UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Caracterização do efeito anti-neoplásico do butirato em duas
linhagens celulares de rato derivadas de tumores hepáticos com
diferente nível de diferenciação.**

Ernesto Vargas-Mendez

Tese para obtenção do título de DOUTOR.
Orientador: Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Caracterização do efeito anti-neoplásico do butirato em duas
linhagens celulares de rato derivadas de tumores hepáticos com
diferente nível de diferenciação.**

Ernesto Vargas-Mendez

Versão Original

Tese para obtenção do título de DOUTOR.
Orientador: Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno

São Paulo
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

V297c	<p>Vargas-Mendez, Ernesto Vargas-Mendez Caracterização do efeito anti-neoplásico do butirato em duas linhagens celulares de rato derivadas de tumores hepáticos com diferente nível de diferenciação / Ernesto Vargas-Mendez Vargas- Mendez. - São Paulo, 2018. 76 p.</p> <p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Orientador: Moreno, Fernando</p> <p>1. Câncer de fígado. 2. Ácido butírico. 3. Células tronco tumorais . 4. Transição epitelio-mesenquimal. I. T. II. Moreno, Fernando, orientador.</p>
-------	--

Ernesto Vargas-Mendez

Caracterização do efeito anti-neoplásico do butirato em duas linhagens
celulares de rato derivadas de tumores hepáticos com diferente nível de
diferenciação

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno
Orientador/Presidente

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

5º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2018.

“When one door closes another door opens; but we so often look so long and so regretfully upon the closed door, that we do not see the ones which open for us.”

Alexander Graham Bell

**À minha mãe Flor e meu pai German, pelo apoio
incondicional e por me ensinar que a educação é
a maior riqueza**

**Ao meu irmão Rudy e Kattia, por acreditar
em mim... sempre!**

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno, pela paciência, pelos ensinamentos e por acreditar em meu potencial. Agradeço por ter sido para mim um modelo de referência como pesquisador e orientador.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

À Oficina de Asuntos Internacionales y Cooperación Externa da Universidad de Costa Rica, pela bolsa concedida.

Ao Departamento de Bioquímica e a Escuela de Medicina da Universidad de Costa Rica, por tornar possível esta oportunidade com seu apoio e confiança.

Ao Prof. Dr. Thomas Prates Ong, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, por ceder gentilmente seu laboratório de cultura celular para realização de experimentos

À Profa. Tit. Silvia Maria Franciscato Cozzolino, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental pela confiança, carinho e por disponibilizar os equipamentos do seu laboratório para realização de experimentos.

À Profa. Dra. Sabrina Epiphany, do Laboratório de Imunopatologia Celular e Molecular da Malária, por disponibilizar o equipamento de PCR em tempo real.

Aos professores do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP por contribuírem com a minha formação.

À minha banca de qualificação: Prof. Dr. Bruno Cogliati, Profa. Tit. Maria Lúcia Zaidan Dagli e a Profa. Silvia Berlanga de Moraes Barros, pelas orientações que tanto contribuíram com o desenvolvimento do meu projeto de doutorado.

Aos meus amigos: Amanda, José Augusto, Bruna e Luciana. Sem sua ajuda e motivação não teria sido possível a elaboração desta tese.

Às minhas amigas Amanda, Graziela e Bruna pelas extensas conversas científicas, pelos momentos de desabafo, pelos doces, o café, os biscoitos/bolachas e por tantos momentos de alegria.

Aos meus colegas e amigos: Juliana, Roberto e Aline por me receber no laboratório não apenas como um colega, mas sim como um amigo querido. Agradeço também à Ju e ao Roberto por me acolher como parte das suas famílias em tantos momentos especiais.

Aos funcionários: Mônica, Cléo, Edilson e Roberta pela atenção e eficiência no desempenho dos seus trabalhos.

Aos colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição experimental pelo carinho, pela amizade e por todos esses dias de risadas.

Aos colegas do Laboratório de Dieta, Nutrição e câncer: Mayara, Ana, Paulo Eduardo e Laura pela ajuda e excelente convivência.

Ao meu colega Renato, pela confiança, pelos cafezinhos de descontração e pelas recomendações nos momentos difíceis do meu projeto. Agradeço também pela sua ajuda como técnico, sempre gentil e atenciosa.

Finalmente, agradeço a todos os que contribuíram com o desenvolvimento do meu projeto de pesquisa e que tornaram possível a elaboração desta tese.

RESUMO

VARGAS-MENDEZ, E. **Caracterização do efeito anti-neoplásico do butirato em duas linhagens celulares de rato derivadas de tumores hepáticos com diferente nível de diferenciação**. 2018. Tese [Doutorado Direto em Ciência dos Alimentos] – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O carcinoma hepatocelular (HCC) é uma neoplasia primária com mau prognóstico e alta taxa de recorrência. Estudos recentes demonstram que o HCC pode ser classificado em três subtipos segundo o perfil molecular. Destes subtipos, o HCC pouco diferenciado apresenta pior prognóstico. Neste sentido, torna-se de particular interesse o estudo de compostos com efeitos diferenciadores e citotóxicos nas células destas neoplasias pouco diferenciadas. O butirato, um ácido graxo de cadeia curta produzido pela fermentação microbiana da fibra alimentar no intestino, tem demonstrado atividade anti-neoplásica e capacidade moduladora da diferenciação celular em diversos tipos celulares, incluindo linhagens de HCC humano e células progenitoras hepáticas. Assim, objetivou-se neste estudo, caracterizar o efeito do butirato de sódio (NaBu) em duas linhagens de células neoplásicas de rato: uma pouco diferenciada (GP7TB) e a outra, uma linhagem derivada de um HCC diferenciado (JM-1). A linhagem GP7TB mostrou maior resistência ao NaBu (ED_{50} = 7,7 mM) do que as células JM-1 (ED_{50} = 5,2 mM). A redução na viabilidade celular após 72 h de tratamento com NaBu esteve relacionada com a diminuição na proliferação celular e no caso das células GP7TB, de um aumento na apoptose. O tratamento com NaBu induziu alterações morfológicas nas duas linhagens celulares, porém apenas nas células do tipo GP7TB, essas alterações sugerem um processo de diferenciação/transdiferenciação celular. O aumento na expressão de genes envolvidos no controle da pluripotência de células tronco, assim como de alguns marcadores de células tronco, sugere que o NaBu induziu uma reprogramação profunda das células GP7TB. Por outro lado, a redução na expressão de genes relacionados com migração e plasticidade celular assim como de proliferação celular apontam que estas células diminuíram seu potencial invasivo e a capacidade de autorenovação. Embora sejam necessárias análises adicionais para confirmar o efeito observado nos perfis de expressão gênica, os resultados deste estudo sugerem que o NaBu apresenta efeito antineoplásico por meio da redução da proliferação, aumento da apoptose e modulação da expressão de genes associados com a transição epitélio-mesenquimal em células com características tronco tumorais.

