

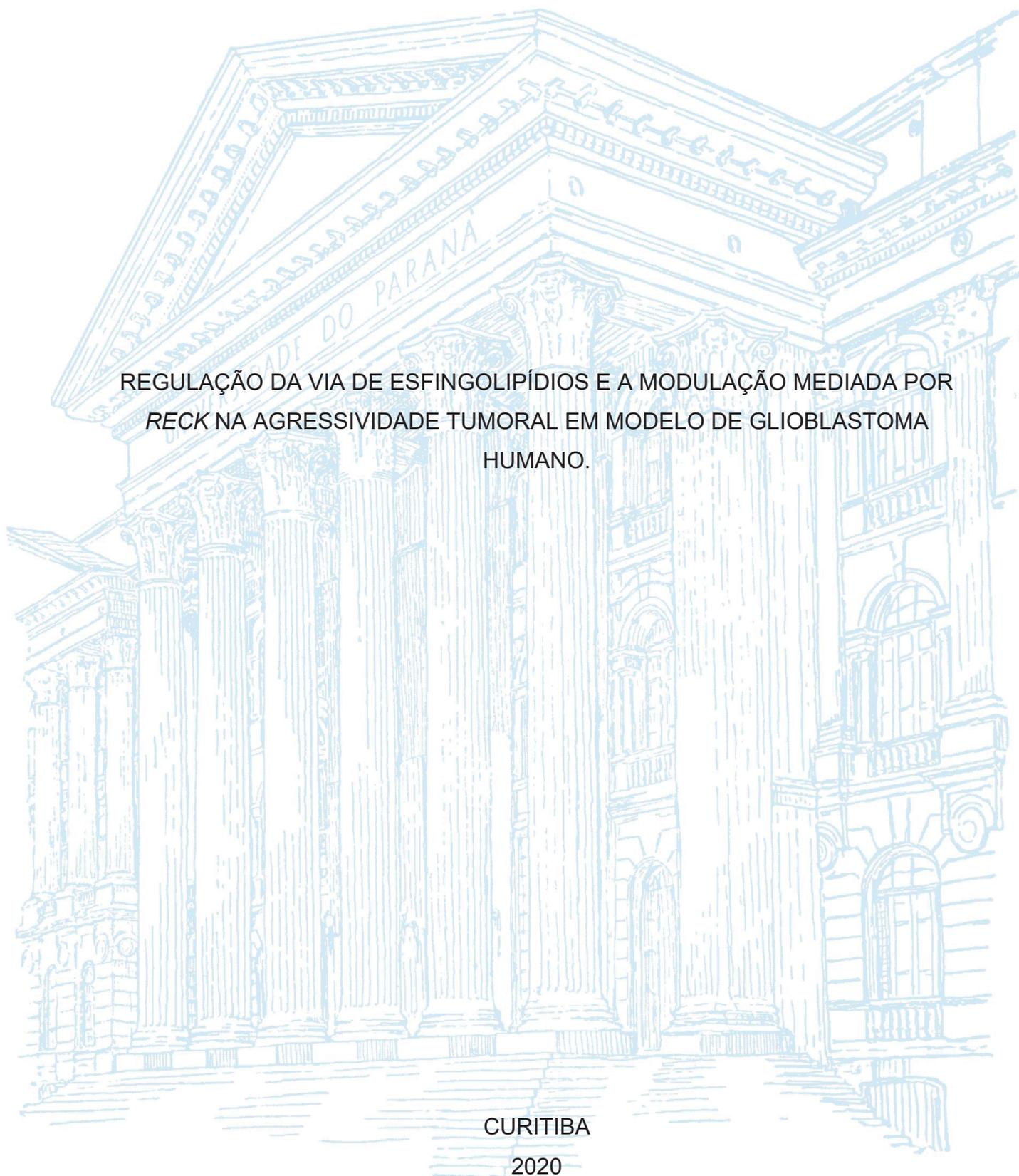
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HENRIQUE TABORDA RIBAS

REGULAÇÃO DA VIA DE ESFINGOLIPÍDIOS E A MODULAÇÃO MEDIADA POR  
RECK NA AGRESSIVIDADE TUMORAL EM MODELO DE GLIOBLASTOMA  
HUMANO.

CURITIBA

2020



HENNRIQUE TABORDA RIBAS

REGULAÇÃO DA VIA DE ESFINGOLIPÍDIOS E A MODULAÇÃO MEDIADA POR  
RECK NA AGRESSIVIDADE TUMORAL EM MODELO DE GLIOBLASTOMA  
HUMANO.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Sheila M. B. Winnischofer

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Ribas, Henrique Taborda  
Regulação da via de esfingolipídios e a modulação mediada por *RECK*  
na agressividade tumoral em modelo de glioblastoma humano. / Henrique  
Taborda Ribas. – Curitiba, 2020.  
75 p.: il.

Orientadora: Sheila M. B. Winnischofer  
Coorientador: Guilherme Lanzi Sasaki  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências –  
Bioquímica.

1. Glioma. 2. Esfingolipídeos. 3. Temozolomida. 4. Resistência a  
medicamentos. I. Título. II. Winnischofer, Sheila Maria Brochado, 1978-. III.  
Sasaki, Guilherme Lanzi, 1975-. IV. Universidade Federal do Paraná.  
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências –  
Bioquímica.

CDD (22. ed.) 616.9948



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de HENRIQUE TABORDA RIBAS intitulada: **Regulação da via de esfingolipídeos e a modulação mediada por RECK na agressividade tumoral em modelo de glioblastoma humano, sob orientação da Profa. Dra. SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER**, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 25 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica

25/03/2020 14:07:00.0

SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

25/03/2020 16:21:32.0

ADRIANA FROHLICH MERCADANTE

Avallador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

25/03/2020 14:23:13.0

GLAUCIA REGINA MARTINEZ

Avallador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico este trabalho à natureza e sua complexidade, sem ela não seríamos tão curiosos.

## AGRADECIMENTOS

Somos indivíduos, que do latim INDIVIDUUS, significa algo que não pode ser dividido, portanto, somos únicos em nossa existência. Tudo que um determinado indivíduo faz ou deixa de fazer é de total e exclusiva responsabilidade individual deste, portanto, não se pode dividi-la. Somos nós, indivíduos, os únicos responsáveis por nossos atos. Assim, o indivíduo é o ser que tem o total controle e liberdade de pensar e agir.

Porém por mais indivíduo que sejamos não estamos sozinhos em nossa existência. É certo que ninguém pode agir ou pensar por outra pessoa, mas as pessoas que vivem perto de nós, pessoas que escolhemos viver perto de nós e pessoas que escolhemos ouvir influenciam e muito nossas ações e nossos pensamentos. São para essas pessoas quem eu dedico esses agradecimentos.

À minha família, a base de minha existência, que sempre me deu suporte e acredita nos meus sonhos.

À minha orientadora Dra. Sheila M. B. Winnischofer e meu coorientador Dr. Guilherme Lanzi Sasaki pelo total apoio e confiança, e ainda pela liberdade que me deram no desenvolvimento e andamento do projeto

Ao Dr. Arquimedes Paixão de Santana Filho, por todo apoio e auxílio nos experimentos.

À banca, professora Dra. Glaucia Regina Martinez e Dra. Adriana Frohlich Mercadante por examinar este trabalho. É um privilégio e uma honra ser avaliado por profissionais de grande competência.

A todos de qualquer forma estiveram envolvidos no desenvolvimento deste trabalho. Colegas de laboratório e técnicos que me auxiliaram desde pequenos problemas até em trabalhosos experimentos e sempre me apoiaram e me incentivaram, e ainda, tornaram o ambiente de trabalho um ambiente muito agradável.

We must never, therefore, let ourselves fall into the way of thinking “ignorabimus” (“We shall never know”), but must have every confidence that the day will dawn when even those processes of life which are still a puzzle today will cease to be inaccessible to us natural scientists

(Eduard Buchner, 197, p. 119)

## RESUMO

Por afetar predominantemente células vitais para a homeostase neurológica, tumores do sistema nervoso central são os mais agressivos e com os piores prognósticos. Os gliomas de alto grau ou glioblastomas (GBM) apresentam uma heterogeneidade que levam a adquirir resistência aos tratamentos convencionais. Apesar do avanço no entendimento da biologia dos gliomas, as terapias atuais são ainda bastante ineficientes e a busca por alvos moleculares mais específicos tem ganhado destaque visando novos tratamentos. Considerando que lipídios tem um papel importante não só estrutural e energético, mas também na sinalização celular; e considerando que os esfingolipídios têm mostrado um papel importante na biologia do câncer, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o envolvimento desses lipídeos no contexto de gliomas. Foi avaliado o envolvimento desses lipídios na progressão de estágio tumoral, em fenótipos de agressividade e resistência a temozolomida (TMZ). Para essa finalidade, foram utilizados dados públicos de paciente (TCGA) e linhagens de glioblastoma humano com diferentes fenótipos de agressividade e resposta à TMZ. Ainda, considerando que a proteína supressora de tumor RECK presente em regiões enriquecidas com colesterol-esfingolipídios na membrana; que seus transcritos alternativos são diferencialmente expressos em gliomas, e considerando que seu papel principal é a modulação da matriz extracelular, um papel também realizado por determinados esfingolipídios, buscou-se esclarecer a relação bioquímica entre essas biomoléculas. Para isso utilizou-se de linhagens U87MG que superexpressa a forma canônica de *RECK*, assim como o transcrito alternativo *RECK* variante 3, e dados de TCGA. Demostramos que a expressão de enzimas da via de esfingolipídios é diferencialmente modulada na progressão do grau de glioma e na agressividade de GBM. Para a progressão tumoral é interessante um ganho da expressão de genes que sugerem um aumento de ceramidas de cadeia lateral muito longa, esfingosina-1-fosfato e derivados de gangliosídios; enquanto, para agressividade de GBM seria interessante um aumento de ceramidas de cadeia lateral muito longa, porém, uma redução de esfingosina-1-fosfato e derivados de gangliosídios. Ainda podemos sugerir que a redução de esfingomielinas pela ação da esfingomielinase SMPD1 pode apresentar um papel relacionado com progressão tumoral, agressividade e resistência a TMZ em gliomas. O aumento da expressão de genes que sugerem um maior aumento de ceramidas de cadeia lateral muito longa e esfingosina-1-fosfato também se demonstraram interessante para a resistência à TMZ. Por ser um regulador da síntese de lipídios a expressão de *ERLIN1* também foi avaliada. Podemos demonstrar que a expressão de *ERLIN1* está relacionada com progressão tumoral e resistência à TMZ. Além disso, a expressão de *ERLIN1* apresentou uma relação positiva com a expressão do gene *RECK*. Por fim, a superexpressão de *RECK* em células de glioblastoma humano (U87MG) foi capaz de inibir a expressão de *SPHK1*, propondo um novo papel de supressão tumoral mediado por *RECK*.

Palavras-chave: Glioma 1. Esfingolipídios 2. Temozolomida 3. *RECK* 4. Agressividade 5. Resistência

## ABSTRACT

By affecting predominately vital cells important to neurological balance, central nervous system tumors are the most aggressive and with the worse prognosis. High grade gliomas or glioblastomas (GBM) eventually acquire resistance to treatments since they exhibit a high heterogeneity. Besides some advances in the understanding of the glioma's biology have been made, the current therapies are still inefficient and the seeking for more specific targets is promising for new treatments. Considering that lipids plays an important role not only structural and energetic, but also in cell signaling; furthermore, considering the role of sphingolipids in cancer biology, this work aimed to evaluate how those lipids are related in the context of glioma. It was evaluated those lipids in tumoral stage progression, aggressiveness phenotypes and temozolomide (TMZ) resistance by using public data (TCGA) and the glioblastoma cell lines with different aggressiveness phenotypes and TMZ response. Moreover, considering that the tumor suppressor protein RECK is within cholesterol-sphingolipids membrane microdomains; considering that its splicing variants are differential express in gliomas; and considering that RECK plays a role in matrix extracellular modeling, a role also played by sphingolipids, this work seized to clarify the biochemistry relation between those molecules. For this end, U87MG cell lineage overexpressing RECK or its splicing variant RECK variant 3, and TCGA data were used. We have shown that expression of enzymes related to sphingolipid pathway is modulated according to the glioma grade and GBM aggressiveness. It is interesting for glioma progression, a gain of expression of genes that suggest an increasing of very long chain ceramides, sphingosine-1-phosphate and gangliosides; although, for GBM aggressiveness would be interesting an increasing of very long chain ceramides; however, a decreasing of sphingosine-1-phosphate and gangliosides. Furthermore, we would suggest that a decreasing of sphingomyelins by SMPD1 activity would play a role in glioma grade progression, aggressiveness and TMZ resistance. The increasing of genes that suggest a gain of very long chain ceramides and sphingosine-1-phosphate have shown to be important for TMZ resistance. Since ERLIN1 is a lipid metabolism modulator, its gene expression was also evaluated. We have shown that ERLIN1 expression is related to glioma grade progression and TMZ resistance. Furthermore, the *ERLIN1* expression has a positive correlation with *RECK* expression in GBM. Finally, *RECK* was capable to modulate *SPHK1* expression which proposes a new role in tumor suppression mediated by *RECK*.

Keywords: Glioma 1. Sphingolipids 2. Temozolomide 3. *RECK* 4. Aggressiveness 5. Resistance

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CONVERSÃO DE TMZ EM MTIC .....	21
FIGURA 2 – ESTRURA GERAL DE EFINGOLIPÍDIOS .....	23
FIGURA 3– VIA DE ESFINGOLIPÍDIOS .....	24
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DOS TRANSCRITOS ALETERNATIVOS DO GENE RECK .....	29
FIGURA 5 – ÍNDICE DE KARNOFSKY .....	31
FIGURA 6 – EXPRESSÃO DE CERAMIDAS SINTASES ( <i>LASS1</i> e <i>LASS2</i> ) NOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDADOS, LGG E GBM, E NOS SUBGRUPOS DE GBM, ALTA E BAIXA SOBREVIDA E PROGNÓSTICO .....	37
FIGURA 7 – EXPRESSÃO DA ESFINGOMIELINASE ( <i>SMPD1</i> ) NOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDADOS, LGG E GBM, E NOS SUBGRUPOS DE GBM, ALTA E BAIXA SOBREVIDA E PROGNÓSTICO .....	39
FIGURA 8 – EXPRESSÃO DAS ESFINGOSINAS QUINASES ( <i>SPHK1</i> E <i>SPHK2</i> ) .....	40
FIGURA 9 – EXPRESSÃO DA ENZIMA ENVOLVIDA NA DE SÍNTESE DE GANGLIOSÍDEOS ( <i>UCGC</i> ) .....	41
FIGURA 10 – EXPRESSÃO DO GENE <i>ERLIN1</i> .....	42
FIGURA 11 – EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DE ESFINGOLIPÍDIOS EM FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA .....	44
FIGURA 12 – CITOTOXICIDADE À TMZ .....	45
FIGURA 13 – CURVA DE PROLIFERAÇÃO DE LINHAGENS GBM .....	46
FIGURA 14 - CURVA DE PROLIFERAÇÃO DE LINHAGENS GBM COM E SEM TRATAMENTO COM TMZ .....	47
FIGURA 15 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DAS LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA .....	49
FIGURA 16 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DAS LINHAGENS U87MG E U87MG R .....	49
FIGURA 17 – MAPA DE DESLOCAMENTO QUÍMICO DE HSQC DA LINHAGEM A172 .....	50
FIGURA 18 – MAPA DE DESLOCAMENTO QUÍMICO DE HSQC DA LINHAGEM U87MG .....	51
FIGURA 19 – QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DAS FAMÍLIAS DE LIPÍDIOS .....	52

FIGURA 20 – EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE ESFINGOLIPÍDIOS.....	54
FIGURA 21 – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>GAMT</i> EM MODELO DE RESISTÊNCIA .....	55
FIGURA 22 – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>MGMT</i> EM MODELO DE GBM...	56
FIGURA 23 - EXPRESSÃO DE <i>RECK</i> (FORMA CANÔNICA E TRANSCRITOS ALTERNATIVOS) EM DIFERENTES GRAUS DE GLIOMA.....	57
FIGURA 24 - RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DE <i>RECK</i> COM <i>SMPD1</i> .....	57
FIGURA 25 - RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DE <i>RECK</i> COM <i>SPHK</i> . .....	58
FIGURA 26 - RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DE <i>RECK</i> COM <i>ERLIN1</i> . .....	58
FIGURA 27 - EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DE ESFINGOLIPÍDIOS NA SUPEREXPRESSÃO DE TRANSCRITOS DE <i>RECK</i> .....	59

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DAS LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA .....	32
TABELA 2 – PRIMERS UTILIZADOS PARA qt-PCR.....	35
TABELA 3 – GENES DA VIA DE ESFINGOLIPÍDIOS AVALIADOS .....	36
TABELA 4 – DESLOCAMENTO QUÍMICOS DOS PRINCIPAIS METABÓLICOS IDENTIFICADOS .....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

Cer	- Ceramida
DMEN	- Meio Dulbecco MEM
DMSO	- Dimetil Sufóxido
<i>ERLIN1</i>	- Temozolima
GBM	- Glioblastoma
LASS	- Ceramida Sintase
LGG	- Glioma de baixo Grau
GPI	- Glicosilfosfaditilinisotol
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
NIH	- National Institutes of Health
NPC2	- Proteína ligante ao Colesterol
<i>MGMT</i>	- Metilguanina Metiltransferase
MMP	- Metaloproteinase
MMR	- Reparo de mal pareamento do DNA
MTIC	- Monometil Triazenoimidazol Carboxamida
MTT	- brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
MSM	- Metilsulfonilmetano
<i>RECK</i>	- Proteína rica em cisteína, indutora de reversão, com motivos kazal
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
PBS	- Tampão Fosfato Salino
SFB	- Soro Fetal Bovino
SPHK	- Esfingosina Quinase
<i>SMPD1</i>	- Esfingomielina fosfodiesterase
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
HSQC	- Correlação heteronuclear de quantum único
S1P	- Esfingosina-1-fosfato
SNC	- Sistema Nervoso Central
SM	- Esfingomielina
SMASE	- Esfingomielinase
SREBP	- Fator de Transcrição de ligação ao elemento regulador de esteroide
TCGA	- <i>The Cancer Genome Atlas</i>
TMZ	- Temozolima
UCGC	- Glucosiltransferase de Ceramida

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 OBJETIVOS .....	17
1.1.1 Objetivos específicos .....	17
1.2 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL .....	18
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
2.1 CELULAS DA GLIA .....	19
2.2 GLIOMA .....	19
2.3 TEMOZOLOMIDA E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA .....	20
2.4 LIPÍDIOS E CÂNCER .....	22
2.5 METALOPROTEASES DE MATRIZ EXTRACELULAR E RECK .....	28
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
3.1 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA .....	30
3.1.1 Expressão de enzimas chaves da via de esfingolipídios na agressividade e sobrevida de pacientes GBM .....	30
3.1.2 Expressão de enzimas chaves da via de esfingolipídios em relação à expressão de <i>MGMT</i> em pacientes com glioma .....	31
3.1.3 Expressão de enzimas chaves da via de esfingolipídios em relação à expressão de RECK e seus transcritos alternativos em pacientes GBM .....	32
3.2 CULTIVO CELULAR .....	32
3.2.1 Curva de proliferação .....	33
3.2.2 Ensaio de Citotoxicidade .....	33
3.3 LIPIDÔMICA .....	34
3.4 ENSAIOS DE EXPRESSÃO GÊNICA .....	35
<b>4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
4.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DE ESFINGOLIPÍDIOS EM MODELO DE GLIOMA HUMANO E SUA CORRELAÇÃO COM A AGRESSIVIDADE TUMORAL .....	36
4.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DE ESFINGOLIPÍDIOS EM MODELO DE GLIOMA HUMANO E SUA CORRELAÇÃO COM A RESISTÊNCIA TUMORAL .....	42
4.3 LIPIDÔMICA DAS LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA .....	47

4.4 AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DA VIA DE ESFINGOLIPÍDIOS MEDIADA POR <i>RECK</i>	56
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Tumores do sistema nervoso central (SNC) possuem uma baixa taxa de sobrevida em decorrência do órgão que é afetado (CHEN et al., 2013). Segundo o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH), a taxa de sobrevida em 5 anos de pacientes diagnosticado com cânceres cerebrais foi de aproximadamente 33%, entre 2008 a 2014, naquele país. No Brasil, a razão mortalidade/incidência para tumores que acometem o SNC é de 92 %. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), são estimados, no Brasil, 11.090 casos de neoplasia maligna com origem do SNC para o ano de 2020. Para o mesmo período, no Paraná estima-se 810 novos casos sendo 90 só na capital (INCA, 2020). Segundo dados mais recentes disponíveis, em Curitiba, no período entre 2000 a 2005, foram registrados 559 novos casos dessa neoplasia, o que representa 2,2 % das neoplasias malignas registradas na cidade (INCA, 2013).

O glioma tem uma progressão muito rápida e as terapias convencionais não são muitas vezes eficientes. Isso ocorre principalmente pela complexidade do microambiente tumoral e a capacidade do tumor em gerar resistência aos tratamentos (OSUKA; MEIR, 2017). Diferentes mecanismos de resistência aos tratamentos podem existir (HAAR et al., 2012), e aquele modulado pelo sistema de reparo ao DNA vem demonstrando uma importante relevância clínica, uma vez que a temozolomida (TMZ), um agente alquilante de DNA, é a droga padrão de escolha para o tratamento de glioblastoma (ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2011). Portanto, novas estratégias terapêuticas; como imunoterapia e terapia gênica, que visam atingir alvos mais específicos, como por exemplo biomoléculas relacionadas à metástase; são mais promissoras (RAJESH, 2017). A elucidação de mecanismos celulares e das biomoléculas envolvidas na patologia do câncer é de suma importância para que haja não só a compreensão do processo de doença, mas também para identificar alvos terapêuticos promissoras. O estudo da lipidômica tem um papel fundamental na elucidação do metabolismo celular em processos patológicos. Identificar e quantificar lipídios para esclarecer suas funções no contexto biológico que estão envolvidos são os principais objetivos dos estudos de lipidômica (SPENER, et al., 2003). Dentro do contexto de lipidômica, a via metabólica de esfingolipídios tem demonstrado grande importância. Essa via tem um papel importante na regulação de diversos processos celulares como crescimento celular, morte, senescência, adesão, migração e angiogênese (OGRETMEN, 2017).

Essa via demonstrou ser importante no processo de metástase por modular metaloproteases de matriz extracelular (MMPs) (FAN et al., 2015). As MMPs também são reguladas por uma proteína de membrana importante a proteína supressora de tumor RECK. Essa proteína demonstrou capacidade em inibir diferentes MMPs (OH et al., 2001; TAKAHASHI et al., 1998) .

Portanto, propõe-se investigar o papel da regulação da via de esfingolipídios na progressão, agressividade e resistência ao tratamento de glioblastoma humano. E, uma vez que a proteína supressora de tumor *RECK* apresenta um papel importante na modulação de MMPs, propõe-se, também, avaliar possíveis correlações entre a composição celular de esfingolipídios e a proteína *RECK*.

