



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO  
DESENVOLVIMENTO

João Victor Krüger Pinto

**Efeitos do carotenoide fucoxantina na distribuição de componentes da matriz  
extracelular e da glicoproteína-P em células de glioblastoma multiforme humano**

Florianópolis  
2022

João Victor Krüger Pinto

**Efeitos do carotenoide fucoxantina na distribuição de componentes da matriz extracelular e da glicoproteína-P em células de glioblastoma multiforme humano**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Orientador: Profa. Dra. Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar

Coorientador: Dra. Alice Heidrich Prompt

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pinto, João Victor Krüger  
Efeitos do carotenoide fucoxantina na distribuição de  
componentes da matriz extracelular e da glicoproteína-P em  
células de glioblastoma multiforme humano / João Victor  
Krüger Pinto ; orientadora, Cláudia Beatriz Nedel,  
coorientadora, Alice Heidrich Prompt, 2022.  
48 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento,  
Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Glioma. 3.  
Fibronectina. 4. Tenascina-C. 5. Células-tronco tumorais.  
I. Nedel, Cláudia Beatriz. II. Prompt, Alice Heidrich.  
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV.  
Titulo.

João Victor Krüger Pinto

**Efeitos do carotenoide fucoxantina na distribuição de componentes da matriz extracelular e da glicoproteína-P em células de glioblastoma multiforme humano**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

---

Prof.<sup>a</sup> Carla Inês Tasca, Dr.<sup>a</sup>

PPGBQA/CCB/UFSC

---

Prof. Ricardo Castilho Garcez, Dr.

PPGBCD/CCB/UFSC

---

Karen Andrineia de Oliveira, Dr.<sup>a</sup>.

Polícia Científica-SC

---

Prof.<sup>a</sup> Talita da Silva Jeremias, Dr.<sup>a</sup>.

PPGBCD/CCB/UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Evelise Nazari - Coordenação do Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e do Desenvolvimento

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar  
Orientadora

Florianópolis, 2022.

Aos meus familiares e amigos.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer algumas pessoas e entidades pela colaboração a este trabalho e por possibilitarem sua finalização.

Em primeiro lugar, agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina e ao Centro de Ciências Biológicas por toda a infraestrutura.

Também agradeço à FAPESC pela bolsa de estudos disponibilizada.

Aos membros da banca avaliadora, pelo seu tempo disponibilizado a avaliar e contribuir para o melhoramento deste trabalho.

À minha orientadora, prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar, por todo o apoio, direcionamento e ajuda durante esse mestrado e mesmo antes.

À minha coorientadora, Dr.<sup>a</sup> Alice Heidrich Prompt, por toda a sua disponibilidade em me auxiliar no projeto.

À prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carla Inês Tasca, por disponibilizar o espaço do Laboratório de Neuroquímica 4, para que eu pudesse realizar os experimentos, e por toda a ajuda prestada.

Aos meus colegas dos dois grupos de pesquisa pela ajuda, discussões e companhia dentro do laboratório, tornando os dias de trabalho mais leves.

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) e seu corpo técnico-científico, que foram fundamentais para que eu pudesse realizar os experimentos e análises me permitindo usar seus equipamentos.

Aos meus professores, que foram fundamentais para pavimentarem a estrada que me fez chegar até aqui.

Quero agradecer também à minha família, em especial meus pais, Francielle e César, e à minha irmã, Maria Eduarda, que estão sempre ao meu lado, me apoiando e me permitindo realizar este trabalho.

Aos meus amigos, principalmente os que me acompanham desde os tempos de colégio e de graduação, que sempre me proporcionam ótimas memórias e me ajudaram em momentos difíceis.

Amo todos vocês 

## RESUMO

Gliomas são tumores do sistema nervoso central (SNC) com origem nas células gliais ou em suas progenitoras e correspondem a aproximadamente 50% dos tumores primários do SNC. O glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo de glioma mais comum e mais agressivo e sua terapia padrão é a ressecção cirúrgica seguida de rádio e quimioterapia. A temozolomida (TMZ) é o principal quimioterápico utilizado no combate ao GBM, mas apesar dos avanços nos tratamentos, a sobrevida dos pacientes continua abaixo dos 15 meses. Esse prognóstico ruim pode ser devido à presença de células-tronco tumorais (CSC) e à alta taxa de invasão do GBM, que estão envolvidas na resistência tumoral. Alterações em fibronectina (FN), tenascina-C (TNC) e glicoproteína-P (P-gp) podem estar relacionadas com a invasão tumoral e com características de células-tronco. A fucoxantina (Fx) é um composto natural que já demonstrou efeitos anticâncer, inclusive antimigratórios, se mostrando uma substância interessante para um futuro uso clínico. A distribuição e organização de FN, TNC e P-gp em células de GBM (GBM1) após tratamento com Fx 100  $\mu$ M foi analisada através de imunocitoquímica. A Fx diminuiu a marcação de FN, enquanto aumentou a de TNC e de P-gp após 24 horas de tratamento. O efeito em P-gp pode ser visto após 3 e 6 horas. A superexpressão de TNC e de P-gp em tumores está associada com presença de células-tronco e piores prognósticos. Os resultados sugerem que a Fx pode estar promovendo a desdiferenciação das células GBM1.

**Palavras-chave:** Fibronectina. Tenascina-C. Glioma. Resistência a multidrogas. Células-tronco tumorais.

## ABSTRACT

Gliomas are central nervous system (CNS) tumors originating from glial cells or their progenitors and account for approximately 50% of primary CNS tumors. Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and most aggressive type of glioma and its standard therapy is surgical resection followed by radiotherapy and chemotherapy. Temozolomide (TMZ) is the main chemotherapeutic used in GBM treatment, but despite advances in treatments, patient survival remains below 15 months. This poor prognosis may be due to the presence of tumor stem cells (CSC) and the high rate of GBM invasion, which are involved in tumor resistance. Changes in fibronectin (FN), tenascin-C (TNC) and P-glycoprotein (P-gp) may be related to tumor invasion and stem cell characteristics. Fucoxanthin (Fx) is a natural compound that has already demonstrated anticancer, including antimigratory, effects, proving to be an interesting substance for future clinical use. The distribution and organization of FN, TNC and P-gp in GBM cells (GBM1) after treatment with Fx 100  $\mu$ M was analyzed by immunocytochemistry. Fx decreased FN labeling, while TNC and P-gp increased after 24 hours of treatment. The effect on P-gp can be seen after 3 and 6 hours. Overexpression of TNC and P-gp in tumors is associated with the presence of stem cells and worse prognosis. The results suggest that Fx may be promoting the dedifferentiation of GBM1 cells.

**Keywords:** Fibronectin. Tenascin-C. Glioma. Multidrug resistance. Cancer stem cells.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolização da fucoxantina. ....	19
Figura 2 - Estrutura da fibronectina e seu posicionamento da matriz extracelular. ...	21
Figura 3 - Estrutura da tenascina-C e sua interação com a célula. ....	22
Figura 4 - Estrutura e funcionamento da glicoproteína-P. ....	23
Figura 5 - Fucoxantina diminui marcação de fibronectina.....	28
Figura 6 - Fucoxantina aumenta a marcação de tenascina-C. ....	29
Figura 7 - Fucoxantina aumenta a marcação de glicoproteína-P. ....	30
Figura 8 - Fucoxantina aumenta a marcação de glicoproteína-P após 3h e 6h. ....	32

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Classificação das neoplasias do Sistema Nervoso Central. ....	16
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABCB1 – do inglês *ATP-binding cassette subfamily B member 1* (outro nome da glicoproteína-P)
- ABCB1* – gene codificante da proteína ABCB1
- AIC – 5-aminoimidazol-4-carboxamida
- ATP – do inglês *adenosine 5'-triphosphate* (trifosfato de adenosina)
- BHE – barreira hematoencefálica
- CEPSH – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
- CSC – do inglês *cancer stem cells* (células-tronco tumorais)
- DMEM-F12 – do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (meio de cultura para cultura de células)
- DNA – do inglês *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribunucleico)
- EUA – Estados Unidos da América
- FN – fibronectina
- Fx – fucoxantina
- Fxol – fucoxantíol
- GBM – glioblastoma multiforme
- GBM1 – cultura primária de glioblastoma multiforme
- IDH – isocitrato desidrogenase
- IDH1 – isocitrato desidrogenase 1
- LAMEB - Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
- MDR1 – do inglês *multidrug resistance 1* (outro nome da glicoproteína-P)
- MDR1* – gene codificante da proteína MDR1
- MGMT – O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA metiltransferase
- MTIC – 5-(3-metil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida
- MYB – do inglês *myeloblastosis* (família de fatores de transcrição)
- MYBL1 – do inglês *Myb proto-oncogene like 1* (proteína da família MYB)
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- P-gp – do inglês *P-glycoprotein* (glicoproteína-P)
- PBS – do inglês *phosphate buffered saline* (tampão fosfato-salino)
- SBF – soro bovino fetal
- SNC – Sistema Nervoso Central

TMZ – temozolomida

TNC – tenascina-C

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1	GLIOMAS .....	15
1.2	GLIOBLASTOMA MULTIFORME .....	16
1.3	FUCOXANTINA .....	18
1.4	Matriz extracelular.....	20
1.5	Resistência a drogas e glicoproteína P.....	22
1.6	OBJETIVOS .....	24
<b>1.6.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>24</b>
<b>1.6.2</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>24</b>
<b>2</b>	<b>Material e métodos .....</b>	<b>25</b>
2.1	Cultura celular .....	25
2.2	Reagentes .....	25
2.3	Imunocitoquímica .....	25
2.4	ensaio de viabilidade celular.....	26
2.5	Análise estatística .....	27
<b>3</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>27</b>
3.1	Fucoxantina diminui a marcação de fibronectina.....	27
3.2	Fucoxantina aumenta a marcação de tenascina-C .....	29
3.3	Fucoxantina aumenta a marcação de glicoproteína-P .....	30
3.4	Fucoxantina aumenta a marcação de glicoproteína-P após 3h e 6h .....	31
<b>4</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>Perspectivas .....</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>Referências .....</b>	<b>37</b>
	<b>ANEXO A – Descrição .....</b>	<b>48</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 GLIOMAS

Gliomas são tumores do sistema nervoso central (SNC) com origem nas células gliais - principalmente astrócitos e oligodendrócitos - ou em suas progenitoras, expressando marcadores gliais (JIANG; UHRBOM, 2012). Essa denominação compreende diversos tipos de neoplasias, como astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas, oligoastrocitomas, entre outros (OSTROM *et al.*, 2017).

Os tumores do SNC – e isso se estende aos gliomas – aparecem pelo acúmulo de alterações no DNA causadas por fatores genéticos ou ambientais. Alguns destes são fatores de risco bem conhecidos, como: obesidade, sistema imunológico deficiente, exposição a radiação ionizante e elementos químicos (arsênio, chumbo e mercúrio), assim como trabalhar em certas indústrias (petroquímica, de borracha, de plástico e gráfica) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019).

Em 2007, a Organização Mundial da Saúde (OMS), na sua classificação mais simples, dividiu os gliomas em função da sua histologia e de suas características patológicas. Em 2021, uma atualização foi feita na classificação dos tumores do SNC, de modo a torná-la mais parecida com as de outras neoplasias (Quadro 1) (LOUIS *et al.*, 2007, 2021). Assim, quanto maior o grau do tumor, mais agressivo ele é e pior será o seu prognóstico (HUSE; HOLLAND, 2010).

Os gliomas correspondem a aproximadamente 50% dos tumores primários do SNC nos Estados Unidos (EUA) (BOUSSIOTIS; CHAREST, 2018). Em crianças, a correspondência é de 51,3%, sendo o astrocitoma pilocítico (grau 1) a maioria dos casos – 35,7% dos gliomas e 18,3% dos tumores do SNC. Já em adolescentes e jovens adultos, os gliomas compreendem 30,4% de todos as neoplasias do SNC, com o oligodendroglioma e astrocitoma difuso (grau 2) como os mais comuns – 34,2% dos gliomas e 10,4% de todo o SNC. Por fim, em adultos acima de 40 anos, os gliomas somam 30,4% dos tumores do SNC e 78,1% dos tumores malignos dessa região, sendo o glioblastoma multiforme (GBM, grau 4) o de maior incidência – 54,6% dos gliomas e 16,6% das neoplasias do SNC (LOW *et al.*, 2022).