Palavras-chave: Butirato, carcinoma hepatocelular, células tronco tumorais, transição epitélio-mesenquimal.

ABSTRACT

VARGAS-MENDEZ, E. **Characterization of the anti-neoplastic effect of butyrate in two mouse cell lines derived from hepatic tumors with different levels of differentiation.** 2018. Thesis [Doctor in Food Science] [Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2018.]

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a primary neoplasia with poor prognosis and high recurrence rate. Recent evidence suggests that HCC can be classified in three different subtypes based on their molecular profile. Among these subtypes, the poorly-differentiated HCC has the worst prognosis. Therefore, the study of compounds with pro-differentiating and cytotoxic effects on poorly-differentiated neoplastic cells represents a matter of primary concern. Butyrate which is a short-chain fatty acid produced by microbial fermentation in the intestine, has demonstrated anti-neoplastic activity and pro-differentiating potential in several cell types, including, human HCC cell lines and liver progenitor cells. In this study, we aimed to characterize the effect of sodium butyrate (NaBu) on two neoplastic cell lines derived from rats: a poorly-differentiated cell line (GP7TB) and, a cell line derived from a well-differentiated HCC. GP7TB showed increased resistance to NaBu treatment ($ED_{50} = 7.7$ mM) compared to JM-1 ($ED_{50} = 5.2$ mM). The reduction in cell viability observed after 72 h of treatment was explained by a reduction in cell proliferation and, in the case of GP7TB, by increased levels of apoptosis. The NaBu treatment induced morphological alterations in both cell lines. However, only in the case of GP7TB cells, the alterations suggested a differentiation/transdifferentiation process. The up-regulation of genes involved in pluripotency and genes expressing stem cell markers indicated that NaBu triggered a deep reprogramming of GP7TB cells. Besides, a down-regulation in the expression of genes related with cell migration and plasticity suggested that these cells reduced their invasive potential and their self-renewal capacity. Additional analyses are necessary to confirm the observed effect on gene expression profiles. However, the results of this study suggest that NaBu exert anti-neoplastic effects through apoptosis, reduction of cell proliferation and downregulation of genes associated with epithelial-mesenchymal transition of cancer stem-like cells.

Keywords: Butyrate, hepatocellular carcinoma, cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exclusão de agregados celulares (DOUBLETs).....	26
Figura 2. Citotoxicidade do NaBu em duas linhagens de carcinoma hepatocelular murino, JM-1 e GP7TB	37
Figura 3. Determinação dos valores ED ₅₀ de NaBu após 72 h de tratamento nas linhagens celulares GP7TB e JM-1.....	38
Figura 4. Quantificação da apoptose induzida nas linhagens celulares GP7TB e JM-1 após 72h de tratamento com NaBu	40
Figura 5. Efeito do NaBu na proliferação das linhagens celulares JM-1 e GP7TB após 72 h de tratamento.....	41
Figura 6. Micrografias das linhagens JM-1 e GP7TB após 72 h de tratamento com NaBu.....	43
Figura 7. Análise quantitativa das alterações no tamanho celular das células JM-1 e GP7TB após tratamento com NaBu.....	45
Figura 8. Expressão diferencial de genes associados com células tronco tumorais nas linhagens celulares JM-1 e GP7TB.....	47
Figura 9. Efeito do NaBu na expressão diferencial de genes associados com células tronco tumorais nas células JM-1 e GP7TB.....	50
Figura 10. Efeito do NaBu na expressão diferencial de genes associados com células tronco tumorais nas células JM-1 após ajuste das condições de seleção estatística.....	53
Figura 11. Quantificação da porcentagem de células GP7TB positivas para os marcadores Thy1.1 e CD44 após tratamento com NaBu.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Densidade celular empregada nos tratamentos com NaBu.....	25
Tabela 2. Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo.....	28
Tabela 3. Lista dos genes avaliados no array de células tronco tumorais para RT-qPCR	30
Tabela 4. Genes diferencialmente expressos na linhagem GP7TB em relação à linhagem JM-1	48
Tabela 5. Genes diferencialmente expressos nas células GP7TB após 72h de tratamento com NaBu ED ₅₀	51
Tabela 6. Genes diferencialmente expressos nas células JM-1 após 72h de tratamento com NaBu ED ₅₀	52

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
1.1. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE FÍGADO	14
1.2. ETIOLOGIA DO CARCINOMA HEPATOCELULAR (HCC).....	15
1.3. HEPATOCARCINOGENESE E EVOLUÇÃO DO HCC	18
1.4. CÉLULAS TRONCO TUMORAIS.....	18
1.5. ÁCIDO BUTÍRICO E CÂNCER.....	20
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. LINHAGENS CELULARES	23
3.2. CULTURA CELULAR.....	23
3.3. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	24
3.4. CITOMETRIA DE FLUXO	25
3.4.1. <i>Marcação das células com Anexina V e 7-AAD</i>	<i>26</i>
3.4.2. <i>Marcação das células com CFSE</i>	<i>27</i>
3.4.3. <i>Determinação das modificações no tamanho celular.....</i>	<i>28</i>
3.4.4. <i>Imunofenotipagem de marcadores de superfície celular.....</i>	<i>28</i>
3.5. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL	29
3.6. MÉTODOS DE ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	33
4. RESULTADOS.....	36
4.1. CITOTOXICIDADE DO BUTIRATO DE SÓDIO EM DUAS LINHAGENS CELULARES DE CARCINOMA HEPATOCELULAR MURINO.....	36
4.2. O NaBu INDUZ APOPTOSE DAS CÉLULAS GP7TB MAS NÃO ALTERA A TAXA DE APOPTOSE DAS JM-1	39
4.3. O NaBu INIBE A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS GP7TB E JM-1.....	40
4.4. AS LINHAGENS CELULARES JM-1 E GP7TB APRESENTAM MUDANÇAS MORFOLÓGICAS DECORRENTES DO TRATAMENTO COM NaBu.....	42
4.5. EFEITO DO NaBu NO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS COM CÉLULAS TRONCO TUMORAIS NAS LINHAGENS CELULARES JM-1 E GP7TB.....	46

4.6. O TRATAMENTO COM NaBu ALTERA DIFERENCIALMENTE OS PADRÕES DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS CÉLULAS JM-1 E GP7TB	49
4.7. VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DE THY1.1 E CD44 POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	52
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXO 1 – FICHA DO ALUNO	73
ANEXO 2 – INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS DE BANCAS	75

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE FÍGADO

O câncer é a principal causa de morte no mundo e sua incidência está em aumento em países em desenvolvimento (TORRE *et al.*, 2016). Estima-se que, para 2030, a ocorrência de novos casos poderá atingir 22,2 milhões em todo o mundo (BRAY *et al.*, 2012). O câncer primário de fígado é a quinta neoplasia com maior incidência e a segunda em termos de mortalidade no mundo (TORRE *et al.*, 2016) representando aproximadamente 4% do total de cânceres diagnosticados por ano e 1% do total das mortes relacionadas a esta doença (NORDENSTEDT; WHITE; EL-SERAG, 2010).