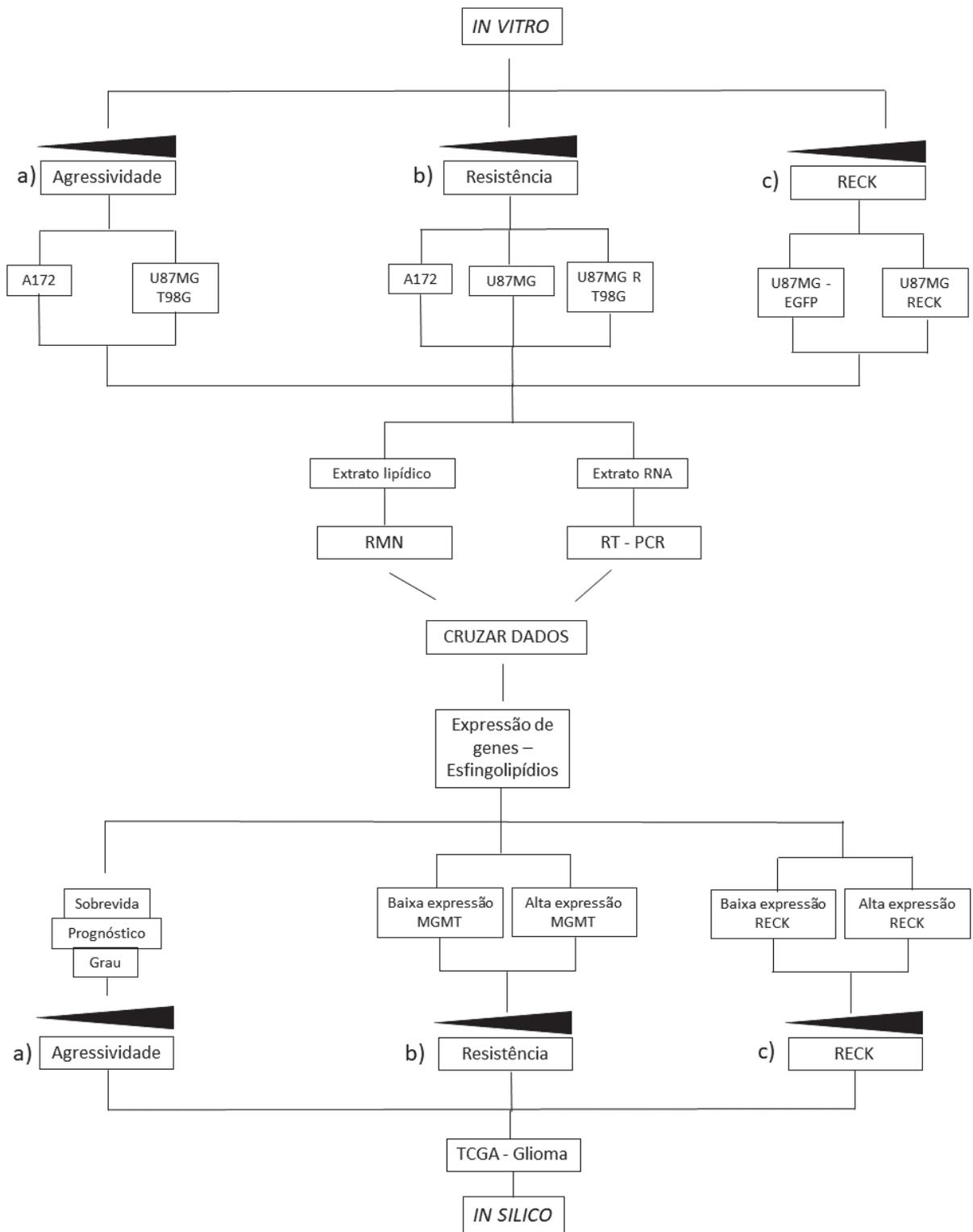
## 1.1 OBJETIVOS

Investigar a via de esfingolipídios em modelos tumorais de glioma humano com diferentes fenótipos de agressividade e resistência ao tratamento com Temozolomida e avaliar a relação da composição celular de esfingolipídios e a proteína *RECK* no âmbito do glioblastoma.

### 1.1.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar a relação da via de esfingolipídios em modelo de gliomas humanos com diferentes fenótipos de malignidade, prognóstico e sobrevida.
- b) Avaliar a relação da via de esfingolipídios em modelo de glioblastoma humano que apresentam responsividade distinta ao quimioterápico TMZ.
- c) Avaliar se a alta expressão de *RECK* e de sua isoforma alternativa de *splicing* (var 3) afetam a via de esfingolipídios.

## 1.2 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CELULAS DA GLIA

O sistema nervoso central é fundamental para o funcionamento do organismo, integra milhões de informações por minuto oriundas dos sistemas sensoriais determinando respostas a serem realizadas (GUYTON; HALL, 2016). A unidade funcional desse sistema é o neurônio, que é sustentado por aproximadamente 10 a 50 células da glia (SNYDER et al., 2018). Essas células desempenham um papel importante no sistema nervoso central e não só oferecem suporte aos neurônios, mas também promovem sua homeostase (EDGAR; NAVE 2009). Os astrócitos são o tipo celular da glia mais abundante e desempenham uma função fundamental no bom funcionamento neuronal e na manutenção da barreira hematoencefálica formando a conexão entre neurônios e vasos sanguíneos (HERNDON; TOME; DAVIS, 2017). Já oligodendrócitos tem um papel importante para a formação e manutenção da mielina que recobre as células neuronais e auxilia na transmissão dos impulsos nervosos (Snyder et al., 2018). Por fim, células ependimárias recobrem toda a superfície dos ventrículos promovendo a circulação do líquido cefalorraquidiano (ROBINSON; NOONE; O'DOWD, 1996). As células glias se originam na fase embrionária e continuam sendo geradas no parênquima cerebral adulto através de células progenitoras (RUSZNÁK et al., 2016). A origem de células da glia tumorais são relacionados com células progenitoras, uma vez que, eventos neoplásicos estão mais associados com células que apresentam capacidade proliferativa (SCHIFFER, 2006). O esclarecimento das vias que levam a diferenciação de células progenitoras e formação de células glias podem levar à melhor compreensão da formação e progressão de gliomas (LAUG; GLASGOW; DENEEN, 2018).

### 2.2 GLIOMA

Glioma é tipo de neoplasia cerebral primária mais comum e é originária de células progenitoras da glia que geralmente apresenta um mau prognóstico para o paciente (HANIF et al., 2017). A principal e mais antiga classificação de gliomas é de acordo com características histológicas que estratifica a doença em astrocitoma, oligodendogliomas e ependimomas e as classificam de acordo com grau de

malignidade (I a IV) (LAUG; GLASGOW; DENEEN, 2018). Gliomas de baixo grau (I e II) apresentam baixa taxa proliferativa, porém o de grau II é mais infiltrativo e pode progredir para glioma de alto grau. Já gliomas de grau III e IV (alto grau) apresentam características histopatológicas malignas (LOUIS et al., 2007). Contudo, o diagnóstico vem sendo cada vez mais determinado além dos limites histopatológicos e marcadores moleculares vem sendo cada vez mais introduzidos para auxiliar no diagnóstico, prognóstico, tratamento de acordo com a classificação feita pela organização mundial da saúde (OMS) (LOUIS et al., 2016).

O astrocitoma de grau IV, ou glioblastoma secundário (GBM), é o mais agressivo e apresenta, proliferação endotelial, necrose e alta densidade celular, que leva pacientes a terem uma taxa de sobrevida em média de 14 meses (WESTPHAL; LAMSZUS, 2011). Glioblastoma pode ser dividido em primário ou secundário, de acordo com características clínicas. Glioblastoma secundário progride a partir de astrocitomas de menores graus, enquanto que o primário se desenvolve diretamente a partir de células progenitoras da glia (HANIF et al., 2017).

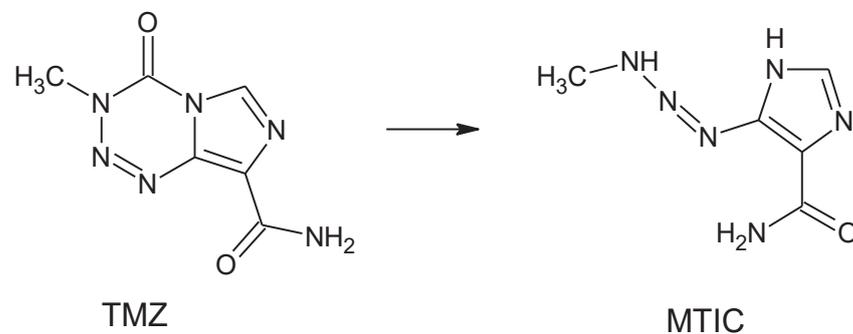
O tratamento de gliomas é escolhido de acordo com o diagnóstico histológico e molecular, sendo a cirurgia realizada tanto para fins de diagnósticos quanto de tratamento. Já radioterapia reduz o risco de recidiva e é determinada de acordo com parâmetros clínicos e prognósticos do paciente. Por fim, como parte da terapia padrão a quimioterapia é amplamente utilizada e deve ter seus efeitos tóxicos monitorados, tendo como principal droga de escolha a temozolomida (TMZ) (WELLER et al., 2017).

### 2.3 TEMOZOLOMIDA E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Temozolomida é derivado de imidazotetrazina com capacidade antitumoral após ser convertida espontaneamente à 3-metil-(triazen-1-il)-imidazol-4-carboxamida (MTIC) (STEVENS et al., 1987) (FIGURA 1). Estudos pré-clínicos demonstraram que a temozolomida apresenta eficácia não só para tratamento de glioma mas também para tumores como melanoma (NEWLANDS et al., 1992). O mecanismo citotóxico é dado por propriedades alquilantes do DNA, tendo a guanina como alvo principal, uma vez que, esse nucleotídeo é o que apresenta o potencial molecular mais eletronegativo. Na guanina, a metilação ocorre em maior proporção na posição N7 (N7-MeG, 70%), por ser o átomo mais eletronegativo, não obstante

na posição O6 também há metilação porém numa menor taxa (O6-MeG, 6%). Outro alvo alquilado, também em menor proporção, é o N3 da adenina (N3-MeA) (DENNY et al., 1994). O efeito citotóxico, e por conseguinte o efeito antitumoral exercido pela temozolomida é dado principalmente pela formação de O6-MeG (TISDALE, 1987). O erro no pareamento de bases ocorrido com O6-MeG/T induz o sistema de reparo MMR (*mismatching repair*) à contornar tal falha, porém a persistência de mal pareamento leva eventualmente à morte celular e citotoxicidade (DRABLØS et al., 2004). Considerando que o efeito citotóxico é dependente da atividade do sistema de reparo efetuado por MMR, o bom funcionamento desse sistema é fundamental para o tratamento com temozolomida. Além disso, O6-MeG pode sofrer demetilação pela ação de uma proteína de reparo direto a *MGMT* (SHARMA et al., 2009). Assim sendo, para que a temozolomida apresente uma boa resposta, MMR deve ser funcional e *MGMT* deve apresentar baixo grau de expressão (ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2011).

FIGURA 1 – CONVERSÃO DE TMZ EM MTIC



FONTE: O autor (2020). Conversão espontânea de TMZ à MTIC.

A baixa atividade de *MGMT* está frequentemente mais relacionada pela metilação do promotor de *MGMT*, que inibi a expressão desse gene. Apesar de que a perda do cromossomo 10, onde encontra-se o gene codificante, e mutações no próprio gene também resultam em baixa atividade desse gene. (ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2011). Em um estudo clínico elaborado por Blanc e colaboradores (2004), mais que 30 % dos pacientes diagnosticados com glioblastomas apresentaram o promotor de *MGMT* desmetilado (BLANC et al., 2004). Resistência ao tratamento com TMZ é ainda um desafio na clínica, e a inativação de sistema de reparos podem auxiliar o tratamento de drogas alquilantes

(MIDDLETON; MARGISON, 2003). Além disso, tumores sensíveis à quimioterapia podem eventualmente adquirir resistência devido a característica evolutiva e heterogênea dos tumores. Em modelo celular, por exemplo, foi descrito que o ganho de resistência à temozolomida por células de glioma previamente sensíveis, pode estar relacionada com o aumento da atividade de *MGMT* (ZHANG et al., 2010).

A resistência adquirida à temozolomida pode estar relacionada à uma característica bastante comum em glioblastomas que é a heterogeneidade. (FRIEDMANN-MORVINSKI, 2014). Tumores malignos apresentam uma alta complexidade genética devido a uma heterogeneidade genômica (FISHER, PUSZTAI E SWANTON, 2013). Essa variação gênica é explicada devido ao fenótipo mutatório que células tumorais apresentam. A aleatoriedade dessas mutações promove a diferenciação de células tumorais diferentes daquela que lhe deu origem, e assim, células mais adaptadas a um determinado microambiente tumoral são selecionadas, o que resulta em uma população heterogênea de células tumorais (LOEB, 2011). Essa heterogeneidade pode acarretar uma dificuldade na terapia e até em resistência à tratamentos devido a seleção e expansão de subclones pré-existentes ou por evolução de células resistentes (DAGOGO-JACK; SHAW, 2018).

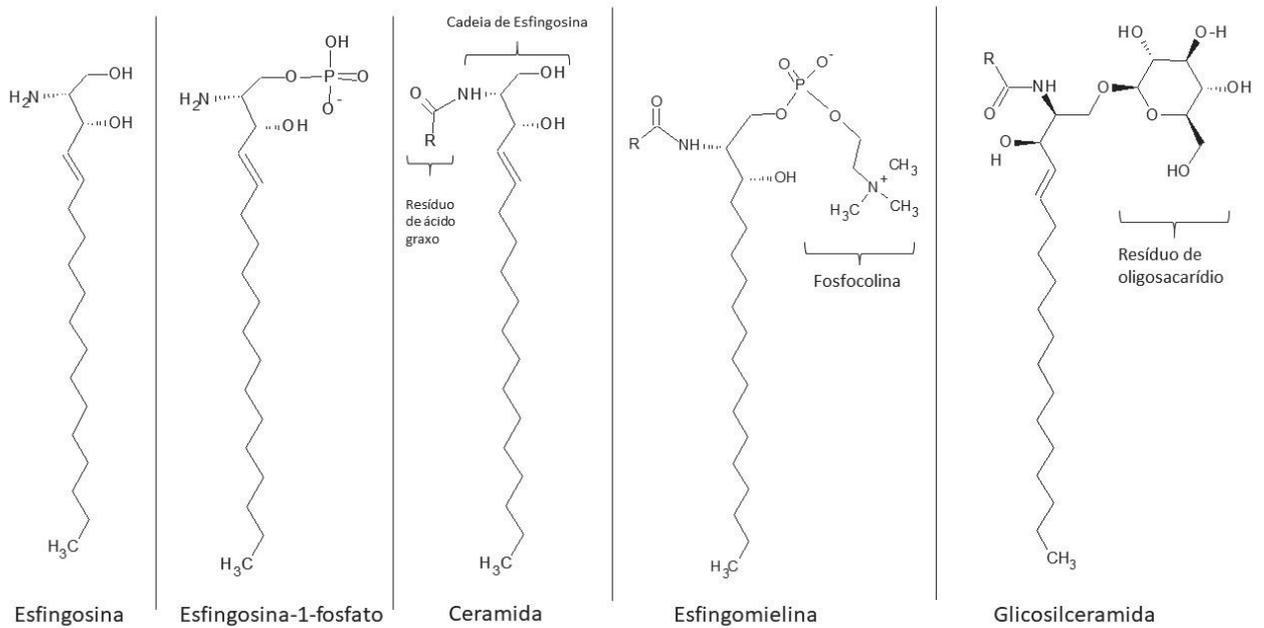
## 2.4 LIPÍDIOS E CÂNCER

Os lipídios compreendem uma classe de biomoléculas bastante diversificada quimicamente e funcionalmente. Têm funções estruturais como componente das membranas biológicas, assim como metabólicas sendo a principal forma de armazenamento de energia (NELSON; COX, 2008). A lipidômica é o estudo da identificação e quantificação de lipídios, assim como das suas funções no contexto biológico que envolve, além de suas funções bioquímicas, a expressão e regulação gênica de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico. A lipidômica vem cada vez mais sendo introduzida em novos estudos, e apresenta um papel importante na elucidação do metabolismo celular de determinadas doenças. (SPENER et al., 2003).

A composição lipídica das membranas influencia e regula a atividade proteínicas de membrana modulando assim a sinalização celular (LITMAN; MITCHELL, 1996). Uma classe desses lipídios, os esfingolipídios, têm um papel fundamental nessa regulação, e devido a sua complexidade e diversidade, exercem

também funções de sinalização celular (ERNST; BRÜGGER, 2014). A estrutura geral dos principais lipídios que compõem essa classe é ilustrada na Figura 2.

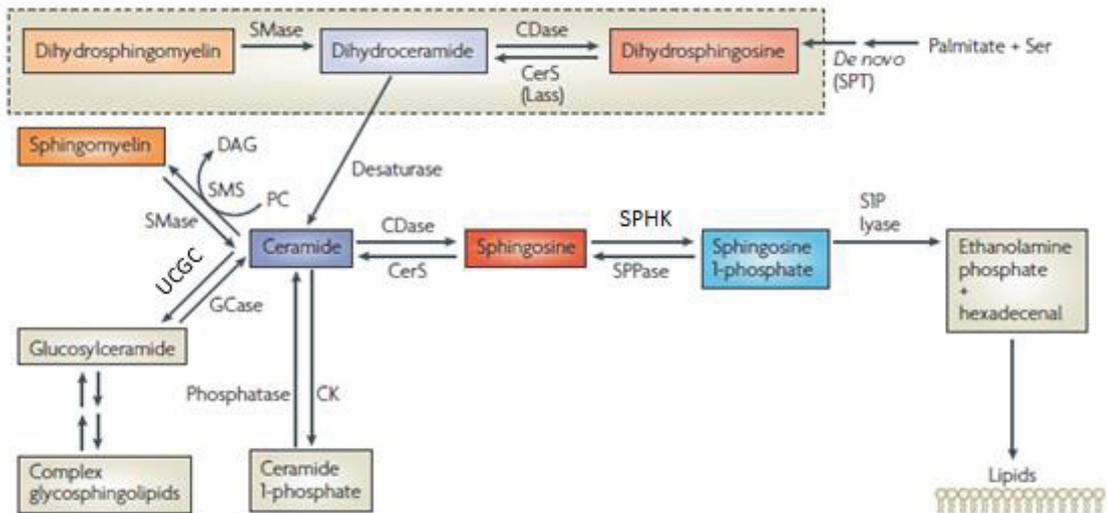
FIGURA 2 – ESTRURA GERAL DE EFINGOLIPÍDIOS



FONTE: O autor (2020). Estrutura geral dos principais esfingolipídios.

Diversas biomoléculas estão envolvidas na via de esfingolipídios, entre elas a ceramida, que vem sendo descrita como tendo papel importante na regulação de morte celular, progressão tumoral e resistência à quimioterapia (HANNUN; OBEID, 2008). A ceramida, a principal molécula da via, pode ser sintetizada por duas vias distintas, a via *e novo* ou pela via de “reaproveitamento”, conforme Figura 2. Sua formação pode aumentar por estímulos tanto extracelulares como intracelulares, sendo que níveis aumentados promovem efeitos antimitogênicos e apoptóticos (BARTKE; HANNUN, 2009).

FIGURA 3– VIA DE ESFINGOLIPÍDIOS



FONTE: Adaptado de HANNUN; OBEID, 2008 - A primeira reação da biossíntese de novo de esfingolipídeo é catalisada pela serina palmitoiltransferase (SPT), seguida pela reação catalisada pela ceramida sintase (LASS). Ceramida pode ser sintetizada pela conversão de esfingomielina pela ação de SMASEs (*SMPD1*). A partir da ceramida pode-se gerar diferentes espécies lipídicas com diferentes funções celulares. Pela ação da UGC a ceramida é convertida a gangliosídios. SPHK converte esfingosina à S1P.

Os níveis de ceramida são significativamente baixos em tumores cerebrais, e essa redução nos níveis está associada à progressão de malignidade de astrocitomas, assim como, está relacionada com pobre prognóstico (RIBONI et al., 2002).

Diversos quimioterápicos para tratamento de câncer são capazes de elevar os níveis de ceramida, tanto pela geração por via de novo como pela ação de esfingomielinases, que convertem a esfingomielina à ceramida (SMASEs)(FIGURA2) (OGRETMEN; HANNUN, 2001). O tratamento com ceramida de cadeia pequena (C2-Cer) foi capaz de induzir morte celular não apoptótica em células de glioblastoma humano (A172) (KIM et al., 2005). E o tratamento combinado com outra ceramida de cadeia curta (C6-Cer) e paclitaxel foi capaz de induzir a citotoxicidade em modelo celular de glioblastoma humano (DESAI; VYAS; AMIJI, 2008). Porém estudos de lipidômica demonstram que não é a simples redução global de todas as ceramidas que está envolvida com a tumorigênese, mas sim a modulação de níveis de alguns tipos de ceramidas (que variam de acordo com o tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo) (KARAHATAY et al., 2007). Um aumento no nível

ceramidas de cadeia carbônica longa está relacionada com o processo carcinogênico em câncer de mama (SCHIFFMANN et al., 2009).

O tamanho da cadeia das ceramidas depende da ação de diferentes isoformas da ceramida sintase (STIBAN; TIDHAR; FUTERMAN, 2010). Os níveis de ceramidas C16:0-Cer, C24:1-Cer e C24:0-Cer, relacionados com a isoforma LASS2, estão elevados em tecidos tumorais de mama quando comparado com tecido normal. Em modelo utilizando carcinoma de cólon e câncer de mama observou-se que a superexpressão de LASS4 e LASS6 leva a inibição da proliferação e indução de apoptose, já quando *LASS2* está superexpressa há o aumento de proliferação celular (HARTMANN et al., 2012).

Os esfingolipídios também demonstram um papel importante na indução de autofagia, que é um processo intracelular com um papel importante na biologia do câncer (YOUNG; KESTER; WANG, 2013; YUN; LEE, 2018). A C2-ceramida, é capaz de induzir autofagia letal em células de glioblastoma humano (DAIDO et al., 2004). Tratamento com ceramida exógena (C2-cer) eleva os níveis de expressão de Beclin1 induzindo a autofagia, o qual é revertido pelo a inibição da ceramida sintase (SCARLATTI et al., 2004). Tanto a administração de ceramida C-18 exógena quanto a expressão de *LASS1* aumentada induz autofagia letal por induzir mitofagia. Isso ocorre porque *LASS1/C18* induz a lipidação de LC3B- PE formando LC3B-II, que por sua vez ao ligar-se em ceramidas na membrana da mitocôndria induz o autofagolisossomo a promover mitofagia (SENTELLE et al., 2012).

A autofagia também pode ser regulada pela expressão da esfingomielina sintase (SMS), uma enzima importante para a síntese de esfingomielina a partir de ceramida (Figura 2) (TANIGUCHI; OKAZAKI, 2014). A ativação de esfingomielina sintase proporciona morte celular em células de glioma resistentes à apoptose (BARCELÓ-COBLIJN et al., 2011). A mesma ativação demonstrou a restauração de lipídios de membrana a níveis encontrados em células normais resultando em morte autofágica de glioblastomas (TERÉS et al., 2012). Já a degradação de esfingomielinas (SM) é realizado por esfingomielinases (SMASEs) que convertem esses esfingolipídios à ceramida. A inibição de SMASEs é capaz de promover a redução do crescimento tumoral e reversão da resistência à drogas (BECKMANN et al., 2014). Esse efeito pode ser explicado pelo fato de inibidores de SMASEs promoverem modulação da membrana celular o que leva a depleção de fosfatidilserina e colesterol da membrana plasmática, isso leva a remoção da

proteína oncogênica RAS da membrana e inibe sua atividade (VAN DER HOEVEN et al., 2017). Apesar de que o aumento de esfingomielinas (SM) pode promover efeitos antitumorais, o aumento no nível de esfingomielinases (SMASEs) em modelo de células tumorais inibe o crescimento celular por promover acúmulo de ceramidas, o que aponta uma papel na regulação de esfingomielinas na proliferação celular (TAFESSE et al., 2007). Essas contradições ressaltam que uma melhor compreensão do papel de esfingomielinases na biologia tumoral se faz necessária, de forma que uma investigação mais completa de como a atividade dessa enzima impacta os níveis de esfingolipídios é importante.

Um outro esfingolipídio que apresenta um papel importante em tumores é a esfingosina-1-fosfato (S1P), sua síntese é catalisada pela enzima esfingosina quinase SPHK1 e SPHK2 a partir da esfingosina. A S1P têm efeitos opostos daqueles mediados pela ceramida (SNIDER; GANDY; OBEID, 2010). Esse esfingolipídio funciona como um mensageiro primário ou secundário quando estimulado em resposta ao interferon e fator de necrose tumoral (FYRST; SABA, 2010); e são externalizado da célula pelo transportador ABCC1 e ABCA1 (KIM et al., 2009) para ligar-se aos receptores S1P1-S1P5 e gerar efeitos mitogênicos além de inibir a apoptose (MANDALA et al., 1998). Aumento dos níveis dessa biomolécula está relacionado com uma menor taxa de sobrevida em pacientes com glioblastoma (VAN BROCKLYN et al., 2005). Além dos níveis de S1P, a modulação dos receptores, S1P1-S1P5 em células tumorais também podem modular fenótipos de agressividade. Modelo utilizando células de glioma com superexpressão ou silenciamento dos genes que codificam para esses receptores demonstrou que o aumento dos níveis do receptor S1P2 leva a um aumento na capacidade de invasão. Enquanto que a isoforma S1P5 foi relacionada com efeito antiproliferativo (YOUNG; VAN BROCKLYN, 2007). O tratamento com inibidor de esfingosina quinases (SPHKs) combinado com doses subletais de temozolomida promoveu morte celular de células de glioblastoma, mediada pelo acúmulo dos intermediários, dihidroesfingosina e dihidroceramida; resultado da autofagia e estresse de retículo endoplasmático observados (NOACK et al., 2014).

