

CARLOS ALEXANDRE FEDRIGO

INIBIÇÃO DA VIA PI3K-AKT EM GLIOMAS

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração Clínica Médica, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Bernardo Garicochea

Co-orientadora: Dra. Adriana Brondani da Rocha

PORTO ALEGRE

2012

CARLOS ALEXANDRE FEDRIGO

INIBIÇÃO DA VIA PI3K-AKT EM GLIOMAS

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração Clínica Médica, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovado em 29 de Maio de 2012

Banca examinadora:

Dra. Ana Lucia Abujamra

Dra. Denise Cantarelli Machado

Dr. Guido Lenz

Dr. Lauro José Gregianin

## FICHA CATALOGRÁFICA

F294i Fedrigo, Carlos Alexandre  
Inibição da via PI3K-Akt em gliomas. / Carlos Alexandre Fedrigo.  
- Porto Alegre: PUCRS, 2012.  
75f.: il. tab. Inclui artigo de periódico submetido à publicação.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Garicochea.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Adriana Brondani da Rocha.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Clínica Médica.

1. GLIOBLASTOMA/radioterapia. 2. GLIOBLASTOMA/quimioterapia. 3. GLIOMA/radioterapia. 4. GLIOMA/quimioterapia. 5. ANTINEOPLÁSICOS ALQUILANTES/toxicidade. 6. ANTINEOPLÁSICOS ALQUILANTES/antagonistas & inibidores. 7. TERAPIA COMBINADA. 8. RESULTADO DE TRATAMENTO. 9. IN VITRO. I. Garicochea, Bernardo. II. Rocha, Adriana Brondani da. III. Título.

C.D.D.616.9948

C.D.U.616.8006.48:615.28(043.2)

N.L.M.QZ 380

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia

Bibliotecária CRB 10/196

Aquele que se satisfaz com  
tudo o que digo não me é de  
nenhuma utilidade.

Confúcio

Dedico este trabalho aos meus pais e a Profa. Dra. Magdolna Maria Vozári Hampe.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Bernardo Garicochea pela orientação mesmo durante realização do meu estágio em Amsterdã.

A Profa. Dra. Adriana Brondani da Rocha pela co-orientação. Sem dúvida foi a principal pessoa, junto com a Dra. Ivana Grivicich, a me moldar no profissional que sou hoje.

Aos orientadores em Amsterdã, Dr. Peter Sminia e Prof. Dr. Godefridus J. Peters por terem me aceitado em seu centro de pesquisa e possibilitado a realização do trabalho de pesquisa.

Ao Prof. Dr. João Feliz Duarte de Moraes da Faculdade de Matemática da PUCRS pelas aulas de estatística e pelas inúmeras horas em que teve paciência de explicar cálculos e uso de programas estatísticos a um biólogo.

A Profa. Dra. Jussara Loch pelas aulas e discussões em Bioética. Aos funcionários do Centro de Oncologia da PUCRS que me ajudaram com burocracias e documentações, em especial a Márcia, Rudi e Gisele.

A Profa. Mirna Züge pelas importantíssimas aulas preparatórias para o TOEFL e aos funcionários e professores do English Office.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Governo Brasileiro por acreditar que a educação é o caminho para um futuro melhor, depositando esperança em pessoas como eu, e não privatizando e sucateando nosso país (Bolsa 3669-10-6).

A minha noiva e futura esposa, Patrícia, pela força e compreensão enquanto estivemos distantes por um longo ano para meu estágio sanduíche em Amsterdã.

Aos meus pais por terem me dado todas as condições de realização de um ótimo curso sempre com dedicação exclusiva, possibilitando que eu o realizasse na área que sempre sonhei e tenho bastante afinidade.

A Professora aposentada do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Dra. Magdolna Maria Vozári Hampe pelo ano de 2006. Se alguém foi tão responsável quanto meus pais pela formação do meu caráter, foi a senhora. Esta tese é também um sincero pedido de desculpas pela minha duvidosa não aprovação como seu aluno de Mestrado.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS .....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT .....	12
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVOS .....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1. Culturas celulares de monocamada.....	23
4.2. Tratamento.....	24
4.3. Ensaio clonogênico .....	24
4.4. Invasão celular .....	24
4.5. Proliferação em esferóides.....	25
4.6. Crescimento celular em esferóides .....	26
4.7. Quantificação protéica .....	26
4.8. Análise estatística .....	27
5. RESULTADOS .....	28
5.1. Sobrevivência celular .....	28
5.2. Capacidade de invasão.....	29
5.3. Status de PTEN e níveis protéicos de Akt Total e fosfo-Akt .....	30
5.4. Proliferação celular em esferóides .....	32
5.5. Atraso de crescimento celular em esferóides.....	33
6. DISCUSSÃO .....	36
7. CONCLUSÕES.....	39
8. REFERÊNCIAS .....	40
9. APÊNDICE .....	44
10. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	49
ARTIGO ORIGINAL.....	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de tratamento utilizado para avaliar eficácia de combinação de Temozolamida e Radiação. ....	16
Figura 2. Média de sobrevivência no experimento de Temozolamida mais Radioterapia contra Radioterapia como tratamento único. ....	16
Figura 3. Alterações genéticas frequentes na rota de sinalização PI3K-Akt em GBM humanos. ....	18
Figura 4. Rota PI3K-Akt. ....	19
Figura 5. Sobrevivência clonogênica. ....	29
Figura 6. Inibição de invasão. ....	30
Figura 7. Níveis de PTEN, Akt Total e fosfo-Akt em U87MG. ....	31
Figura 8. Inibição de proliferação em esferóides. ....	32
Figura 9. Atraso de crescimento celular em esferóides de U87MG. ....	34



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação WHO de tumores astrocíticos.....	14
Tabela 2. Rotas genéticas comumente alteradas de GBM primários e secundários.	17
Tabela 3. Status de PTEN e MGMT nas linhagens celulares utilizadas.....	23
Tabela 4. Redução de tamanho de esferóides de U87MG no dia 15.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS

BBB: *Blood brain barrier*

EGFR: *Epidermal growth factor receptor*

EORTC: *European Organization for Research and Treatment of Cancer*

GBM: Glioblastomas multiformes

IDH: isocitrato desidrogenase

LGG: *low-grade gliomas*

LOH: *Loss of Heterozygosity*

MGMT: O<sup>6</sup>-Metil Guanina-DNA Metil Transferase

MMR: *Mismatch repair*

MTIC: Metil-Triazeno-Imidazol-Carboxamida

NCIC: *National Cancer Institute of Canada*

O<sup>6</sup>-BG: O<sup>6</sup>-benzilguanina

PDK1: 3'-phosphoinositide-dependent kinase 1

PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase

PTEN: *Phosphatase and tensin homology*

RT: Radioterapia

RTK: *Receptor tyrosine kinase*

TMZ: Temozolamida, Temodal

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

WHO: *World Health Organization*

## RESUMO

O Glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo mais maligno e mais comum de todos tumores astrocíticos. O tratamento atual para pacientes de GBM envolve máxima remoção cirúrgica, seguida de radio e quimioterapia, normalmente com o agente alquilante Temozolamida (TMZ). Apesar da agressividade da terapia combinada, o tempo de sobrevivência dos pacientes ainda é baixo. Este trabalho procurou investigar os efeitos citotóxicos do inibidor de Akt MK-2206 em combinação com irradiação (RT) e TMZ em um painel de células de gliomas humanos. Sete linhagens de glioma foram cultivadas e testadas em ensaio de sobrevivência clonogênica, inibição de invasão, e modelos de proliferação e crescimento de volume em esferóides. O inibidor MK-2206 e TMZ foram adicionados em diferentes tempos de tratamento e diferentes doses. As culturas foram irradiadas com doses únicas ou em terapias fracionadas com irradiação  $\gamma$ . A modulação celular de Akt e fosfo-Akt foi checada via *Western Blot*. O composto MK-2206 reduziu a fosforilação da proteína chave Akt na via PI3K, diminuindo a sobrevivência celular e inibindo invasão, proliferação e crescimento celular. A combinação de MK-2206 com RT levou a uma maior inibição de invasão e proliferação, o que não é observado somente com a RT. O efeito radiosensível de MK-2206 foi ainda maior na inibição do volume dos esferóides em terapia combinada com RT fracionada, sendo ainda maior do que o efeito combinado com TMZ. MK-2206 aumentou os efeitos *in vitro* de RT e TMZ em termos de redução de sobrevivência celular, invasão, proliferação e crescimento celular em gliomas malignos. Os efeitos podem ser atribuídos a inibição da via PI3K-Akt.

Palavras-chave: MK-2206, glioblastoma, radiação, temozolomide, PI3K-Akt.

## ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GMB) is the most malignant and common type of all astrocytic tumours. Current standard treatment for GBM patients involves maximum surgical resection of the tumour, followed by radiotherapy and chemotherapy, usually containing the alkylating agent Temozolomide (TMZ). Despite this aggressive combination therapy, the survival rate of GBM patients is still low. This work consisted in investigating the cytotoxic effects of Akt-inhibition by MK-2206 with irradiation (RT) and TMZ on *in vitro* human malignant glioma. Seven malignant glioma cell lines were cultured and tested for clonogenic survival, invasion inhibition, tumour spheroid growth and proliferation. The Akt-inhibitor MK-2206 and TMZ were added at different time treatments and in varying doses. Cultures were irradiated with single dose and with fractionated  $\gamma$ -irradiation. Cellular modulation of Akt and p-Akt were assessed by Western blot analysis. MK-2206 reduced the levels of phospho-Akt key protein in the PI3Kinase-Akt pathway, decreased cell survival, and inhibited invasion, proliferation and cell growth. The combination of MK-2206 and RT lead to enhanced inhibition of cell proliferation and invasion, which is not observed with RT alone. The radioenhancing effect of MK-2206 was most striking in inhibition of spheroid volume growth by fractionated RT; the radiosensitizing effect of MK-2206 was stronger than that of TMZ. MK-2206 enhanced the *in vitro* effects of RT and TMZ in terms of decreased cell survival, invasion, proliferation and growth in malignant glioma. Effects could be ascribed to inhibition of PI3K-Akt pathway.

*Key words:* MK-2206, glioblastoma, radiation, temozolomide, PI3K-Akt.



## 1. INTRODUÇÃO

A incidência dos tumores primários do Sistema Nervoso Central (SNC) é de 7 para cada 100.000 pessoas por ano, representando menos de 2% de todos tumores malignos em humanos. (Furnari, Fenton et al, 2007) Os tumores do SNC são classificados pela Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization – WHO*) de acordo com o grau de malignidade, características histológicas e alterações genéticas. (Louis, Ohgaki et al, 2007) Os gliomas são tumores histologicamente heterogêneos originados das células da glia e possuem uma enorme capacidade invasiva. (Wen e Kesari, 2008) Os diferentes graus destes tumores são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação WHO de tumores astrocíticos. (Louis, Ohgaki et al, 2007)

	WHO Grau			
	I	II	III	IV
Tumores astrocíticos				
Astrocitoma subependimário de células gigantes	X			
Astrocitoma pilocítico	X			
Astrocitoma pilomixóide		X		
Astrocitoma difuso		X		
Xantoastrocitoma pleomórfico		X		
Astrocitoma anaplásico			X	
Glioblastoma				X
Glioblastoma de células gigantes				X
Gliosarcoma				X

Os glioblastomas multiforme (GBM) são os tumores cerebrais mais comuns e agressivos em adultos, e conforme a WHO, de Grau IV. Ainda, de acordo com suas características clínicas, podem ser separados em duas categorias: os primários, ou *de novo*, quando evoluem diretamente de células tronco precursoras ou astrócitos, respondendo por 90% dos casos, e os secundários, quando evoluem de GBM de menor grau. Devido a características como alta capacidade mitótica, proliferação microvascular (angiogênese), presença de áreas necróticas e crescimento infiltrativo,

são extremamente difíceis de tratar, apresentando um baixo prognóstico com uma sobrevivência média de apenas um ano após diagnóstico. (Kleihues, Louis et al, 2002; Louis, Ohgaki et al, 2007)

Esta taxa de sobrevivência é de menos de 30% para um ano, 5% para 3 anos e somente 2,7% para 5 anos, em populações norte-americanas e européias, sem diferença entre gênero. A sobrevivência média cai drasticamente com aumento de idade. (Sant, Minicozzi et al, 2011; Johnson e O'Neill, 2012)

Os sintomas mais comuns são déficit neurológico, fraqueza motora, dores de cabeça e convulsões. (Brandes, Tosoni et al, 2008) Prognósticos favoráveis incluem idade jovem, ausência ou um mínimo déficit neurológico e ressecção cirúrgica completa. (Sathornsumetee, Rich et al, 2007)

Entretanto, procedimentos cirúrgicos que envolvem uma completa remoção não são comuns devido às capacidades invasivas e migratórias do tumor, que estão diretamente relacionadas com dano ao tecido cerebral já que não se sabe a extensão exata do tumor. (Van Nifterik, 2011)

Como uma opção de tratamento surgiu a radioterapia, que hoje é a terapia em modalidade única mais efetiva contra gliomas. Estudos com doses fracionadas em 30 partes de 2 Gy apresentaram benefícios terapêuticos, (Walker, Strike et al, 1979) sendo que hoje 50% de todos os pacientes com tumores, e 92% dos pacientes com tumores de SNC recebem radioterapia. (Joiner e Kogel, 2009)

Entretanto, desde os resultados positivos do estudo de fase III da *European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)/National Cancer Institute of Canada clinical trials group (NCIC)*, (Stupp, Mason et al, 2005), o tratamento passou a integrar o quimioterápico Temolozamida (TMZ), com o regime de tratamento apresentado na Figura 1. A TMZ é um agente alquilante imidazotetracênico, com atividade antitumoral, que sofre transformação química rápida na circulação sistêmica em pH fisiológico, formando o composto ativo MTIC (monometil-triaceno-imidazol-carboxamida). Considera-se que a citotoxicidade do MTIC deva-se principalmente à alquilação na posição O<sup>6</sup> da guanina, ocorrendo também alquilação adicional na posição N<sup>7</sup>, levando a célula à morte por dano ao DNA. (Agarwala e Kirkwood, 2000)

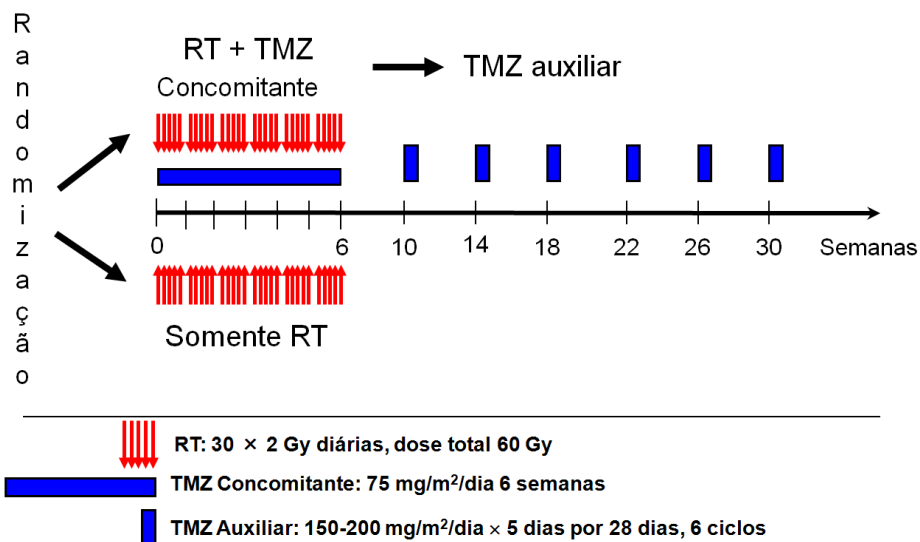


Figura 1. Esquema de tratamento utilizado para avaliar eficácia de combinação de Temozolamida e Radiação. (Stupp, Hegi et al, 2009)

Segundo este estudo, houve uma sensível melhora da sobrevivência média de 12,1 meses do grupo tratado somente com radioterapia (RT) para 14,6 meses no grupo tratado com RT mais TMZ. Em cinco anos de seguimento a taxa de sobrevivência alcançou 9,8% neste grupo comparado a somente 1,9% no primeiro (Figura 2). (Stupp, Hegi et al, 2009)

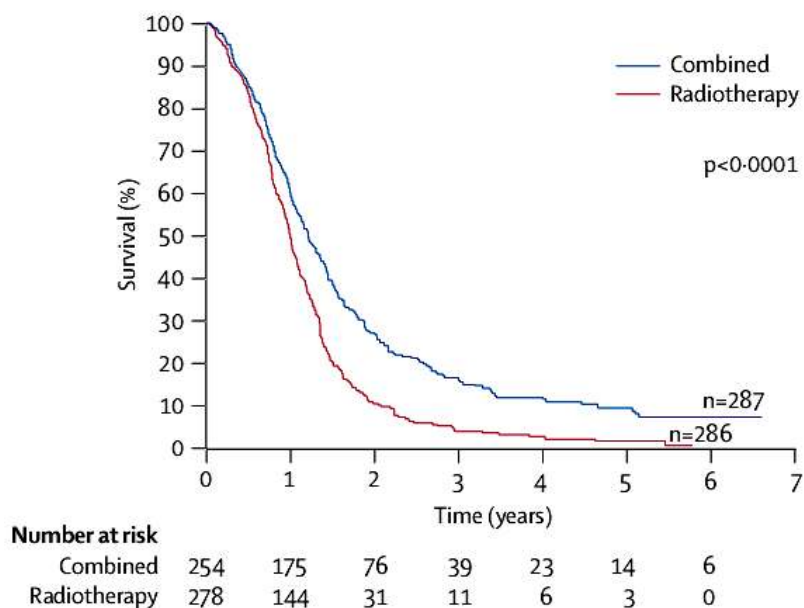


Figura 2. Média de sobrevivência no experimento de Temozolamida mais Radioterapia (Combined) contra Radioterapia como tratamento único.



O potencial radiosensível da TMZ pode ser atribuído a retenção do ciclo celular em fases G2/M, (Hirose, Berger et al, 2001) bem como a um aumento de dano em fita dupla (DSB – *double strand breaks*) no DNA. (Chakravarti, Erkinen et al, 2006) Após irradiação e TMZ, o número residual de DSB poderia ser aumentado por um ainda maior aumento de lesões, bem como uma inibição dos reparos, diretamente relacionados com a expressão de O<sup>6</sup>-Metil Guanina-DNA Metil Transferase (MGMT), que demonstra significativa correlação entre atividade da TMZ e atividade da MGMT. (Van Niflerik, Van Den Berg et al, 2007; Augustine, Yoo et al, 2009)

A introdução da TMZ na prática clínica foi um grande passo na terapia de pacientes com gliomas de alto grau, mas uma melhora deste tratamento, buscando aumentar a sobrevida através de novas terapias, é urgente.

Entre os alvos destas novas terapias estão diversas rotas metabólicas claramente superexpressadas e já identificadas em tumores. A distinção prévia em GBM primários e secundários apresenta aqui um importante fator genético, com mutações específicas em ambos, demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2. Rotas genéticas comumente alteradas de GBM primários e secundários. (Ohgaki e Kleihues, 2007)

Alteração	GBM Primário	GBM Secundário
<i>Mutação em TP53</i>	28%	65% *
LOH 10q	70%	63%
<i>EGFR</i> amplificação	36% *	8%
<i>P16INK4a</i> deleção	31%	19%
<i>Mutação em PTEN</i>	25% *	4%

\*Alterações genéticas significativamente diferentes entre GBM primários e secundários. *LOH*: Loss of Heterozygosity; *EGFR*: Epidermal growth factor receptor; *PTEN*: phosphatase and tensin homology.

