



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

GUSTAVO FACCHINI

**Estudo da administração de fitol e retinol sobre
linhagens celulares humanas de glioblastoma**

Campinas, 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

GUSTAVO FACCHINI

**Estudo da administração de fitol e retinol sobre linhagens
celulares humanas de glioblastoma**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Doutor em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Fisiologia.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO GUSTAVO
FACCHINI E ORIENTADO PELO PROF. DR. FÁBIO
ROGÉRIO.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Rogerio

Campinas, 2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2011/50400-0; FAPESP, 2013/07559-3

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0111-7596>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F118e Facchini, Gustavo, 1982-
Estudo da administração de fitol e retinol sobre linhagens celulares humanas de glioblastoma / Gustavo Facchini. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Fábio Rogério.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Glioblastoma. 2. Fitol. 3. Vitamina A. I. Rogério, Fábio, 1977-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of phytol and retinol administration on human glioblastoma cells

Palavras-chave em inglês:

Glioblastoma

Phytol

Vitamin A

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Fábio Rogério [Orientador]

Luciano Neder Serafini

Carlos Amílcar Parada

Simone Aparecida Teixeira

Victor Angelo Martins Montalli

Data de defesa: 26-01-2018

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 26 de janeiro de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabio Rogerio

Prof. Dr. Luciano Neder Serafini

Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada

Dra. Simone Aparecida Teixeira

Prof. Dr. Victor Angelo Martins Montalli

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

“Viste como levantaram aquele edifício de grandeza imponente? - Um tijolo, e outro. Milhares. Mas, um a um. - E sacos de cimento, um a um. E blocos de pedra, que são bem pouco ante a mole do conjunto. - E pedaços de ferro. - E operários trabalhando, dia após dia, as mesmas horas...

Viste como levantaram aquele edifício de grandeza imponente?... À força de pequenas coisas!”

São Josemaría Escrivá

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar saúde e serenidade, indispensáveis para a realização deste desafio e trabalho.

Agradeço à minha esposa Larissa Maria Rodrigues Facchini por sempre estar ao meu lado durante esse período, pelo seu companheirismo, carinho, amor, pela paciência e, sobretudo por acreditar e apoiar meus sonhos. Te amo.

Agradeço, em especial, aos meus filhos Luca Rodrigues Facchini e Luigi Rodrigues Facchini, pelo olhar e sorriso de inocência que me confortam todos os dias. Amo vocês.

Agradeço a meus pais, Maria Elena e Wagner pelo irrestrito apoio, presença, carinho e dedicação durante todas as etapas de minha vida. Serão sempre o exemplo que seguirei.

Ao Prof. Dr. Fábio Rogério pela orientação, paciência, solicitude e dedicação durante a execução deste projeto e também durante a redação da tese, artigo e relatórios. Tenho certeza que sua presença me fez crescer muito profissionalmente.

Ao colaborador Prof. Dr. Roger Frigério Castilho por abrir as portas de seu laboratório e proporcionar toda a infra-estrutura necessária para a realização deste projeto. Também por auxiliar na obtenção e discussão dos resultados, bem como na redação do artigo científico.

À Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes responsável pelo Laboratório de Genética Molecular da FCM (UNICAMP) onde foram realizados os experimentos de Transcriptoma.

Agradeço ao professor Francesco Langone pela oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa durante meu programa de mestrado e por sua sempre constante e essencial orientação em meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Agradeço aos Professores Carlos Amilcar Parada, Carmen Veríssima Ferreira e Alba Regina Monteiro Souza Brito pelo conforto e apoio em todos os momentos de dificuldade.

Agradeço especialmente ao Professor André Schwambach Vieira por me apresentar, agora no Doutorado, o mundo do “Transcriptoma”.

À minha querida amiga Raffaella Silvestre Ignarro por toda a ajuda, pela amizade fantástica, por estar sempre ao meu lado nos momentos de alegria e sofrimento e por ser um exemplo de profissionalismo e ética.

À minha grande e eterna amiga Samara Eberlin pela sincera amizade, que só aumentou nestes últimos anos.

Agradeço aos amigos Gustavo de Campos Dieamant e Maria Del Carmen Velazquez Pereda pelas oportunidades e pelo exemplo profissional.

Agradeço à Kosmoscience por toda oportunidade de crescimento proporcionada e em especial ao Adriano da Silva Pinheiro pela confiança e espírito de inovação.

Aos colegas do Laboratório de Bioenergética, Tiago Rezende Figueira, Juliana Ronchi, Marcia Fagian, Edilene de Souza Siqueira Santos, Roberto Stahl, Juliana Ruas, Estela Busanello, Ana Carolina Marques, Hanan Chweih, Annelise Francisco, Noelia Lander, Miguel Chiurillo, Mayara Santos Bertolini, Genoefa Dal’Bó, pela amizade, união, por somar conhecimentos, experiências e por tornar o cotidiano do laboratório, por vezes cansativo, agradável para o desenvolvimento dos experimentos científicos.

Especialmente à Kézia Moura, Evellyne Figueirôa, Cláudia Navarro, Erika Rodrigues da Silva e Raffaella Silvestre Ignarro pelas intermináveis conversas no “bandejão” sobre diversos assuntos e principalmente pelo companheirismo e união nos momentos difíceis. Certamente todos são não apenas colegas de trabalho, mas sim amigos que gostaria de levar para a vida toda.

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas por minha formação acadêmica e por estabelecer um ambiente de constante estímulo e apoio à pesquisa científica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado que sem dúvida foi decisiva para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de projeto de auxílio à pesquisa e projeto temático (2011/50400-0; 2013/02618-1) que forneceram boa parte dos recursos financeiros necessários para a realização deste estudo.

Ao Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e Extensão (FAEPEX; 379/13; 554/14; 621/14) que também forneceu recursos financeiros para a compra de materiais de consumo e para contratação de serviços de terceiros.

Minha sincera gratidão.

RESUMO

Glioblastoma é tumor cerebral primário, cujo metabolismo pode estar reprogramado devido a mutações genéticas. Em células neoplásicas, alterações nas vias de biossíntese do colesterol e dos ácidos graxos podem favorecer a produção de biomassa e resistência a fármacos. Assim, compostos que interferem com tais vias de biossíntese e que possuem propriedades antioxidantes, como o fitol (FIT) e retinol (RET), poderiam ser utilizados como agentes citotóxicos contra neoplasias. No presente trabalho, estudamos a viabilidade de linhagens de glioblastoma humano (U87MG, A172 e T98G) após exposição a FIT ou RET por 24, 48 e 72 horas e observamos citotoxicidade dose-dependente. Análises posteriores foram realizadas utilizando concentrações correspondentes aos valores de IC_{50} de cada composto. Especificamente, a avaliação morfológica das linhagens evidenciou redução do calibre dos prolongamentos celulares, após 72 horas. Ainda que tenhamos verificado evidência de morte celular por necrose e alteração da homeostase redox após os tratamentos, não foi possível caracterizar se FIT e RET exercem efeito anti- ou pró-oxidante. Visto que às células A172 corresponderam as menores concentrações de IC_{50} para FIT e RET, esta linhagem foi selecionada para estudo do transcriptoma pós-tratamentos por 72 horas, o qual evidenciou diminuição significativa da expressão de genes envolvidos em vias de biossíntese de colesterol e/ou ácidos graxos. Para validação dos dados de expressão gênica, investigamos os níveis de proteínas de vias de síntese de ácidos graxos e/ou colesterol após tratamento das três linhagens com FIT ou RET por 72 horas. A expressão de *sterol regulatory element-binding proteins 1* (SREBP-1), fator de transcrição da via de ácidos graxos, foi reduzida por FIT em células U87MG e T98G. No entanto, a expressão da *fatty acid synthase* (FAS), regulada pelo SREBP-1, foi diminuída em todas as linhagens após ambos os tratamentos. Com relação à síntese de colesterol, FIT e RET reduziram os níveis de *farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1* (FDFT1), respectivamente, em todas as linhagens e nas células U87MG e A172. Assim, nossos resultados sugerem que proteínas associadas com a produção de biomassa tumoral, como SREBP-1, FAS e FDFT1 sejam potenciais alvos para futuras abordagens experimentais *in vivo* contra glioblastoma. Além disso, apoiam o uso de agentes citotóxicos e inibidores da síntese de tais proteínas, como FIT e RET, nestas abordagens.

ABSTRACT

Glioblastoma is a primary brain tumor, whose metabolism may be reprogrammed due to genetic mutations. In neoplastic cells, changes in cholesterol and fatty acid biosynthesis pathways may favor biomass production and drug resistance. Thus, compounds that interfere with such biosynthetic pathways and have antioxidant properties, such as phytol (PHY) and retinol (RET), could be tested as cytotoxic agents against tumor. In the present study, we assessed the viability of human glioblastoma lineages (U87MG, A172 and T98G) after exposure to PHY or RET for 24, 48 and 72 hours and observed dose-dependent cytotoxicity. Subsequent analyzes were performed with concentrations corresponding to the IC₅₀ values of each compound. Specifically, the morphological evaluation of lineages showed reduction of the caliber of cellular processes after 72 hours. Although we detected cell death due to necrosis and alteration of redox homeostasis after treatments, it was not possible to characterize whether PHY and RET played an anti- or pro-oxidant role. Since A172 cells were associated with the lowest concentrations of PHY and RET IC₅₀, such lineage was selected for transcriptome analyses after 72 hours. It was observed a significant decrease in the expression of genes involved in cholesterol and/or fatty acid biosynthesis. To validate gene expression data, we investigated protein levels of fatty acid and/or cholesterol synthetic pathways after treatment of the three lineages with PHY or RET for 72 hours. PHY reduced the expression of sterol regulatory element-binding proteins 1 (SREBP-1), a transcription factor of the fatty acid pathway, in U87MG and T98G cells. However, the expression of fatty acid synthase (FAS), which is regulated by SREBP-1, was decreased in all cell lines after both treatments. As regards cholesterol synthesis, PHY and RET reduced the levels of farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1 (FDFT1) in all lineages and in U87MG and A172 cells, respectively. Thus, our results suggest that proteins associated with tumor biomass production, such as SREBP-1, FAS and FDFT1 would be potential targets for future *in vivo* experimental approaches against glioblastoma. In addition, the present investigation supports the use of cytotoxic agents and inhibitors of the synthesis of such proteins, such as PHY and RET, in such approaches.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7AAD - 7-aminoactinomycin *D*

A172 - Linhagem comercial de glioblastoma humano

ATCC - do inglês, *American Type Culture Collection*

ATRA - Ácido *trans*-retinóico

CAT - Catalase

CO₂ - Dióxido de carbono

CRABPs - do inglês, *cytosolic retinoic acid bound protein*

CRBPs - do inglês, *cytosolic retinol bound protein*

DMEM - do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO - Dimetilsulfóxido

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FAS - do inglês, *fatty acid synthase*

FDFT1 - do inglês, *farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1*

FIT - Fitol

GBM - Glioblastoma

GSH - Glutathione

GSSG - Glutathione oxidada, glutathione dissulfeto

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

IC₅₀ - Concentração inibitória máxima de 50 % da viabilidade celular

MDA - Malondialdeído

MTT - do inglês, 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide

NAC - N-acetilcisteína

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

O₂⁻ - Ânion superóxido

OMS - Organização mundial da saúde

RAREs - do inglês, *responsive element retinoic acid*

RARs - do inglês, *retinoic acid receptors*

RETs - Retinóides

RXRs - do inglês, *retinoid X receptors*

SNC - Sistema nervoso central

SOD - Superóxido dismutase

SREBP-1 - do inglês, *sterol regulatory element-binding protein 1*

T98G - Linhagem comercial de glioblastoma humano

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA - Ácido tricarboxílico

U87MG - Linhagem comercial de glioblastoma humano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Gliomas.....	15
1.2. Características metabólicas e balanço redox em gliomas.....	16
1.3. Fitol.....	20
1.4. Retinol	23
1.5. Justificativa.....	25
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1. Linhagens celulares	28
3.2. Grupos experimentais e tratamentos com fitol ou retinol para viabilidade celular/IC ₅₀ ..	28
3.3. Avaliação da viabilidade celular: Ensaio colorimétrico (MTT).....	29
3.4. Para todos os demais protocolos experimentais	30
3.5. Investigação de morte celular por apoptose ou necrose através de citometria de fluxo utilizando as moléculas anexina V e 7AAD	30
3.6. Quantificação da síntese de ânion superóxido citoplasmático <i>Dihydroethidium</i> (<i>hydroethidine</i>) - DHE	30
3.7. Quantificação da síntese de ânion superóxido mitocondrial - MitoSOX™ <i>Red</i>	31
3.8. Quantificação da atividade de superóxido dismutase e catalase	31
3.9. Quantificação de glutatona total.....	32
3.10. Análise de expressão gênica: Transcriptoma de células A172 tratadas com fitol ou retinol	34
3.11. Análise de expressão gênica: Análise dos dados de sequenciamento	35
3.12. Western Blotting para SREBP-1, FASN e FDFT1	35
3.13. Análise estatística	37
4. RESULTADOS	38
4.1. FIT IC ₅₀ e RET IC ₅₀ reduziram a viabilidade celular.....	38
4.2. FIT IC ₅₀ e RET IC ₅₀ co-administrados com Trolox® ou N-acetilcisteína (NAC) reduziram a viabilidade celular	41
4.3. FIT IC ₅₀ e RET IC ₅₀ reduziram a formação de ânion superóxido citoplasmático e mitocondrial	43

4.4. FIT IC ₅₀ e RET IC ₅₀ modulam a atividade de SOD, CAT e a síntese de glutathione total.	45
4.5. FIT IC ₅₀ e RET IC ₅₀ induziram necrose	48
4.6. Análise do transcriptoma	49
4.7. FIT IC ₅₀ e RET IC ₅₀ modularam a expressão de SREBP-1, FAS e FDFT1	51
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÕES	59
7. REFERÊNCIAS	60
8. APÊNDICE I – Manuscrito submetido para publicação	68
9. ANEXO I – Declaração de bioética e biossegurança	87
10. ANEXO II – Declaração de direitos autorais	88

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gliomas

Gliomas são os tumores cerebrais mais comuns e correspondem a cerca de 70% das neoplasias primárias do sistema nervoso central (SNC). Estes tumores surgem a partir de células gliais, sendo que aqueles que possuem características histológicas que remetem à linhagem astrocitária são definidos como astrocitomas. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os astrocitomas podem ser classificados em quatro graus histológicos (I – IV), os quais guardam relação estreita com o comportamento biológico da lesão, tempo de sobrevida do paciente e resposta à abordagem terapêutica. O astrocitoma pilocítico, ao qual é atribuído grau I, é bem delimitado, de crescimento lento e acomete predominantemente crianças e adultos jovens. Seu padrão histológico bifásico é característico: áreas compactas, constituídas por células bipolares associadas a fibras de Rosenthal, que se misturam, em proporções variadas, com áreas frouxas contendo células multipolares e estruturas microcísticas ou arredondadas granulares eosinofílicas. Via de regra, a conduta é cirúrgica e o prognóstico, favorável (LOUIS et al., 2016).

Por sua vez, os astrocitomas graus II, III e IV ocorrem principalmente em adultos e são considerados gliomas difusos, pois se infiltram de forma irrestrita na substância branca tornando impossível sua delimitação precisa. Do ponto de vista morfológico, a classificação destes tumores baseia-se nos seguintes achados histológicos: atipias nucleares, mitoses, proliferação microvascular e necrose. O astrocitoma grau II (astrocitoma difuso de baixo grau) apresenta apenas um dos achados, sendo o mais comum atipia nuclear. O tumor grau III (astrocitoma anaplásico) exhibe dois dos achados microscópicos listados, sendo atipia nuclear e mitoses os mais frequentes. No astrocitoma grau IV (glioblastoma; GBM), são observados ao menos três dos achados histológicos. Além desta classificação, os astrocitomas difusos podem ser categorizados em baixo (II) ou alto (III e IV) graus, em função do comprometimento lento ou rápido do parênquima cerebral vizinho, respectivamente. A excisão cirúrgica apenas, ainda que não permita a retirada completa da lesão, é a abordagem proposta para os tumores grau II. Os tumores graus III e IV recebem ainda radioterapia e/ou quimioterapia adjuvante. O tempo de sobrevida dos pacientes é inversamente proporcional ao grau histológico dos astrocitomas (LOUIS et al., 2016).

GBM é o tumor cerebral primário mais frequente, correspondendo a aproximadamente 70 % dos astrocitomas e 15 % de todas as neoplasias intra-cranianas. Cerca de 90 % dos GBMs são classificados como primários. Tais lesões acometem principalmente

idosos (média de 62 anos), tem rápida evolução (menos de três meses) e não apresentam evidências clínicas ou histopatológicas de lesão precursora. Por outro lado, GBMs secundários acometem indivíduos mais jovens (média de 45 anos) e progridem de forma lenta a partir de astrocitoma difuso de menor grau. Histologicamente indistinguíveis entre si, as duas formas de GBM apresentam prognóstico sombrio. Pacientes com GBM primário apresentam sobrevida mediana aproximada de cinco meses e aqueles com a forma secundária, de oito meses (OHGAKI; KLEIHUES, 2009).

A análise histológica tem papel importante para a definição do tipo de uma neoplasia astrocitária. Porém, dificuldades diagnósticas podem surgir em função da heterogeneidade do tumor, sobreposição com aspectos morfológicos de outros gliomas ou amostragem parcial da lesão. Em função disso, nas últimas décadas, foram conduzidos diversos estudos empregando prioritariamente técnicas moleculares objetivando-se encontrar marcadores biológicos com relevância diagnóstica e/ou prognóstica. Tais estudos permitiram não só a identificação de tais marcadores, mas também propiciaram aumento significativo do conhecimento sobre o metabolismo dos gliomas e o encontro de potenciais alvos para novas abordagens terapêuticas (NIKIFOROVA; HAMILTON, 2011; LOUIS et al., 2016).

1.2. Características metabólicas e balanço redox em gliomas

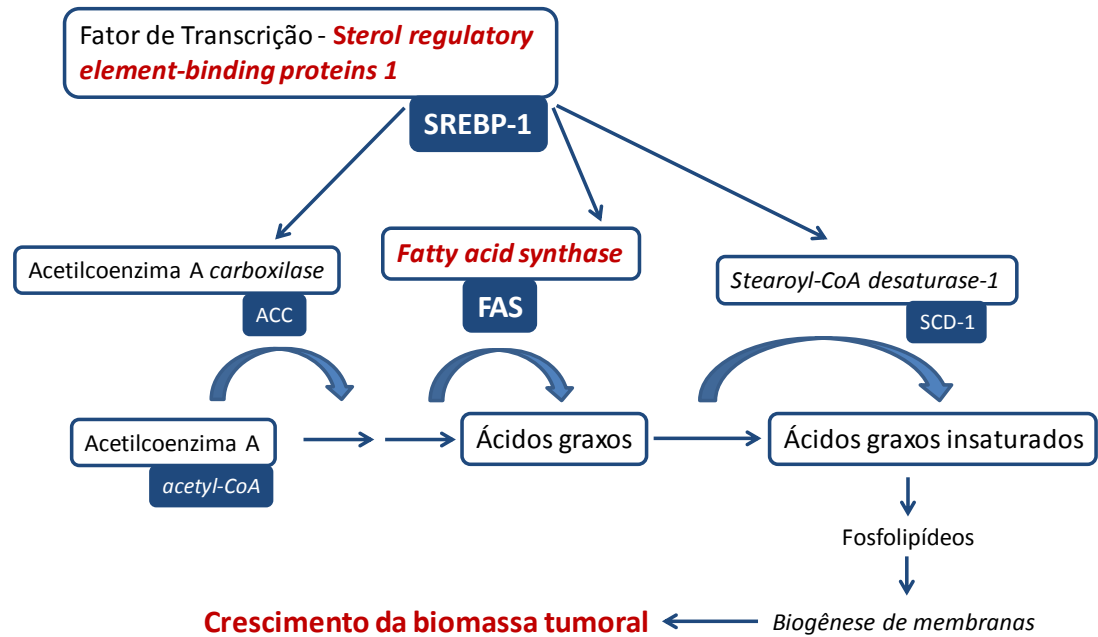
Com relação ao metabolismo de tumores, Otto Warburg demonstrou em estudos pioneiros que células neoplásicas convertem a maior parte da glicose internalizada em lactato, mesmo na presença de oxigênio suficiente para ocorrência de fosforilação oxidativa (KREBS, 1972; OTTO WARBURG; WIND; NEGELEIN, 1923; WARBURG, 1956). Ao longo das últimas décadas, com o advento de estudos de biologia funcional molecular, evidenciou-se que alterações genéticas, como por exemplo, mutações em oncogenes e genes supressores de tumor, contribuem com estas alterações no metabolismo celular. Neste contexto, a reprogramação ou remodelação metabólica de células tumorais, inclusive de gliomas, proporciona a melhor resposta de sobrevivência a estímulos deletérios, favorecendo a síntese de biomassa (biogênese), progressão da neoplasia e resistência a terapias (VENNETI; MISCHER, 2015; VENNETI; THOMPSON, 2017).

A maioria das células de glioma é capaz de aumentar a captação de glicose para satisfazer demandas energéticas e biossintéticas decorrentes do rápido crescimento tumoral. Neste contexto, estas células tumorais possuem adaptações bioquímicas adicionais que: (1) promovem a disponibilização de carbonos derivados de glicose para produção de ribose,

glicerol, serina e glicina; (2) utilizam outros derivados de glicose para a síntese lipídica através da atividade da ATP citrato liase e (3) secretam lactato. A glutaminólise, isto é, o catabolismo da glutamina que é utilizada para a proliferação celular, é também uma característica dos gliomas. Esta reprogramação metabólica age: (1) como fonte de nitrogênio para síntese de nucleotídeos e aminoácidos; (2) como mecanismo para síntese de NADPH e lípidos e (3) como fonte alternativa de carbono para suprir etapas intermediárias do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (VENNETI; MISCHÉL, 2015; VENNETI; THOMPSON, 2017).

Por sua vez, a lipogênese e o metabolismo do colesterol estão aumentados em gliomas devido: (1) à absorção de lipídios exógenos; (2) sinalização celular na qual participam fatores de transcrição como o SREBP-1 (do inglês, *sterol regulatory element-binding proteins 1*); (3) expressão de proteínas moduladas pelo SREBP-1, como a FASN (*fatty acid synthase*), e (4) expressão de enzimas envolvidas na biossíntese de colesterol, como a FDFT1 (*farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1*), garantindo assim a produção da membrana lipídica e transdução de sinais intra- e extracelulares (Figura 1) (AN et al., 2017; EBERLÉ et al., 2004; FERRÉ; FOUFELLE, 2010; JAYAKUMAR, 1994; LUO et al., 2017; NORRMÉN et al., 2014; TANSEY, 2000; VAN DEIJK et al., 2017).

a



b

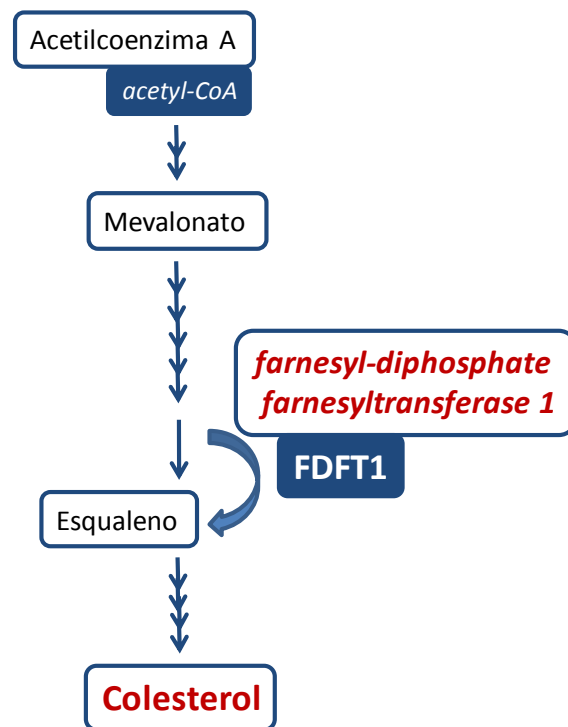


Figura 1. Esquemas simplificados de vias de síntese de ácidos graxos e colesterol. Em **a**, representação de vias de sinalização celular moduladas pelo fator de transcrição SREBP-1, como, por exemplo, aquela da FAS. Em **b**, etapas da síntese de colesterol com destaque para a participação da enzima FDFT1, a qual participa da conversão do mevalonato em esqualeno (SREBP-1: do inglês, *sterol regulatory element-binding proteins*; FAS: *fatty acid synthase*; FDFT1: *farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1*). Adaptado de TANSEY (2000) e RU et al. (2013).