Ainda, metabólitos glicosilados de esfingolipídios (gangliosídeos) também demonstram importância na biologia do câncer. A glicosilceramida é formada pela ação da enzima *UGCG*, primeira etapa da biossíntese de gangliosídeos, e está relacionada com um fenótipo de resistência a drogas em modelos tumorais

(MORJANI et al., 2001). A nomenclatura oficial de glicoesfingolípídios é bastante complexa portanto, na literatura esses compostos são referidos por nome não oficiais, como por exemplo GM3. “G” refere-se a série dos gangliosídeos de acordo com o resíduo de sacarídeos na estrutura, a segunda letra refere-se a quantidade de ácidos sálicos presentes, e por fim, a numeração representa a ordem de migração na cromatografia de camada delgada (SCHNAAR RL, 2017). A composição de gangliosídeos foi relacionada com diferentes graus de malignidade de glioma e tempo de sobrevivência do paciente (SUNG et al., 1995). Altos níveis de gangliosídeos simples GM3 e GD3 em gliomas sugerem que estes podem estar envolvidos com a proliferação e a dediferenciação de gliomas de alto grau de malignidade (VON HOLST et al., 1997). Vale destacar que células tronco de glioblastoma apresentaram altos níveis de GD3 e GD3-sintase que suporta o papel desses gangliosídeos na tumorigênese de glioblastomas assim como potentes alvos de tratamento (YEH et al., 2016). É ainda interessante citar que a redução dos níveis de colesterol da membrana dos lisossomos favorece a degradação de gangliosídeos e o aumento da produção global de ceramida (KOLTER; SANDHOFF, 2005). A proteína transportadora de colesterol NPC2 tem um papel importante nessa degradação, essa proteína é estimulada a retirar colesterol dos endossomos, quando há formação de ceramida o que facilita ainda mais tal degradação (ENKAVI et al., 2017). A depleção de colesterol demonstrou também, capacidade de reduzir a formação de agregados de gangliosídeos na membrana (FUJITA et al., 2007). Esses dados sugerem que compostos capazes de alterar o conteúdo de colesterol das células possam modular a formação de ceramida podendo ter um benefício antitumoral. A regulação da biossíntese de colesterol e de lipídios é feita pelo fator de transcrição SREBP, que se mantém inativado e retido no retículo endoplasmático quando os níveis de colesterol são normais. Porém, quando esses níveis são reduzidos, SREBP é ativado e promove a transcrição de genes envolvidos na síntese de colesterol (SHIMANO; SATO, 2017). A proteína ERLIN, presente em *lipid rafts* de membrana do retículo endoplasmático, também é modulada pelo colesterol e tem a capacidade de inibir a atividade SREBP (BROWMAN et al., 2006; HUBER et al., 2013). O retículo endoplasmático tem um papel fundamental na via sintética de esfingolípídios, podendo controlar os níveis e a natureza desses lipídios. No câncer as vias de sinalização do retículo estão desreguladas e o perfil de esfingolípídios

relacionados com tumorigênese podem ser oriundas desta desregulação (KATO; NISHITOH, 2015).

Esfingolipídios, também, são capazes de regular a expressão e atividade de metaloproteases de matriz extracelular (MMPs), enzimas envolvidas no remodelamento da matriz extracelular e processo de invasão e metástase tumoral. Apesar que a *LASS2* apresentar efeitos pró-tumorais em câncer de mama, foi descrito que a superexpressão desse gene leva a redução da atividade de MMP2 e MMP9, e reduz a migração e invasão celular (FAN et al., 2015). Além disso, S1P foi capaz de regular a invasão de glioblastomas (YOUNG; PEARL; VAN BROCKLYN, 2009) e de aumentar a expressão de MMP-2 (WU et al., 2005).

## 2.5 METALOPROTEASES DE MATRIZ EXTRACELULAR E RECK

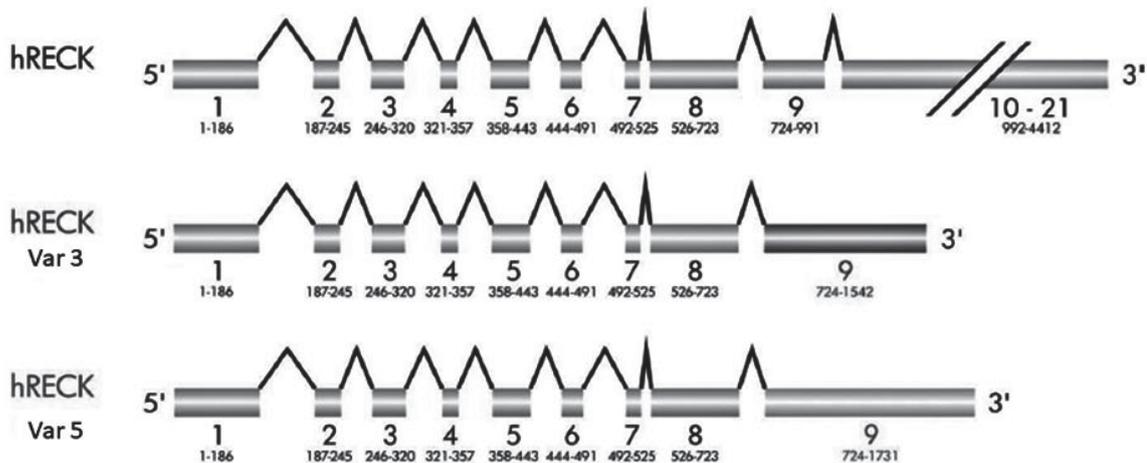
A proteína inibidora de metaloproteases de matriz extracelular (MMP) RECK, é encontrada na superfície extracelular, ancorada à membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI), (TAKAHASHI et al., 1998). O efeito inibitório de RECK sob as MMPs, mais especificamente a MMP 2, MMP9 e MT1-MMP, reduz a degradação de proteínas da matriz extracelular reduzindo a capacidade de invasão, migração e, portanto, a agressividade de tumores (OH et al., 2001; TAKAHASHI et al., 1998). Essa proteína encontra-se nas regiões de microdomínios funcionais da membrana plasmática, regiões enriquecidas com colesterol-esfingolipídios, e tal localização mostrou-se importante para que RECK exerça suas funções (MIKI et al., 2007). Além disso, a proteína RECK, quando superexpressa em modelos celulares, foi capaz de modificar o comportamento da superfície celular e com isso promover o aumento da quantidade de MT1-MMP em regiões resistentes a solubilização a detergentes, levando a inibição dessa metaloprotease (MIKI et al., 2007). Por outro lado, a remoção do colesterol nessas células retirou a capacidade de regulação de RECK (MIKI et al., 2007).

Foi descrito que a baixa expressão do gene que codifica a proteína RECK está relacionada com malignidade e mau prognóstico em diversos modelos tumorais, como câncer de mama (ABOUGHALIA et al., 2018); câncer de próstata (RABIEN et al., 2007); e câncer de pulmão (TAKEMOTO et al., 2007).

Transcritos alternativos do gene *RECK* foram identificados por Trombetta-Lima e colaboradores em 2015, esses transcritos compartilham os oito primeiros

éxons presentes da forma canônica e diferenciam-se pelo nono éxon conforme FIGURA 4.

FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DOS TRANSCRITOS ALETERNATIVOS DO GENE RECK



FONTE: Adaptado de Trombetta-Lima e colaboradores, 2015. Gene *RECK* e seus transcritos alternativos *RECK var 3* e *RECK var 5*. O gene *RECK* e suas variantes se diferenciam pelo o nono éxon.

Esses transcritos apresentam papel oposto daquele mediado por *RECK*. A maior expressão do transcrito canônico de *RECK* em relação à expressão dos transcritos alternativos de *RECK* (*RECK var 3* e *RECK var 5*) correlacionou positivamente com a maior sobrevivência de pacientes com glioblastoma após tratamento quimioterápico (TROMBETTA-LIMA et al., 2015). Em modelo de células de melanoma humano observou-se que a razão *RECK/RECKvar 3* é significativamente menor em linhagens de melanoma derivadas de lesões metastáticas do que nas derivadas de tumores primários, e altos níveis do transcrito *RECK var 3* foram preditivos para um pior prognóstico dos pacientes (JACOMASSO et al., 2019).

Considerando que o papel dos diferentes esfingolipídios na biologia tumoral ainda não é bem esclarecido, e que os efeitos pró ou antitumorais desses lipídios algumas vezes são controversos, no presente trabalho procuramos avaliar esse via de maneira global considerando as principais rotas da via esfingolipídios que

possam estar relacionada com malignidade, agressividade e resistência à quimioterapia.

Ainda na busca de novos alvos moleculares e considerando o efeito da proteína supressora de tumor de *RECK* e dos esfingolipídios na invasão tumoral mediada pela regulação de MMPs, nos propomos a avaliar possíveis correlações entre a composição celular de esfingolipídios e a proteína *RECK*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

Para avaliar a relação da via de esfingolipídios com a malignidade tumoral de gliomas, foi realizada análise de bioinformática utilizando dados públicos de pacientes depositados em *The Cancer Genome Atlas Program* (TCGA) obtidos em <http://firebrowse.org/>. Para as análises dos dados do TCGA, um software foi desenvolvido neste trabalho utilizando a biblioteca Pandas, a qual utiliza uma linguagem Python, que por sua vez, comunica-se por API com a plataforma disponível em <http://firebrowse.org/>.

Os grupos foram separados de acordo com diferente grau de glioma: gliomas de baixo grau (LGG) e glioblastoma (alto grau, GBM). Os dados de RNAseq de genes normalizados foram obtidos nessa plataforma TCGA e as expressões das enzimas de interesse em LGG (N=516) e GBM (N=160) foram avaliados. A comparação da expressão gênica entre os grupos foi realizada por análise estatística utilizando o método de teste t de Student.

##### 3.1.1 Expressão de enzimas chaves da via de esfingolipídios na agressividade e sobrevida de pacientes GBM

Com intuito de se avaliar a via de esfingolipídios na agressividade de glioblastoma, foi avaliado o grau de expressão de genes alvos dessa via, em pacientes diagnosticados com glioblastoma (N=160) considerando dois fenótipos clínicos; sobrevida e prognóstico (índice de Karnofsky). Pacientes com baixa sobrevida, de acordo com o parâmetro estatístico, foram considerados aqueles do primeiro quartil, que viveram 138 dias ou menos, o restante foi considerado com alta

sobrevida. O índice de Karnofsky quantifica a performance do paciente oncológico de acordo com os parâmetros físicos, e é muitas vezes relacionado com o prognóstico do paciente (MAYCON, 2002; SCHAAFSMA; OSOBA, 1994). A pontuação é feita de acordo com a FIGURA 5, e varia de 10 a 100. Aqueles pacientes com valor abaixo de 50 para o índice de Karnofsky foram considerados apresentando pior prognóstico. A comparação da expressão gênica entre os grupos foi realizada por análise estatística utilizando o método de teste t de Student.

FIGURA 5 – ÍNDICE DE KARNOFSKY

EscaLa de Karnofsky (%)
<b>100</b> - nenhuma queixa: ausência de evidência da doença
<b>90</b> - capaz de levar vida normal; sinais menores ou sintoma da doença
<b>80</b> - alguns sinais ou sintomas da doença com o esforço
<b>70</b> - capaz de cuidar de si mesmo; incapaz de levar suas atividades normais ou exercer trabalho ativo
<b>60</b> - necessita de assistência ocasional, mas ainda é capaz de prover a maioria de suas atividades
<b>50</b> - requer assistência considerável e cuidados médicos freqüentes
<b>40</b> - incapaz; requer cuidados especiais e assistência
<b>30</b> - muito incapaz; indicada hospitalização, apesar da morte não ser iminente
<b>20</b> - muito debilitado; hospitalização necessária; necessitando de tratamento de apoio ativo
<b>10</b> - moribundo, processos letais progredindo rapidamente

FONTE (Adaptado de MAYCON, 2002). Classificação do prognóstico de pacientes com glioblastoma. Quanto menor o índice pior o prognóstico e qualidade de vida do paciente.

### 3.1.2 Expressão de enzimas chaves da via de esfingolipídios em relação à expressão de *MGMT* em pacientes com glioma

A forma clássica de resistência à TMZ é relacionada com alta expressão do gene *MGMT*. A fim de avaliar a via de esfingolipídios na resistência ao quimioterápico padrão, a expressão de genes envolvidos na via de esfingolipídios foi avaliada considerando o grau de expressão de *MGMT* em dados de TCGA. Portanto pacientes diagnosticados com glioma (N=676) foi estratificado em dois grupos, grupo

com alta expressão e baixa expressão de *MGMT*. Pacientes com alta expressão de *MGMT* (*MGMT+*), de acordo com o parâmetro estatístico, foram considerados aqueles do terceiro quartil, o restante foi considerado com baixa expressão (*MGMT-*). A comparação da expressão gênica entre os grupos foi realizada por análise estatística utilizando o método de teste t de Student.

### 3.1.3 Expressão de enzimas chaves da via de esfingolipídios em relação à expressão de *RECK* e seus transcritos alternativos em pacientes GBM

Para avaliar a expressão das variantes de *splicing* alternativo de *RECK* (Variante 3 e 5 de *RECK*), foram utilizados dados de RNAseq, de TGCA, de isoformas normalizados obtidos na plataforma firebrowse. A comparação entre os grupos foi realizada por análise estatística utilizando o método de teste t de Student. Para estudar a relação da expressão entre *RECK* e suas isoformas com a expressão de esfingolipídios, os dados de RNAseq de isoformas normalizados e os dados de RNAseq de genes normalizados foram concatenados e uma regressão linear pelo método estatístico dos mínimos quadrados foi calculada.

## 3.2 CULTIVO CELULAR

Foram utilizadas as linhagens de glioblastoma humana A172, U87MG, T98G que apresentam diferentes fenótipos de agressividade conforme a TABELA 1. As linhagens foram adquiridas pelo banco ATCC e cedidas pela professora Mari C. Sogayar da Universidade de São Paulo.

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DAS LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA

Linhagem	Proliferação	Resistência à TMZ
A172	baixa	sensível
U87MG	alta	sensível
T98G	alta	resistente

FONTE: O autor (2020).

Com intuito de avaliar a resistência à TMZ em glioblastoma, durante o desenvolvimento desse projeto foi gerada linhagem U87MG resistente (U87MG R) de acordo com o protocolo baseado na literatura (CHO et al., 2012; PAN et al.,

2012). A linhagem U87MG foi cultivada em garrafa com superfície de 25 cm<sup>2</sup> e exposta à temozolomida em concentrações crescentes (10 µM, 20 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM e 100 µM) por um período de 3 meses. Aumentava-se a concentração da droga a cada 4-6 dias aproximadamente. O tratamento era feito sempre quando a população de célula atingia uma confluência de 80%, e quando se atingia uma confluência de quase 100%, 2/3 das células eram congeladas para obtenção de células pré-resistentes.

As linhagens superexpressando as diferentes formas de *RECK*, foram obtidas por transdução viral de construção contendo o cassete para supressão de *RECK* e seu variante 3 de acordo com Trombetta-Lima e colaboradores em 2015, e foram cedidas pela professora Mari C. Sogayar da Universidade de São Paulo.

As linhagens foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina, à uma temperatura de 37° C. A atmosfera foi controlada contendo 5 % CO<sub>2</sub>, e as células mantidas em uma confluência de 80% aproximadamente. A subcultura foi realizada utilizando solução salina-fosfato tamponada (PBS) para lavagem, e em seguida, solução de tripsina-EDTA para desprender as células.

### 3.2.1 Curva de proliferação

1x10<sup>4</sup> células/poço foram plaqueadas em placa de 48 poços em mantidas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após 24 horas o meio foi removido e substituído por um meio com os tratamentos 100 µM TMZ ou veículo 0,02% de DMSO. Após esse período também foram coletadas células para a contagem do 1° dia. A contagem foi realizada a cada dois dias até o 11° dia.

A coleta foi realizada utilizando solução salina-fosfato tamponada (PBS) para lavagem, e solução de tripsina-EDTA para desprender as células. As células foram mantidas em solução de meio contendo 0,37% de formaldeído a 5 °C para futura contagem.

### 3.2.2 Ensaio de Citotoxicidade

Para a avaliação da viabilidade celular, foram plaqueadas 8x10<sup>3</sup> células/poço em placa de 96 poços, com volume de meio/poço de 200µL. Após 24

horas, o sobrenadante foi retirado e as condições controle com 0,02% de veículo da droga (DMSO) e 100 $\mu$ M de TMZ foram adicionadas ao meio de cultura. As células foram incubadas por 72 horas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Depois de transcorrido o tempo de tratamento, o sobrenadante foi removido e foram adicionados 200 $\mu$ L da solução de brometo de 3,4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-tetrazolium (MTT) (0,5 mg/mL em PBS) em cada poço. A placa mantida ao abrigo da luz, e após 3h de incubação, o sobrenadante foi retirado e as células ressuspensas em 200 $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância foi lida no comprimento de onda de 545 nm no leitor de microplacas (TECAN-Infinite M200) e os resultados analisados pelo software GraphPad Prism.

### 3.3 LIPIDÔMICA

2,3 x 10<sup>6</sup> células foram plaqueadas em placa de 150 mm (8 placas por linhagem) e após um período de 24 horas as células foram desprendidas das placas com solução de tripsina-EDTA para obtenção do pellet. As amostras foram submetidas a lise, sendo mergulhadas em nitrogênio líquido e depois aquecidas a 37° C 3 vezes. Feito isso, as amostras foram liofilizadas overnight e os pellets, após pesados, foram submetidos a extração utilizando uma mistura de clorofórmio metanol (1:1, 2 mL) por 10 minutos em temperatura ambiente no banho de ultrassom. Após isso as amostras foram centrifugadas e o solvente eliminado por meio de um fluxo de N<sub>2</sub> e liofilizadas overnight. Após essa etapa as amostras foram dissolvidas em CDCl<sub>3</sub>:MeOD (600  $\mu$ L), contendo 2,5 mg/mL de metilsulfonilmetano (MSM) para quantificação, e submetidas a análise por RMN.

Estes experimentos foram realizados em um espectrômetro Bruker operando a 14,1 Tesla (600,13 MHz para 1H), equipado com uma criosonda de nitrogênio TCI Prodigy com gradiente de campo no eixo Z. Os experimentos realizados foram: Análise de 1H, análise de 1H com presaturação do sinal da água utilizando a sequência padrão zgpr e análise de correlação heteronuclear (1H-13C) do tipo HSQC utilizando a sequência padrão hsqcedetgpsisp2.3.

### 3.4 ENSAIOS DE EXPRESSÃO GÊNICA

1 x 10<sup>6</sup> células foram plaqueadas em placa de 100 mm e após um período de 24 horas as células foram desprendidas das placas com solução de tripsina-EDTA para obtenção do pellet. Para extração de RNA foi utilizado o kit ilustra RNAspin Mini (GE-Healthcare, UK), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação de RNA foi realizada através da medida de absorbância em 260 e 280 nm (Nanodrop 1000 – Thermo Scientific), e o extrato foi mantido a - 80 °C.

Posteriormente, foi realizada a síntese do cDNA a partir do RNA extraído, utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems). Reação foi realizado no termociclador Veriti 96-Well (Applied Biosystems): 10 min a 25 °C (incubação); 120 min a 37 °C (síntese); 5 min a 85 °C (inativação da enzima). O cDNA recém sintetizado foi armazenado a - 20 °C.

As reações de qRT-PCR foram realizadas em um termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems) utilizando SYBER Green PCR Master Mix e primers específicos para os genes alvos conforme TABELA 2. A mistura de reação foi constituída por: 3 µL de cDNA 1:30; 3 µL de primer (combinação F (forward) e R (reverse)); e 6 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), composto por AmpliTaq Gold® DNA Polimerase altamente purificada, corante ROX™, mistura de dNTPs e tampões otimizados. A reação ocorreu com 40 ciclos de amplificação.

A expressão do gene será normalizada pelo gene de referência HPRT e GAPDH utilizando o método de normalização com múltiplos genes e considerando a eficiência dos primers utilizados (VANDESOMPELE et al., 2002).

TABELA 2 – PRIMERS UTILIZADOS PARA qt-PCR

GENE	Concentração	SEQUÊNCIA
<i>SPHK1 - F</i>	400 nM	5'- ATTATGCTGGCTATGAGCAGG – 3'
<i>SPHK1 - R</i>	400 nM	5'- TGCAGAGACAGCAGGTTTCAT– 3'
<i>SPHK2 - F</i>	600 nM	5'- CCAGACAGAACGACAGAACCAC– 3'
<i>SPHK2 - R</i>	600 nM	5'- CTCCCGAGACCGTGACGATG– 3'
<i>SMPD1 - F</i>	400 nM	5'- ACCGAATTGTAGCCAGGTATGA– 3'
<i>SMPD1 - R</i>	400 nM	5'- AGAAGACCTCAAATTCATCCACA– 3'

<i>ERLIN1 - F</i>	400 nM	5'- TGCCACCTCAAACAAGCACA- 3'
<i>ERLIN1 - R</i>	400 nM	5'- ATGTTAGGGATGTTGCTGCCA- 3'
<i>GAMT - F</i>	600 nM	5' – ATGTTTGAGGAGACGCAGG – 3'
<i>GAMT - R</i>	600 nM	5' – AAGGCATAGTAGCGGCAGT -3'
<i>GAPDH - F</i>	600 nM	5'- ACCCACTCCTCCACCTTGA- 3'
<i>GAPDH - R</i>	600 nM	5'-CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3'
<i>HPRT - F</i>	400 nM	5'-GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA-3'
<i>HPRT - R</i>	400 nM	5' – TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-3'

## 4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DE ESFINGOLIPÍDIOS EM MODELO DE GLIOMA HUMANO E SUA CORRELAÇÃO COM A AGRESSIVIDADE TUMORAL

Para avaliar a via de esfingolipídios na agressividade tumoral em modelo de glioma foram avaliadas as expressões de enzimas chave envolvidas nessa via, considerando três fenótipos de agressividade: grau do tumor, sendo grau I e II (LGG, baixo grau) e grau III e IV (GBM, alto grau); taxa de sobrevivência de pacientes com glioma de alto grau, relacionado com o número de dias do diagnóstico até a morte; e o índice de Karnofsky de pacientes com GBM, que quantifica o prognóstico do paciente numerando-o de 10 a 100, sendo 100 melhor prognóstico. o índice de 50 foi escolhida como linha corte.

A via de esfingolipídios foi avaliada considerando a síntese ou degradação de ceramidas como ponto central, já que o consumo e a síntese desse lipídio estão preferencialmente relacionados com tumorigênese. Os genes da via de esfingolipídios avaliados estão descritos na TABELA 3.