Nos GBM, uma das rotas que merece destaque é a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), envolvida no crescimento e sobrevivência celular (Figura 3) e comumente associada à resistência em tratamentos. (Hennessy, Smith et al, 2005)

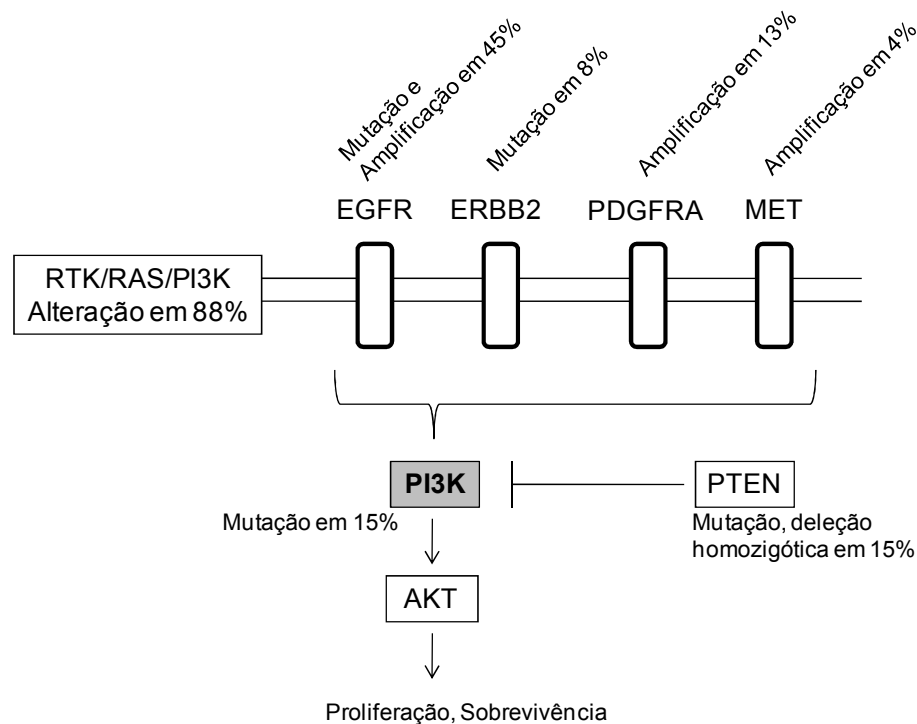


Figura 3. Alterações genéticas frequentes na rota de sinalização PI3K-Akt em GBM humanos. A natureza da alteração e porcentagem estão indicadas. (Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways, 2008). *RTK*, receptor tyrosine kinase; *PI3K*, phosphatidylinositol 3-kinase; *EGFR*: Epidermal growth factor receptor; *ERBB2*, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2; *PDGFRA*, Alpha-type platelet-derived growth factor receptor; *MET*, hepatocyte growth factor receptor; *PTEN*: phosphatase and tensin homology.

A ativação desta via, sucintamente demonstrada na Figura 4, está associada também com radio resistência (Gupta, Cerniglia et al, 2003). Já foi demonstrado, inclusive, uma menor sobrevivência de pacientes que apresentaram ativação de PI3K. (Chakravarti, Zhai et al, 2004)

A proteína PI3K é composta por duas subunidades, sendo p110 a subunidade catalítica e a subunidade p85 a regulatória. Quando ativada, converte o lipídio de membrana plasmático PI(4,5)P2 em PI(3,4,5)P3, um potente segundo mensageiro que ativará a Akt. Esta pode apresentar três isoformas: Akt1 (PKB $\alpha$ ), Akt2 (PKB $\beta$ ) e Akt3 (PKB $\gamma$ ), sendo a Akt2 81% similar à Akt1 na sequência de aminoácidos, e a Akt3 83% similar a Akt1 na sequência de aminoácidos. (Osaki, Oshimura et al, 2004) PIP3 age, por fim, como um site de ancoragem, aproximando Akt e PDK1 e permitindo que este a fosforele no resíduo Treonina 308 (Thr308), seu domínio catalítico. Por sua vez, o complexo mTOR-riCTOR (mTORC2) também contribui com

um resíduo fosfato para a Akt na Serina 473 (Ser473), no domínio helicoidal. Ambos os eventos são necessários para uma completa atividade da Akt. (Markman, Dienstmann et al, 2010)

A ativação da rota metabólica é mediada pela mutação/deleção do gene supressor de tumor PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) ou mutação/superexpressão de EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*). Já foi demonstrado que a via PI3K-Akt modula o reparo ao dano no DNA em resposta a radiação, (Kao, Jiang et al, 2007) e também que pacientes tratados com cirurgia e RT que apresentavam esta rota ativada, tinham uma menor sobrevivência, (Chakravarti, Zhai et al, 2004) sugerindo um papel na radio resistência.

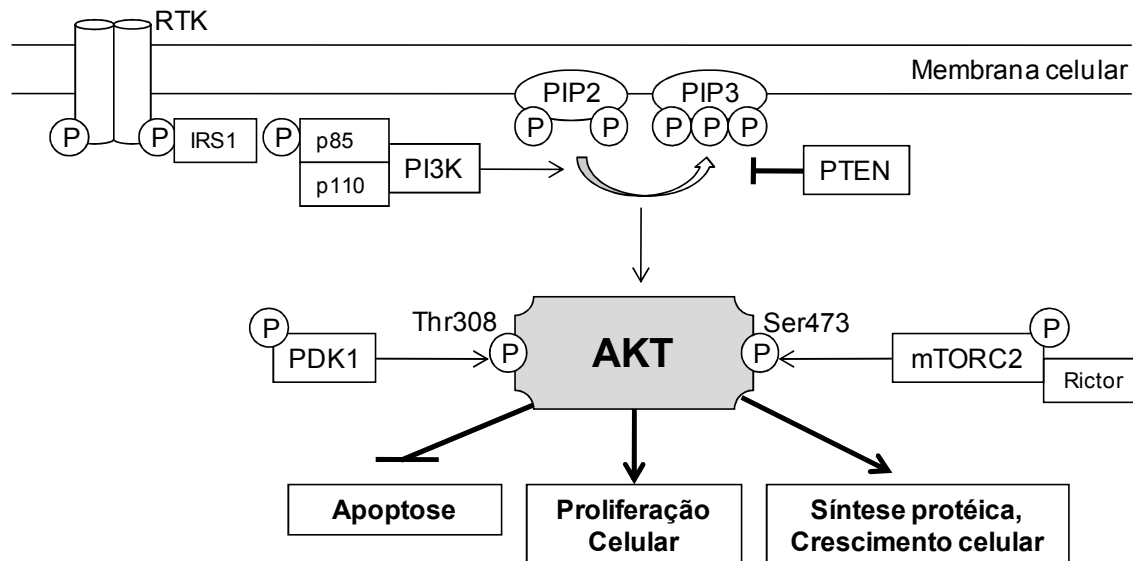


Figura 4. Rota PI3K-Akt. Receptores tirosino-quinase como IGF e RGFR, integrinas e proteínas-G podem estimular PI3K. PTEN é um antagonista da ativação de PI3K através da remoção de grupos fosfato. A geração de 3'-fosfo-inositol ativa tanto Akt quanto PDK1, que fosforila a Akt no resíduo Threonina 308. A mTORC2 pode fosforilar a Akt no resíduo Serina 473. A Akt propaga o sinal prevenindo apoptose e estimulando proliferação celular, síntese proteica e crescimento celular. *EGFR*, epidermal growth factor receptor; *IGF* insulin-like growth factor-1 receptor; *mTOR*, mammalian target of rapamycin; *PDK1*, 3'-phosphoinositide-dependent kinase 1; *PI3K*, phosphatidylinositol 3-kinase; *PI(3,4)P2*, phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate; *PI(3,4,5)P3*, phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate; *PTEN*, phosphatase and tensin homolog.

Um dos recentes compostos que atua nesta via é o inibidor alostérico MK-2206. Administrado oralmente e com capacidade de cruzar a barreira

hematoencefálica age diretamente prevenindo a fosforilação da Akt. (Tolcher, Yap et al, 2009) Artigos mostram tanto que o composto foi capaz de evitar a fosforilação de Akt induzida por radiação e aumentar a radiosensibilidade de células de U87MG, (Li, Kim et al, 2009) como aumentar a atividade de agentes citotóxicos convencionais. (Hirai, Sootome et al, 2010) Yap et al. (2011) apresentaram os primeiros dados clínicos com MK-2206 em vários tumores sólidos, com redução média na fosforilação do resíduo Ser473 de 88,8%, sendo biologicamente bem tolerado em baixas doses de mais de 1 $\mu$ M.

Entretanto, nenhum estudo clínico ou pré-clínico da interação entre MK-2206 e Temozolamida em GBM foi realizado até o momento.

## 2. JUSTIFICATIVA

O atual tratamento para glioblastomas oferece uma pequena sobrevida aos pacientes. A necessidade de melhorar os resultados oferecidos via terapias acessórias é urgente, e reflete nossa principal linha na pesquisa.

O composto sintético MK-2206 apresentou bons resultados em recentes estudos *in vitro* em combinação com diferentes quimioterápicos e está em dezenas de estudos clínicos de fase I e II, nos mais diversos tumores. Entretanto, nenhum estudo apresentou resultados da interação com temozolamida em gliomas.

Os resultados apresentados podem servir de base para um futuro estudo clínico visando aumentar o tempo de sobrevivência de pacientes acometidos por esta enfermidade.

### 3. OBJETIVOS

- Investigar o potencial de sensibilização do composto MK-2206, inibidor da via PI3K-Akt;
- Analisar a interação do composto MK-2206 com o quimioterápico Temozolomida;
- Avaliar interação com radioterapia.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Culturas celulares de monocamada

Quatro linhagens estabelecidas de GBM (U251 *wild type*), U251 TMZ *Variante Resistente*, T98G e U87MG), duas linhagens primárias de GBM (VU-28 e VU-122), e um astrocitoma de grau III (D384) foram utilizadas neste estudo. As linhagens primárias foram originalmente isoladas de amostras tumorais de pacientes com GBM submetidos a cirurgia. Ambas linhagens foram descritas geneticamente e se mostraram compatíveis com o GBM original. (Van Niffterik, Elkhuisen et al, 2006) Para gerar a linhagem resistente ao TMZ, células de U251 foram expostas a altas doses da droga e as frações sobreviventes foram repetidamente postas em cultura. As células foram mantidas em condições padrões, a 37°C em meio contendo 10% de soro fetal bovino (FCS), 2mmol 1-1L-glutamina, 100 IUml-1 penicilina e 100IUml-1 streptomycin (Invitrogen, Groningen, The Netherlands), em Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM; Gibco BRL, UK). As culturas ficaram em uma atmosfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>. As células usadas apresentavam mais de 100 passagens. Os pacientes deram consentimento escrito para os procedimentos cirúrgicos, radioterápicos e experimentais.

Tabela 3. Status de PTEN e MGMT nas linhagens celulares utilizadas. (Van Niffterik, Van Den Berg et al, 2010)

Linhagens celulares	PTEN Status	MGMT Status
U251 <i>wt</i>	Negativa	Negativa
U251 TMZ Variante resistente	Negativa	Negativa
T98G	Negativa	Positiva
U87MG	Positiva	Negativa
VU-28 (linhagem primária)	Positiva	Positiva
VU-122 (linhagem primária)	Negativa	Negativa
D384 (astrocitoma grau III)	Negativa	Negativa

*PTEN*: phosphatase and tensin homolog; *MGMT*: O<sup>6</sup>-Metil Guanina-DNA Metil Transferase; *TMZ*: Temozolamida.

#### 4.2. Tratamento

Os experimentos foram realizados em células em crescimento exponencial, exceto quando mencionado. As células eram normalmente plaqueadas dois dias antes do início dos experimentos. O agente alquilante Temozolamida (Schering-Plough®, Utrecht, The Netherlands) e o inibidor alostérico de Akt MK-2206 (Selleck Chemicals®, Houston, Texas, USA) foram dissolvidos completamente em dimetilsulfóxido (DMSO) antes de cada tratamento e diluído em meio de cultura. A concentração final do solvente não afetou a proliferação e sobrevivência celular. As células foram irradiadas em temperatura ambiente com irradiação  $\gamma$  em uma fonte de Cobalto-60 a uma taxa de 516Gy/h (Gammacell 200®; Atomic Energy of Canada, Mississauga, Ontario, Canada).

#### 4.3. Ensaio clonogênico

A sobrevivência celular após 1h ou 24h de exposição ao MK-2206 foi verificada adicionando a droga (1-10 $\mu$ M) às células uma hora após plaqueadas, durante a fase de platô. (Franken, Rodermond et al, 2006) Após, o meio foi trocado por um meio sem a droga para o restante do experimento. Para a exposição contínua de longo prazo, e para a combinação com dose única de 4Gy de irradiação, 1 $\mu$ M de MK-2206 foi adicionado ao meio de cultura das células. Após uma incubação de 10 dias, as colônias em desenvolvimento foram fixadas com etanol 100% e coloridas com solução de 5% de Giemsa (Merck®, Darmstadt, Germany). Colônias contendo 50 células ou mais foram contadas e consideradas como células com uma capacidade clonogênica não-afetada.

#### 4.4. Invasão celular

A capacidade inibitória de invasão do composto MK-2206 foi verificada através do experimento de *Boyden chamber*. Resumidamente,  $2 \times 10^5$  células foram plaqueadas em cada inserção de uma placa de 24-wells (Falcon #353504) contendo D-MEM sem FCS no compartimento superior e um meio completo no compartimento inferior, separadas por uma membrana (Matrigel) de 10% com D-MEM. Diferentes concentrações da droga, de 1 até 10 $\mu$ M, foram adicionadas em ambos compartimentos. Após 16h do plaqueamento das células a capacidade invasiva foi verificada usando-se um microscópio de fluorescência para contar o número de células que cruzaram a membrana do compartimento superior para o inferior. Na



última meia hora do experimento foram adicionados 5 $\mu$ M de Calceína AM no compartimento inferior para a dosagem via fluorescência.

Para o tratamento combinado, as células foram expostas a 1 $\mu$ M de MK-2206 por uma hora e depois irradiadas, ou expostas a 1 $\mu$ M de MK-2206 por 24h e depois irradiadas, ambos os tratamentos com 4Gy. Após 1h de tratamento combinado nas células, 2x10<sup>5</sup> células foram plaqueadas em cada inserção de uma placa de 24-wells (Falcon #353504) contendo D-MEM sem FCS no compartimento superior e um meio completo no compartimento inferior, separadas por uma membrana (Matrigel) de 10% com D-MEM. Após 16h do plaqueamento das células a capacidade invasiva foi verificada usando-se um microscópio de fluorescência para contar o número de células que cruzaram a membrana do compartimento superior para o inferior. Na última meia hora do experimento foram adicionados 5 $\mu$ M de Calceína AM no compartimento inferior para a dosagem via fluorescência.

#### 4.5. Proliferação em esferóides

Esferóides para o ensaio de proliferação de quatro linhagens foram preparados de acordo com método de *hanging drop*. (Del Duca, Werbowetski et al, 2004; Foty, 2011) Resumidamente, 3x10<sup>4</sup> células foram colocadas em uma gota de 20 $\mu$ L de Methogel (20%) com D-MEM na parte interna da tampa de uma placa de Petri estéril, e depois a tampa foi invertida para fechar a placa. Dentro da placa, 10mL de PBS foram adicionados para evitar desidratação. Após um dia os esferóides foram coletados e transferidos, cada um, para um poço numa placa de 24-wells (Corning cell culture multiwell plates #CLS3337). O tratamento foi de 1 ou 10 $\mu$ M de MK-2206 durante 96h. Para o tratamento combinado com RT, os esferóides foram submetidos a uma pré-exposição de 24h à droga e depois irradiados com dose única de 4Gy. O tamanho dos esferóides e da área tomada por células foram medidos nos tempos 0h, 24h, 48h, 72h e 96h usando-se um microscópio invertido com uma câmera conectada na ocular. A área média de proliferação dos esferóides foi medida em dois diâmetros de acordo com a fórmula  $A=\pi*r1*r2$ , onde r1 e r2 são os raios.

#### 4.6. Crescimento celular em esferóides

Esferas tumorais de U87MG foram preparadas usando-se placas de baixa aderência. Em resumo, células em crescimento exponencial em monocamada foram tripsinizadas e  $5 \times 10^6$  células foram adicionadas em cada um dos *6-wells* de uma placa de baixa aderência (*6-well ultra-low attachment plates* Corning #3471) contendo 5mL de D-MEM. Após dois dias em cultura, esferóides de diâmetro entre 150 e 250 $\mu$ m foram coletados com micropipeta, transferidos para *wells* independentes em uma placa de *24-wells* de baixa aderência (*24-well ultra-low attachment plates* Corning #3473), e cultivados individualmente. O tratamento com 1 $\mu$ M de MK-2206 começou imediatamente após coleta e isolamento em placas de *24-wells*. Para o tratamento com dose única de RT, 4Gy foram aplicados no dia 0, 1h após isolamento, e com o tratamento com TMZ, este foi adicionado 1h antes da RT. No protocolo de RT fracionada, após 3 dias de crescimento isolado os esferóides foram irradiados com 2Gy durante 5 dias, e a TMZ foi adicionada 1h antes de cada exposição à RT, como descrito previamente. (Van Niftrik, Van Den Berg et al, 2007) O tamanho dos esferóides foi medido em intervalos de 3 em 3 dias, durante 15 dias, usando-se um microscópio invertido com uma câmera acoplada na ocular. O volume do esferóide foi calculado usando a fórmula  $V = \frac{4}{3} \pi R^2 r$ , onde R= raio maior, r= raio menor. (Nirmala, Rao et al, 2001)

#### 4.7. Quantificação protéica

Para avaliar os níveis protéicos da Akt Total, e os níveis de fosfo-Akt Ser473 e fosfo-Akt Thr308 (todas com 60kDa) em culturas de monocamada, as células foram tratadas com 1 $\mu$ M de MK-2206 por 1h, irradiadas com 4Gy, ou não no grupo controle, e coletadas em diferentes tempos 0,5h, 1h, 2h e 4h. Para a quantificação de longo tempo, células foram tratadas por 1h e submetidas a RT. Após mais 1h o meio foi trocado por um livre de droga e as células foram coletadas nos tempos 24h, 48h, 72h e 96h. Para verificação do status de PTEN (54kDa), células não tratadas foram usadas. Para as culturas de esferóides, as amostras foram coletadas nos tempos 6, 9, 12 e 15 dias de tratamentos somente com 1 $\mu$ M de MK-2206, 5 doses de 2Gy de RT, combinação de ambos e controle. Análise feita com scanner Odyssey Infrared Imager (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska USA). (Mathews, Plaisance et al, 2009)

#### 4.8. Análise estatística

ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni para comparação entre múltiplos grupos. Os resultados foram considerados significativos com diferença de  $p < 0,05$  e 95% de Intervalo de Confiança. Os pressupostos teóricos da ANOVA (normalidade, homogeneidade de variância e esfericidade) foram verificados entre os tempos iniciais e finais. Os softwares GraphPad Prism 5.0, Microsoft Excel 2007 e SPSS 17 foram utilizados.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Sobrevivência celular

Um painel de 5 células de glioma (4 GBM e 1 astrocitoma de grau III), incluindo a linhagem resistente a TMZ (U251 *TMZ Variante resistente*), foram testadas para uma resposta de tratamento de 24h de exposição a diferentes concentrações de MK-2206. Os dados de sobrevivência celular apresentados na Figura 5A mostram diferentes suscetibilidades entre linhagens celulares, bem como um comportamento dose-dependente. Em combinação com RT (4Gy), uma exposição mais longa foi acessada, como demonstrado nas Figuras 5B-F. A sobrevivência clonogênica para U251 *TMZ Variante resistente* demonstrou uma melhora do tratamento quando as células foram expostas a 1 $\mu$ M de MK-2206 por 24h e irradiadas, ou quando foram continuamente expostas à droga durante 10 dias, sendo irradiadas no primeiro dia. Entretanto, apesar dos resultados animadores para esta linhagem (Figura 5C), a linhagem ainda foi mais resistente do que o tipo selvagem (Figura 5B). Isto poderia sugerir um tratamento alternativo para pacientes que adquirem resistência a TMZ. As outras linhagens não apresentaram nenhuma melhora de terapia. O uso de uma dose única de radiação no experimento é uma limitação, se comparado a um ensaio clonogênico completo, mas devido aos resultados serem limitados somente a uma linhagem decidimos não continuar no momento.

