study glioblastoma - current trends and future perspectives", *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 61, p. 91–97, 2021, doi: 10.1016/j.coph.2021.08.019.
[61] J. Wanigasekara, L. J. Carroll, P. J. Cullen, B. Tiwari, e J. F. Curtin, "Three-Dimensional (3D) in vitro cell culture protocols to enhance glioblastoma research", *PloS One*, vol. 18, nº 2, p. e0276248, 2023, doi: 10.1371/journal.pone.0276248.
[62] Z. F. Bielecka, K. Maliszewska-Olejniczak, I. J. Safir, C. Szczylik, e A. M. Czarnecka, "Three-dimensional cell culture model utilization in cancer stem cell research", *Biol. Rev.*, vol. 92, nº 3, p. 1505–1520, 2017, doi: 10.1111/brv.12293.
[63] K. Poornima *et al.*, "Implications of Three-Dimensional Cell Culture in Cancer Therapeutic Research", *Front. Oncol.*, vol. 12, p. 891673, 2022, doi: 10.3389/fonc.2022.891673.
[64] J. A. D. V. Carvalho *et al.*, "Systemic dissemination of glioblastoma: literature review", *Rev. Assoc. Medica Bras. 1992*, vol. 65, nº 3, p. 460–468, 2019, doi: 10.1590/1806-9282.65.3.460.
[65] P. S. Bernardo *et al.*, "LQB-118 compound inhibits migration and induces cell death in glioblastoma cells", *Oncol. Rep.*, vol. 43, nº 1, p. 346–357, 2020, doi: 10.3892/or.2019.7402.
[66] P. D. Mourad, L. Farrell, L. D. Stamps, M. R. Chicoine, e D. L. Silbergeld, "Why are systemic glioblastoma metastases rare? Systemic and cerebral growth of mouse glioblastoma", *Surg. Neurol.*, vol. 63, nº 6, p. 511–519; discussion 519, 2005, doi: 10.1016/j.surneu.2004.08.062.
[67] K. A. Ahmed e P. Chinnaiyan, "Applying metabolomics to understand the aggressive phenotype and identify novel therapeutic targets in glioblastoma", *Metabolites*, vol. 4, nº 3, p. 740–750, 2014, doi: 10.3390/metabo4030740.
[68] E. Calzada, O. Onguka, e S. M. Claypool, "Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease", *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, vol. 321, p. 29–88, 2016, doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.10.001.
[69] S. Doll *et al.*, "ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition", *Nat. Chem. Biol.*, vol. 13, nº 1, p. 91–98, 2017, doi: 10.1038/nchembio.2239.
[70] V. E. Kagan *et al.*, "Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis", *Nat. Chem. Biol.*, vol. 13, nº 1, p. 81–90, jan. 2017, doi: 10.1038/nchembio.2238.
[71] S. J. Dixon *et al.*, "Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death", *Cell*, vol. 149, nº 5, p. 1060–1072, 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
[72] S. Liu *et al.*, "Tubastatin A potently inhibits GPX4 activity to potentiate cancer radiotherapy through boosting ferroptosis", *Redox Biol.*, vol. 62, p. 102677, 2023, doi: 10.1016/j.redox.2023.102677.
[73] "The Human Metabolome Database (HMDB)". https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0041368, 2024 (accessed 23 september 2024).
[74] Q. Nie *et al.*, "Iron oxide nanoparticles induce ferroptosis via the autophagic pathway by synergistic bundling with paclitaxel", *Mol. Med. Rep.*, vol. 28, nº 4, p. 198, 2023, doi: 10.3892/mmr.2023.13085.
[75] M. Orlicka-Płocka *et al.*, "Implications of Oxidative Stress in Glioblastoma Multiforme Following Treatment with Purine Derivatives", *Antioxid. Basel Switz.*, vol. 10, nº 6, p. 950, 2021, doi: 10.3390/antiox10060950.

11. FIGURE LEGENDS

Figure 1. HDAC6 protein is overexpressed in GBM. (A) Gene expression of HDAC6 in GBM based on sample types. Boxplots of *HDAC6* expression levels among normal and GBM tissues (UCEC; TCGA project from

UALCAN portal). (B) Promoter methylation level of HDAC6 in GBM. The Beta value indicates level of DNA methylation ranging from 0 (unmethylated) to 1 (fully methylated). Different beta value cut-off has been considered to indicate hyper-methylation [Beta value: 0.7 - 0.5] or hypo-methylation [Beta-value: 0.3 – 0.25]. (C) Protein expression level of HDAC6 in GBM samples. Z-values represent standard deviations from the median across samples for the given cancer type. Log2 Spectral count ratio values from CPTAC were first normalized within each sample profile, then normalized across samples. (D) Representative protein staining images of HDAC6 in glioma and normal brain tissues, obtained from Human Protein Atlas (HPA, https://www.proteinatlas.org/), are shown.

Figure 2. WT161 decreased the viability, increased acetylated α-tubulin, arrested cell cycle and decreased clonogenicity of GBM. (A-C) Cell viability of glioblastoma (GBM) cells treated with different concentrations of (A) WT161 or (B) temozolomide (TMZ) for 48 h was measured by MTT assay. (C) IC50 values were determined using the CalcuSyn® software and showed to WT161 (table above) and TMZ (table bellow). (D) GBM cells were subjected to IC50 concentrations of WT161 for 48 h. Representative western blot images (left) and relative densitometric bar graphs (rigth) of acetyl-α-tubulin relative to total α-tubulin are showed. (E) Cell-cycle distribution of GBM cell lines was assessed after treatment with IC50 concentrations of WT161 for 24 hours. Representative flow cytometric histograms (above) and bar graphs (shown below) illustrating the cell cycle distribution are presented. (F) Clonogenic growth of U251, U87, and T98G cells was evaluated after treatment with serial doses of WT161 for 48 hours, followed by recovery in drug-free medium for an additional 7-10 days. Data are presented as mean ± SD (n = 3), and representative photographs of colony formation are shown below. ANOVA followed by Dunnett's post-test compared to DMSO (*p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001).