TABELA 3 – GENES DA VIA DE ESFINGOLIPÍDIOS AVALIADOS

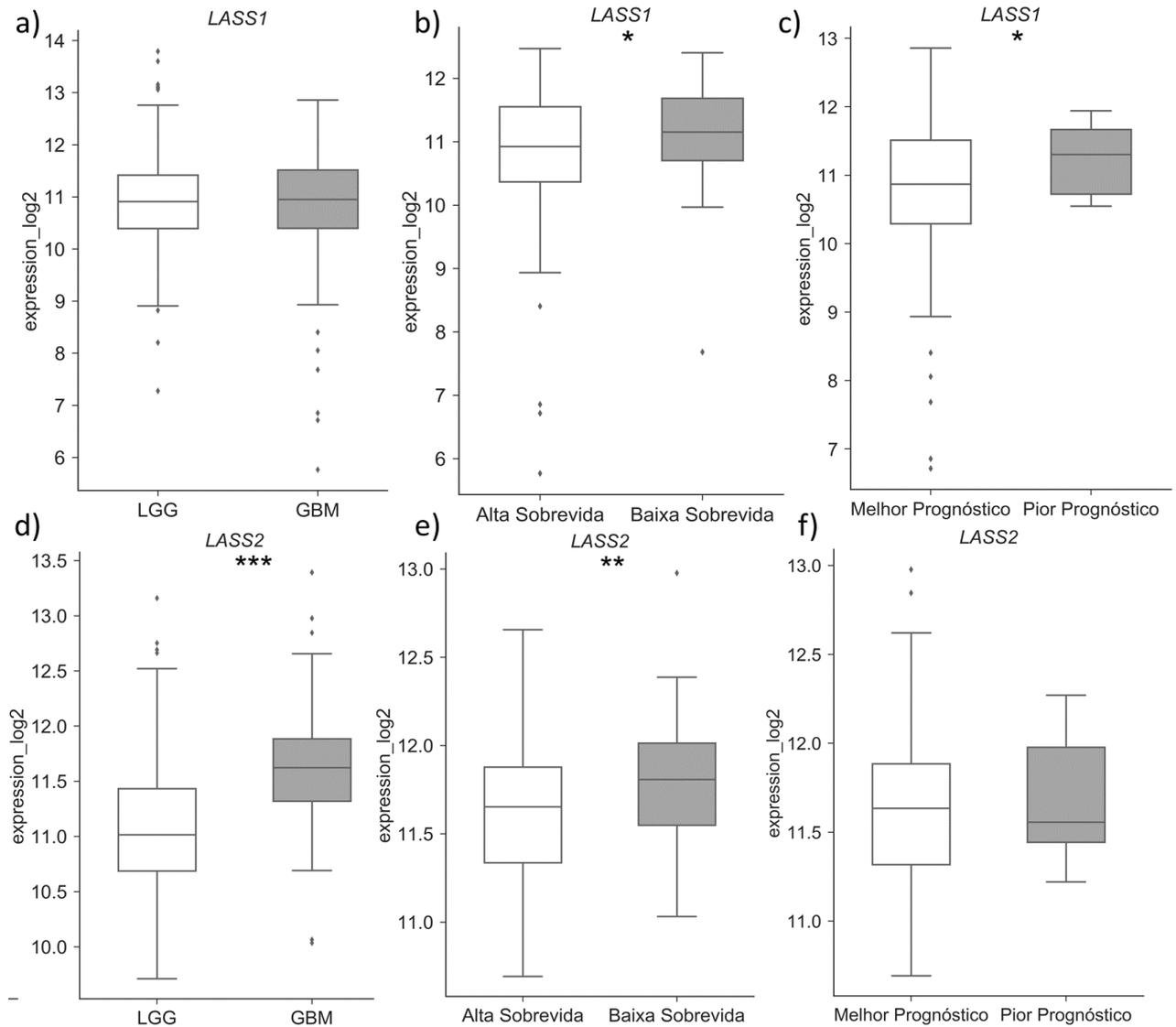
	<i>Gene</i>	<i>Produto</i>	<i>Efeito</i>	<i>Referências</i>
Geração de ceramidas	<i>LASS1</i>	Cer-18	Antitumoral	(KOYBASI et al., 2004)
	<i>LASS2</i>	Cer-20, Cer-24	Pró-tumoral	(HARTMANN et al., 2012).
	<i>SMPD (1-4)</i>	Ceramidas	-	(BECKMANN

Consumo de ceramidas	<i>UCGG</i>	Lactosilceramida	Resistência a quimioterapias	et al., 2014) (MORJANI et al., 2001).
(de maneira indireta pelo consumo de esfingosina)	<i>SPHK1</i>	S1P	Pró-tumoral	(NOACK et al., 2014)
	<i>SPHK2</i>	S1P	Pró-tumoral	

A ceramida pode ser sintetizada pela catálise da ceramida sintase LASS que apresenta 6 isoformas (OGRETMEN, 2018). Na FIGURA 6 está representada a modulação da expressão das isoformas *LASS1* e *LASS2* em modelo de malignidade (LGG e GBM), sobrevida e agressividade (índice de Karnofsky).

A expressão do gene *LASS1* não apresenta diferenças estatísticas conforme a progressão do grau (FIGURA 6 a). Porém em pacientes GBM que apresentam baixo índice de Karnofsky (pior prognóstico) e baixa sobrevida apresentam maior expressão desse gene (FIGURA 6b e 6c). Já a isoforma *LASS2* apresenta maior grau de expressão em tumores de alto grau (GBM) quando comparado com LGG (baixo grau) (FIGURA 6d), e ainda, naqueles pacientes GBM com baixa sobrevida a expressão de *LASS2* também é maior (FIGURA 6e), mas não apresentou diferença em relação ao parâmetro de avaliação clínica (FIGURA 6f). Esses dados sugerem que o gene *LASS2* pode estar relacionado com progressão de diferenciação tumoral e que alta expressão de *LASS1* e *LASS2* estão relacionados com agressividade. Esses dados são interessantes pois como revisado, o aumento de expressão de *LASS2* está relacionado com altos níveis das ceramidas de natureza longa e com o aumento de proliferação celular (HARTMANN et al., 2012).

FIGURA 6 – EXPRESSÃO DE CERAMIDAS SINTASES (*LASS1* e *LASS2*) NOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDADOS, LGG E GBM, E NOS SUBGRUPOS DE GBM, ALTA E BAIXA SOBREVIDA E PROGNÓSTICO

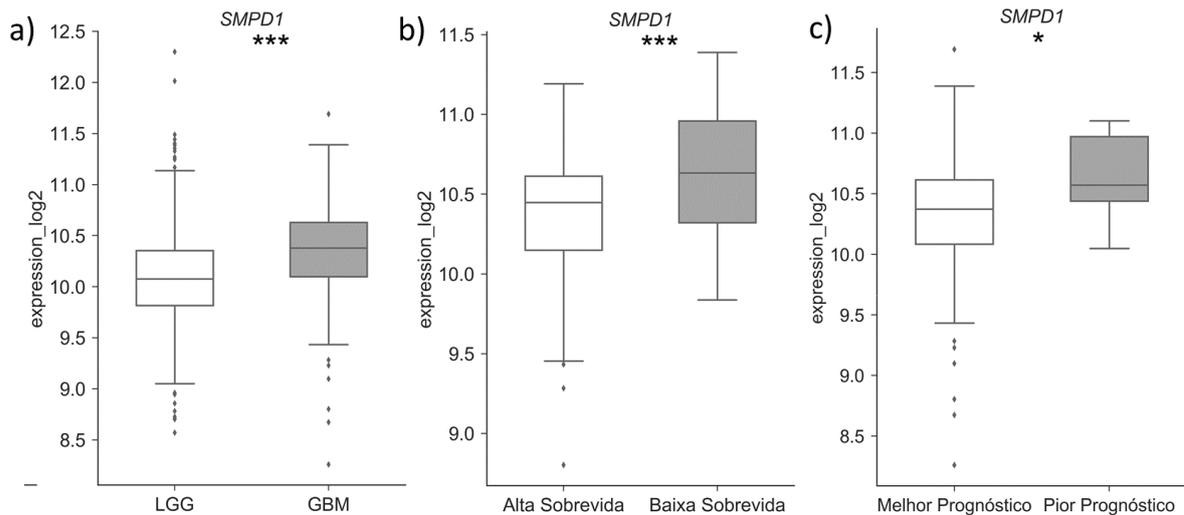


FONTE: O AUTOR. Análise da expressão das diferentes isoformas de ceramida sintase (*LASS1* e *LASS2*) em modelo de glioma humano. Dados foram obtidos da plataforma *firebrowse* contendo amostras derivadas de pacientes de baixo grau LGG (N=516) e alto grau GBM (N=160). As amostras de pacientes GBM também foram divididas em relação a taxa de sobrevida– alta ou baixa; e prognóstico pelo índice de Karnofsky– melhor prognóstico, índice acima de 50 e pior prognóstico, índice abaixo de 50. a) Expressão de *LASS1* nos diferentes graus de glioma. b) Expressão de *LASS1* pacientes GBM de acordo com a sobrevida. c) Expressão de *LASS1* pacientes GBM de acordo com o prognóstico. d) Expressão de *LASS2* nos diferentes graus de glioma. e) Expressão de *LASS2* pacientes GBM de acordo com a sobrevida. f) Expressão de *LASS2* pacientes GBM de acordo com o prognóstico. d) \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

A ceramida também pode ser gerada pela degradação de esfingomielinas (SM) pela ação de esfingomielinases (SMASEs) que apresentam diferentes isoformas (TANIGUCHI M., OKAZAKI, T. 2013). Portanto, também avaliamos a expressão dessas enzimas em pacientes com glioma. Na FIGURA 7 percebemos o aumento da expressão de uma das isoformas de SMASEs a *SMPD1*, em todos os parâmetros, sugerindo que uma maior degradação de esfingomielina está

relacionada com progressão tumoral, baixa sobrevida e pior prognóstico, apesar de que alguns trabalhos apresentarem um efeito antitumoral dessas enzimas (VAN DER HOEVEN et al., 2017).

FIGURA 7 – EXPRESSÃO DA ESFINGOMIELINASE (*SMPD1*) NOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDADOS, LGG E GBM, E NOS SUBGRUPOS DE GBM, ALTA E BAIXA SOBREVIDA E PROGNÓSTICO



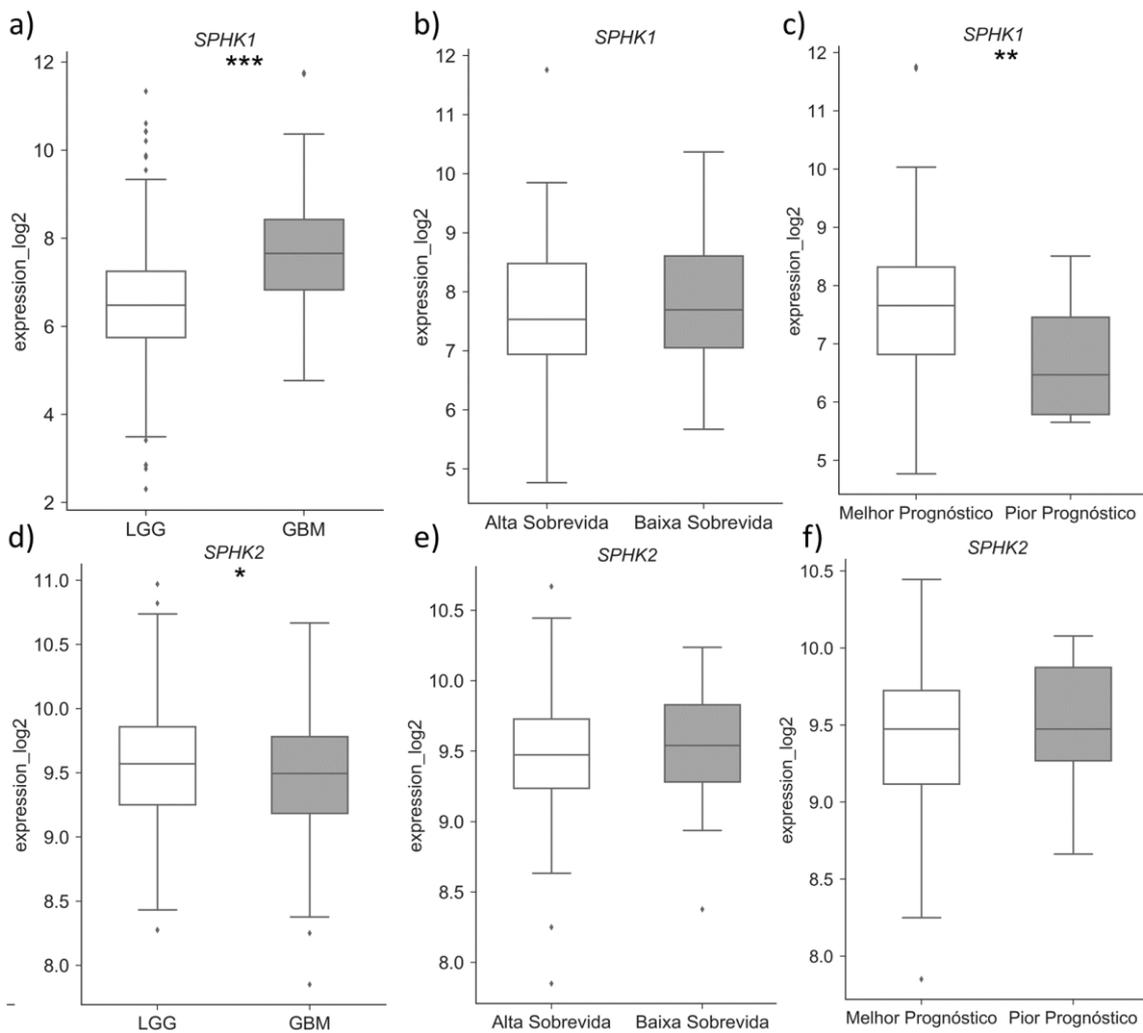
FONTE: O AUTOR. Análise da expressão de *SMPD1*, uma isoforma de esfingomielinase em modelo de glioma humano. Dados foram obtidos da plataforma firebrowse contendo amostras derivadas de pacientes LGG (N=516) e GBM (N=160). As amostras foram classificadas em três condições distintas: a) grau de malignidade - LGG (baixo grau) e GBM (alto grau), b) taxa de sobrevida dos pacientes GBM e c) o índice de Karnofsky dos pacientes com glioma de alto grau – melhor prognóstico, índice acima de 50 e pior prognóstico, índice abaixo de 50. \*p<0,05; \*\*p<0,01;\*\*\*p<0,001.

Níveis de ceramidas também são regulados pela catálise e conversão à esfingosina, pela ação das enzimas ceramidases *ASAH1* e *ASAH2*. Então, a esfingosina é convertida a esfingosina-1-fosfato (S1P) pela esfingosina-1-fosfato quinase, *SPHK1* e *SPHK2*, reduzindo assim os níveis de ceramidas e aumentando os níveis de S1P (SNIDER, ORR GANDY, e OBEID., 2010).

Com o intuito de avaliar a via de catabolização das ceramidas, foi analisada a expressão da enzima *SPHK1* e *SPHK2* em pacientes com glioma. Como demonstrado na FIGURA 8 percebe-se que há aumento da expressão da isoformas *SPHK1* em glioma de alto grau (Figura 8a), o que indica uma relação dessas enzimas na progressão de malignidade tumoral, o que corrobora com dados da literatura, onde o aumento de S1P está relacionado com efeitos pró tumorais (SNIDER; GANDY; OBEID, 2010). Porém, de maneira interessante em pacientes com GBM que apresentaram um pior prognóstico (baixo índice de Karnofsky), os

níveis da expressão desse gene foram menores (FIGURA 8c) se contrapondo aos dados revisados na literatura. A expressão de *SPHK1* não apresentaram relação com a sobrevida de pacientes GBM (FIGURA 8b). Apesar de uma pequena redução da expressão de *SPHK2* estar relacionada com glioma de alto grau não houve relação da expressão desse gene com prognóstico e nem com sobrevida de pacientes GBM (FIGURA 8e e 8f).

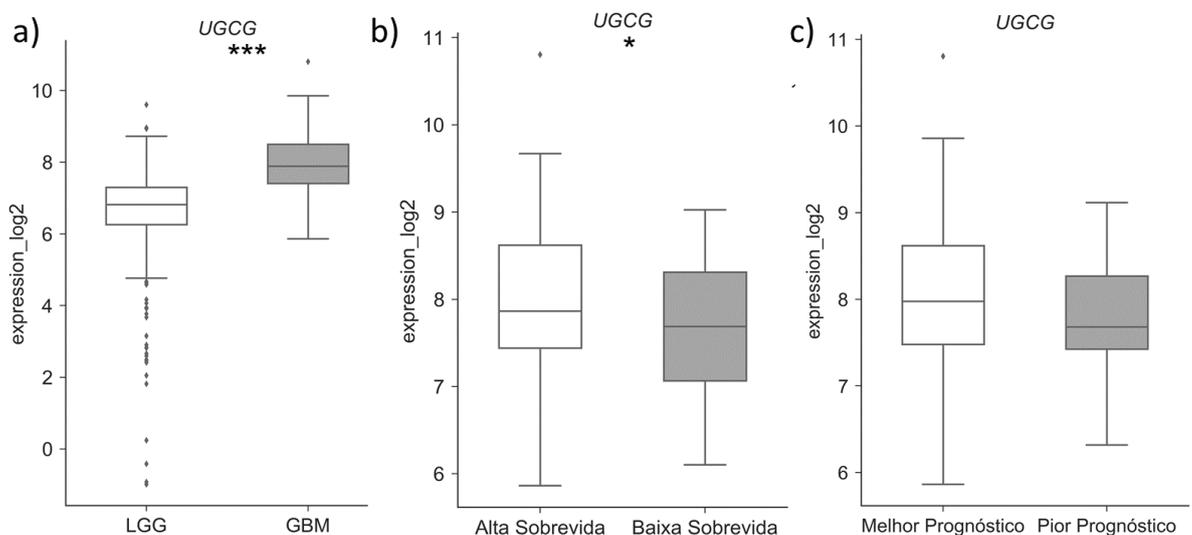
FIGURA 8 – EXPRESSÃO DAS ESFINGOSINAS QUINASES (*SPHK1* E *SPHK2*)



FONTE: O AUTOR. Análise da expressão de *SPHK1* e *SPHK2* em modelo de glioma humano. Dados foram obtidos da plataforma firebrowse contendo amostras derivadas de pacientes LGG (N=516) e GBM (N=160). As amostras de pacientes GBM também foram divididas em relação a taxa de sobrevida– alta ou baixa; e prognóstico pelo índice de Karnofsky– melhor prognóstico, índice acima de 50 e pior prognóstico, índice abaixo de 50. a) Expressão de *SPHK1* nos diferentes graus de glioma. b) Expressão de *SPHK1* pacientes GBM de acordo com a sobrevida. c) Expressão de *SPHK1* pacientes GBM de acordo com o prognóstico. d) Expressão de *SPHK2* nos diferentes graus de glioma. e) Expressão de *SPHK2* pacientes GBM de acordo com a sobrevida. f) Expressão de *SPHK2* pacientes GBM de acordo com o prognóstico. d) \*p<0,05; \*\*p<0,01;\*\*\*p<0,001. \*p<0,05; \*\*p<0,01;\*\*\*p<0,001.

Outra via de consumo de ceramida se dá pela síntese de metabólitos glicosilados de esfingolípídios que são sintetizados a partir da ceramida pela enzima *UGCG*, que consiste na primeira etapa da biossíntese de gangliosídeos. Altos níveis desses compostos foram relacionados com tumorigênese em modelo celular glioblastoma humano (YEH *et. al.*, 2016) (MORJANI *et. al.*, 2001). Nossos dados apresentados na FIGURA 9a confirmam essa relação, em que notamos uma maior expressão de *UGCG* em pacientes com maior grau de malignidade sugerindo que há um maior consumo de ceramida, e o acúmulo de galactosilceramida em tumores mais malignos. Porém, de maneira interessante, em pacientes com glioblastoma a alta expressão desse gene relaciona-se com maior sobrevida (FIGURA 9b), o que sugere um papel distinto desse gene em glioma de alto grau. A expressão desse gene não apresentou relação com prognóstico de pacientes GBM (FIGURA 9c).

FIGURA 9 – EXPRESSÃO DA ENZIMA ENVOLVIDA NA DE SÍNTESE DE GANGLIOSÍDEOS (*UGCG*)

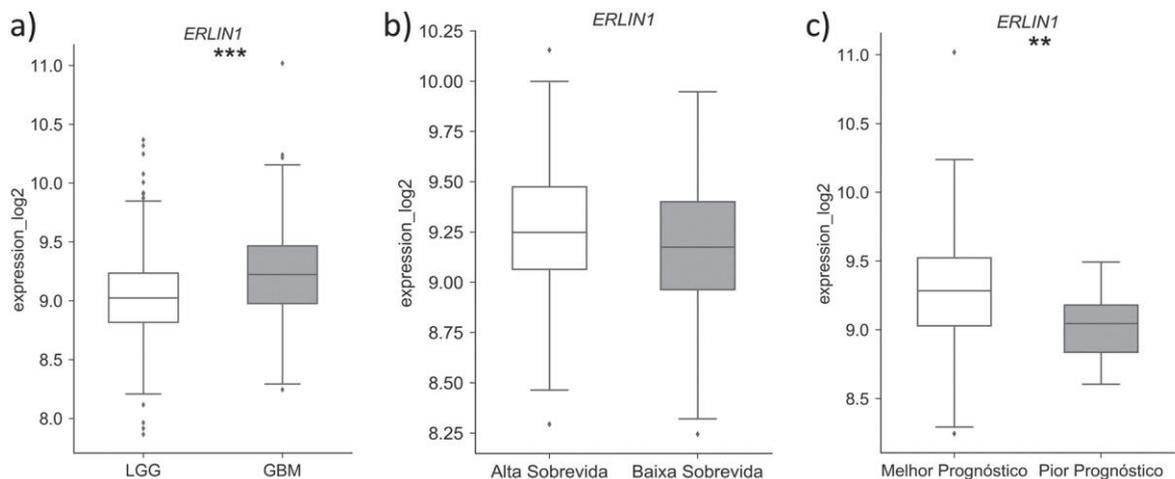


FONTE: O AUTOR. Análise da expressão de *UGCG* em modelo de glioma humano. Dados foram obtidos da plataforma firebrowse contendo amostras derivadas de pacientes LGG (N=516) e GBM (N=160). As amostras foram classificadas em três condições distintas: a) grau de malignidade - LGG (baixo grau) e GBM (alto grau), b) taxa de sobrevida dos pacientes GBM e c) o índice de Karnofsky dos pacientes com glioma de alto grau – melhor prognóstico, índice acima de 50 e pior prognóstico, índice abaixo de 50. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Considerando que o retículo endoplasmático (RE) tem um papel importante na síntese de esfingolípídios, e pode controlar os níveis e a natureza desses lipídios (KATO; NISHITOH, 2015). Ainda, considerando que uma determinada proteína do RE, ERLIN1, regula a síntese de colesterol está relacionada de maneira indireta

com o metabolismo lipídico (HUBER et al., 2013)(HUBER et al., 2013). Avaliou-se os níveis de expressão do gene que codifica para essa proteína com intuito de buscar novos alvos que possam modular a via de esfingolipídios e ter um papel na agressividade tumoral de gliomas (FIGURA 10). Na FIGURA 10a notamos que a expressão desse gene demonstrou relação positiva com tumores de maior malignidade, pois GBM apresentam maior expressão desse gene do que LGG. De maneira interessante, tumores relacionados com pior prognóstico (menor índice de Karnofsky) apresentaram níveis de expressão de *ERLIN1* menores que aqueles relacionados com melhor prognóstico (FIGURA 10c). A expressão desse gene não apresentou relação com sobrevida dos pacientes.