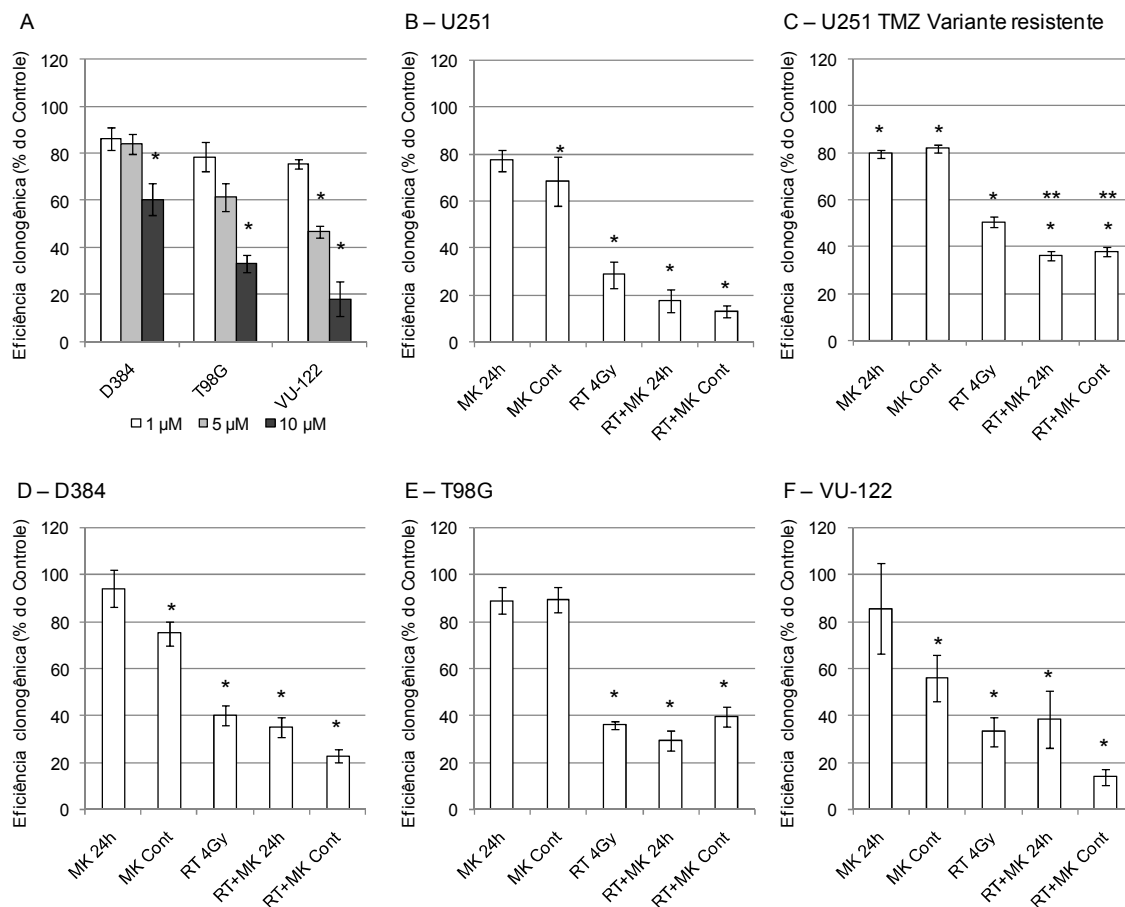


Figura 5. Sobrevivência clonogênica. (A) Após 24h de exposição de 3 linhagens em diferentes concentrações de MK-2206. (B-F) Sobrevivência clonogênica após 24h de exposição ou exposição contínua durante os 10 dias de experimento a 1μM de MK-2206 em combinação com 4Gy de RT. \* $p < 0,05$  comparado ao Controle, \*\* $p < 0,05$  comparado a 4Gy RT. Dados de dois diferentes experimentos expressos em Média±EPM. Controle em 100%. (n=6). Tabela Suplementar 1 no Apêndice com dados estatísticos.

## 5.2. Capacidade de invasão

Uma inibição dose-dependente na invasão de células foi observada com a aplicação da droga (Figura 6A) em 3 linhagens celulares. No tratamento combinado, que envolveu irradiação de células previamente expostas a 1μM de MK-2206 por 1h ou 24h, não houve melhora para U87MG (Figura 6B) e VU-122 (Figura 6E). Entretanto, para T98G (Figura 6C) e VU-28 (Figura 6D) foi observada uma maior inibição quando as células foram submetidas a uma pré-exposição de 24h à droga. Considerando-se que a invasão celular é um dos principais alvos do tratamento de gliomas, sugerimos que uma pré-incubação ainda mais longa possa prevenir ainda mais este comportamento.

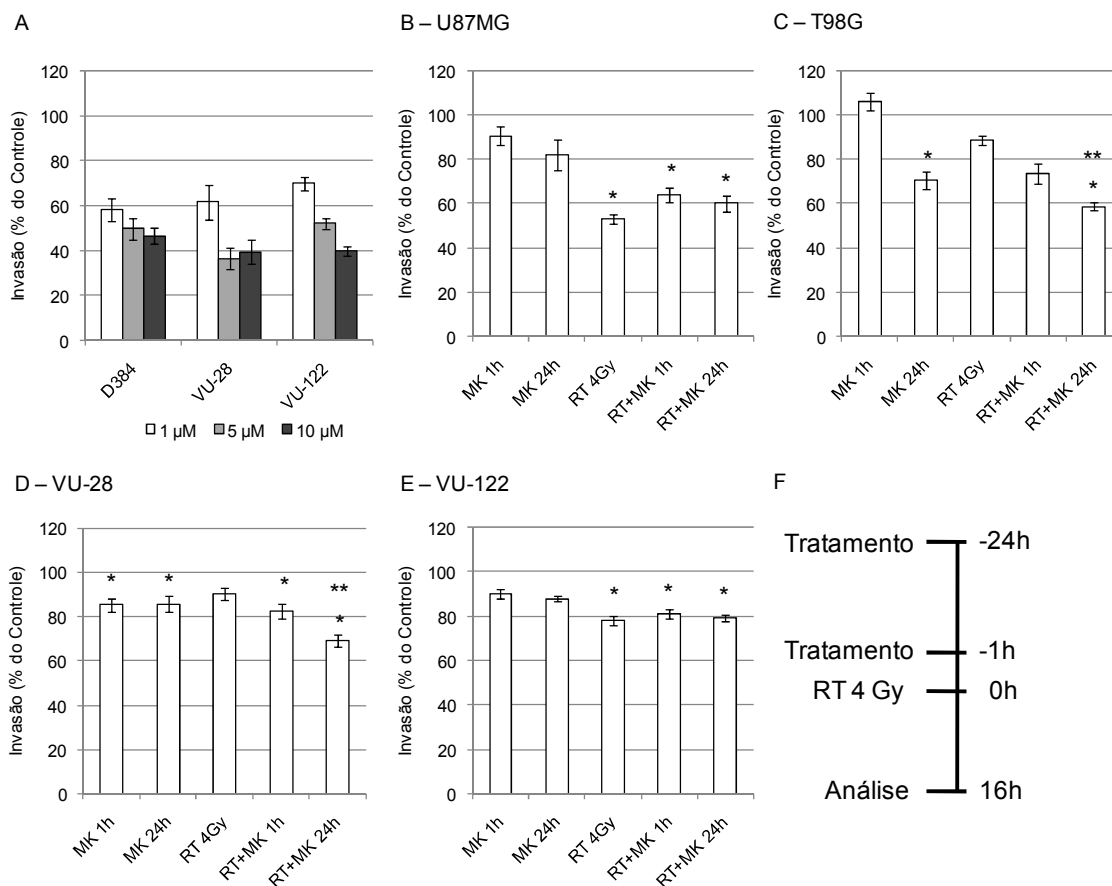


Figura 6. Inibição de invasão. (A) Grupos foram submetidos a 1h de pré-incubação com a droga e depois durante as 16h do experimento, em diferentes concentrações. Todos resultados foram significativos ( $p < 0,05$ ) comparados ao controle. (B-E) No tratamento combinado as células foram expostas a 1h ou 24h de pré-exposição, irradiadas (4Gy) e novamente submetidas a mesma concentração da droga durante as 16h do experimento, segundo esquema (F). \* $p < 0,05$  comparado ao Controle, \*\* $p < 0,05$  comparado a 4Gy RT. Dados de dois diferentes experimentos expressos em Média $\pm$ EPM. Controle em 100%. (n=8). Tabela Suplementar 2 no Apêndice com dados estatísticos.

### 5.3. Status de PTEN, níveis protéicos de Akt Total e níveis de fosfo-Akt

O status de PTEN foi avaliado em 5 linhagens celulares, somente com a linhagem VU-28 sendo bastante positiva e a linhagem U87MG levemente positiva (Figura 7A). Para acessar o papel inibitório de MK-2206 em células de glioma, determinamos os níveis de Akt Total e fosfo-Akt Ser473 e Thr308. Exposição a 1 $\mu$ M de MK-2206 reduziu a expressão de fosfo-Akt Ser473 (Figura 7B) há menos de 20% da expressão verificada no controle (para quantificação, ver Tabela Suplementar 3

no Apêndice; Para resultados nas outras células ver Figura Suplementar 1, em Apêndice). A Figura 7C mostra que após 1h de exposição à droga, os níveis de fosfo-Akt Ser473 em 72h e 96h ainda não havia retornado aos níveis do controle. Resultados similares para outras 4 linhagens. O resíduo Thr308 não apresentou diferença (Dados não apresentados). A expressão de fosfo-Akt pode indicar atividade reduzida da rota. Entretanto, entendemos que uma abordagem mais completa, envolvendo, por exemplo, a atividade de mTORC2 e PDK1, poderia dar uma noção mais completa da situação.

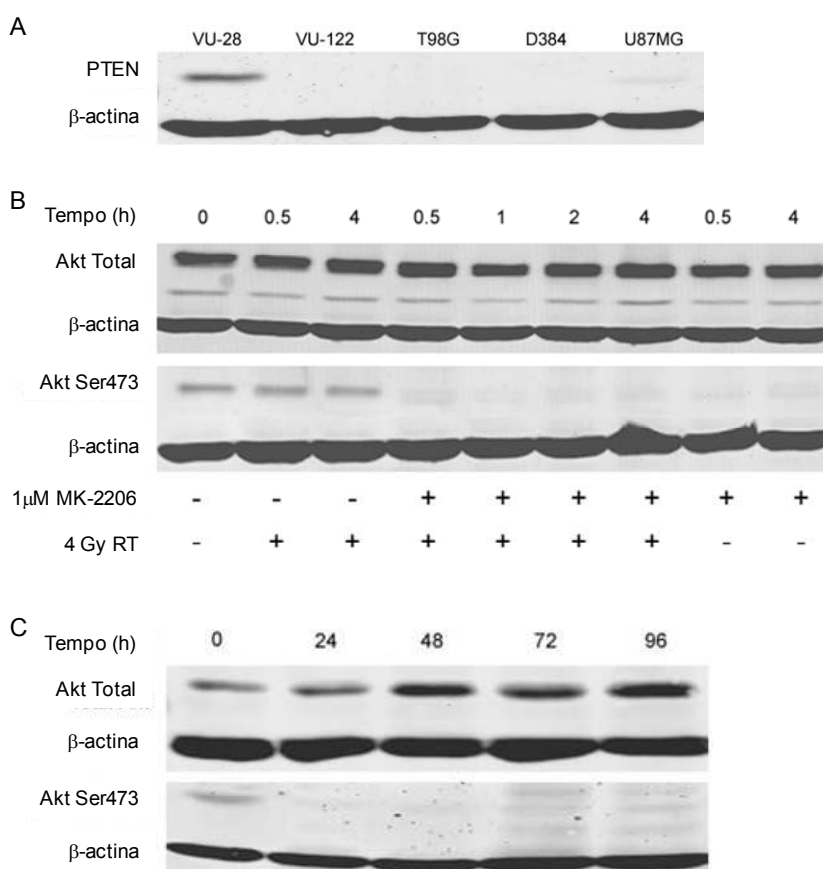


Figura 7. Níveis de PTEN, Akt Total e fosfo-Akt em U87MG. (A) Status de PTEN em 5 linhagens. VU-28 foi usada como controle. (B) Somente a irradiação (4Gy) apresentou fosforilação de Akt, sendo inibida (em 0,5h, 1h, 2h e 4h) de uma pré-incubação de 1h com 1μM MK-2206. Células não tratadas foram usadas como controle (0h). (C) Células tratadas com 1μM MK-2206 por 1h, irradiadas (4Gy) e deixadas por mais 1h na presença da droga, quando o meio foi substituído. Lisado celular foi coletado (24h, 48h, 72h e 96h) após a RT e submetido à análise. Células não tratadas usadas como controle (0h).

#### 5.4. Proliferação celular em esferóides

A proliferação radial do esferóide implantado na placa tido como o centro de um micro tumor, que reproduz pontos chave de tumores cerebrais como extensão e remodelamento da matriz, (Del Duca, Werbowetski et al, 2004) foi seguido durante 4 dias. Uma redução de proliferação celular foi observada em 4 linhagens com duas concentrações de MK-2206 (Figura 8A). Na combinação com RT (Figura 8B), um efeito radio sensível de 1 $\mu$ M de MK-2206 foi observado para a linhagem VU-28, aumentando os efeitos da radioterapia única de 4Gy. Para a outra linhagem primária, VU-122, somente o tratamento combinado apresentou diferença do controle, e para T98G, ambos os tratamentos na presença de RT apresentaram significância.

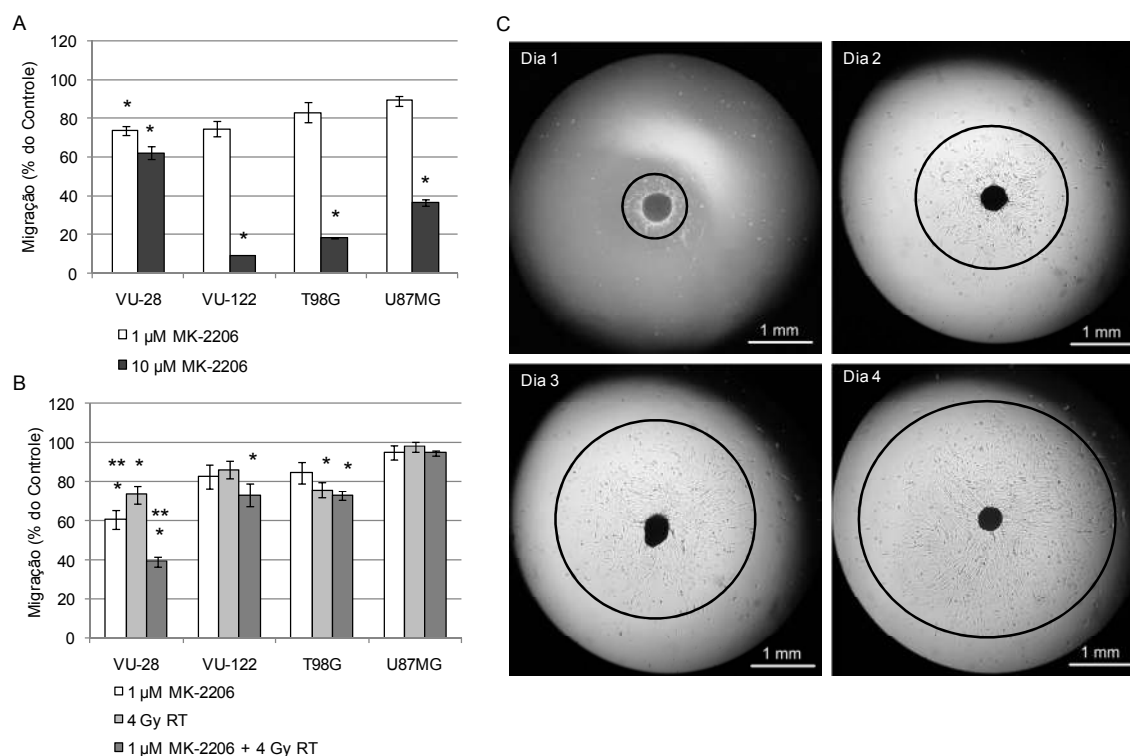


Figura 8. Inibição de proliferação em esferóides. (A) Terapia única, com esferóides sendo tratados e área medida durante 4 dias. (B) Terapia combinada, com esferóides sendo tratados por 24h com 1 $\mu$ M de MK-2206, irradiados (4Gy) no segundo dia do experimento e deixados na presença da droga nos outros 3 dias. Uma redução da área em que as células proliferaram foi significativa em VU-28, VU-122 e T98G. (C) Área de esferóides controle de U87MG seguidas durante 4 dias, 32x de aumento. \* $p < 0,05$  comparado ao Controle, \*\* $p < 0,05$  comparado a 4Gy RT. Dados de dois diferentes experimentos expressos em Média $\pm$ EPM. Controle em 100%. (n=16). Tabela Suplementar 4 no Apêndice com dados estatísticos.



### 5.5. Atraso de crescimento celular em esferóides

O volume de esferóides de U87MG após tratamento com MK-2206, Temozolomide (TMZ) e radiação foi determinado. O tratamento combinado entre 1 $\mu$ M de MK-2206 e aplicação única de 4Gy RT apresentou ótimos resultados, com uma resposta sinérgica entre tratamentos (Figura 9A). Da mesma forma, a combinação entre 1 $\mu$ M de MK-2206 com uma exposição simples de 5 $\mu$ M de TMZ também apresentou resultados positivos, ainda que menores do que o anterior (Figura 9D). Combinamos, então, 1 $\mu$ M de MK-2206 com 5 doses fracionadas de 2Gy e múltiplas exposições de 5 $\mu$ M de TMZ e os resultados foram promissores (Figura 9B-E): o volume dos esferóides de tratamentos combinados (segundo esquema na Figura 9G) foi até 10 vezes menores do que os esferóides de tratamentos singulares (Tabela 3). A quantificação de fosfo-Akt Ser473 em esferóides (Tabela Suplementar 3 no Apêndice) demonstrou a longa inibição de fosforilação quando MK-2206 foi aplicado durante os 15 dias do experimento, com ou sem radiação (Figura 9F).