	<b>Grau OMS</b>	<b>Histopatologia</b>	<b>Subtipo</b>
<b>Baixo grau</b>	1	Benigno, bem definido	Astrocitoma difuso (MYB ou MYBL1-alterado) *; Tumor neuroepitelial polimorfo de baixo grau juvenil; Tumor neuronal multinodular e vacuolizante; Meningioma.
<b>Baixo grau</b>	2	Infiltração difusa e alta proliferação	Astrocitoma (IDH-mutante) *; Oligodendroglioma (IDH-mutante e 1p/19q-codeletados) *; Meningioma; Xantastrocitoma pleomórfico *; Ependimoma supratentorial *; Ependimoma da fossa posterior *; Ependimoma mixopapilar *; Tumor fibroso solitário.
<b>Alto grau</b>	3	Muito infiltrativo e com muita proliferação	Astrocitoma (IDH-mutante) *; Oligodendroglioma (IDH-mutante e 1p/19q codeletados) *; Meningioma; Xantastrocitoma pleomórfico *; Ependimoma supratentorial *; Ependimoma da fossa posterior *; Tumor fibroso solitário.
<b>Alto grau</b>	4	Muito infiltrativo, proliferação celular e vascular elevada, necrose, hemorragia	Astrocitoma (IDH-mutante) *; Glioblastoma (IDH-selvagem) *; Glioma hemisférico difuso (H3 G34-mutante) *.

**Tabela 1 - Classificação das neoplasias do Sistema Nervoso Central.** Os tumores do Sistema Nervoso Central, e consequentemente os gliomas, são classificados de acordo com suas características histológicas pela Organização Mundial da Saúde. \* identificam os gliomas. Adaptado de JONES; HOLLAND (2011) e LOUIS *et al.* (2021).

## 1.2 GLIOBLASTOMA MULTIFORME

O GBM, sendo classificado como grau 4, é um dos gliomas mais agressivos e com prognósticos ruins (ALCANTARA LLAGUNO; PARADA, 2016). Além disso, o GBM é o tumor maligno mais comum do SNC, sendo diagnosticado em 49,1% dos casos (LOW *et al.*, 2022). A média de idade para o diagnóstico dessa neoplasia é de 64 anos (MCNEILL, 2016).

Em 2016, a OMS havia dividido o GBM em três tipos de acordo com características moleculares da enzima isocitrato desidrogenase 1 (IDH1). Os GBMs com IDH1 selvagem foram chamados de primários e correspondem a 90% dos casos, acometendo pessoas mais velhas (acima de 55 anos), enquanto os que continham IDH1 mutada seriam os secundários, provenientes de gliomas de menores graus (como astrocitoma difuso ou anaplásico), mais diagnosticados em pacientes mais novos. O terceiro grupo é o GBM não especificado, quando o tipo de IDH1 não pode ser identificado (LOUIS *et al.*, 2016).

Na última atualização, a nomenclatura dessa divisão foi novamente alterada. O GBM passou a ser considerado apenas os com IDH1 selvagem (GBMs primários), ao passo que os GBMs secundários passaram a ser chamados de astrocitomas de grau 4 (LOUIS *et al.*, 2021). No entanto, histopatologicamente, esses dois tipos de glioma são indistinguíveis, ou seja, essa distinção só é possível após análises moleculares (OHGAKI; KLEIHUES, 2013).

As principais características celulares dos GBMs são: alta atividade mitótica, atipia nuclear, presença de áreas de necrose e angiogênese (WEN; KESARI, 2008). O formato das células varia de poligonal a fusiforme, com um aumento do núcleo em relação ao citoplasma, a cromatina fica mais corada (hipercromia), os núcleos apresentam formas variadas (pleomorfismo nuclear), as membranas nucleares são irregulares e o nucléolo fica bem distinto. Também estão presentes células com dois ou mais núcleos, além de células de defesa e núcleos livres (SCHULTZ *et al.*, 2005).

Assim como outros tumores do SNC, os GBMs costumam ser diagnosticados em estágios avançados, geralmente após aparecerem sintomas clínicos, como dores de cabeça, convulsões, náusea/vômito, perda de consciência, disfunção neurocognitiva, mudanças de personalidade, perda sensorial, desequilíbrio ao caminhar, incontinência urinária, hemiplegia, afasia, negligência unilateral, e disfunção do campo visual (BOUSSIOTIS; CHAREST, 2018).

O tratamento padrão para o diagnóstico de GBM é a retirada do tumor através de cirurgia com posterior rádio e quimioterapia (CWIKLOWSKA *et al.*, 2018). A combinação desses tratamentos aumenta a sobrevida dos pacientes, uma vez que essa tripla intervenção permite que vivam em média 14,6 meses após o diagnóstico (STUPP; VAN DEN BENT; HEGI, 2005). Por sua vez, cirurgia, por si só, resultaria em uma sobrevida de apenas 3,5 meses e a adição da radioterapia promoveria esse tempo para 9 meses (SALAZAR *et al.*, 1979).

A temozolomida (TMZ) é o principal quimioterápico utilizado no combate ao GBM. Administrado de forma oral, ele é facilmente absorvido e ultrapassa a barreira hematoencefálica (BHE). Além disso, a TMZ tem um tempo de meia-vida de quase duas horas e não apresenta

efeitos cumulativos após várias administrações. Em condições fisiológicas, a TMZ é transformada em 5-(3-metil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida (MTIC). Por sua vez, o MTIC é degradado em 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) e cátion metildiazônio (NEWLANDS *et al.*, 1997). Esses cátions causam metilações nas moléculas de adenina e guanina. Ao metilar o O<sup>6</sup> de guanina, forma-se a O<sup>6</sup>-metilguanina, capaz de se ligar à timidina (ao invés da citosina) no DNA. O sistema de reparo de incompatibilidade do DNA é então acionado e retira este nucleosídeo. Mas, como a O<sup>6</sup>-metilguanina não é removida, cria-se um ciclo de ligação e retirada de timidina causando então um colapso da replicação, o que leva à apoptose (MOJAS; LOPES; JIRICNY, 2007).

Por outro lado, a TMZ pode causar efeitos colaterais, resultando em danos na medula óssea, alergias por inalação, defeitos congênitos e toxicidade de células-tronco hematopoiéticas (DE *et al.*, 2018). Além disso, os tumores podem desenvolver resistência ou tolerância à ação da TMZ, por meio de outros sistemas de reparo do DNA e de proteínas de efluxo de drogas (ZHANG; STEVENS; BRADSHAW, 2012).

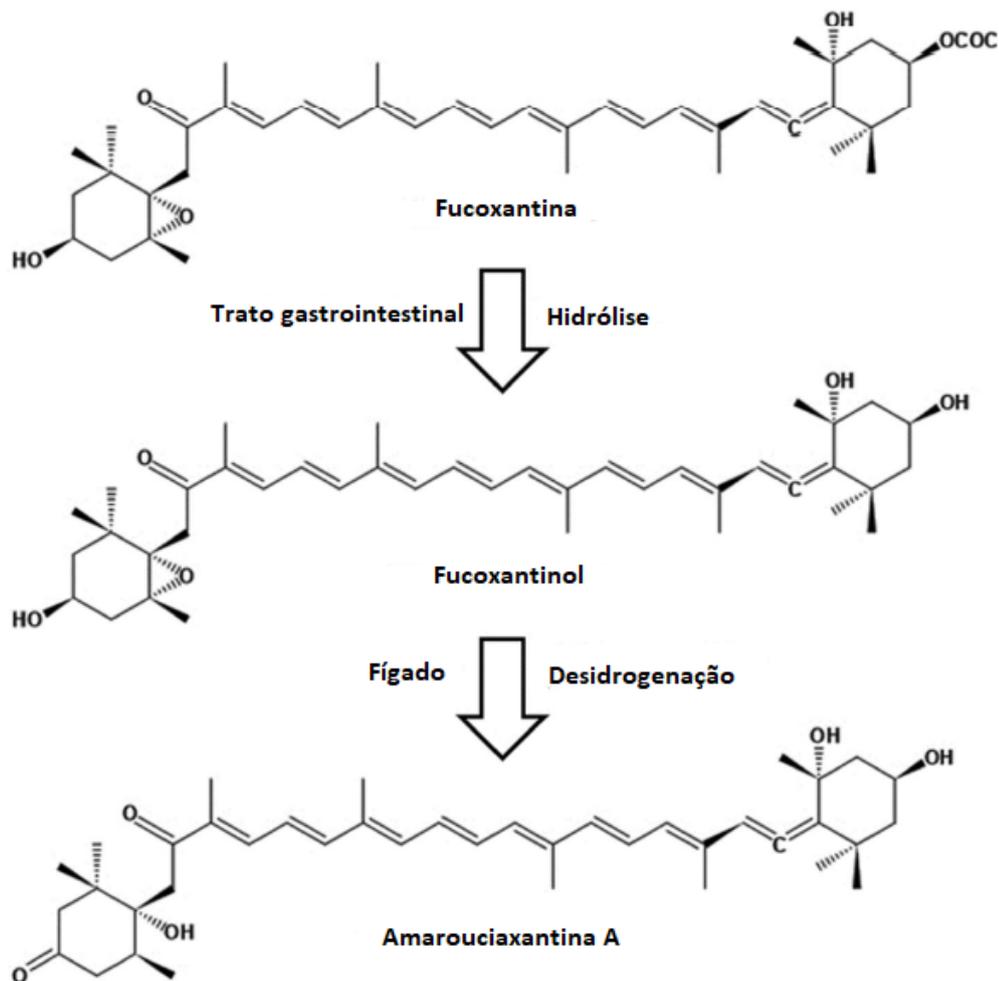
Devido a esses e outros desafios, mesmo após muitos estudos sobre o tema, as taxas de sobrevida dos pacientes com GBM continuam baixas, com estimativas de que apenas 6,6% e 4,3% dos pacientes sobrevivem 5 e 10 anos após o diagnóstico, respectivamente (LOW *et al.*, 2022).

Três principais pontos são responsáveis pelas baixas taxas de sobrevida. Uma delas é a presença de células-tronco tumorais (CSC – do inglês *cancer stem cells*), capazes de configurar resistência aos quimioterápicos (CHEN *et al.*, 2012). A segunda é a característica do GBM de se infiltrar rapidamente no tecido adjacente, dificultando sua retirada por completo e a eficiência da radioterapia (LI *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2018). Por último, a BHE se mostra um grande problema para a busca de quimioterápicos, uma vez que eles têm de atravessá-la (GROOTHUIS, 2000). Esse conjunto de atributos permite que o GBM escape dos tratamentos convencionais e volte a crescer, fazendo com que os prognósticos dos pacientes sejam ruins. Assim, é de extrema importância a busca de substâncias que possam ser usadas como tratamentos adjuvantes a fim de prolongar a sobrevida ou melhorar a qualidade de vida das pessoas acometidas pela doença.

### 1.3 FUCOXANTINA

Dentre os compostos naturais como objetos de pesquisa antitumorais, a fucoxantina (Fx) se destaca, com um aumento de mais de 12 milhões de dólares no mercado global de

fucoxantina desde 2019 (MOHIBBULLAH *et al.*, 2022). A Fx é um carotenoide alaranjado proveniente de algas pardas e diatomáceas, representando 10% da produção mundial dos carotenoides (DEMBITSKY; MAOKA, 2007; PENG *et al.*, 2011). Esse carotenoide possui em sua estrutura química uma ligação alênica, 5,6-monoepóxido e um grupo acetila (SATOMI, 2017). Depois de absorvida pelo organismo, a Fx é hidrolisada no intestino e transformada por enzimas digestivas em fucoxantíol (Fxo) que, por sua vez, sofre desidrogenação para formar amarouciaxantina A no fígado (Figura 1) (MÉRESSE *et al.*, 2020).



**Figura 1 - Metabolização da fucoxantina.** Primeiramente, ocorre a hidrólise desse composto no trato gastrointestinal, transformando-o em fucoxantíol. Este, por sua vez, sofre desidrogenação no fígado, formando amarouciaxantina A. Adaptado de KOTAKE-NARA; NAGAO (2011).

Populações asiáticas são menos afetadas por neoplasias do SNC quando comparadas a populações europeias e norte-americanas (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2014-; KURATSU; TAKESHIMA; USHIO, 2011). A alimentação asiática, rica em algas pardas como o wakame (*Undaria pinnatifida*) e o konbu (*Laminaria japonica*), que

possuem grande quantidade de Fx, pode estar relacionada a essa menor incidência (SATOMI, 2017; SHO, 2001).