FIGURA 10 – EXPRESSÃO DO GENE *ERLIN1*



FONTE: O AUTOR. Análise da expressão de *ERLIN1* em modelo de glioma humano. Dados foram obtidos da plataforma firebrowse contendo amostras derivadas de pacientes LGG (N=516) e GBM (N=160). As amostras foram classificadas em duas condições distintas: a) grau de malignidade - LGG (baixo grau) e GBM (alto grau), b) o índice de Karnofsky dos pacientes com glioma de alto grau - melhor prognóstico (Non agressivo) e pior prognóstico (Agressivo). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DE ESFINGOLIPÍDIOS EM MODELO DE GLIOMA HUMANO E SUA CORRELAÇÃO COM A RESISTÊNCIA TUMORAL

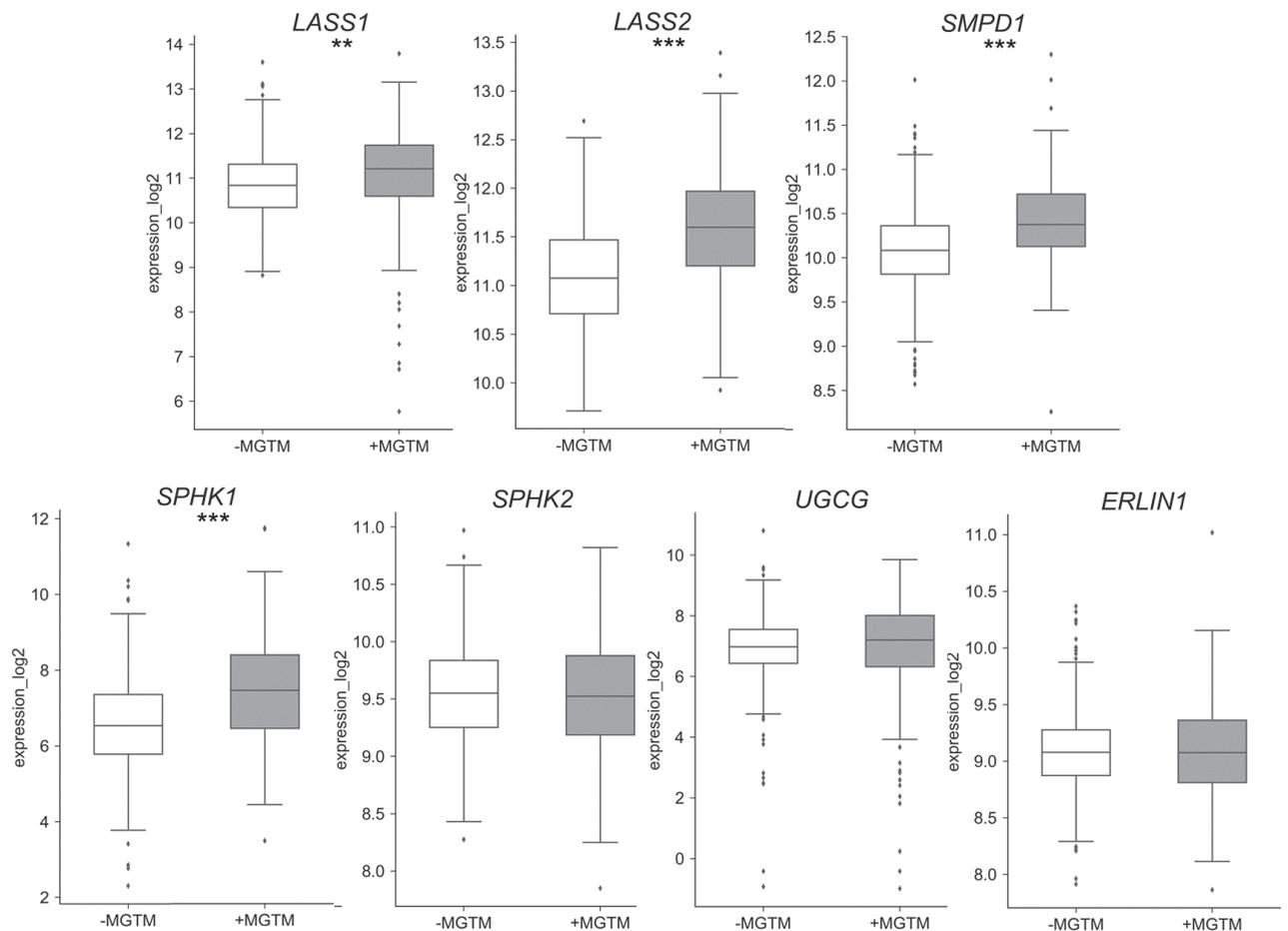
Considerando que a alta expressão de *MGMT* está relacionada com resistência ao quimioterápico TMZ (ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2011), foi realizada análise da expressão de genes envolvidos na via de esfingolipídios comparando dois grupos de pacientes diagnosticados com glioma; aqueles com alta expressão de *MGMT* e aqueles com baixa expressão desse gene, com intuito de se

investigar a via de esfingolipídios no fenótipo de resistência à temozolomida nesses pacientes.

Foram avaliados os genes envolvidos da síntese de ceramidas *LASS1/2* e a SMASE *SMPD1*. Também foram avaliados os genes envolvidos no consumo de ceramidas, *SPHK1/2* e *UGCG*. Ainda foi avaliado a expressão do gene *ERLIN1* que apresenta um papel importante no metabolismo de lipídios.

Conforme a FIGURA 11, em pacientes com maior expressão de *MGMT* (resistentes a TMZ) observa-se maior expressão de *LASS2* e *SMPD1*. Esses dados sugerem um papel dessas enzimas e de ceramidas de cadeia muito longa na resistência a TMZ. Ainda na FIGURA 11, uma maior expressão da isoforma *SPHK1* está relacionado com alta expressão de *MGMT*, enquanto a isoforma *SPHK2* não apresenta correlação. Esses dados sugerem que a síntese de S1P mediada pela isoforma *SPHK1* pode estar relacionada com resistência a TMZ. A expressão do gene responsável pela primeira etapa da síntese de gangliosídios *UGCG* não apresentou relação com a expressão de *MGMT*, assim como a expressão do gene *ERLIN1*.

FIGURA 11 – EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DE ESFINGOLIPÍDIOS EM FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA

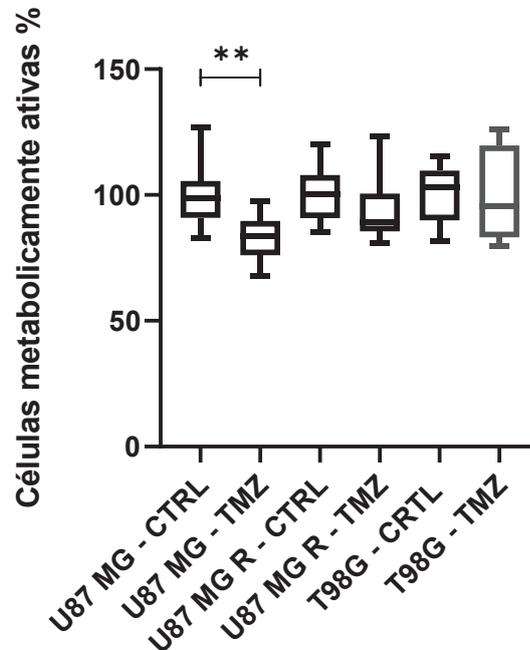


FONTE: O AUTOR. Expressão de genes envolvidos na síntese de ceramidas (*LASS1*, *LASS2*, *SMPD1*), no consumo de ceramidas (*SPHK1*, *SPHK2*, *UGCG*) e no metabolismo de lipídios (*ERLIN1*) no fenótipo de resistência à temozolomida em pacientes com glioma. Dados foram obtidos da plataforma firebrowse contendo amostras derivadas de pacientes diagnosticado com glioma (N=676). As amostras foram classificadas em duas condições distintas: baixa expressão de *MGMT* (-MGTM) e alta expressão de *MGMT* (+MGTM). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Com o intuito de avaliar a resistência à TMZ em modelo celular, foi gerada para este trabalho uma linhagem de células U87MG resistentes à TMZ (U87MG-R). Para confirmar a aquisição de resistência por essa linhagem avaliou-se o efeito citotóxico da temozolomida na U87MG R assim como nas demais linhagens U87MG e T98G. O tratamento das diferentes linhagens foi realizado com 100  $\mu\text{M}$  de TMZ por 72 horas e submetidas ao ensaio por MTT. Os resultados obtidos estão representados na FIGURA 12. Percebe-se uma redução significativa de quase 17 % da atividade metabólica para a linhagem parental U87MG após o tratamento com TMZ. Já as linhagens U87MG R e T98G mostram-se resistentes ao tratamento quimioterápico. Considerando esse modelo, esses resultados confirmam que a

linhagem U87MG R adquiriu resistência à TMZ após o período de seleção de 3 meses.

FIGURA 12 – CITOTOXICIDADE À TMZ

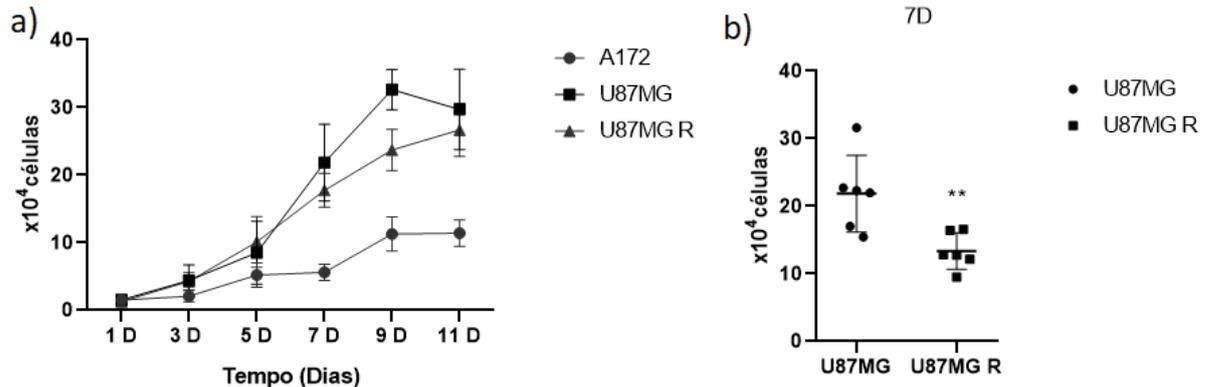


FONTE: O AUTOR. Avaliação do efeito citotóxico da temozolomida nas linhagens A172, U87MG, U87MG R e T98G.  $8 \times 10^3$  células foram plaqueadas em placas de 96 poços e após 24 horas foi adicionado  $100 \mu\text{M}$  de TMZ. O ensaio de MTT foi realizado após 72 horas de tratamento. Leitura foi realizada no leitor de microplacas (TECAN-Infinite M200) em comprimento de onda de 545 nm. \*\*  $p < 0,01$ .

Para complementar caracterização dessa linhagem resistente, decidiu-se avaliar o perfil de proliferação da linhagem U87MG R em comparação com as linhagens U87MG (linhagem parental) e A172 (que apresenta uma menor taxa de proliferação em comparação com a linhagem U87MG). Para esse objetivo as diferentes linhagens foram plaqueadas em baixa densidade ( $1,05 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) e mantidas em cultura por até 11 dias. Nesse experimento, o meio de cultura com 10% soro fetal bovino (SFB) é renovado a cada 2 dias. Observa-se que a linhagem U87MG e a linhagem U87MG R apresentaram um perfil de proliferação mais acentuado que a linhagem A172, conforme demonstrado na FIGURA 13. Ainda, percebe-se que a U87MG R apresenta uma menor taxa de proliferação quando comparada com a U87MG parental. E já no 7º dia notamos que há uma diferença significativa no número de células entre essas linhagens. No 11º percebemos que a

linhagem U87MG já se encontra em sua fase de declínio. Vale a pena destacar que dados do grupo demonstraram que a linhagem T98G apresenta uma curva de proliferação semelhante à U87MG, e por isso não foi considerada nesse ensaio.

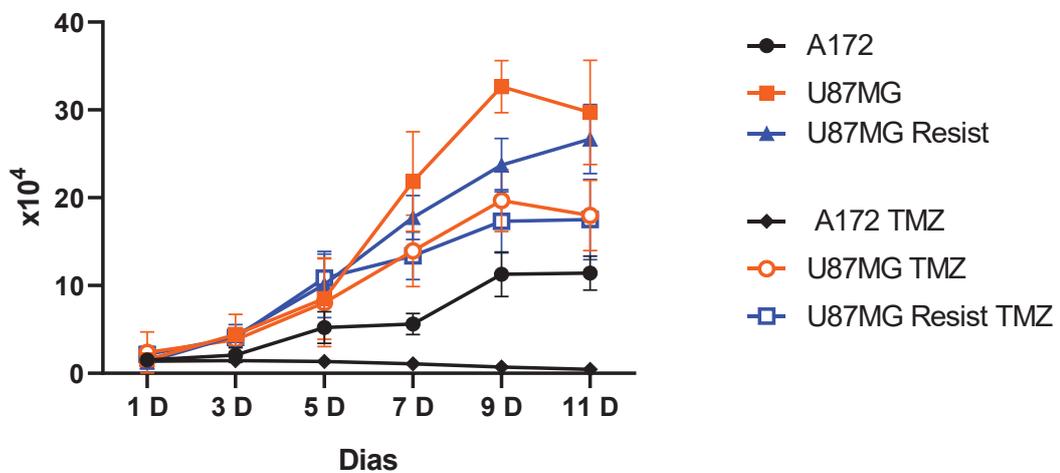
FIGURA 13 – CURVA DE PROLIFERAÇÃO DE LINHAGENS GBM



FONTE: O AUTOR. Avaliação do crescimento celular das linhagens A172, U87MG e U87MG R. a) Curva de proliferação das linhagens A172, U87MG e U87MG R. Foram plaqueadas  $1 \times 10^4$  células em meio DMEM/10%SFB em placas de 48 poços. A cada dois dias as células foram coletadas e contadas utilizando câmara de Neubauer, totalizando 11 dias da curva de crescimento. A linhagem U87MG apresentou uma maior taxa de proliferação b) Comparação da quantidade de células das linhagens U87MG e U87MG R no 7º dia. No sétimo dia de experimento percebe-se que a linhagem U87MG apresenta maior número.

A curva de proliferação das diferentes linhagens também foi avaliada com o tratamento intermitente com temozolomida, como ilustrado na FIGURA 14. A linhagem A172 nessa condição mantém-se na fase lag e avança diretamente para fase de morte. Em relação as células U87MG, observa-se que no 7º dia do experimento há uma redução significativa no número de células U87MG tratadas com TMZ quando comparado com aquelas que não receberam tratamento, o mesmo perfil não ocorre para células U87MG R nesse período. Porém no 9º dia de experimento fica evidente a diminuição do número de células da linhagem U87MG R tratadas com TMZ em comparação com células não tratadas para esse período.

FIGURA 14 - CURVA DE PROLIFERAÇÃO DE LINHAGENS GBM COM E SEM TRATAMENTO COM TMZ



FONTE: O AUTOR. Curva de proliferação das linhagens A172, U87MG e U87MG R com ou sem tratamento com temozolomida. Foram plaqueadas  $1 \times 10^4$  células em meio DMEM/10%SFB em placas de 48 poços. A cada dois dias as células foram coletadas e contadas utilizando câmara de Neubauer, totalizando 11 dias da curva de crescimento.

#### 4.3 LIPIDÔMICA DAS LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA

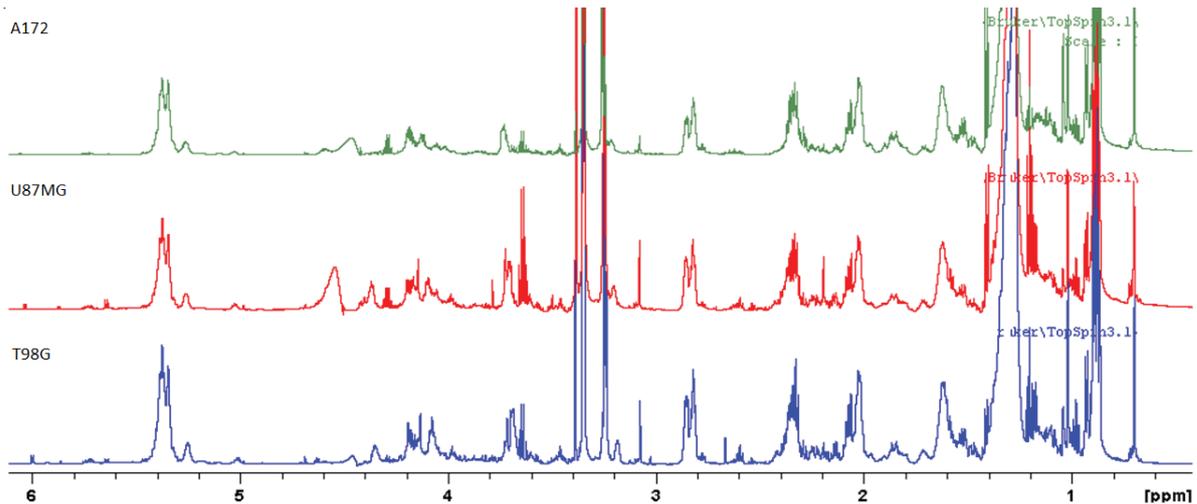
Para tentar identificar lipídios que possam estar envolvidos na agressividade tumoral e resistência à temozolomida, os extratos lipídicos das linhagens celulares de glioma A172, U87MG, T98MG e U87MG R foram submetidos à análise de lipidômica por RMN 1D e 2D. As classes lipídicas e seus respectivos deslocamentos químicos apresentados na FIGURA 15 e 16 estão ilustrados na TABELA 2 e foram assinalados conforme a literatura (ADOSRAKU; et al., 1994; CASU et al., 1991; SANTANA-FILHO et al., 2017).

TABELA 4 – DESLOCAMENTO QUÍMICOS DOS PRINCIPAIS METABÓLICOS IDENTIFICADOS

Lipid Class	<sup>1</sup> H Chemical shift	<sup>13</sup> C Chemical shift
Chol-C18	0.6931	12.05
Chol-C21 (d)	0.9261	18.89
Chol-C9	0.9361	50.54
Chol-C14	1.0031	57.14
Chol-C19	1.0157	19.54
Chol	1.1022	56.24
-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (t)	0.9792	14.41
Chol-C19	1.0155	19.53
(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	1.2665 - 1.3116	22.89 - 32.16
Chol	1.5072	21.34
F <sub>β</sub> :R-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-	1.609	25.13
F <sub>β</sub> :CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-	1.702	25
Chol	1.8115	31.48
Chol	1.8422	28.56
Chol	1.8506	37.61
Chol	1.9752	32.19
-CH=CH-CH <sub>2</sub> - (18:1)	2.0202	27.45
Chol	2.0233	40.08
-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH- (18:2;20:4)	2.0554	27.38
-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO- (20:4)	2.1283	26.82
Chol	2.1743	36.78
Chol	2.2248	42.17
Chol	2.2543	42.21
F <sub>α</sub> : R-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-	2.3256	34.48
-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO- (22:6)	2.4022	34.38
-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH- (18:2)	2.7765	25.88
-CH=CH-(CH <sub>2</sub> -CH=CH-) <sub>y</sub> (20:4, 22:6)	2.8142	25.87
Creatine	3.041 (s)	37.24
PE-2'	3.1025	41.00
-N <sup>+</sup> (Me) <sub>3</sub> (PC, SM)	3.2163	54.45
PC-2'	3.5861	66.93
PI-4'	3.6483	72.85
PI-2'	3.6483	72.85
Gly-C3 (DG)	3.6998	60.97
PI-6'	3.7848	72.21
PI-1'	3.8821	77.1
Cer-C2	3.9291	54.12
Creatina	3.930 (s)	54.23
Gly-C3(PLS/PC/PE)	4.0034	64.01
Cer-C1/Gly-C3(PI)/PE-1'	4.0361	61.61
Cer-C3	4.1573	71.84
Gly-C1 (DG/TG/PC/PE/PI)	4.1665	62.96
Gly-C3 (PI)/PE-1'	4.2426	59.24
PC-1'	4.2431	59.21
PLS-(=CH-)	4.3584	108.26
Gly-C1 (DG/TG/PC/PE/PI)	4.4156	62.02
Gly-C2 (DG)	5.1694	72.09
Gly-C2 (PC/PE/PI)	5.2301	70.78
Mono-UFA	5.3492	130.18
Poly-UFA	5.3724	128.67
PLS (-O-HC=)	5.9158	145.07

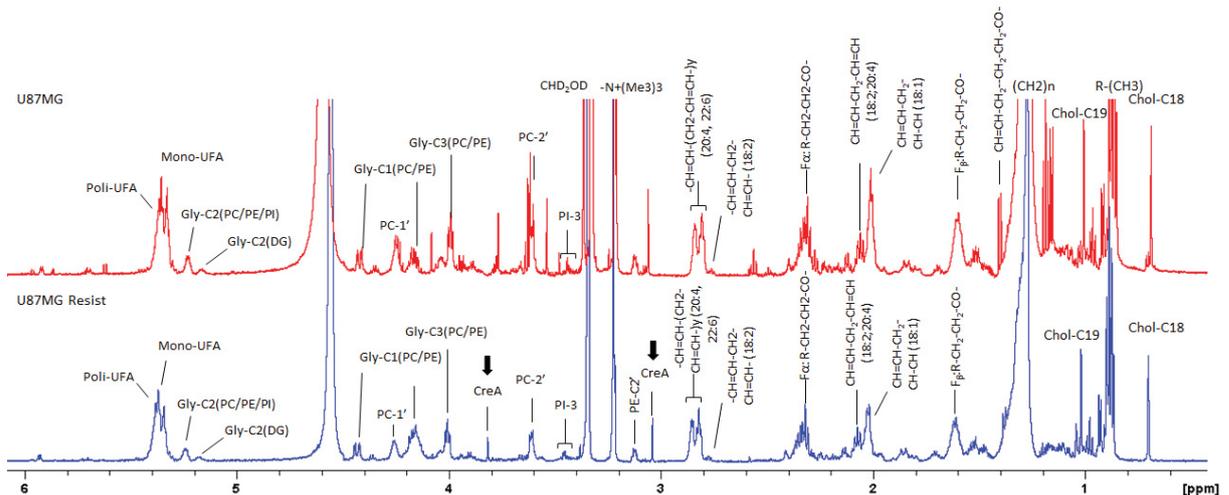
Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato lipídico foram semelhantes entre as linhagens (FIGURA 15). No entanto, percebe-se a presença do sinal para creatina, destacado na FIGURA 16, no extrato lipídico da linhagem U87M R, que não é encontrado no espectro da U87MG.

FIGURA 15 – ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DAS LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA



FONTE: O AUTOR. Dados de  $^1\text{H}$  por RMN dos extratos orgânicos de A172, T98G, U87MG.

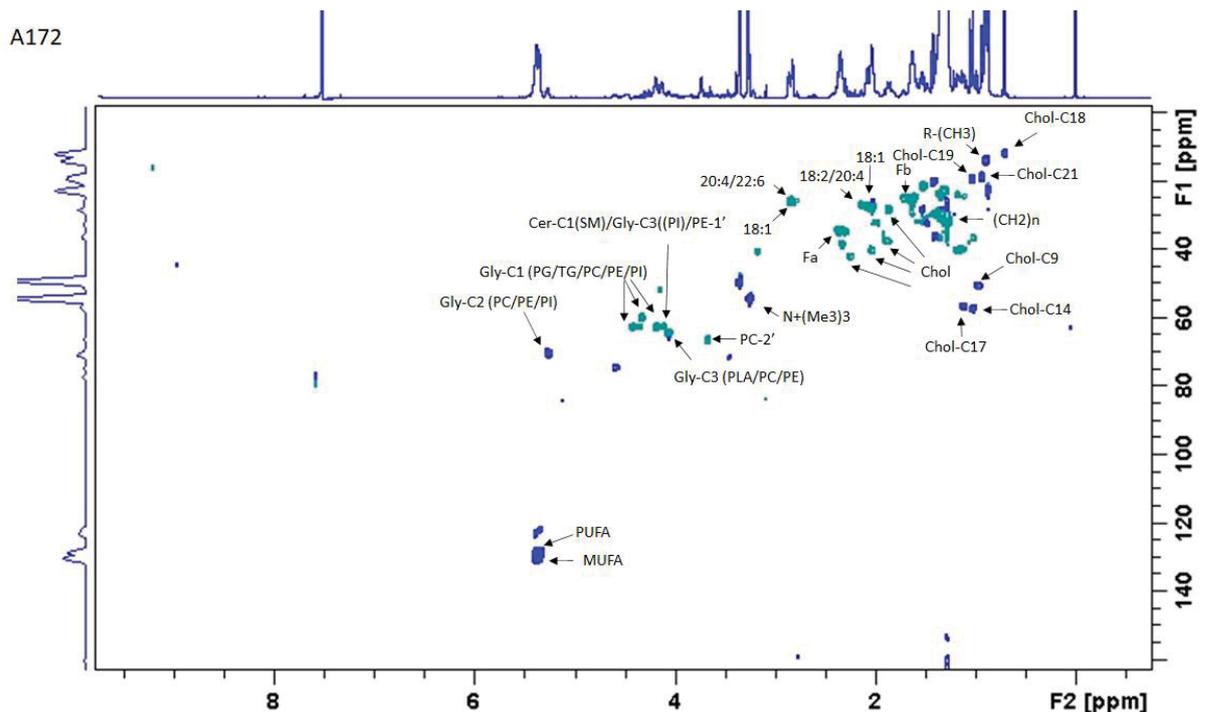
FIGURA 16 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DAS LINHAGENS U87MG E U87MG R



FONTE: O AUTOR. Assinalamentos do espectro de RMN  $^1\text{H}$  dos extratos orgânicos de U87MG e U87MG R. A presença dos sinais de creatina (CreA) estão destacados pela seta.