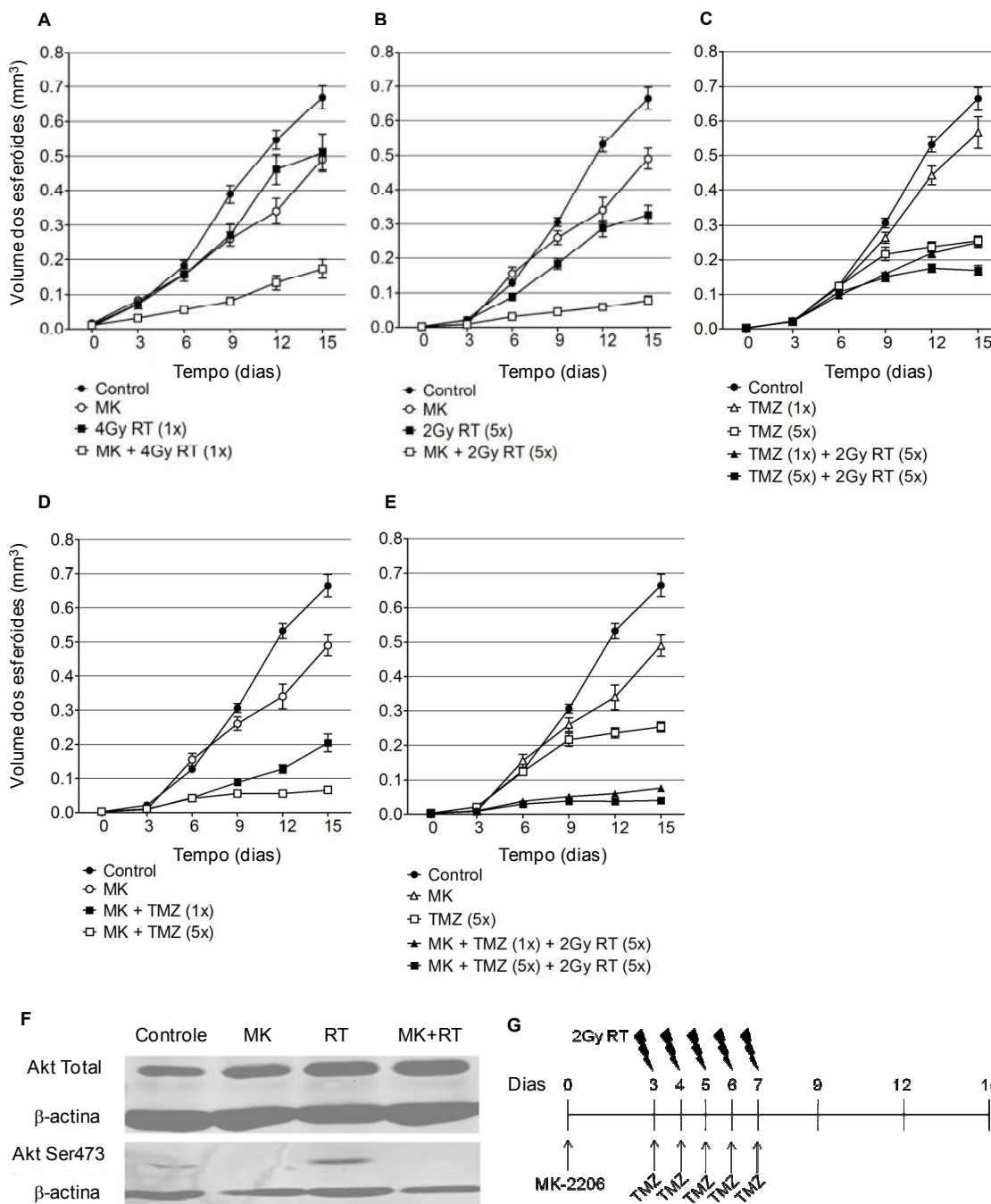


Figura 9. Atraso de crescimento celular em esferóides de U87MG. (A) 1 $\mu$ M MK-2206 mais 4Gy de RT em única aplicação. (B) 1 $\mu$ M MK-2206 e 5 aplicações de 2Gy de RT. (C) Múltiplas exposições de 5 $\mu$ M de TMZ e 5 aplicações de 2Gy de RT para simular condições clínicas de tratamento. (D) Interação entre MK-2206 e TMZ. (E) Combinação das 3 terapias de acordo com esquema em G. (F) Quantificação protéica de esferóides cultivados durante 15 dias com 1 $\mu$ M MK-2206 e 5 aplicações de 2Gy de RT. Resultados similares para 6, 9 e 12 dias não mostrados. Dados de dois diferentes experimentos expressos em Média $\pm$ EPM. (n=16). Dados estatísticos completos na Tabela 1. MK= 1 $\mu$ M MK-2206; TMZ= 5 $\mu$ M Temozolamida; RT= Radiação.

Tabela 4. Redução de tamanho de esferóides de U87MG no dia 15.

Fig	Grupos	Volume (mm <sup>3</sup> )	Razão
5A	Controle	0,669 [0,734 a 0,603]	1.00
	1 $\mu$ M MK-2206	0,490 [0,551 a 0,429]	0.71 <sup>a</sup>
	4Gy RT	0,510 [0,617 a 0,402]	0.77
	1 $\mu$ M MK-2206 + 4Gy RT	0,173 [0,226 a 0,119]	0.34 <sup>a,b</sup>
5B	Controle	0,669 [0,734 a 0,603]	1.00
	1 $\mu$ M MK-2206	0,490 [0,551 a 0,429]	0.71 <sup>a</sup>
	2Gy RT (5x)	0,327 [0,380 a 0,274]	0.50 <sup>a</sup>
	1 $\mu$ M MK-2206 + 2Gy RT (5x)	0,078 [0,102 a 0,055]	0.12 <sup>a,c</sup>
5C	Controle	0,669 [0,734 a 0,603]	1.00
	5 $\mu$ M TMZ (1x)	0,567 [0,656 a 0,478]	0.83
	5 $\mu$ M TMZ (5x)	0,254 [0,282 a 0,226]	0.38 <sup>a</sup>
	5 $\mu$ M TMZ (1x) + 2Gy RT (5x)	0,249 [0,277 a 0,221]	0.37 <sup>a</sup>
	5 $\mu$ M TMZ (5x) + 2Gy RT (5x)	0,169 [0,196 a 0,141]	0.26 <sup>a,d</sup>
5D	Controle	0,669 [0,734 a 0,603]	1.00
	1 $\mu$ M MK-2206	0,490 [0,551 a 0,429]	0.71 <sup>a</sup>
	1 $\mu$ M MK-2206 + 5 $\mu$ M TMZ (1x)	0,205 [0,256 a 0,153]	0.31 <sup>a,e</sup>
	1 $\mu$ M MK-2206 + 5 $\mu$ M TMZ (5x)	0,066 [0,082 a 0,050]	0.10 <sup>a,e</sup>
5E	Controle	0,669 [0,734 a 0,603]	1.00
	1 $\mu$ M MK-2206	0,490 [0,551 a 0,429]	0.71 <sup>a</sup>
	5 $\mu$ M TMZ (5x)	0,254 [0,282 a 0,226]	0.38 <sup>a,e</sup>
	1 $\mu$ M MK-2206+5 $\mu$ M TMZ (1x)+2Gy RT (5x)	0,076 [0,093 a 0,059]	0.11 <sup>a,d,e</sup>
	1 $\mu$ M MK-2206+5 $\mu$ M TMZ (5x)+2Gy RT (5x)	0,040 [0,047 a 0,033]	0.06 <sup>a,d,e</sup>

ANOVA com Bonferroni pós-teste. Dados de dois diferentes experimentos expressos em Média [95% IC]. (n=16). Razão= Tratamento/Controle; RT= Radioterapia; TMZ= Temozolamida.

<sup>a</sup> Diferente de Controle, p<0,05;

<sup>b</sup> Diferente de 4Gy RT, p<0,05;

<sup>c</sup> Diferente de 2Gy RT (5x) p<0,05;

<sup>d</sup> Diferente de 5 $\mu$ M TMZ (5x) p<0,05;

<sup>e</sup> Diferente de 1 $\mu$ M MK-2206 p<0,05.

## 6. DISCUSSÃO

No presente trabalho investigamos o efeito do composto MK-2206 na sobrevivência e invasão celular, expressão protéica, bem como proliferação e crescimento celular em um painel de 7 linhagens de gliomas.

A via PI3K está comumente mutada em tumores, afetando a distribuição do ciclo celular, sobrevivência celular, síntese protéica, crescimento, metabolismo, motilidade e angiogênese. A proteína Akt, *downstream* de PI3K, está também envolvida. Além destas duas, PTEN, um gene supressor de tumor de PI3K, está normalmente com menor expressão em tumores. (Markman, Dienstmann et al, 2010) Vários inibidores duplos de PI3K/mTOR, e inibidores de PI3K, Akt e mTOR estão sendo investigados em estudos clínicos de fase I e II. (Engelman, 2009) MK-2206, um novo composto sintético capaz de inibir alostericamente a Akt está sendo investigado por alguns grupos em tumores cerebrais. (Li, Kim et al, 2009; Hirai, Sootome et al, 2010) Entretanto, nenhum artigo até o presente momento estudou os efeitos da combinação com o atual tratamento padrão para glioblastomas, envolvendo radioterapia e Temozolamida.

Li et al. (2009) mostraram o potencial radiosensível de MK-2206 na linhagem de GBM U87MG após 1h de exposição à droga. Contrariamente, nós não conseguimos replicar os resultados após um período curto de incubação no ensaio clonogênico. Nós analisamos a sobrevivência celular após 24h de exposição ou continuamente, durante os 10 dias de ensaio, e somente uma linhagem apresentou benefício da presença da droga em baixa concentração (1 $\mu$ M) em combinação com radioterapia (4Gy), demonstrado na Figura 1C. Além disso, nenhum efeito antagonista foi observado nas linhagens estudadas.

Literatura recente versa sobre a importância da via PI3K-Akt na invasão celular. (Zhang, Gu et al, 2009; Kwiatkowska, Kijewska et al, 2011; Luk, Piekorz et al, 2012) O ensaio de invasão, (Marshall, 2011) aqui realizado com uma variação do *Boyden chamber system*, é uma ferramenta útil para monitorar este comportamento em células tumorais. Assim, conseguimos demonstrar que MK-2206 inibe o comportamento invasivo de células de glioma, reduzindo o número de células que foram capazes de atravessar a membrana no experimento quando submetidos ao tratamento radioterápico na presença da droga (Figuras 6C e 6D).

Nossa análise através de *western blot* mostrou que MK-2206 reduziu drasticamente os níveis da Akt fosforilada em 80% ou mais, indicando uma possível redução de atividade da via PI3K-Akt. Células que foram submetidas à RT não apresentaram fosforilação quando na presença do composto, como demonstrado por Li et al. (2009) Adicionalmente aos dados publicados por eles, onde apresentaram dados de fosfo-Akt em um único tempo (1h), realizamos uma série de checagens, indo de 0,5 até 96h em monocamada (Figuras 7B e 7C), e 15 dias em esferóides (Figura 9F), e demonstramos que mesmo após longos períodos os níveis de fosfo-Akt permaneceram inferiores ao controle. Os aumentos nos níveis protéicos de Akt Total podem ser atribuídos a um *feedback* negativo que envolve mTOR. (Chandarlapaty, Sawai et al, 2011)

Além da utilização de culturas celulares de monocamada, utilizamos também o modelo de esferóide, modelo bastante aceito como capaz de predizer melhor determinadas respostas *in vivo* quando comparadas com monocamada, devido ao contato célula-célula, variações no ciclo celular, metabolismo alterado e difusão de nutrientes e oxigênio. (Kunz-Schughart, 1999; Santini, Rainaldi et al, 1999; Sminia, Acker et al, 2003) O ensaio de proliferação celular neste modelo mede, portanto, a capacidade das células organizadas em uma estrutura tridimensional de proliferar na placa onde as esferas são fixadas. Para acessar a capacidade inibitória do composto MK-2206 em terapia única ou em combinação com RT, utilizamos esferóides formados pelo método de *hanging drop*. (Foty, 2011) A vantagem deste método é que permite iniciar com esferóides muito semelhantes em tamanho já que o número inicial de célula colocado em cada gota é conhecido. Nossos resultados mostram que houve uma redução da área em que as células foram capazes de proliferar (Figura 8A). É conhecido da literatura que doses simples de radiação, dentro do espectro utilizado neste trabalho, podem até mesmo estimular proliferação celular. (Kleynen, Stoter et al, 2003; Rieken, Habermehl et al, 2011) Entretanto, com 1 $\mu$ M de MK-2206 antes da RT, a proliferação pode ser inibida em 3 linhagens celulares (Figura 8B), mostrando que pacientes podem se beneficiar de uma terapia prévia de inibição de Akt, também demonstrado por Zhang et al. (Zhang, Chen et al, 2011)

Em outro método de formação de esferóide, utilizando agarose para evitar a fixação das células ao fundo da placa, também é possível obter neuroesferas. (Carlsson e Yuhas, 1984) Adaptamos esta metodologia utilizando placas especiais

de baixa aderência, mas o princípio é o mesmo: evitar a fixação das células e fazer com que cresçam aglomerando-se. Usando este método, esferóides de U87MG duram por até 20 dias. A desvantagem deste método é que nem todas as linhagens celulares, como observado nas utilizadas por nós, forma esferóides que se mantêm agregados por tanto tempo. Recentemente demonstramos o efeito de diferentes doses únicas de RT em esferóides, (Fedrigo, Grivicich et al, 2011) e no presente estudo utilizamos, além de dose única, um protocolo fracionado de radiação para aproximar do modelo clínico utilizado para tratar pacientes com GBM, agregando também o uso de TMZ em múltiplas doses.

Hirai et al. (2010) apresentaram dados, em modelo de monocamada, sobre a interação entre MK-2206 e diversos agentes citotóxicos, sugerindo que as interações são mais efetivas que as monoterapias. Decidimos comparar as monoterapias de MK-2206, TMZ e RT no modelo de esferóide, bem como se haveria melhora entre as diferentes combinações de tratamento. Nossos resultados mostraram uma enorme redução de volume no crescimento celular dos esferóides nas diversas combinações (Figura 9), controlando efetivamente o crescimento celular tumoral *in vitro*. Quando a TMZ foi utilizada diversas vezes não houve acúmulo entre uma dose e outra já que ela perde o efeito após 6h. (Van Rijn, Heimans et al, 2000) Em estudo de Yap et al. (2011) os primeiros dados clínicos foram apresentados, e da mesma forma que nossos experimentos *in vitro*, eles mostraram que uma administração contínua de MK-2206 é preferencial.

Além disso, como a inibição da rota PI3K-Akt é independente da metilação de MGMT, que pode levar a resistência nas terapias com TMZ, a inibição de Akt pode, eventualmente, levar a uma quebra ou evasão desta resistência. Nossos dados onde houve melhora do tratamento nas terapias combinadas são independentes do status do promotor de MGMT, o que faria do composto MK-2206 um interessante candidato em casos de GBM com o promotor da MGMT metilado, e portanto, resistente ao tratamento com TMZ.

## 7. CONCLUSÕES

O composto MK-2206 apresentou grande potencial de sensibilização com radioterapia e com o quimioterápico Temozolamida, melhorando os efeitos em algumas linhagens de gliomas em ensaios de repopulação (clonogênico), invasão, e migração celular. No ensaio de crescimento celular realizado em esferóides, o composto apresentou uma enorme interação tanto com radiação quanto com Temozolamida, apresentando efeitos aditivos e sinérgicos entre as diversas combinações.

Baseado especialmente neste último experimento, mas resguardado pelos outros, acreditamos que o composto merecerá uma atenção maior no futuro e que nosso artigo possa servir de base para eventuais estudos *in vivo*.

Além disso, ficou demonstrado que a via PI3K-Akt é, portanto, uma rota que desempenha papel crítico nos gliomas, sendo um excelente alvo para novas terapias.

## 8. REFERÊNCIAS

AGARWALA, S. S.; KIRKWOOD, J. M. Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma. **Oncologist**, v. 5, n. 2, p. 144-51, 2000.

AUGUSTINE, C. K. et al. Genomic and molecular profiling predicts response to temozolomide in melanoma. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 2, p. 502-10, Jan 15 2009.

BRANDES, A. A. et al. Glioblastoma in adults. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 67, n. 2, p. 139-52, Aug 2008.

CARLSSON, J.; YUHAS, J. M. Liquid-overlay culture of cellular spheroids. **Recent Results Cancer Res**, v. 95, p. 1-23, 1984.

CHAKRAVARTI, A. et al. Temozolomide-mediated radiation enhancement in glioblastoma: a report on underlying mechanisms. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 15, p. 4738-46, Aug 1 2006.

CHAKRAVARTI, A. et al. The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. **J Clin Oncol**, v. 22, n. 10, p. 1926-33, May 15 2004.

CHANDARLAPATY, S. et al. AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. **Cancer Cell**, v. 19, n. 1, p. 58-71, Jan 18 2011.

Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1061-8, Oct 23 2008.

DEL DUCA, D.; WERBOWETSKI, T.; DEL MAESTRO, R. F. Spheroid preparation from hanging drops: characterization of a model of brain tumor invasion. **J Neurooncol**, v. 67, n. 3, p. 295-303, May 2004.

ENGELMAN, J. A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 8, p. 550-62, Aug 2009.

FEDRIGO, C. A. et al. Radioresistance of human glioma spheroids and expression of HSP70, p53 and EGFr. **Radiat Oncol**, v. 6, p. 156, 2011.

FOTY, R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. **J Vis Exp**, n. 51, p. 2011.

FRANKEN, N. A. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat Protoc**, v. 1, n. 5, p. 2315-9, 2006.

FURNARI, F. B. et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Dev**, v. 21, n. 21, p. 2683-710, Nov 1 2007.



GUPTA, A. K. et al. Radiation sensitization of human cancer cells in vivo by inhibiting the activity of PI3K using LY294002. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 56, n. 3, p. 846-53, Jul 1 2003.

HENNESSY, B. T. et al. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 12, p. 988-1004, Dec 2005.

HIRAI, H. et al. MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. **Mol Cancer Ther**, v. 9, n. 7, p. 1956-67, Jul 2010.

HIROSE, Y.; BERGER, M. S.; PIEPER, R. O. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. **Cancer Res**, v. 61, n. 5, p. 1957-63, Mar 1 2001.

JOHNSON, D. R.; O'NEILL, B. P. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. **J Neurooncol**, v. 107, n. 2, p. 359-64, Apr 2012.

JOINER, M.; KOGEL, A. V. D. **Basic clinical radiobiology**. 4th. London: Hodder Arnold, 2009. vi, 375 p. ISBN 9780340929667.

KAO, G. D. et al. Inhibition of phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt signaling impairs DNA repair in glioblastoma cells following ionizing radiation. **J Biol Chem**, v. 282, n. 29, p. 21206-12, Jul 20 2007.

KLEIHUES, P. et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 61, n. 3, p. 215-25; discussion 226-9, Mar 2002.

KLEYNEN, C. E. et al. The effects of irradiation on cell migration from glioblastoma multiforme biopsy spheroids. **Anticancer Res**, v. 23, n. 6C, p. 4907-12, Nov-Dec 2003.

KUNZ-SCHUGHART, L. A. Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor. **Cell Biol Int**, v. 23, n. 3, p. 157-61, 1999.

KWIATKOWSKA, A. et al. Downregulation of Akt and FAK phosphorylation reduces invasion of glioblastoma cells by impairment of MT1-MMP shuttling to lamellipodia and downregulates MMPs expression. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 5, p. 655-67, May 2011.

LI, H. F.; KIM, J. S.; WALDMAN, T. Radiation-induced Akt activation modulates radioresistance in human glioblastoma cells. **Radiat Oncol**, v. 4, p. 43, 2009.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol**, v. 114, n. 2, p. 97-109, Aug 2007.

LUK, S. K. et al. The catalytic phosphoinositol 3-kinase isoform p110delta is required for glioma cell migration and invasion. **Eur J Cancer**, v. 48, n. 1, p. 149-57, Jan 2012.

MARKMAN, B.; DIENSTMANN, R.; TABERNERO, J. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway--beyond rapalogs. **Oncotarget**, v. 1, n. 7, p. 530-43, Nov 2010.

MARSHALL, J. Transwell((R)) invasion assays. **Methods Mol Biol**, v. 769, p. 97-110, 2011.

MATHEWS, S. T.; PLAISANCE, E. P.; KIM, T. Imaging systems for westerns: chemiluminescence vs. infrared detection. **Methods Mol Biol**, v. 536, p. 499-513, 2009.

NIRMALA, C. et al. Growth characteristics of glioblastoma spheroids. **Int J Oncol**, v. 19, n. 6, p. 1109-15, Dec 2001.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **Am J Pathol**, v. 170, n. 5, p. 1445-53, May 2007.

OSAKI, M.; OSHIMURA, M.; ITO, H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. **Apoptosis**, v. 9, n. 6, p. 667-76, Nov 2004.