Além dos aspectos relacionados à reprogramação metabólica de gliomas, alterações relacionadas a síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenham um papel crucial na progressão destes tumores. EROs, considerados radicais livres, são definidas como moléculas altamente reativas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados. Especificamente, a adição de um, dois ou três elétrons à molécula de O_2 forma o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou hidroxila ($OH\cdot$), respectivamente (BERGENDI et al., 1999). Ainda que produzidas pelo metabolismo celular normal, estas espécies podem ter papéis paradoxais em sistemas biológicos, como por exemplo, em células tumorais, já que são capazes de exercer efeitos fisiológicos ou nocivos, dependendo da concentração e da interação com macromoléculas intracelulares (AIRTON et al., 2010).

Em condições fisiológicas, as EROs participam de sistemas de sinalização celular em baixas concentrações. Por outro lado, em condições de estresse oxidativo, em que há produção excessiva de EROs e/ou deficiência de sistemas antioxidantes, essas espécies podem reagir com lipídios, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA). A ação de EROs sobre os lipídios da membrana leva à perda não somente da integridade estrutural e funcional deste componente celular, mas também de estruturas intracelulares, alterando assim a fluidez e permeabilidade. Além disso, essas espécies podem provocar a fragmentação, ligação cruzada e agregação proteica, resultando, por exemplo, em ativação ou inativação enzimática. Quanto ao DNA genômico ou mitocondrial, a atuação de EROs pode determinar não só fragmentação da molécula, mas também outras alterações estruturais como deleções, inserções e mutações de pares de bases. Por sua vez, células tumorais possuem níveis mais elevados de EROs e menor controle de atividade antioxidante, quando comparadas a células normais, o que as torna mais suscetíveis a alterações da homeostase redox (AIRTON et al., 2010; GLASAUER; CHANDEL, 2014).

Particularmente, os efeitos lesivos do ânion superóxido (O_2^-) são minimizados em condições basais por um sistema enzimático antioxidante intracelular. A superóxido dismutase (SOD) é uma importante enzima deste sistema e catalisa a conversão do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é transformado em água por ação da catalase e glutathione peroxidase. Três isoformas da SOD são expressas em humanos: a SOD citosólica ligada a íons cobre e zinco (SOD1), a SOD presente na matriz mitocondrial e ligada a íons manganês (SOD2) e a SOD extracelular localizada principalmente na matriz extracelular e também ligada a íons cobre e zinco (SOD3). A catalase (CAT) e a glutathione (GSH), moléculas também consideradas antioxidante, catalisam a redução do peróxido de

hidrogênio à água e oxigênio molecular ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) (Figura 2) (PARK; OH, 2011). Por fim, a análise da atividade da SOD, CAT, quantificação de glutathiona total e a investigação da síntese do ânion superóxido podem ser utilizadas como indicadores de suscetibilidade a estresse oxidativo.

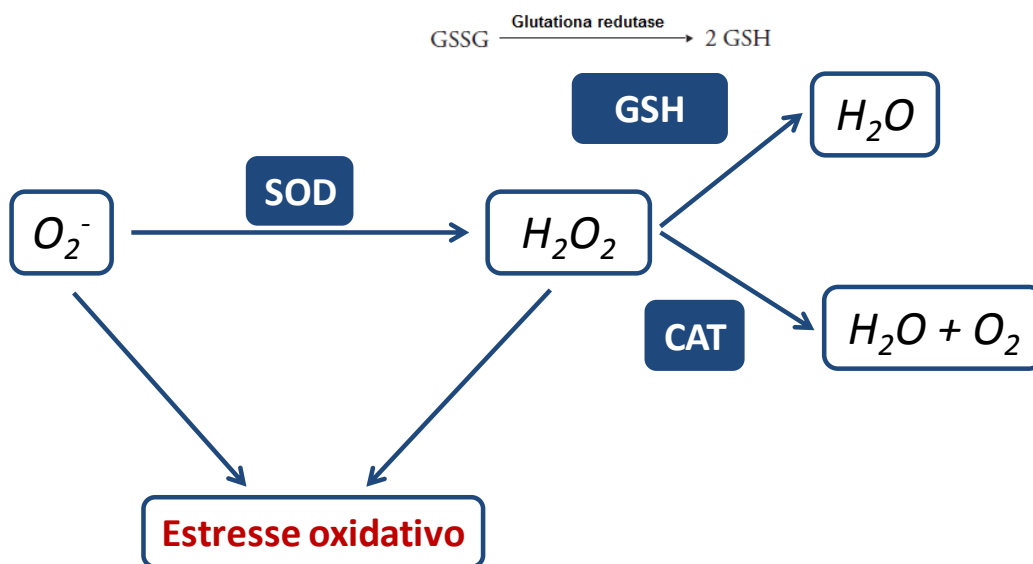


Figura 2. Esquema simplificado de mecanismos antioxidantes intracelulares. Destaque para o ânion superóxido (O_2^-), enzima superóxido dismutase (SOD), formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e participação das peroxidases glutathiona (GSH) e catalase (CAT). Adaptado de PARK; OH (2011) e CAYMAN CHEMICAL (2017).

1.3. Fitol

Compostos que interferem com balanço redox tem sido utilizados como abordagens terapêuticas para reduzir a viabilidade de células tumorais, tais como os quimioterápicos daunorrubicina, vincristina, paclitaxel, docetaxel e 2-metoxiestradiol (GLASAUER; CHANDEL, 2014; SAEIDNIA; ABDOLLAHI, 2013; WU et al., 2011). Outros compostos com capacidade de modular o estado redox têm sido investigados experimentalmente como possíveis estratégias futuras contra células neoplásicas, dentre eles o fitol e o retinol.

De fato, o fitol é um composto que tem sido identificado como tóxico para células tumorais. PEJIN; KOJIC; BOGDANOVIC (2014) relatam efeito deletério desta substância sobre linhagens celulares de tumores humanos, como mama, próstata, pulmão, pele e cólon. A citotoxicidade foi avaliada *in vitro* utilizando o ensaio de MTT e uma resposta concentração-

dependente foi observada em todas as linhagens celulares. No entanto, o mecanismo de ação do fitol nas células neoplásicas avaliadas não foi investigado e permanece em aberto.

O fitol (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol), precursor do ácido fitânico (ácido 3,7,11,15-tetrametilexadecanóico) e provavelmente o mais abundante isoprenoide acíclico na biosfera, caracteriza-se por ser um álcool acíclico de cadeia longa ($C_{20}H_{40}O$) e ramificada (Figura 3). Para humanos, as principais fontes exógenas de fitol e ácido fitânico são gordura animal, produtos derivados do leite e pescados. Diferente de muitos ácidos graxos, a degradação do fitol ocorre via α -oxidação, devido à presença de um grupo metil na posição 3, com formação de CO_2 e ácido pristânico (ácido 2,6,10,14- tetrametilpentadecanoico), um ácido com um átomo de carbono a menos e um grupo metil na posição 2 (GLOERICH et al., 2007; VAN DEN BRINK et al., 2005; VAN DEN BRINK; WANDERS, 2006).

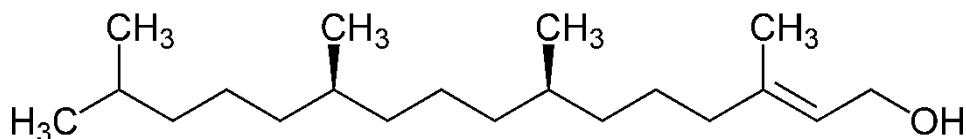


Figura 3. Fórmula estrutural do fitol (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol). Caracteriza-se por ser um álcool acíclico de cadeia longa e ramificada. Adaptado de VAN DEN BRINK et al. (2005).

A degradação do fitol é iniciada pela sua conversão à fitenal, via álcool desidrogenase, e posterior produção de ácido fitênico pela enzima microsossomal aldeído desidrogenase (FALDH). Esse produto é ativado ao seu éster de CoA (fitenoil-CoA) no retículo endoplasmático ou peroxissomo, seguido pela formação de ácido fitânico e posterior α -oxidação (GLOERICH et al., 2007; VAN DEN BRINK et al., 2005; VAN DEN BRINK; WANDERS, 2006).

O interesse científico pelo fitol e ácido fitânico surgiu em decorrência de uma alteração metabólica dos lipídeos de caráter recessivo, denominada de Síndrome de Refsum, uma doença descrita inicialmente em 1946, caracterizada pelo efeito citotóxico decorrente do acúmulo de ácido fitânico em diversos órgãos, como fígado, rins e outros, devido à deficiência funcional de fitanoil-Co-A hidroxilase. Por outro lado, investigações realizadas nas últimas décadas evidenciaram que o fitol pode desempenhar funções terapêuticas atuando sobre o balanço redox.

Em modelos experimentais de doenças autoimunes, o fitol tem sido empregado como ativador do complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) oxidase. A NADPH oxidase é uma enzima que catalisa a produção de ânion superóxido (O_2^-) a partir de oxigênio e de NADPH. Além disso, pode participar da síntese de peróxido de hidrogênio a partir de O_2^- (BABIOR, 2004). Especificamente, a administração do fitol a ratos levou a aumento de atividade de NADPH oxidase e proteção contra artrite reumatoide (OLOFSSON et al., 2007). De forma semelhante, HUBERLE et al. (2009) mostraram a participação da via NADPH oxidase em modelo de Síndrome de Guillain-Barré em ratos, no qual o tratamento com fitol diminuiu a gravidade da doença. Por sua vez, SANTOS et al. (2013) verificaram diminuição da produção de radicais livres pelo fitol. O objetivo destes últimos pesquisadores foi avaliar os efeitos antinociceptivos do fitol usando modelos químicos e térmicos de nocicepção em camundongos e avaliar seus efeitos antioxidantes *in vitro*. Neste contexto, tais autores mostraram que o fitol foi capaz de reduzir a produção de radicais livres. Esta ação anti-oxidante pode ser atribuída à sua característica estrutural, pois, o fitol, sendo um álcool insaturado de cadeia ramificada, possui um grupo hidroxila (OH) em sua molécula. Provavelmente, o fitol, ao reagir com um radical livre, doa átomos de hidrogênio para um elétron não emparelhado, o que proporciona conversão de radicais livres em espécies menos reativas (DE SOUSA, 2011; GUIMARÃES et al., 2010). Contudo, não foram relatados, até o momento, estudos sobre os efeitos do fitol no metabolismo oxidativo de gliomas.

Conforme mencionado no item 1.2, mutações em oncogenes e genes supressores de tumor podem alterar o metabolismo das células de glioma induzindo assim uma remodelação ou reprogramação metabólica. Particularmente, alterações envolvendo a síntese de colesterol e ácido graxo, favorecem não só a síntese da biomassa (biogênese) mas também a resistência a terapias (VENNETI; MISCHER, 2015). Neste contexto, compostos que interferem no metabolismo do colesterol e/ou ácido graxo, tal como fitol, são investigados como possível estratégia terapêutica contra células neoplásicas (PEJIN; KOJIC; BOGDANOVIC, 2014).

Sabe-se que o fitol é convertido no meio intracelular em ácido fitânico, o qual pode alterar a expressão de proteínas envolvidas na síntese e metabolismo de lipídeos, tal como o SREBP-1 (AN et al., 2017), um fator de transcrição que se liga ao elemento regulatório de esterol (SRE) de diversos genes. Entre os genes transcritos estão aquele do receptor LDL e outros associados com a biossíntese de colesterol, ácido graxo e de lipídeos

(EBERLÉ et al., 2004; FERRÉ; FOUFELLE, 2010). Além disso, a FAS, um complexo multi-enzimático codificado pelo gene FASN em humanos é uma outra proteína que pode ser regulada por fitol e que também participa da produção de biomassa e síntese de ácidos graxos (JAYAKUMAR, 1994; LUO et al., 2017; NORRMÉN et al., 2014; VAN DEIJK et al., 2017). Uma outra enzima envolvida na síntese do colesterol que está localizada na membrana do retículo endoplasmático é a FDFT1 (também referida na literatura inglesa como *squalene synthase* (SQ)). A SQ catalisa uma reação em que duas moléculas de pirofosfato de farnesila idênticas são convertidas em esqualeno, um precursor do colesterol (TANSEY, 2000). Até onde sabemos, existe um estudo sobre FDFT1 e glioma (CRICK et al., 1995), destacando a importância desta enzima para a síntese de colesterol na linhagem de rato C6. Contudo, não encontramos estudos que tenham abordado a expressão de FDFT1 em células de glioma, expostas ou não a fitol.

1.4. Retinol

O retinol (ou vitamina A) e seus derivados naturais ou sintéticos - coletivamente referidos como retinóides (RETs) exercem, em vertebrados, diversos efeitos relacionados a embriogênese, reprodução, visão, regulação da inflamação, crescimento e diferenciação celular em condições fisiológicas ou patológicas (neoplasias) (BLOMHOFF, 1994; VAHLQUIST; DUVIC, 2007). Este composto lipossolúvel foi descrito em 1920 por Drumond como sendo um nutriente essencial denominado “*fat soluble A*” (HOLLINGSWORTH; WRIGHT, 1954).

O termo vitamina A é utilizado para os derivados C₂₀- β -ionona, os quais exibem atividade de *trans*-retinol. Quimicamente, a vitamina A apresenta quatro unidades isoprenóides unidas através de ligação “cabeça-cauda”. Desta forma, tal composto pode ser derivado de uma molécula monocíclica contendo cinco duplas ligações carbono-carbono e um grupo funcional terminal na porção final da região acíclica (VAHLQUIST; DUVIC, 2007) (Figura 4).

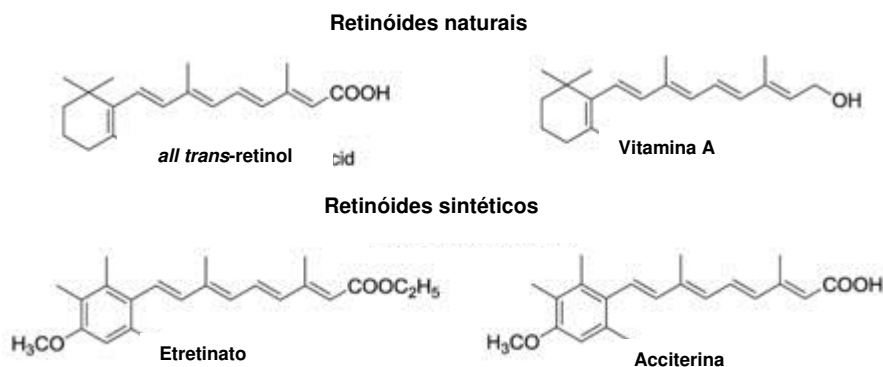


Figura 4. Fórmulas estruturais de retinóis. Destaque para a vitamina A que apresenta quatro unidades isoprenóides unidas através de ligação “cabeça-cauda”. Assim, tal composto pode ser derivado de uma molécula monocíclica contendo cinco duplas ligações carbono-carbono e um grupo funcional terminal na porção final da região acíclica. Adaptado de VAHLQUIST; DUVIC (2007).

Os RETs possuem importante papel na morfogênese, na diferenciação e no desenvolvimento celular. Apesar de a ação destes compostos não estar totalmente elucidada, acredita-se que exerçam suas ações através da interação com duas famílias de receptores nucleares, denominados RARs (*retinoic acid receptors*) e RXRs (*retinoid X receptors*). Ambos os receptores possuem três diferentes isoformas: α , β e γ (FISHER; VOORHEES, 1996). Os RETs atravessam a membrana celular e, no interior do citoplasma, ligam-se a proteínas citosólicas denominadas CRBPs (*cytosolic retinol bound protein*) ou CRABPs (*cytosolic retinoic acid bound protein*), formando um complexo que permite sua passagem para o interior do núcleo. Neste último compartimento celular, os RETs ligam-se aos receptores RARs, formando um complexo que tem capacidade de se ligar a regiões conhecidas como RAREs (*responsive element retinoic acid*), porções do DNA que correspondem a promotores de centenas de genes, dentre eles os relacionados à expressão do próprio receptor RAR, das enzimas SOD1 e SOD2, do transportador de cistina e glutamato (sistema X_c^-) e CAT (MAMEDE et al., 2011; TANG; GUDAS, 2011). Especificamente, o ácido *trans*-retinóico (ATRA) liga-se a receptores RARs com uma afinidade similar para as três isoformas. (Figura 5).

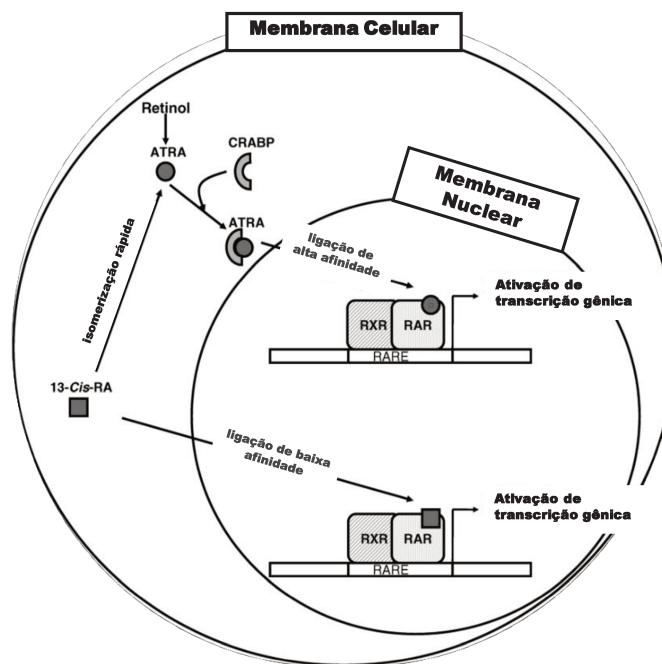


Figura 5. Esquema simplificado de vias de sinalização de retinóis. O retinol atravessa a membrana celular, é convertido a ácido trans-retinóico (ATRA), o qual se liga a proteínas citosólicas denominadas CRBP (do inglês, *cytosolic retinol bound protein*) ou CRABP (*cytosolic retinoic acid bound protein*) e forma um complexo que se transloca para o núcleo. Neste compartimento celular, o ATRA liga-se aos receptores RAR (*retinoic acid receptors*) e RXR (*retinoid X receptors*), formando um outro complexo que interage com regiões promotoras conhecidas como RAREs (*responsive element retinoic acid*). Adaptado de TANG; GUDAS (2011)).

Após o tratamento com ATRA ou ATRA associado com *interferon gama*, KARMAKAR et al. (2010) verificaram, em linhagem de glioblastoma humano (T98G), indução da via extrínseca pró-apoptótica pela ativação da caspase-8 e clivagem de *Bid* para *tBid*, com posterior translocação para mitocôndria. Além disso, tais autores constataram a inibição da expressão das proteínas anti-apoptóticas hTERT, c-IAP2 e survivina, o que resultou em aumento da fragmentação de DNA detectado através da técnica de TUNEL. Por fim, até onde sabemos, não há relatos sobre alterações da expressão e/ou atividade da SOD, CAT e a síntese de glutatona em gliomas após tratamento com RETs. Entretanto, investigações funcionais sobre tais enzimas em tumores gliais parecem ser de grande importância, uma vez que o ATRA induziu a morte de células de glioblastoma humano.

1.5. Justificativa

Assim, considerando que glioblastoma é a neoplasia astrocitária mais comum, de prognóstico sombrio e com escassas alternativas terapêuticas na atualidade, o presente estudo visa investigar possível ação citotóxica *in vitro* dos compostos fitol e retinol sobre linhagens

celulares deste glioma de alto grau. Além de contribuir com a escassa literatura atual a respeito da ação destes compostos sobre a viabilidade de gliomas, investigaremos também se o eventual efeito tóxico está associado com alterações do equilíbrio redox e da síntese de biomassa (especificamente das vias de produção de colesterol, ácido graxo e lipídeos).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar alterações de viabilidade e metabólicas relacionadas com o equilíbrio redox e de síntese de biomassa em linhagens de glioblastoma humano, após tratamento *in vitro* com fitol ou retinol.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar efeito do fitol e do retinol sobre a viabilidade de linhagens celulares de glioblastoma humano, após tratamento *in vitro*.

Verificar ocorrência de desequilíbrio da homeostase redox após o tratamento de linhagens celulares de glioblastoma humano com fitol ou retinol.

Analisar se eventual redução da viabilidade das células de glioblastoma humano expostas a fitol ou retinol está associada com mecanismo de morte por apoptose ou necrose.

Estudar a expressão gênica em larga escala de células de glioblastoma humano expostas a fitol ou retinol, visando identificar vias celulares moduladas por estes compostos.

Investigar eventual alteração na síntese de proteínas cujos genes apresentem alteração de expressão após o tratamento de linhagens de glioblastoma humano com fitol ou retinol.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares

Foram utilizadas linhagens celulares de glioblastoma humano (U87MG – *American Type Culture Collection* (ATCC), Manassas, VA, USA; A172 e T98G – doações da Profa. Dra. S. K. N. Marie, Universidade de São Paulo, SP, Brasil). A manutenção celular foi realizada com meio DMEM, contendo 2.0 g/L de glicose (cat nº D0460, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (cat nº S0011, Vitrocell) e 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina) (cat nº P0403, Vitrocell) em estufa umidificada contendo CO₂ (5 %) a 37°C.

3.2. Grupos experimentais e tratamentos com fitol ou retinol para viabilidade celular/IC₅₀

As linhagens celulares de glioblastoma humano (U87MG, A172 e T98G) foram plaqueadas na concentração de 10.000 células/cm² em placas de 96 poços. Para o plaqueamento, as células foram descoladas dos frascos de cultura utilizando-se solução de Tripsina-EDTA (50 µl/cm², cat nº T0012, Vitrocell) por cerca de 3 minutos. A tripsina foi inativada utilizando-se o meio suplementado. A suspensão celular foi centrifugada (400 g, 5 min, 25 °C, Baby® I Centrifuge mod 206; FANEM, São Paulo, SP, Brasil) e a quantidade de células estimada, usando-se a câmara de Neubauer (cat nº 111020, Laboroptik, Lancing, Inglaterra).

Vinte e quatro (24) horas após o plaqueamento, com o objetivo de determinar o valor de IC₅₀, o meio de cultura foi substituído por solução de igual volume constituída por meio de cultura suplementado contendo fitol (250.000,00 a 1,91 µM (cat nº W502200, Sigma; St Louis, MO, USA) ou retinol (250.000,00 a 1,91 µM (cat nº R7632, Sigma), por um período variando de 24 a 72 horas.

Para os experimentos de viabilidade celular de co-tratamento com outras moléculas antioxidantes as células foram tripsinizadas conforme descrito acima e alocadas em placas de 96 poços na densidade de 10.000 células/cm². Após 24 horas, o meio de cultura suplementado foi substituído por solução de igual volume constituída por meio de cultura suplementado contendo um dos seguintes compostos antioxidantes: Trolox®, um análogo de vitamina E (100 µM; cat nº 238813, Sigma; DE BITTENCOURT PASQUALI et al., 2013), ou N-acetilcisteína (NAC), um precursor da glutatona (5 mM, cat nº A9165, Sigma;

ROSSATO et al., 2014). As células ficaram expostas a estes compostos por um período de 1 hora para então serem submetidas ao tratamento por 72 horas com FIT ou RET nas IC₅₀ correspondentes a este período.

As soluções estoque de fitol, retinol e NAC foram preparadas em meio de cultura acrescidas de DMSO sendo que as concentrações foram de 0,5 M para FIT ou RET e 0,1 M para NAC. Para o preparo da solução estoque de Trolox®, a droga foi solubilizada primeiramente em etanol absoluto na concentração de 1 M.

Estas soluções estoque foram, então, diluídas em meio de cultura suplementado para se obter as concentrações finais de retinol, fitol, Trolox® e NAC utilizadas nos experimentos de tal forma que a concentração final de DMSO ou etanol a que as células estivessem expostas não ultrapassasse 0,1%. Em paralelo, foram estudados grupos constituídos por células cultivadas apenas em meio de cultura suplementado ou em meio suplementado acrescido do veículo de diluição (DMSO ou etanol) de cada composto (retinol, fitol, Trolox® ou NAC).