Dentre os cânceres primários de fígado, o tipo mais frequente é o carcinoma hepatocelular (HCC) atingindo 85-90% das neoplasias de fígado diagnosticadas (LAFARO; DEMIRJIAN; PAWLIK, 2015). A incidência do HCC apresenta diferenças por gênero, sendo mais incidente em homens do que em mulheres (LAFARO; DEMIRJIAN; PAWLIK, 2015; TORRE *et al.*, 2016), por regiões geográficas e índice de desenvolvimento humano (BRAY *et al.*, 2012). Desta forma, países no leste e no sudeste da Ásia, assim como no norte e no oeste da África apresentam taxas mais elevadas de incidência e mortalidade, enquanto países ao norte da América e ao centro e leste da Europa apresentam menores taxas de incidência e mortalidade (TORRE *et al.*, 2016). De forma interessante, em alguns países de menor incidência como nos Estados Unidos, as taxas ajustadas por idade triplicaram-se entre os anos 1975 e 2011 (LAFARO; DEMIRJIAN; PAWLIK, 2015; TORRE *et al.*, 2016) e em outros países como a Itália e a Dinamarca a incidência tem diminuído (NORDENSTEDT; WHITE; EL-SERAG, 2010).

A distribuição heterogênea da incidência e a mortalidade desta doença tem sido associadas à distribuição dos principais fatores de risco conhecidos: infecções crônicas pelos vírus das hepatites B (HBV) e C (HCV), consumo de bebidas alcoólicas, consumo de alimentos contaminados por aflatoxina e doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) (LAFARO; DEMIRJIAN; PAWLIK, 2015; TORRE *et al.*, 2016). A alta prevalência de HBV na África e na Ásia

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

correlaciona-se com a incidência do câncer de fígado nestas regiões exceto no Japão, onde o principal fator de risco da neoplasia é o HCV (GBODLC *et al.*, 2017; MARTEL *et al.*, 2012). Em países desenvolvidos os principais fatores de risco do HCC são o HCV e o consumo excessivo de bebidas alcoólicas. Neste sentido, o incremento na incidência observada nos Estados Unidos nos últimos 35 anos tem sido atribuído ao aumento de infecções crônicas de HCV entre 1960 e 1970 (LAFARO; DEMIRJIAN; PAWLIK, 2015; TORRE *et al.*, 2016).

Um detalhe importante a ser ressaltado é que nos grandes estudos realizados em países ocidentais, de 30-40% dos casos de HCC não foram associados a nenhum dos fatores de risco mencionados anteriormente (NORDENSTEDT; WHITE; EL-SERAG, 2010). Esses casos são chamados de etiologia criptogênica e acredita-se que poderiam estar associados com a alimentação e estilos de vida (BRAY *et al.*, 2012). Neste sentido associações recentes da obesidade (YANG *et al.*, 2017) e o desenvolvimento da doença gordurosa hepática não alcoólica (NAFLD) com o desenvolvimento do HCC confirmam a hipótese de que novos fatores de risco estão emergindo (SHERMAN, 2010), os quais estão associados principalmente à alimentação e ao estilo de vida e são os principais responsáveis pelo aumento da incidência do HCC nos países onde o controle e a prevenção da hepatite viral está sendo efetiva (BRAY *et al.*, 2012; SHERMAN, 2010).

1.2. ETIOLOGIA DO CARCINOMA HEPATOCELULAR (HCC)

Embora o carcinoma hepatocelular seja um câncer com elevada letalidade, seus principais fatores etiológicos são conhecidos. Esta discrepância pode ser explicada, em parte, pela falta de biomarcadores precoces de diagnóstico e o contexto da doença crônica subjacente que limita as opções terapêuticas da maioria destes pacientes (FARAZI; DEPINHO, 2006).

Os principais fatores de risco associados com o HCC são as infecções crônicas pelos vírus das hepatites B (HBV) e C (HCV), o consumo crônico de bebidas alcoólicas, os alimentos contaminados pela aflatoxina B1 e outras condições que desencadeiam fibrose ou cirrose hepática como a NAFLD e a cirrose autoimune (BRUIX *et al.*, 2017; FARAZI; DEPINHO, 2006; YANG; ROBERTS, 2010).

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A infecção crônica pelo HBV é o fator etiológico responsável pela maior parte dos casos de HCC diagnosticados nos países menos desenvolvidos (FARAZI; DEPINHO, 2006). Embora a implementação de programas de vacinação esteja reduzindo o número de novos casos (KIM *et al.*, 2018), a falta de tratamentos curativos e o grande custo das terapias disponíveis fazem com que o risco de HCC seja ainda grande em países onde o HBV é endêmico (KIM *et al.*, 2018; SCHINAZI *et al.*, 2018).

A influência do vírus na origem e evolução do HCC é complexa e envolve fatores tanto virais como do hospedeiro (FARAZI; DEPINHO, 2006; YANG; ROBERTS, 2010). Existem evidências que sugerem que o vírus pode induzir a transformação neoplásica de forma direta, através de alterações que acontecem após a inserção do DNA viral no genoma da célula hospedeira, assim como, da modulação na expressão de oncogenes como *SRC*, *RAS*, *RAF*, *MAPK*, *ERK* e *JNK* (FARAZI; DEPINHO, 2006). Além disso, em países endêmicos da Ásia e da África, a infecção crônica do HBV coexiste com a exposição a alimentos contaminados com aflatoxina B1 (BRUIX *et al.*, 2017).

A evolução do HBV depende de fatores genéticos associados com a etnia. Em caucasianos é mais frequente o desenvolvimento de cirrose decorrente da infecção pelo HBV do que em negros ou asiáticos. Assim, o HCC nestas últimas populações, origina-se frequentemente de forma independente da cirrose ou em pacientes com cirrose menos avançada (BRUIX *et al.*, 2017; YANG; ROBERTS, 2010).

Já a infecção crônica pelo vírus HCV, é o principal fator etiológico no desenvolvimento de HCC em países ocidentais desenvolvidos como Estados Unidos (YANG; ROBERTS, 2010). Contrário ao HBV, este vírus de RNA apresenta grande propensão (60-80%) ao estabelecimento de infecções crônicas (FARAZI; DEPINHO, 2006) e associa-se com maior incidência de cirrose (YANG; ROBERTS, 2010). Este vírus apresenta mecanismos de evasão da resposta imune e interage com proteínas da via de sinalização MAPK, modulando a proliferação da célula hospedeira (FARAZI; DEPINHO, 2006).