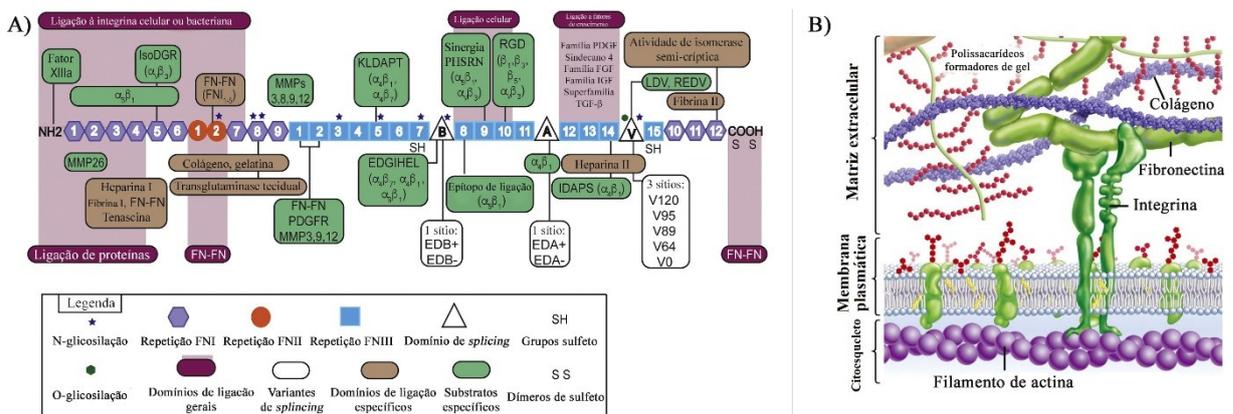
O incremento na movimentação de dinheiro da Fx é proveniente do grande espectro de efeitos benéficos que essa molécula proporciona. Já foi descrito que a Fx, o Fxol e a amarouciaxantina A, estão relacionados com efeitos antioxidantes, antiobesidade, antidiabéticos, anti-inflamatórios e neuroprotetores (ABIDOV *et al.*, 2010; HU *et al.*, 2018, 2012; LI *et al.*, 2021; MIKAMI *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2021, 2020; ZHANG *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2021). Efeitos antitumorais, tanto da Fx quanto de seus metabólitos, também foram observados em diferentes tipos de câncer (ÁVILA-ROMÁN *et al.*, 2021), inclusive em GBM, onde se observou que a Fx diminui os processos de proliferação, viabilidade e migração e invasão celulares, enquanto aumenta os níveis de apoptose, além de causar modificação da MEC envolvida nesse tumor (LIU *et al.*, 2016; LOPES *et al.*, 2020; PINTO, 2018).

Adicionalmente a esses efeitos, a Fx mostrou ter outras características necessárias quando se busca uma substância para o tratamento de patologias no SNC, como a segurança para células saudáveis e a capacidade de atravessar a BHE (LOPES *et al.*, 2020; XIANG *et al.*, 2017). Dessa forma, ela se mostra como um composto interessante para o uso como terapia adjuvante no tratamento do GBM. Porém, é necessário compreender melhor os mecanismos pelos quais a Fx atua, inclusive os seus efeitos na matriz extracelular (MEC) e em processos de resistência aos fármacos.

#### 1.4 MATRIZ EXTRACELULAR

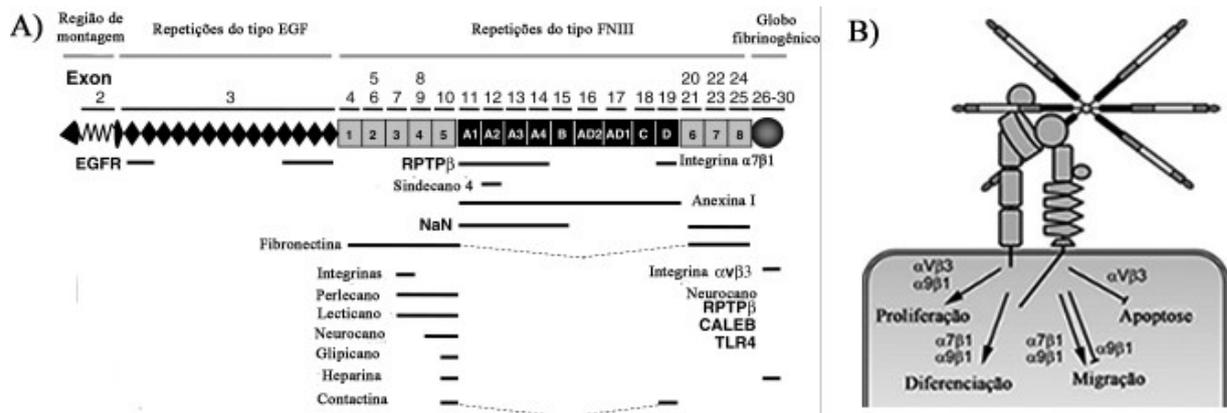
A MEC compreende o espaço entre as células de indivíduos multicelulares, composta por proteínas e polissacarídeos, com sua composição específica, orientação e a quantidade de cada molécula dependendo do tecido onde se encontra (JARVELAINEN *et al.*, 2009). A MEC tem a função de promover o suporte físico das células, mantendo-as conectadas umas às outras através da ligação entre seus componentes e receptores presentes nas membranas celulares, as integrinas (LODISH *et al.*, 2014; TREPAT; CHEN; JACOBSON, 2012). Essa estrutura também participa de processos celulares, como morfogênese, diferenciação, sinalização e homeostase, ativando vias intracelulares (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010). No entanto, células tumorais produzem uma MEC que se difere em sua composição daquela presente nos tecidos saudáveis que as rodeiam (LOUISTHELMY; BURKE; CORNELISON, 2022).

Um dos principais componentes da MEC é a fibronectina (FN). Esta molécula é secretada como um dímero ligado por uma ponte dissulfeto e tem peso molecular de aproximadamente 250 kDa. A FN apresenta sítios de ligação com outras FNs, com heparina, colágeno e receptores presentes na membrana das células (Figura 2A) (YUE, 2014). Essa proteína de matriz tem papel na adesão, migração, crescimento e diferenciação celulares (Figura 2B) (PANKOV; YAMADA, 2002). Sua ação é bem descrita como fundamental na migração celular durante o desenvolvimento embrionário e na cicatrização (PATTEN; WANG, 2021).



**Figura 2 - Estrutura da fibronectina e seu posicionamento da matriz extracelular.** A) Estrutura de um monômero de fibronectina (FN) indicando seus componentes e principais domínios de ligação. B) Disposição da FN na matriz extracelular (MEC), mostrando como essa molécula interage com outras presentes na MEC e na membrana celular. Adaptado de A) PATTEN; WANG (2021) e B) KHUTORSKOY (2018).

A tenascina-C (TNC) é outra proteína presente na MEC. Sua estrutura se apresenta como um hexâmero formado por seis monômeros idênticos que pesam entre 180 e 400 kDa, ligados por pontes de dissulfeto (Figura 3A). A TNC tem a capacidade de se ligar a integrinas, imunoglobulinas (moléculas de adesão), fatores de crescimento e outras moléculas de MEC, incluindo a FN (FU *et al.*, 2022). Em adultos, a TNC está presente apenas no tecido conjuntivo denso e em locais de células-tronco, com sua ausência observada nos outros tecidos. Mas a TNC é muito expressa principalmente no desenvolvimento embrionário, próximo de células da crista neural em migração, de precursores gliais que estão migrando e se proliferando e em locais de interação epitélio-mesenquimal, mostrando estar envolvida na migração celular e com células indiferenciadas (Figura 3B) (TUCKER; DEGEN, 2022). Em contrapartida, ela é superexpressa em patologias, principalmente na formação de tumores e metástase (JONES; JONES, 2000).



**Figura 3 - Estrutura da tenascina-C e sua interação com a célula.** A) Estrutura de um monômero de tenascina-C (TNC), de modo a visualizar seus componentes, sítios de ligação e principais moléculas de interação. B) Estrutura de hexômeros da TNC, sua interação com integrinas na membrana celular e consequentes destinos celulares. Adaptado de A) MIDWOOD; OREND (2009) e B) TUCKER; CHIQUET-EHRISMANN (2015).

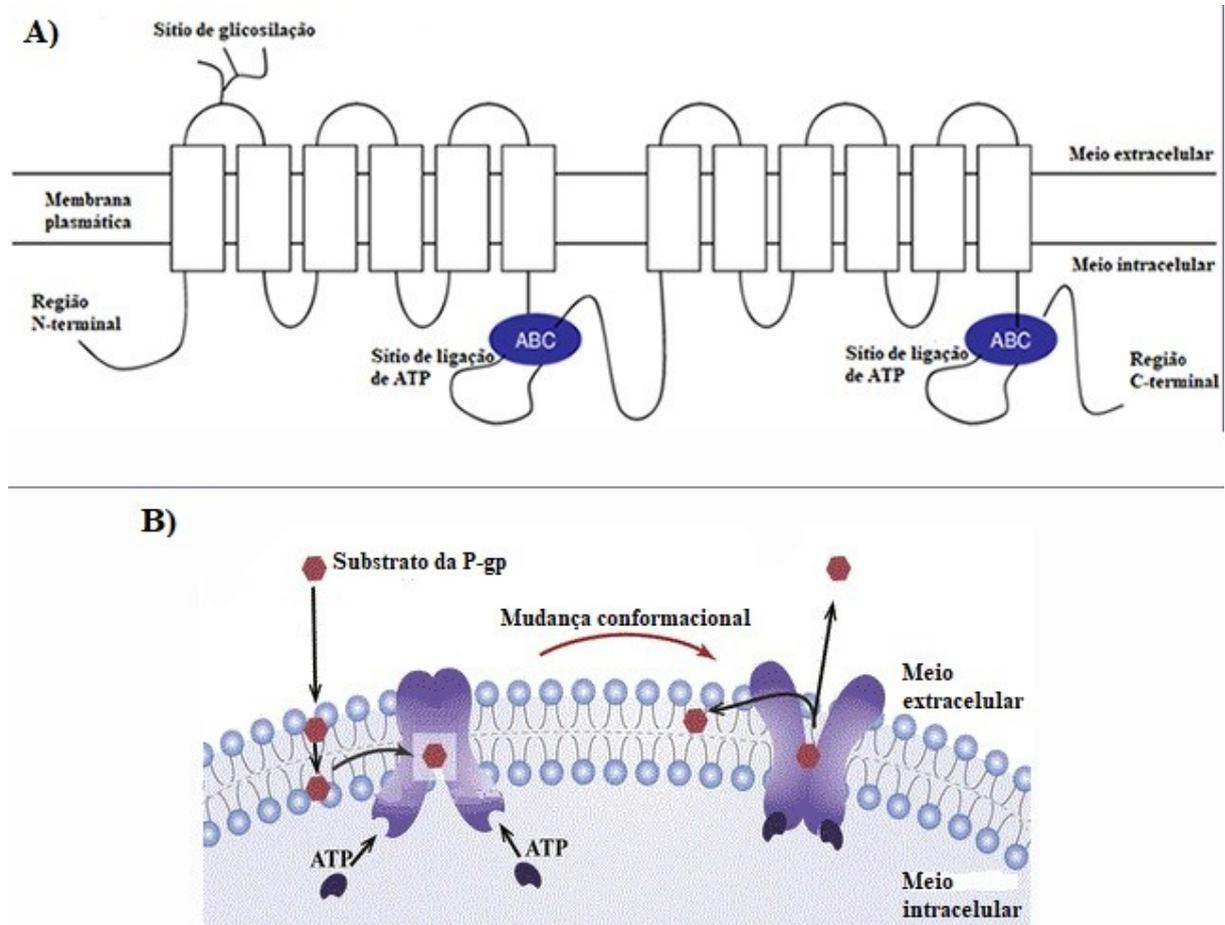
### 1.5 RESISTÊNCIA A DROGAS E GLICOPROTEÍNA P

Outra característica relacionada com células-tronco e que propiciam a resistência das células tumorais aos quimioterápicos é a resistência a multidrogas. Essa resistência pode ser classificada como primária - quando o câncer não responde ao tratamento desde o início - ou adquirida - quando o tumor regride com as terapias, mas se torna não-responsivo após um período (NIKOLAOU *et al.*, 2018). A evasão aos quimioterápicos se dá por uma gama de mecanismos, entre os quais se encontram o aumento do efluxo de drogas, a redução da captação ou a inativação de drogas, mutações dos alvos dos quimioterápicos, alteração nas vias de sinalização, defeito na apoptose, autofagia, mutação gênica, diminuição de células T e deleção de antígenos (HU *et al.*, 2022).

O efluxo de drogas tem o papel fisiológico de manter a homeostase da membrana plasmática, transportar lipídeos, ajudar na sinalização e na desintoxicação celular e proteger as células contra xenobióticos (HUANG, 2007). Os principais responsáveis pelo efluxo de drogas são transportadores presentes na membrana celular, sendo a família dos transportadores ABC (do inglês *ATP-binding cassette*) o exemplo mais conhecido (EID; EL-READI; WINK, 2012). As proteínas dessa família bombeiam as drogas para o meio extracelular, contra o gradiente de concentração, de forma ativa, através da hidrólise do ATP (RAMACHANDRA *et al.*, 1998).