3.3. Avaliação da viabilidade celular: Ensaio colorimétrico (MTT)

As células foram plaqueadas na densidade de 10.000 células/cm² e, após cada período de incubação, a viabilidade foi avaliada através do ensaio colorimétrico MTT. Este ensaio é baseado na clivagem do sal tetrazolium (MTT, cat nº M5655, Sigma), de coloração amarela, por enzimas mitocondriais, como a succinato desidrogenase. Tal clivagem produz o composto solúvel formazan, de coloração azulada. A quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células vivas presentes no momento em que o MTT foi adicionado ao meio de cultura (SYLVESTER, 2011; TADA et al., 1986). Após cada período de incubação, o meio de cultura foi retirado e 50 µl de solução de MTT (1 mg/ml em DMEM 2 g/L de glicose, sem fenol, cat nº D0462, Vitrocell) foram adicionados a cada poço da placa de 96 poços e as células incubadas por aproximadamente 1 hora em estufa a 37° C e 5 % CO₂. Em seguida, o conteúdo do poço foi removido e 150 µl de etanol absoluto foram adicionados com o propósito de solubilizar os cristais de formazan formados. Os resultados foram obtidos através da leitura da absorbância da solução a 570 nm subtraindo-se o valor da absorbância medido a 650 nm em leitora de placa (PowerWave XS 2, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). As medidas de absorbância dos poços sem células foram consideradas como controles negativos (brancos) do ensaio e subtraídas de cada valor de absorbância obtido nos poços com células.

A viabilidade celular foi expressa em porcentagem, conforme fórmula abaixo:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \left(\frac{\text{absorbância do grupo tratado}}{\text{absorbância do grupo controle}} \right) \times 100$$

3.4. Para todos os demais protocolos experimentais

Conforme detalhado nos itens correspondentes a seguir, para os demais experimentos realizados com as linhagens U87MG, A172 e T98G, utilizamos valores correspondentes a IC₅₀ de 72 horas tanto de fitol quanto de retinol.

3.5. Investigação de morte celular por apoptose ou necrose através de citometria de fluxo utilizando as moléculas anexina V e 7AAD

As percentagens de morte celular por apoptose ou necrose foram determinadas por meio da utilização das molécula anexina V (cat nº A13201, ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) e 7-aminoactinomycin D (cat nº A1310, ThermoFisher Scientific) marcadores. Após 72 horas de incubação com fitol ou retinol, as células foram descoladas das placas, ainda contendo o meio de cultura, utilizando-se *rubber policeman*. Todo o conteúdo (meio de cultura e células) foi transferido para tubos de 50 mL para centrifugação a 4000 g, por 5 min., à temperatura ambiente. Após centrifugação, o meio de cultura foi retirado e o *pellet* de células ressuspensão em tampão de ligação (10 mM de Hepes, 140 mM de NaCl e CaCl₂ a 5 mM, pH 7,4) contendo 1:500 de anexina V. Após 15 min de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se 7-AAD (1:50) e populações de células foram analisados separadamente para a intensidade do sinal fluorescente da sonda utilizando um sistema FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) equipado com um laser de argon e o software CellQuest (version 4.1) (Becton Dickinson). Dez mil eventos (células) para cada amostra foram avaliados.

3.6. Quantificação da síntese de ânion superóxido citoplasmático *Dihydroethidium* (*hydroethidine*) - DHE

Após os tratamentos com retinol e fitol, as células foram descoladas das placas de cultura utilizando-se solução de Tripsina-EDTA por cerca de 3 minutos. A tripsina foi inativada utilizando-se o meio suplementado, a suspensão celular foi centrifugada (400 g, 5

mim, 25° C) e, em seguida, as células foram resuspensas em 500 µL DMEM (2 g/L de glicose sem fenol). Após, o DHE (0,5 µM, cat nº D11347, ThermoFisher Scientific) foi adicionado, seguindo-se incubação por 5 minutos a 37° C e 5 % CO₂.

A média da intensidade de fluorescência decorrente da oxidação do DHE pelo ânion superóxido de origem citoplasmática foi analisada por citometria de fluxo. O mínimo de 10.000 eventos foram registrados através do citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado com laser de argônio e software CellQuest (Becton Dickinson) com comprimento de onda de excitação e emissão de 488 nm e 620 nm.

3.7. Quantificação da síntese de ânion superóxido mitocondrial - MitoSOXTM Red

Após os tratamentos com fitol e retinol, as células foram descoladas das placas de cultura utilizando-se solução de Tripsina-EDTA por cerca de 3 minutos. A tripsina foi inativada utilizando-se o meio suplementado, a suspensão celular foi centrifugada (400 g, 5 mim, 25° C) e, em seguida, as células foram resuspensas em 500 µL DMEM (2 g/L de glicose sem fenol). Após, o MitoSOXTM Red (2,5 µM, cat nº M36008, ThermoFisher Scientific) foi adicionado, seguindo-se incubação por 5 minutos a 37° C e 5 % CO₂.

A média da intensidade de fluorescência decorrente da oxidação do MitoSOXTM Red pelo ânion superóxido de origem mitocondrial foi analisada por citometria de fluxo. O mínimo de 10.000 eventos foram registrados através do citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado com laser de argônio e software CellQuest (Becton Dickinson) com comprimento de onda de excitação e emissão de 488 nm e 620 nm.

3.8. Quantificação da atividade de superóxido dismutase e catalase

As enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foram mensuradas no lisado celular utilizando kits de ensaio disponíveis comercialmente. Especificamente, as células foram plaqueadas em discos de 60 cm² (cat nº 93100, TPP, Zollstrasse, Trasadingen, Suíça), na densidade de 10.000 células/cm². Após 72 horas de incubação com fitol ou retinol, as células foram descoladas das placas, ainda contendo o meio de cultura, utilizando-se “rubber policeman”. Todo o conteúdo (meio de cultura e células) foi transferido para tubos de 50 mL para centrifugação a 4000 g, por 5 mim, à temperatura ambiente. Após centrifugação, o meio de cultura foi retirado e o “pellet” de células ressuspense em tampão (1 mL) contendo 50 mM de MES pH 6-7 (cat nº M8250, Sigma), 1 mM de EDTA (cat nº E5134, Sigma) e 0.1% de Triton X-100 (cat nº T9284, Sigma). Em seguida, as amostras foram sonicadas

(Sonicator 3000, Misonix, New Highway, NY, USA) por 45s (3 ciclos de 15s com intervalo de repouso de 10s entre eles), com potência (*power setting*) entre 0.5 e 1. Logo após, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por cerca de 1 min e mediu-se a concentração de proteína total utilizando o método colorimétrico de Bradford (cat nº B6916, Sigma; (MITCHENER et al., 1976). As amostras foram centrifugadas a 10000 g, por 15 min, 4°C, o sobrenadante foi mantido em gelo e o pellet, descartado.

A detecção da atividade SOD (cat nº 706002, Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA) é feita com a utilização do sal de tetrazolium para detectar radicais superóxidos que são gerados pela adição de xantina oxidase às amostras. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para promover 50% de dismutação dos radicais superóxidos. A quantidade de SOD é calculada com base na concentração conhecida dos padrões de SOD (U/mL).

A atividade da catalase (cat nº 707002, Cayman Chemical Co.) é baseada na reação da enzima com metanol na presença de peróxido de hidrogênio e geração de formaldeído, que é detectado com a adição de um cromógeno (4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol). A atividade da catalase é calculada com base na concentração conhecida dos padrões de formaldeído (mM), utilizando a equação: catalase (nmol/min/mL) = mM da amostra/20 minutos. Uma unidade (U) de catalase é definida como a quantidade de enzima que promove a formação de 1 nmol/minuto de formaldeído.

Os valores de atividade obtidos de SOD e CAT foram divididos pela concentração de proteína total das amostras (mg/mL) e, então, obtido o valor correspondente à atividade relativa. Assim, os valores relativos foram expressos em U por mg de proteína para SOD e nmol/minuto por mg de proteína para CAT

3.9. Quantificação de glutathiona total

A quantidade de glutathiona total (glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG)) foi avaliada através de método colorimétrico enzimático de reciclagem, utilizando *kit* comercial (cat nº 703002, Cayman Chemical Co.). O protocolo proposto pelo fabricante foi adaptado. Especificamente, as células foram plaqueadas em discos de 60 cm² (cat nº 93100, TPP), na densidade de 10.000 células/cm². Após 72 horas de incubação com fitol ou retinol, as células foram descoladas das placas, ainda contendo o meio de cultura, utilizando-se “rubber policeman”. Todo o conteúdo (meio de cultura e células) foi transferido para tubos de 50 mL para centrifugação a 4000 g, por 5 min, à temperatura ambiente. Após

centrifugação, o meio de cultura foi retirado e o “pellet” de células ressuspensas em tampão (1 mL) contendo 50 mM de MES pH 6-7 (cat nº M8250, Sigma), 1 mM de EDTA (cat nº E5134, Sigma) e 0.1% de Triton X-100 (cat nº T9284, Sigma). Em seguida, as amostras foram sonicadas (Sonicator 3000) por 45s (3 ciclos de 15s com intervalo de repouso de 10s entre eles), com potência (*power setting*) entre 0.5 e 1. Logo após, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por cerca de 1 min e mediu-se a concentração de proteína total utilizando o método colorimétrico de Bradford (cat nº B6916, Sigma; Bradford, 1976). As amostras foram centrifugadas a 10000 g, por 15 min, 4°C, o sobrenadante foi mantido em gelo e o pellet, descartado. O sobrenadante foi submetido à desproteíntização, utilizando-se igual volume de ácido metafosfórico 10% (cat nº 239275, Sigma). As amostras foram agitadas em vórtex e incubadas por 5 min a temperatura ambiente. Seguiu-se à centrifugação (10000g, 5 min) e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C para medição da glutatona total. Imediatamente antes desta medição, foi adicionado trietanolamina 4M (cat nº T58300, Sigma) às amostras (50 µl por mL de amostra). A adição de trietanolamina eleva o pH da amostra, permitindo a atividade das enzimas envolvidas no processo de reciclagem.

O ensaio colorimétrico enzimático é baseado na reação da GSH com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (composto DTNB ou reagente de Ellman), a qual produz ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (cromóforo amarelo TNB, com máxima absorvância a 412 nm) e o complexo glutatona oxidada-TNB (GSTNB). O complexo GSTNB é reduzido continuamente pela enzima glutatona redutase (GR) em presença de NADPH, formando novamente a GSH. A taxa de formação do TNB, medida em 405-414 nm, é proporcional à quantidade de GSH na amostra. Uma vez que a GR reduz a GSSG formada produzindo 2 GSH, a quantidade de glutatona medida neste protocolo reflete os níveis de glutatona total na amostra (Figura 6). O aumento linear da absorvância a 405 nm em função do tempo foi aferido usando leitora de placa (PowerWave XS 2, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). As reações de concentrações conhecidas de glutatona e dos grupos experimentais foram monitoradas minuto a minuto por meia hora gerando uma reta cuja inclinação é denominada *i-slope*. Construiu-se uma curva padrão com as concentrações conhecidas de glutatona, na qual os valores em µM foram representados no eixo X e o *i-slope* de cada concentração conhecida no eixo Y. Para o cálculo de glutatona das amostras dos grupos experimentais, utilizou-se o valor do *i-slope* das amostras, tomando-se por base a curva padrão acima mencionada ($Y=aX+b$). O resultado foi multiplicado por 2 para compensar a diluição da amostra pelo ácido metafosfórico.

Em resumo, o cálculo de concentração de glutathiona pode ser representado pela fórmula abaixo:

$$\text{Glutathiona total (X)} = [(i\text{-slope dos grupos experimentais} - b)/a] \times 2$$

Os valores de concentração obtidos em μM foram divididos pela concentração de proteína total na amostra (mg/mL) e, então, foi obtido o valor correspondente à quantidade de glutathiona total, a qual foi expressa em nmol de glutathiona por mg de proteína.

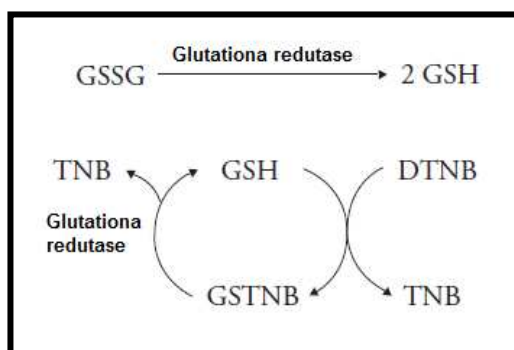


Figura 6. Reações químicas que ocorrem durante o método enzimático para quantificação da GSH total e GSSG (CAYMAN CHEMICAL, 2017).

3.10. Análise de expressão gênica: Transcriptoma de células A172 tratadas com fitol ou retinol

As células foram cultivadas na densidade de $10.000 \text{ células/cm}^2$ e tratadas com fitol (IC_{50}) ou retinol (IC_{50}). Após a incubação (72 horas), foram analisadas tanto as células aderidas às placas quanto aquelas possivelmente soltas no meio de cultura. As células aderidas foram descoladas das placas, ainda contendo o meio de cultura, utilizando-se “rubber policeman”. Em seguida, realizou-se a extração e purificação de RNA total de cada amostra através do protocolo fenol clorofórmio utilizando TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, cat n° 15596018), conforme instruções do fabricante. Uma quantidade de 400 ng de RNA foi convertido a uma biblioteca de cDNA utilizando-se o kit TruSeq Stranded mRNA LT (Illumina, cat n° 122-2103-RS, San Diego, CA, USA), também conforme as instruções do fabricante.

As bibliotecas produzidas foram quantificadas por qPCR utilizando-se primers específicos para os adaptadores universais Illumina. Para cada biblioteca produzida foi adicionada uma sequência identificadora única para posterior separação das amostras após o sequenciamento. Esta estratégia permitiu que todas as amostras fossem sequenciadas em uma mesma corrida, minimizando possíveis variações nas condições de sequenciamento.

As bibliotecas foram sequenciadas em uma plataforma HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, USA) em modo High Output, produzindo-se sequências de 2x100 nucleotídeos para cada molécula sequenciada.

3.11. Análise de expressão gênica: Análise dos dados de sequenciamento

O alinhamento das sequências produzidas foi realizado utilizando-se o pacote de software TopHat2 (<http://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>) e utilizando como referência o genoma da espécie *Homo sapiens*, montagem UCSC hg19. A porcentagem média de sequências alinhada para o conjunto de dados foi de aproximadamente 90%. Para a análise de expressão de genes conhecidos foram utilizados os pacotes de softwares:

- HTSeqCount (https://htseq.readthedocs.io/en/release_0.9.1/);
- DESeq2 (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.htm>).

3.12. Western Blotting para SREBP-1, FASN e FDFT1

Após 72 horas de exposição ao fitol ou retinol, as células foram descoladas das placas (120 cm²) utilizando *cell scraper* e, juntamente com o meio de cultura, transferidas para tubo falcon seguindo-se de centrifugação (4.000 rpm por 5 minutos a 4°C). Posteriormente, após remoção do meio de cultura do sobrenadante, o *pellet* de células foi resuspenso em tampão de extração contendo 50 mM de tampão fosfato (*phosphate buffer* - PB) pH 7.4, 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 5 % de βmercaptoetanol, 10 mM ortovanadato de sódio (Na₃VO₄), 10 mM fluoreto de sódio (NaF) e 1% de inibidor de protease (Sigma, cat nº P8340). As células foram, então, lisadas utilizando o método de sonicação em gelo (3 ciclos de 15s; MISONIX, Sonicator®3000, Farmingdale, NY, USA). Após, as amostras foram mantidas por 5 minutos em água fervente, centrifugadas por 5 minutos (12.000 g - temperatura ambiente), o pellet descartado e a concentração de proteínas no sobrenadante foi determinada por método colorimétrico (Bradford Reagent, cat nº B6916, Sigma; Bradford, 1976). O volume das amostras a ser aplicado no gel de eletroforese foi calculado para que todas possuíssem igual concentração total de proteína. Após a realização do método colorimétrico, as amostras receberam igual volume de tampão (LAEMMLI, 1970) e foram armazenadas a -80°C.

Para a realização da técnica de Western Blotting, as amostras de proteínas com o tampão LaemmLi foram mantidas por 5 minutos em água fervente e cem (100) microgramas de proteínas totais foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% com SDS.

As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (0.45 μm , cat nº 162-0115, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) a 120 V por 90 minutos (TOWBIN; STAEBELIN; GORDON, 1979). Em seguida, a membrana foi corada com solução de Ponceau S (cat nº P7170, Sigma) para se verificar a qualidade da transferência e para confirmação da concentração de proteínas indicada pelo método colorimétrico. O corante foi removido através de lavagem da membrana com NaOH 0.1 M por 1 minuto. A membrana foi lavada rapidamente com PBS Tween (50 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.01 % Tween 20) e seus sítios de ligações inespecíficas bloqueados com uma solução de 5 % de leite em pó desnatado (0.5 g de leite em pó desnatado em 10 mL de solução de PBS Tween) por 1 hora. Após lavagem com PBS Tween para a remoção da solução de bloqueio, incubou-se a membrana com os anticorpos primários SREBP-1 (1:1000, nº ab3259, Abcam, Cambridge, Cambridgeshire, UK), FAS (1:1000, cat nº 3189, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), FDFT1 (1:1000, cat nº bs-11517R, Bioss, Woburn, MA, USA) diluído em 10 mL de tampão PBS-Tween contendo 3 % albumina do soro bovino, por 24 horas a 4°C. A membrana de nitrocelulose foi lavada por 15 minutos com solução de PBS-Tween e incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:10000, cat nº 554002, Becton Dickinson, USA; 1:10000, cat nº 7074, Cell Signaling, USA) em 10 mL de PBS-Tween + 3 % leite desnatado em pó, por mais 24 hora a 4°C. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens (5 minutos cada) com PBS-Tween e as bandas imunorreativas foram detectadas através de fotodocumentador (UVITEC Gel Doc Systems, Rugby, Warwickshire, UK), utilizando-se kit de quimioluminescência SuperSignal West Pico (cat nº 34080, Thermo Fisher Scientific). A densitometria das bandas foi quantificada utilizando-se o software Image J (version 1.49V). A dosagem de proteínas feita através do método de Bradford foi confirmada pela coloração das proteínas totais das membranas com Ponceau S. Desta forma, a coloração com Ponceau S permitiu o emprego do valor da densitometria óptica de todas as proteínas detectadas na membrana como um controle interno (IGNARRO et al., 2013, 2016; ROMERO-CALVO et al., 2010). O emprego de tal controle interno objetivou a correção de possíveis variações da técnica utilizada para quantificação protéica e/ou durante pipetagens das amostras. Assim, para cada amostra, o valor da densidade óptica da banda correspondente às proteínas SREBP-1, FAS e FDFT1 foi dividido pelo valor da densidade óptica obtida através da coloração por Ponceau S. Posteriormente a esta normalização pelo controle interno, o valor do grupo de células exposto apenas ao meio de cultura suplementado, foi considerado como 100%.

3.13. Análise estatística

Nas análises de viabilidade celular, morte celular programada (apoptose) ou necrose, formação radicais livres, atividade das enzimas SOD e CAT, glutathiona total e expressão proteica de SREBP-1, FASN e FDFT1, os grupos experimentais foram comparados entre si em um mesmo período pós-incubação/exposição à FIT ou RET. Utilizou-se o teste estatístico ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas (GraphPad Prism 6, versão 6,01). Considerou-se diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Com relação ao transcriptoma, o pacote HTSeqCount foi utilizado para realizar a contagem de número de sequências alinhadas a elementos do genoma, tais como genes ou exons, gerando uma tabela de contagem de cada um destes elementos. O pacote DESeq2 permitiu que fossem executados, em ambiente R, diversos processos utilizados na estimativa de expressão diferencial a partir de dados de sequenciamento de alto desempenho. Tais processos incluem: modelagem dos dados utilizando distribuição binomial negativa para normalização entre amostras, redução da contribuição da variabilidade de genes pouco expressos nas estimativas de variância entre as amostras, teste estatístico de hipótese de expressão diferencial utilizando teste de Wald e correção para múltiplos testes utilizando procedimento de Benjamini e Hochberg.

Após processamento dos dados utilizando os pacotes de software mencionados, foram geradas listas de contagem de sequências para cada gene conhecido, sendo encontrado em média 25.300 genes que apresentaram pelo menos 10 sequências alinhadas.

Também foram geradas listas de genes diferencialmente expressos que apresentaram valor de probabilidade de hipótese nula menor que 5% (valor de $p < 0,05$) após correção para múltiplos testes. O conjunto total de expressão gênica de todas as amostras, modelado e normalizado pelo software DESeq2 foi processado utilizando-se método de redução de dimensionalidade PCA.

Devido ao grande volume e complexidade dos dados que foram gerados, o conjunto de genes diferencialmente expressos foi submetido à análise de enriquecimento de vias biológicas utilizando a ferramenta MetaCore® (Thomas-Reuters). Este tipo de análise calcula a probabilidade de um determinado conjunto de genes diferencialmente expressos estarem envolvidos em uma determinada via biológica. O nível de significância foi assumido em $p < 0,05$ (após a correção para testes múltiplos, isto é, valor de p ajustado).

4. RESULTADOS

4.1. FIT IC₅₀ e RET IC₅₀ reduziram a viabilidade celular

A fim de avaliar o efeito citotóxico de fitol (FIT) e retinol (RET) nas linhagens U87MG, A172 e T98G após 24, 48 e 72 horas, construímos uma curva dose resposta com 18 concentrações para determinar a IC₅₀ de cada substância. Em todas as linhagens os compostos apresentaram uma resposta de redução de viabilidade dose-dependente ao longo do tempo. Além disso, a administração isolada do veículo de diluição do FIT e do RET (0,1 % DMSO) não alterou a viabilidade celular em nenhum dos períodos estudados (Figura 7).

Com base nos dados das curvas de dose resposta, outras análises experimentais foram realizadas com os valores IC₅₀ de cada composto. De modo complementar, as características morfológicas celulares foram avaliadas diariamente.

Os grupos expostos apenas ao meio de cultura suplementado (DMEM) ou ao veículo de diluição (0,1% DMSO) atingiram/permaneceram em alta confluência (aproximadamente 100%). As células tratadas com FIT IC₅₀ ou RET IC₅₀ apresentaram menor densidade celular após 72 horas, quando se observaram prolongamentos celulares ramificados, com redução gradual do calibre em direção às projeções distal (Figura 8).