Embora não exista uma vacina efetiva para a prevenção das infecções por HCV, os recentes estudos clínicos que avaliaram a efetividade do tratamento com associações de antivirais de ação direta (DAA) observaram respostas virológicas sustentadas (SVR) de até 98%, sugerindo que a eliminação da

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

infecção foi total (ASSELAH; MARCELLIN; SCHINAZI, 2018; SUDA *et al.*, 2018). Porém, ainda são necessários mais estudos para garantir a segurança dos tratamentos para pacientes com outras complicações sistêmicas (SUDA *et al.*, 2018) e para determinar se a erradicação do HCV poderia ter uma redução no risco de HCC para estes pacientes (ASSELAH; MARCELLIN; SCHINAZI, 2018).

No caso da aflatoxina B1, a associação com o desenvolvimento de HCC é direta. Embora a intoxicação aguda induza danos hepáticos que, em última instância, podem evoluir para cirrose, a intoxicação crônica é a que apresenta uma relação causal com o HCC (ADILAH, 2017). Existe também uma relação entre a aflatoxicose crônica e o estabelecimento do processo cirrótico. Porém, esse efeito é dependente da co-infecção com o HBV (BRUIX *et al.*, 2001; CHU *et al.*, 2017). Contudo, o efeito mutagênico da aflatoxina B1 é conhecido, assim como seu potencial carcinogênico (FARAZI; DEPINHO, 2006; YANG; ROBERTS, 2010). A aflatoxina é produzida por fungos do gênero *Aspergillus* que crescem em alimentos, principalmente grãos. A exposição a esta toxina ocorre principalmente na África e alguns países da Ásia (ADILAH, 2017). A aflatoxina ingerida é primeiro metabolizada pelas enzimas de fase I hepáticas gerando um intermediário epóxido que se liga covalentemente na posição N7 dos nucleotídeos de guanina no DNA dos hepatócitos (VARTANIAN *et al.*, 2017). Em última instância, esses adutos geram mutações durante a replicação do DNA. Num estudo recente foi realizada uma triagem molecular por sequenciamento de nova geração (NGS) e modelamento computacional em que foi estabelecido o perfil genômico das principais mutações geradas pela toxina *in vitro* e *in vivo* (HUANG *et al.*, 2017). Este modelo poderia ajudar na identificação das vias celulares que são alteradas no processo carcinogênico induzido pela aflatoxina B1.

O consumo crônico de bebidas alcoólicas também é um fator etiológico de relevância na gênese do HCC (FARAZI; DEPINHO, 2006; YANG; ROBERTS, 2010). Este tem sido implicado na produção de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e prostanglandina E₂, assim como no recrutamento de monócitos e na ativação de células de *küpf*er e estreladas. Este ambiente pró-inflamatório e pró-oxidativo no parênquima hepático induz a morte dos hepatócitos. A constante exposição do fígado a este ambiente gera ciclos de morte e regeneração que podem desencadear fibrose e cirrose (FARAZI; DEPINHO,

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2006). Existe também evidência que aponta para o desenvolvimento de mutações oncogênicas, que são produzidas pelo estresse oxidativo decorrente do estado inflamatório assim como de alterações em vias de sinalização pró-inflamatórias como no caso da via Jak/Stat. (FARAZI; DEPINHO, 2006).

1.3. HEPATOCARCINOGENESE E EVOLUÇÃO DO HCC

A carcinogênese é o processo em que uma ou várias células evoluem até uma neoplasia. Este processo ocorre através do acúmulo de mutações no DNA (IRIGARAY; BELPOMME, 2010) ou de alterações estáveis no epigenoma das células (NEPHEW; HUANG, 2003). Este processo envolve múltiplas etapas, como iniciação, promoção e progressão na transformação das células normais em malignas (FARBER, 1984; PITOT; DRAGAN, 1991) e é um processo longo, pois requer cerca de metade ou até 2/3 da vida dos animais (FARBER, 1984), ou de 20 a 40 anos no caso de humanos, especialmente no contexto das neoplasias sólidas (LOEB; HARRIS, 2008).

O primeiro passo é a iniciação das células, em que alterações genéticas irreversíveis são fixadas (PITOT; DRAGAN, 1991). Na etapa seguinte, conhecida como promoção, originam-se as lesões pré-neoplásicas (LPN) como resposta à expansão clonal das células iniciadas em presença de um ou vários agentes promotores (LUCH, 2005; PITOT; DRAGAN, 1991). Neste estágio, novas alterações, principalmente epigenéticas, concedem propriedades adaptativas às células que facilitam sua expansão, aumentando a extensão das LPNs (NEPHEW; HUANG, 2003; PITOT; DRAGAN, 1991). A fase da promoção é reversível e apresenta grande período de latência pelo que representa um alvo de agentes quimiopreventivos (PITOT; DRAGAN, 1991).

1.4. CÉLULAS TRONCO TUMORAIS

Os estudos em carcinogênese tem acrescentado nosso conhecimento sobre os fatores que levam a formação de LPN, e de como a evolução destas LPN pode levá-las a progredir a neoplasias ou regredir a tecidos não alterados. Porém, a origem e os mecanismos celulares de evolução das neoplasias sólidas são ainda desconhecidos (VISVADER; LINDEMAN, 2008) e a evidência sobre os tipos celulares envolvidos assim como a natureza das mudanças fenotípicas

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

que necessitam ocorrer para o câncer evoluir é ainda controversa (GUPTA; CHAFFER; WEINBERG, 2009; NGUYEN *et al.*, 2012).

Nowell propôs em 1976 a hipótese da origem clonal das neoplasias na qual a célula iniciada sofre uma expansão clonal por mitose e as mutações que surgem devido à instabilidade cromossômica são a força que geram novas características adaptativas das células conferindo-lhes maior capacidade de proliferação (NOWELL, 1976). A principal premissa na hipótese da expansão clonal é que todas as células dentro de um tumor possuem a mesma capacidade de iniciar uma nova neoplasia por serem todas clones da célula iniciada. Porém, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que nem todas as células extraídas de um câncer tem a mesma capacidade de gerar neoplasias e em muitos casos só uma pequena proporção das células consegue gerar um novo câncer (LAPIDOT *et al.*, 1994; LOBO *et al.*, 2007).

Outra hipótese de evolução das neoplasias propõe um modelo hierárquico em que células com características tronco geram subpopulações celulares mais diferenciadas ou com diferentes características adaptativas. Este modelo surgiu no estudo das células tronco hematopoiéticas e a leucemia mieloide aguda (AML) (VISVADER; LINDEMAN, 2008). Neste sentido, descobriu-se que os marcadores usados para identificar as células tronco hematopoiéticas foram detectados também numa fração das células de AML.

Posteriormente, a descoberta de marcadores de células tronco em glioblastomas (GILBERTSON; RICH, 2007) e em câncer de mama (DONTU *et al.*, 2003) permitiram expandir o conceito das células tronco tumorais também às neoplasias sólidas (PARDAL; CLARKE; MORRISON, 2003; VISVADER; LINDEMAN, 2008). Estudos adicionais com células isoladas injetadas em camundongos com severa imunodeficiência combinada (SCID) e de expansão e diferenciação *in vitro* levaram à hipótese hierárquica da origem e evolução das neoplasias (LOBO *et al.*, 2007; VISVADER; LINDEMAN, 2008).