O membro mais conhecido e estudado dos transportadores ABC é a glicoproteína-P (P-gp), também conhecida como MDR1 ou ABCB1, e foi o primeiro a ser descrito (BAGULEY, 2010). A P-gp é codificada pelo gene *ABCB1* (ou *MDR1*) e sua estrutura possui 12 domínios transmembrana e dois sítios de ligação de ATP (Figura 4A) (CHEN *et al.*, 1986). Drogas lipofílicas, com cargas neutras ou positivas, se ligam às regiões transmembrana da

proteína e, quando o ATP é hidrolisado no seu sítio de ligação, o transportador lança a substância para o lado externo da célula (Figura 4B) (AMBUDKAR *et al.*, 1999).



**Figura 4 - Estrutura e funcionamento da glicoproteína-P.** A) Estrutura da glicoproteína-P (P-gp) com seus 12 domínios transmembrana e dois sítios de ligação de ATP. B) Esquema ilustrando como a P-gp lança substâncias do meio intracelular para o meio extracelular através de mudança na sua conformação causado pela hidrólise de duas moléculas de ATP. Adaptado de A) GRUNDY (2012) e B) CAO *et al.* (2020).

O GBM é uma doença agressiva cujos pacientes têm pouco tempo de sobrevivência após o seu diagnóstico, mesmo após avanços no tratamento. Portanto, a descoberta e o desenvolvimento de terapias adjuvantes são imprescindíveis. Assim, estudos que procurem elucidar os efeitos da fucoxantina sobre o GBM e os mecanismos pelos quais ela atua são importantes nessa busca por substâncias que possam tornar o tratamento mais eficaz. (CAO *et al.*, 2020)

## 1.6 OBJETIVOS

### 1.6.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da fucoxantina na distribuição e organização de proteínas da matriz extracelular, bem como na distribuição de bombas de efluxo de drogas em células de glioblastoma multiforme humano.

### 1.6.2 Objetivos Específicos

- Analisar a distribuição e organização de fibronectina em células de glioblastoma multiforme humano GBM1 após tratamento de 24 horas com fucoxantina;
- Observar, nas mesmas células, a distribuição e a organização de tenascina-C após tratamento com fucoxantina por 24 horas;
- Verificar a imunomarcagem da glicoproteína-P em células de glioblastoma multiforme humano GBM1 após o tratamento de 24 horas com fucoxantina;
- Determinar o tempo de ação da fucoxantina na distribuição da glicoproteína-P em curva de tempo de 3 a 12 horas nas células de glioblastoma multiforme humano GBM1;
- Avaliar o efeito do verapamil, inibidor de glicoproteína-P, na viabilidade das células de glioblastoma multiforme humano GBM1 após o tratamento com fucoxantina por 24 horas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 CULTURA CELULAR

Uma amostra de glioblastoma multiforme foi cirurgicamente retirada de paciente do sexo feminino, de 64 anos, do hospital Celso Ramos, em Florianópolis, Santa Catarina, no ano de 2012. O diagnóstico de GBM foi posteriormente feito histopatologicamente por especialistas. A amostra foi coletada por cirurgiões e colocada em tubos cônicos de 15 mL contendo *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM-F12) e 10% de soro bovino fetal (SBF) e a amostra foi levada à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) para posterior processamento. Em um fluxo laminar, removeu-se as meninges cerebrais e vasos sanguíneos. O tecido foi dissociado mecanicamente com tripsina e auxílio de uma pipeta Pasteur. Então as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) e cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, contendo DMEM-F12 acrescido de glicose (0,6%), glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (0,06%) e penicilina/estreptomicina (1 U/1 µg) e 10% de SBF. As células foram mantidas em estufa de atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, e foram chamadas de GBM1. Após expansão da cultura, alíquotas foram congeladas para experimentos futuros. Todos os procedimentos e formulários de autorização para obtenção das amostras foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (CEPSH – 108.286) (Anexo 1).

### 2.2 REAGENTES

A fucoxantina (F6932) foi comprada da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e usada na concentração de 100 µM com base nos resultados de LOPES e colaboradores (2020) e PINTO (2018).

Os anticorpos anti-fibronectina (F6140) e anti-glicoproteína-P (P7965) também foram obtidos da Sigma-Aldrich. O anticorpo anti-tenascina-C E-9 (sc-25328) foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EUA).

### 2.3 IMUNOCITOQUÍMICA

As células de GBM1 (entre as passagens 20 e 40) foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares no fundo (2,5 x 10<sup>5</sup> células por poço). Após a confluência chegar próxima a 80% (~ 24 horas), as células foram tratadas em dois grupos distintos: controle (DMEM-F12) e tratado (DMEM-F12 + Fx 100 µM). Depois do tempo de tratamento de cada

experimento, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos. Depois, foram incubadas com albumina de soro bovino 3% por 1h para bloquear os sítios inespecíficos. Em seguida, ocorreu a incubação com os anticorpos anti-fibronectina (na concentração de 1:400), anti-tenascina-C (1:50) ou anti-glicoproteína-P (1:200) *overnight* a 4°C em câmara úmida. Na sequência, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com fluoróforo (diluição de 1:1000, Alexa-Fluor 488 anti-*rabbit* ou Alexa-Fluor 594 anti-*mouse*) por 1 hora em temperatura ambiente protegido da luz. Posteriormente, houve a incubação com Hoechst (5 µg/mL) por 10 minutos para marcação dos núcleos. Após, as lamínulas foram retiradas das placas, colocadas em lâminas e visualizadas e fotografadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX41; Olympus, Japão) no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) da UFSC. A partir do tratamento até o momento da montagem das lâminas, cada passo foi intercalado com 3 lavagens com PBS. Por fim, as imagens foram observadas pelo programa ImageJ (*National Institute of Health*, MD, EUA) no qual as células foram contadas. Os experimentos foram feitos em duplicata, com 5 fotografias randômicas de cada lamínula, totalizando 10 fotos de cada grupo.

#### 2.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de redução do MTT foi utilizado para avaliar o efeito citotóxico da Fx na presença do inibidor de P-gp, o verapamil.

O MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol brometo) é um sal de tetrazólio de coloração amarela. Quando o MTT entra em contato com desidrogenases mitocondriais (presentes em células viáveis), é reduzido em formazan, formando precipitados arroxeados. Depois de solubilizado em DMSO, o formazan pode ser submetido a um teste colorimétrico (STEPANENKO; DMITRENKO, 2015).

As células GBM1 (entre as passagens 20 e 30) foram plaqueadas em placas de 96 poços ( $1 \times 10^5$  células por poço). Depois de atingirem a confluência de 80% (~ 24 horas), as células foram incubadas com 7 tratamentos: controle (somente DMEM-F12), veículo (DMSO), verapamil 100 µM, verapamil 200 µM, Fx 100 µM, Fx 100 µM + verapamil 100 µM e Fx 100 µM + verapamil 200 µM. Após 24 horas, os meios foram removidos e o MTT (0,2 mg/mL em PBS) foi adicionado e mantido por 2 horas a 37 °C. Em seguida, o MTT foi retirado e os cristais de formazan foram solubilizados com DMSO. A placa então foi levada para leitura de absorbância em espectrofotômetro Infinite M200 Tecan no comprimento de onda de 540 nm. Após ajustes com o branco, os valores da absorbância foram medidos através da média de triplicatas. No entanto, os

resultados e análises obtidos neste ensaio não foram mostrados neste trabalho devido à descoberta de erros da técnica que podem acarretar deturpação dos dados.

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita usando o teste t de Student ou ANOVA de uma via, quando necessário. A exibição dos dados foi por meio da média com erro padrão. O *software* utilizado foi o GraphPad Prism 9 e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

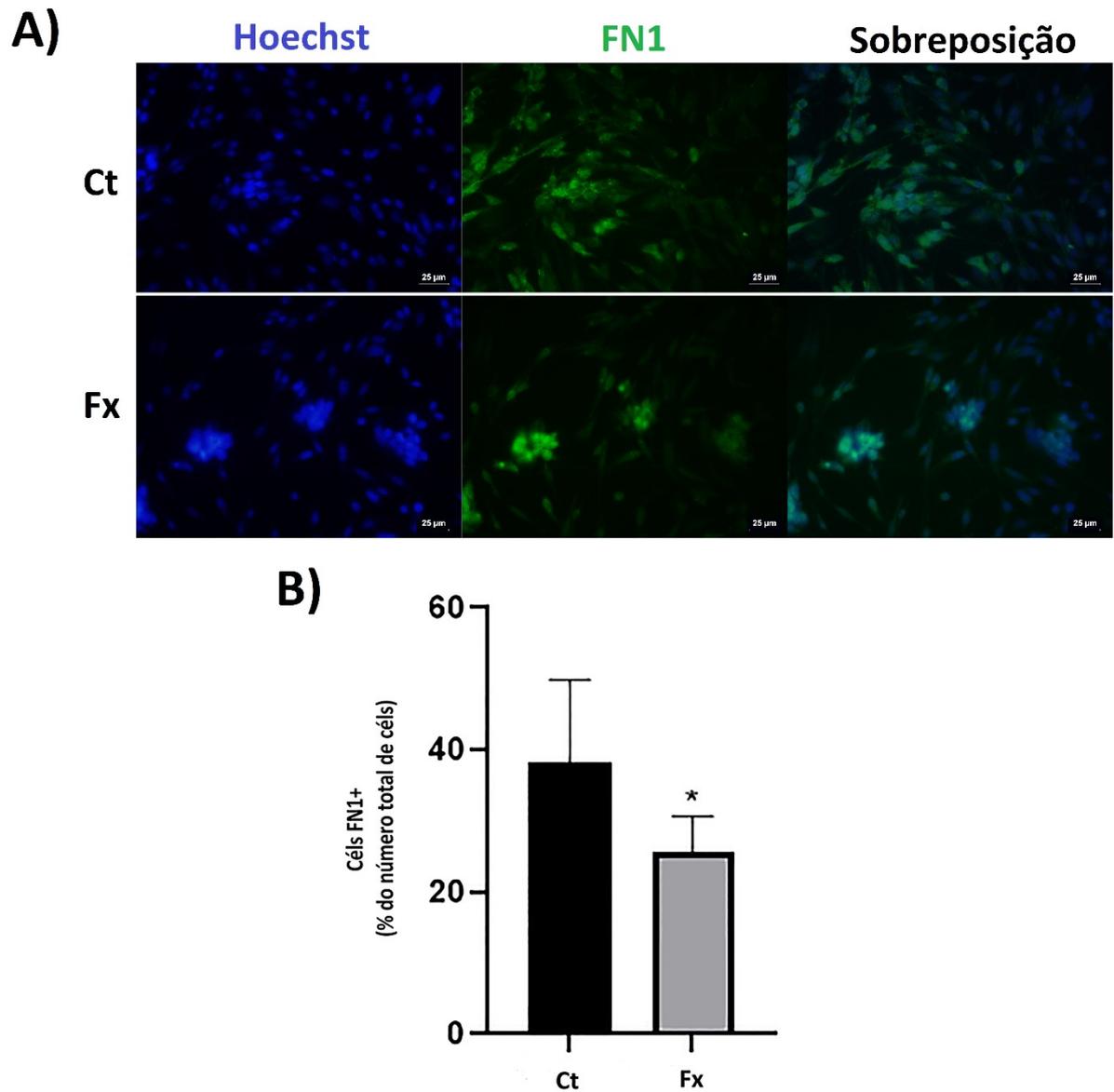
## 3 RESULTADOS

### 3.1 FUCOXANTINA DIMINUI A MARCAÇÃO DE FIBRONECTINA

A primeira observação feita foi sobre como a fibronectina se distribui nas células GBM1 após o tratamento com Fx. Uma vez que foi visto que a Fx causa remodelação da MEC de GBM e atua na laminina, ver o efeito sobre outra molécula importante e abundante na MEC foi o objetivo para entender melhor a atuação da Fx.