Figure 3. WT161 acts synergistycally with TMZ in GBM cells. Sequence-dependent interactions between WT161 and TMZ in U251, U87, and T98G cells. Plots of the combination index (CI) from GBM cell lines exposed to WT161 and TMZ using different schedules of administration: simultaneous (TMZ+WT161) exposures and sequential (TMZ→WT161 or WT161→TMZ) exposures at different molar ratios of the agents (TMZ:WT161). The line across the CI value of 1 indicates additivity; CIs above and below indicate antagonism and synergism, respectively. Crosses represent the CIs of the actual data points and continuous lines represent computer-derived CIs at effect levels ranging from 10 to 100% inhibition of clonal growth according with CalcuSyn® software.

Figure 4. WT161 induces apoptosis and enhances TMZ-induced apoptosis in GBM cells. (A) Representative flow cytometry histograms (left) and bar charts (right) showing the percentage of the total apoptotic cell population in U251, U87, and T98G cell lines, as determined by annexin V/ PI staining and flow cytometry. In all cases, cells were treated for 48 h. U251 cells were treated with DMSO, 400µM TMZ, 10µM WT161, or simultaneous combination (TMZ+WT161). U87 cells were treated with DMSO, 400µM TMZ, 15µM WT161 or TMZ+WT161. T98G cells were treated with DMSO, 1500µM TMZ, 2µM WT161 or TMZ+WT161. (B) Representative western blot images showing the levels of full-length PARP, cleaved PARP, and α-tubulin after treatment of U251, U87, and T98G cells (above). All cells were subjected to the same treatments used in the annexin V/PI staining assays. The mean ± standard deviation of densitometry values and the ratio of cleaved PARP protein concentrations, calculated from three independent experiments, are represented by bar charts (below). Statistical significance is indicated as *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 compared to the control treatment (DMSO). Significant differences between the combined treatment and isolated treatments are also shown with *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Figure 5. WT161 decreases migration and cell invasion capacities associated to reduction of β-catenin in GBM cells. (A) Wound-healing assays were conducted in GBM cells by creating wounds in cell monolayers before treating with WT161 (2 or 4 µM) for 24 hours. Representative images of the wound gaps at 0 and 24 hours for each treatment, relative to the 4 µM WT161, are shown above to illustrate the maximal degree of inhibition of cell migration. The bars below represent the mean ± SD of three independent experiments, showing the percentage of the migrated area for each cell line. **(B)** An invasion assay was conducted using transwell chambers coated with Geltrex™ to evaluate U251, U87, and T98G cells, 24 hours after treatment with WT161. Representative images of cell invasion through the Boyden chamber are shown (above). The mean values of invasive cells are graphed relative to the WT161 concentration (below). **(C)** Western blot analysis showing β-catenin protein expression in U251, U87 and T98G cells treated with IC50 values of

WT161 or with the control (DMSO). α-Tubulin was used as a loading control. Data represent mean ± SD (n = 3). Data are presented as mean ± SD from three independent experiments. Statistical significance was determined using Student's t-test compared to DMSO (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

Figure 6. Relative growth kinetics and cell migration of 3D cultures after treatment with WT161, TMZ, or both drugs. **(A)** 3D structures of GMB cells were formed in non-adherent conditions. U251 and T98G cells were seeded onto 96-well plates coated with 1.5% agarose and cultured for 4 days (day 0). The 3D cultures were treated with DMSO, WT161, TMZ, or WT161+TMZ, cultivated for 6 days and imaged at the time points indicated in each experiment. Area measurements was analyzed on day 0, 3 and 6 after treatment, normalized to the volume of spheroids on day 0, and values are reported as mean and standard deviation of the fold change. **(B)** Analysis of cell migration cultivated as 3D cultures after treatment with WT161. Fully formed spheroids of U251 and T98G cells were plated onto 24-well plates coated with gelatin and migration was assessed over time upon exposure to WT161. Area of cells migrated outwards the 3D structure was calculated and divided by the area of the 3D cultures on day 0. Values reported as mean and standard deviation of three independent experiments with at least 8 replicates each. Statistical significance was analyzed using the Student´s t test (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

Figure 7. WT161 metabolomics effects comparing DMSO vs. 2µM WT161 vs. 4µM WT161. A: Venn diagram; B: Heatmap of quantitative changes in differentially expressed metabolites between extracelullar and intracellular fractions after DMSO treatment. C: Heatmap of quantitative changes in differentially expressed metabolites between extracelullar and intracellular fractions after 2µM WT161. D: Heatmap of quantitative changes in differentially expressed metabolites between extracelullar and intracellular fractions after 4µM WT161. The most abundant shown in red and the least abundant in green. We considered molecular compounds that were present in 75% of samples of at least one group. Fold change > 2.00: 22 compounds. Unpaired T test; p < 0.05

Figure 8. WT161 metabolomics effects comparing Extracellular vs. Intracellular fractions. **A:** Heatmap of quantitative changes in differentially expressed metabolites among DMSO, 2µM WT161, and 4µM WT161.treatments showed in each fractions. The most abundant shown in red and the least abundant in green. We considered molecular compounds that were present in 75% of samples of at least one group. Fold change > 2.00: 22 compounds. Unpaired T test; p < 0.05.