No modelo hierárquico, as células tronco tumorais (CSC, do inglês *cancer stem cells*), são as responsáveis pelo crescimento e complexidade da neoplasia. As CSC são células pluripotentes e possuem tanto capacidade de auto renovação como grande plasticidade fenotípica (REYA *et al.*, 2001; VISVADER; LINDEMAN, 2008).

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em termos da origem das CSC, uma hipótese sugere que estas células são derivadas de células tronco somáticas por possuírem a capacidade de auto-renovação e diferenciação. Além disso, as células tronco somáticas apresentam maior meia vida comparadas às células maduras ou diferenciadas e, em consequência, uma maior probabilidade de acumular mutações (LOBO *et al.*, 2007; PARDAL; CLARKE; MORRISON, 2003) e mudanças epigenéticas irreversíveis (NGUYEN *et al.*, 2012). Outra hipótese sugere que as células tronco neoplásicas podem derivar-se não só de células tronco somáticas, mas também de células neoplásicas mais diferenciadas por meio de mecanismos de desdiferenciação ou trans-diferenciação celular (NGUYEN *et al.*, 2012).

Dentre os marcadores celulares para a identificação de CSCs no fígado encontram-se marcadores de células hematopoiéticas como CD34, C-kit, flt-3 e Thy1 (CD90) (HE; SMITH; MISHRA, 2015; ROSKAMS, 2006; ROSKAMS *et al.*, 1998) e marcadores identificados em CSCs de outras neoplasias extra-hepáticas (próstata, mama e cérebro) como CD133, CD44, CD13 e EpCAM. Estes marcadores de CSC são expressos por subpopulações de células progenitoras e tem sido associados a subtipos de HCC de mau prognóstico identificados por perfis de expressão de larga escala (LEE *et al.*, 2004).

1.5. ÁCIDO BUTÍRICO E CÂNCER

O ácido butírico (AB) é um ácido graxo de quatro carbonos, produzido pela fermentação bacteriana de fibras alimentares no lúmen intestinal. O AB, ou butirato na sua forma desprotonada, é classificado como ácido graxo de cadeia curta (AGCC), junto com os ácidos acético e propiônico, também produzidos pelo metabolismo bacteriano da microbiota intestinal em humanos (HAMER *et al.*, 2008).

As fibras são compostas principalmente de polissacarídeos não amiláceos (em inglês NSP, *nonstarch polysaccharides*) que não podem ser hidrolisados pelas enzimas endógenas das células humanas, mas sim pelas bactérias anaeróbias presentes no intestino (TOPPING; CLIFTON, 2001). O butirato é o produto mais abundante produzido pela microbiota intestinal e é necessário para a fisiologia normal dos colonócitos (LEONEL; ALVAREZ-LEITE, 2012).

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nos últimos 40 anos, o ácido butírico (AB), vem sendo estudado como um agente no tratamento do câncer e de doenças hematológicas com base em resultados obtidos em culturas celulares (LEDER; LEDER, 1975; PRASAD, 1980). Em um dos primeiros relatos do potencial anti-neoplásico do butirato, descreveu-se que o butirato de sódio (NaBu) promoveu alterações morfológicas e reduziu o crescimento de linhagens celulares transformadas (GINSBURG *et al.*, 1973). Foi sugerido que a estrutura simples de quatro carbonos era o fator determinante da sua capacidade diferenciadora, segundo um estudo conduzido em células leucêmicas (LEDER; LEDER, 1975).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Caracterizar o mecanismo de ação do butirato em células neoplásicas hepáticas de rato pouco diferenciadas e determinar se existem diferenças no mecanismo de ação do butirato segundo o grau de diferenciação da célula neoplásica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LINHAGENS CELULARES

Foram utilizadas duas linhagens celulares, JM-1 e GP7TB, derivadas de neoplasias hepáticas induzidas em ratos Fischer 344 (F-344). A linhagem JM-1 foi cedida pelo pesquisador Dr. George Michalopoulos (Departamento de Patologia, Centro Médico da Universidade de Duke, Carolina do Norte, EUA) e foi estabelecida clonalmente a partir de um carcinoma hepatocelular de morfologia trabecular diferenciada (NOVICKI; JIRTLE; MICHALOPOULOS, 1983). A neoplasia original desta célula foi produzida por um modelo modificado de Pitot *et al.* (1978) em que uma dose de 70 mg/Kg de dietilnitrosamina (DEN) foi administrada 24 h após hepatectomia parcial de 2/3 seguida de administração constante de fenobarbital na água (0,1 g/100 mL) por duas semanas (NOVICKI; JIRTLE; MICHALOPOULOS, 1983). Já a linhagem GP7TB, gentilmente fornecida pelo pesquisador Dr. William B. Coleman (Departamento de Patologia da Escola de Medicina da Universidade da Carolina do Norte, Chapel Hill, EUA), é uma linhagem clonal que foi derivada de um tumor gerado a partir da inoculação singênica de uma linhagem celular transformada neoplasticamente *in vitro* por meio do tratamento com N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) (COLEMAN *et al.*, 1993). As células usadas inicialmente para a transformação neoplásica *in vitro* foram provenientes da linhagem epitelial diploide WB-F344 que o grupo do referido pesquisador havia isolado a partir do fígado imaturo de um rato macho F-344 em estudo anterior. A linhagem GP7TB apresentou aneuploidia e alta plasticidade fenotípica que foi demonstrada pelas diferenças morfológicas entre as neoplasias pouco diferenciadas que produziram quando inoculadas por via subcutânea e as neoplasias hepáticas bem diferenciadas que produziram quando transplantadas ortotopicamente (COLEMAN *et al.*, 1993).

3.2. CULTURA CELULAR

As duas linhagens celulares foram cultivadas em meio DMEM sem glutamina (Lonza, Suécia) ou suplementado com 2 mM de glutamina modificada (UltraGlutamina, Lonza, Suécia) e 10% de soro fetal bovino inativado (SFB;

3. MATERIAL E MÉTODOS

CultiLab, Brasil) em garrafas plásticas de 25 ou 75 cm² (Corning Inc, EUA). As culturas foram incubadas em equipamento contendo 5% de CO₂ a 37°C (Sanyo, Japão). As células JM-1 foram expandidas até 75% de confluência enquanto as células GP7TB até 95-100%. Após atingida essa confluência, as células foram lavadas com DPBS (Lonza, Suécia) e submetidas a descolamento enzimático por meio de uma mistura comercial de tripsina e tampão Versene (Trypsin-Versene, Lonza, Suécia) e foram semeadas após contagem em novas garrafas plásticas. Tanto as células JM-1 como as GP7TB foram mantidas em cultura até a passagem número 20. Após o limite de passagens, uma nova alíquota de células criopreservadas em nitrogênio líquido foi descongelada e expandida. A eventual contaminação das culturas celulares com diversas espécies de micoplasma foi monitorada com testes fluorimétricos (MycoAlert Plus, Lonza, Suécia) seguindo-se as orientações do fabricante em leitor multiplacas (Synergy H1 Hybrid Reader; Biotek, EUA).