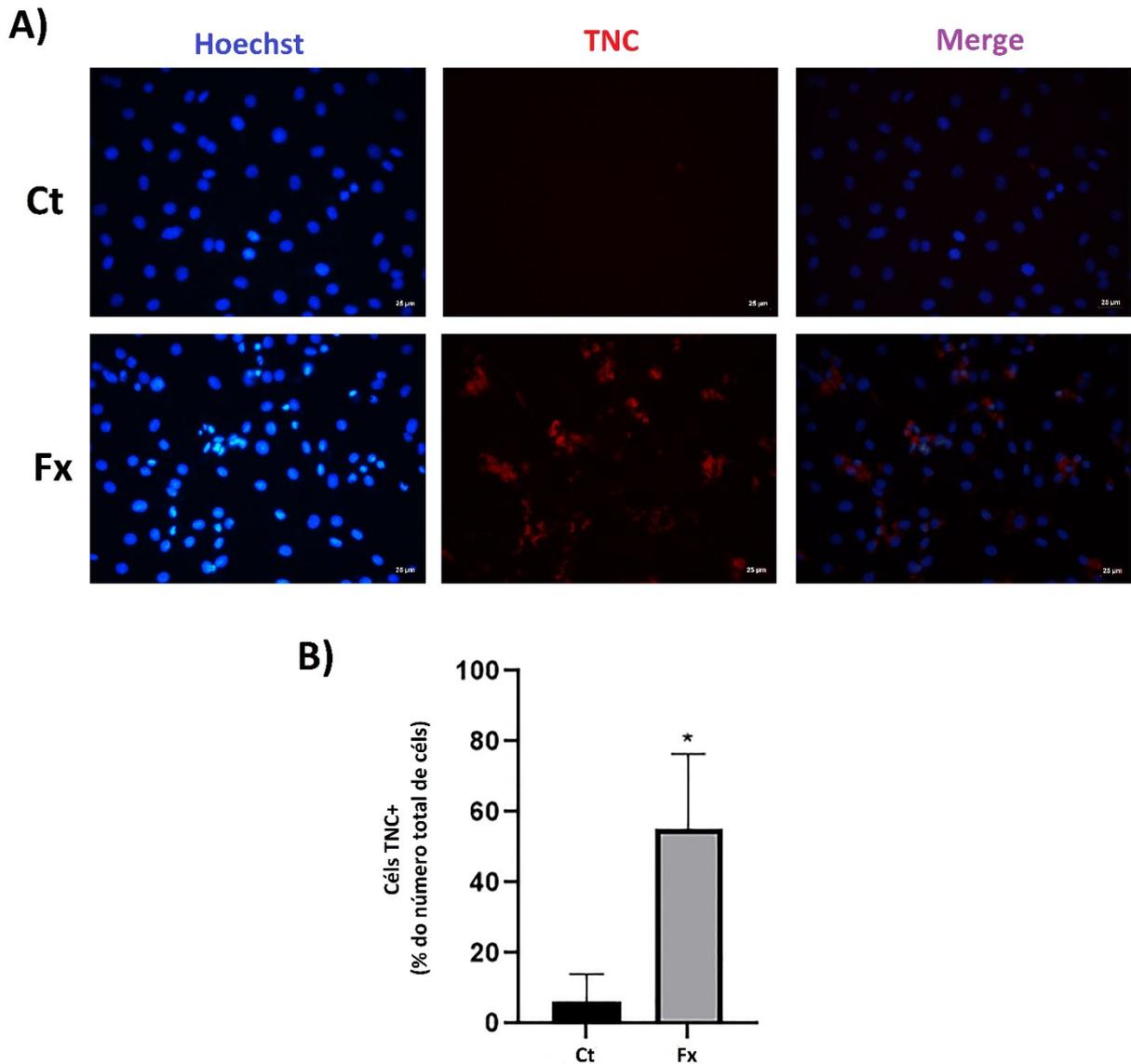
Realizada através da imunocitoquímica, podemos fazer a análise de acordo com o padrão de marcação fluorescente da proteína. Como dito anteriormente, a concentração de Fx utilizada foi determinada de acordo com LOPES e colaboradores (2020) e PINTO (2018). Além disso, não se utilizou grupo veículo (utilizando apenas DMSO) também por conta de resultados anteriores, que demonstraram que o DMSO não difere dos resultados do grupo controle (PINTO, 2018).

Como é possível observar na figura 5A, o tratamento com a Fx diminui o número de células que obtiveram marcação para FN comparando-se com o controle, depois de 24 horas. Enquanto 38% das células do grupo controle foram marcadas, apenas 25,5% das que foram tratadas exibiram a marcação para a molécula de MEC (Figura 5B). Com isso, sugere-se que a modificação da MEC causada pela Fx também se deve através da sua atuação sobre a FN.



**Figura 5 - Fucoxantina diminui marcação de fibronectina.** Imunocitoquímica de células GBM1 tratadas com Fx 100  $\mu$ M por 24 horas. **A)** Imagens representativas das marcações do núcleo em azul (Hoechst), da fibronectina em verde (FN1) e as sobreposições das imagens. **B)** Gráfico da porcentagem do número de células marcadas para fibronectina (em relação ao número total de células). Barra = 25  $\mu$ M. n = 3, em experimentos independentes. \* $p < 0,05$ .

### 3.2 FUCOXANTINA AUMENTA A MARCAÇÃO DE TENASCINA-C

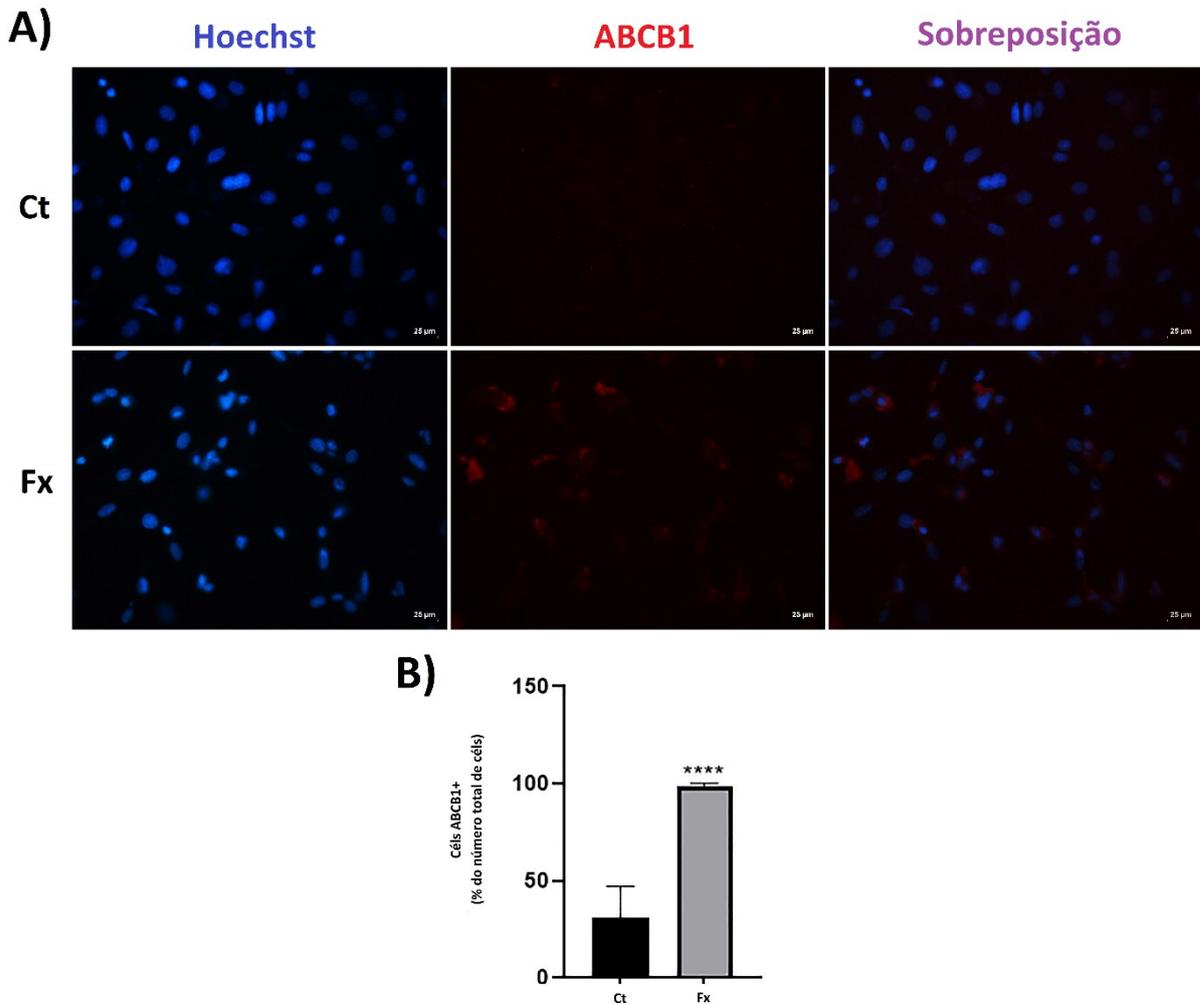


**Figura 6 - Fucoxantina aumenta a marcação de tenascina-C.** Imunocitoquímica de células GBM1 tratadas com Fx 100  $\mu$ M por 24 horas. **A)** Imagens representativas das marcações do núcleo em azul (Hoechst), da tenascina-C em vermelho (TNC) e as sobreposições das imagens. **B)** Gráfico da porcentagem do número de células marcadas para tenascina-C (em relação ao número total de células). Barra = 25  $\mu$ M. n = 2, em experimentos independentes. \* $p < 0,05$ .

Ao analisar a tenascina-C, observou-se um aumento na imunomarcagem desta proteína com o tratamento com Fx após 24 horas (Figura 6A). Neste ensaio, cerca de 6% das células do grupo controle exibiram marcação, enquanto que o número ficou em 55% no grupo tratado (Figura 6B). Este resultado corrobora a hipótese de que há alteração da MEC após tratamento

com Fx. Além disso, insinua a possibilidade de uma remodelação do ambiente com aumento de características de células indiferenciadas.

### 3.3 FUCOXANTINA AUMENTA A MARCAÇÃO DE GLICOPROTEÍNA-P



**Figura 7 - Fucoxantina aumenta a marcação de glicoproteína-P.** Imunocitoquímica de células GBM1 tratadas com Fx 100  $\mu$ M por 24 horas. **A)** Imagens representativas das marcações do núcleo em azul (Hoechst), da glicoproteína-P em vermelho (ABCB1) e as sobreposições das imagens. **B)** Gráfico da porcentagem do número de células marcadas para glicoproteína-P (em relação ao número total de células). Barra = 25  $\mu$ M. n = 2, em experimentos independentes. \*\*\*\* $p$ <0,0001.

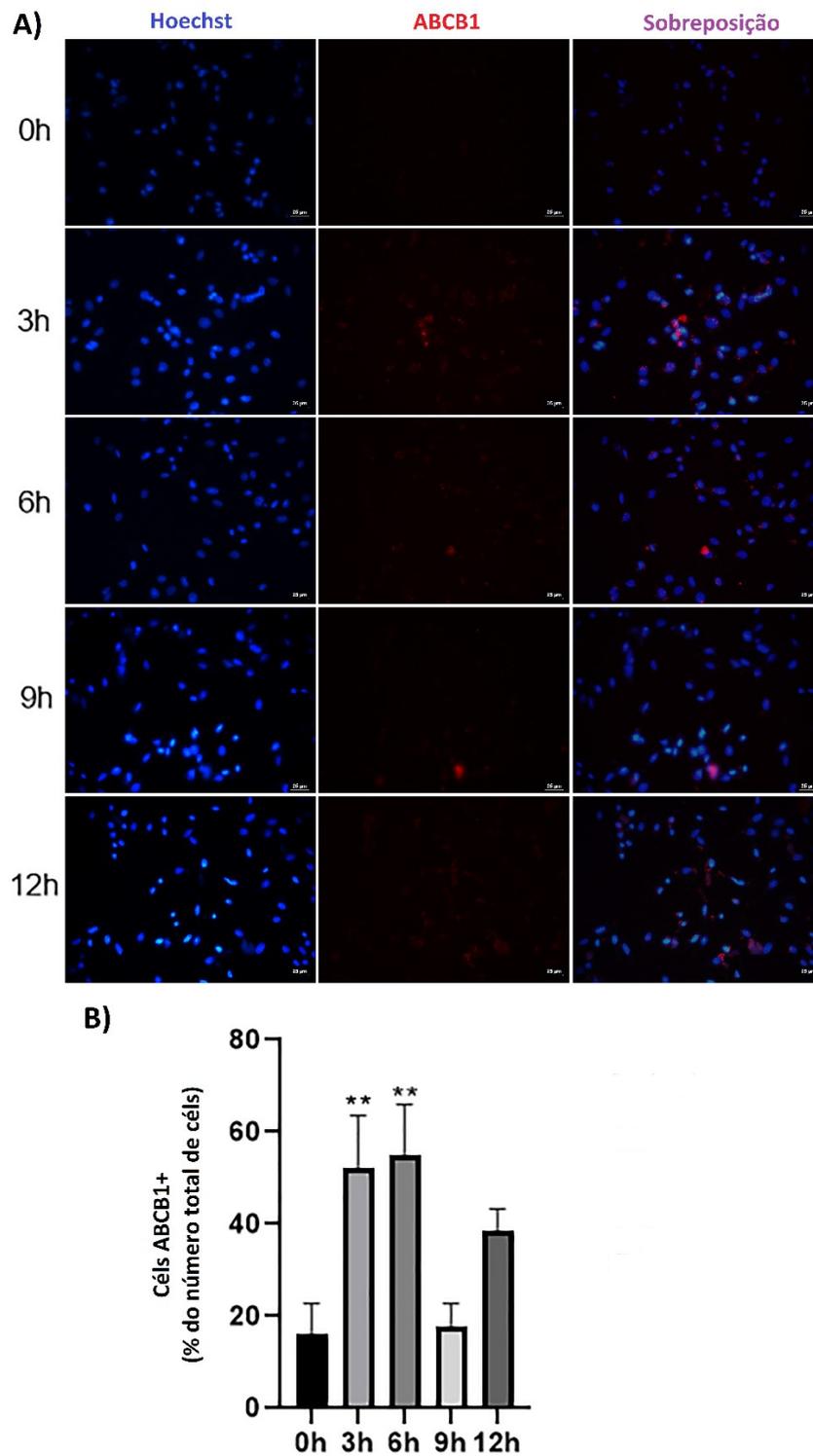
O passo seguinte foi observar a presença e a distribuição da glicoproteína-P, uma proteína de efluxo de drogas de membrana, também muito presente em células indiferenciadas. Os resultados deste experimento também demonstram um aumento do número de células marcadas no grupo tratado com Fx após 24 horas em relação ao grupo controle (Figura 7A). No controle, a porcentagem de células que exibiram marcação ficou em torno de 31%, enquanto 98,5% das células tratadas estavam marcadas (Figura 7B). Dessa forma, corroborando o

resultado anterior, estes dados mostram que a Fx promove a presença de mais uma característica de indiferenciação.