Figures

Fig 1.

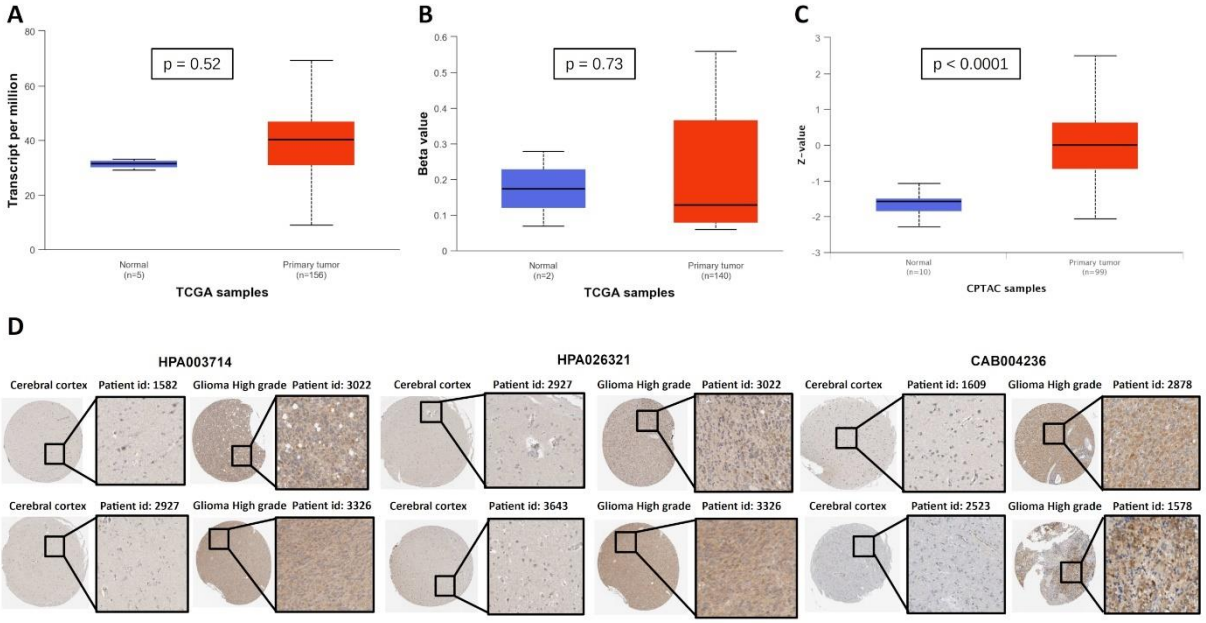

A
p = 0.52
Transcript per million
Normal (n=5)
Primary tumor (n=156)
TCGA samples
B
p = 0.73
Beta value
Normal (n=2)
Primary tumor (n=140)
TCGA samples
C
p < 0.0001
Z-value
Normal (n=10)
Primary tumor (n=99)
CPTAC samples
D
HPA003714
HPA026321
CAB004236
Cerebral cortex Patient id: 1582
Glioma High grade Patient id: 3022
Cerebral cortex Patient id: 2927
Glioma High grade Patient id: 3326
Cerebral cortex Patient id: 2927
Glioma High grade Patient id: 3022
Cerebral cortex Patient id: 3643
Glioma High grade Patient id: 3326
Cerebral cortex Patient id: 1609
Glioma High grade Patient id: 2878
Cerebral cortex Patient id: 2523
Glioma High grade Patient id: 1578

Fig 2.