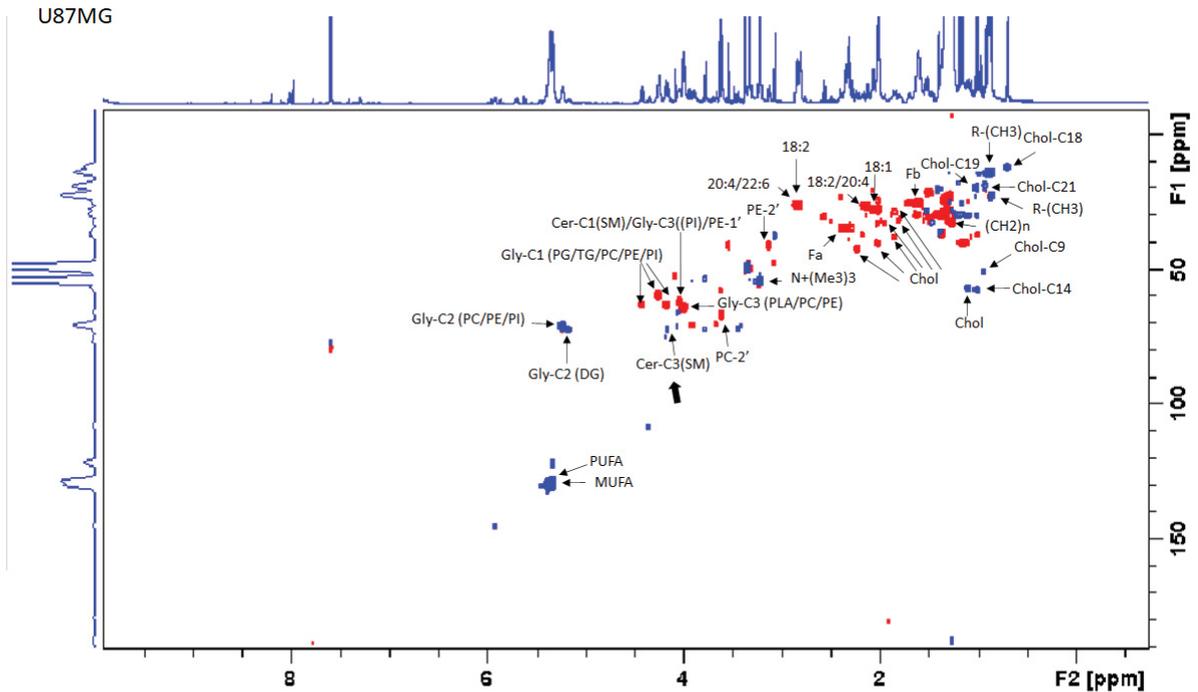
Foram obtidos também espectros de RMN-2D por HSCQC para complementar a identificação dos extratos lipídicos (FIGURAS 17 e 18). Nesse espectro os átomos de carbono que estão ligados a dois átomos de hidrogênios adquirem uma fase diferente, e podem ser diferenciados dos carbonos ligados a 1 ou 3 átomos de hidrogênio. O espectro 2D da linhagem T98G apresentou semelhante ao da U87MG e por isso não foi apresentado. Os resultados obtidos mostram que a linhagem menos agressiva A172 não apresentou o deslocamento referente ao carbono C3 da porção da ceramida da esfingomiéline, destacado na FIGURA 18, que está presente nas linhagens com fenótipos mais agressivos U87MG e T98G. Esses dados sugerem que um fenótipo menos agressivo apresenta níveis menores de esfingomiéline. Os demais sinais foram semelhantes entre as linhagens.

FIGURA 17 – MAPA DE DESLOCAMENTO QUÍMICO DE HSQC DA LINHAGEM A172



FONTE: O AUTOR. Mapa de deslocamento químico obtido pela avaliação do extrato lipídico por RMN 2D HSQC-ed. A fase positiva, em azul, representa as correlações referentes a CH e CH<sub>3</sub>, enquanto, em verde representa as relações de CH<sub>2</sub>.

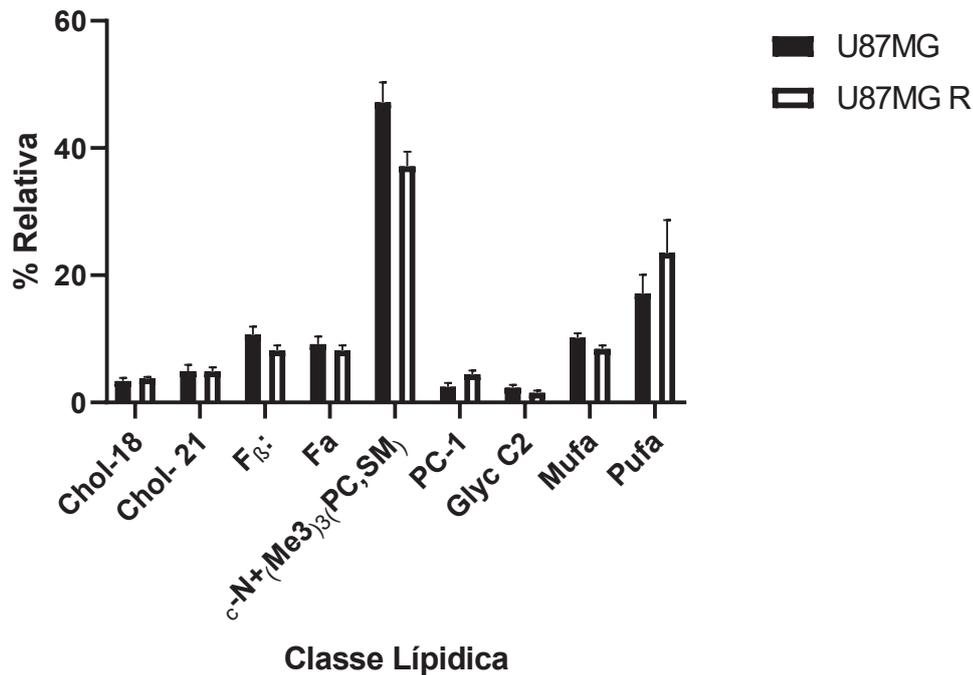
FIGURA 18 – MAPA DE DESLOCAMENTO QUÍMICO DE HSQC DA LINHAGEM U87MG



FONTE: O AUTOR. Mapa de deslocamento químico obtido pela avaliação do extrato lipídico por RMN 2D HSQC-ed. A fase positiva, em azul, representa as correlações referentes a CH e CH<sub>3</sub>, enquanto, em vermelho representa as relações de CH<sub>2</sub>. A presença do sinais referente ao carbono C3 da porção da ceramida da esfingomielina está destacado pela seta.

A quantificação relativa dos principais deslocamentos pela integral dos sinais foi realizada de acordo com a resolução do espectro por RMN <sup>1</sup>H utilizando o metilsulfonilmetano como padrão (MSM) (FIGURA 19). Dados estatísticos não foram representados pois esse experimento foi realizado em duplicata, porém notamos uma tendência na redução da área integrada do deslocamento referente aos hidrogênios ligado no grupamento trimetil amônio N+(Me<sub>3</sub>)<sub>3</sub> presentes na molécula de fosfatidilcolina e esfingomielina na linhagem U87MG R quando comparada com a linhagem sensível. Análise adicionais de RMN 1D de <sup>31</sup>P e 2D (HMBC <sup>1</sup>H - <sup>31</sup>P), assim como espectrometria de massa, podem auxiliar na investigação da natureza lipídica que é modulada no fenótipo de resistência.

FIGURA 19 – QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DAS FAMÍLIAS DE LIPÍDIOS



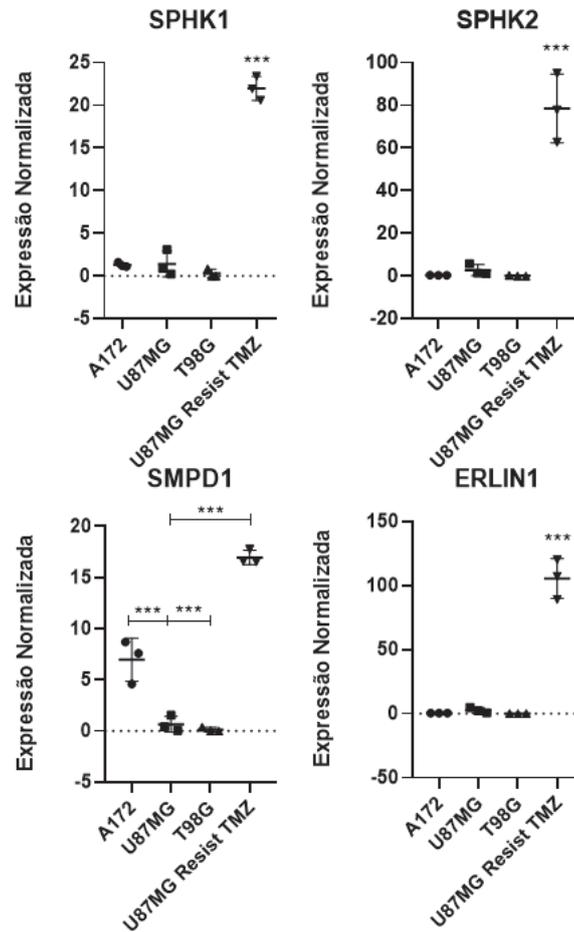
FONTE: O AUTOR. A quantificação foi realizada utilizando MSM como padrão para normalizar as integrais das amostras. Foram quantificados os lipídios das linhagens U87MG e U87MG R. Chol, Colesterol; F $\beta$ ,protons adjacentes ao grupo COOH na cadeia de ácidos graxos; F $\alpha$ , adjacentes ao grupo COOH na cadeia de ácidos graxos; N+(Me3)3, grupo trimetil amônio presente nas moléculas PC e SM; PC, fosfatidilcolinas; SM, esfingomiélinas; Glyc C2, hidrogênio ligado ao carbono 2 da cadeia de glicerol; MUFA, ácido graxo monoinsaturado; PUFA, ácido graxo polinsaturado.

Com base nos dados de lipidômica que sugerem uma redução nos níveis de esfingomiélinas nas linhagens com um menor perfil proliferativo, e considerando os dados obtidos através das análises de bioinformática, genes alvos da via de esfingolipídios foram quantificados por PCR em tempo real (TABELA 3) no modelo celular de agressividade e resistência à temozolomida. Para a quantificação foram utilizados dois genes endógenos (HPRT e GAPDH). Ainda, como detectamos a presença diferencial de creatina no extrato lipídico, a expressão de GAMT, gene que codifica para uma enzima envolvido na síntese de creatina, também foi avaliada.

A quantificação relativa foi realizada considerando a média das expressões de todas as linhagens avaliadas e está ilustrada na FIGURA 20. Houve um aumento significativo da expressão de todos os genes analisados envolvidos na via de esfingolipídios nas células U87MG R, quando comparado com as outras linhagens. O aumento da expressão de *SMPD1* sugere um aumento da degradação de esfingomiélinas e geração de ceramidas, além disso o aumento na expressão de

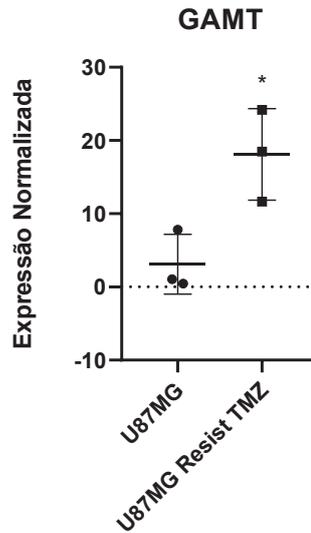
*SPHK1* e *SPHK2* sugerem que essas ceramidas estejam sendo convertidas a S1P. Já a linhagem com fenótipo menos agressivo A172, também apresenta uma maior expressão do gene que codifica para a esfingomielinase *SMPD1* em comparação com as células U87MG e T98G, porém na linhagem com resistência adquirida (U87MG R) a expressão de *SMPD1* é ainda maior. Diferente da linhagem U87MG R, a linhagem A172 não apresenta aumento da expressão das enzimas *SPHK1* e *SPHK2*, o que sugere que a redução dos níveis de esfingomielinas não está relacionada com o aumento dos níveis de S1P. Esses dados corroboram com os dados da lipidômica, uma vez que, nas duas linhagens detectamos a redução de esfingomielinas, na A172 pela ausência do sinal Cer-3 (SM) no experimento de HSQC, e na U87MG R pela quantificação do deslocamento referente a N+(Me<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. Na linhagem U87MG R nota-se uma maior expressão de *ERLIN1*, esses dados sugerem que nessa linhagem está havendo modulação do metabolismo de lipídios mediada por retículo endoplasmático.

FIGURA 20 – EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE ESFINGOLIPÍDIOS



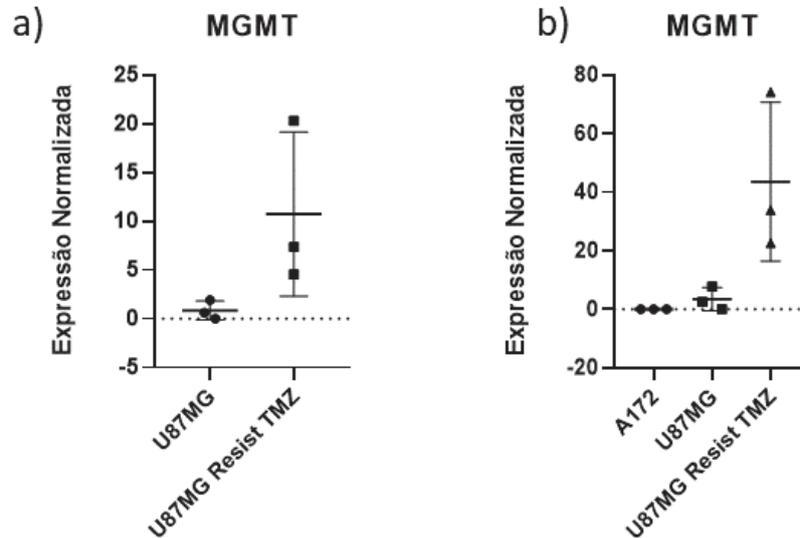
FONTE: O AUTOR. Níveis de expressão relativa dos genes *SPHK1*, *SPHK2*, *SMPD1* e *ERLIN1* das linhagens de glioblastomas com diferentes fenótipos de agressividade e resistência a TMZ.  $1 \times 10^6$  células foram plaqueadas em placa de 100 mm e após 24 horas, foi realizada a extração de RNA. O cDNA foi sintetizado e a análise de qPCR foi realizada em equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems). A expressão do gene de interesse foi normalizada considerando dois genes endógenos: HPRT e GAPDH. Os dados são referentes à três experimentos independentes, realizados em duplicata. \* $p=0.05$

Uma vez que os dados de lipidômica apontam a presença de creatina em linhagem com resistência adquirida U87MG R, avaliou-se também a expressão do gene *GAMT*, responsável por codificar uma enzima que sintetiza tal biomolécula (FIGURA 21). Esse dado corrobora com os dados da lipidômica, uma vez que há um aumento da expressão desse gene nas linhagens U87MG R.

FIGURA 21 – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *GAMT* EM MODELO DE RESISTÊNCIA

FONTE: O AUTOR. Níveis de expressão relativa do gene *GAMT* das linhagens de glioblastomas com diferentes fenótipos de resistência a TMZ.  $1 \times 10^6$  células foram plaqueadas em placa de 100 mm e após 24 horas, foi realizada a extração de RNA. O cDNA foi sintetizado e a análise de qtPCR foi realizada em equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems). A expressão do gene de interesse foi normalizada considerando dois genes endógenos: HPRT e GAPDH. Os dados são referentes à três experimentos independentes, realizados em duplicata. \* $p=0.05$ .

Como a alta expressão de *MGMT* é um fator de resistência clássica à temozolomida, e ainda o aumento da expressão de *MGMT* vou evidenciado em linhagem U87MG com resistência adquirida na literatura (KOHSAKA et al., 2012), avaliou-se o grau de expressão desse gene nas linhagens U87MG R em comparação com as linhagens U87MG (FIGURA 22). Percebe-se que há uma tendência de aumento da expressão de *MGMT* na linhagem U87MG R em comparação com a linhagem parental U87MG, porém esse aumento não se apresentou estatisticamente significativo. Isso ocorreu devido à uma das replicatas apresentar um aumento muito elevado em comparação às outras replicatas que elevou o erro do cálculo. Como houve um provável ganho da expressão de *MGMT* na linhagem resistente ao quimioterápico seria interessante avaliar se esse aumento está relacionado com a modulação da via de esfingolipídios. A avaliação do grau de expressão de *MGMT* nas linhagens U87MG tratadas com diferente inibidores da via de esfingolipídios, inibidor de SPHK e de SMASEs, poderá esclarecer essa relação.

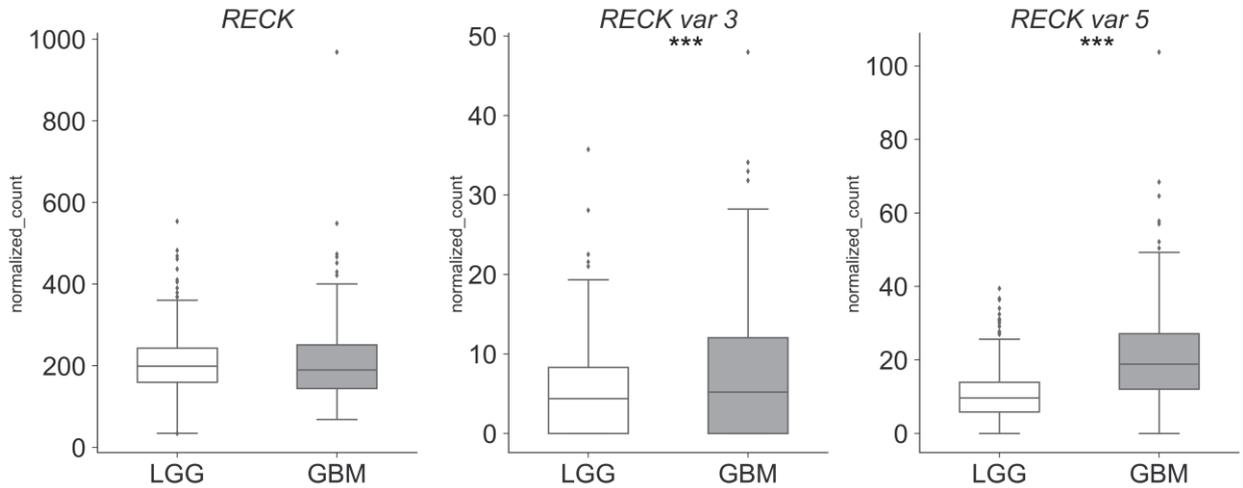
FIGURA 22 – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *MGMT* EM MODELO DE GBM

FONTE: O AUTOR. Níveis de expressão relativa do gene *MGMT* das linhagens de glioblastomas com diferentes fenótipos de resistência a TMZ.  $1 \times 10^6$  células foram plaqueadas em placa de 100 mm e após 24 horas, foi realizada a extração de RNA. O cDNA foi sintetizado e a análise de qtPCR foi realizada em equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems). A expressão do gene de interesse foi normalizada considerando dois genes endógenos: HPRT e GAPDH. Os dados são referentes à três experimentos independentes, realizados em duplicata. \* $p=0.05$ . a) A expressão relativa de *MGMT* na linhagem U87MG R foi calculada em relação a expressão em U87 MG b) A expressão relativa foi calculada em relação a média da expressão das linhagens comparadas.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DA VIA DE ESFINGOLIPÍDIOS MEDIADA POR *RECK*

Com intuito de investigar a relação de *RECK* e de seus transcritos alternativos na progressão e agressividade tumoral, foram avaliados a expressão desses transcritos de *RECK* (canônico, variante 3 e 5) nos diferentes graus de malignidade de glioma utilizando dados públicos de pacientes no TCGA. Na FIGURA 23, percebe-se que a expressão dos transcritos alternativos de *RECK* é maior em gliomas de alto grau, enquanto a expressão do gene *RECK* canônico não se altera. Esses dados confirmam os dados da literatura revisado (TROMBETTA-LIMA et al., 2015).

FIGURA 23 - EXPRESSÃO DE *RECK* (FORMA CANÔNICA E TRANSCRITOS ALTERNATIVOS) EM DIFERENTES GRAUS DE GLIOMA

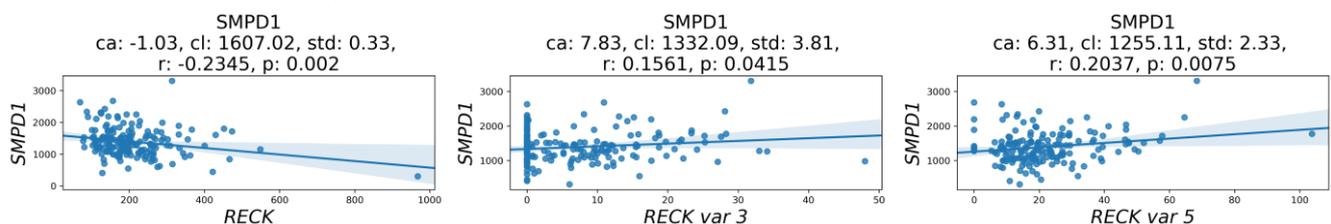


FONTE: O AUTOR. Expressão de *RECK*, *RECK* variante 3 e *RECK* variante 5. Dados do TCGA foram obtidos da plataforma *firebrowse* contendo amostras derivadas de pacientes LGG (N=516) e GBM (N=160). Os dados foram divididos de acordo com o grau de malignidade, baixo grau (LGG) e alto grau (GBM) \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Com intuito de se investigar se *RECK* e seus transcritos alternativos têm uma relação com genes envolvidos na via de esfingolipídios, avaliou-se a relação da expressão desses transcritos com a expressão de enzimas envolvidas em vias de lipídios importantes para a tumorigênese utilizando dados pacientes com glioblastoma (N=160). As FIGURA 24 e 25 demonstram a relação da expressão das isoformas de *RECK* com diferentes enzimas da via de esfingolipídios que demonstraram significância estatística.

Na FIGURA 24 observa-se que o gene *SMPD1* ( $r = -0,2345$ ;  $p < 0,01$ ) apresenta uma relação negativa com a expressão de *RECK*, porém uma relação positiva com *RECK var 5* ( $r = 0,2037$ ;  $p < 0,01$ ).

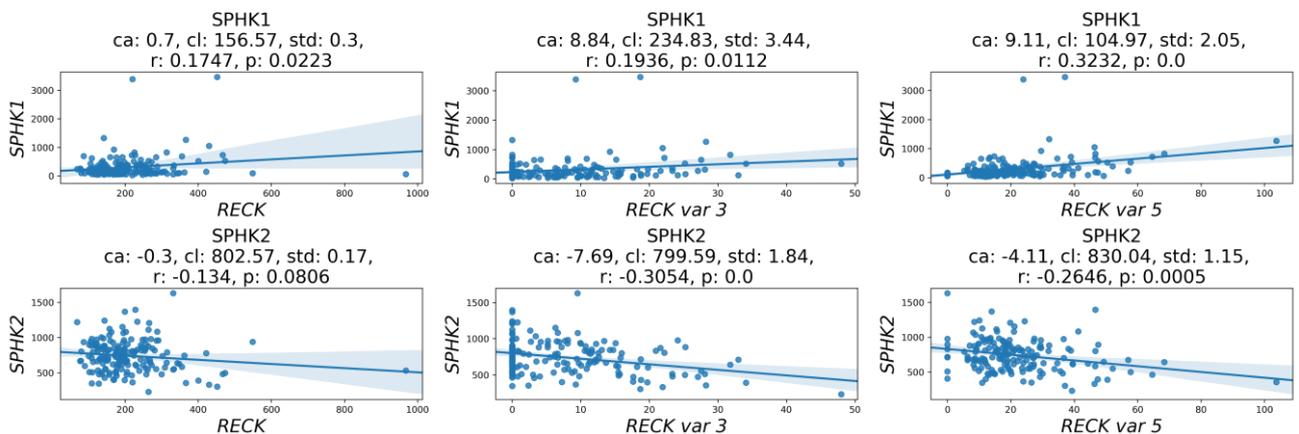
FIGURA 24 - RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DE *RECK* COM *SMPD1*.