#### 3.4 FUCOXANTINA AUMENTA A MARCAÇÃO DE GLICOPROTEÍNA-P APÓS 3H E 6H

A fim de saber o tempo de ação da Fx no acréscimo do número de células que são imunomarcadas com glicoproteína-P, o mesmo ensaio foi realizado nos tempos de 0, 3, 6, 9 e 12 horas após o tratamento com o carotenoide. O que se observou foi um aumento significativo do número de células marcadas para P-gp após 3 e 6 horas e uma tendência a aumentar em 12 horas, sem significância ( $p= 0,051$ ). Não houve alteração após 9 horas (Figura 8A). Considerando a porcentagem de células marcadas em relação ao número de células totais, 0 e 9 horas pouco diferiram, com 16% e 18% de células marcadas, respectivamente. Já com 3 horas, 52% das células mostraram marcação, número próximo dos 54% vistos após 6 horas. Por fim, o tratamento de 12 horas contou com 38,5% das células marcadas (Figura 8B).

Estes resultados demonstram que a Fx atua rapidamente nas células de GBM, indicando uma possível modulação direta do carotenoide em fatores de transcrição de genes que protegem essas células da morte.



**Figura 8 - Fucoxantina aumenta a marcação de glicoproteína-P após 3h e 6h.** Imunocitoquímica de células GBM1 tratadas com Fx 100  $\mu$ M por 0, 3, 6, 9 e 12 horas. **A)** Imagens representativas das marcações do núcleo em azul (Hoechst), da glicoproteína-P em vermelho (ABCB1) e as sobreposições das imagens. **B)** Gráfico da porcentagem do número de células marcadas para glicoproteína-P (em relação ao número total de células). Barra = 25  $\mu$ M. n = 2, em experimentos independentes. \*\* $p$ <0,005.

## 4 DISCUSSÃO

O GBM é um tumor agressivo, altamente invasivo e heterogêneo, o que acarreta uma sobrevida média menor do que 15 meses. Apesar de todas as pesquisas recentes, foi observada pouca melhora no tratamento dessa neoplasia. Desse modo, estudos que visem tratamentos alternativos são necessários para a melhora dos prognósticos e/ou qualidade de vida dos pacientes, e substâncias naturais, que não sejam tóxicas aos humanos, são vistas com expectativa.

A Fx é um desses compostos naturais com potencial antineoplásico. Componente de dietas humanas e segura para células saudáveis, diversos estudos demonstraram o efeito antitumoral da Fx em diferentes tipos de câncer (MÉRESSE *et al.*, 2020).

Em relação aos efeitos da Fx em gliomas, LIU e colaboradores (2016) observaram nas linhagens humanas U87 e U251 que o carotenoide diminui proliferação, invasão e migração celulares, além de promover a apoptose. LOPES e colaboradores (2020) observaram os mesmos efeitos na cultura primária humana GBM1, além de aumento das espécies reativas de oxigênio, diminuição do potencial clonogênico e da angiogênese, além de alteração da estrutura da MEC.

PINTO (2018) também verificou a diminuição da viabilidade das células GBM1 pela Fx, assim como a diminuição da adesão celular após 24 horas, corroborando os resultados de modificação da MEC, demonstrando que a Fx diminui a imunomarcação de laminina. No presente trabalho, foi observado que a Fx causa uma remodelação na MEC das células GBM1, também diminuindo a presença de FN e aumentando a de TNC. Ainda sobre os efeitos da Fx na modulação da MEC, já foi demonstrado que ela diminui a expressão de colágeno tipo 1 – principal componente da MEC em diversos tecidos conjuntivos - em fibroblastos derivados de pólipos nasais (JUNG *et al.*, 2018).

A MEC é importante para o suporte físico das células e para diversos processos celulares, como adesão, invasão e migração (BILOZUR; HAY, 1988). Para que as células consigam se deslocar, elas precisam abrir caminho através da MEC, degradando-a e remodelando-a. Ademais, a MEC participa indiretamente de outros processos por meio da sinalização extracelular, na qual seus componentes interagem com as integrinas, que são receptores presentes nas membranas celulares.

Em tumores, a MEC é organizada de forma diferente dos tecidos normais, com proporções alteradas dos seus componentes. É sabido, por exemplo, que ela é mais rígida no primeiro caso do que no último, característica causada pelo aumento da deposição de colágeno, laminina e fibronectina (HAN; KWON; KIM, 2022).

A FN, uma abundante molécula de MEC, participa da sinalização celular entre as células e a MEC ao seu redor, exercendo papel importante na progressão e proliferação tumoral, promovendo a migração e invasão das células cancerosas (SENGUPTA *et al.*, 2010). A superexpressão, e conseqüente correlação com prognósticos ruins, dessa molécula já foi observada em câncer gástrico (ZHONG *et al.*, 2018), câncer de mama (ZHANG; LUO; WU, 2022), de tireoide (SPONZIELLO *et al.*, 2016), entre outros. Em câncer de células escamosas penianas, foi visto que a ativação de FN leva a uma ativação das metaloproteinases 2 e 9 – moléculas que degradam MEC -, promovendo a invasão celular e metástase (TAN *et al.*, 2022).

A expressão aumentada de FN também foi observada em gliomas, assim como o seu potencial em promover migração e invasão nas células desse tipo de tumor (LI; YAN; OU, 2022; OHNISHI *et al.*, 1997). Além disso, quando estimuladas a secretarem componentes de MEC, células de GBM acumulam mais FN do que células de tecido sadio. Essa MEC tumoral incrementa a migração de astrócitos saudáveis (LOUISTHELMY; BURKE; CORNELISON, 2022). Devido à sua alta expressão relacionada com piores prognósticos e seu grande número de conexões com genes e fatores de transcrição desregulados, foi proposto o seu uso como biomarcador para GBM (KABIR; APU, 2022).

A Fx, por sua vez, atenua a expressão de FN em fibroblastos induzida por TGF- $\beta$ 1 (MA *et al.*, 2017) e diminui em células de câncer de pulmão (MING *et al.*, 2021). Os resultados obtidos no presente trabalho, apesar de ser uma correlação indireta por meio da imunocitoquímica, mostram que a Fx diminui a marcação de FN nas células GBM1, o que pode estar relacionado com os seus efeitos antimigratório e anti-invasivo.

A TNC é uma proteína de MEC cuja expressão é regulada por estresse mecânico, sendo então encontrada predominantemente em tecidos que sofrem muito estresse de tração, como ligamentos, tendões e músculo liso, principalmente durante o período embrionário. Em adultos, sua expressão se dá com mais frequência em tecidos danificados, como cortes, corações que sofreram infarto do miocárdio e miocardite, pacientes com artrite reumatoide e com lesões. Ao contrário da FN, a TNC é uma molécula antiaderente que pode diminuir a capacidade de adesão da FN quando estão combinadas e até levar à morte células endoteliais dependentes de ancoragem (HALPER; KJAER, 2021; YILMAZ *et al.*, 2022).

A expressão aumentada de TNC e a sua relação com piores prognósticos e com altas taxas de metástase são vistas em câncer de mama (OSKARSSON *et al.*, 2011), de bexiga (GUAN *et al.*, 2022), de pulmão (PAREKH *et al.*, 2005), de cabeça e pescoço (JUHÁSZ *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2010), de câncer colorretal (HASHIMOTO *et al.*, 2021) e em melanoma

(GRAHOVAC; BECKER; WELLS, 2013). Em gliomas, a TNC está associada com a hipótese de *go-or-grow*, pois sua presença está associada com aumento da invasão celular, enquanto que na sua ausência ocorre a proliferação dessas células e o crescimento tumoral *in vivo* (VIRTUOSO *et al.*, 2022; XIA *et al.*, 2016). No presente trabalho, observou-se que a Fx aumenta a marcação de TNC em células de GBM1. Até onde se tem notícia, é o primeiro trabalho que demonstra efeitos do carotenoide nessa molécula de MEC.

A P-gp, por conta da sua função, está envolvida com resistência de diversas doenças a quimioterápicos, assim como outras bombas de efluxo de drogas. Essa quimiorresistência se estende aos casos de câncer (NIKOLAOU *et al.*, 2018). Sua superexpressão foi correlacionada com piores prognósticos em câncer colorretal (AMAWI *et al.*, 2019). Em gliomas, foi observado que o uso de inibidores diretos da P-gp e a inibição da via Akt/NF- $\kappa$ B/MDR1 aumentam a sensibilidade à quimioterapia de linhagens resistentes à TMZ (FUJIHARA *et al.*, 2018; LUSTIG *et al.*, 2022).

Na presente pesquisa, observou-se que a Fx aumenta a imunomarcação de P-gp nas células GBM1 após 24 horas de tratamento e que o seu efeito acontece de forma rápida, aparecendo já após 3 horas de tratamento com Fx, se mantendo após 6 e 12 horas. Na literatura, foi visto que o tratamento com Fx a 10  $\mu$ M diminui a expressão de P-gp após 24 horas em células de hepatocarcinoma e de adenocarcinoma de cólon (LIU; LIM; HU, 2012). Além disso, foi mostrado que Fx 100  $\mu$ M retém a concentração de drogas citotóxicas no espaço intracelular em células de câncer de cólon e de leucemia inibindo a atividade da P-gp após 30 minutos e que a Fx 40  $\mu$ M diminui a expressão de P-gp após 48 horas nessas mesmas células. Dessa forma, isto indica que a Fx é um possível inibidor competitivo desse transportador (EID; EL-READI; WINK, 2012).

Os resultados obtidos no ensaio de MTT não foram utilizados neste trabalho devido a uma possível falha na técnica. Há a possibilidade de que o MTT reaja com o verapamil (inibidor da P-gp) e interfira nos resultados do teste (LUSTIG *et al.*, 2022; VELLONEN; HONKAKOSKI; URTTI, 2004). Observando os resultados alcançados por este método, concluiu-se que podem ter sofrido alguma alteração.

As células-tronco, apesar de corresponderem a uma pequena parte da população de um tumor, são cruciais na invasão das células neoplásicas e na recorrência do câncer (CHANG, 2016). Isso acontece porque as células-tronco podem evadir das terapias ativando vias para manter seu estado de indiferenciação e alta resistência, como capacidade de autorrenovação e expulsão de substâncias nocivas (JIN; JIN; KIM, 2017; ZHOU *et al.*, 2021). Em GBM, as

células-tronco também tem a capacidade de reparar o DNA danificado pela TMZ, ativando a enzima O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) que remove os grupos metil adicionados à guanina, prevenindo os erros de replicação (ANNOVAZZI *et al.*, 2015).