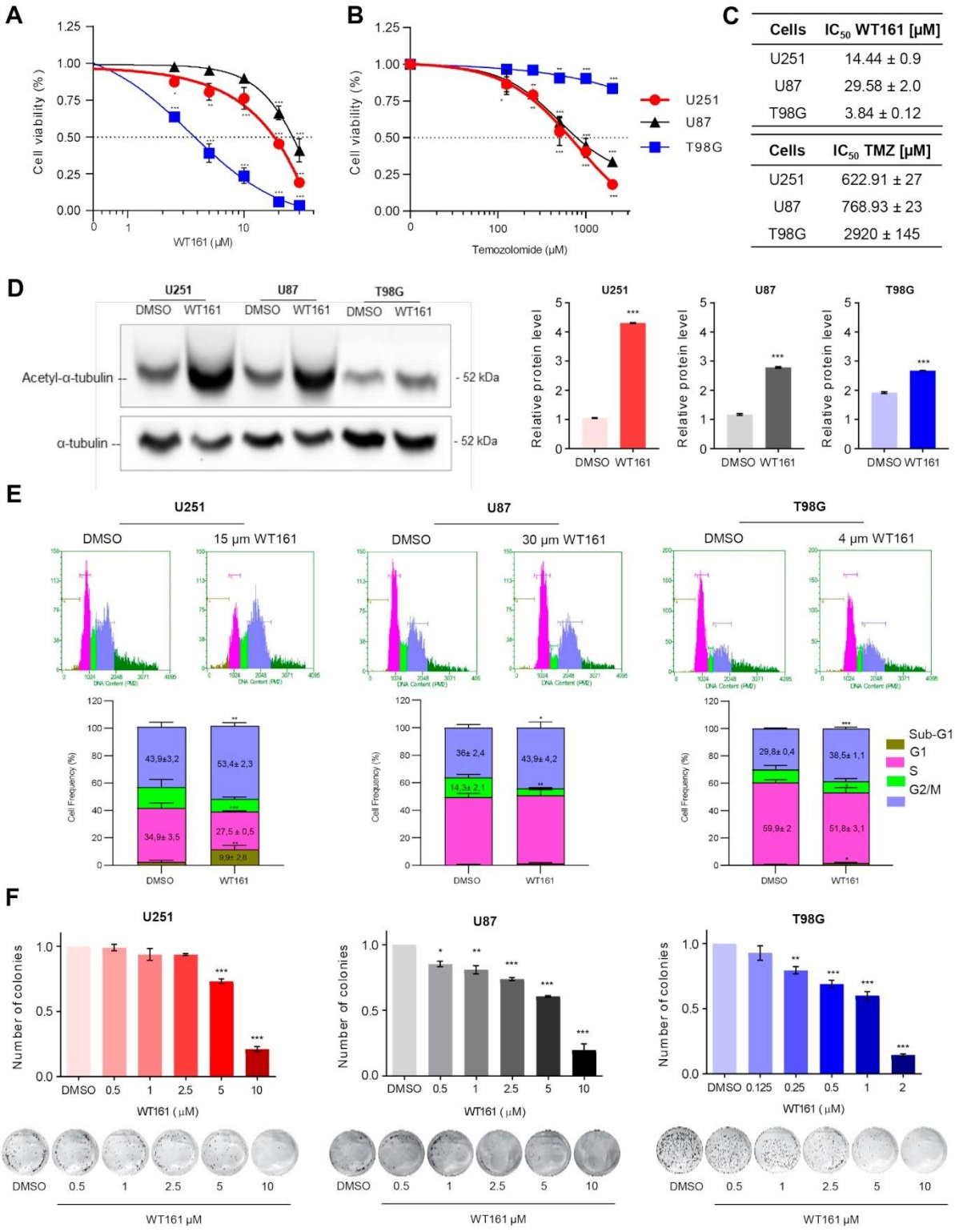

A
Cell viability (%)
WT161 (μM)
B
Cell viability (%)
Temozolomide (μM)
U251
U87
T98G
C
Cells | IC50 WT161 [μM]
U251 | 14.44 ± 0.9
U87 | 29.58 ± 2.0
T98G | 3.84 ± 0.12
Cells | IC50 TMZ [μM]
U251 | 622.91 ± 27
U87 | 768.93 ± 23
T98G | 2920 ± 145
D
U251
U87
T98G
DMSO WT161
Acetyl-α-tubulin
α-tubulin
- 52 kDa
Relative protein level
E
DMSO
15 μm WT161
30 μm WT161
4 μm WT161
Cell Frequency (%)
Sub-G1
G1
S
G2/M
F
Number of colonies
WT161 (μM)
WT161 μM

Fig 3.