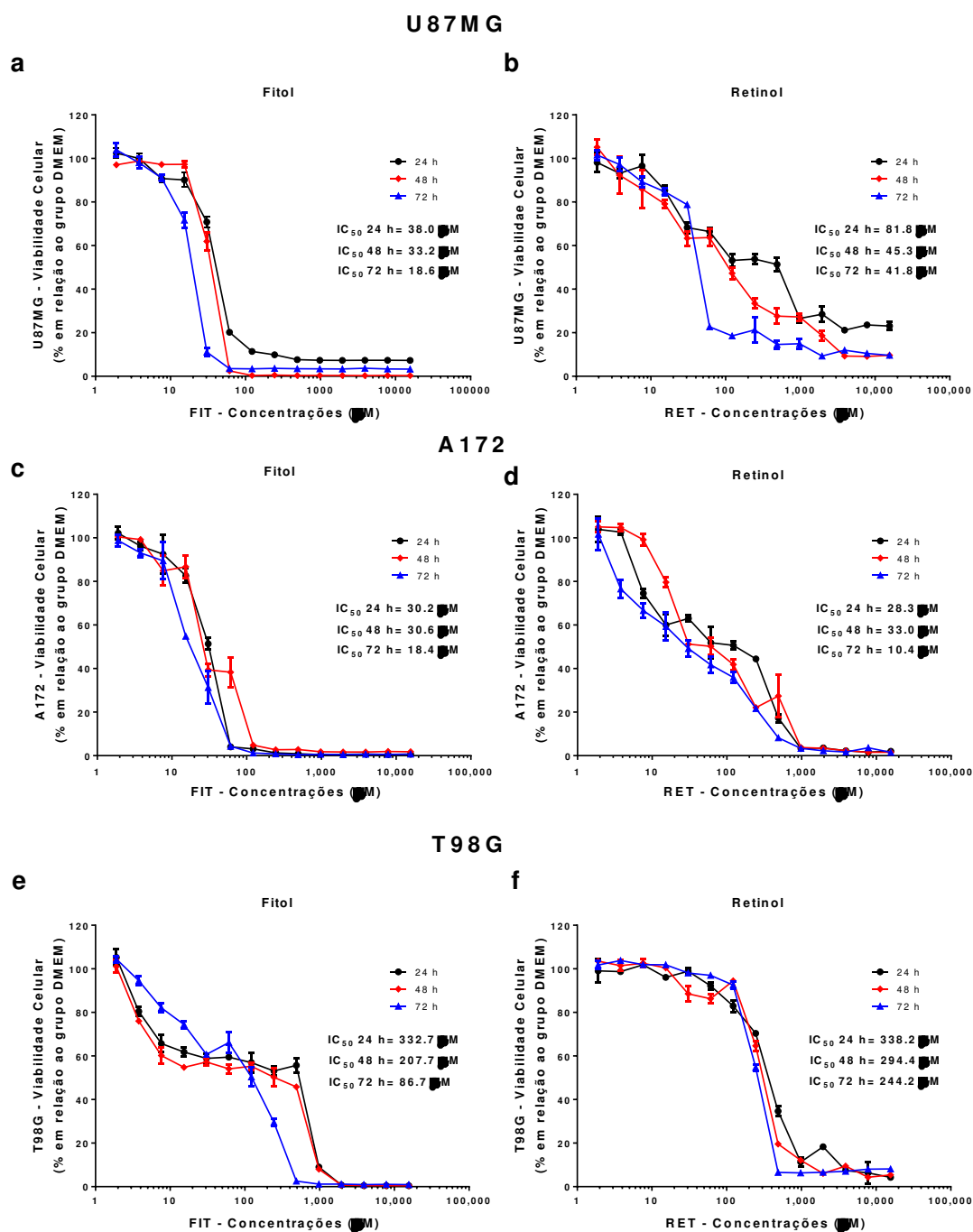


Figura 7. Efeitos do fitol (FIT) e retinol (RET) sobre a viabilidade celular das linhagens de glioblastoma humano U87MG (a, b), A172 (c, d) e T98G (e, f) após 24, 48 e 72 horas. Uma curva dose resposta (apresentada aqui em escala logarítmica e mostrando 14 das 18 concentrações testadas) foi criada para identificar a concentração inibitória máxima de 50 % da viabilidade celular (IC₅₀, valores mostrados à direita em cada gráfico). Valores expressos como porcentagem relativa ao grupo DMEM (células expostas apenas ao meio de cultura suplementado) que representam a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata.

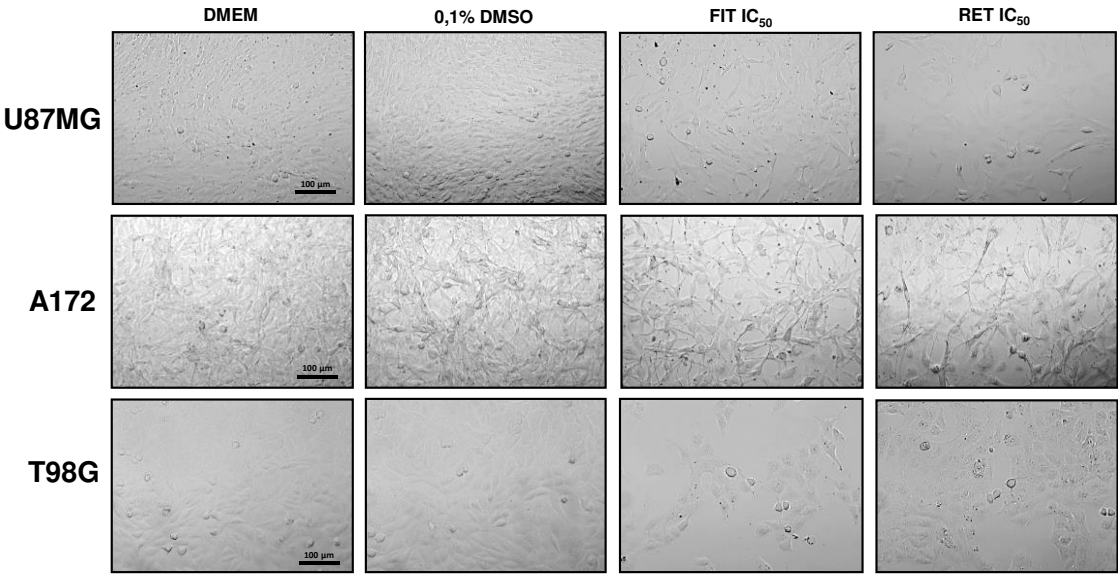


Figura 8. Características morfológicas das células de glioblastoma humano U87MG, A172 e T98G

após o tratamento com fitol (FIT) IC₅₀ ou retinol (RET) IC₅₀ por 72 horas. As células expostas apenas a meio suplementado (DMEM) ou meio contendo 0,1% DMSO apresentaram alta confluência. As células tratadas com FIT IC₅₀ ou RET IC₅₀ apresentaram menor densidade e processos com uma redução gradual no calibre em direção às projeções distal. Barra de escala: 100 µm (aplica-se a todas as imagens).

4.2. FIT IC₅₀ e RET IC₅₀ co-administrados com Trolox® ou N-acetilcisteína (NAC) reduziram a viabilidade celular

De acordo com os resultados apresentados na Figura 9, após 72 horas de tratamento, tanto fitol (FIT) quanto retinol (RET) co-administrados com Trolox® ou NAC apresentam efeito citotóxico quando comparados ao grupo DMEM. Especificamente, a administração de 100 µM de Trolox® juntamente com FIT IC₅₀ ou RET IC₅₀ levou a maior redução da viabilidade celular, em comparação com FIT ou RET isolados em todas as linhagens celulares estudadas (U87MG - FIT + Trolox®: 30,2 % e RET + Trolox®: 39,4 % vs FIT: 62,8 % e RET: 57,3 %, respectivamente, $p < 0,01$; A172 - FIT + Trolox®: 39,5 % e RET + Trolox®: 43,6 % vs FIT: 57,6 % e RET: 64,6 %, respectivamente, $p < 0,05$; T98G - FIT + Trolox®: 25,9 % e RET + Trolox®: 37,8 % vs FIT: 46,2 % e RET: 57,1 %, respectivamente, $p < 0,05$).

Por sua vez, a exposição conjunta de NAC (5 mM) com FIT IC₅₀ ou RET IC₅₀ reduziu a viabilidade celular, em comparação com FIT ou RET isolados apenas na linhagem T98G (FIT + NAC: 48,1 % e RET + NAC: 48,6 % vs FIT: 65,1 % e RET: 72,8 %, respectivamente, $p < 0,01$).

Por fim, a administração isolada de Trolox® (100 µM) ou NAC (5 mM) não alterou a viabilidade celular das linhagens humanas de glioblastoma U87MG, A172 e T98G (U87MG - Trolox®: 111,2 %, NAC: 103,3 %, $p > 0,05$ vs DMEM; A172 - Trolox®: 102,3 %, NAC: 107,3 %, $p > 0,05$ vs DMEM; T98G - Trolox®: 101,8 %, NAC: 99,1 %, $p > 0,05$ vs DMEM).

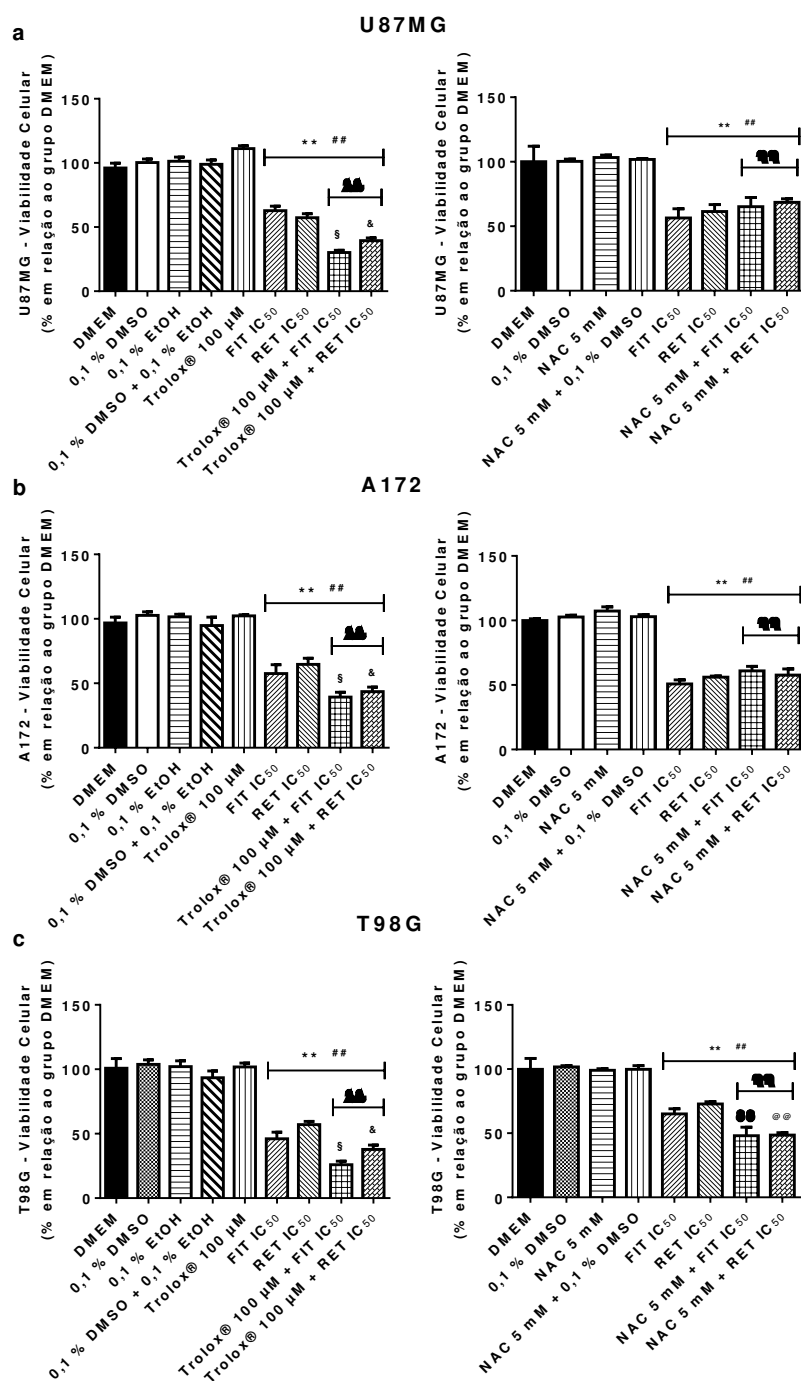


Figura 9. Efeitos do fitol (FIT) e retinol (RET), co-administrados com Trolox® ou N-acetilcisteína (NAC), sobre a viabilidade celular das linhagens de glioblastoma humano U87MG (a), A172 (b) e T98G (c) após 72 horas. Notar diminuição da viabilidade celular após administração de FIT IC₅₀ ou RET IC₅₀, associados ou não com Trolox® ou NAC. Ainda, a administração de FIT IC₅₀ ou RET IC₅₀IT conjuntamente com Trolox® reduziu significativamente a viabilidade celular em todas as linhagens estudadas, quando comparado com o tratamento apenas com FIT ou RET. Dado semelhante foi observado com NAC apenas na linhagem T98G. Valores expressos como porcentagem relativa ao grupo DMEM (células expostas apenas ao meio de cultura suplementado) que representam a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados foram analisados utilizando-se o teste estatístico ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas; **p<0,01 vs DMEM; ##p<0,01 vs 0,1% DMSO; λp<0,01 vs 0,1% Trolox® 100 µM; §p<0,05 vs FIT IC₅₀; &p<0,05 vs RET IC₅₀; ηp<0,01 vs 0,1% NAC 5mM; δδp<0,01 vs FIT IC₅₀; @@p<0,01 vs RET IC₅₀.

4.3. FIT IC₅₀ e RET IC₅₀ reduziram a formação de ânion superóxido citoplasmático e mitocondrial

Após 72 horas de tratamento com retinol (RET) ou fitol (FIT), houve alteração significativa da síntese de ânion superóxido de origem citoplasmática e mitocondrial - DHE e MitoSox™, respectivamente, nas linhagens U87MG e T98G (Figura 10).

Especificamente, a administração de FIT IC₅₀ ou RET IC₅₀ diminuiu a intensidade de fluorescência para DHE e MitoSox™ nas linhagens U87MG e T98G, em comparação com as células expostas apenas ao meio de cultura suplementado (DMEM) ou meio suplementado com o veículo de diluição de FIT ou RET (0,1 % DMSO) (U87MG - DHE - FIT IC₅₀: 29,9 e RET IC₅₀: 100,4 vs DMEM 213,9 e 0,1 % DMSO: 207,5 - respectivamente, p<0,01; U87MG - MitoSox™ - FIT IC₅₀: 77,0 e RET IC₅₀: 65,2 vs DMEM 109,3 e 0,1 % DMSO: 103,4 - respectivamente, p<0,05; T98G - DHE - FIT IC₅₀: 24,1 e RET IC₅₀: 24,0 vs DMEM 31,4 e 0,1 % DMSO: 31,7 - respectivamente, p<0,01; T98G - MitoSox™ - FIT IC₅₀: 32,2 e RET IC₅₀: 36,9 vs DMEM 73,7 e 0,1 % DMSO: 65,1 - respectivamente, p<0,01).

Contudo, na linhagem A172, o tratamento com FIT IC₅₀ ou RET IC₅₀ não foi capaz de promover alterações nas intensidades de fluorescência das sondas DHE e MitoSox™ (A172 - DHE - FIT IC₅₀: 112,0 e RET IC₅₀: 123,0 vs DMEM 141,1 e 0,1 % DMSO: 148,3 - respectivamente, p>0,05; A172 - MitoSox™ - FIT IC₅₀: 166,9 e RET IC₅₀: 178,8 vs DMEM 201,7 e 0,1 % DMSO: 196,1 - respectivamente, p>0,05) (Figura 10).

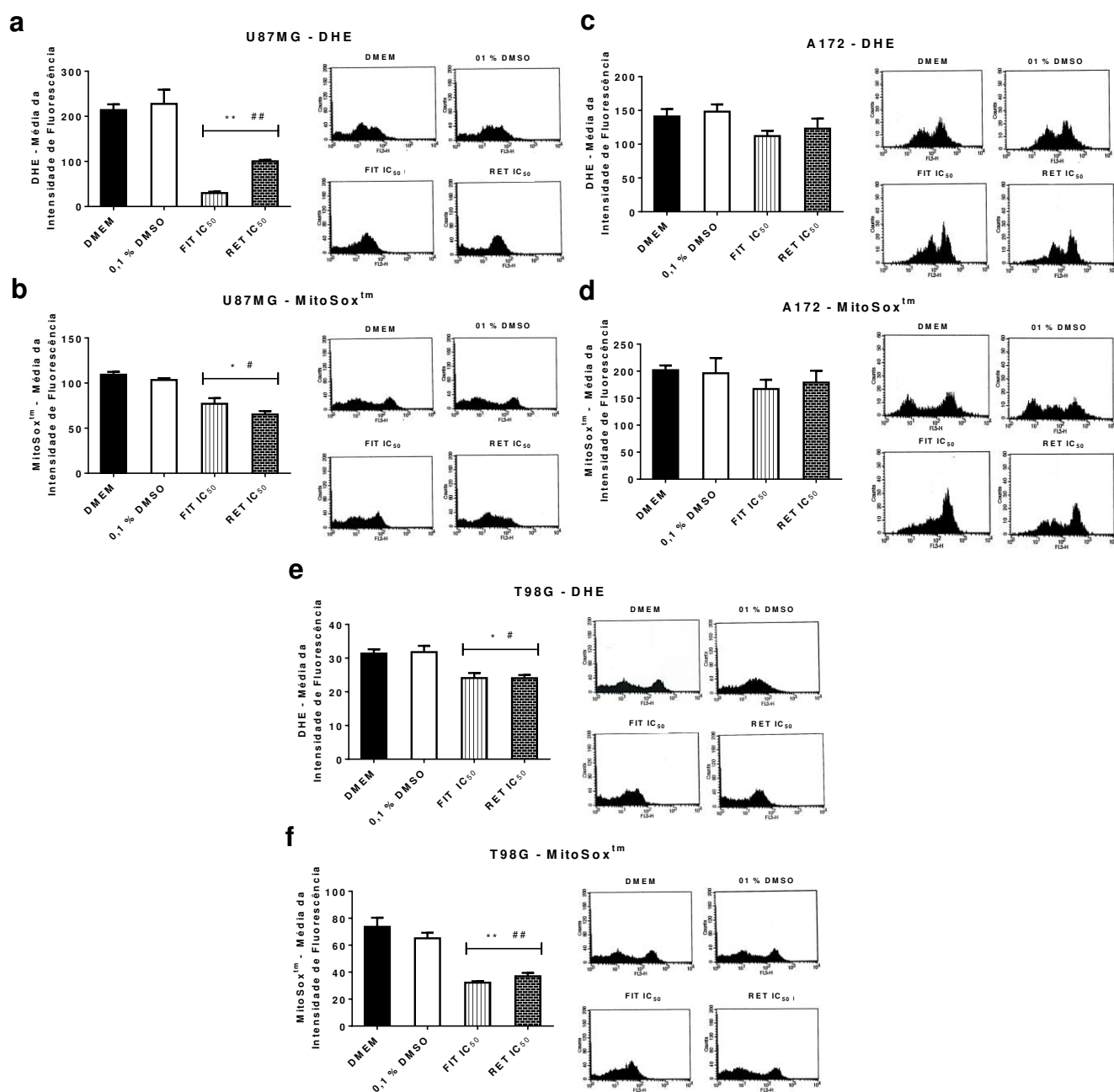


Figura 10. Intensidade de fluorescência das sondas DHE e MitoSoxTM nas linhagens U87MG, A172 e T98G após 72 horas de tratamento com fitol (FIT) IC₅₀ ou retinol (RET) IC₅₀, avaliada através de citometria de fluxo. Os gráficos representam a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. Nas linhagens U87MG (a, b) e T98G (e, f), FIT IC₅₀ e RET IC₅₀ reduziram significativamente a síntese de ânion superóxido de origem citoplasmática e mitocondrial, conforme indicado pelas células que apresentaram menor intensidade de fluorescência para as sondas DHE e MitoSoxTM, respectivamente. A linhagem A172 (c, d) tratada com FIT IC₅₀ ou RET IC₅₀ não mostrou mudança nas intensidades de fluorescência das sondas DHE e MitoSoxTM. DMEM: grupo que recebeu apenas meio suplementado; 0,1% DMSO: células que receberam meio suplementado com o veículo de diluição de FIT ou RET. Os dados foram analisados utilizando-se o teste estatístico ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs DMEM; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ vs 0,1% DMSO.

4.4. FIT IC₅₀ e RET IC₅₀ modulam a atividade de SOD, CAT e a síntese de glutathiona total

Conforme os dados apresentados na Figura 11, as concentrações correspondentes às IC₅₀ do fitol (FIT) e do retinol (RET) modulam a atividade da superóxido dismutase (SOD) de forma heterogênea entre as três linhagens após 72 horas de tratamento, em comparação com os grupos DMEM e 0,1% DMSO. Podemos notar que FIT IC₅₀ reduziu de modo significativo a atividade da SOD nas linhagens A172 e T98G (A172 - SOD (U/mg Proteína) - FIT IC₅₀: 1,9 vs DMEM: 4,1 e 0,1 % DMSO: 4,2 - p<0,01; T98G - SOD (U/mg Proteína) - FIT IC₅₀: 3,7 vs DMEM: 6,6 e 0,1 % DMSO: 6,5 - p<0,05). Entretanto, FIT IC₅₀, não alterou de maneira significativa a atividade de SOD na linhagem U87MG (U87MG - SOD (U/mg Proteína) - FIT IC₅₀: 2,1 vs DMEM: 4,7 e 0,1 % DMSO: 4,1 - p>0,05).

Por sua vez, RET IC₅₀, elevou significativamente a atividade de SOD nas células U87MG e reduziu, também de modo significativo, a atividade de SOD em A172. (U87MG - SOD (U/μg Proteína) - RET IC₅₀: 8,6 vs DMEM: 4,7 e 0,1 % DMSO: 4,1 - p<0,05; A172 - SOD (U/mg Proteína) - RET IC₅₀: 1,8 vs DMEM: 4,1 e 0,1 % DMSO: 4,2 - p<0,01). No entanto, RET IC₅₀ não alterou a atividade da SOD na linhagem T98G (T98G - SOD (U/mg Proteína) - RET IC₅₀: 5,5 vs DMEM: 6,6 e 0,1 % DMSO: 6,5 - p>0,05).

Ainda na Figura 11, observa-se que FIT IC₅₀ atenuou de modo significativo a atividade da enzima catalase (CAT), após 72 horas de incubação, nas linhagens A172 e T98G, quando comparados ao grupo que recebeu apenas meio de cultura suplementado (DMEM) ou meio de cultura suplementado acrescido de 0,1% de DMSO (A172 - CAT (nmol/min/mg Proteína) - FIT IC₅₀: 1,8 vs DMEM: 16,2 e 0,1 % DMSO: 14,9 - p<0,01 e p<0,05 - respectivamente; T98G - CAT (nmol/min/mg Proteína) - FIT IC₅₀: 2,4 vs DMEM: 18,7 e 0,1 % DMSO: 19,6 - p<0,05). FIT IC₅₀, após exposição de 72 horas, não alterou a atividade de CAT nas células U87MG (CAT (nmol/min/mg Proteína) - FIT IC₅₀: 18,2 vs DMEM: 22,6 e 0,1 % DMSO: 24,7 - p>0,05). Com relação ao RET IC₅₀, este tratamento elevou a atividade de CAT de forma significativa apenas nas células da linhagem A172 (CAT (nmol/min/mg Proteína) - RET IC₅₀: 4,6 vs DMEM: 16,2 e 0,1 % DMSO: 14,9 - p<0,01 e p<0,05 - respectivamente).

Especificamente, sobre a quantificação de glutathiona total, os resultados obtidos com FIT IC₅₀ e RET IC₅₀ nas linhagens U87MG e A172 mostram que ambos os compostos modificaram o perfil de síntese desta proteína. Em comparação com os grupos DMEM e 0,1 % DMSO, FIT IC₅₀ diminuiu significativamente a concentração de glutathiona total tanto nas

células U87MG quanto nas células A172 (U87MG - glutathiona total (nmol/mg Proteína) - FIT IC₅₀: 1,5 vs DMEM: 17,0 e 0,1 % DMSO: 17,7 - p<0,01; A172 - glutathiona total (nmol/mg Proteína) - FIT IC₅₀: 2,0 vs DMEM: 19,7 e 0,1 % DMSO: 19,8 - p<0,01). Além disso, RET IC₅₀ estimulou de maneira significativa produção de glutathiona total na linhagem U87MG, enquanto que nas células A172 este efeito foi contrário, ou seja, redução da síntese de glutathiona total (U87MG - glutathiona total (nmol/mg Proteína) - RET IC₅₀: 28,3 vs DMEM: 17,0 e 0,1 % DMSO: 17,7 - p<0,01; A172 - glutathiona total (nmol/mg Proteína) – RET IC₅₀: 8,1 vs DMEM: 18,7 e 0,1 % DMSO: 19,8 - p<0,05). Na linhagem T98G, não houve alteração significativa na produção de glutathiona total após 72 horas de tratamento com cada um dos compostos, em comparação com os grupos DMEM e 0,1 % DMSO.