3.3. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Para a avaliação do efeito antineoplásico do butirato de sódio (NaBu; Sigma-Aldrich, EUA), foi conduzido ensaio de viabilidade celular tanto nas células JM-1 como nas GP7TB, usando a técnica de redução do MTT (Bromuro de 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium) (Sigma-Aldrich, EUA) como indicador de viabilidade celular após tratamento com diferentes concentrações de butirato de sódio em 24, 48 e 72 horas. O sal do MTT é reduzido na mitocôndria das células viáveis gerando um precipitado de cor azul-roxo insolúvel em água que após solubilização em etanol pode ser quantificado por espectrofotometria a 570 nm.

Para o ensaio de MTT, $5,0 \times 10^3$ e $1,2 \times 10^4$ células das linhagens GP7TB e JM-1 respectivamente, foram semeadas em placas de 96 poços (Corning Inc., EUA) e tratadas, após 24 h de adesão, durante 24, 48 e 72 horas com concentrações de butirato de sódio que variaram de 0,08 a 100,0 mM. As curvas de tratamento foram preparadas por diluição seriada e testadas nas células em 5 replicatas técnicas por placa. Após o tratamento, o meio foi substituído por 50 µL da solução de trabalho do MTT (0,5 mg/mL em DMEM sem soro) e foram incubadas 45 min a 37°C. Posteriormente, a solução foi removida das células

3. MATERIAL E MÉTODOS

por aspiração e os cristais do sal de formazan produzido pelas células viáveis foram solubilizados em 100 µL de etanol a 95% (Merck, Alemanha). O formazan produzido foi quantificado por espectrofotometria usando um leitor de placas (Multiskan GO; Thermo Scientific, EUA) a 570 nm. A viabilidade celular foi determinada pela divisão da absorbância das células tratadas pela absorbância das células tratadas com o veículo do butirato de sódio (PBS) e foi apresentada como porcentagem relativa de viabilidade celular. As curvas de viabilidade foram realizadas 3 vezes em experimentos independentes (n=3).

3.4. CITOMETRIA DE FLUXO

As duas linhagens celulares foram tratadas com as respectivas doses efetivas 50% (ED₅₀, do *ingês effective dose 50%*) de butirato de sódio determinadas nas curvas de viabilidade dos ensaios de redução do MTT. As células foram semeadas em garrafas de 75 cm² 24 horas antes do início do tratamento em diferentes densidades dependendo da linhagem e do tempo de tratamento (**tabela 1**).

Tabela 1. Densidade celular empregada nos tratamentos com NaBu

Linhagem celular	Tempo de tratamento	Nº de células por garrafa
JM-1	72 h	1,8 x 10 ⁶
GP7TB	72 h	7,5 x 10 ⁵

Após adesão, as células foram tratadas com o NaBu ou veículo (PBS) durante 24 h ou 72 h. A seguir, as foram coletadas por descolamento enzimático usando tripsina (Lonza, Suécia) e o *pellet* de células obtido por centrifugação (1500 rpm por 5 min) foi ressuspensionado no respectivo tampão para a marcação e/ou análise no citômetro de fluxo (BD FACSVerser na configuração de 2 lasers, 488 e 640 nm; BD Biosciences, EUA). O número de células a ser marcado e analisado foi determinado por meio de um contador automático (*TC20 Cell Counter*; Bio-Rad Laboratories, Inc., EUA) usando a técnica de exclusão do corante *trypan blue* (Sigma-Aldrich, EUA) para a identificação de células não viáveis nas suspensões celulares. Com exceção da análise de CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) em que foram adquiridos 5.000-10.000

3. MATERIAL E MÉTODOS

eventos a baixo fluxo (*Low flow rate*), nos demais ensaios foram adquiridos aproximadamente 50.000 eventos a fluxo médio (*Normal flow rate*). Os eventos obtidos foram salvos em arquivos com formato FCS 3 e exportados para análise gráfica no programa FlowJo v10 (FlowJo LLC, EUA), em que foram excluídos os grumos de células e, conseqüentemente, os *outliers* observados nos gráficos de SSC-W x SSC-H e FSC-W x SFSC-W como se mostra na **figura 1**.

Figura 1. Exclusão de agregados celulares (DOUBLETS)

3.4.1. Marcação das células com Anexina V e 7-AAD

Visando identificar se o NaBu exerce um efeito apoptótico nas células JM-1 e GP7TB, empregou-se a marcação com anexina V para a detecção de células em fase precoce de apoptose junto com a marcação de 7-AAD (7-amino-actinomycin D) para a exclusão de células mortas. Para a marcação tanto das células JM-1 como das GP7TB foi utilizado um kit comercial (*PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I*, BD Pharmigen). O *pellet* de células obtido para a análise de citometria de fluxo foi ressuspendido no tampão de ligação da anexina (*Annexin V Binding Buffer*). A seguir, $3,0 \times 10^5$ células em 100 μL de tampão de ligação foram incubadas com 5 μL de Anexina V conjugada com PE (Ficoeritrina) e 5 μL de 7-AAD durante 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Uma vez finalizada a marcação, as suspensões celulares foram diluídas em 200 μL de tampão de ligação e foram quantificadas no citômetro de fluxo em até 1 h

3. MATERIAL E MÉTODOS

após marcação. Tubos controle com células marcadas só com PE-anexina V ou só com 7-AAD foram preparados tanto para as células tratadas com NaBu como para as células controle. Os dados gerados por estes tubos foram empregados na definição dos quadrantes usados na quantificação das porcentagens celulares. Cinco replicatas experimentais foram utilizadas para a análise estatística dos resultados.

3.4.2. Marcação das células com CFSE

O CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) é uma substância fluorescente, permeável à membrana celular que se liga de forma covalente aos agrupamentos amino, principalmente das proteínas. É usado como indicador de proliferação uma vez que durante a mitose as moléculas de CFSE ligadas nas proteínas se distribuem de forma equimolar entre as duas células produzindo uma perda na intensidade de fluorescência proporcional ao número de ciclos de divisão celular (LYONS, 2000). Este efeito de diluição na fluorescência pode ser quantificado por citometria de fluxo como sinal no canal do fluorocromo FITC (Fluoresceína Isotiociano).

Para a determinação do efeito anti-proliferativo do NaBu tanto nas células JM-1 como nas GP7TB, a marcação com 5 μ M de CFSE (BD biosciences, EUA) foi realizada antes do tratamento com NaBu ou seu veículo. Assim, células JM-1 e GP7TB foram coletadas após tripsinização, lavadas com DPBS e ressuspensas em DPBS em uma concentração de $1,0 \times 10^6$ células. A seguir, o CFSE mantido em alíquotas de 10 mM a -20°C foi descongelado e o volume correspondente para uma concentração final de 5 μ M foi colocado nas suspensões celulares. Após incubação a 37°C durante 15 minutos, o CFSE não ligado foi excluído por adição de DMEM contendo 10% SFB e as células foram lavadas e ressuspensas em DMEM-10% FBS fresco para serem semeadas e tratadas com NaBu ou controle por 72 h.