FONTE: O AUTOR. Relação de expressão de *RECK*, *RECK* variante 3 e *RECK* variante 5 com enzimas envolvidas na via de esfingolipídios. Dados foram obtidos da plataforma *firebrowse* contendo amostras derivadas de GBM (N=160). Foi realizado a regressão linear dos mínimos quadrados.

Já na FIGURA 25 observamos que há uma relação da expressão das isoformas de *RECK* (variante 3 e 5) com ambas as isoformas de *SPHK*. A variante de 5 de *RECK* apresenta uma relação positiva com *SPHK1* ( $r=0.323$ ;  $p<0,0001$ ), enquanto a variante 3 de *RECK* apresenta uma relação negativa com *SPHK2* ( $r=-0,305$ ;  $p<0,0001$ ). Esses dados são interessantes, uma vez que, os dados revisados na literatura demonstram que *SPHK1* e *SPHK2* estão relacionados com efeitos tumorais, destacando o *RECK* variante 5 que apresenta uma relação positiva com *SPHK1*.

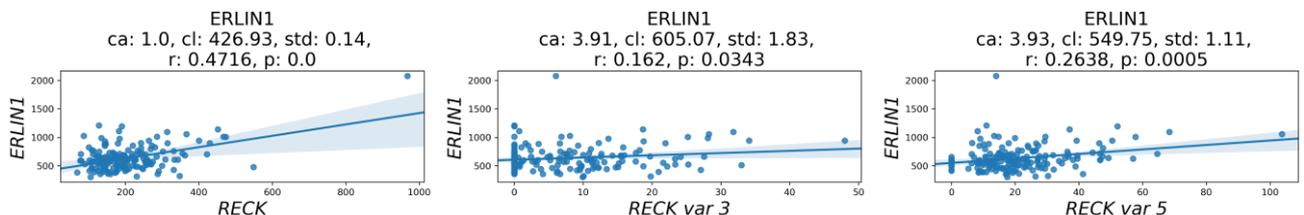
FIGURA 25 - RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DE *RECK* COM *SPHK*.



FONTE: O AUTOR. Relação de expressão de *RECK*, *RECK* variante 3 e *RECK* variante 5 com a expressão de *SPHK1* e *SPHK2*. Dados foram obtidos da plataforma *firebrowse* contendo amostras derivadas de GBM (N=160). Foi realizado a regressão linear dos mínimos quadrados.

Além disso, a expressão de *RECK* canônico apresentou uma relação positiva com a expressão do gene *ERLIN1* ( $r=0,4716$ ,  $p>0,0001$ ) (FIGURA 26). Esse dado sugere uma possível relação de *RECK* com metabolismo de lipídios.

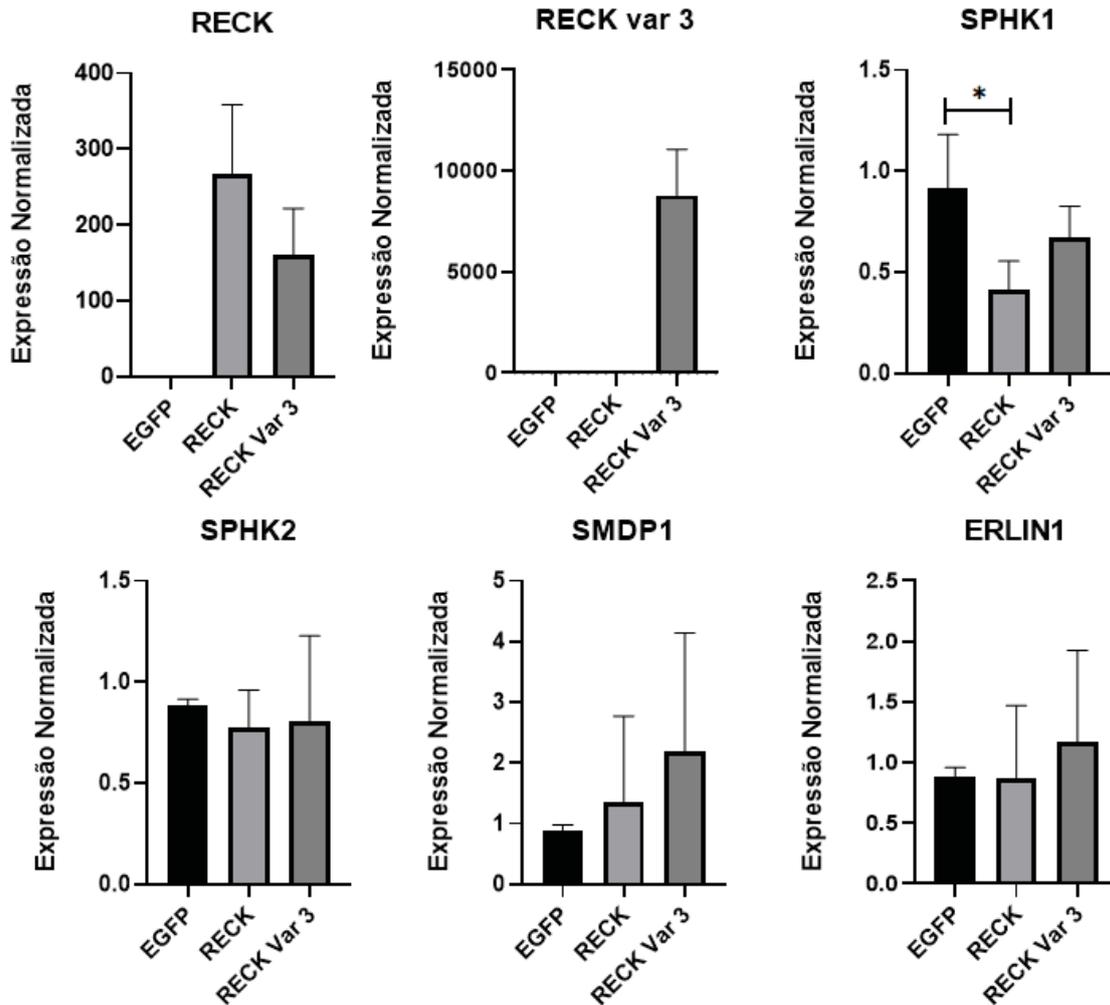
FIGURA 26 - RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DE *RECK* COM *ERLIN1*.



FONTE: O AUTOR. Relação de expressão de *RECK*, *RECK* variante 3 e *RECK* variante 5 com a expressão de *ERLIN1*. Dados foram obtidos da plataforma *firebrowse* contendo amostras derivadas de GBM (N=160). Foi realizado a regressão linear dos mínimos quadrados.

Com base nesses dados de pacientes apresentados, e ainda para esclarecer a relação de expressão de *RECK* e seus transcritos alternativos com a expressão de genes envolvidos na via de esfingolípídios, avaliou-se a expressão dos genes, *SPHK1*, *SPHK2*, *SMPD1* e *ERLIN1*, em modelo celular superexpressando os diferentes transcritos de *RECK* (FIGURA 27). A superexpressão de *RECK* canônico foi capaz de modular negativamente a expressão de *SPHK1*. Esse é um dado interessante uma vez que os dados de pacientes demonstram que os variantes de *RECK* possuem relação de expressão com SPHKs, sugerindo que uma relação da razão da expressão *RECK/RECK* var 5 possa ser importante na modulação da expressão de *SPHK1*.

FIGURA 27 - EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DE ESFINGOLÍPIDIOS NA SUPEREXPRESSÃO DE TRANSCRITOS DE *RECK*



FONTE: O AUTOR. Níveis de expressão relativa dos genes *RECK*, *RECK* var 3, *SPHK1*, *SPHK2*, *SMPD1* e *ERLIN1* das linhagens de glioblastomas superexpressando os diferentes variantes de *RECK* (*RECK* e *RECK* var 3) ou o vetor vazio (*EGFP*) como controle negativo.  $1 \times 10^6$  células foram plaqueadas em placa de 100 mm e após 24 horas, foi realizada a extração de RNA. O cDNA foi

sintetizado e a análise de qtPCR foi realizada em equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems). A expressão do gene de interesse foi normalizada considerando dois genes endógenos: HPRT e GAPDH. Os dados são referentes à três experimentos independentes, realizados em duplicata. \*p=0.05.

## 5 DISCUSSÃO

Devido a sua complexidade e diversidade, os esfingolipídios têm um papel fundamental na regulação celular (ERNST; BRÜGGER, 2014). Um esfingolipídio importante para a biologia de gliomas é a ceramida, que apresenta níveis significativamente baixos nesses tumores, os quais estão associados à progressão de malignidade em astrocitomas (RIBONI et al., 2002). Entretanto, não só os níveis, mas sim, o tamanho da cadeia carbônica desse lipídio está relacionado com tumorigênese, portanto, não necessariamente a redução global de ceramidas está associada à essa patologia (KARAHATAY et al., 2007). A LASS1 é responsável pela síntese de ceramida C18:0, e sua alta expressão associada ao aumento dos níveis de C18:0-Cer foram descritas como associadas a efeitos pró-apoptóticos e antiproliferativos em modelo celular de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (KOYBASI et al., 2004). Essa isoforma de ceramida sintase é mais expressa no sistema nervoso central, e a C18:0-Cer tem um papel importante para o seu funcionamento (GRÖSCH; SCHIFFMANN; GEISLINGER, 2012). Uma redução nos níveis dessa ceramida foi demonstrado em tecido tumoral de glioma quando comparado com tecido normal, e, em modelo celular, a superexpressão de *LASS1* ou o tratamento com C18:0-Cer, promoveu morte celular e indução de estresse de retículo endoplasmático (WANG et al., 2017). Porém, em pacientes diagnosticados com câncer de colón o aumento da expressão de *LASS1* e a redução de C18:0-Cer foram relacionados com tumorigênese (CHEN et al., 2015). Nossos dados demonstram que a expressão de *LASS1* não está relacionada com progressão tumoral, porém em pacientes com fenótipo mais agressivo evidenciamos um ganho da expressão desse gene sugerindo uma relação dessa enzima na agressividade em glioblastomas, porém, futura investigação nos níveis de C18:0-Cer em fenótipos de agressividade deve ser realizada.

A alta expressão da isoforma *LASS2*, foi relacionada com tumorigênese e com o aumento dos níveis das ceramidas C24:1-Cer e C24:0-Cer em modelo de

câncer de mama (SCHIFFMANN et al., 2009). Já em modelo celular, a alta expressão dessa isoforma também elevou a capacidade proliferativa de linhagens tumorais de câncer de mama e de cólon (HARTMANN et al., 2012). Contudo, alguns estudos demonstram que a LASS2 pode estar relacionada, também, com bom prognóstico, reduzindo a invasão em modelo celular de câncer de mama (FAN et al., 2015), podendo inclusive ser considerada uma proteína supressora tumoral, uma vez que em camundongos que tiveram *LASS2* silenciado houve o desenvolvimento de hepatocarcinoma (IMGRUND et al., 2009). É importante ressaltar que mudanças nos níveis de ceramidas geram respostas em células tumorais que irão depender da natureza global e das propriedades físico-químicas de outros tipos de ceramidas presentes na célula (HARTMANN et al., 2013). Percebe-se que estabelecer uma relação de tumorigênese levando em consideração apenas a expressão de uma isoforma de ceramida sintase, sem considerar o conjunto, assim como não considerar a via de esfingolipídios como um todo pode levar a conclusões contraditórias.

Nossos dados demonstram aumento na expressão de enzimas envolvidas na síntese de ceramidas (*LASS1*, *LASS2* e *SMPD1*) associado a um aumento da expressão de enzimas que consomem a ceramida, *SPHK1* e UCGC em tumores de maior grau. Esses dados sugerem que na progressão tumoral há um aumento de ceramidas de cadeia longa, porém, não necessariamente o aumento dessas ceramidas pode estar relacionada com progressão tumoral, uma vez que pode estar havendo a conversão a outros esfingolipídios, como esfingosina-1-fosfato e derivados de gangliosídeos, já descritos por apresentarem propriedades pró-tumorais (SUNG et al., 1995; VAN BROCKLYN et al., 2005). Uma investigação futura da lipidômica em modelo celular por espectrometria de massa poderá confirmar que há um aumento desses esfingolipídios em tumores mais malignos.

A avaliação da agressividade foi realizada utilizando dados de pacientes com glioblastomas e modelo celular de glioblastomas com diferentes fenótipos de agressividade. Em pacientes GBM que apresentaram um fenótipo mais agressivo (menor índice de Karnofsky ou baixa sobrevida) há uma maior expressão de genes que codificam para enzimas relacionados com a síntese de ceramidas, *SMPD1*, *LASS1* e *LASS2* aliado a uma redução da expressão de enzimas que consomem ceramidas (*SPHK1* e UGCC). Esses dados sugerem, portanto, que um aumento nos níveis de ceramidas, principalmente das C18-Cer, C24:1-Cer e C24:0-Cer, pode

estar relacionado com agressividade tumoral em glioblastoma. A redução na expressão dos genes que codificam para *SPHK1* e *UGCC* parecem ser contraditórias considerando dados na literatura que os correlaciona com propriedades pró-tumorais (SUNG et al., 1995; VAN BROCKLYN et al., 2005). Porém, não foram encontrados trabalhos que relacionam a expressão desses genes em modelos de agressividade em glioblastoma, e, portanto, nossos dados sugerem que em GBM, o aumento dos níveis de C18-Cer, C24:1-Cer e C24:0-Cer geram efeitos relacionados com pior prognóstico e menor sobrevida. Ceramidas tem um papel fundamental na modulação de proteínas de membrana (SILVA; FUTERMAN; PRIETO, 2009), e uma hipótese que sugerimos é que células de maior grau, por apresentar um perfil dessas proteínas assim como uma natureza esfingolipídica diferente em comparação com tumores de baixo grau, o aumento de ceramidas e não de S1P ou gangliosídeos possa ter um papel na modulação de agressividade que pode estar relacionado com esse perfil diferenciado. Além disso, no nosso modelo de agressividade considerando células de glioblastoma com diferentes perfis de proliferação, a linhagem com menor fenótipo de agressividade/proliferação apresentou ausência de sinais referentes a esfingomielina (SM) na análise de RMN HSQC, que pode ser explicado, pelo menos em parte, pela a maior expressão do gene que codifica esfingomielinase *SMPD1*, quando comparamos com as linhagens mais proliferativas/agressivas. O aumento no nível de esfingomielinases em modelo de células tumorais promove o acúmulo de ceramidas e inibição do crescimento celular, o que aponta uma papel na regulação de esfingomielinas na proliferação celular (TAFESSE et al., 2007). Outros trabalhos mostram que gentamicina e resveratrol promovem inibição da proliferação de células tumorais por aumentar os níveis de *SMPD1* (ALBI et al., 2019; MIZUTANI et al., 2016). A linhagem A172, que apresenta menor atividade proliferativa, apresentou uma maior expressão desse gene, o que sugere um maior consumo de esfingomielina e aumento de ceramidas, já que não houve alteração nos níveis de expressão de *SPHK 1* e *2*. Uma investigação da natureza e dos níveis de ceramidas nessa linhagem, podem ajudar a confirmar e esclarecer quais ceramidas que estão relacionados com agressividade.

De maneira interessante, a linhagem com resistência adquirida U87MG R apresentou redução da atividade proliferativa comparada com a U87MG, que pode ser explicada, pelo menos em parte, pela redução de esfingomielina acompanhada

do aumento dos níveis de *SMPD1*. Apesar de baixa taxa de proliferação, a U87MG R apresentou um maior fluxo metabólico evidenciado pela presença de creatina no extrato lipídico e confirmado pelo ganho de expressão de *GAMT*. A concentração desse metabólico está envolvido nos processos de geração e armazenamento de energia (NASRALLAH; FEKI; KAABACHI, 2010). Vale destacar que alterações na via da creatina, que indicam um aumento no fluxo metabólico e geração de energia, foram também evidenciadas em outros modelos tumorais (GAZDAR et al., 1981; SANTANA-FILHO et al., 2017).

Em relação aos mecanismos de resistência tumoral, um estudo demonstrou que a inibição de esfingomielinase promoveu a sensibilização à drogas em tumor, em painel utilizando diferentes células tumorais (ELLEGAARD et al., 2013). Podemos observar no nosso modelo celular que a aquisição de resistência está relacionada com aumento dos níveis de *SMPD1* (FIGURA 5) associado à uma possível redução nos níveis de esfingomielina (FIGURA 17). De maneira interessante, em pacientes que apresentam resistência ao tratamento a expressão do gene *SMPD1* é maior sugerindo que a ação de esfingomielinase pode ter relação com resistência à TMZ.

Um mecanismo descrito no qual gliomas apresentam resistência à temozolomida sugere que células resistentes mantém os níveis de ceramidas baixos através do consumo desses esfingolipídios, assim como pelo aumento nos níveis de S1P (HADI. et al., 2015). Porém, o mecanismo celular envolvido nessa resistência ainda é pouco explorado.

A linhagem U87MG R apresentou níveis de expressão do gene *SPHK1* e *SPHK2* aumentados (o que corrobora com a proposta apresentada em Hadi et al., 2015). Já linhagem T98G, que apresenta resistência natural, não apresentou modulação nos níveis de expressão dos genes avaliados, sugerindo que a via de esfingolipídios está mais relacionada na aquisição de resistência a temozolomida. Os dados de pacientes confirmam a relação de resistência com a alta expressão de *SPHK1*. Trabalhos demonstram que a inibição de *SPHK1* promove a sensibilização à quimioterapia em diferentes tumores (GAULT; OBEID, 2011). Em glioblastoma, o tratamento com inibidor de *SPHK* combinado com doses sub letais de temozolomida promoveu morte celular (NOACK et al., 2014), essa combinação também foi importante para a sensibilização à radioterapia (OANCEA-CASTILLO et al., 2017).

Modelos tumorais apontam que alta expressão de *LASS2* pode estar envolvida na resistência a quimioterápicos (BRACHTENDORF; EL-HINDI; GRÖSCH,

2019). Apesar de que em glioblastoma um determinado gene (*Bcl2L13*) envolvido na resistência à quimioterapia promove a inibição da atividade de LASS2 (JENSEN et al., 2014). Novamente, para termos um melhor esclarecimento do mecanismo pelo qual esfingolípídios estão envolvido na resistência à TMZ devemos considerar a via como um todo.

Assim sendo, o aumento de expressão de *LASS2*, assim como, o aumento de esfingomielinases podem promover aumento na síntese ceramidas, principalmente as ceramidas C24:1-Cer e C24:0-Cer, que são convertidas a esfingosina-1-fosfato pelo aumento da expressão de SPHKs. Além disso, S1P pode modular positivamente a via de proteína quinase C (LAMPASSO et al., 2001)(VAN BROCKLYN et al., 2002), que é uma via de estímulo da expressão de *MGMT* (SHARMA et al., 2009). Nossa hipótese é que S1P pode ser importante para elevar a expressão de *MGMT*, assim levando a aquisição de resistência ao tratamento à TMZ. Uma investigação mais profunda na relação de S1P e expressão de *MGMT* deve ser explorada, e essa via se demonstra promissora para tal investigação.

Apesar de gangliosídeos serem relacionados com resistência tumoral a diversos tratamentos, os dados desse trabalho sugerem que pacientes resistentes ao tratamento com TMZ não apresentam alteração nos níveis de expressão de *UCGC*. De maneira geral, o desenvolvimento primário de resistência em glioblastoma está relacionado com altos níveis de C24:1-Cer, C24:0-Cer, esfingosina-1-fosfato e baixos níveis de esfingomielina e essa mudança de esfingolípídios podem estar promovendo o aumento na expressão de *MGMT*. A maneira pela qual esfingolípídios podem estar promovendo essa resistência deve ser mais explorado. Porém, podemos especular pelo menos duas hipóteses, a primeira se baseia no fato de que esses esfingolípídios por promoverem efeitos anti apoptóticos podem elevar a sobrevivência do tumor contra quimioterapia. Não obstante, com as observações ilustradas no presente trabalho podemos também sugerir que, uma vez que a expressão de *MGMT* está relacionado com a metilação de seu promotor, esses esfingolípídios poderiam elevar a expressão desse gene pela a regulação de tal promotor.

Vale destacar o papel do reticulo endoplasmático (RE) na síntese de esfingolípídios, que pode controlar os níveis e a natureza desses lipídios (KATO; NISHITOH, 2015). Uma proteína presente nessa organela, a proteína ERLIN1, presente em *lipid rafts* de membrana do reticulo endoplasmático, é capaz de inibir a

atividade SREBP (um fator de transcrição importante no metabolismo de lipídios) e pode estar relacionada de maneira indireta com o metabolismo lipídico que são sintetizados nessa organela (HUBER et al., 2013)(BROWMAN et al., 2006)(HUBER et al., 2013). Assim, investigamos se essa proteína pode ter um papel importante na regulação de esfingolipídios na progressão tumoral, agressividade e resistência. Em pacientes percebemos que o aumento da expressão de *ERLIN1* está relacionado com alto grau de glioma. Porém, em pacientes com pior prognóstico (menor índice de Karnofsky) percebemos a redução da expressão de *ERLIN1*. Ainda em pacientes com maior expressão de *MGMT*, assim como em modelo celular de resistência adquirida, também se observou uma maior expressão de *ERLIN1*. Pouco se sabe o papel de *ERLIN1* na regulação de esfingolipídios e considerando que esse o aumento da expressão desse gene está relacionado com maior malignidade tumoral em glioma uma futura investigação de seu papel parece ser promissora. Seria interessante investigar como a expressão desse gene é capaz de modular a expressão de genes envolvidos na via de esfingolipídios.

A terceira parte desse trabalho teve como objetivo avaliar a relação de *RECK* com esfingolipídios. Sabendo que *RECK* é um marcador de bom prognóstico em diferentes modelos tumorais. Decidiu-se avaliar se a expressão de *RECK* e seus transcritos está relacionado com a expressão de genes envolvidos na via de esfingolipídios.

A expressão dos transcritos alternativos de *RECK* é maior em gliomas de alto grau, enquanto a expressão do gene *RECK* canônico não se altera, esses dados confirmam dados já publicados por TROMBETTA et al., 2015, que correlacionou aumento de expressão do transcrito alternativo *RECK var 3* e *RECK var 5* na progressão de gliomas. Ainda nesse mesmo estudo, o aumento da expressão de *RECK* canônico, assim como o aumento da razão *RECK/RECK var 3* e *RECK/RECK var 5* está relacionado com maior sobrevida em pacientes com glioblastoma (TROMBETTA-LIMA et al., 2015). Esse aumento na razão de *RECK/RECK var 3* também foi descrito em modelo de melanoma e está relacionado com menor grau de tumor (JACOMASSO et al., 2019).

Nossos dados mostram que a superexpressão de *RECK* canônico leva a redução na expressão de *SPHK1* (Figura 23), o aumento da expressão dessa enzima foi previamente descrita na relação de tumorigênese, e ainda em pacientes com glioblastomas há uma relação positiva da expressão desse gene com *RECK var*

5 ( $r=0.323$ ;  $p<0,0001$ ) (Figura 22). Portanto podemos sugerir que a relação entre os efeitos de supressão tumoral de *RECK* e efeitos pro tumorais dos variantes alternativos podem estar envolvidos na modulação de progressão e agressividade tumoral, pelo menos em parte, pelos efeitos na via de esfingolipídios mediados por esfingosina-1-fosfato. Ou seja, os níveis de *RECK/RECK var 5* podem contribuir na modulação dos níveis de esfingosina-1-fosfato presente no glioblastoma. Além disso, como as SPHKs estão envolvidas na resistência ao tratamento, e considerando que o aumento *RECK/RECK var 5* e *RECK/RECK var 3* (TROMBETTA-LIMA et al., 2015) está relacionado ao aumento na taxa de sobrevivência de pacientes tratados com quimioterapia, podemos sugerir que o aumento *RECK* acompanhada da redução de seus variantes alternativos podem levar a um melhor resposta ao tratamento devido à redução dos níveis de *SPHK1*. A principal atividade supressora de tumor promovida por *RECK* é a inibição direta de metaloproteases de matriz extracelular (MMPs) (MIKI et al., 2007; TAKAHASHI et al., 1998). Considerando que *SPHK1* é um regulador positivo de TIMP-1 (YAMANAKA et al., 2004), que níveis de S1P é capaz de aumentar a invasão de glioblastoma (YOUNG; PEARL; VAN BROCKLYN, 2009) e a expressão de *MMP-2* (WU et al., 2005), nossos dados sugerem uma nova forma de regulação de MMPs mediado por *RECK*, através da modulação da expressão de *SPHK1*.