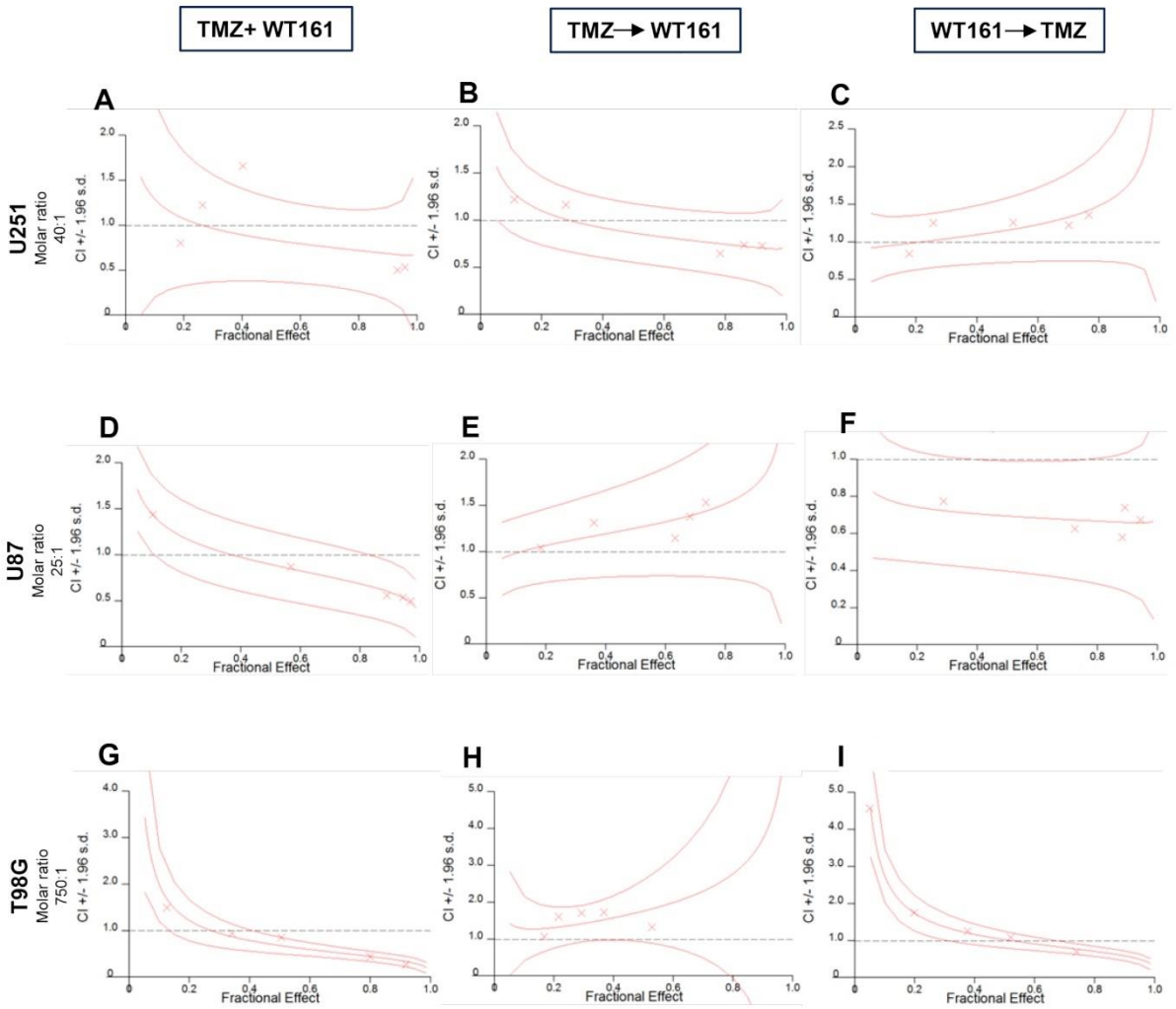

TMZ+ WT161
TMZ→ WT161
WT161→ TMZ
A
B
C
D
E
F
G
H
I
U251
Molar ratio
40:1
U87
Molar ratio
25:1
T98G
Molar ratio
750:1
CI +/- 1.96 s.d.
Fractional Effect

Fig 4.

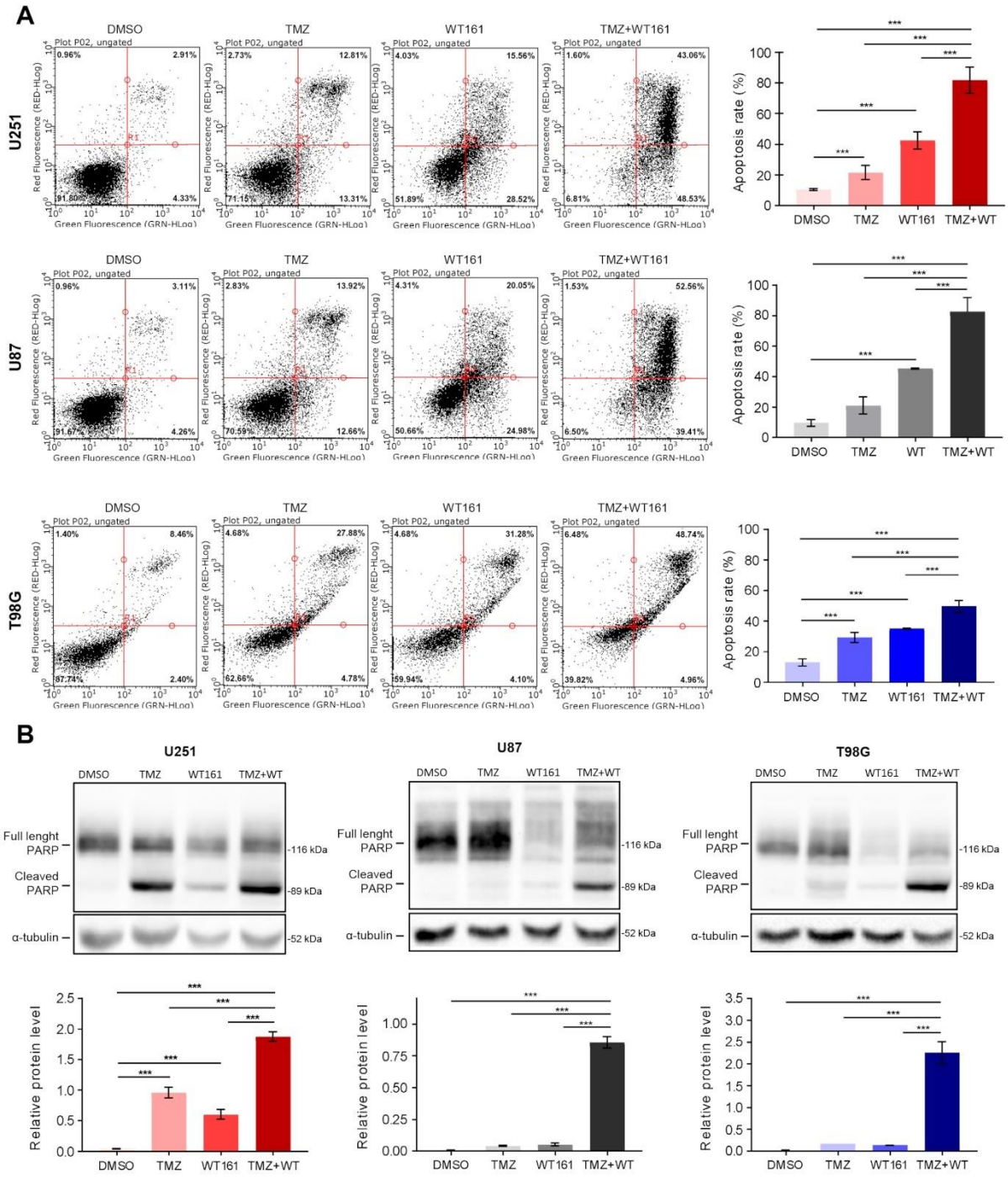

A
DMSO
TMZ
WT161
TMZ+WT161
U251
U87
T98G
Plot P02, ungated
Red Fluorescence (RED-HLog)
Green Fluorescence (GRN-HLog)
Apoptosis rate (%)
DMSO
TMZ
WT161
WT
TMZ+WT
B
U251
U87
T98G
Full lenght PARP
Cleaved PARP
α-tubulin
-116 kDa
-89 kDa
-52 kDa
Relative protein level

Fig 5.