RIEKEN, S. et al. Carbon Ion Irradiation Inhibits Glioma Cell Migration Through Downregulation of Integrin Expression. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, p. Nov 4 2011.

SANT, M. et al. Survival of European patients with central nervous system tumors. **Int J Cancer**, p. Jul 29 2011.

SANTINI, M. T.; RAINALDI, G.; INDOVINA, P. L. Multicellular tumour spheroids in radiation biology. **Int J Radiat Biol**, v. 75, n. 7, p. 787-99, Jul 1999.

SATHORNSUMETEE, S.; RICH, J. N.; REARDON, D. A. Diagnosis and treatment of high-grade astrocytoma. **Neurol Clin**, v. 25, n. 4, p. 1111-39, x, Nov 2007.

SMINIA, P. et al. Oxygenation and response to irradiation of organotypic multicellular spheroids of human glioma. **Anticancer Res**, v. 23, n. 2B, p. 1461-6, Mar-Apr 2003.

STUPP, R. et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **Lancet Oncol**, v. 10, n. 5, p. 459-66, May 2009.

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

TOLCHER, A. W. et al. **A potent oral allosteric AKT inhibitor. Presented at the 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Denver, CO, April 18-22, 2009 (abstr DDT01-1) 2009.**

VAN NIFTERIK, K. **In vitro studies on radiation and temozolomide in human glioma.** 2011. VU University, Amsterdam, The Netherlands.

VAN NIFTERIK, K. A. et al. Genetic profiling of a distant second glioblastoma multiforme after radiotherapy: Recurrence or second primary tumor? **J Neurosurg**, v. 105, n. 5, p. 739-44, Nov 2006.

VAN NIFTERIK, K. A. et al. Differential radiosensitizing potential of temozolomide in MGMT promoter methylated glioblastoma multiforme cell lines. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 69, n. 4, p. 1246-53, Nov 15 2007.

VAN NIFTERIK, K. A. et al. Absence of the MGMT protein as well as methylation of the MGMT promoter predict the sensitivity for temozolomide. **Br J Cancer**, v. 103, n. 1, p. 29-35, Jun 29 2010.

VAN RIJN, J. et al. Survival of human glioma cells treated with various combination of temozolomide and X-rays. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 47, n. 3, p. 779-84, Jun 1 2000.

WALKER, M. D.; STRIKE, T. A.; SHELINE, G. E. An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 5, n. 10, p. 1725-31, Oct 1979.

WEN, P. Y.; KESARI, S. Malignant gliomas in adults. **N Engl J Med**, v. 359, n. 5, p. 492-507, Jul 31 2008.

YAP, T. A. et al. First-in-Man Clinical Trial of the Oral Pan-AKT Inhibitor MK-2206 in Patients With Advanced Solid Tumors. **J Clin Oncol**, p. Oct 24 2011.

ZHANG, B. et al. Reduction of Akt2 inhibits migration and invasion of glioma cells. **Int J Cancer**, v. 125, n. 3, p. 585-95, Aug 1 2009.

ZHANG, X. et al. Notch1 promotes glioma cell migration and invasion by stimulating beta-catenin and NF-kappaB signaling via AKT activation. **Cancer Sci**, p. Nov 17 2011.

## 9. APÊNDICE

Tabela Suplementar 1. Médias dos ensaios clonogênicos.

Fig	Grupo	Número de colônias
5A	D384 Controle	51,33 [56,56 a 46,11]
	D384 MK-2206 1 $\mu$ M	44,00 [48,93 a 39,07]
	D384 MK-2206 5 $\mu$ M	43,67 [50,10 a 37,23]
	D384 MK-2206 10 $\mu$ M	31,00 [32,96 a 29,04] *
	T98G Controle	26,33 [32,14 a 20,53]
	T98G MK-2206 1 $\mu$ M	20,00 [22,26 a 17,74]
	T98G MK-2206 5 $\mu$ M	16,00 [18,99 a 13,01]
	T98G MK-2206 10 $\mu$ M	8,67 [9,97 a 7,36] *
	VU-122 Controle	49,33 [52,79 a 45,88]
	VU-122 MK-2206 1 $\mu$ M	37,33 [43,87 a 30,80]
	VU-122 MK-2206 5 $\mu$ M	23,00 [26,39 a 19,61] *
	VU-122 MK-2206 10 $\mu$ M	8,67 [15,85 a 1,48] *
5B	Controle	54,60 [60,06 a 49,14]
	MK-2206 24h	42,20 [47,02 a 37,38] *
	MK-2206 continuamente	37,40 [48,62 a 26,18] *
	RT 4Gy	15,60 [21,63 a 9,57] *
	RT 4Gy + MK-2206 24h	9,60 [14,73 a 4,47] *
	RT 4Gy + MK-2206 continuamente	7,00 [9,77 a 4,23] *
5C	Controle	135,00 [140,77 a 129,23]
	MK-2206 24h	107,67 [112,43 a 102,90] *
	MK-2206 continuamente	110,67 [114,92 a 106,41] *
	RT 4Gy	68,50 [74,31 a 62,69] *
	RT 4Gy + MK-2206 24h	49,00 [54,06 a 43,94] *, **
	RT 4Gy + MK-2206 continuamente	51,33 [56,78 a 45,89] *, **
5D	Controle	22,00 [24,21 a 19,79]
	MK-2206 24h	20,67 [24,09 a 17,25]
	MK-2206 continuamente	16,50 [18,69 a 14,31] *
	RT 4Gy	8,83 [10,69 a 6,98] *
	RT 4Gy + MK-2206 24h	7,67 [9,54 a 5,80] *
	RT 4Gy + MK-2206 continuamente	5,00 [6,24 a 3,76] *
5E	Controle	34,33 [40,07 a 28,59]
	MK-2206 24h	30,50 [34,31 a 26,69]
	MK-2206 continuamente	30,67 [34,27 a 27,06]
	RT 4Gy	12,33 [13,54 a 11,13] *
	RT 4Gy + MK-2206 24h	10,00 [12,82 a 7,18] *
	RT 4Gy + MK-2206 continuamente	13,50 [16,40 a 10,60] *
5F	Controle	29,00 [36,94 a 21,06]
	MK-2206 24h	24,80 [35,63 a 13,97]
	MK-2206 continuamente	16,20 [21,03 a 10,57] *
	RT 4Gy	9,60 [13,14 a 6,06] *
	RT 4Gy + MK-2206 24h	11,20 [18,11 a 4,29] *

RT 4Gy + MK-2206 continuamente 4,00 [6,06 a 1,94] \*  
 Dados de dois diferentes experimentos expressos em Média [95% IC]. (n=8).  
 \*p<0,05 comparado ao Controle; \*\*p<0,05 comparado a 4 Gy RT.

Tabela Suplementar 2. Ensaio de invasão.

Fig	Grupo	Número médio de células
6A	D384 Controle	165,14 [171,88 a 158,40]
	D384 MK-2206 1µM	117,43 [132,79 a 102,07] *
	D384 MK-2206 5µM	85,14 [92,07 a 78,21] *
	D384 MK-2206 10µM	67,29 [75,93 a 58,64] *
	VU-28 Controle	91,75 [108,18 a 75,32]
	VU-28 MK-2206 1µM	56,50 [74,08 a 38,92] *
	VU-28 MK-2206 5µM	33,50 [46,26 a 20,74] *
	VU-28 MK-2206 10µM	36,25 [41,99 a 30,51] *
	VU-122 Controle	171,57 [183,34 a 159,80]
	VU-122 MK-2206 1µM	145,57 [159,50 a 131,64] *
	VU-122 MK-2206 5µM	119,86 [127,40 a 112,31] *
	VU-122 MK-2206 10µM	76,71 [83,99 a 69,43] *
	6B U87MG	Controle
MK-2206 1h		118,63 [129,37 a 107,88]
MK-2206 24h		107,75 [132,72 a 82,78]
RT 4Gy		69,38 [98,91 a 39,84] *
RT 4Gy + MK-2206 1h		83,88 [108,89 a 58,86] *
6C T98G	Controle	38,33 [40,20 a 36,46]
	MK-2206 1h	40,67 [44,54 a 36,79]
	MK-2206 24h	27,00 [33,83 a 20,17] *
	RT 4Gy	34,00 [38,26 a 29,74]
	RT 4Gy + MK-2206 1h	28,17 [34,60 a 21,74]
6D VU-28	Controle	78,75 [82,28 a 75,22]
	MK-2206 1h	69,75 [74,95 a 64,55]
	MK-2206 24h	67,63 [72,44 a 62,81] *
	RT 4Gy	73,25 [77,24 a 69,26]
	RT 4Gy + MK-2206 1h	65,75 [70,03 a 61,47] *
6E VU-122	Controle	150,13 [169,11 a 131,14]
	MK-2206 1h	135,38 [142,88 a 127,87]
	MK-2206 24h	131,75 [135,97 a 127,53]
	RT 4Gy	117,50 [124,09 a 110,91] *
	RT 4Gy + MK-2206 1h	122,00 [128,58 a 115,42] *
	RT 4Gy + MK-2206 24h	119,13 [123,74 a 114,51] *

Dados de dois diferentes experimentos expressos em Média [95% IC]. (n=8).  
 \*p<0,05 comparado ao Controle; \*\*p<0,05 comparado a 4 Gy RT.

Tabela Suplementar 3. Quantificação de bandas de *western blot*.

Fig	Grupos	Akt Total	fosfo-Akt Ser473
7B	Controle	1	1
	4Gy RT 30min	0.665	0.770
	4Gy RT 4h	0.711	0.601
	4Gy + 1 $\mu$ M MK-2206 30min	0.938	0.180
	4Gy + 1 $\mu$ M MK-2206 1h	0.606	0.089
	4Gy + 1 $\mu$ M MK-2206 2h	0.724	0.095
	4Gy + 1 $\mu$ M MK-2206 4h	0.891	0.083
	1 $\mu$ M MK-2206 30min	0.936	ND
1 $\mu$ M MK-2206 4h	0.835	ND	
7C	Controle	1	1
	MK-2206 após 24h	0.778	0.100
	MK-2206 após 48h	1.290	0.033
	MK-2206 após 72h	1.127	0.301
	MK-2206 após 96h	1.419	0.116
9G	Controle	1.0	1.0
	1 $\mu$ M MK-2206	1.743	0.018
	4Gy RT	2.627	0.995
	4Gy + 1 $\mu$ M MK-2206	2.800	ND

Controle foi padronizado como 100% e os tratamentos normalizados. ND= não detectável. Para quantificar as bandas o resíduo de fundo foi descontado da leitura. Retângulos do mesmo tamanho foram usados em todas as bandas para quantificar a mesma área. Análise feita no Odyssey Infrared Imager.

Tabela Suplementar 4. Ensaio de proliferação em esferóides.

Fig	Linhagens	Grupos	Área (mm <sup>2</sup> )	
8A	VU-28	Controle	11.51 [13.06 a 9.95]	
	VU-28	MK-2206 1µM	8.45 [9.11 a 7.79] *	
	VU-28	MK-2206 10µM	7.13 [8.02 a 6.24] *	
	VU-122	Controle	12.13 [13.77 a 10.50]	
	VU-122	MK-2206 1µM	9.01 [10.51 a 7.81]	
	VU-122	MK-2206 10µM	1.11 [1.15 a 1.07] *	
	T98G	Controle	12.20 [13.44 a 10.96]	
	T98G	MK-2206 1µM	10.10 [11.47 a 8.74]	
	T98G	MK-2206 10µM	2.22 [2.36 a 2.07] *	
	U87MG	Controle	22.34 [23.59 a 21.08]	
	U87MG	MK-2206 1µM	19.82 [21.29 a 18.35]	
	U87MG	MK-2206 10µM	8.06 [9.10 a 7.01] *	
	8B	VU-28	Controle	4.41 [4.81 a 4.01]
		VU-28	MK-2206 1µM	2.67 [3.08 a 2.27] *, **
		VU-28	RT 4Gy	3.23 [3.62 a 2.84] *
VU-28		RT 4Gy + MK-2206 1µM	1.73 [1.95 a 1.50] *, **	
VU-122		Controle	13.42 [15.53 a 11.33]	
VU-122		MK-2206 1µM	11.08 [12.67 a 9.48]	
VU-122		RT 4Gy	11.56 [12.81 a 10.31]	
VU-122		RT 4Gy + MK-2206 1µM	9.79 [11.32 a 8.25] *	
T98G		Controle	6.39 [7.03 a 5.75]	
T98G		MK-2206 1µM	5.40 [6.17 a 4.63]	
T98G		RT 4Gy	4.83 [5.31 a 4.35] *	
T98G		RT 4Gy + MK-2206 1µM	4.66 [4.91 a 4.41] *	
U87MG		Controle	17.73 [19.59 a 15.87]	
U87MG		MK-2206 1µM	16.81 [18.18 a 15.43]	
U87MG		RT 4Gy	17.34 [18.37 a 16.30]	
U87MG	RT 4Gy + MK-2206 1µM	16.77 [17.19 a 16.36]		

Dados de dois diferentes experimentos expressos em Média [95% IC]. (n=8).

\*p<0,05 comparado ao Controle; \*\*p<0,05 comparado a 4 Gy RT.

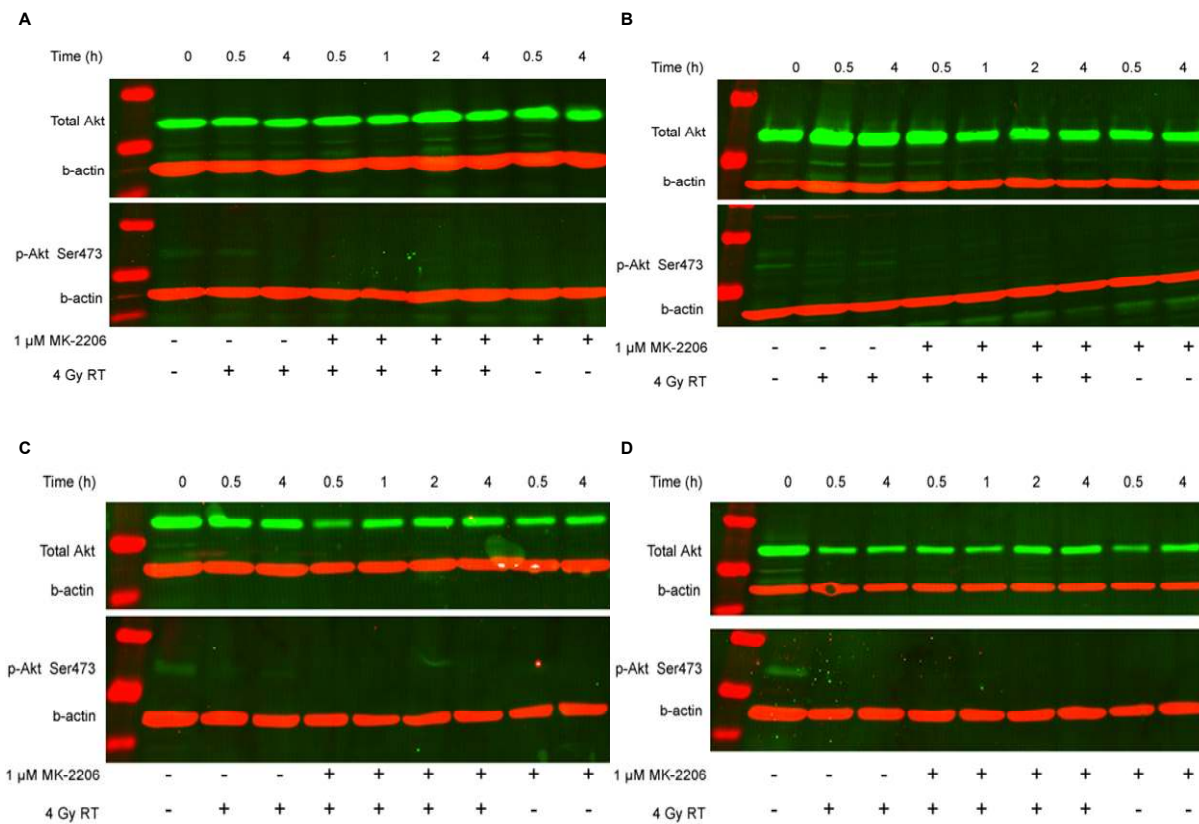


Figura Suplementar 1. *Western blot*. (A) D384; (B) T98G; (C) VU-28; (D) VU-122. Fosforilação foi inibida (0.5, 1, 2 and 4h) com pré-incubação de MK-2206 (1 $\mu$ M por 1h). Células não tratadas foram usadas como controle (0h).



## 10. PERSPECTIVAS FUTURAS

Acessar a toxicidade do composto em um modelo *in vivo*; Quantificar inibição de migração em “*scratch assay*” e fazer comparativo com modelo de migração em esferóide; Acessar a capacidade anti-apoptótica e anti-angiogênica do composto MK-2206 em combinação com TMZ; Estudo dos efeitos em células tronco tumorais.

A possibilidade de realização de estágio pós-doutoral no mesmo centro de pesquisa, *Cancer Center Amsterdam*, será buscada tão logo seja possível. Assim, pretendo dar continuidade aos trabalhos realizados para corrigir as inevitáveis falhas, e buscar complementar ainda mais o conhecimento na área.

## ARTIGO ORIGINAL

Sensitization of Irradiation and Temozolomide by Inhibition of Akt-Phosphorylation in Human Malignant Glioma.

## Authors:

Fedrigo, Carlos Alexandre<sup>1,2,3</sup>, fedrigo.carlos@gmail.com

Garicochea, Bernardo<sup>1</sup>, bgarico@terra.com.br

Da Rocha, Adriana Brondani<sup>1</sup>, brondani@terra.com.br

Stalpers, Lukas JA<sup>4</sup>, l.stalpers@amc.nl

Baumert, Brigitta G<sup>5</sup>, brigitta.baumert@maastro.nl

Slotman, Ben<sup>3</sup>, bj.slotman@vumc.nl

Peters, Godefridus J<sup>2</sup>, gj.peters@vumc.nl

Sminia, Peter<sup>3</sup>, p.sminia@vumc.nl

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

<sup>2</sup> Department of Medical Oncology VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands;

<sup>3</sup> Department of Radiation Oncology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands;

<sup>4</sup> Department of Radiation Oncology, Academic Medical Center (AMC), University of Amsterdam (UvA), Amsterdam, The Netherlands;

<sup>5</sup> Department of Radiation-Oncology (MAASTRO), GROW (School for Oncology & Developmental Biology), Maastricht University Medical Centre (MUMC), The Netherlands

## Disclaimer

MK-2206 was purchased from Selleck Chemicals.

## Competing Interests

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Financial Support: This project was supported by grant 3669-10-6 from Coordination for the Improvement of Higher Level -or Education- Personnel (CAPES), Government of Brazil

#### Abstract

Investigation of the cytotoxic effects of Akt-inhibition by MK-2206 with irradiation (RT) and temozolomide (TMZ) on *in vitro* human malignant glioma. Seven malignant glioma cell lines were cultured and tested for invasion inhibition, tumour spheroid migration, and growth. The Akt-inhibitor MK-2206 and TMZ were added for different time treatments and in varying doses. Cultures were irradiated with single dose and fractionated  $\gamma$ -irradiation. Cellular modulation of Akt and p-Akt were assessed by Western blot analysis. MK-2206 reduced the expression of the phospho-Akt key protein in the PI3Kinase-Akt pathway, inhibited cell proliferation, invasion and growth. The radioenhancing effect of MK-2206 was most striking in spheroid growth delay; the radiosensitizing effect of MK-2206 was stronger than that of TMZ. MK-2206 enhances the *in vitro* effects of RT and TMZ in terms of decreased cell invasion, proliferation and growth delay in malignant glioma. Effects could be ascribed to inhibition of Akt phosphorylation.