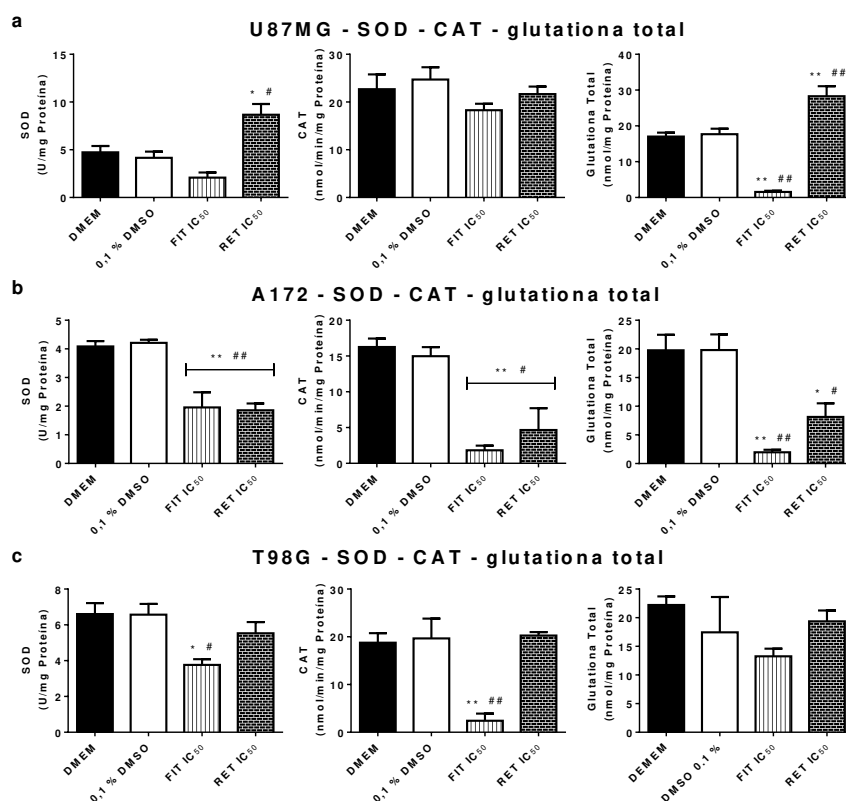


Figura 11. Quantificação da atividade de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e síntese de glutathiona total nas linhagens U87MG, A172 e T98G após 72 horas de tratamento com fitol (FIT) IC₅₀ ou retinol (RET) IC₅₀. Os gráficos representam a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. Na linhagem U87MG (a), FIT IC₅₀ não altera a atividade de SOD ou CAT e reduz a produção de glutathiona total. Nesta mesa linhagem, RET IC₅₀ eleva a atividade de SOD e a quantificação de glutathiona total, mas não modula a atividade da CAT. Na linhagem A172 (b), ambos os compostos (FIT IC₅₀ e RET IC₅₀) diminuem tanto a atividade de SOD ou CAT quanto a síntese de glutathiona total. Quanto as células T98G (c), FIT IC₅₀ inibe a atividade de SOD e CAT. Contudo, não modifica os níveis de glutathiona total. Ainda na linhagem T98G, RET IC₅₀ não foi capaz de alterar os parâmetros dos marcadores investigados. DMEM: grupo que recebeu apenas meio suplementado; 0,1% DMSO: células que receberam meio suplementado com o veículo de diluição de FIT ou RET. Os dados foram analisados utilizando-se o teste estatístico ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs DMEM; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ vs 0,1% DMSO.

4.5. FIT IC₅₀ e RET IC₅₀ induziram necrose

Após 72 horas, as análises de citometria de fluxo revelaram que, em comparação com grupos expostos apenas a DMEM ou DMEM contendo 0,1% de DMSO, a linhagem de glioblastoma humano A172 tratada com FIT IC₅₀ ou RET IC₅₀ apresentou proporção elevada de células positivas para 7-AAD, favorecendo morte celular por necrose. Especificamente, FIT IC₅₀ e RET IC₅₀ induziram, respectivamente, 30,9% e 27,5% de perda celular (Figura 12). A linhagem A172 foi selecionada para esta análise, pois a ela corresponderam as menores concentrações de IC₅₀, tanto para FIT quanto para RET, em comparação com as linhagens U87MG e T98G.

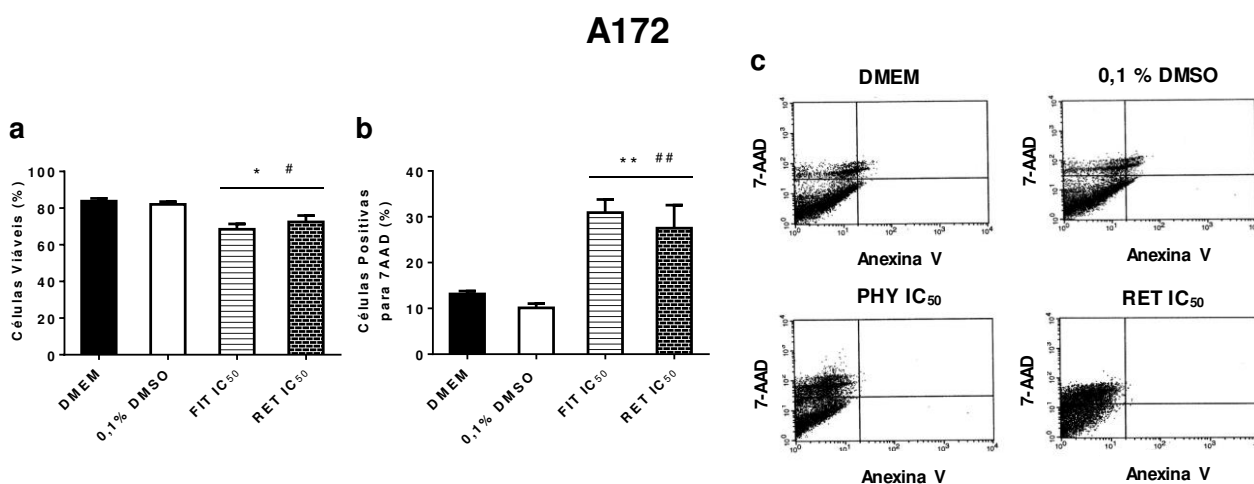


Figura 12. Morte celular por necrose na linhagem A172 após 72 horas de tratamento com FIT IC₅₀ ou RET IC₅₀, avaliada através de citometria de fluxo. Os gráficos representam a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. FIT IC₅₀ e RET IC₅₀ reduziram o número de células viáveis e aumentaram significativamente a ocorrência de necrose, conforme indicado pelo percentual de células positivas para 7AAD. DMEM: grupo que recebeu apenas meio suplementado; 0,1% DMSO: células que receberam meio suplementado com o veículo diluído de FIT ou RET. Os dados foram analisados utilizando-se o teste estatístico ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs DMEM; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ vs 0,1% DMSO.

4.6. Análise do transcriptoma

Para ampliar a investigação dos efeitos de FIT ou RET sobre células de glioblastoma, realizamos avaliação do transcriptoma de grupos cultivados em DMEM com 0,1% de DMSO ou tratados com FIT IC₅₀ ou RET IC₅₀ (ambos os compostos diluídos em 0,1% de DMSO), após 72 h. Da mesma forma que justificado para a análise de mecanismo de morte celular (vide item 4.5), a linhagem A172 foi selecionada porque a ela corresponderam as menores concentrações de IC₅₀ tanto para FITI como para RET.

O sequenciamento forneceu um total de 162.248.078 leituras (*reads*) de 100 pb em pares (~ 80% > Q30; ~ 10Mi de leituras/amostra). O pacote de software DESeq2 (vide item 3.11) foi usado para gerar uma lista de genes com diferença significativa de expressão.

Os grupos que receberam FIT IC₅₀ ou RET IC₅₀ apresentaram 546 e 897 genes diferencialmente expressos (*vs* DMEM com 0,1% de DMSO), respectivamente. Entre os dois conjuntos de genes diferencialmente expressos, 228 genes são comuns a ambos os grupos, enquanto que 318 são exclusivos do tratamento com FIT IC₅₀ e 669 são exclusivos daquele com RET IC₅₀ (Figura 13).

Para identificar a modulação da expressão gênica mediada por FIT ou RET em vias/sinalizações celulares associadas a biossíntese/metabolismo de colesterol, lipídeos e/ou ácidos graxos, calculamos o enriquecimento destas via para o conjunto de genes diferencialmente expressos após o tratamento com IC₅₀ de 72 horas de cada substância. Particularmente, FIT IC₅₀ enriqueceu significativamente 10 vias, sendo que a maioria contém genes com diminuição de expressão (*down-regulated*) envolvidos na biossíntese/metabolismo de colesterol, lipídeos e/ou ácidos graxos. RET IC₅₀ enriqueceu significativamente 8 vias, sendo que uma contém genes com diminuição de expressão (*down-regulated*) associados com o metabolismo do colesterol (Figura 13).

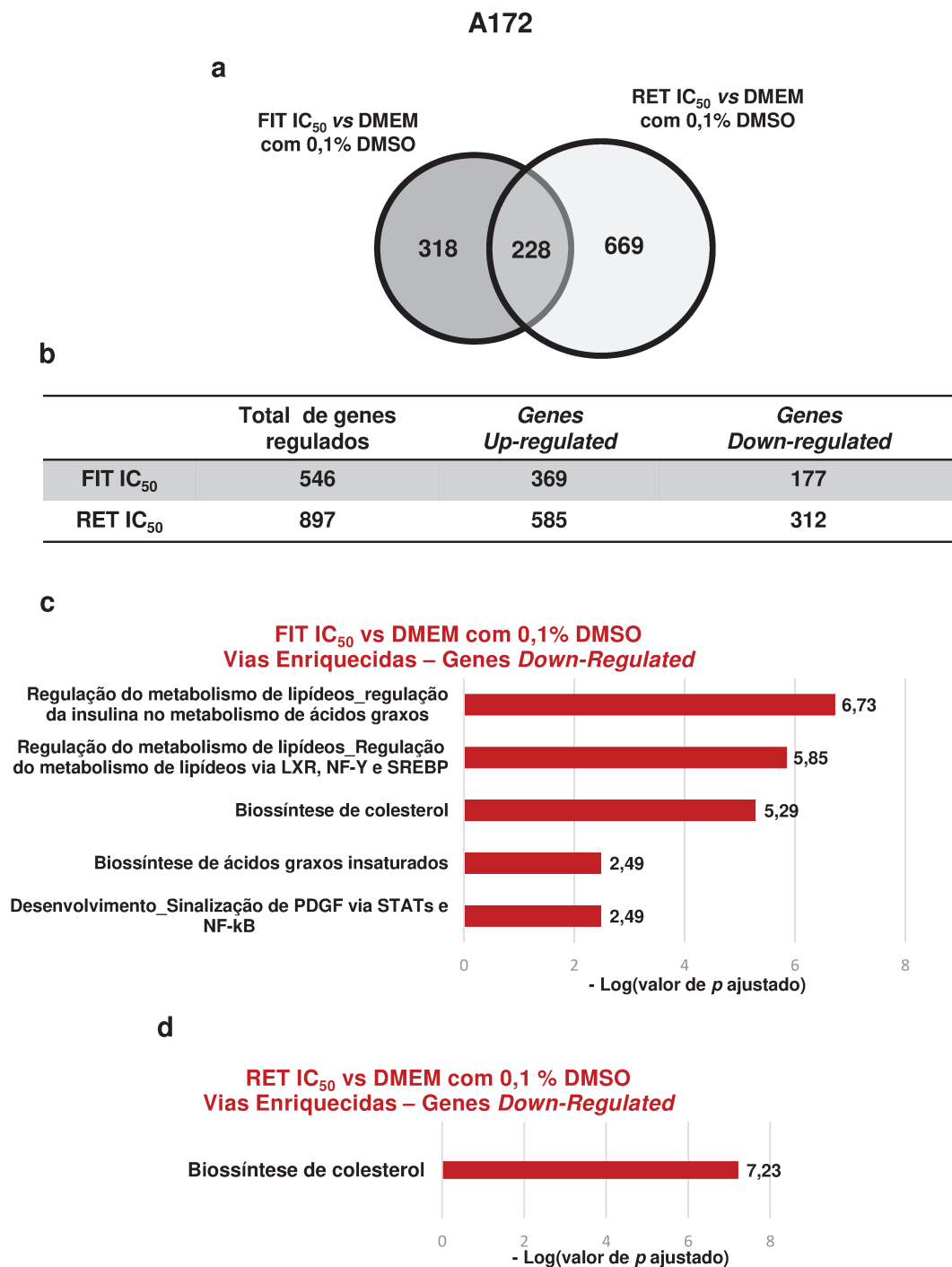


Figura 13. Expressão gênica na linhagem A172 após 72 horas de tratamento com FIT IC₅₀ ou RET IC₅₀, avaliada através de transcriptoma. **a** Diagrama de Venn mostrando os genes diferencialmente expressos em cada condição experimental em comparação com o grupo DMEM contendo 0,1% de DMSO. FIT IC₅₀ e RET IC₅₀ mostraram 546 e 897 genes diferencialmente expressos, respectivamente. Um total de 228 genes foi comum a ambos os grupos, enquanto que 318 e 669 são exclusivos para FIT IC₅₀ e RET IC₅₀, respectivamente. **b** Tabela exibindo o número de genes com aumento ou diminuição de expressão (*up-regulated* ou *down-regulated*, respectivamente) considerando o total de genes expressos diferencialmente. **c, d** Gráficos que mostram as vias enriquecidas contendo genes que exibiram diminuição da expressão gênica, estão envolvidos em mecanismos de biossíntese e/ou metabolismos de colesterol e ácidos graxos e que estão representados no diagrama de Venn após o tratamento com FIT IC₅₀ ou RET IC₅₀ por 72 horas. O eixo x apresenta valores correspondentes à $-\log(\text{valores de } p \text{ ajustados})$. As vias enriquecidas associadas a valores superiores à $-\log(0,05) = 1,30$ foram consideradas estatisticamente significativas.

4.7. FIT IC₅₀ e RET IC₅₀ modularam a expressão de SREBP-1, FAS e FDFT1

Após as análises do transcriptoma, realizamos Western blot para avaliar os níveis de expressão das proteínas SREBP-1, FAS e FDFT1, visto que os respectivos genes apresentaram diminuição da expressão e estão envolvidos na síntese e/ou metabolismo de colesterol e ácidos graxos.

Em comparação com DMEM e 0,1% DMSO, FIT IC₅₀ reduziu significativamente os níveis do fator de transcrição SREBP-1 nas linhagens U87MG e T98G, mas não na A172. RET IC₅₀ não modulou a expressão da proteína SREBP-1 em qualquer linhagem de células tratadas. Também em comparação com DMEM e 0,1% DMSO, tanto FIT IC₅₀ quanto RET IC₅₀ reduziram significativamente a síntese de FAS nas linhagens U87MG, A172 e T98G. Além disso, a expressão da proteína FDFT1 nas células U87MG, A172 e T98G foi significativamente menor após exposição a FIT IC₅₀, quando comparado com DMEM ou 0,1% DMSO. Finalmente, RET IC₅₀ reduziu significativamente a expressão de FDFT-1 nas linhagens U87MG e A172, mas não na T98G (Figura 14).

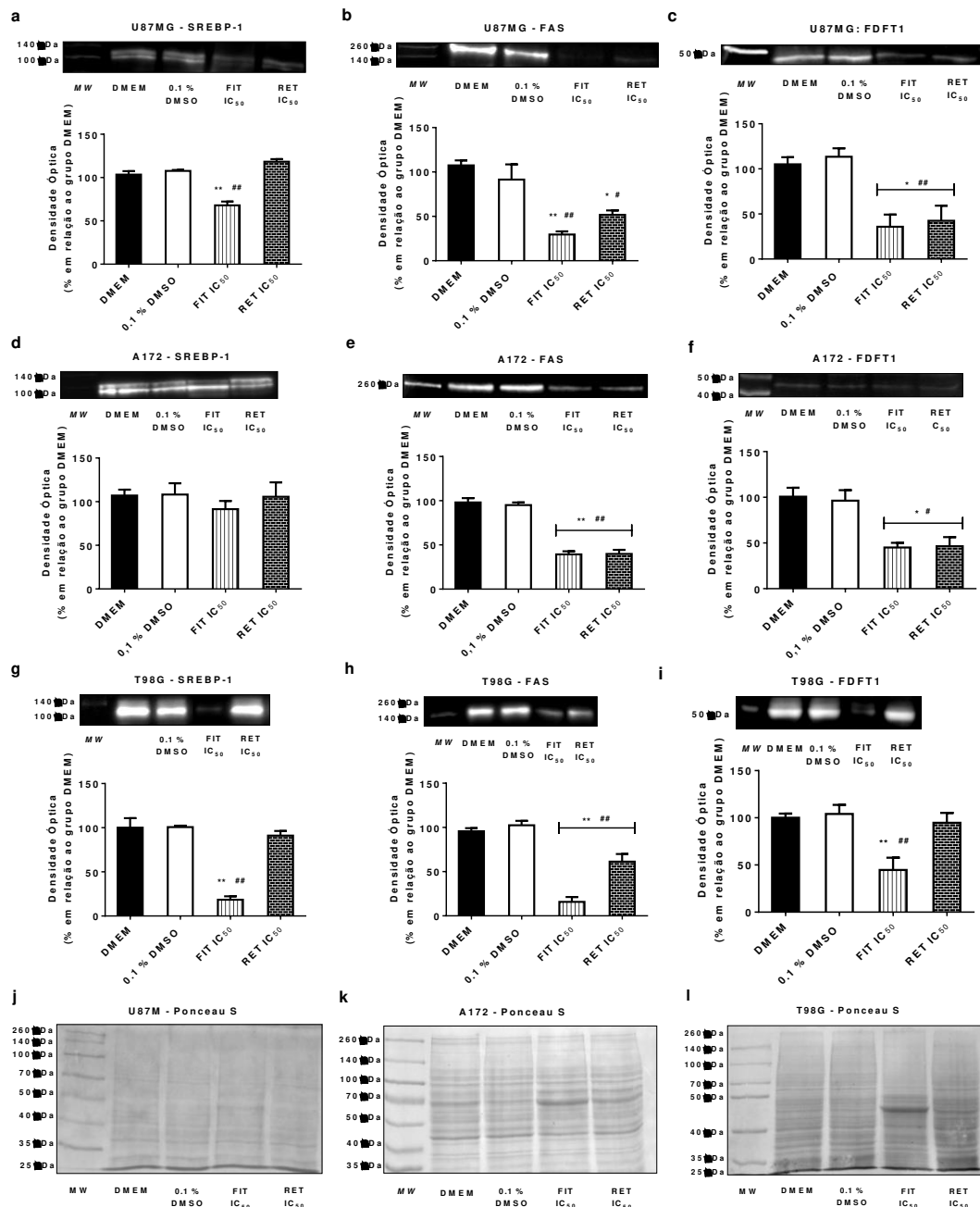


Figura 14. Análises de Western Blot para proteínas relacionadas com mecanismos de síntese e/ou metabolismos de colesterol e ácidos graxos *sterol regulatory element-binding proteins 1* (SREBP-1), *fatty acid synthase* (FAS) e *farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1* (FDFT1). Expressão de proteínas em células tratadas com FIT IC₅₀ ou RET IC₅₀ em comparação com células cultivadas apenas em meio suplementado (DMEM, considerado 100%) ou DMEM contendo 0,1% de DMSO (0,1% DMSO). **a, d, g** FIT IC₅₀ reduziu significativamente a expressão de SREBP-1 nas linhagens U87MG e T98G. Nenhuma linhagem tratada com RET IC₅₀ mostrou mudanças nos níveis SREBP-1. **b, e, h** FIT IC₅₀ e RET IC₅₀ reduziram significativamente a síntese de FAS nas linhagens U87MG, A172 e T98G. **c, f, i** FIT IC₅₀ diminuiu significativamente a expressão de FDFT1 nas células U87MG, A172 e T98G. RET IC₅₀ reduziu significativamente a expressão de FDFT-1 apenas nas linhagens U87MG e A172. **j, k, l** Membranas coradas com Ponceau S para mostrar o teor total de proteína para cada grupo. A proporção entre a densidade óptica (OD) de cada banda de proteína alvo e a OD correspondente a todas as bandas de proteína (faixa inteira das membranas coradas com Ponceau S) foi calculada. Os dados foram analisados utilizando-se o teste estatístico ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas; *p<0,05 e **p<0,01 vs DMEM; #p<0,05 e ##p<0,01 vs 0,1% DMSO.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, relatamos os efeitos de fitol (FIT) e retinol (RET) sobre a viabilidade de linhagens celulares de glioblastoma humano (U87MG, A172 e T98G), bem como sobre o estado redox e a expressão de genes e proteínas relacionados às vias da síntese de colesterol e/ou ácidos graxos, as quais podem vir a se tornar alvos de novas abordagens terapêuticas contra este glioma de alto grau.

Até onde sabemos, existem poucos estudos sobre o efeito citotóxico de FIT em células tumorais humanas, mas nenhum deles voltado para glioblastoma. Particularmente, PEJIN; KOJIC; BOGDANOVIC (2014) identificaram os valores de IC_{50} em diversas linhagens celulares de tumores humanos. As linhagens de tumor de mama MCF-7 e câncer cervical HeLa foram sensíveis a FIT com valores de IC_{50} de 8,79 μM e 15,51 μM , respectivamente. Por sua vez, as linhagens de carcinomas de cólon HT-29 e pulmonar A-549 também foram sensíveis ao FIT, porém os valores de IC_{50} foram maiores: 34,82 μM e 56,98 μM , respectivamente. Finalmente, menor sensibilidade ao FIT foi observada nas linhagens tumorais Hs294T (pele), MDA-MB-231 (mama) e PC-3 (próstata) (IC_{50} =65,15, 69,67 e 77,85 μM , respectivamente). Ainda que os autores tenham reportado valores de IC_{50} em diversas linhagens, não foi especificado o intervalo de tempo de exposição das células ao FIT. Em nossa investigação, estudamos as linhagens de glioblastoma humano mais comumente usadas em ensaios de toxicidade *in vitro* e identificamos valores de IC_{50} semelhantes àqueles relatados por PEJIN; KOJIC; BOGDANOVIC (2014). Nas células U87MG, os valores de IC_{50} foram 38,0 μM , 33,2 μM e 18,6 μM após 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Os valores de IC_{50} na linhagem A172 foram de 30,2 μM , 30,6 μM e 18,4 μM após 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Nas células T98G, os valores de IC_{50} foram 332,7 μM , 207,7 μM e 86,7 μM após 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Portanto, detectamos um efeito citotóxico de FIT em três linhagens de glioblastoma, sendo que as células U87MG e A172 foram mais suscetíveis a FIT do que a linhagem T98G.

Em relação ao RET, estudos prévios reportaram o efeito deletério do ácido *trans*-retinóico (ATRA), um metabolito de RET, em células de glioma. TANG et al. (2008), observaram que o tratamento de células C6 (glioma de rato) com 16 μM de ATRA resultou em inibição significativa do crescimento e alterações do ciclo celular. Mais precisamente, com relação ao ciclo celular, a fase G0/G1 foi prolongada e a quantidade de células em fase S diminuiu. Além disso, a morfologia clássica da linhagem C6 foi alterada, isto é, os

prolongamentos citoplasmáticos se tornaram mais longos e finos após o tratamento. De maneira complementar, também com relação à viabilidade e proliferação celular, KARSY et al. (2014) relatam que ATRA diminuiu significativamente o número de células viáveis das linhagens U87MG e LN18 após 24 horas de tratamento.

Nossos dados corroboram os resultados acima mencionados de TANG et al. (2008) e KARSY et al. (2014). De fato, nos presentes experimentos realizados com as linhagens U87MG, A172 e T98G, mais precisamente na identificação da RET IC₅₀ após 24, 48 e 72 horas de tratamento, observamos resposta citotóxica dose-dependente (valores variando de 81,8 µM a 41,8 µM, 28,2 µM a 10,4 µM e 338,2 µM a 244,2 µM, respectivamente). Novamente, as células T98G foram mais resistentes do que aquelas das outras duas linhagens. Por fim, as alterações das características morfológicas descritas por TANG et al. (2008) também foram semelhantes às aquelas que observamos, ou seja, redução gradual do calibre dos prolongamentos celulares após 72 horas de tratamento com RET IC₅₀.

Considerando-se que FIT e RET são conhecidos por suas características antioxidantes (DE SOUSA, 2011; GUIMARÃES et al., 2010; HOLLINGSWORTH; WRIGHT, 1954), poder-se-ia propor que a redução dos níveis de EROs contribuiu com a toxicidade verificada no presente estudo nas células neoplásicas. De fato, sabe-se que EROs podem exercer papéis relacionados com a sobrevivência celular através da regulação da proliferação e de sinalizações homeostáticas (KARDEH; ASHKANI-ESFAHANI; ALIZADEH, 2014; MONTICONE et al., 2014). Em nossos experimentos, a natureza antioxidante dos efeitos de FIT e RET foi corroborada pelo fato de não termos verificado alterações de tais efeitos após a co-administração de FIT e RET com Trolox® ou NAC.