Os dados de pacientes mostram uma relação bastante interessante entre a expressão de *RECK* canônico e *ERLIN1* ( $r=0,4716$ ;  $p<0,0001$ ). Como já descrito, *ERLIN1* pode apresentar um papel importante na regulação de esfingolipídios, portanto, essa relação de expressão pode ser importante para explicar modulação de genes da via esfingolipídios mediada por *RECK*. É interessante avaliar a lipidômica das linhagens supreexpressando *RECK* para evidenciar e confirmar essa modulação mediado por *RECK*. Em nosso modelo celular com superexpressão de *RECK* não encontramos aumento de expressão de *ERLIN1*, porém é importante ressaltar que respostas em células tumorais dependem dos tipos de esfingolipídios presentes na célula (HARTMANN et al., 2013). Ainda, a superexpressão de *RECK* em modelo celular de neuroblastoma foi capaz de induzir estresse de retículo endoplasmático (CHEN; TSAI; TSENG, 2013), e considerando que estresse de RE tem um papel importante no metabolismo de lipídios (HAN; KAUFMAN, 2016), vale a pena investigar se a modulação de *SPHK1* mediada por *RECK* pode ser dependente de estresse de RE.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Percebe-se que para estabelecer uma relação de progressão tumoral e esfingolipídios e entendermos melhor o papel desses lipídios na biologia tumoral devemos analisar a via considerando cada etapa, e analisando-a como um todo.

Aqui demonstramos que o nível de expressão de enzimas envolvidas na via de esfingolipídios é modulado de maneira diferente no ganho de malignidade, quando comparado com agressividade. Para o ganho de malignidade sugere-se o aumento de ceramidas de cadeia muito longa, associado ao aumento de esfingosina-1-fosfato e derivados de gangliosídios. Já na agressividade de GBM, o aumento nos níveis de ceramidas, principalmente das C18-Cer, C24:1-Cer e C24:0-Cer, parece ser importante para o ganho do fenótipo de agressividade em pacientes. Esses dados sugerem que após ganho de malignidade, o aumento dos níveis de ceramidas e não de esfingosina-1-fosfato e gangliosídios, são mais importantes para se estabelecer o fenótipo de agressividade. A investigação de natureza esfingolipídica no modelo celular de agressividade será importante para confirmarmos esses dados.

Sugere-se que o ganho de resistência a TMZ está relacionado com altos níveis de C24:1-Cer, C24:0-Cer, esfingosina-1-fosfato e baixos níveis de esfingomielina, que podem estar promovendo o aumento na expressão de *MGMT*. A utilização de inibidores dessas enzimas, em nosso modelo celular, pode auxiliar na investigação de relação de esfingolipídios com ganho de expressão de *MGMT*.

Por fim, a avaliação da expressão de *RECK* e seus transcritos alternativos mostrou uma relação interessante com esfingolipídios. Propomos um novo papel de supressão tumoral mediado por *RECK*, através da modulação da expressão de *SPHK1*. Futuras investigações serão realizadas para esclarecer por qual via essa modulação ocorre.

## REFERÊNCIAS

ABOUGHALIA, A. H. et al. Evaluation of RECK mRNA and RECK protein in tissue and serum of breast cancer patients. **Gene Reports**, v. 12, p. 9–14, 2018.

ADOSRAKU, R. K. et al. NMR lipid profiles of cells, tissues and body fluids: Proton NMR of human erythrocyte lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 35, p. 1925–1931, 1994.

ALBI, E. et al. Gentamicin targets acid sphingomyelinase in cancer: The case of the human gastric cancer NCI-N87 cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, 2019.

BARCELÓ-COBLIJN, G. et al. Sphingomyelin and sphingomyelin synthase (SMS) in the malignant transformation of glioma cells and in 2-hydroxyoleic acid therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 49, p. 19569–19574, 2011.

BARTKE, N.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids: Metabolism and function. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. SUPPL., p. S91–S96, 2009.

BECKMANN, N. et al. Inhibition of acid sphingomyelinase by tricyclic antidepressants and analogs. **Frontiers in Physiology**, v. 5 AUG, n. September, p. 1–14, 2014.

BLANC, J. L. et al. Correlation of clinical features and methylation status of MGMT gene promoter in glioblastomas. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 68, n. 3, p. 275–283, 2004.

BRACHTENDORF, S.; EL-HINDI, K.; GRÖSCH, S. Ceramide synthases in cancer therapy and chemoresistance. **Progress in Lipid Research**, v. 74, n. February, p. 160–185, 2019.

BROWMAN, D. T. et al. Erlin-1 and erlin-2 are novel members of the prohibitin family of proteins that define lipid-raft-like domains of the ER. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 15, p. 3149–3160, 2006.

CASU, M. et al. NMR lipid profiles of cells, tissues and body fluids. I— 1D and 2D Proton NMR of lipids from rat liver. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 29, n. 6, p. 594–602, 1991.

CHEN, L. et al. Endocannabinoid and ceramide levels are altered in patients with colorectal cancer. **Oncology Reports**, v. 34, n. 1, p. 447–454, 2015.

CHEN, Y.; TSAI, Y. H.; TSENG, S. H. RECK regulated endoplasmic reticulum stress response and enhanced cisplatin-induced cell death in neuroblastoma cells. **Surgery (United States)**, v. 154, n. 5, p. 968–979, 2013.

CHO, H.-Y. et al. Perillyl Alcohol for the Treatment of Temozolomide-Resistant Gliomas. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 11, n. 11, p. 2462 LP – 2472, 1 nov. 2012.

DAGOGO-JACK, I.; SHAW, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, n. 2, p. 81–94, 2018.

DAIDO, S. et al. Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. **Cancer Research**, v. 64, n. 12, p. 4286–4293, 2004.

- DENNY, B. J. et al. NMR and Molecular Modeling Investigation of the Mechanism of Activation of the Antitumor Drug Temozolomide and Its Interaction with DNA. **Biochemistry**, v. 33, n. 31, p. 9045–9051, 1994.
- DESAI, A.; VYAS, T.; AMIJI, M. Cytotoxicity and Apoptosis Enhancement in Brain Tumor Cells Upon Coadministration of Paclitaxel and Ceramide in Nanoemulsion Formulations. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 7, p. 2245–2756, 2008.
- DRABLØS, F. et al. Alkylation damage in DNA and RNA - Repair mechanisms and medical significance. **DNA Repair**, v. 3, n. 11, p. 1389–1407, 2004.
- EDGAR, J. M.; NAVE, K. A. The role of CNS glia in preserving axon function. **Current Opinion in Neurobiology**, n. 19, p. 498–504, 2009.
- ELLEGAARD, A. M. et al. Sunitinib and SU11652 inhibit acid sphingomyelinase, destabilize lysosomes, and inhibit multidrug resistance. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 12, n. 10, p. 2018–2030, 2013.
- ENKAVI, G. et al. Concerted regulation of npc2 binding to endosomal/lysosomal membranes by bis(monoacylglycerol)phosphate and sphingomyelin. **PLoS Computational Biology**, v. 13, n. 10, p. 1–21, 2017.
- ERNST, A. M.; BRÜGGER, B. Sphingolipids as modulators of membrane proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, n. 5, p. 665–670, 2014.
- FAN, S. H. et al. CERS2 Suppresses Tumor Cell Invasion and is Associated with Decreased V-ATPase and MMP-2/MMP-9 Activities in Breast Cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 4, p. 502–513, 2015.
- FRIEDMANN-MORVINSKI, D. Glioblastoma heterogeneity and cancer cell plasticity. **Critical Reviews in Oncogenesis**, v. 19, n. 5, p. 327–336, 2014.
- FUJITA, A. et al. Gangliosides GM1 and GM3 in the Living Cell Membrane Form Clusters Susceptible to Cholesterol Depletion and Chilling. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, p. 2112–2122, 2007.
- FYRST, H.; SABA, J. D. An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. **Nature Chemical Biology**, v. 6, n. 7, p. 489–497, 2010.
- GAULT, C. R.; OBEID, L. M. Still Benched on its Way to the Bedside: Sphingosine Kinase 1 as an Emerging Target in Cancer Chemotherapy. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 46, n. 4, p. 342–351, 2011.
- GAZDAR, A. F. et al. Levels of creatine kinase and its BB Isoenzyme in lung cancer specimens and cultures. **Cancer Research**, v. 41, n. 7, p. 2773–2777, 1981.
- GRÖSCH, S.; SCHIFFMANN, S.; GEISSLINGER, G. Chain length-specific properties of ceramides. **Progress in Lipid Research**, v. 51, n. 1, p. 50–62, 2012.
- GUYTON, A. C.; HALL, E. J. **Textbook of medical physiology**. 11. ed. Pennsylvania: Elsevier Inc., 2016.
- HAAR, C. P. et al. Drug resistance in glioblastoma: A mini review. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 6, p. 1192–1200, 2012.

HADI., L. A. et al. **Bioactive sphingolipids in cancer biology and therapy**. [s.l: s.n.].

HAN, J.; KAUFMAN, R. J. The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. **Journal of Lipid Research**, v. 57, n. 8, p. 1329–1338, 2016.

HANIF, F. et al. Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 1, p. 3–9, 2017.

HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 139–150, 2008.

HARTMANN, D. et al. Long chain ceramides and very long chain ceramides have opposite effects on human breast and colon cancer cell growth. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 44, n. 4, p. 620–628, 2012.

HARTMANN, D. et al. The equilibrium between long and very long chain ceramides is important for the fate of the cell and can be influenced by co-expression of CerS. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 45, n. 7, p. 1195–1203, 2013.

HERNDON, J. M.; TOME, M. E.; DAVIS, T. P. Development and Maintenance of the Blood-Brain Barrier. **Primer on Cerebrovascular Diseases: Second Edition**, v. 20989, p. 51–56, 2017.

HUBER, M. D. et al. Erlins restrict SREBP activation in the ER and regulate cellular cholesterol homeostasis. **Journal of Cell Biology**, v. 203, n. 3, p. 427–436, 2013.

IMGRUND, S. et al. Adult ceramide synthase 2 (CERS2)-deficient mice exhibit myelin sheath defects, cerebellar degeneration, and hepatocarcinomas. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 48, p. 33549–33560, 2009.

JACOMASSO, T. et al. The alternatively spliced RECK transcript variant 3 is a predictor of poor survival for melanoma patients being upregulated in aggressive cell lines and modulating MMP gene expression in vitro. **Melanoma Research**, p. 1, 2019.

JENSEN, S. A. et al. Bcl2L13 is a ceramide synthase inhibitor in glioblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 15, p. 5682–5687, 2014.

KARAHATAY, S. et al. Clinical relevance of ceramide metabolism in the pathogenesis of human head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): Attenuation of C18-ceramide in HNSCC tumors correlates with lymphovascular invasion and nodal metastasis. **Cancer Letters**, v. 256, n. 1, p. 101–111, 2007.

KATO, H.; NISHITOH, H. Stress responses from the endoplasmic reticulum in cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 5, n. APR, p. 1–15, 2015.

KIM, R. H. et al. Export and functions of sphingosine-1-phosphate. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1791, n. 7, p. 692–696, 2009.

KIM, W. H. et al. Ceramide induces non-apoptotic cell death in human glioma cells. **Neurochemical Research**, v. 30, n. 8, p. 969–979, 2005.

KOHSAKA, S. et al. STAT3 inhibition overcomes temozolomide resistance in glioblastoma by downregulating MGMT expression. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 11, n. 6, p. 1289–1299, 2012.

- KOLTER, T.; SANDHOFF, K. PRINCIPLES OF LYSOSOMAL MEMBRANE DIGESTION: Stimulation of Sphingolipid Degradation by Sphingolipid Activator Proteins and Anionic Lysosomal Lipids. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, n. 1, p. 81–103, 2005.
- KOYBASI, S. et al. Defects in cell growth regulation by C18:0-ceramide and longevity assurance gene 1 in human head and neck squamous cell carcinomas. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 43, p. 44311–44319, 2004.
- LAMPASSO, J. D. et al. Sphingosine-1-phosphate effects on PCK isoform expression in human osteoblastic cells. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 65, n. 3, p. 139–146, 2001.
- LAUG, D.; GLASGOW, S. M.; DENEEN, B. A glial blueprint for gliomagenesis. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 393–403, 2018.
- LITMAN, B. J.; MITCHELL, D. C. A role for phospholipid polyunsaturation in modulating membrane protein function. **Lipids**, v. 31, n. 1, p. S193–S197, 1996.
- LOEB, L. A. Human cancers express mutator phenotypes: Origin, consequences and targeting. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 6, p. 450–457, 2011.
- LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, 2007.
- LOUIS, 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, 2016.
- MANDALA, S. M. et al. Sphingoid base 1-phosphate phosphatase: A key regulator of sphingolipid metabolism and stress response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 1, p. 150 LP – 155, 6 jan. 1998.
- MAYCON, L. Cuidados Paliativos Oncológicos - Controle de Sintomas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 2, p. 191–211, 2002.
- MIDDLETON, M. R.; MARGISON, G. P. Improvement of chemotherapy efficacy by inactivation of a DNA-repair pathway. **Lancet Oncology**, v. 4, n. 1, p. 37–44, 2003.
- MIKI, T. et al. The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 16, p. 12341–12352, 2007.
- MIZUTANI, N. et al. Resveratrol-induced transcriptional up-regulation of ASMase (SMPD1) of human leukemia and cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 470, n. 4, p. 851–856, 2016.
- MORJANI, H. et al. Elevation of glucosylceramide in multidrug-resistant cancer cells and accumulation in cytoplasmic droplets. **International Journal of Cancer**, v. 94, n. 2, p. 157–165, 2001.
- NASRALLAH, F.; FEKI, M.; KAABACHI, N. Creatine and Creatine Deficiency Syndromes: Biochemical and Clinical Aspects. **Pediatric Neurology**, v. 42, n. 3, p. 163–171, 2010.

NELSON, D.; COX, M. **Principles of biochemistry**. 1. ed. New York: Freeman and Company, 2008.

NEWLANDS, E. S. et al. Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045: M&U 39831: NSC 362856). **British Journal of Cancer**, v. 65, n. 2, p. 287–291, 1992.

NOACK, J. et al. A sphingosine kinase inhibitor combined with temozolomide induces glioblastoma cell death through accumulation of dihydrosphingosine and dihydroceramide, endoplasmic reticulum stress and autophagy. **Cell Death and Disease**, v. 5, n. 9, p. 1–12, 2014.

OANCEA-CASTILLO, L. R. et al. Comparative analysis of the effects of a sphingosine kinase inhibitor to temozolomide and radiation treatment on glioblastoma cell lines. **Cancer Biology and Therapy**, v. 18, n. 6, p. 400–406, 2017.

OGRETMEN, B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 1, p. 33–50, 2017.

OGRETMEN, B.; HANNUN, Y. A. Updates on functions of ceramide in chemotherapy-induced cell death and in multidrug resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 4, n. 6, p. 368–377, 2001.

OH, J. et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. **Cell**, v. 107, n. 6, p. 789–800, 2001.

OSUKA, S.; MEIR, E. G. VAN. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma : the way forward. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 2, p. 415–426, 2017.

PAN, Q. et al. Chemoresistance to Temozolomide in Human Glioma Cell Line U251 is Associated with Increased Activity of O6-methylguanine-DNA Methyltransferase and Can be Overcome by Metronomic Temozolomide Regimen. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 62, n. 1, p. 185–191, 2012.

RABIEN, A. et al. Decreased RECK Expression Indicating Proteolytic Imbalance in Prostate Cancer is Associated with Higher Tumor Aggressiveness and Risk of Prostate-Specific Antigen Relapse after Radical Prostatectomy. **European Urology**, v. 51, n. 5, p. 1259–1266, 2007.

RIBONI, L. et al. Ceramide levels are inversely associated with malignant progression of human glial tumors. **Glia**, v. 39, n. 2, p. 105–113, 2002.

ROBINSON, S. R.; NOONE, D. F.; O'DOWD, B. S. Ependymocytes and supra-ependymal axons in rat brain contain glutamate. **Glia**, v. 17, n. 4, p. 345–348, 1996.

RUSZNÁK, Z. et al. Adult neurogenesis and gliogenesis: Possible mechanisms for neurorestoration. **Experimental Neurobiology**, v. 25, n. 3, p. 103–112, 2016.

SANTANA-FILHO, A. P. DE et al. NMR metabolic fingerprints of murine melanocyte and melanoma cell lines: Application to biomarker discovery. **Scientific Reports**, v. 7, n. February 2016, p. 1–9, 2017.

SCARLATTI, F. et al. Ceramide-mediated Macroautophagy Involves Inhibition of Protein Kinase B and Up-regulation of Beclin 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 18, p. 18384–18391, 2004.

SCHAAFSMA, J.; OSOBA, D. The Karnofsky performance status scale re-examined: a cross-validation with the EORTC-C30. **Quality of Life Research**, v. 3, n. 6, p. 413–424, 1994.

SCHIFFER, D. The Origin of Gliomas in Relation to the Histological Diagnosis. In: **Brain Tumor Pathology: Current Diagnostic Hotspots and Pitfalls**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. p. 3–18.

SCHIFFMANN, S. et al. Ceramide synthases and ceramide levels are increased in breast cancer tissue. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 5, p. 745–752, 2009.

SCHNAAR RL, K. T. Glycosphingolipids. In: VARKI, A. et al. (Eds.). . **Essentials of Glycobiology [Internet]**. NY: [s.n.]. p. 2015–2017.

SENTELLE, R. D. et al. Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. **Nature Chemical Biology**, v. 8, n. 10, p. 831–838, 2012.

SHARMA, S. et al. Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis. **Anticancer Research**, v. 29, n. 10, p. 3759–3768, 2009.

SHIMANO, H.; SATO, R. SREBP-regulated lipid metabolism: Convergent physiology-divergent pathophysiology. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 12, p. 710–730, 2017.

SILVA, L. C.; FUTERMAN, A. H.; PRIETO, M. Lipid raft composition modulates sphingomyelinase activity and ceramide-induced membrane physical alterations. **Biophysical Journal**, v. 96, n. 8, p. 3210–3222, 2009.

SNIDER, A. J.; GANDY, K. A. O.; OBEID, L. M. Sphingosine Kinase: Role in Regulation of Bioactive Sphingolipid Mediators in Inflammation. v. 92, n. 6, p. 707–715, 2010.

SNYDER, J. M. et al. **Nervous system**. [s.l: s.n.].

SPENER, F. et al. Editorial: What is lipidomics? **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, n. 9, p. 481–482, 2003.

STEVENS, M. F. G. et al. Antitumor Activity and Pharmacokinetics in Mice of 8-Carbamoyl-3-methyl-imidazo[5, 1-d], 2, 3, 5-tetrazin-4(3/f)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a Novel Drug with Potential as an Alternative to Dacarbazine. **Cancer Research**, v. 47, n. 22, p. 5846–5852, 1987.

STIBAN, J.; TIDHAR, R.; FUTERMAN, T. Ceramide Synthases: Roles in Cell Physiology and Signaling. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 688, p. 60–71, 1 jan. 2010.

SUNG, C. -C et al. Correlation of ganglioside patterns of primary brain tumors with survival. **Cancer**, v. 75, n. 3, p. 851–859, 1995.

TAFESSE, F. G. et al. Both sphingomyelin synthases SMS1 and SMS2 are required for sphingomyelin homeostasis and growth in human HeLa cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 24, p. 17537–17547, 2007.

TAKAHASHI, C. et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. **Medical Sciences**, v. 95, n. October, p. 13221–13226, 1998.

TAKEMOTO, N. et al. Low expression of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) indicates a shorter survival after resection in patients with adenocarcinoma of the lung. **Lung Cancer**, v. 58, n. 3, p. 376–383, 2007.

TANIGUCHI, M.; OKAZAKI, T. The role of sphingomyelin and sphingomyelin synthases in cell death, proliferation and migration - From cell and animal models to human disorders. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, n. 5, p. 692–703, 2014.

TERÉS, S. et al. Normalization of sphingomyelin levels by 2-hydroxyoleic acid induces autophagic cell death of SF767 cancer cells. **Autophagy**, v. 8, n. 10, p. 1542–1544, 2012.

TISDALE, M. J. Antitumour imidazotetrazines-XV. Role of guanine O6 alkylation in the mechanism of cytotoxicity of imidazotetrazinones. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 4, p. 457–462, 1987.

TROMBETTA-LIMA, M. et al. Isolation and characterization of novel RECK tumor suppressor gene splice variants. **Oncotarget**, v. 6, n. 32, p. 33120–33133, 2015.

VAN BROCKLYN, J. R. et al. Sphingosine-1-phosphate stimulates human glioma cell proliferation through Gi-coupled receptors: Role of ERK MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase  $\beta$ . **Cancer Letters**, v. 181, n. 2, p. 195–204, 2002.

VAN BROCKLYN, J. R. et al. Sphingosine Kinase-1 Expression Correlates With Poor Survival of Patients With Glioblastoma Multiforme: Roles of Sphingosine Kinase Isoforms in Growth of Glioblastoma Cell Lines. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 64, n. 8, p. 695–705, 2005.

VAN DER HOEVEN, D. et al. Sphingomyelin Metabolism Is a Regulator of K-Ras Function. **Molecular and Cellular Biology**, v. 38, n. 3, p. 1–17, 2017.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. research0034.1, 2002.

VON HOLST, H. et al. The presence of foetal ganglioside antigens 3'-IsoLM1 and 3'6'-IsoLD1 in both glioma tissue and surrounding areas from human brain. **Acta Neurochirurgica**, v. 139, n. 2, p. 141–145, 1997.

WANG, Z. et al. Overexpression of ceramide synthase 1 increases C18-ceramide and leads to lethal autophagy in human glioma. **Oncotarget**, v. 8, n. 61, p. 104022–104036, 2017.

WELLER, M. et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 6, p. e315–e329, 2017.

WESTPHAL, M.; LAMSZUS, K. The neurobiology of gliomas: From cell biology to the development of therapeutic approaches. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 9, p. 495–508, 2011.

WU, W. T. et al. Lysophospholipids enhance matrix metalloproteinase-2 expression in human endothelial cells. **Endocrinology**, v. 146, n. 8, p. 3387–3400, 2005.

YAMANAKA, M. et al. Sphingosine kinase 1 (SPHK1) is induced by transforming growth factor- $\beta$  and mediates TIMP-1 up-regulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 52, p. 53994–54001, 2004.

YEH, S.-C. et al. Glycolipid GD3 and GD3 synthase are key drivers for glioblastoma stem cells and tumorigenicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 20, p. 5592 LP – 5597, 17 maio 2016.

YOUNG, M. M.; KESTER, M.; WANG, H. G. Sphingolipids: Regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 1, p. 5–19, 2013.

YOUNG, N.; PEARL, D. K.; VAN BROCKLYN, J. R. Sphingosine-1-phosphate regulates glioblastoma cell invasiveness through the urokinase plasminogen activator system and CCN1/Cyr61. **Molecular Cancer Research**, v. 7, n. 1, p. 23–32, 2009.

YOUNG, N.; VAN BROCKLYN, J. R. Roles of sphingosine-1-phosphate (S1P) receptors in malignant behavior of glioma cells. Differential effects of S1P2 on cell migration and invasiveness. **Experimental Cell Research**, v. 313, n. 8, p. 1615–1627, 2007.

YUN, C. W.; LEE, S. H. The Roles of Autophagy in Cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 11, p. 1–18, 2018.

ZHANG, J. et al. Acquired resistance to temozolomide in glioma cell lines: Molecular mechanisms and potential translational applications. **Oncology**, v. 78, n. 2, p. 103–114, 2010.

ZHANG, J.; F.G. STEVENS, M.; D. BRADSHAW, T. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. **Current Molecular Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 102–114, 2011.