Observando os resultados obtidos neste trabalho em conjunto, percebe-se uma remodelação da MEC promovida pela Fx, causando uma diminuição de FN e o aumento da presença de TNC. Estudos em câncer de mama demonstraram que a TNC está presente em maior quantidade em células sem receptores de estrógeno, o que é característica de células mais indiferenciadas (DANDACHI *et al.*, 2001; LOWY; OSKARSSON, 2015). O mesmo acontece em cânceres de glândula salivar, em que a TNC aparece mais expressa em tumores com menores níveis de diferenciação (RAITZ; MARTINS; ARAÚJO, 2003). Em câncer colorretal, a expressão de TNC está relacionada diretamente com a expressão de marcadores de células-tronco e da via *Hedgehog*, via de sinalização presente no desenvolvimento embrionário e em células-tronco em adultos e em patologias (YANG, Z. *et al.*, 2020). Também já foi observado que a glicosilação da TNC pode promover a proliferação de células-tronco neuronais (LEPUCKI *et al.*, 2022).

A presença de transportadores ABC na membrana plasmática também é relacionada com células-tronco, principalmente em tumores. Populações de células-tronco de diversas neoplasias apresentam expressão aumentada de diferentes proteínas de efluxo de drogas (BAGULEY, 2010; BEGICEVIC; FALASCA, 2017). A superexpressão de P-gp já foi observada em células-tronco de melanoma em contrapartida das células diferenciadas desse tumor (KESHET *et al.*, 2008). Em GBM, a expressão aumentada dessa bomba de efluxo de drogas foi vista em células-tronco resistentes à TMZ (LUSTIG *et al.*, 2022).

Assim, de acordo com o conjunto de dados obtidos neste estudo, propõe-se que a Fx, apesar de diminuir a viabilidade de células GBM1, pode estar provocando a desdiferenciação das células que não morreram, de modo que elas passem a expressar características de células-tronco, vide a diminuição de FN, o aumento de TNC na MEC e o aumento de P-gp na membrana celular. Ademais, esse efeito acontece de forma rápida, uma vez que já pode ser visualizado após 3 horas de tratamento. Resultado semelhante foi visto por BLEAU e colaboradores (2009) com a TMZ, onde o quimioterápico aumentou a população de células-tronco que expressam bomba de efluxo de drogas em glioma.

Outra hipótese possível é a de que a Fx pode estar matando as células que não têm características de indiferenciação e não apresentam transportadores de efluxo de drogas. Assim, as células-tronco tumorais, que possuem essas características, sobrevivem e repopulam o local.

Apesar de todos esses resultados, ainda são necessárias mais pesquisas envolvendo os efeitos da Fx em células de GBM e seus mecanismos, principalmente envolvendo componentes da MEC e marcadores característicos de células indiferenciadas.

## 5 CONCLUSÕES

- A Fx diminui a marcação de FN em células GBM1 após 24 horas;
- O tratamento com Fx aumenta a imunomarcação de TNC em células GBM1 após 24 horas;
- A distribuição e a organização de P-gp é alterada, aumentando sua presença, em células GBM1 após 24 horas de tratamento com Fx;
- O efeito da Fx sobre a distribuição de P-gp em células GBM1 já começa após 3 horas de tratamento.

## 6 PERSPECTIVAS

- Verificar características de células-tronco em células GBM1 através de marcadores de indiferenciação, como CD133, NANOG e Nestina após tratamento com Fx;
- Analisar o efeito da Fx sobre a expressão de RNAm de laminina, fibronectina, tenascina-C, glicoproteína-P, MMP-2 e MMP-9 em células GBM1;
- Observar o efeito da Fx na expressão das proteínas laminina, fibronectina, tenascina-C, glicoproteína-P, mTOR, p-mTOR, AKT, p-AKT, ERK1, p-ERK1, ERK2 e p-ERK2 em células GBM1;
- Avaliar o efeito da Fx sobre a atividade das MMP-2 e MMP-9 de degradação em células GBM1.

## 7 REFERÊNCIAS

ABIDOV, M. *et al.* The effects of Xanthigen<sup>TM</sup> In the weight management of obese premenopausal women with non-alcoholic fatty liver disease and normal liver fat. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, [s. l.], v. 12, p. 72–81, 2010.

ALCANTARA LLAGUNO, S. R.; PARADA, L. F. Cell of origin of glioma: biological and clinical implications. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 115, n. 12, p. 1445–1450, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2016.354>.

AMAWI, H. *et al.* ABC Transporter-Mediated Multidrug-Resistant Cancer. *In*: LIU, X.; PAN, G. (org.). **Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity**. [S. l.]: Springer, 2019. p. 549–580. *E-book*. Disponível em: [http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-7647-4\\_12](http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-7647-4_12).

AMBUDKAR, S. V. *et al.* Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [s. l.], v. 39, p. 361–398, 1999.

ANNOVAZZI, L. *et al.* The DNA damage/repair cascade in glioblastoma cell lines after chemotherapeutic agent treatment. **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 46, n. 6, p. 2299–2308, 2015.

ÁVILA-ROMÁN, J. *et al.* Anti-inflammatory and anticancer effects of microalgal carotenoids. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 19, n. 10, p. 1–49, 2021.

BAGULEY, B. C. Multiple drug resistance mechanisms in cancer. **Molecular Biotechnology**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 308–316, 2010.

BEGICEVIC, R.-R.; FALASCA, M. ABC transporters in cancer stem cells: Beyond chemoresistance. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 11, 2017.

BILOZUR, M. E.; HAY, E. D. Neural crest migration in 3D extracellular matrix utilizes laminin, fibronectin, or collagen. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 125, n. 1, p. 19–33, 1988.

BLEAU, A.-M. *et al.* PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 in glioma tumor stem-like cells. **Cell Stem Cell**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 226–235, 2009.

BOUSSIOTIS, V. A.; CHAREST, A. Immunotherapies for Malignant Glioma. **Oncogene**, [s. l.], v. 37, n. 9, p. 1121–1141, 2018.

CAO, Y. *et al.* The effects of traditional chinese medicine on p-glycoprotein-mediated multidrug resistance and approaches for studying the herb-p-glycoprotein interactions. **Drug Metabolism and Disposition**, [s. l.], v. 48, n. 10, p. 972–979, 2020.

CHANG, J. C. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance. **Medicine (United States)**, [s. l.], v. 95, n. 1, p. S20–S25, 2016.

CHEN, J. *et al.* A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. **Nature**, [s. l.], v. 488, n. 7412, p. 522–526, 2012.

CHEN, C. jie *et al.* Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. **Cell**, [s. l.], v. 47, n.

3, p. 381–389, 1986.

CWIKLOWSKA, K. *et al.* Viability of glioblastoma stem cells is effectively reduced by diisothiocyanate-derived mercapturic acids. **Oncology Letters**, [s. l.], v. 16, p. 6181–6187, 2018. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-85054313227&partnerID=MN8TOARS>.

DANDACHI, N. *et al.* Co-expression of tenascin-C and vimentin in human breast cancer cells indicates phenotypic transdifferentiation during tumour progression: correlation with histopathological parameters, hormone receptors, and oncoproteins. **Journal of Pathology**, [s. l.], v. 193, n. 2, p. 181–189, 2001.

DE, A. *et al.* Smart niosomes of temozolomide for enhancement of brain targeting. **Nanobiomedicine**, [s. l.], v. 5, p. 1–11, 2018. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1849543518805355>.

DEMBITSKY, V. M.; MAOKA, T. Allenic and cumulenenic lipids. **Progress in Lipid Research**, [s. l.], v. 46, n. 6, p. 328–375, 2007.

EID, S. Y.; EL-READI, M. Z.; WINK, M. Carotenoids reverse multidrug resistance in cancer cells by interfering with ABC-transporters. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 19, n. 11, p. 977–987, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2012.05.010>.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 123, n. 24, p. 4195–4200, 2010.

FU, Z. *et al.* Matricellular protein tenascin C: Implications in glioma progression, gliomagenesis, and treatment. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], n. August, p. 1–17, 2022.

FUJIHARA, T. *et al.* Down-regulation of MDR1 by Ad-DKK3 via Akt/NFκB pathways augments the anti-tumor effect of temozolomide in glioblastoma cells and a murine xenograft model. **Journal of Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 139, n. 2, p. 323–332, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11060-018-2894-5>.

GRAHOVAC, J.; BECKER, D.; WELLS, A. Melanoma cell invasiveness is promoted at least in part by the epidermal growth factor-like repeats of tenascin-C. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 136, n. 1, p. 210–220, 2013.

GROOTHUIS, D. R. The blood-brain and blood-tumor barriers: A review of strategies for increasing drug delivery. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 45–59, 2000.

GRUNDY, M. **Activity of the Aurora kinase B inhibitor AZD1152 in Acute Myeloid Leukaemia**. 2012. 1–214 f. - University of Nottingham, [s. l.], 2012.

GUAN, Z. *et al.* Tenascin-C promotes bladder cancer progression and its action

depends on syndecan-4 and involves NF- $\kappa$ B signaling activation. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 1–14, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09285-x>.

HALPER, J.; KJAER, M. Basic Components of Connective Tissues and Extracellular Matrix: Fibronectin, Fibrinogen, Laminin, Elastin, Fibrillins, Fibulins, Matrilins, Tenascins and Thrombospondins. *In*: **ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY**. [S. l.: s. n.], 2021. v. 802, p. 31–47.

HAN, S. J.; KWON, S.; KIM, K. S. Contribution of mechanical homeostasis to epithelial - mesenchymal transition. **Cellular Oncology**, [s. l.], n. 0123456789, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13402-022-00720-6>.

HASHIMOTO, M. *et al.* Expression Patterns of Microenvironmental Factors and Tenascin-C at the Invasive Front of Stage II and III Colorectal Cancer: Novel Tumor Prognostic Markers. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 11, n. August, p. 1–12, 2021.

HU, X. *et al.* Combination of fucoxanthin and conjugated linoleic acid attenuates body weight gain and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced obese rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 519, p. 59–65, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2012.01.011>.

HU, T. *et al.* Nanomedicines for Overcoming Cancer Drug Resistance. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 14, n. 1606, 2022.

HU, L. *et al.* Neuroprotective role of fucoxanthin against cerebral ischemic/reperfusion injury through activation of Nrf2/HO-1 signaling. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 106, p. 1484–1489, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.088>.

HUANG, Y. Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy. **Cancer and Metastasis Reviews**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 183–201, 2007.

HUSE, J. T.; HOLLAND, E. C. Targeting brain cancer: Advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 319–331, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2818>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: [s. n.], 2019.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Cancer Incidence in Five Continents**. 10. ed. Lyon: International Association of Cancer Registries, 2014-. ISSN 09598138. Disponível em: <http://ci5.iarc.fr/CI5I-X/old/vol10/CI5vol10.pdf>.

JARVELAINEN, H. *et al.* Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in

Pharmacotherapy. **Pharmacological Reviews**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 198–223, 2009.

JIANG, Y.; UHRBOM, L. On the origin of glioma. **Upsala Journal of Medical Sciences**, [s. l.], v. 117, n. 2, p. 113–121, 2012.

JIN, Xiong; JIN, Xun; KIM, H. Cancer stem cells and differentiation therapy. **Tumor Biology**, [s. l.], v. 39, n. 10, p. 1–11, 2017.

JONES, T. S.; HOLLAND, E. C. Molecular Pathogenesis of Malignant Glial Tumors. **Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 158–166, 2011.

JONES, F. S.; JONES, P. L. The tenascin family of ECM glycoproteins: Structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. **Developmental Dynamics**, [s. l.], v. 218, n. 2, p. 235–259, 2000.

JUHÁSZ, A. *et al.* Characteristic distribution patterns of tenascin in laryngeal and hypopharyngeal cancers. **Laryngoscope**, [s. l.], v. 110, n. 1, p. 84–92, 2000.

JUNG, H. *et al.* Fucoxanthin inhibits myofibroblast differentiation and extracellular matrix production in nasal polyp-derived fibroblasts via modulation of Smad-dependent and SmAD-independent signaling pathways. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 1–13, 2018.

KABIR, F.; APU, M. N. H. Multi-omics analysis predicts fibronectin 1 as a prognostic biomarker in glioblastoma multiforme. **Genomics**, [s. l.], v. 114, n. 3, p. 110378, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2022.110378>.

KESHET, G. I. *et al.* MDR1 expression identifies human melanoma stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 368, n. 4, p. 930–936, 2008.

KHUTORSKOY, I. R. **Heparin-fibronectin interactions in the development of extracellular matrix insolubility**. 2018. 1–110 f. - Princeton University, [s. l.], 2018.

KOTAKE-NARA, E.; NAGAO, A. Absorption and metabolism of xanthophylls. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 1024–1037, 2011.

KURATSU, J.; TAKESHIMA, H.; USHIO, Y. Trends in the incidence of primary intracranial tumors in Kumamoto, Japan. **International Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 6, p. 183–191, 2011.

LEPUCKI, A. *et al.* The Role of Extracellular Matrix Proteins in Breast Cancer. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 1–30, 2022.