*Key words:* MK-2206, glioma, radiation, temozolomide, Akt

## Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) are the most common and aggressive primary brain tumours in adults, with an incidence of 3-5 new cases per 100,000 population per year. Two clinical types of GBM can be differentiated: Primary GBM (*de novo*) directly evolved from astrocytes or precursor stem cells (>90%), and secondary GBM gradually progressed from low grade glioma (grade II or III). The unique characteristics of GBM, such as high mitotic capacity, microvascular proliferation, pseudopallisading necrosis and infiltrative growth, confer a poor prognosis, with a median survival of approximately one year after diagnosis. (1, 2)

Postoperative radiotherapy with concomitant temozolomide (TMZ) has become the standard procedure in the treatment of patients with newly diagnosed GBM, based on the results of a large European-Canadian phase III trial. (3) This randomized trial demonstrated a significant increase in median survival of 12.1 months for treatment with radiotherapy alone, to 14.6 months, for treatment with radiotherapy combined with TMZ. Benefits of TMZ-combined radiotherapy lasted throughout 5-years of follow-up, with a survival rate of 9.8 % versus 1.9% for radiotherapy alone. Despite these encouraging results, the majority of patients still die from locally recurrent disease. The high recurrence rate of this tumour type is due to its infiltrative growth characteristics and high level of resistance to radiotherapy and chemotherapy. (4)

The treatment response and prognosis are related to several (epi)genetic characteristics of glioma like methylation status of O<sup>6</sup>-methylguanine–DNA methyltransferase (MGMT), (5-7) downregulation of tumour suppressor gene phosphatase and tensin homolog (PTEN), and at least one genetic event in the phosphatidylinositide 3-kinase (PI3K) pathway. (8)

PI3K is a central node related to cell survival, growth, and proliferation. Its downstream protein Akt, also known as Protein Kinase B (PKB), plays a pivotal role in the pathway activation, which occurs with the phosphorylation of Akt on two critical residues, Thr308 (T308-Akt) and Ser473 (S473-Akt). (9, 10) Several research groups presented promising data on this subject and are studying how to attack this pathway in many types of cancer. (11-14) Moreover, clinical trials are going on to evaluate the potential of a broad range of both specific and unspecific PI3K pathway inhibitors. (9)

One of these promising compounds is MK-2206, an oral allosteric Akt inhibitor that crosses the blood brain barrier (BBB) and inhibits phosphorylation at Akt residues. (15) Emerging data indicate that MK-2206 can counteract Akt phosphorylation induced by radiation and increase the radiosensitivity of U87MG cell line, (16) as well as enhance the activity of conventional cytotoxic agents (17). Additionally MK-2206 is already being tested in clinical trials. (18, 19) In the present study, we investigated the effect of MK-2206 alone, and combined with irradiation and temozolomide on a panel of 7 glioma cell lines.

## Material and Methods

### Monolayer cell culture

Four established GBM cell lines (U251 Wild type, U251 TMZ resistant Variant, T98G, U87MG), the astrocytoma grade III (D384) cell line (20), and two long term primary GBM cell lines (VU-28 and VU-122) were used in our studies. The long term primary cell lines were originally isolated from tumour samples obtained from patients undergoing GBM surgery. Both cell lines were genetically profiled and proven to match with the original GBM, as described previously for VU-28 and VU-122. (21) To generate the TMZ resistant cell line, U251 cells were exposed to high doses of TMZ and surviving cells were repeatedly re-cultured. Cells were cultured at 37°C in medium containing 10% fetal calf serum (FCS), 2 mmol l<sup>-1</sup> L-glutamine, 100 IU ml<sup>-1</sup> penicillin and 100 IU ml<sup>-1</sup> streptomycin (Invitrogen, Groningen, The Netherlands), in Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM; Gibco BRL, UK). Cells were cultured in a 5% CO<sub>2</sub>-humidified atmosphere. The cells used for the experiments had already undergone >100 passages. Patients gave written consent for the surgical, radiotherapeutic and experimental procedures.

### Treatment

Experiments were performed on exponentially growing cells, except when mentioned. Cells were seeded 2 days before the start of treatments. The alkylating agent Temozolomide (Schering-Plough®, Utrecht, The Netherlands) and the Akt-inhibitor MK-2206 (Selleck Chemicals®, Houston, Texas, USA) were dissolved freshly in dimethyl sulfoxide before each treatment and diluted in culture medium.

Also, final concentrations of the solvent did not affect cell proliferation neither cell survival. Cells were irradiated at room temperature by  $\gamma$ -radiation from a Cobalt-60 source at a dose rate of 516 Gy/h. (Gammacell 200®; Atomic Energy of Canada, Mississauga, Ontario, Canada).

#### Boyden chamber system

The invasion inhibitory capacity of MK-2206 was evaluated using Boyden chamber assay. In short,  $2 \times 10^5$  cells were seeded into each insert of a 24-well plate (Falcon #353504) containing serum-free D-MEM medium in the upper compartment and complete medium in the lower compartment, separated by a Matrigel (10%) membrane with D-MEM. Different concentrations of the drug, ranging from 1 to 10  $\mu\text{M}$ , were added to both compartments. After 16 hours of cell seeding, the invasive capacity was assessed using a fluorescent microscope to count the number of cells that crossed the membrane. In the last half hour of the experiment 5  $\mu\text{M}$  of Calcein AM was added to the lower compartment.

For the combination treatment, cells were exposed to 1  $\mu\text{M}$  of MK-2206 for 1h and then irradiated with 4 Gy or exposed to 1  $\mu\text{M}$  of MK-2206 during 24h and then irradiated with 4 Gy. After one hour of combined treatment,  $2 \times 10^5$  cells were seeded into each insert of a 24-well plate (Falcon #353504) containing serum-free D-MEM medium in the upper compartment and complete medium in the lower compartment, separated by a Matrigel (10%) membrane with D-MEM. After 16 hours of cell seeding, the invasive capacity was assessed using a fluorescent microscope to count the number of cells that crossed the membrane. In the last half hour of the experiment 5  $\mu\text{M}$  of Calcein AM was added to the lower compartment.

#### Spheroid proliferation

Spheroids for the proliferation assay of all cell lines were prepared with the hanging drop method. (22, 23) Briefly,  $3 \times 10^4$  cells were put in 20  $\mu\text{L}$  droplet of Methogel (20%) with D-MEM inside the top part of a sterile Petri dish, and then the top was turned upside down. Inside the Petri dish, 10mL of PBS was added to prevent dehydration. After one day, spheroids were collected and transferred to a 24-well plate (Corning cell culture multiwell plates #CLS3337). The treatment consisted of 1 and 10  $\mu\text{M}$  of MK-2206 for 96h. For the combination with irradiation, spheroids were exposed to the drug for 24h and then irradiated with 4 Gy. The spheroids size was measured prior to

and following treatment at 0h, 24h, 48h, 72h and 96h using an inverted microscope with a camera connected to the eyepiece. The average migration area of the spheroids was recorded as measurements in two diameters, according to the formula:  $A = \pi * r_1 * r_2$ , where  $r_1$ =radius one and  $r_2$ =radius two.

### Spheroid growth

Tumour spheres from U87MG cells were prepared using ultra-low attachment plates. In short, exponentially growing monolayer cells were trypsinized and  $5 \times 10^6$  cells were seeded in 6-well ultra-low attachment plates containing 5 ml of growth medium (Corning #3471). After culture for 2 days, spheroids with diameter between 150 and 250  $\mu\text{m}$  were collected, transferred to separate wells of 24-well ultra-low attachment plates, and cultured individually (Corning #3473). Treatment with MK-2206 started right after harvest and isolation in 24-well plates. Cell growth inhibition was evaluated for single dose irradiation and fractionated irradiation. For the single dose irradiation, 4 Gy was applied at day 0, one hour after isolation, and 5  $\mu\text{M}$  of TMZ was added one hour prior to irradiation. Fractionated irradiation started at day 3 after isolation, with daily applications of 2 Gy for 5 days, and 5  $\mu\text{M}$  of TMZ was administered one hour before each fraction, as described previously. (6) The size of the spheroids was measured in a 3-day interval over a 15-day period, using an inverted microscope with a camera attached to the eyepiece. The spheroid volume was calculated using the formula  $V = 4/3 * \pi * R * r^2$ , where  $R$ =major radius,  $r$ =minor radius. (24)

### Western blot

In order to evaluate modulation of Total Akt, p-Akt Ser473 and p-Akt Thr308 (all 60 kDa) protein expressions on monolayer cell culture, the cells were treated with 1  $\mu\text{M}$  MK-2206 for 1h, irradiated with 4 Gy, or not, and then collected at time points 0.5h, 1h, 2h and 4h. For the long term quantification, cells were treated for 1h and submitted to radiotherapy. After another 1h, the medium was refreshed for a free drug medium and then collected at time points 24h, 48h, 72h and 96h. For the evaluation of PTEN (54kDa) status, untreated cells were used. For the spheroid culture, samples were collected at time points 6, 9, 12 and 15 days. (25) For complete methods refer to Supplementary data.

## Statistics

For the statistical analysis ANOVA was used followed by a Bonferroni multiple comparison test, where results were considered significant when the probability of its randomness was lower than 5% ( $p < 0.05$ ). Complete statistic description in Supplementary data.

## Results

### PTEN status, levels of phospho-Akt and protein levels of Total Akt

PTEN status was verified on all cell lines, with only VU-28 being strongly positive and U87MG slightly positive (Figure 1a). The other three cell lines showed negative results. To further assess the role of MK-2206 in glioma cell lines, we determined the expression levels of Total Akt and phosphorylated Akt Ser473 and Thr308. Exposure to 1  $\mu$ M of MK-2206 reduced the expression of p-Akt Ser473 (Figure 1b) by less than 20% of control expression (Supplementary data, Table S1). Figure 1c shows that after one hour of exposition to the drug, p-Akt Ser473 expression at 72h and 96h still did not match the Control level. Similar results were obtained for the other 4 cell lines (Supplementary data, Figure S1). Thr308 p-Akt did not show any difference (data not included). The modulation of p-Akt expression might indicate reduced activity of the pathway. However we acknowledge that a more complete screening of the pathway, for example mTORC2 and PDPK1 activity, would provide a better picture of the situation.



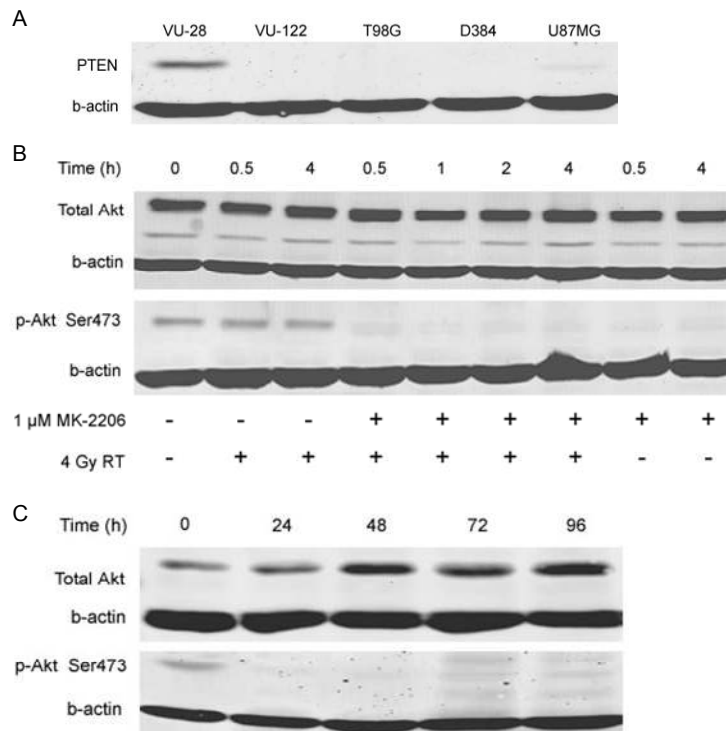


Figure 1. PTEN, Total Akt and p-Akt protein expression of U87MG. (A) PTEN (54kDa) status of 5 cell lines. VU-28 was used as positive control. (B) Irradiation (4 Gy) alone expressed p-Akt, which was inhibited (0.5, 1, 2 and 4h) following pre-incubation of 1h with 1  $\mu$ M MK-2206. Untreated cells were used as control group (0h). (C) Cells were treated for 1h with 1  $\mu$ M MK-2206, irradiated with 4 Gy, and left for one more hour in the presence of drug, when the medium was refreshed for a free drug medium. Total cell lysate was harvested (24, 48, 72 and 96h) after RT and subjected to Western blot analysis with the Akt (60 kDa) and p-Akt Ser473 (60 kDa) antibodies. Untreated cells were used as control group (0h). Gels cropped for better presentation; full-length blots/gels are presented in Supplementary Figure S1. Quantification of bands on Supplementary Table S1.

### Invasion capacity

Dose-dependent inhibition of cell invasion was observed with the application of drug alone (Figure 2a) in three cell lines. The other treatment, which involved the irradiation of cell lines previously exposed to 1  $\mu$ M of MK-2206, showed no effect for U87MG (Figure 2b) and VU-122 cells (Figure 2e). However, the other two cell lines, T98G (Figure 2c) and VU-28 (Figure 2d), showed improved inhibition of cell migration

when MK-2206 was applied 24h before radiotherapy. Considering that cell invasion is one of the main targets in glioma treatment, we think that longer pre-incubation times with MK-2206 could prevent even more this behavior.

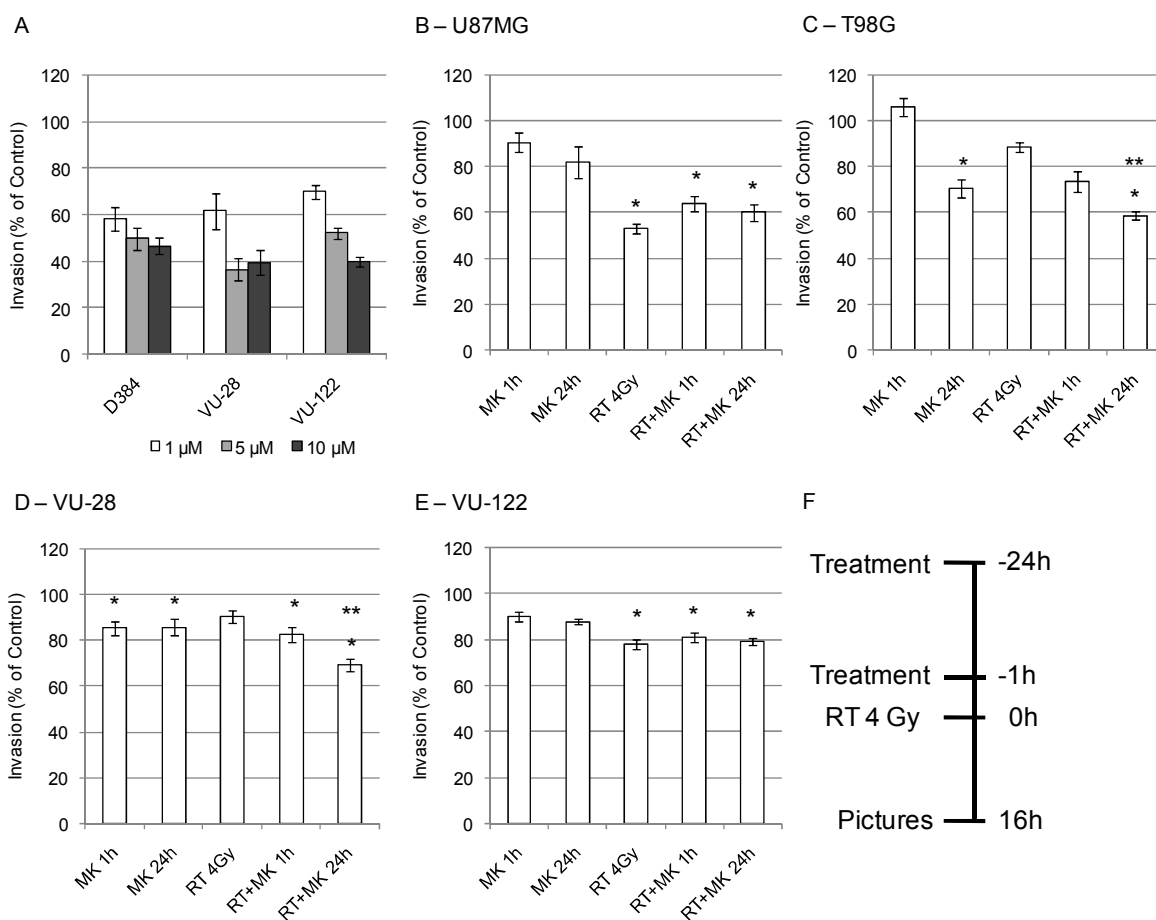


Figure 2. Inhibition of invasion. (A) Treated groups were submitted to 1h of pre incubation with MK-2206 and then during the 16h of the experiment. All results were significantly different compared to the Control ( $p < 0,05$ ), showing a dose-dependent behavior. (B-E) On combined treatment cells were exposed to 1h or 24h of pre incubation with 1 $\mu$ M MK-2206, irradiated with 4 Gy and again submitted to the same concentration of the drug during the 16h of experiment, according scheme (F). \* $p < 0,05$  compared to the Control group, \*\* $p < 0,05$  compared to 4 Gy RT group. Data of two different experiments expressed in Mean $\pm$ SEM. Control set at 100%. (n=8). For a complete statistical table, refer to Supplementary data Table S2.

### Spheroid proliferation

The radial proliferation of the implanted spheroid, assumed as the core of a tumour, which reproduces key brain tumour features like extension and matrix remodeling, (22) was followed over 4 days. Cell proliferation reduction was observed in 4 cell lines following treatment with two different concentrations of MK-2206 ( $p < 0,05$ ) (Figure 3A). For the combination procedure, spheroids were exposed to 1  $\mu\text{M}$  of MK-2206 for 24h, irradiated with 4 Gy and followed during 4 days (Figure 3B). From the four cell lines tested, a significant radiosensitizing effect of MK-2206 on cell proliferation was observed only for VU-28, improving the results of RT single therapy. For the other primary cell line, VU-122, only the combined treatment between 1  $\mu\text{M}$  of MK-2206 and 4 Gy RT allowed us to verify a significant difference when compared to the control. For T98G both radiation treatments, either alone or in combination with MK-2206, presented proliferation inhibition. This experiment presented no effect for U87MG cell line.