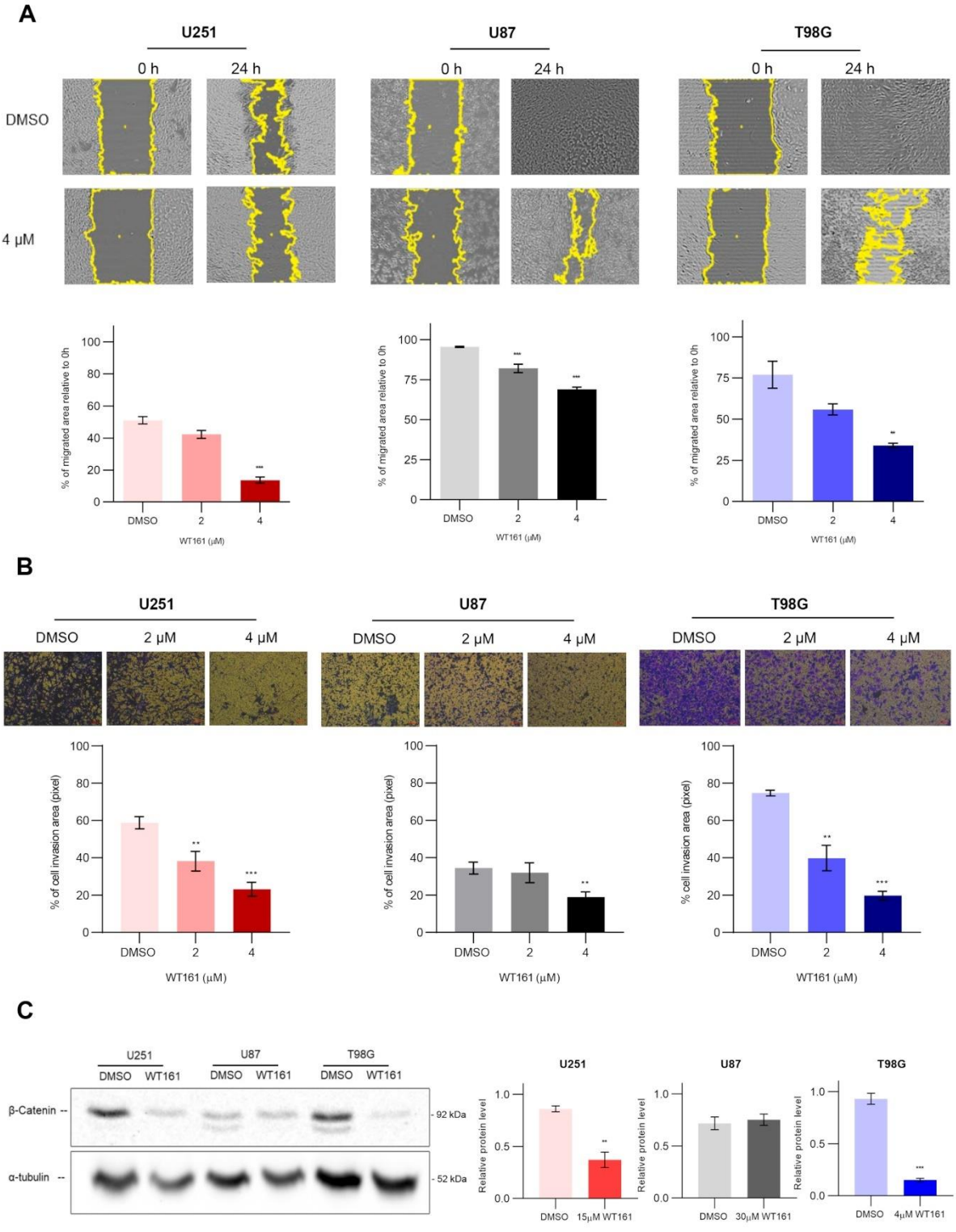

A
U251
U87
T98G
0 h
24 h
DMSO
4 μM
% of migrated area relative to 0h
DMSO
2
4
WT161 (μM)
B
DMSO
2 μM
4 μM
% of cell invasion area (pixel)
C
U251
U87
T98G
DMSO
WT161
β-Catenin --
α-tubulin --
- 92 kDa
- 52 kDa
Relative protein level
DMSO 15μM WT161
DMSO 30μM WT161
DMSO 4μM WT161

Fig 6.