Finalizado o tratamento, as células foram coletadas, marcadas com 7-AAD (5 μ L em 50 μ L de suspensões celulares a $1,0 \times 10^6$ células/mL) durante 20 minutos e analisadas no citômetro de fluxo. As medianas das intensidades de fluorescência do CFSE (canal FITC) nas células tratadas com NaBu foram então comparadas com as células controle (PBS). As células não viáveis foram

3. MATERIAL E MÉTODOS

excluídas da análise por meio da exclusão de eventos positivos para 7-AAD (canal PerCP). Cinco replicatas experimentais foram utilizadas para a análise estatística dos resultados.

3.4.3. Determinação das modificações no tamanho celular

As modificações no tamanho das células JM-1 e GP7TB induzidas pelo NaBu foram determinadas comparando os valores de FSC (*forward scatter*) das células tratadas 72 h com NaBu ED₅₀ e as células controle tratadas com PBS. Os valores de FSC foram quantificadas no citômetro de fluxo nas configurações de voltagem usadas para a detecção do CFSE. As células das duas linhagens foram coletadas após tratamento por tripsinização e foram fixadas com 1% paraformaldeído em DPBS. As medianas de fluorescência para cada experimento foram determinadas e a média dos experimentos foi empregada nas análises estatísticas. No total, 5 replicatas experimentais foram realizadas.

3.4.4. Imunofenotipagem de marcadores de superfície celular

A lista de anticorpos e suas respectivas concentrações usadas para a imunodetecção de marcadores na superfície da membrana das células JM-1 e GP7TB estão apresentadas na **tabela 2**.

Tabela 2. Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Concentração ($\mu\text{L}/10^6$ células)	Fabricante
CD90.1 (Thy1.1)	PE	OX-7	6	BD Biosciences
CD44H (CD44s)	FITC	OX-49	2	BD Biosciences

Após 24 ou 72 horas de tratamento das células com NaBu ED₅₀ ou PBS, as células foram coletadas após tripsinização, lavadas uma vez com PBS e ressuspensas em tampão FACS (DPBS com 1% de SFB e EDTA a 1 mM). A marcação com os anticorpos foi realizada em placas de 96 poços com fundo em U (Corning Inc, EUA) em um volume total de 50 μL por poço de reação contendo $5,0 \times 10^5$ células. Antes da marcação com os anticorpos conjugados com fluorocromos, as suspensões celulares foram tratadas 5 minutos com anti-CD32

3. MATERIAL E MÉTODOS

(FC-blocker; BD biosciences) como bloqueador de ligações inespecíficas dos anticorpos. Em seguida, sem lavar as células, o coquetel correspondente de anticorpos conjugados com fluorocromos foi adicionado e as células foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luz com papel alumínio. Após o término da marcação, as células foram lavadas duas vezes com tampão FACS, fixadas com 1% paraformaldeído e mantidas na geladeira (4°C) até análise no citômetro de fluxo.

Além dos tubos contendo o coquetel de anticorpos (multiplex), tubos contendo somente um anticorpo (controles *single-stained*; ST) e tubos contendo todos os anticorpos exceto um (controles *fluorescence minus one*; FMO) foram marcados e usados nas análises citométricas. Os controles ST foram empregados na compensação digital dos canais no FlowJo e os controles FMO foram utilizados na definição dos quadrantes e os *gates* de seleção de subpopulações celulares. Os resultados foram apresentados como médias de percentuais de células positivas ou negativas para os marcadores de 5 experimentos independentes.

3.5. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

Para a análise de expressão gênica utilizou-se a técnica de PCR quantitativo em tempo Real (RT-qPCR) em dois passos (transcrição reversa do RNA e amplificação do cDNA em corridas separadas) seguindo-se as orientações do MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*; (BUSTIN *et al.*, 2009). Foram empregados arrays comerciais de RT-qPCR pré-validados em placas de 96 poços (*RT² Profiler PCR Array Rat Cancer Stem Cells*; No Cat. PARN-176Z) contendo 84 genes associados com células tronco tumorais (**tabela 3**). As duas linhagens foram cultivadas e tratadas com butirato de sódio por 72 horas conforme **tabela 1**.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 3. Lista dos genes avaliados no *array* de células tronco tumorais para RT-qPCR

Gene	Código GenBank	Código Unigene	Descrição do gene
Abcb5	XM_006225905	ND	ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 5
Abcg2	NM_181381	Rn.13131	ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 2
Alcam	NM_031753	Rn.5789	Activated leukocyte cell adhesion molecule
Aldh1a1	NM_022407	Rn.6132	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1
Atm	NM_001106821	Rn.214048	Ataxia telangiectasia mutated homolog (human)
Atxn1	NM_012726	Rn.88438	Ataxin 1
Axl	NM_001013147	Rn.161805	Axl receptor tyrosine kinase
Bmi1	NM_001107368	Rn.220522	Bmi1 polycomb ring finger oncogene
Bmp7	NM_001191856	Rn.18030	Bone morphogenetic protein 7
Cd24	NM_012752	Rn.6007	CD24 molecule
Cd34	NM_001107202	Rn.219720	CD34 molecule
Cd38	NM_013127	Rn.11414	CD38 molecule
Cd44	NM_012924	Rn.1120	Cd44 molecule
Chek1	NM_080400	Rn.33267	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)
Ddr1	NM_013137	Rn.7807	Discoidin domain receptor tyrosine kinase 1
Dkk1	NM_001106350	Rn.214343	Dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)
Dll1	NM_032063	Rn.10628	Delta-like 1 (Drosophila)
Dll4	NM_001107760	Rn.147393	Delta-like 4 (Drosophila)
Dnmt1	NM_053354	Rn.6955	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
Egf	NM_012842	Rn.6075	Epidermal growth factor
Eng	NM_001010968	Rn.187025	Endoglin
Epcam	NM_138541	Rn.106481	Epithelial cell adhesion molecule
ErbB2	NM_017003	Rn.93966	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
Etfa	NM_001009668	Rn.32496	Electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide
Fgfr2	NM_001109892	Rn.12732	Fibroblast growth factor receptor 2
Flot2	NM_031830	Rn.2105	Flotillin 2
Foxa2	NM_012743	Rn.10948	Forkhead box A2
Foxp1	NM_001034131	Rn.35036	Forkhead box P1
Fzd7	XM_006226838	ND	Frizzled family receptor 7
Gata3	NM_133293	Rn.229174	GATA binding protein 3
Gata4	NM_144730	Rn.26251	GATA binding protein 4
Gsk3b	NM_032080	Rn.10426	Glycogen synthase kinase 3 beta
Hdac1	NM_001025409	Rn.1863	Histone deacetylase 1
Id1	NM_012797	Rn.2113	Inhibitor of DNA binding 1
Ikbkb	NM_053355	Rn.19222	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta
Itga2	XM_345156	Rn.83597	Integrin, alpha 2
Itga4	NM_001107737	Rn.12704	Integrin, alpha 4
Itga6	NM_053725	Rn.22382	Integrin, alpha 6
Itgb1	NM_017022	Rn.25733	Integrin, beta 1
Jag1	NM_019147	Rn.88804	Jagged 1
Jak2	NM_031514	Rn.18909	Janus kinase 2
Kit	NM_022264	Rn.54004	V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
Kitlg	NM_021843	Rn.44216	KIT ligand