Nosso dado a respeito da diminuição da produção do ânion superóxido de origem citosólica e mitocondrial reforça o caráter antioxidante do tratamento com FIT ou RET. Tal caráter foi previamente descrito por outros autores. De fato, DE SOUSA (2011) e GUIMARÃES et al. (2010) mostraram que o FIT foi capaz de reduzir a síntese de radicais livres. Esta ação antioxidante pode ser atribuída à estrutura molecular deste composto, a qual possui um grupo hidroxila. Ao reagir com um radical livre, a molécula de FIT doaria átomos de hidrogênio para um elétron não emparelhado, o que proporcionaria conversão de radicais livres em espécies menos reativas. De maneira semelhante, verificou-se que o RET atua como um antioxidante eficaz através de doação de átomos de hidrogênio (EPSTEIN; GOODMAN, 1984; KAMMEYER; LUITEN, 2015; MAMEDE et al., 2011).

Ainda que, isoladamente, nossos dados de viabilidade celular após administração de FIT ou RET com Trolox® ou NAC e de produção citosólica e mitocondrial de ânion superóxido favoreçam uma natureza antioxidante para os efeitos de FIT e RET, esta mesma natureza não foi corroborada com nossos dados obtidos através da quantificação das atividades de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e da síntese de glutathione total. De fato, observamos que o tratamento das células neoplásicas com FIT ou RET modulou a atividade da SOD, CAT e a síntese de glutathione total de forma heterogênea entre as diferentes linhagens estudadas. Desta forma, no presente modelo experimental *in vitro* e com os recursos técnicos aqui empregados, não nos foi possível caracterizar uma ação claramente anti- ou pró-oxidante para cada um dos compostos investigados.

No presente trabalho, também investigamos se os efeitos de FIT IC₅₀ e RET IC₅₀ estavam associados com morte celular por apoptose ou necrose. Conforme mencionado acima, atualmente não há estudos sobre o efeito de FIT na morte celular de gliomas. Assim, nossa observação de que este composto induziu necrose em células de astrocitoma de alto grau *in vitro* (aumento da proporção de células positivas/marcadas para 7-AAD) é original. No entanto, LIANG; YANG; GUO (2015) mostraram que o tratamento de células U87MG e SHG44 com concentrações de ATRA variando de 5 a 40 µmol/l induziu apoptose após 24 horas. Além disso, LIANG; YANG; GUO (2015) verificaram que a migração, invasão e proliferação de células de glioma foram inibidas pelo ATRA. Particularmente, as concentrações mais elevadas de ATRA (20 e 40 µM) reduziram significativamente a síntese de metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9). Portanto, nossos resultados estão parcialmente de acordo com aqueles apresentados por LIANG; YANG; GUO (2015), uma vez a análise de citometria de fluxo que realizamos mostrou que o tratamento da linhagem A172 com RET IC₅₀ aumentou a proporção de células positivas para 7-AAD após 72 horas, favorecendo assim um processo necrótico ao invés de apoptótico. Uma vez que analisamos os efeitos do RET (um precursor de ATRA) em concentrações maiores que aquelas utilizadas por LIANG; YANG; GUO (2015) ao estudarem o próprio ATRA, um efeito deletério mais intenso do RET sobre as células neoplásicas poderia explicar o fato de termos verificado morte celular por necrose. Além disso, considerando em conjunto os resultados aqui obtidos através dos ensaios de citometria de fluxo e de expressão gênica (ver abaixo), podemos propor que alterações estruturais e funcionais levando a permeabilização inespecífica das membranas (incluindo a membrana plasmática) tenham contribuído com o mecanismo de morte celular por necrose.

A elevada síntese de lipídeos em gliomas tem sido relatada ao longo das últimas décadas. Recentemente, observou-se que a via de sinalização oncogênica EGFR/PI3K/AKT está associada com aumento da produção e da absorção de lipídios através do aumento dos níveis da proteína SREBP-1, um fator de transcrição que controla o metabolismo lipídico e a síntese de biomassa (biogênese). Neste contexto, evidências farmacológicas e genéticas mostraram que a inibição ou redução de SREBP-1 induz aumento da morte celular em glioblastoma (AN et al., 2017; GENG et al., 2016; GUO et al., 2009; GUO; BELL; CHAKRAVARTI, 2013; VENNETI; THOMPSON, 2017).

Em nosso estudo, verificamos que o transcriptoma das células A172 tratadas com FIT IC₅₀ ou RET IC₅₀ apresentou redução da expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico, incluindo o gene SREBP-1. Além disso, observamos diminuição da síntese proteica de SREBP-1 nas linhagens U87MG e T98G após tratamento com FIT IC₅₀. No entanto, esta redução não foi observada em nenhuma linhagem celular após a administração de RET IC₅₀ durante 72 horas. Não podemos excluir que concentrações maiores ou um período de exposição superior a 72 horas possam alterar a expressão da proteína SREBP-1 com RET IC₅₀, bem como com FIT IC₅₀ em células A172. Por outro lado, no presente estudo, a proteína FAS, cuja expressão é regulada pelo fator de transcrição SREBP-1, exibiu níveis menores em todas as linhagens após tratamento com FIT IC₅₀ ou RET IC₅₀ (ver abaixo). Especificamente, o fato de não termos verificado modulação da expressão proteica de SREBP-1 em células A172 após qualquer tratamento enfatiza a importância de se estudar mais de uma linhagem celular em modelos *in vitro*. De fato, outros autores reportaram recentemente diferenças moleculares e funcionais não apenas entre as três linhagens que estudamos, mas também entre subpopulações da uma mesma linhagem celular (ALLEN et al., 2016; KISELEVA et al., 2016). Desta forma, é possível que as diferenças que observamos quanto à viabilidade e expressão proteica no presente trabalho possam ser explicadas, pelo menos em parte, por estas diferenças moleculares e funcionais.

Uma enzima chave envolvida na lipogênese de tumores é a FAS, cujo aumento de expressão é comum a muitos tipos de neoplasia, incluindo glioma. De fato, TAO et al. (2013) mostraram que os níveis de FAS são maiores em astrocitomas de alto grau do que em de baixo grau. Além disso, estes autores relataram que a FAS desempenha um papel fundamental na manutenção de células-tronco de glioma e que a biossíntese de lipídeos *de novo* mediada pela FAS está intimamente associada com o crescimento e capacidade invasiva em glioblastoma. Ainda com relação ao papel da FAS em tumores, outros autores demonstraram

que inibidores de FAS, tais como cerulenina, C75 e orlistate, retardaram o crescimento celular *in vivo* (FLAVIN et al., 2010). No presente estudo, utilizamos análises de transcriptoma para confirmar que tanto FIT IC₅₀ como RET IC₅₀ diminuíram a expressão de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos. Também, nossos dados de Western Blot mostraram que ambos os compostos reduziram significativamente a síntese de FAS nas linhagens U87MG, A172 e T98G. Portanto, nossos resultados corroboram observações de outros autores e sugerem que SREBP-1 e FAS possam ser alvos para futuras abordagens para impedir a síntese de biomassa em glioblastoma.

Com relação à enzima *farnesyl-diphosphate farnesyltransferase* (FDFT1; uma esqualeno-sintase (SQ)), sabe-se que esta molécula está associada com o desenvolvimento de tumores, como carcinoma, melanoma e doenças malignas hematológicas (FUKUMA et al., 2012; JAYASHREE et al., 2015; YANG et al., 2014; ZHANG; DAI; WANG, 2012). A respeito dos gliomas, CRICK et al. (1995) evidenciaram a importância da FDFT1 para a biossíntese de colesterol na linhagem murina C6 ao utilizarem esqualestatina 1, um inibidor de SQ, *in vitro*. Embora estes autores tenham destacado a importância da SQ para a síntese de colesterol *de novo* em células de glioma, não foram apresentados detalhes sobre a viabilidade celular. No presente estudo, detectamos a inibição da proteína FDFT1 em células U87MG, A172 e T98G após tratamento FIT IC₅₀. Por sua vez, RET IC₅₀ reduziu significativamente a expressão desta proteína nas células U87MG e A172, mas não na linhagem T98G. Desta forma, nossos achados sugerem que as células T98G sejam mais resistentes a RET que as outras linhagens. Além disso, conforme considerado anteriormente, não pode ser excluída a possibilidade de que períodos mais longos de exposição da linhagem T98G a RET levasse a redução da síntese de FDFT1. Em geral, a expressão reduzida de FDFT1 em células U87MG e A172 tratadas com FIT IC₅₀ ou RET IC₅₀ ressalta a importância de se considerar esta enzima e estes compostos em futuras estratégias contra glioblastoma.

Finalmente, não é possível excluir que os valores IC₅₀ que encontramos para FIT e RET *in vitro* possam ser maiores que as concentrações consideradas seguras *in vivo*. De fato, análises *in vivo* indicam que níveis plasmáticos de retinol acima de 3,5 µM estão associados a efeitos tóxicos na hipervitaminose crônica A (BENDICH; LANGSETH, 1989). Portanto, ainda que nossos dados sejam originais, futuras investigações *in vitro* e *in vivo*, considerando menores concentrações e períodos de exposição maiores a FIT e/ou RET, são essenciais para se definir de forma mais precisa valores considerados seguros para eventuais ensaios clínicos.

Em conclusão, no presente trabalho, reportamos dados originais sobre os efeitos de FIT e RET sobre a viabilidade das linhagens celulares de glioblastoma humano U87MG, A172 e T98G. Além disso, relatamos a modulação por FIT e RET de vias celulares e proteínas envolvidas na lipogênese do tumor e na síntese de colesterol, reforçando assim a inibição da biomassa como uma estratégia potencial para impedir o crescimento do glioblastoma.

6. CONCLUSÕES

Tanto fitol quanto retinol exercem, sobre as linhagens de glioblastoma humano U87MG, T98G e A172, efeito citotóxico *in vitro* dose-dependente (redução da viabilidade celular).

No presente estudo evidenciamos alteração da homeostase redox em linhagens de glioblastoma expostas a fitol ou retinol. No entanto, com os métodos aqui empregados, não nos foi possível identificar natureza anti- ou pró-oxidante desta alteração.

Nossa investigação sobre a redução da viabilidade das células de glioblastoma expostas a fitol ou retinol favorece que o mecanismo de morte celular associado seja por necrose.

A expressão gênica em larga escala de células de glioblastoma expostas a fitol ou retinol evidenciou a diminuição significativa da expressão de genes, além de enriquecimento de vias celulares, relacionados com a biossíntese de colesterol, ácido graxo e lipídeos.

A síntese das proteínas SREBP-1, FAS e FDFT1, cujos genes apresentaram diminuição significativa da expressão, foi reduzida em linhagens de glioblastoma tratadas com fitol ou retinol.

A toxicidade *in vitro* do fitol e do retinol sobre células de glioblastoma humano pode estar relacionada com necrose e diminuição da biossíntese de colesterol, ácido graxo e lipídeos, sugerindo redução da biomassa tumoral.

7. REFERÊNCIAS

AIRTON, F. et al. Universidade Federal do Ceará Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas Efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos do fitol, um ativador de NADPH oxidase, e tadalafil, um inibidor de 5- fosfodiesterase, em modelos experimentais. 2010.

ALLEN, M. et al. Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 354, p. 354re3-354re3, 2016.

AN, Y. et al. 27-Hydroxycholesterol regulates cholesterol synthesis and transport in C6 glioma cells. **NeuroToxicology**, fev. 2017.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Current opinion in immunology**, v. 16, n. 1, p. 42–7, fev. 2004.

BENDICH, A.; LANGSETH, L. Safety of vitamin A. **The American journal of clinical nutrition**, v. 49, n. 2, p. 358–71, fev. 1989.

BERGENDI, L. et al. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life sciences**, v. 65, n. 18–19, p. 1865–74, 1999.

BLOMHOFF, R. **Vitamin A in health and disease**. [s.l.] M. Dekker, 1994.

CAYMAN CHEMICAL. **Glutathione Assay Kit**. Disponível em: <www.caymanchem.com>. Acesso em: 19 dez. 2017.

CRICK, D. C. et al. Selective inhibition of cholesterol biosynthesis in brain cells by squalenstatin 1. **Journal of neurochemistry**, v. 65, n. 3, p. 1365–73, set. 1995.

DE BITTENCOURT PASQUALI, M. A. et al. Vitamin A (retinol) downregulates the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) by oxidant-dependent activation of p38 MAPK and NF-kB in human lung cancer A549 cells. **Cellular signalling**, v. 25, n. 4, p. 939–54, abr. 2013.

DE SOUSA, D. P. Analgesic-like Activity of Essential Oils Constituents. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 2233–2252, 7 mar. 2011.

EBERLÉ, D. et al. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 839–848, nov. 2004.

EPSTEIN, F. H.; GOODMAN, D. S. Vitamin A and Retinoids in Health and Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 310, n. 16, p. 1023–1031, 19 abr. 1984.

FERRÉ, P.; FOUFELLE, F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 12, n. s2, p. 83–92, out. 2010.

FISHER, G. J.; VOORHEES, J. J. Molecular mechanisms of retinoid actions in skin. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 10, n. 9, p. 1002–13, jul. 1996.

FLAVIN, R. et al. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. **Future Oncology**, v. 6, n. 4, p. 551–562, abr. 2010.

FUKUMA, Y. et al. Role of squalene synthase in prostate cancer risk and the biological aggressiveness of human prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 15, n. 4, p. 339–345, 1 dez. 2012.

GENG, F. et al. Inhibition of SOAT1 Suppresses Glioblastoma Growth via Blocking SREBP-1-Mediated Lipogenesis. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 21, p. 5337–5348, 1 nov. 2016.

GLASAUER, A.; CHANDEL, N. S. Targeting antioxidants for cancer therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 92, n. 1, p. 90–101, 1 nov. 2014.

GLOERICH, J. et al. Metabolism of phytol to phytanic acid in the mouse, and the role of PPARalpha in its regulation. **Journal of lipid research**, v. 48, n. 1, p. 77–85, 23 jan. 2007.

GUIMARÃES, A. G. et al. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 107, n. 6, p. 949–57, dez. 2010.

GUO, D. et al. EGFR Signaling Through an Akt-SREBP-1-Dependent,

Rapamycin-Resistant Pathway Sensitizes Glioblastomas to Antilipogenic Therapy. **Science Signaling**, v. 2, n. 101, p. ra82-ra82, 15 dez. 2009.

GUO, D.; BELL, E. E. H.; CHAKRAVARTI, A. Lipid metabolism emerges as a promising target for malignant glioma therapy. **CNS oncology**, v. 2, n. 3, p. 289–299, maio 2013.

HOLLINGSWORTH, D. F.; WRIGHT, N. C. Sir Jack Cecil Drummond, 1891-1952. **The British journal of nutrition**, v. 8, n. 4, p. 319–24, 1954.

HUBERLE, A. et al. Advanced Intercross Line Mapping Suggests That Ncf1 (Ean6) Regulates Severity in an Animal Model of Guillain-Barre Syndrome. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 7, p. 4432–4438, 1 abr. 2009.

IGNARRO, R. S. et al. JAK2 inhibition is neuroprotective and reduces astrogliosis after quinolinic acid striatal lesion in adult mice. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 48–49, p. 14–22, mar. 2013.

IGNARRO, R. S. et al. Sulfasalazine intensifies temozolomide cytotoxicity in human glioblastoma cells. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 418, n. 1–2, p. 167–78, 23 jul. 2016.

JAYAKUMAR, A. Isolation and Chromosomal Mapping of Genomic Clones Encoding the Human Fatty Acid Synthase Gene. **Genomics**, v. 23, n. 2, p. 420–424, 15 set. 1994.

JAYASHREE, B. S. et al. Targets in anticancer research--A review. **Indian journal of experimental biology**, v. 53, n. 8, p. 489–507, ago. 2015.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R. M. Oxidation events and skin aging. **Ageing research reviews**, v. 21, p. 16–29, maio 2015.

KARDEH, S.; ASHKANI-ESFAHANI, S.; ALIZADEH, A. M. Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer. **European Journal of Pharmacology**, v. 735, p. 150–168, 15 jul. 2014.

KARMAKAR, S. et al. Activation of Multiple Molecular Mechanisms for

Increasing Apoptosis in Human Glioblastoma T98G Xenograft. **Journal of Cancer Science & Therapy**, v. 2, n. 4, p. 107–113, 26 jun. 2010.

KARSY, M. et al. The impact of arsenic trioxide and all-trans retinoic acid on p53 R273H-codon mutant glioblastoma. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 35, n. 5, p. 4567–80, 8 maio 2014.

KISELEVA, L. N. et al. A172 and T98G cell lines characteristics. **Cell and Tissue Biology**, v. 10, n. 5, p. 341–348, 2016.

KITAREEWAN, S. et al. Phytol metabolites are circulating dietary factors that activate the nuclear receptor RXR. **Molecular biology of the cell**, v. 7, n. 8, p. 1153–66, ago. 1996.

KREBS, H. A. Otto Heinrich Warburg, 1883-1970. **Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society**, v. 18, p. 628–699, 1 nov. 1972.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 15 ago. 1970.

LEMOTTE, P. K.; KEIDEL, S.; APFEL, C. M. Phytanic acid is a retinoid X receptor ligand. **European journal of biochemistry**, v. 236, n. 1, p. 328–33, 15 fev. 1996.

LIANG, C.; YANG, L.; GUO, S. All-trans retinoic acid inhibits migration, invasion and proliferation, and promotes apoptosis in glioma cells *in vitro*. **Oncology Letters**, v. 9, n. 6, p. 2833–2838, 15 abr. 2015.

LIU, Y. et al. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of neurochemistry**, v. 69, n. 2, p. 581–93, ago. 1997.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, 9 jun. 2016.

LUO, D. et al. B7-H3 regulates lipid metabolism of lung cancer through SREBP1-

mediated expression of FASN. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 4, p. 1246–1251, 22 jan. 2017.

MAMEDE, A. C. et al. The Role of Vitamins in Cancer: A Review. **Nutrition and Cancer**, v. 63, n. 4, p. 479–494, maio 2011.

MITCHENER, J. S. et al. Cellular autophagocytosis induced by deprivation of serum and amino acids in HeLa cells. **The American journal of pathology**, v. 83, n. 3, p. 485–492, 1976.

MONTICONE, M. et al. NAC, Tiron and Trolox Impair Survival of Cell Cultures Containing Glioblastoma Tumorigenic Initiating Cells by Inhibition of Cell Cycle Progression. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e90085, 28 fev. 2014.

NIKIFOROVA, M. N.; HAMILTON, R. L. Molecular diagnostics of gliomas. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 135, n. 5, p. 558–68, maio 2011.

NORRMÉN, C. et al. mTORC1 Controls PNS Myelination along the mTORC1-RXR γ -SREBP-Lipid Biosynthesis Axis in Schwann Cells. **Cell Reports**, v. 9, n. 2, p. 646–660, 23 out. 2014.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. **Cancer Science**, v. 100, n. 12, p. 2235–2241, dez. 2009.

OLOFSSON, P. et al. Arthritis suppression by NADPH activation operates through an interferon- β pathway. **BMC Biology**, v. 5, n. 1, p. 19, 9 maio 2007.

OTTO WARBURG, B.; WIND, F.; NEGELEIN, N. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. The Journal of General Physiology. **Biochem. Z. Biochem. Z. Biochem. Z.. Biol. Chem**, v. 309, n. 2, p. 397–519, 1923.

PARK, J.-G.; OH, G. T. The role of peroxidases in the pathogenesis of atherosclerosis. **BMB reports**, v. 44, n. 8, p. 497–505, ago. 2011.

PEJIN, B.; KOJIC, V.; BOGDANOVIC, G. An insight into the cytotoxic activity of phytol at *in vitro* conditions. **Natural Product Research**, v. 28, n. 22, p. 2053–2056, 17 nov. 2014.

ROMERO-CALVO, I. et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Analytical Biochemistry**, v. 401, n. 2, p. 318–320, 15 jun. 2010.

ROSSATO, F. A. et al. Fatty Acid Synthase Inhibitors Induce Apoptosis in Non-Tumorigenic Melan-A Cells Associated with Inhibition of Mitochondrial Respiration. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e101060, 25 jun. 2014.

RU, P. et al. Tumor metabolism of malignant gliomas. **Cancers**, v. 5, n. 4, p. 1469–84, 2013.

SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, M. Antioxidants: Friends or foe in prevention or treatment of cancer: The debate of the century. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 271, n. 1, p. 49–63, 15 ago. 2013.

SANTOS, C. C. DE M. P. et al. Antinociceptive and Antioxidant Activities of Phytol *In Vivo* and *In Vitro* Models. **Neuroscience Journal**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

STUPP, R. et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 10, p. 987–996, 10 mar. 2005.

SYLVESTER, P. W. Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l: s.n.]. v. 716p. 157–168.

TADA, H. et al. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **Journal of immunological methods**, v. 93, n. 2, p. 157–65, 6 nov. 1986.

TANG, K. et al. [Effect of all-trans-retinoic acid on C6 glioma cell proliferation and differentiation]. **Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Central South University. Medical sciences**, v. 33, n. 10, p. 892–7, out. 2008.

TANG, X.-H.; GUDAS, L. J. Retinoids, Retinoic Acid Receptors, and Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, n. 1, p. 345–364, 28 fev. 2011.

TANSEY, T. Structure and regulation of mammalian squalene synthase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1529, n.

1–3, p. 49–62, 15 dez. 2000.

TAO, B.-B. et al. Up-regulation of USP2a and FASN in gliomas correlates strongly with glioma grade. **Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia**, v. 20, n. 5, p. 717–20, maio 2013.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4, set. 1979.

VAHLQUIST, A.; DUVIC, M. **Retinoids and carotenoids in dermatology**. [s.l.] Informa Healthcare, 2007.

VAN DEIJK, A.-L. F. et al. Astrocyte lipid metabolism is critical for synapse development and function in vivo. **Glia**, v. 65, n. 4, p. 670–682, abr. 2017.

VAN DEN BRINK, D. M. et al. Characterization of the Final Step in the Conversion of Phytol into Phytanic Acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 29, p. 26838–26844, 22 jul. 2005.

VAN DEN BRINK, D. M.; WANDERS, R. J. A. Phytanic acid: production from phytol, its breakdown and role in human disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 15, p. 1752–1765, 24 ago. 2006.

VENNETI, S.; MISCHEL, P. S. Metabolic Reprogramming in Brain Cancer: A Coordinated Effort. **Brain Pathology**, v. 25, n. 6, p. 753–754, nov. 2015.

VENNETI, S.; THOMPSON, C. B. Metabolic Reprogramming in Brain Tumors. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 12, n. 1, p. 515–545, 24 jan. 2017.

VIEIRA, A. S. et al. Ciliary neurotrophic factor infused intracerebroventricularly shows reduced catabolic effects when linked to the TAT protein transduction domain. **Journal of Neurochemistry**, v. 110, n. 5, p. 1557–1566, set. 2009.

WARBURG, O. On the Origin of Cancer Cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309–314, 24 fev. 1956.

WU, J. et al. Vitamin K3-2,3-epoxide induction of apoptosis with activation of ROS-dependent ERK and JNK protein phosphorylation in human glioma cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 193, n. 1, p. 3–11, ago. 2011.

YANG, Y.-F. et al. Squalene Synthase Induces Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Enrichment in Lipid Rafts to Promote Lung Cancer Metastasis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 190, n. 6, p. 675–687, 15 set. 2014.

YASUMOTO, Y. et al. Inhibition of Fatty Acid Synthase Decreases Expression of Stemness Markers in Glioma Stem Cells. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0147717, 25 jan. 2016.

YOSHINO, A. et al. Gene expression profiling predicts response to temozolomide in malignant gliomas. **International journal of oncology**, v. 36, n. 6, p. 1367–77, jun. 2010.

ZHANG, F.; DAI, X.; WANG, Y. 5-Aza-2'-deoxycytidine Induced Growth Inhibition of Leukemia Cells through Modulating Endogenous Cholesterol Biosynthesis. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 7, p. M111.016915-M111.016915, 1 jul. 2012.

ZHAO, S. et al. Roles of vitamin A status and retinoids in glucose and fatty acid metabolism. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 90, n. 2, p. 142–152, abr. 2012.

8. APÊNDICE I – Manuscrito submetido para publicação

Toxic effects of phytol and retinol on human glioblastoma cells are associated with modulation of cholesterol and fatty acid biosynthetic pathways

Gustavo Facchini^{a§}, Raffaella Silvestre Ignarro^{a§}, Erika Rodrigues-Silva^b, André Schwambach Vieira^c, Iscia Lopes-Cendes^d, Roger Frigério Castilho^b, Fabio Rogerio^{a*}

^a Department of Anatomical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Av. Tessália Vieira de Camargo, 126, Zip Code: 13083-887, Campinas, SP, Brazil.