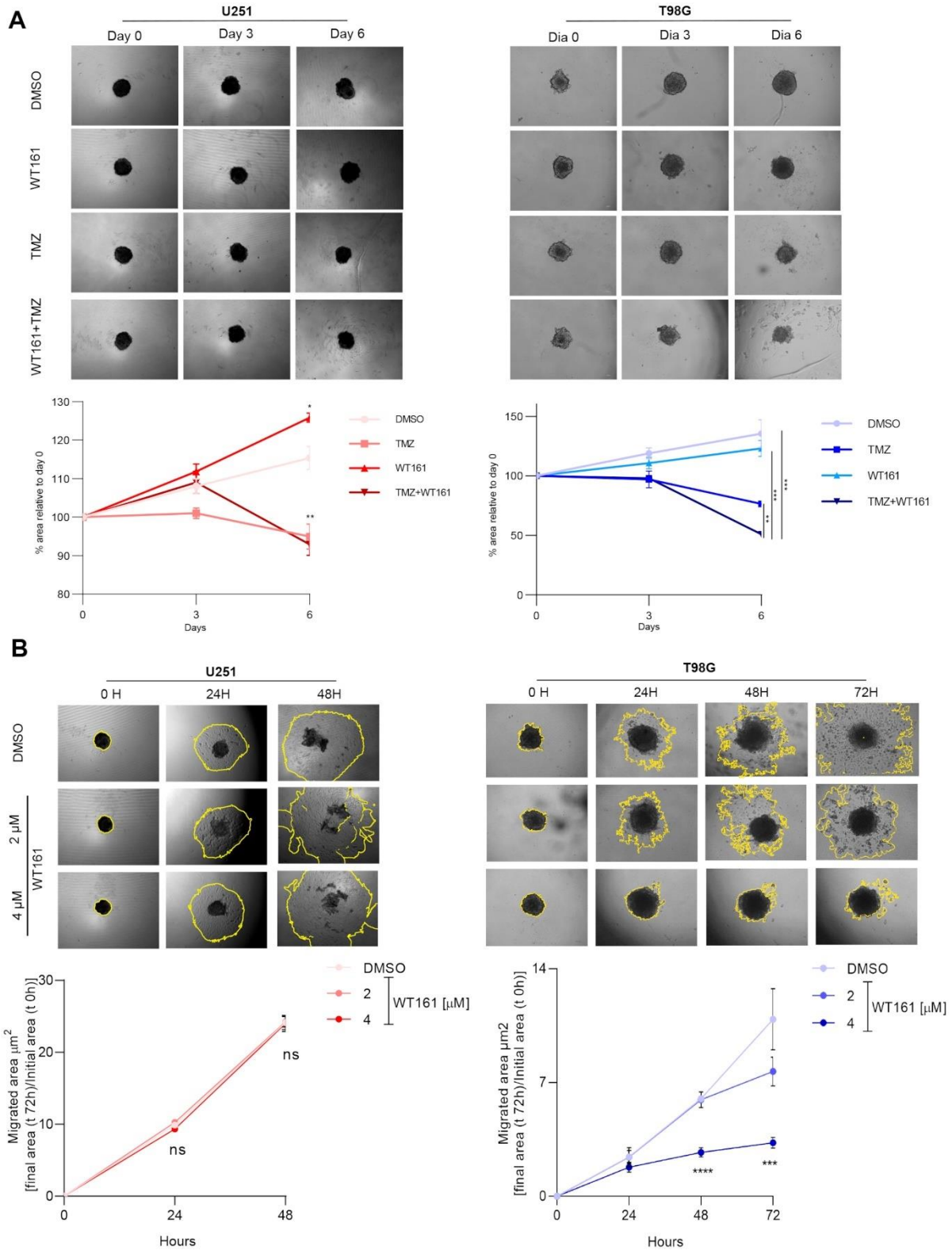

A
U251
Day 0
Day 3
Day 6
T98G
Dia 0
Dia 3
Dia 6
DMSO
WT161
TMZ
WT161+TMZ
% area relative to day 0
Days
DMSO
TMZ
WT161
TMZ+WT161
B
U251
0 H
24H
48H
T98G
0 H
24H
48H
72H
2 µM
4 µM
WT161
Migrated area µm2
[final area (t 72h)/Initial area (t 0h)]
Hours
WT161 [µM]
ns
****
***

Fig 7.