LI, Y. *et al.* Fucoxanthin metabolites exert anti-fibrogenic and antioxidant effects in hepatic stellate cells. **Journal of Agriculture and Food Research**, [s. l.], v. 6, p. 100245, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100245>.

LI, Y. M. *et al.* The influence of maximum safe resection of T1 contrast-enhancing tumor and T2 FLAIR abnormality on survival in 1229 glioblastoma patients. **Journal of neurosurgery**, [s. l.], v. 124, n. 4, p. 977–988, 2016.

LI, H.; YAN, X.; OU, S. Correlation of the prognostic value of FNDC4 in glioblastoma with macrophage polarization. **Cancer Cell International**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 1–11, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02688-7>.

LIU, Y. *et al.* Fucoxanthin Activates Apoptosis via Inhibition of PI3K/Akt/mTOR Pathway and Suppresses Invasion and Migration by Restriction of p38-MMP-2/9 Pathway in Human Glioblastoma Cells. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 41, n. 10, p. 2728–2751, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-016-1989-7>.

LIU, C. L.; LIM, Y. P.; HU, M. L. Fucoxanthin attenuates rifampin-induced cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) and multiple drug resistance 1 (MDR1) gene expression through pregnane X receptor (PXR)-mediated pathways in human hepatoma HepG2 and colon adenocarcinoma LS174T cells. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 242–257, 2012.

LODISH, H. *et al.* **Biologia celular e molecular**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

LOPES, F. G. *et al.* Anti-cancer effects of fucoxanthin on human glioblastoma cell line. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 40, n. 12, p. 6799–6815, 2020.

LOUIS, D. N. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], 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**, [s. l.], v. 131, n. 6, p. 803–820, 2016.

LOUIS, D. N. *et al.* The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 1231–1251, 2021.

LOUISTHELMY, R.; BURKE, B. M.; CORNELISON, R. C. Brain Cancer Cell-Derived Matrices and Effects on Astrocyte Migration. **Cells Tissues Organs**, [s. l.], p. 1–11, 2022.

LOW, J. T. *et al.* Primary brain and other central nervous system tumors in the United States (2014-2018): A summary of the CBTRUS statistical report for clinicians. **Neuro-Oncology Practice**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 165–182, 2022.

LOWY, C. M.; OSKARSSON, T. Tenascin C in metastasis: A view from the invasive front. **Cell Adhesion and Migration**, [s. l.], v. 9, n. 1–2, p. 112–124, 2015.

LUSTIG, S. D. *et al.* Ko143 Reverses MDR in Glioblastoma via Deactivating P-

Glycoprotein, Sensitizing a Resistant Phenotype to TMZ Treatment. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 723–730, 2022.

MA, S. Y. *et al.* Fucoxanthin inhibits profibrotic protein expression in vitro and attenuates bleomycin-induced lung fibrosis in vivo. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 811, n. June, p. 199–207, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.06.022>.

MCNEILL, K. A. Epidemiology of Brain Tumors. **Neurologic Clinics**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 981–998, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.014>.

MÉRESSE, S. *et al.* Fucoxanthin, a marine-derived carotenoid from brown seaweeds and microalgae: A promising bioactive compound for cancer therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 23, p. 1–27, 2020.

MIDWOOD, K. S.; OREND, G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. **Journal of Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 3, n. 3–4, p. 287–310, 2009.

MIKAMI, N. *et al.* Reduction of HbA1c levels by fucoxanthin-enriched akamoku oil possibly involves the thrifty allele of uncoupling protein 1 (UCP1): A randomised controlled trial in normal-weight and obese Japanese adults. **Journal of Nutritional Science**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 1–9, 2017.

MING, J. X. *et al.* Fucoxanthin extracted from *Laminaria Japonica* inhibits metastasis and enhances the sensitivity of lung cancer to Gefitinib. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 265, p. 113302, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113302>.

MOHIBBULLAH, M. *et al.* A Systematic Review on Marine Algae-Derived Fucoxanthin: An Update of Pharmacological Insights. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 1–35, 2022.

MOJAS, N.; LOPES, M.; JIRICNY, J. Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. **Genes and Development**, [s. l.], v. 21, n. 24, p. 3342–3355, 2007.

NEWLANDS, E. S. *et al.* Temozolomide: A review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. **Cancer Treatment Reviews**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 35–61, 1997.

NIKOLAOU, M. *et al.* The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. **Clinical and Experimental Metastasis**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 309–318, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10585-018-9903-0>.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. The definition of primary and secondary glioblastoma. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 764–772, 2013.

OHNISHI, T. *et al.* Fibronectin-mediated cell migration promotes glioma cell invasion through chemokinetic activity. **Clinical and Experimental Metastasis**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 538–546, 1997.

OSKARSSON, T. *et al.* Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 17, n. 7, p. 867–874, 2011.

OSTROM, Q. T. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 19, n. suppl\_5, p. v1–v88, 2017. Disponível em: [http://academic.oup.com/neuro-oncology/article/19/suppl\\_5/v1/4596648](http://academic.oup.com/neuro-oncology/article/19/suppl_5/v1/4596648).

PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Fibronectin at a glance. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 115, n. 20, p. 3861–3863, 2002.

PAREKH, K. *et al.* Tenascin-C, over expressed in lung cancer down regulates effector functions of tumor infiltrating lymphocytes. **Lung Cancer**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 17–29, 2005.

PATTEN, J.; WANG, K. Fibronectin in development and wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 170, p. 353–368, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.09.005>.

PENG, J. *et al.* Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 1806–1828, 2011.

PINTO, J. V. K. **Avaliação dos efeitos do carotenoide fucoxantina na laminina em células de glioblastoma multiforme humano**. 2018. 1–64 f. - Universidade Federal de Santa Catarina, [s. l.], 2018.

RAITZ, R.; MARTINS, M. D.; ARAÚJO, V. C. A study of the extracellular matrix in salivary gland tumors. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 290–296, 2003.

RAMACHANDRA, M. *et al.* Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state. **Biochemistry**, [s. l.], v. 37, n. 14, p. 5010–5019, 1998.

SALAZAR, O. M. *et al.* High dose radiation therapy in the treatment of malignant gliomas: final report. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. 1733–1740, 1979.

SATOMI, Y. Antitumor and Cancer-preventative Function of Fucoxanthin: A Marine Carotenoid. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 37, p. 1557–1562, 2017. Disponível em: <http://ar.iijournals.org/content/37/4/1557.abstract>.

SCHULTZ, S. *et al.* Fine needle aspiration diagnosis of extracranial glioblastoma multiforme: Case report and review of the literature. **CytoJournal**, [s. l.], v. 2, n. 19, p. 1–6, 2005.

SENGUPTA, S. *et al.* Short hairpin RNA-mediated fibronectin knockdown delays tumor growth in a mouse glioma model. **Neoplasia**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 837–847, 2010.

SHO, H. History and characteristics of Okinawan longevity food. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 159–164, 2001.

SPONZIELLO, M. *et al.* Fibronectin-1 expression is increased in aggressive thyroid cancer and favors the migration and invasion of cancer cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 431, p. 123–132, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2016.05.007>.

STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**, [s. l.], v. 574, n. 2, p. 193–203, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.009>.

STUPP, R.; VAN DEN BENT, M. J.; HEGI, M. E. Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 198–206, 2005. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11910-005-0047-7>.

TAN, X. *et al.* miR-138-5p-mediated HOXD11 promotes cell invasion and metastasis by activating the FN1 / MMP2 / MMP9 pathway and predicts poor prognosis in penile squamous cell carcinoma. [s. l.], n. July, p. 1–14, 2022.

TREPAT, X.; CHEN, Z.; JACOBSON, K. Cell Migration. **Comprehensive Physiology**, [s. l.], v. 2, n. October, p. 2369–2392, 2012. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c110012>.

TUCKER, R. P.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Tenascin-C: Its functions as an integrin ligand. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [s. l.], v. 65, p. 165–168, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2015.06.003>.

TUCKER, R. P.; DEGEN, M. Revisiting the Tenascins: Exploitable as Cancer Targets?. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 12, n. June, p. 1–22, 2022.

VELLONEN, K. S.; HONKAKOSKI, P.; URTTI, A. Substrates and inhibitors of

efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 181–188, 2004.

VIRTUOSO, A. *et al.* Tumor Microenvironment and Immune Escape in the Time Course of Glioblastoma. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02996-z>.

WANG, Z. *et al.* Expression of angiopoietin-like 4 and tenascin C but not cathepsin C mRNA predicts prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma. **Biomarkers**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 39–46, 2010.

WEN, P.; KESARI, S. Malignant Gliomas in Adults. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 359, n. 5, p. 492–507, 2008. Disponível em: <http://www.nejm.org.lib-proxy.fullerton.edu/doi/full/10.1056/NEJMra0708126>.

XIA, S. *et al.* Tumor microenvironment tenascin-C promotes glioblastoma invasion and negatively regulates tumor proliferation. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 507–517, 2016.

XIANG, S. *et al.* Fucoxanthin Inhibits  $\beta$ -Amyloid Assembly and Attenuates  $\beta$ -Amyloid Oligomer-Induced Cognitive Impairments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 65, n. 20, p. 4092–4102, 2017.

YANG, Y. P. *et al.* Anti-inflammatory effect of fucoxanthin on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. **Natural Product Research**, [s. l.], v. 34, n. 12, p. 1791–1795, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1528593>.

YANG, H. *et al.* Role of Fucoxanthin towards Cadmium-induced renal impairment with the antioxidant and anti-lipid peroxide activities. **Bioengineered**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 7235–7247, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1973875>.

YANG, Z. *et al.* Tenascin-C predicts poor outcomes for patients with colorectal cancer and drives cancer stemness via Hedgehog signaling pathway. **Cancer Cell International**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01188-w>.

YILMAZ, A. *et al.* Advances on the roles of tenascin-C in cancer. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 135, p. 14, 2022.

YUE, B. Biology of the Extracellular Matrix: An Overview. **J Glaucoma.**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 1–7, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.

ZHANG, L. *et al.* Fucoxanthin provides neuroprotection in models of traumatic brain

injury via the Nrf2-ARE and Nrf2-autophagy pathways. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, p. 1–15, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep46763>.

ZHANG, N. *et al.* Molecular pathological expression in malignant gliomas resected by fluorescein sodium-guiding under the YELLOW 560 nm surgical microscope filter. **World Journal of Surgical Oncology**, [s. l.], v. 16, n. 195, p. 1–10, 2018.

ZHANG, X. X.; LUO, J. H.; WU, L. Q. FN1 overexpression is correlated with unfavorable prognosis and immune infiltrates in breast cancer. **Frontiers in Genetics**, [s. l.], v. 13, n. August, p. 1–16, 2022.

ZHANG, J.; STEVENS, M. F. G.; BRADSHAW, T. D. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. **Current Molecular Pharmacology**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 102–114, 2012.

ZHONG, M. *et al.* High FNDC1 expression correlates with poor prognosis in gastric cancer. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 3847–3854, 2018.

ZHOU, H. M. *et al.* Targeting cancer stem cells for reversing therapy resistance: mechanism, signaling, and prospective agents. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–17, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-00430-1>.

## ANEXO A – Descrição

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC




---

**PROJETO DE PESQUISA**


---

**Título:** CARACTERIZAÇÃO E ESTABELECIMENTO DE CULTURAS CELULARES PRIMÁRIAS A PARTIR DE GLIOMAS PROVENIENTES DE PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA DE RESSECÇÃO NO HOSPITAL GOVERNADOR CELSO RAMOS, FLORIANÓPOLIS, SC

**Área Temática:**

Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

**Versão:** 1

**CAAE:** 04087112.9.0000.0121

**Pesquisador:** Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar

**Instituição:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA (Hospital Universitário HU- UFSC)

---

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**


---

**Número do Parecer:** 108.286

**Data da Relatoria:** 24/09/2012

**Apresentação do Projeto:**

O estudo de Aguiar pretende estudar culturas de células de gliomas ressecados de pacientes do Hospital Celso Ramos, Florianópolis.

**Objetivo da Pesquisa:**

Estabelecer linhagens tumorais primárias a partir de gliomas humanos provenientes de pacientes submetidos à ressecção de tumores no Hospital Celso Ramos, Florianópolis, SC, estudando nestas linhagens os efeitos do tratamento com temozolamida e carmustina na modulação do aminoácido excitatório glutamato e o perfil de células tronco presentes.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos suplantam os benefícios.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Contribuirá sobre o conhecimento generalizável sobre o tema.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

TCLE adequado, anuência do HGCR.

**Recomendações:**

Não se aplica

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Pela aprovação

**Endereço:** Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-900  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-9208 **Fax:** (48)3721-9696 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado

FLORIANOPOLIS, 26 de Setembro de 2012

---

Assinado por:  
Washington Portela de Souza