^b Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Av. Tessália Vieira de Camargo, 126, Zip Code: 13083-887, Campinas, SP, Brazil.

^c Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), R. Monteiro Lobato, 255, Zip Code: 13083-862, Campinas, SP, Brazil.

^d Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Av. Tessália Vieira de Camargo, 126, Zip Code: 13083-887, Campinas, SP, Brazil.

[§] These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author: Phone: +55 19 3521-7541 / Fax: +55 19 3289-3897

E-mail: fabio@fcm.unicamp.br

This manuscript has 15 pages, 4 figures and 1 Online Resource.

Abstract

Glioblastoma (GBM) is the most common primary brain tumor. Genetic mutations may reprogram the metabolism of neoplastic cells. Particularly, alterations in cholesterol and fatty acid biosynthetic pathways may favor biomass synthesis and resistance to therapy. Therefore, compounds that interfere with those pathways, such as phytol (PHY) and retinol (RET), may be appropriate for cytotoxic approaches. We tested the effect of PHY or RET on the viability of human GBM cell lines (U87MG, A172 and T98G). Since the compounds showed a dose-dependent cytotoxic effect, additional analyses were performed with IC₅₀ values. Transcriptome analyses of A172 cells treated with PHY IC₅₀ or RET IC₅₀ revealed down-regulated genes involved in cholesterol and/or fatty acid biosynthetic pathways. Thus, we investigated the expression of proteins required for cholesterol and/or fatty acid synthesis after treating all lineages with PHY IC₅₀ or RET IC₅₀ and comparing them with controls. Sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) expression was reduced by PHY in U87 and T98G cells. However, fatty acid synthase (FAS) protein expression, which is regulated by SREBP-1, was down-regulated in all lineages after both treatments. Moreover, farnesyl-diphosphate farnesyltransferase (FDFT1) levels, a protein associated with cholesterol synthesis, were reduced in all lineages by PHY and in U87MG and A172 cells by RET. Our results suggest that SREBP-1, FAS and FDFT1 are potential target(s) for future *in vivo* approaches against GBM and support the use of inhibitors of their synthesis, including PHY and RET, for such approaches.

Key words

Glioblastoma, Phytol, Retinol, Sterol regulatory element-binding protein 1, Fatty acid synthase, Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase

Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most common primary brain tumor, accounting for approximately 70% of astrocytomas and 15% of all intra-cranial neoplasms. Approximately 90% of primary GBMs grow rapidly and do not present clinical or histopathological evidence of a precursor lesion. Conversely, secondary GBMs progress slowly from a lower grade astrocytoma. Histologically indistinguishable from each other, both forms of GBM have poor prognosis. Patients with primary GBM have a survival of approximately five months, and those with secondary GBM have a survival of eight months (LOUIS et al., 2016). In addition to surgical procedures, the chemotherapeutic agent temozolomide and radiation therapy have been used as the first line therapies to treat GBM patients. However, clinical trials using temozolomide and radiotherapy in patients submitted to surgery showed a 5-year survival of only 9.8% (STUPP et al., 2005). Furthermore, some tumors may develop resistance to temozolomide (YOSHINO et al., 2010).

Mutations in oncogenes and tumor suppressor genes may alter the metabolism of glioma cells, thus inducing metabolic remodeling or reprogramming. Particularly, alterations involving cholesterol and fatty acid synthesis favor not only biomass synthesis (biogenesis) but also resistance to therapies (VENNETI; MISCHER, 2015). In this context, compounds that interfere with cholesterol and/or fatty acid metabolism, such as phytol (PHY), have been investigated as possible therapeutic strategies against neoplastic cells (PEJIN; KOJIC; BOGDANOVIC, 2014). PHY is intracellularly converted to phytanic acid, which may change the expression of proteins involved in cholesterol synthesis and metabolism, such as sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) (AN et al., 2017), a transcription factor that binds to a sequence in the promoter of different genes, sterol regulatory element-1 (SRE1). This sequence flanks the LDL receptor gene and others associated with cholesterol, fatty acid and lipid biosynthesis (EBERLÉ et al., 2004; FERRÉ; FOUFELLE, 2010). Fatty acid synthase (FAS), a multi-enzyme complex that is encoded by the FASN gene in humans, is another protein that may be regulated by PHY and participates in biomass production (JAYAKUMAR, 1994; LUO et al., 2017; NORRMÉN et al., 2014; VAN DEIJK et al., 2017). Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase (FDFT1; squalene synthase (SQ)), another enzyme involved in cholesterol synthesis, is localized to the endoplasmic reticulum membrane. SQ catalyzes a reaction in which two identical molecules of farnesyl pyrophosphate are converted into squalene, a precursor of cholesterol (TANSEY, 2000). To the best of our knowledge, there is only one study on FDFT1 and glioma (CRICK et al., 1995) that highlighted the importance of this enzyme for cholesterol production in rat C6 lineage, but no data were reported regarding PHY, FDFT1 and glioma.

Another PHY metabolite, phytenic acid, may activate the retinoid X receptor (RXR) with potency and efficacy similar to that of phytanic acid (KITAREEWAN et al., 1996; LEMOTTE; KEIDEL; APFEL, 1996). RXR is a nuclear receptor that plays a central role in cellular pathways

regulated by retinoids (vitamin A) and is also directly involved in cholesterol and/or fatty acid metabolism (ZHAO et al., 2012). Furthermore, retinol (RET) and/or its derivatives inhibit proliferation in different types of tumor cells *in vitro*. Indeed, Tang et al. (2008) (TANG et al., 2008) reported that trans retinoic acid (ATRA), a RET metabolite, inhibited the growth of rat glioma cells. In addition, Karsy et al., (2014) (KARSY et al., 2014) observed that ATRA decreased the number of viable cells of the human GBM lineages U87MG and LN18.

To date, there are no studies on the action of PHY on gliomas, and little is known regarding the role of RET in cholesterol and/or fatty acid metabolism in these tumors. In this context, the aim of the present study is to investigate the effect of PHY and RET on the viability of human GBM cell lines (U87MG, A172 and T98G) and to determine whether these compounds modulate the expression of proteins in the cholesterol and/or fatty acid biosynthetic pathways. These compounds may represent targets for new therapeutic approaches.

Materials and Methods

Cell lines and treatment

U87MG, A172 and T98G human glioblastoma cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium containing 2 g/L glucose (DMEM, Vitrocell, cat#D0460, Campinas, SP, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin (Vitrocell, cat#P0403) at 37°C under a humidified atmosphere with 5% CO₂. Twenty-four hours after plating (96 well-plate; 10,000 cells/cm²), the cells were treated with serial dilutions (18 concentrations from 1.9 to 250,000 µM) of phytol (PHY; Sigma, cat#W502200, St Louis, MO, USA) or retinol (RET; Sigma, cat#R7632) for 24, 48 or 72 hours to define the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀). Stock solutions of 0.5 M PHY or 0.5 M RET were prepared by dissolving the drug in a solution with DMEM and dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, cat#D2650). Cells were exposed to a final DMSO concentration of 0.1%, which was always the same irrespective of the tested concentration of PHY or RET. The same final concentration of DMSO was used in the control group. Except for viability assays, the cells were seeded on 152 cm² growth dishes (10,000 cells/cm²) and exposed to PHY and RET concentrations corresponding to IC₅₀ after 72 hours.

Cell viability

After treatment, the medium containing PHY or RET was replaced with MTT (Sigma, cat#M5655) solution (1 mg/mL in DMEM, without phenol (Vitrocell, cat#D0462); 250 µL/well) for

45 minutes (37°C; 5% CO₂) (LIU et al., 1997). The MTT solution was then discarded, and absolute ethanol was added to dissolve formazan salts. Absorbance was read at 570 nm, subtracting the value measured at 650 nm (PowerWave XS 2, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA).

Transcriptome sequencing

Purified total RNA was obtained with TRIzol (Thermo Fisher Scientific, cat#15596018, Waltham, MA, USA). RNA (400 ng) and converted to a cDNA library by TruSeq Stranded LT mRNA kit (Illumina, cat#122-2103-RS, San Diego, CA, USA). Specific adapters for Illumina universal and qPCR were used to quantify cDNA libraries. One unique identifier sequence was added for sample separation after sequencing each library, thus allowing for sequencing of all samples during the same run and minimizing technical variations. Libraries were sequenced in a HiSeq 2500 platform (Illumina) in High Output mode, producing sequences of 2x100 nucleotides for each sequenced molecule. Sequence alignment was performed with TopHat2 (<http://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>) to *Homo sapiens* UCSC hg19 assemble (IGNARRO et al., 2016). The average sequence alignment rate was 80%.

Western blotting

Cells were lysed in an ice bath by using a sonicator (MISONIX, Sonicator®3000, Farmingdale, NY, USA). The total protein concentration of each sample was measured by using the Bradford colorimetric method (MITCHENER et al., 1976). For each sample, total protein (100 µg) was separated by SDS/polyacrylamide 12% gel electrophoresis and electroblotted onto a 0.45 µm nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, cat#162-0115, Hercules, CA, USA) (LAEMMLI, 1970; TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). Equalization of total protein concentration among the samples was performed by staining the membrane with Ponceau S solution (Sigma, cat#P7170). Subsequently, membranes were incubated with primary antibody against SREBP-1 (1:1000; Abcam, cat#ab3259, Cambridge, Cambridgeshire, UK), FAS (1:1000; Cell Signaling, cat#3189, Danvers, MA, USA), FDFT1 (1:1000; Bioss, cat#bs-11517R, Woburn, MA, USA) and with secondary antibodies conjugated to peroxidase (anti-mouse - 1:10000; BD Biosciences, cat#554002, Franklin Lakes, NJ, USA; anti-rabbit - 1:10000; Cell Signaling, cat#7074). The immunoreactive bands were detected and quantified by using a chemiluminescence kit (SuperSignal® West Pico, Thermo Fisher Scientific, cat#34080), a gel documentation system (UVITEC Gel Doc Systems, Rugby, Warwickshire, UK) and the ImageJ software (version 1.49V). Ponceau S staining allowed the use of the optical density value of all proteins detected in the membrane as a loading control for each sample. To assess the level of expression of proteins in each sample, the optical density value of the chemiluminescent band corresponding to each protein was divided by the value of the optical density of the complete lane

stained with Ponceau S (IGNARRO et al., 2013, 2016; ROMERO-CALVO et al., 2010; VIEIRA et al., 2009).

Statistical analyses

Data are presented as the mean \pm standard error of mean. Nonlinear regression was performed for IC₅₀. One-way ANOVA followed by Bonferroni correction for multiple comparisons was used for Western blotting data (GraphPad Prism 5, version 5.00). Significance level was assumed at $p < 0.05$.

HTSeqCount and DESeq2 packages (<http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq/doc/overview.html> and <http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>) were used for transcriptome analyses. HTSeqCount estimates gene expression through counting aligned sequences to genome elements, such as exons and genes. DESeq2 employs a negative-binomial distribution for data normalization, corrects for outliers and the contribution of low expression genes for analysis of variance, uses differential expression statistical Wald tests and corrects for multiple tests employing the Benjamini-Hochberg procedure. A list of differentially expressed genes was generated and enrichment of pathways for the set of differentially expressed genes was calculated using Metacore® (Thomson Reuters). Significance level was assumed at $p < 0.05$ (after correction for multiple tests, i.e., adjusted p-value).

Results

PHY and RET reduced cell viability

To evaluate the cytotoxic effects of PHY and RET on U87MG, A172 and T98G lineages after 24, 48 and 72 hours, we constructed a dose-response curve with 18 concentrations to determine the IC₅₀ of each substance. For each cell line, the compounds showed a dose-dependent response when values of viability were compared within the same treatment period. Particularly, DMSO 0.1% did not alter viability at any time point (Figure 1). Based on dose-response curve data, other experimental analyses were performed with the IC₅₀ values of each compound. Cellular morphological characteristics were evaluated daily. The groups exposed only to supplemented culture medium (DMEM) or the dilution vehicle (0.1% DMSO) reached high confluence (approximately 100%). Cells treated with PHY IC₅₀ or RET IC₅₀ showed a lower density. After 72 hours, branched cellular processes were noted, with gradual reduction of the caliber toward the distal projections (Figure 2).

Transcriptome analyses

To further investigate the effects of PHY or RET on glioblastoma cells, we performed transcriptome analyses in groups grown in DMEM with 0.1% DMSO or treated with PHY IC₅₀ or RET IC₅₀ (both compounds diluted in 0.1% DMSO) after 72 h. The A172 lineage was selected because it showed the lowest PHY and RET IC₅₀ concentrations. Sequencing provided a total of 162,248,078 paired-end 100 bp reads (~80% > Q30; ~10Mi reads/sample). The DESeq2 pipeline was used to generate a list of significantly differentially expressed genes (Online Resource 1). The groups receiving PHY IC₅₀ or RET IC₅₀ showed 546 and 897 differentially expressed genes (vs DMEM with 0.1% DMSO), respectively. Among the two sets of differentially expressed genes, 228 genes were common to both groups, while 318 were exclusive to PHY IC₅₀ and 669 to RET IC₅₀ (Figure 3).

To identify PHY and RET-mediated regulation of cellular pathways associated with cholesterol and/or fatty acid metabolism in glioblastoma cells, we calculated pathway enrichment for the set of differentially expressed genes after treatment with the IC₅₀ of each substance. Particularly, PHY IC₅₀ significantly enriched 10 pathways, and the majority contained down-regulated genes involved in cholesterol and/or fatty acid metabolism. RET IC₅₀ significantly enriched 8 pathways, and one contained down-regulated genes associated with cholesterol metabolism (Figure 3; Online Resource 1).

PHY IC₅₀ or RET IC₅₀ modulated SREBP-1, FAS and FDFT1 expression levels

After transcriptome analyses, we performed Western blotting to evaluate the expression of SREBP-1, FAS and FDFT1, which exhibited down-regulated gene expression and are involved in cholesterol and/or fatty acid metabolism pathways. Specifically, SREBP-1, FAS and FDFT1 mRNA levels showed a reduction of 2.14, 2.24 and 1.88 times after treatment with PHY IC₅₀, respectively. As regards RET IC₅₀, the same mRNA levels were reduced 7.49, 0.64 and 1.68 times, respectively (Online Resource 1).

Compared with DMEM and 0.1% DMSO, PHY IC₅₀ significantly reduced the protein levels of the transcription factor SREBP-1 in U87MG and T98G lineages (but not in A172 cells). RET IC₅₀ did not modulate SREBP-1 protein expression in any group of treated cells. Compared with DMEM and 0.1% DMSO, both PHY IC₅₀ and RET IC₅₀ significantly reduced FAS synthesis in U87MG, A172 and T98G lineages. Moreover, FDFT1 protein expression in U87MG, A172 and T98G cells was significantly lower after PHY IC₅₀ than after DMEM and 0.1% DMSO. Finally, RET IC₅₀ significantly reduced FDFT-1 expression in U87MG and A172 lineages, but not in T98G cells (Figure 4).

Discussion

We reported the effects of PHY and RET on the viability of human GBM cell lines (U87MG, A172 and T98G), as well as gene modulation and protein expression of the cholesterol and/or fatty acid biosynthetic pathways, which may be targets for new therapeutic approaches.

To the best of our knowledge, there are few studies on the cytotoxic effect of PHY on human tumor cells, and none have focused on glioblastoma. Indeed, Pejin et al., (2014) (PEJIN; KOJIC; BOGDANOVIC, 2014) found that breast (MCF-7) and cervical cancer (HeLa cells) lineages were sensitive to PHY with IC_{50} values of 8.79 μ M and 15.51 μ M, respectively. Lung cancer cells (HT-29 and A-549) were also sensitive to PHY with higher IC_{50} values (34.82 μ M and 56.98 μ M, respectively). Finally, lower sensitivity to PHY was observed in melanoma (Hs294T), breast (MDA-MB-231) and prostate (PC-3) tumor cells (IC_{50} = 65.15 μ M, 69.67 μ M and 77.85 μ M, respectively). However, the duration of exposure to PHY was not specified. Here, we studied human glioblastoma lineages commonly used for *in vitro* toxicity assays. In U87MG cells, IC_{50} values were 38.0 μ M, 33.2 μ M and 18.6 μ M after 24, 48 and 72 hours, respectively. A172 IC_{50} values were 30.2 μ M, 30.6 μ M and 18.4 μ M after 24, 48 and 72 hours, respectively. In T98G cells, IC_{50} values were 332.7 μ M, 207.7 μ M and 86.7 μ M after 24, 48 and 72 hours, respectively. Therefore, we detected a cytotoxic effect of PHY on three glioblastoma cells, and U87MG and A172 lineages were more susceptible to PHY than T98G.

Regarding RET, previous studies have reported the deleterious effect of ATRA, a RET metabolite, on glioma cells. Tang et al. (2008) (TANG et al., 2008) observed that treatment of rat glioma C6 cells with 16 μ M ATRA resulted in growth inhibition and cell cycle abnormalities. In fact, the G0/G1 phase was prolonged, and the number of S-phase cells decreased. In addition, morphological changes occurred, with longer and thinner cytoplasmic processes observed after treatment. Karsy et al. (2014) (KARSY et al., 2014) reported that ATRA significantly decreased the number of viable human U87MG and LN18 cells after 24 hours of treatment. Our data corroborate the results by Tang et al. (2008) (TANG et al., 2008) and Karsy et al. (2014) (KARSY et al., 2014). In fact, we observed a dose-dependent cytotoxic effect of RET on U87MG, A172, and T98G lineages when identifying RET IC_{50} after 24, 48 and 72 hours of treatment (values ranging from 81.8 μ M to 41.8 μ M, 28.2 μ M to 10.4 μ M and 338.2 μ M to 244.2 μ M, respectively). Again, T98G cells were more resistant than the other two lineages. In addition, morphological feature changes described by Tang et al. (2008) (TANG et al., 2008) were similar to those that we observed, particularly, gradual reduction of cellular process caliber after 72 hours of treatment with RET IC_{50} . Therefore, we verified an *in vitro* deleterious effect of RET on U87MG, A172 and T98G cells.

Over the last decades, elevated lipid synthesis has been reported in gliomas. Recently, the oncogenic signaling EGFR/PI3K/Akt pathway was shown to enhance lipid levels and uptake by upregulating the SREBP-1 protein, a transcriptional factor that controls lipid metabolism and biomass synthesis (biogenesis). In this context, pharmacologic and genetic data reported by other authors showed that inhibition of SREBP-1-induced glioblastoma cell death (AN et al., 2017; GENG et al., 2016; GUO et al., 2009; GUO; BELL; CHAKRAVARTI, 2013; VENNETI; THOMPSON, 2017). We confirmed that the transcriptome of A172 cells treated with PHY IC₅₀ or RET IC₅₀ showed reduced expression of genes involved in lipid metabolism, including the SREBP-1 gene. In addition, SREBP-1 protein synthesis was reduced after U87MG and T98G lineages were treated with PHY IC₅₀. However, this reduction was not observed in any cell line after RET IC₅₀ administration for 72 h. Potentially, higher concentrations or a period longer than 72 hours is required to induce changes in SREBP-1 protein expression with RET IC₅₀ (and PHY IC₅₀ in A172 cells). However, FAS protein, which is regulated by the transcription factor SREBP-1, was down-regulated in all lineages after either PHY IC₅₀ or RET IC₅₀ (see below). In this sense, the lack of change in SREBP-1 expression in A172 cells after any treatment emphasizes the importance of studying more than one cell line. Indeed, we studied three commercial cell lines that were derived from human glioblastoma obtained from different donors. Other authors have recently discussed molecular and functional differences not only among these three lineages but also among subpopulations of the same cell line (ALLEN et al., 2016; KISELEVA et al., 2016). Therefore, it is possible that the differences that we observed regarding viability and protein expression may be at least partially due to such molecular and functional differences.

FAS is a key enzyme involved in tumor lipogenesis, and its overexpression is common in many cancers, including glioma. Indeed, Tao et al. (2013) (TAO et al., 2013) showed that FAS levels were higher in high-grade than in low-grade astrocytomas. Additionally, Tao et al. (2013) (YASUMOTO et al., 2016) reported that FAS plays a pivotal role in the maintenance of glioma stem cells, and FAS-mediated *de novo* lipid biosynthesis is closely associated with tumor growth and invasion in glioblastoma. Furthermore, FAS inhibitors, such as cerulenin, C75 and orlistat, have been shown to induce cancer growth delay *in vivo* (FLAVIN et al., 2010). In the present study, we used transcriptome analyses to confirm that both PHY IC₅₀ and RET IC₅₀ led to down-regulation of genes involved in fatty acid metabolism. Additionally, our Western blotting data showed that compared with controls (DMEM and 0.1% DMSO), both compounds significantly reduced FAS synthesis in U87MG, A172 and T98G lineages. Therefore, our results corroborate observations by others and suggest that SREBP-1 and FAS may be targets for future approaches to impede glioblastoma biomass synthesis. Moreover, the present data suggest that inhibitors of SREBP-1 and/or FAS expression, including PHY and RET, could be considered for such approaches.

FDFT1 (SQ) has been associated with the development of tumors, such as carcinoma, melanoma, and hematological malignancies (FUKUMA et al., 2012; JAYASHREE et al., 2015; YANG et al., 2014; ZHANG; DAI; WANG, 2012). Concerning glioma, Crick et al. (1995) (CRICK et al., 1995) described the *in vitro* blockage of cholesterol biosynthesis in murine C6 lineage using squalostatins 1, a SQ inhibitor. Even though the authors highlighted the importance of SQ for *de novo* cholesterol production in glioma cells, they did not provide further details on cell viability. In the present study, we detected FDFT1 protein inhibition in U87MG, A172 and T98G cells after PHY IC₅₀ treatment compared with DMEM and 0.1% DMSO. However, RET IC₅₀ significantly reduced FDFT1 expression in U87MG and A172 cells but not in T98G cells. Particularly, our findings suggest a higher resistance to RET in T98G cells than in the other lineages. Additionally, it may not be excluded the possibility that longer periods of exposure of T98G lineage to RET would result in reduced FDFT1 synthesis. Overall, reduced FDFT1 expression in U87MG and A172 cells treated with PHY IC₅₀ or RET IC₅₀ favors the consideration of this enzyme and these compounds in future strategies against glioblastoma growth.

Finally, it is not possible to rule out that the IC₅₀ values that we have found for PHY and RET *in vitro* may be above the *in vivo* concentrations considered to be safe. In fact, *in vivo* analyses indicate that plasma levels of retinol above 3.5 µM are associated with toxic effects in chronic hypervitaminosis A (BENDICH; LANGSETH, 1989). Therefore, even though our data are original, future *in vitro* and *in vivo* investigations considering lower concentrations and longer exposure to PHY and/or RET are essential to more precisely propose safer values to be tested in *in vivo* approaches.

In conclusion, we provide original data on the effects of PHY or RET on the viability of human glioblastoma U87MG, A172 and T98G cell lines. Additionally, we report the modulation of cellular pathways and key proteins involved in tumor lipogenesis and cholesterol synthesis by PHY and RET, thus reinforcing biomass inhibition as a potential strategy to impede glioblastoma growth.