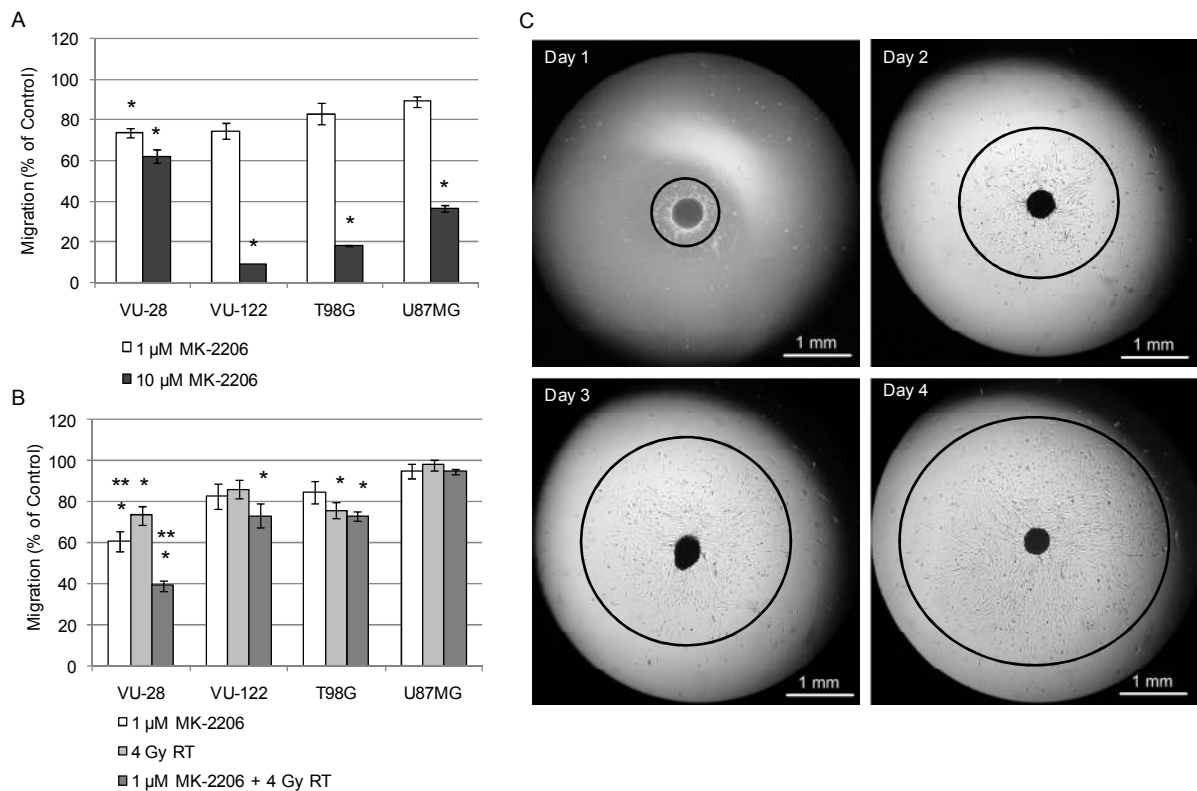


Figure 3. Inhibition of proliferation on spheroids (hanging drop method). (A) Single therapy: spheroids were treated and followed during 4 days with 1  $\mu\text{M}$  or 10  $\mu\text{M}$  of MK-2206. (B) Combined therapy: spheroids were treated for 24h with 1  $\mu\text{M}$  of MK-2206, irradiated with 4 Gy on the second day of experiment, and left on presence of

the drug during 3 more days. A reduction on proliferated area was noticed in VU-28, VU-122 and T98G. (C) U87MG Control (no treatment) proliferated area followed during 4 days, 32x magnification. \* $p < 0,05$  compared to the Control, \*\* $p < 0,05$  compared to 4Gy RT. Data of two different experiments expressed in Mean $\pm$ SEM. Control set at 100%. (n=16). For a complete statistical table, refer to Supplementary data Table S3.

#### Spheroid growth delay

The volume growth of U87MG spheroids after treatment with 1  $\mu$ M of MK-2206, Temozolomide (TMZ) and ionizing irradiation was determined. The combined treatment of the drug with a single dose of 4 Gy presented promising results, with a synergistic response between treatments (Figure 4a). Likewise, the combined treatment of MK-2206 with a single exposure of 5  $\mu$ M of TMZ presented good response, although a bit lower than the previous one (Figure 4b). Then we combined MK-2206 with fractionated radiation and multiple exposures of TMZ, and the results, showed from Figure 4c to Figure 4f, were quite promising: the spheroids volume on combined treatments was even 10 times smaller than the single treatments (Table 1). The quantification of p-Akt Ser473 on spheroids showed long-term inhibition of phosphorylation when MK-2206 was applied during 15 days of the experiment, with or without irradiation (Figure 4g). The long-term downregulation of Akt by MK-2206 could be directly related to the reduction of volume. The interaction, both with TMZ and RT, presented exciting results, suggesting that the combined therapy needs to be further evaluated.

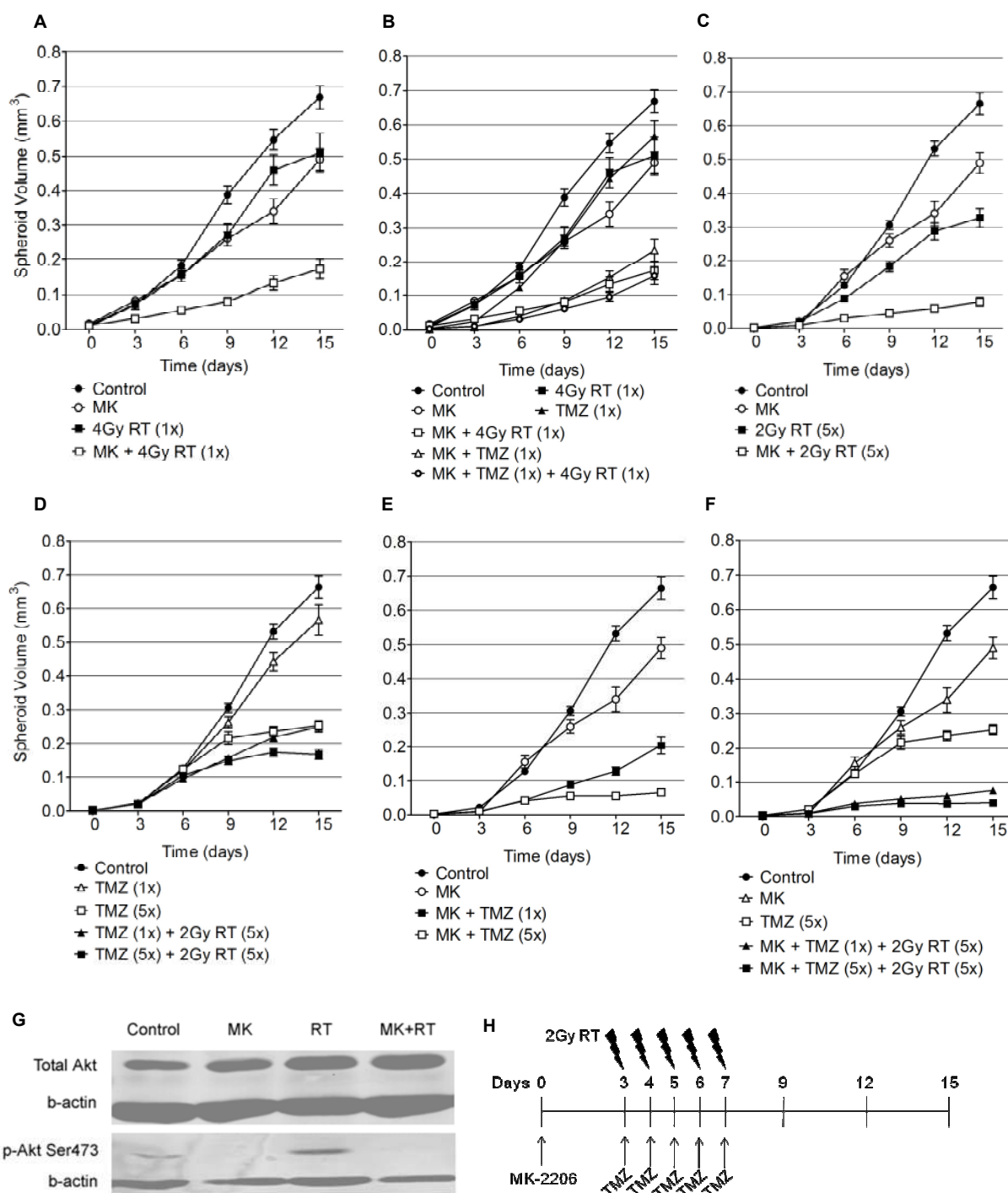


Figure 4. Volume growth delay in U87MG spheroids. (A) MK-2206 plus single dose irradiation 4 Gy and (B) 5  $\mu\text{M}$  TMZ single exposure; (C) MK-2206 and 2 Gy fractionated irradiation; (D) Multiple TMZ exposure and 2 Gy fractionated radiotherapy to simulate clinical regime; (E) Interaction of MK-2206 and TMZ; (F) Combination of three therapies, according to scheme (H). (G) Protein quantification of spheroids. Spheroids were cultured for 15 days with 1 $\mu\text{M}$  of MK-2206 and 2 Gy

fractionated radiotherapy (5x), inhibiting the phosphorylation of Akt alone or in combination with radiotherapy. Similar results were obtained for day 6, 9 and 12 (Data not show). Compared to Control changes at day 15 were significant ( $p < 0,05$ ). Complete statistics on Supplementary Table S4. Quantification of bands on Supplementary Table S1. Data of two different experiments expressed in Mean $\pm$ SEM. (n=16). For a complete statistical table, refer to Supplementary data Table S4. MK= 1 $\mu$ M MK-2206; TMZ= 5 $\mu$ M Temozolamide; RT= Radiotherapy.

## Discussion

In the present study, we investigated the effect of MK-2206 in the invasion status and protein expression, as well as the effect of the treatments on cell proliferation and growth delay in spheroid models. MK-2206 reduced invasiveness, proliferative capacity, and expression of the phospho-Akt key protein in the PI3Kinase-Akt pathway. Both methylated MGMT promoter (TMZ sensitive glioma cell lines) and unmethylated MGMT (TMZ resistant cell lines) (26) were sensitive to MK-2206. Of particular interest is the radiosensitizing effect of MK-2206 on cell invasion when using combination treatments, reducing the number of cells that were able to invade through the membrane in the experiment. In contrast, treatments with radiation alone were not effective in the inhibition of cell invasion. Further experiments were performed on glioma spheroids, a well accepted model since it resembles an *in vivo* situation. (27) A large radioenhancing effect of MK-2206 in the growth of glioma spheroids was observed for combination treatment with fractionated radiotherapy. Similar effects were obtained in the combination with TMZ, suggesting MK-2206 can be a potential accessory drug for clinical use.

The PI3K pathway is frequently mutated in tumours, thereby disturbing cell cycle, cell survival, protein synthesis and growth, metabolism, motility, and angiogenesis. The PI3K downstream protein Akt is then involved as well, depending on mTOR to be activated. Also PTEN, a tumour suppressor gene of PI3K, is commonly down regulated in tumours. (28) Several dual PI3K/mTOR inhibitors, PI3K, Akt and mTOR inhibitors are being investigated in phase I and II clinical trials (9). For example, there are ongoing phase I studies with combined radiochemotherapy (Phase I in the US (NCT00915694) and in the Netherlands (NCT00694837)). MK-

2206 is one of the few Akt inhibitors that have been investigated *in vitro* by few groups in brain tumours (16, 17), and never in combination with standard therapy with radiotherapy plus TMZ.

Recent literature reports the importance of PI3K-Akt pathway in cell invasion. (29-31) The invasion assay, (32) performed through a variation of the Boyden Chamber System, is a useful tool for monitoring the behavior of tumour cells. Thereby, we could show that MK-2206 inhibits glioma cell invasiveness. The number of glioma cells that invaded through the membrane was reduced after irradiation combined with long term exposure to MK-2206 (Figures 1c and 1d).

Furthermore, our Western blot analysis showed that MK-2206 reduced p-Akt levels, representing a depletion of Akt pathway activity of 80% or more (Figure 2b). Cells submitted to radiotherapy did not present phosphorylation of Akt when in presence of MK-2206, as showed by Li et al.. (16) Additional to their data, i.e. determination of p-Akt levels in a single time point (1h), we performed a time series ranging from 0.5 to 96h, in order to get insight into the kinetics of Akt phosphorylation. Even after 96h, p-Akt levels did not return to normal levels, represented by the control (untreated) group (Figure 2c). The small increase of Total Akt levels might be ascribed to a negative feedback that includes mTORC1. (33)

Spheroid cultures of glioma cell lines are a well accepted model that can predict the *in vivo* response better than monolayer cultures, due to cell-cell contact, variation in cell cycle, altered metabolism, and diffusion of nutrients (27). Oxygen and several drugs may influence outcome. (34, 35). The proliferation assay measures the migration and proliferation ability of cells organized in a three-dimensional structure. To assess proliferation capacity on different cell lines exposed to MK-2206 and/or radiotherapy, we used spheroids formed through the hanging-drop method. (23) The advantage of this method is that it allowed us to form similar-sized spheroids from a fixed number of cells per droplet.

Our data demonstrate a reduction of the proliferation area in cell lines, both after application of 1 and 10  $\mu$ M MK-2206. Single dose radiotherapy with 4 Gy did not change cell proliferation. It is known from literature that radiotherapy alone, when used in the dose range applied in this study, might even stimulate cell proliferation, and high single doses only slightly inhibit this process. (36, 37) However, by giving 1  $\mu$ M of MK-2206 prior to irradiation, cell proliferation could be inhibited in three cell lines (Figure 3b). Our data therefore demonstrates how patients could benefit from

an adjuvant therapy by Akt inhibition. Targeting the Akt pathway might be an effective way to prevent cell proliferation, as recently pointed out by Zhang et al. (2011). (38) Another method for spheroid formation uses agarose to prevent the attachment of cells on the bottom of the plate. (39) We adapted this methodology by using special ultra-low adherent plates, but the principle is the same: to prevent cell fixation. Using this method, U87MG spheroids normally last for up to 20 days growing. Recently, it was demonstrated the effect of single dose radiation on spheroids. (40) In the present study, additional to single dose radiotherapy, a fractionated radiotherapy protocol was used to simulate clinical situation with concomitant TMZ treatment. The disadvantage of this particular method, as observed on our cell lines, is that not all cell lines are able to form spheres, or they disaggregate after few days.

Fehlauer et al. (2007) studied application of TMZ plus radiotherapy on cell line spheroids, and concluded that this combination could lead to a less than additive reduction of proliferation and migration. (41) Recently, Hirai et al. (2010) presented data (in monolayer models) of combinations between MK-2206 and several cytotoxic agents, suggesting that this interaction is more effective than monotherapies. (17) Based on their data, we compared monotherapies and combinations between MK-2206, TMZ, and radiotherapy, to approach a clinical set up *in vitro*. Our results showed a >8 times reduction in the volume of spheroids for the combination of MK-2206 and five radiation fractions of 2 Gy (Figure 4c).

Our data clearly show that the combination of three therapies (MK-2206 + five exposures of TMZ + five fractions of 2 Gy) could effectively control tumour cell growth *in vitro*. The concentration of TMZ did not accumulate since it loses its effectiveness after 6h. (42)

A recent study by Yap et al. showed the first clinical data in patients. (18) In agreement with the present *in vitro* experiments, they found continuously administration of the compound preferential. Since the PTEN/PI3K/AKT pathway leads to the activation of Akt and phospho-Akt, and its levels are elevated in the majority of GBM, Akt represents a key point to be targeted in GBM therapy. (43) In another recent study, Cheng et al. (44) demonstrated that MK-2206 acts synergistically with Gefitinib to treat gliomas, both *in vitro* and *in vivo*, increasing the apoptosis and autophagy in glioma cells.

Furthermore, as the inhibition of the PTEN/PI3K/AKT pathway is independent of MGMT methylation, which can also lead to resistance of therapy with TMZ, the



inhibition of Akt may eventually lead to a break-down or circumvention of this resistance to TMZ. Additionally, not all tumours show MGMT methylation. Hegi et al. showed that patients in whom the MGMT promoter is methylated in GBM respond better to TMZ as to radiotherapy, and best respond to the combination of radiotherapy and TMZ. (7) The enthusiasm about this fortunate finding has somewhat covered up the disappointing findings presented in the same paper, regarding the majority (55%) of GBM patients whom the MGMT promoter was not-methylated, and that even in the most prognostically favorable group more than 85% GBMs recur within 3 years. Our present observation that radioenhancement by MK-2206 is independent from MGMT-promotor status and from intrinsic TMZ sensitivity, would make MK-2206 a clinically interesting drug for the majority of GBM cases with a normally methylated MGMT-promoter. Early clinical feasibility studies have shown that MK-2206 monotherapy is well tolerated in patients. The next challenge is to establish the *in vivo* and early clinical toxicity of MK-2206 with radiotherapy and TMZ in patients diagnosed with a glioblastoma.

## Conclusion

MK-2206 enhanced the effect of radiotherapy and TMZ in a series of *in vitro* assays, regarding cell survival, invasion, migration and proliferation on a panel of GBM cell lines. Effects could be ascribed to inhibition of Akt phosphorylation. Our findings therefore indicate that the PI3K-Akt pathway has a critical role in GBM and, therewith, is an excellent target for the development of novel drugs, which might be prescribed in addition to standard radiation therapy combined with temozolomide.

## Acknowledgements

Kees Smid and Leonie H.A.M. Kuipers de Wilt are kindly acknowledged for their technical assistance.

## References

1. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, *et al.* The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:215-225; discussion 226-219.
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114:97-109.
3. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987-996.
4. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009;10:459-466.
5. Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, *et al.* Glioblastoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;67:139-152.
6. van Niffterik KA, van den Berg J, Stalpers LJ, *et al.* Differential radiosensitizing potential of temozolomide in MGMT promoter methylated glioblastoma multiforme cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;69:1246-1253.
7. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:997-1003.
8. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008;455:1061-1068.
9. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 2009;9:550-562.
10. Yap TA, Garrett MD, Walton MI, *et al.* Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8:393-412.
11. Meng J, Dai B, Fang B, *et al.* Combination treatment with MEK and AKT inhibitors is more effective than each drug alone in human non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *PLoS ONE* 2010;5:e14124.
12. Guo JP, Coppola D, Cheng JQ. IKBKE protein activates Akt independent of phosphatidylinositol 3-kinase/PDK1/mTORC2 and the pleckstrin homology domain to sustain malignant transformation. *J Biol Chem* 2011;286:37389-37398.

13. Gorlick R, Maris JM, Houghton PJ, *et al.* Testing of the Akt/PKB inhibitor MK-2206 by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer* 2011.
14. Jiang H, Fan D, Zhou G, *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor(LY294002) induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma in vitro and in vivo. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29:34.
15. Tolcher AW, Yap TA, Fearen I, *et al.* A potent oral allosteric AKT inhibitor. Presented at the 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Denver, CO, April 18-22, 2009 (abstr DDT01-1); 2009.
16. Li HF, Kim JS, Waldman T. Radiation-induced Akt activation modulates radioresistance in human glioblastoma cells. *Radiat Oncol* 2009;4:43.
17. Hirai H, Sootome H, Nakatsuru Y, *et al.* MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2010;9:1956-1967.
18. Yap TA, Yan L, Patnaik A, *et al.* First-in-Man Clinical Trial of the Oral Pan-AKT Inhibitor MK-2206 in Patients With Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol* 2011.
19. Clinicaltrials.org. 2011.
20. Balmforth AJ, Ball SG, Freshney RI, *et al.* D-1 dopaminergic and beta-adrenergic stimulation of adenylate cyclase in a clone derived from the human astrocytoma cell line G-CCM. *J Neurochem* 1986;47:715-719.
21. van Niffterik KA, Elkhuisen PH, van Andel RJ, *et al.* Genetic profiling of a distant second glioblastoma multiforme after radiotherapy: Recurrence or second primary tumor? *J Neurosurg* 2006;105:739-744.
22. Del Duca D, Werbowetski T, Del Maestro RF. Spheroid preparation from hanging drops: characterization of a model of brain tumor invasion. *J Neurooncol* 2004;67:295-303.
23. Foty R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp* 2011.
24. Nirmala C, Rao JS, Ruifrok AC, *et al.* Growth characteristics of glioblastoma spheroids. *Int J Oncol* 2001;19:1109-1115.
25. Mathews ST, Plaisance EP, Kim T. Imaging systems for westerns: chemiluminescence vs. infrared detection. *Methods Mol Biol* 2009;536:499-513.
26. van Niffterik KA, van den Berg J, van der Meide WF, *et al.* Absence of the MGMT protein as well as methylation of the MGMT promoter predict the sensitivity for temozolomide. *Br J Cancer* 2010;103:29-35.

27. Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor. *Cell Biol Int* 1999;23:157-161.
28. Markman B, Dienstmann R, Tabernero J. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway--beyond rapalogs. *Oncotarget* 2010;1:530-543.
29. Kwiatkowska A, Kijewska M, Lipko M, *et al.* Downregulation of Akt and FAK phosphorylation reduces invasion of glioblastoma cells by impairment of MT1-MMP shuttling to lamellipodia and downregulates MMPs expression. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813:655-667.
30. Zhang B, Gu F, She C, *et al.* Reduction of Akt2 inhibits migration and invasion of glioma cells. *Int J Cancer* 2009;125:585-595.
31. Luk SK, Piekorz RP, Nurnberg B, *et al.* The catalytic phosphoinositol 3-kinase isoform p110delta is required for glioma cell migration and invasion. *Eur J Cancer* 2012;48:149-157.
32. Marshall J. Transwell((R)) invasion assays. *Methods Mol Biol* 2011;769:97-110.
33. Chandarlapaty S, Sawai A, Scaltriti M, *et al.* AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer Cell* 2011;19:58-71.
34. Santini MT, Rainaldi G, Indovina PL. Multicellular tumour spheroids in radiation biology. *Int J Radiat Biol* 1999;75:787-799.
35. Sminia P, Acker H, Eikesdal HP, *et al.* Oxygenation and response to irradiation of organotypic multicellular spheroids of human glioma. *Anticancer Res* 2003;23:1461-1466.
36. Kleynten CE, Stoter TR, Tadema TM, *et al.* The effects of irradiation on cell migration from glioblastoma multiforme biopsy spheroids. *Anticancer Res* 2003;23:4907-4912.
37. Rieken S, Habermehl D, Wuerth L, *et al.* Carbon Ion Irradiation Inhibits Glioma Cell Migration Through Downregulation of Integrin Expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011.
38. Zhang X, Chen T, Zhang J, *et al.* Notch1 promotes glioma cell migration and invasion by stimulating beta-catenin and NF-kappaB signaling via AKT activation. *Cancer Sci* 2011.
39. Carlsson J, Yuhas JM. Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Recent Results Cancer Res* 1984;95:1-23.

40. Fedrigo CA, Grivicich I, Schunemann DP, *et al.* Radioresistance of human glioma spheroids and expression of HSP70, p53 and EGFr. *Radiat Oncol* 2011;6:156.
41. Fehlaue F, Muench M, Richter E, *et al.* The inhibition of proliferation and migration of glioma spheroids exposed to temozolomide is less than additive if combined with irradiation. *Oncol Rep* 2007;17:941-945.
42. van Rijn J, Heimans JJ, van den Berg J, *et al.* Survival of human glioma cells treated with various combination of temozolomide and X-rays. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:779-784.
43. McDowell KA, Riggins GJ, Gallia GL. Targeting the AKT Pathway in Glioblastoma. *Curr Pharm Des* 2011;17:2411-2420.
44. Cheng Y, Zhang Y, Zhang L, *et al.* MK-2206, a Novel Allosteric Inhibitor of Akt, Synergizes with Gefitinib against Malignant Glioma via Modulating Both Autophagy and Apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2012;11:154-164.

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table S1. Quantification of Western Blot bands.

Fig	Groups	Total Akt	p-Akt Ser473
1b	Control	1	1
	4Gy RT 30min	0.665	0.770
	4Gy RT 4h	0.711	0.601
	4Gy + 1 $\mu$ M MK-2206 30min	0.938	0.180
	4Gy + 1 $\mu$ M MK-2206 1h	0.606	0.089
	4Gy + 1 $\mu$ M MK-2206 2h	0.724	0.095
	4Gy + 1 $\mu$ M MK-2206 4h	0.891	0.083
	1 $\mu$ M MK-2206 30min	0.936	ND
	1 $\mu$ M MK-2206 4h	0.835	ND
1c	Control	1	1
	MK-2206 after 24h	0.778	0.100
	MK-2206 after 48h	1.290	0.033
	MK-2206 after 72h	1.127	0.301
	MK-2206 after 96h	1.419	0.116
4g	Control	1.0	1.0
	1 $\mu$ M MK-2206	1.743	0.018
	4Gy RT	2.627	0.995
	4Gy + 1 $\mu$ M MK-2206	2.800	ND

Control was set to 100% and the treatments normalized. ND: not detectable. To quantify the bands the background was discounted from the reading. Squares of the same size were used on all bands to dosage exactly the same area. Analysis done on Odyssey Infrared Imager.

Table S2. Invasion assay complete statistic.

Fig	Treatment Group	Average Number of cells
2a	D384 Control	165,14 [171,88 to 158,40]
	D384 MK-2206 1µM	117,43 [132,79 to 102,07] *
	D384 MK-2206 5µM	85,14 [92,07 to 78,21] *
	D384 MK-2206 10µM	67,29 [75,93 to 58,64] *
	VU-28 Control	91,75 [108,18 to 75,32]
	VU-28 MK-2206 1µM	56,50 [74,08 to 38,92] *
	VU-28 MK-2206 5µM	33,50 [46,26 to 20,74] *
	VU-28 MK-2206 10µM	36,25 [41,99 to 30,51] *
	VU-122 Control	171,57 [183,34 to 159,80]
	VU-122 MK-2206 1µM	145,57 [159,50 to 131,64] *
	VU-122 MK-2206 5µM	119,86 [127,40 to 112,31] *
	VU-122 MK-2206 10µM	76,71 [83,99 to 69,43] *
	2b U87MG	Control
MK-2206 1h		118,63 [129,37 to 107,88]
MK-2206 24h		107,75 [132,72 to 82,78]
RT 4Gy		69,38 [98,91 to 39,84] *
RT 4Gy + MK-2206 1h		83,88 [108,89 to 58,86] *
RT 4Gy + MK-2206 24h		78,50 [99,95 to 57,05] *
2c T98G	Control	38,33 [40,20 to 36,46]
	MK-2206 1h	40,67 [44,54 to 36,79]
	MK-2206 24h	27,00 [33,83 to 20,17] *
	RT 4Gy	34,00 [38,26 to 29,74]
	RT 4Gy + MK-2206 1h	28,17 [34,60 to 21,74]
	RT 4Gy + MK-2206 24h	22,50 [27,21 to 17,79] *, **
2d VU-28	Control	78,75 [82,28 to 75,22]
	MK-2206 1h	69,75 [74,95 to 64,55]
	MK-2206 24h	67,63 [72,44 to 62,81] *
	RT 4Gy	73,25 [77,24 to 69,26]
	RT 4Gy + MK-2206 1h	65,75 [70,03 to 61,47] *
	RT 4Gy + MK-2206 24h	56,00 [60,60 to 51,40] *, **
2e VU-122	Control	150,13 [169,11 to 131,14]
	MK-2206 1h	135,38 [142,88 to 127,87]
	MK-2206 24h	131,75 [135,97 to 127,53]
	RT 4Gy	117,50 [124,09 to 110,91] *
	RT 4Gy + MK-2206 1h	122,00 [128,58 to 115,42] *
	RT 4Gy + MK-2206 24h	119,13 [123,74 to 114,51] *

Data of two different experiments expressed in Mean [95% CI]. (n=8). \*p<0,05 compared to the Control; \*\*p<0,05 compared to 4 Gy RT.

Table S3. Spheroid proliferation assay complete statistic.

Fig	Cell line	Treatment Group	Area (mm <sup>2</sup> )
3a	VU-28	Control	11.51 [13.06 to 9.95]
	VU-28	MK-2206 1µM	8.45 [9.11 to 7.79] *
	VU-28	MK-2206 10µM	7.13 [8.02 to 6.24] *
	VU-122	Control	12.13 [13.77 to 10.50]
	VU-122	MK-2206 1µM	9.01 [10.51 to 7.81]
	VU-122	MK-2206 10µM	1.11 [1.15 to 1.07] *
	T98G	Control	12.20 [13.44 to 10.96]
	T98G	MK-2206 1µM	10.10 [11.47 to 8.74]
	T98G	MK-2206 10µM	2.22 [2.36 to 2.07] *
	U87MG	Control	22.34 [23.59 to 21.08]
	U87MG	MK-2206 1µM	19.82 [21.29 to 18.35]
	U87MG	MK-2206 10µM	8.06 [9.10 to 7.01] *
	3b	VU-28	Control
VU-28		MK-2206 1µM	2.67 [3.08 to 2.27] *, **
VU-28		RT 4Gy	3.23 [3.62 to 2.84] *
VU-28		RT 4Gy + MK-2206 1µM	1.73 [1.95 to 1.50] *, **
VU-122		Control	13.42 [15.53 to 11.33]
VU-122		MK-2206 1µM	11.08 [12.67 to 9.48]
VU-122		RT 4Gy	11.56 [12.81 to 10.31]
VU-122		RT 4Gy + MK-2206 1µM	9.79 [11.32 to 8.25] *
T98G		Control	6.39 [7.03 to 5.75]
T98G		MK-2206 1µM	5.40 [6.17 to 4.63]
T98G		RT 4Gy	4.83 [5.31 to 4.35] *
T98G		RT 4Gy + MK-2206 1µM	4.66 [4.91 to 4.41] *
U87MG		Control	17.73 [19.59 to 15.87]
U87MG		MK-2206 1µM	16.81 [18.18 to 15.43]
U87MG		RT 4Gy	17.34 [18.37 to 16.30]
U87MG	RT 4Gy + MK-2206 1µM	16.77 [17.19 to 16.36]	

Data of two different experiments expressed in Mean [95% CI]. (n=8). \*p<0,05 compared to the Control; \*\*p<0,05 compared to 4 Gy RT.



Table S4. Reduction of volume of U87MG glioma spheroid on day 15.

Fig	Treatment group	Volume (mm <sup>3</sup> )	Ratio
5a	Control	0,669 [0,734 to 0,603]	1.00
	1μM MK-2206	0,490 [0,551 to 0,429]	0.71 <sup>a</sup>
	4Gy RT	0,510 [0,617 to 0,402]	0.77
	1μM MK-2206 + 4Gy RT	0,173 [0,226 to 0,119]	0.34 <sup>a,b</sup>
5b	Control	0,669 [0,734 to 0,603]	1.00
	1μM MK-2206	0,490 [0,551 to 0,429]	0.71 <sup>a</sup>
	5μM TMZ	0,567 [0,656 to 0,478]	0.83 <sup>a</sup>
	4Gy RT	0,510 [0,617 to 0,402]	0.77
	1μM MK-2206 + 5μM TMZ	0,235 [0,299 to 0,171]	0.36 <sup>a,b</sup>
	1μM MK-2206 + 4Gy RT	0,173 [0,226 to 0,119]	0.26 <sup>a,b</sup>
	1μM MK-2206 + 5μM TMZ + 4Gy RT	0,157 [0,206 to 0,108]	0.23 <sup>a,b</sup>
5c	Control	0,669 [0,734 to 0,603]	1.00
	1μM MK-2206	0,490 [0,551 to 0,429]	0.71 <sup>a</sup>
	2Gy RT (5x)	0,327 [0,380 to 0,274]	0.50 <sup>a</sup>
	1μM MK-2206 + 2Gy RT (5x)	0,078 [0,102 to 0,055]	0.12 <sup>a,c</sup>
5d	Control	0,669 [0,734 to 0,603]	1.00
	5μM TMZ (1x)	0,567 [0,656 to 0,478]	0.83
	5μM TMZ (5x)	0,254 [0,282 to 0,226]	0.38 <sup>a</sup>
	5μM TMZ (1x) + 2Gy RT (5x)	0,249 [0,277 to 0,221]	0.37 <sup>a</sup>
	5μM TMZ (5x) + 2Gy RT (5x)	0,169 [0,196 to 0,141]	0.26 <sup>a,d</sup>
5e	Control	0,669 [0,734 to 0,603]	1.00
	1μM MK-2206	0,490 [0,551 to 0,429]	0.71 <sup>a</sup>
	1μM MK-2206 + 5μM TMZ (1x)	0,205 [0,256 to 0,153]	0.31 <sup>a,e</sup>
	1μM MK-2206 + 5μM TMZ (5x)	0,066 [0,082 to 0,050]	0.10 <sup>a,e</sup>
5f	Control	0,669 [0,734 to 0,603]	1.00
	1μM MK-2206	0,490 [0,551 to 0,429]	0.71 <sup>a</sup>
	5μM TMZ (5x)	0,254 [0,282 to 0,226]	0.38 <sup>a,e</sup>
	1μM MK-2206 + 5μM TMZ (1x) + 2Gy RT (5x)	0,076 [0,093 to 0,059]	0.11 <sup>a,d,e</sup>
	1μM MK-2206 + 5μM TMZ (5x) + 2Gy RT (5x)	0,040 [0,047 to 0,033]	0.06 <sup>a,d,e</sup>

Two-way Repeated-Measures ANOVA with Bonferroni posttest. Data of two different experiments expressed in Mean [95% CI]. (n=16). Ratio= Treatment/Control; RT= Radiotherapy; TMZ= Temozolamide.

<sup>a</sup> Different from Control, p<0,05;

<sup>b</sup> Different from 4Gy RT, p<0,05;

<sup>c</sup> Different from 2Gy RT (5x) p<0,05;

<sup>d</sup> Different from 5μM TMZ (5x) p<0,05;

<sup>e</sup> Different from 1μM MK-2206 p<0,05.

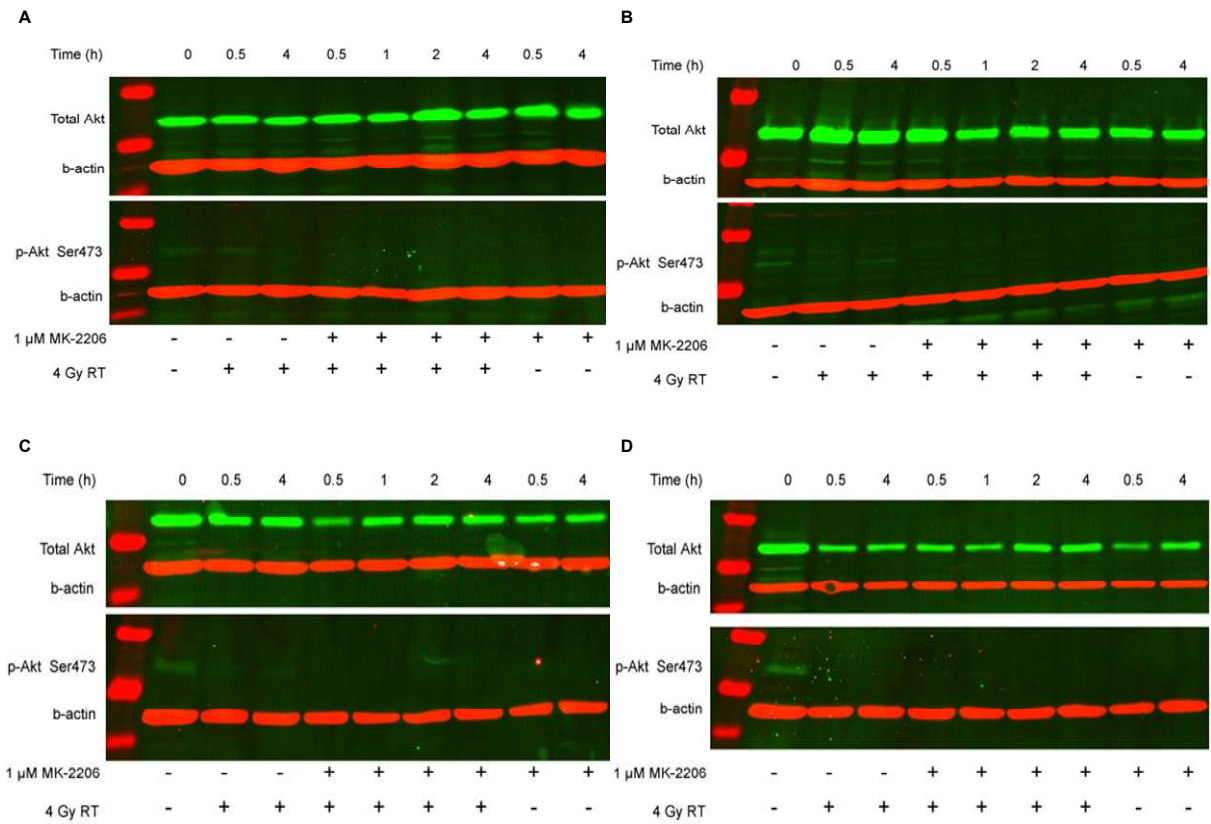


Figure S1. (a) D384; (b) T98G; (c) VU-28; (d) VU-122. Expression of Total Akt and p-Akt (0.5, 1, 2 and 4h) following pre-incubation with MK-2206 (1 $\mu$ M for 1h). Untreated cells were used as control group (0h).

## Material and Methods

### *Western Blot*

Cells were washed twice with ice-cold PBS and lysed in lysis buffer (Cell Signalling Technology Inc., Denver, USA). Cell lysates were scraped, transferred into a vial and centrifuged at 11,000 x g at 4° C for 10 min. Supernatants were transferred to a new vial and protein amounts were determined by the Bio-Rad assay, according to the manufacturer's instruction (Bio-Rad Laboratories, Veenendaal, The Netherlands). From each condition, 20 µg of protein was separated on a 8% SDS-PAGE and electroblotted onto polyvinylidenedi-fluoride (PVDF) membranes (Millipore Immobilon TM-FL PVDF, 0.45 mm). Subsequently, the membranes were blocked for 1h at room temperature in Odyssey blocking buffer (Odyssey blocking buffer #927-40003, Westburg, Leusden, The Netherlands) and incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies (dilution 1:1,000–10,000 in Odyssey blocking buffer 1:1 diluted with PBS-T (PBS with 0.05% Tween-20)). The membrane was washed 5 times in PBS-T and incubated with the secondary antibodies (1:10,000) for 1h at room temperature in the dark. After incubation, the membrane was washed in PBS-T and followed by 5 min washing in PBS without Tween-20 to decrease the background signal. Subsequently, the bands were scanned using an Odyssey Infrared Imager (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska USA), 0 mm offset, 84 mm resolution and with high quality.

Western Blot images of the main paper were submitted to edition in order to turn it to a gray scale, as well to invert colors. If contrast was applied, it was for the whole image, not specific points of the images.

### *Statistics*

Statistical analysis for invasion assays was done using one-way ANOVA. Two-way repeated measures ANOVA was used for the follow up experiments on spheroids. Bonferroni posttest was used to compare differences between groups. The p-value was adjusted to the number of groups. Differences between two sets of data were considered statistically significant when  $p < 0.05$  with 95% Confidence Interval. The statistical assumptions for the ANOVA application (Normality, Homogeneity of Variance and Sphericity) were confirmed between the initial and final time of experiments. GraphPad Prism 5.0, Microsoft Excel 2007 and SPSS 17 were used for the analysis. For complete methods refer to Supplementary data.

Dear Dr. Fedrigo,

On Mar 26 2012 8:26AM, we received your Research Article entitled "Title - Sensitization of Irradiation and Temozolomide by Inhibition of Akt-Phosphorylation in Human Malignant Gliomas" by Carlos Alexandre Fedrigo, Ph.D.; Bernardo Garicochea; Adriana Brondani Da Rocha; Lukas JA Stalpers; Brigitta G Baumert; Ben J Slotman; Godefridus J Peters; Peter Sminia.

Your manuscript has been assigned the manuscript number: PONE-D-12-08673.

We will keep you informed about the progress of your manuscript or you can check the status by logging into your account.

Please be aware that you will NOT be required to complete the 'Open-Access Agreement' field until your manuscript is accepted for publication. You may also be asked to provide your article and figure files in a different format at this time (please see the 'Electronic Format' section of the Author Guidelines for more information: <http://www.plosone.org/static/guidelines.action#preparation>)

Please visit everyONE (<http://everyone.plos.org>), the PLoS ONE community blog for authors who have published with us (as well as our readers), where you will be able to find out what the journal is thinking, changing and doing.

Thank you for submitting to PLoS ONE.

If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript, please contact <http://pone.edmgr.com/>.

Thank you for choosing PLoS ONE.

Best wishes,

Damian Pattinson, PhD  
Executive Editor, PLoS ONE