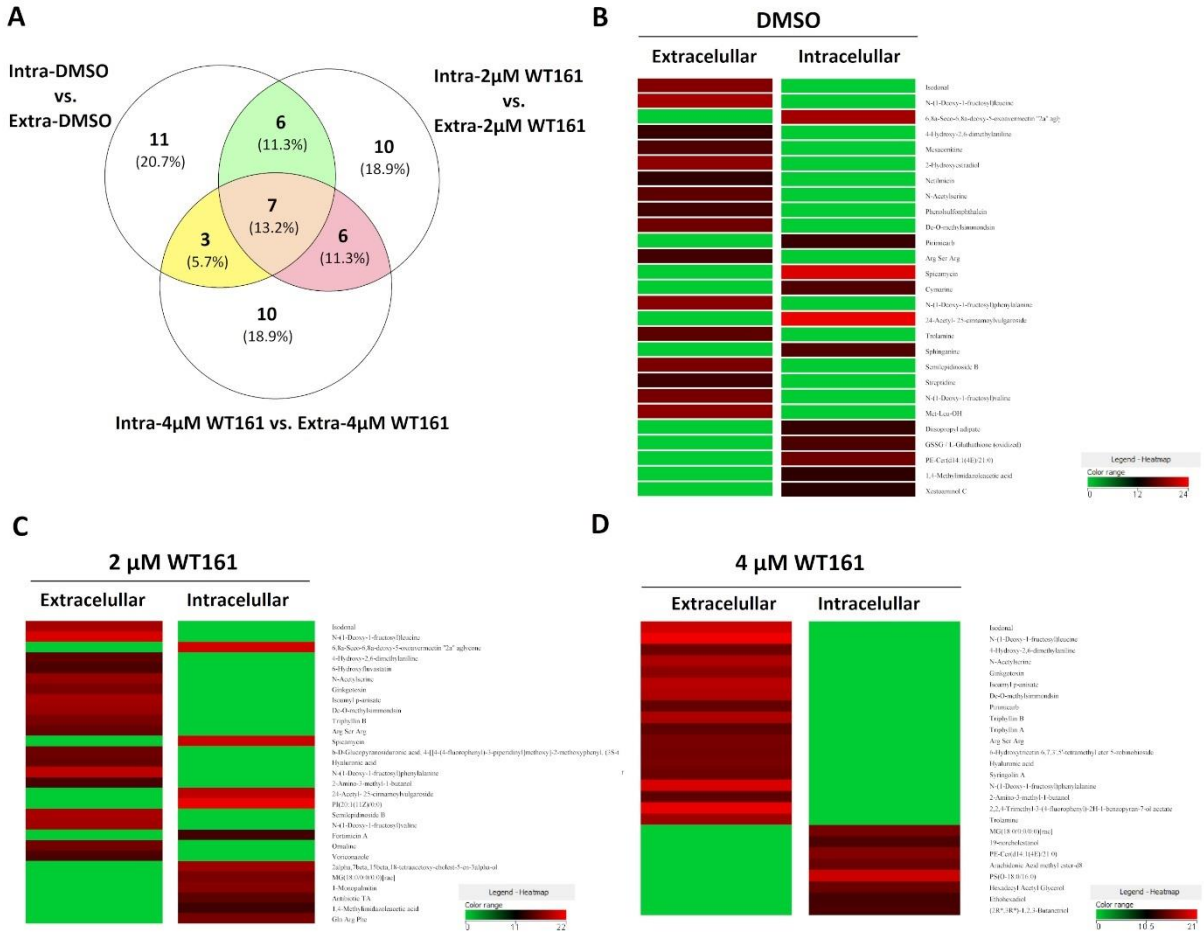
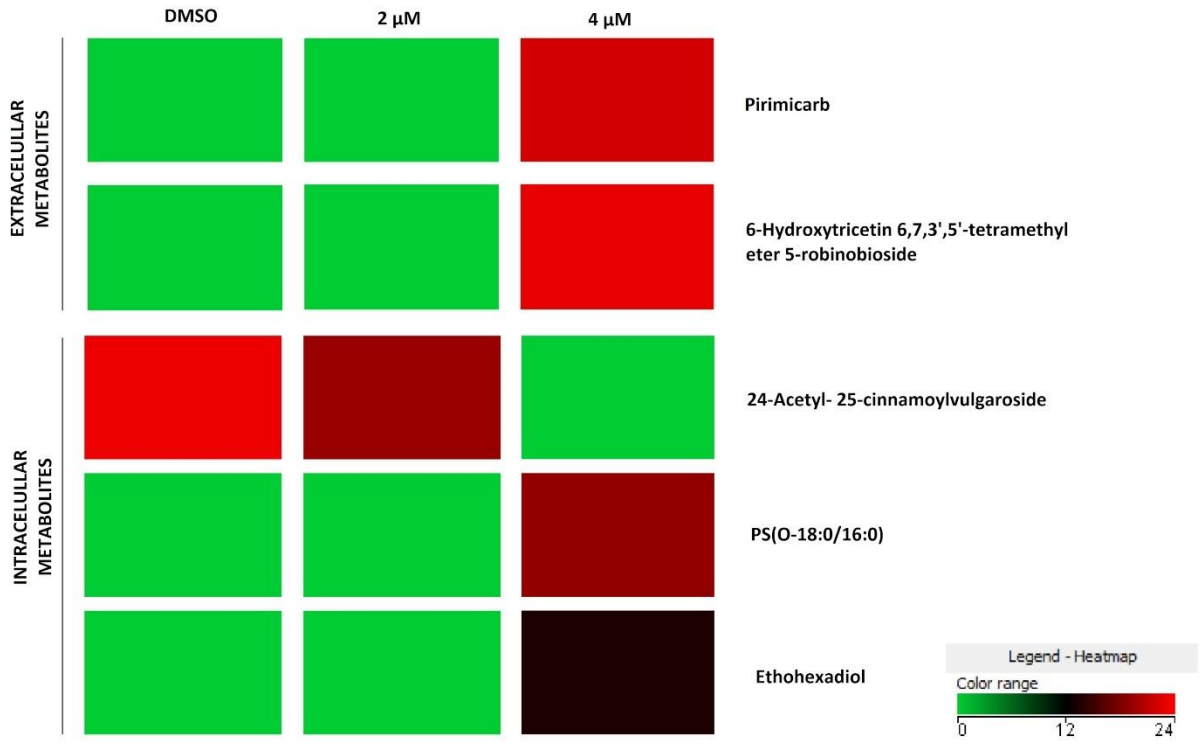

A
Intra-DMSO
vs.
Extra-DMSO
Intra-2μM WT161
vs.
Extra-2μM WT161
11
(20.7%)
6
(11.3%)
10
(18.9%)
7
(13.2%)
3
(5.7%)
6
(11.3%)
10
(18.9%)
Intra-4μM WT161 vs. Extra-4μM WT161
B
DMSO
Extracelullar
Intracelullar
C
2 μM WT161
Extracelullar
Intracelullar
D
4 μM WT161
Extracelullar
Intracelullar

Fig 8.


DMSO
2 µM
4 µM
EXTRACELULLAR METABOLITES
INTRACELULLAR METABOLITES
Pirimicarb
6-Hydroxytricetin 6,7,3',5'-tetramethyl eter 5-robinobioside
24-Acetyl- 25-cinnamoylvulgaroside
PS(O-18:0/16:0)
Ethohexadiol
Legend - Heatmap
Color range
0
12
24