Funding

This work was supported by grants from FAPESP (2011/50400-0; 2013/02618-1; 2013/07559-3) and FAEPEX/UNICAMP (379/13; 554/14; 621/14).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Ethical standards

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 131:803–820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1
2. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al (2005) Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987–996. doi: 10.1056/NEJMoa043330
3. Yoshino A, Ogino A, Yachi K, et al (2010) Gene expression profiling predicts response to temozolomide in malignant gliomas. *Int J Oncol* 36:1367–77.
4. Venneti S, Mischel PS (2015) Metabolic Reprogramming in Brain Cancer: A Coordinated Effort. *Brain Pathol* 25:753–754. doi: 10.1111/bpa.12308
5. Pejin B, Kojic V, Bogdanovic G (2014) An insight into the cytotoxic activity of phytol at *in vitro* conditions. *Nat Prod Res* 28:2053–2056. doi: 10.1080/14786419.2014.921686
6. An Y, Zhang D-D, Yu H-L, et al (2017) 27-Hydroxycholesterol regulates cholesterol synthesis and transport in C6 glioma cells. *Neurotoxicology*. doi: 10.1016/j.neuro.2017.02.001
7. Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, et al (2004) SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86:839–848. doi: 10.1016/j.biochi.2004.09.018
8. Ferré P, Foufelle F (2010) Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes, Obes Metab* 12:83–92. doi: 10.1111/j.1463-1326.2010.01275.x
9. Jayakumar A (1994) Isolation and Chromosomal Mapping of Genomic Clones Encoding the Human Fatty Acid Synthase Gene. *Genomics* 23:420–424. doi: 10.1006/geno.1994.1518
10. Norrmén C, Figlia G, Lebrun-Julien F, et al (2014) mTORC1 Controls PNS Myelination along the mTORC1-RXR γ -SREBP-Lipid Biosynthesis Axis in Schwann Cells. *Cell Rep* 9:646–660. doi: 10.1016/j.celrep.2014.09.001
11. Luo D, Xiao H, Dong J, et al (2017) B7-H3 regulates lipid metabolism of lung cancer through SREBP1-mediated expression of FASN. *Biochem Biophys Res Commun* 482:1246–1251. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.021
12. van Deijk A-LF, Camargo N, Timmerman J, et al (2017) Astrocyte lipid metabolism is critical for synapse development and function in vivo. *Glia* 65:670–682. doi: 10.1002/glia.23120
13. Tansey T (2000) Structure and regulation of mammalian squalene synthase. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1529:49–62. doi: 10.1016/S1388-1981(00)00137-2

14. Crick DC, Suders J, Kluthe CM, et al (1995) Selective inhibition of cholesterol biosynthesis in brain cells by squalastatin 1. *J Neurochem* 65:1365–73.
15. Kitareewan S, Burka LT, Tomer KB, et al (1996) Phytol metabolites are circulating dietary factors that activate the nuclear receptor RXR. *Mol Biol Cell* 7:1153–66.
16. Lemotte PK, Keidel S, Apfel CM (1996) Phytanic acid is a retinoid X receptor ligand. *Eur J Biochem* 236:328–33.
17. Zhao S, Li R, Li Y, et al (2012) Roles of vitamin A status and retinoids in glucose and fatty acid metabolism. *Biochem Cell Biol* 90:142–152. doi: 10.1139/o11-079
18. Tang K, Cao L, Fan S, et al (2008) [Effect of all-trans-retinoic acid on C6 glioma cell proliferation and differentiation]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 33:892–7.
19. Karsy M, Albert L, Murali R, Jhanwar-Uniyal M (2014) The impact of arsenic trioxide and all-trans retinoic acid on p53 R273H-codon mutant glioblastoma. *Tumour Biol* 35:4567–80. doi: 10.1007/s13277-013-1601-6
20. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D (1997) Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69:581–93.
21. Krysko D V., Berghe T Vanden, Parthoens E, et al (2008) Chapter 16 Methods for Distinguishing Apoptotic from Necrotic Cells and Measuring Their Clearance. pp 307–341
22. Zembruski NCL, Stache V, Haefeli WE, Weiss J (2012) 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Anal Biochem* 429:79–81. doi: 10.1016/j.ab.2012.07.005
23. Ignarro RS, Facchini G, Vieira AS, et al (2016) Sulfasalazine intensifies temozolomide cytotoxicity in human glioblastoma cells. *Mol Cell Biochem* 418:167–78. doi: 10.1007/s11010-016-2742-x
24. Mitchener JS, Shelburne JD, Bradford WD, Hawkins HK (1976) Cellular autophagocytosis induced by deprivation of serum and amino acids in HeLa cells. *Am J Pathol* 83:485–492.
25. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–5.
26. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350–4.
27. Vieira AS, Rezende ACS, Grigoletto J, et al (2009) Ciliary neurotrophic factor infused intracerebroventricularly shows reduced catabolic effects when linked to the TAT protein

- transduction domain. *J Neurochem* 110:1557–1566. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06259.x
28. Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, et al (2010) Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem* 401:318–320. doi: 10.1016/j.ab.2010.02.036
 29. Ignarro RS, Vieira AS, Sartori CR, et al (2013) JAK2 inhibition is neuroprotective and reduces astrogliosis after quinolinic acid striatal lesion in adult mice. *J Chem Neuroanat* 48–49:14–22. doi: 10.1016/j.jchemneu.2013.02.005
 30. Liang C, Yang L, Guo S (2015) All-trans retinoic acid inhibits migration, invasion and proliferation, and promotes apoptosis in glioma cells *in vitro*. *Oncol Lett* 9:2833–2838. doi: 10.3892/ol.2015.3120
 31. Guo D, Prins RM, Dang J, et al (2009) EGFR Signaling Through an Akt-SREBP-1-Dependent, Rapamycin-Resistant Pathway Sensitizes Glioblastomas to Antilipogenic Therapy. *Sci Signal* 2:ra82-ra82. doi: 10.1126/scisignal.2000446
 32. Guo D, Bell EEH, Chakravarti A (2013) Lipid metabolism emerges as a promising target for malignant glioma therapy. *CNS Oncol* 2:289–299. doi: 10.2217/cns.13.20.Lipid
 33. Geng F, Cheng X, Wu X, et al (2016) Inhibition of SOAT1 Suppresses Glioblastoma Growth via Blocking SREBP-1-Mediated Lipogenesis. *Clin Cancer Res* 22:5337–5348. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2973
 34. Venneti S, Thompson CB (2017) Metabolic Reprogramming in Brain Tumors. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 12:515–545. doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044329
 35. Allen M, Bjerke M, Edlund H, et al (2016) Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. *Sci Transl Med* 8:354re3-354re3. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf6853
 36. Kiseleva LN, Kartashev A V., Vartanyan NL, et al (2016) A172 and T98G cell lines characteristics. *Cell tissue biol* 10:341–348. doi: 10.1134/S1990519X16050072
 37. Tao B-B, He H, Shi X, et al (2013) Up-regulation of USP2a and FASN in gliomas correlates strongly with glioma grade. *J Clin Neurosci* 20:717–20. doi: 10.1016/j.jocn.2012.03.050
 38. Yasumoto Y, Miyazaki H, Vaidyan LK, et al (2016) Inhibition of Fatty Acid Synthase Decreases Expression of Stemness Markers in Glioma Stem Cells. *PLoS One* 11:e0147717. doi: 10.1371/journal.pone.0147717
 39. Flavin R, Peluso S, Nguyen PL, Loda M (2010) Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Futur Oncol* 6:551–562. doi: 10.2217/fon.10.11
 40. Fukuma Y, Matsui H, Koike H, et al (2012) Role of squalene synthase in prostate cancer risk

- and the biological aggressiveness of human prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 15:339–345. doi: 10.1038/pcan.2012.14
41. Zhang F, Dai X, Wang Y (2012) 5-Aza-2'-deoxycytidine Induced Growth Inhibition of Leukemia Cells through Modulating Endogenous Cholesterol Biosynthesis. *Mol Cell Proteomics* 11:M111.016915-M111.016915. doi: 10.1074/mcp.M111.016915
 42. Yang Y-F, Jan Y-H, Liu Y-P, et al (2014) Squalene Synthase Induces Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Enrichment in Lipid Rafts to Promote Lung Cancer Metastasis. *Am J Respir Crit Care Med* 190:675–687. doi: 10.1164/rccm.201404-0714OC
 43. Jayashree BS, Nigam S, Pai A, et al (2015) Targets in anticancer research--A review. *Indian J Exp Biol* 53:489–507.
 44. Bendich A, Langseth L (1989) Safety of vitamin A. *Am J Clin Nutr* 49:358–71.

Figure Captions

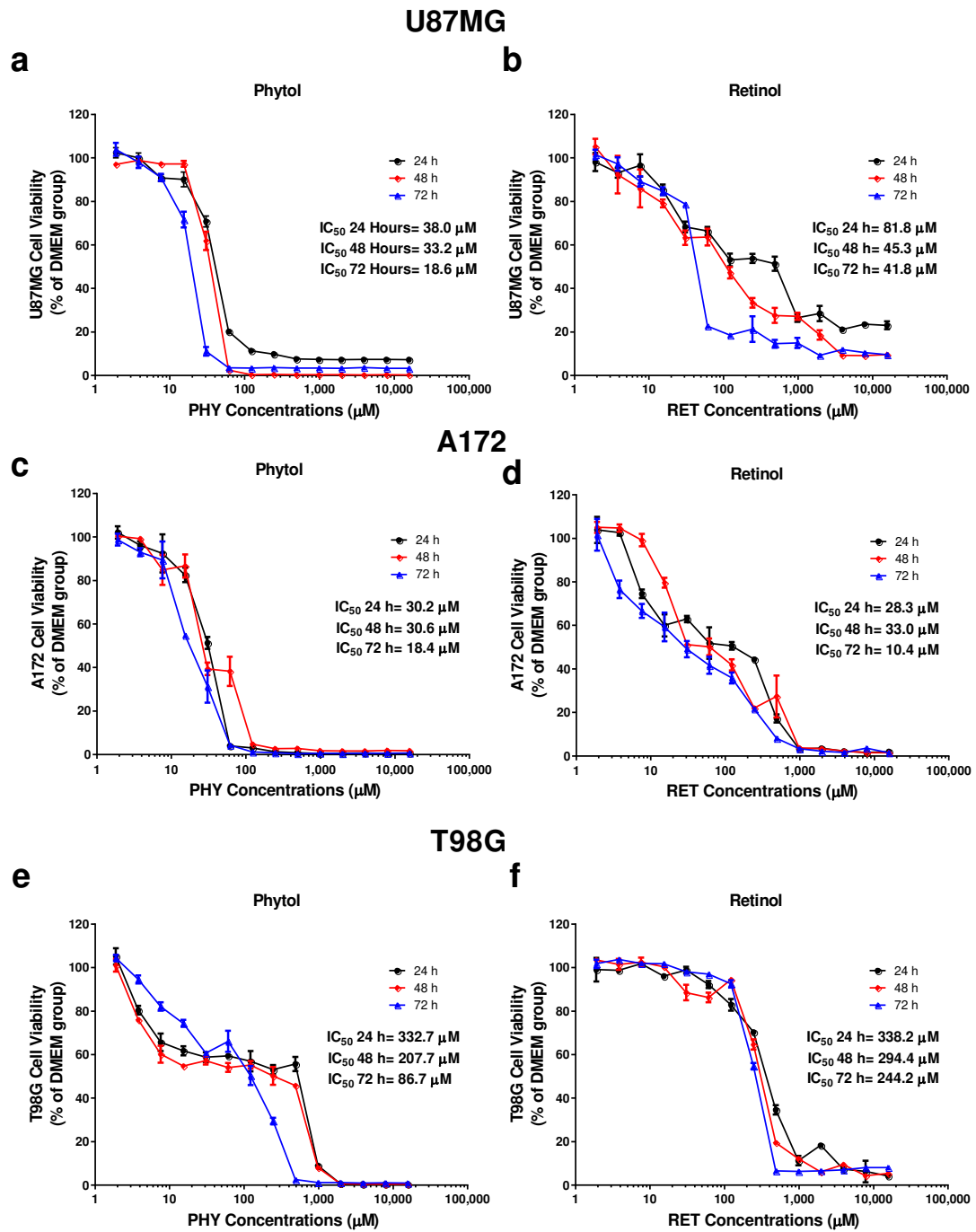


Fig. 1 a-f Effects of phytol (PHY) and retinol (RET) on the cell viability of human glioblastoma lineages U87MG (a, b), A172 (c, d) and T98G (e, f) after 24, 48 and 72 hours. A dose-response curve (presented here in logarithmic scale and showing 14 of the 18 tested concentrations) was created to identify the half maximal inhibitory concentration (IC_{50} ; values shown on the right in each graph). Values expressed as the relative percentage to the DMEM group (cells exposed only to supplemented culture medium) and represent the mean \pm standard error of the mean of three independent experiments performed in triplicate.

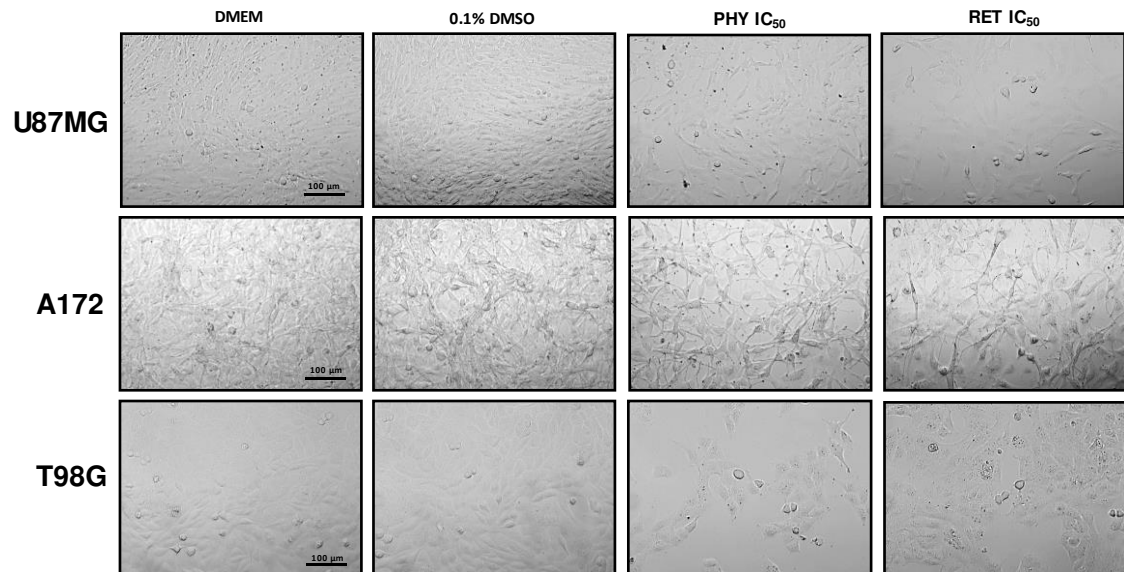


Fig. 2 Morphological features of human glioblastoma cells U87MG, A172 and T98G after treatment with PHY IC₅₀ or RET IC₅₀ for 72 hours. Cells exposed to supplemented medium only (DMEM) or medium containing 0.1% DMSO showed high confluence. Cells treated with PHY IC₅₀ or RET IC₅₀ showed a lower density and processes with a gradual reduction in the caliber toward the distal projections. Scale bar: 100 μ m (applies to all pictures).

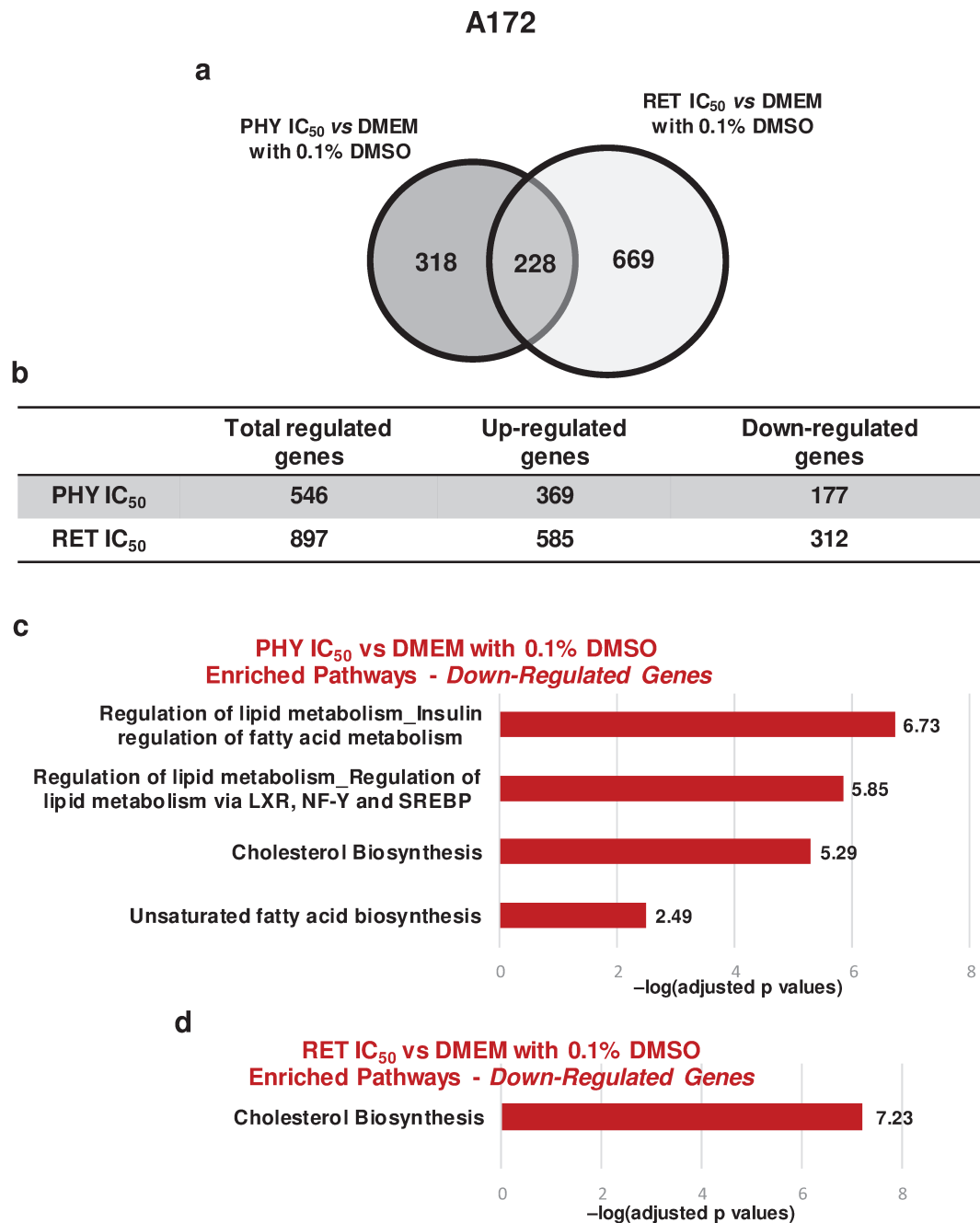


Fig. 3 a Venn diagram showing differentially expressed genes in each experimental condition compared with the DMEM containing 0.1% DMSO group. PHY IC₅₀ and RET IC₅₀ showed 546 and 897 differentially expressed genes, respectively. A total of 228 genes were common to both groups, while 318 and 669 were exclusive to PHY IC₅₀ and RET IC₅₀, respectively. **b** Table displaying the number of up- or down-regulated genes, considering the total of differentially expressed genes. **c, d** Graphs showing enriched pathways that contain down-regulated genes of the cholesterol and/or fatty acid metabolism pathways represented in the Venn diagram after treatment with PHY IC₅₀ or RET IC₅₀ for 72 hours. The x-axis presents values corresponding to $-\log(\text{adjusted } p \text{ values})$. Enriched pathways associated with values higher than $-\log(0.05) = 1.30$ were considered statistically significant. Additional data on enriched pathways and individual gene modulation are presented in Online Resource 1.

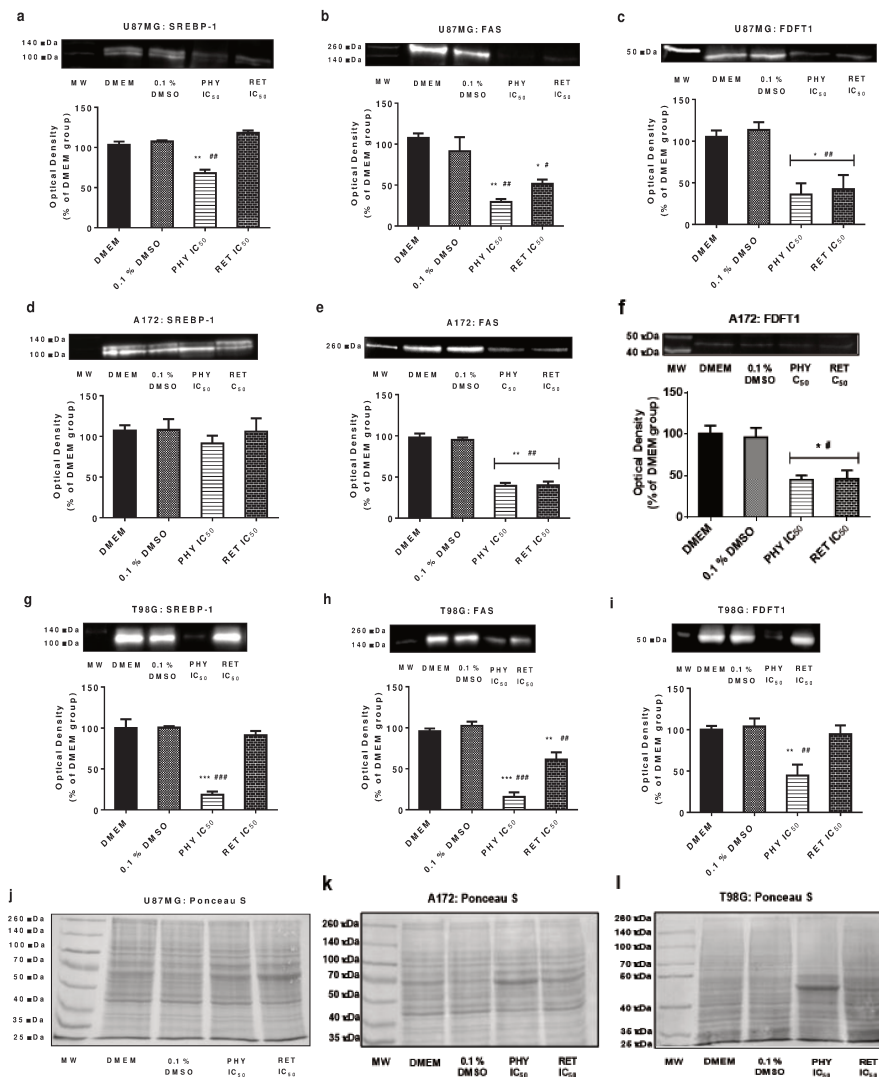
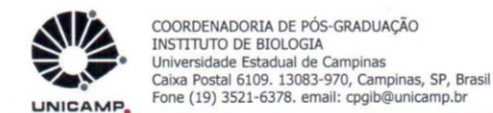


Figure 4. Western Blot analyses of cholesterol and/or fatty acid metabolism-related proteins sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1), fatty acid synthase (FAS) and farnesyl-diphosphate farnesyltransferase (FDFT1). Protein levels in cells treated with PHY IC₅₀ or RET IC₅₀ compared with cells cultured in supplemented medium only (DMEM; considered 100%) or DMEM containing 0.1% DMSO (0.1% DMSO). **a, d, g** PHY IC₅₀ significantly reduced SREBP-1 expression in U87MG and T98G lineages. No lineage treated with RET IC₅₀ showed changes in SREBP-1 levels. **b, e, h** PHY IC₅₀ and RET IC₅₀ significantly reduced FAS synthesis in U87MG, A172 and T98G lineages. **c, f, i** PHY IC₅₀ significantly decreased FDFT1 expression in U87MG, A172 and T98G cells lines. RET IC₅₀ significantly reduced FDFT-1 expression in only U87MG and A172 lineages. **j, k, l** Membranes stained with Ponceau S to show total protein content for each group. The ratio between the optical density (OD) of each target protein band and the OD corresponding to all protein bands (whole lane in Ponceau S stained membranes) was calculated. Data were analyzed using one-way ANOVA, followed by Bonferroni test for multiple comparisons; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs DMEM; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs 0.1% DMSO.

Online Resource 1. Gene expression data in human glioblastoma A172 cells after 72 hours of treatment with PHY IC₅₀ or RET IC₅₀. Columns in Tables 1-2 show gene symbols, log2fold changes relative to DMEM with 0.1% DMSO treated cells, p-values and adjusted p-values. Tables 3-6 contain enriched pathways for up- and down-regulated genes for each group.

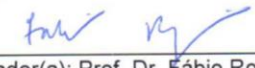
9. ANEXO I – Declaração de bioética e biossegurança



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "*Estudo da administração de fitol e retinol sobre linhagens celulares humanas de glioblastoma*", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: 
Nome do(a) aluno(a): Gustavo Facchini

Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): Prof. Dr. Fábio Rogério

Data: 26 de Janeiro de 2018

10. ANEXO II – Declaração de direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Estudo da administração de fitol e retinol sobre linhagens celulares humanas de glioblastoma**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 26 de Janeiro de 2018

Assinatura :

Nome do(a) autor(a): **Gustavo Facchini**

RG n.º 33.411.258-8

Assinatura :

Nome do(a) orientador(a): **Prof. Dr. Fábio Rogério**

RG n.º 22.155.011-2