3. MATERIAL E MÉTODOS

Klf17	XM_233437	Rn.159750	Kruppel-like factor 17
Klf4	NM_053713	Rn.7719	Kruppel-like factor 4 (gut)
Lats1	NM_001134543	Rn.29152	LATS, large tumor suppressor, homolog 1 (Drosophila)
Lin28a	NM_001109269	Rn.147538	Lin-28 homolog (C. elegans)
Lin28b	XM_001069344	ND	Lin-28 homolog B (C. elegans)
Maml1	NM_001106997	Rn.2394	Mastermind like 1 (Drosophila)
Mertk	NM_022943	Rn.48789	C-mer proto-oncogene tyrosine kinase
Ms4a1	NM_001107578	Rn.16385	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
Muc1	NM_012602	Rn.10779	Mucin 1, cell surface associated
Myc	NM_012603	Rn.12072	Myelocytomatosis oncogene
Mycn	NM_001013096	Rn.81116	V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)
Nanog	NM_001100781	Rn.124668	Nanog homeobox
Nfkb1	NM_001276711	Rn.2411	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
Nos2	NM_012611	Rn.10400	Nitric oxide synthase 2, inducible
Notch1	NM_001105721	Rn.25046	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)
Notch2	NM_024358	Rn.65930	Notch homolog 2 (Drosophila)
Pecam1	NM_031591	Rn.1878	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
Plat	NM_013151	Rn.107102	Plasminogen activator, tissue
Plaur	NM_017350	Rn.82711	Plasminogen activator, urokinase receptor
Pou5f1	NM_001009178	Rn.161748	POU class 5 homeobox 1
Prom1	NM_021751	Rn.144589	Prominin 1
Ptch1	NM_053566	Rn.102312	Patched homolog 1 (Drosophila)
Ptpcr	NM_001109887	Rn.90166	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
Sav1	NM_001097581	Rn.14087	Salvador homolog 1 (Drosophila)
Sirt1	NM_001107627	ND	Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (S. cerevisiae)
Smo	NM_012807	Rn.44429	Smoothened homolog (Drosophila)
Snai1	NM_053805	Rn.8008	Snail homolog 1 (Drosophila)
Snai2	NM_013035	Rn.43117	Snail homolog 2 (Drosophila)
Sox2	NM_001109181	Rn.17369	SRY (sex determining region Y)-box 2
Stat3	NM_012747	Rn.10247	Signal transducer and activator of transcription 3
Taz	NM_001025748	Rn.7267	Tafazzin
Tgfbr1	NM_012775	Rn.44402	Transforming growth factor, beta receptor 1
Thy1	NM_012673	Rn.108198	Thy-1 cell surface antigen
Twist1	NM_053530	Rn.161904	Twist homolog 1 (Drosophila)
Twist2	NM_021691	Rn.16279	Twist homolog 2 (Drosophila)
Wee1	NM_001012742	Rn.208255	Wee 1 homolog (S. pombe)
Wnt1	NM_001105714	Rn.138108	Wingless-type MMTV integration site family, member 1
Wwc1	XM_002727761	Rn.101912	WW and C2 domain containing 1
Yap1	NM_001034002	Rn.162978	Yes-associated protein 1
Zeb1	NM_013164	Rn.10600	Zinc finger E-box binding homeobox 1
Zeb2	NM_001033701	Rn.59710	Zinc finger E-box binding homeobox 2
Actb	NM_031144	Rn.94978	Actin, beta
B2m	NM_012512	Rn.1868	Beta-2 microglobulin
Hprt1	NM_012583	Rn.47	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
Ldha	NM_017025	Rn.107896	Lactate dehydrogenase A
Rplp1	NM_001007604	Rn.973	Ribosomal protein, large, P1

3. MATERIAL E MÉTODOS

Após tratamento, as células foram coletadas por tripsinização, contadas e lavadas com PBS. O *pellet* contendo $1,5 \times 10^6$ e $3,0 \times 10^6$ células das linhagens GP7TB e JM-1, respectivamente, foi armazenado seco a -80°C por até 2 semanas. O RNA das células foi extraído com o kit de extração *RNeasy mini kit* (Qiagen, Alemanha) conforme as instruções do fabricante. Logo depois da lise das células com o tampão RLT, a solução contendo o RNA foi homogeneizada com uma agulha de 22G acoplada a uma seringa estéril, passando-se a solução 10 vezes através da agulha. Adicionalmente, as amostras foram tratadas 15 min a temperatura ambiente com 0,34 kunitz/ μL de DNase I (*RNase-Free DNase set*; Qiagen, Alemanha) na coluna do *RNeasy mini kit* durante o processo de extração do RNA para degradar o excesso de DNA genômico. O RNA isolado na coluna foi enfim eluído em 80 μL de água livre de nucleases e a concentração foi determinada por espectrofotometria a 260 nm usando um NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). A qualidade da extração foi estimada pela razão de absorbância A260/A280 e a integridade do RNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose. Em seguida, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 0,5 μg de RNA de cada amostra em tubos de PCR de 200 μL (20 μL de volume total de reação) usando-se o *RT² First Strand Kit* (Qiagen, Alemanha) em um termociclador (*Mastercycler epgradient S*; Eppendorff, Alemanha) conforme orientações do fabricante. A seguir, o produto da reação da transcrição reversa foi armazenado a -20°C e empregado nos *arrays* de expressão gênica. Conforme instruções do fabricante, o cDNA junto ao master mix da reação de qPCR (*RT² SYBR Green ROX qPCR Master Mix*; Qiagen, Alemanha) foram colocados nas placas dos *arrays* contendo os *primers* liofilizados dos respectivos genes e após homogeneização, as reações de amplificação (25 μL de volume de reação) foram efetuadas num equipamento de qPCR modelo ABI 7500 (Thermo Scientific, EUA.) com bloco aquecedor tipo *fast*. Três *arrays* foram realizados para cada uma das linhagens celulares, tanto para as células tratadas com Butirato ED₅₀ como para os seus controles tratados com PBS.

Os valores brutos de expressão gênica expressos em Cq (ciclo de quantificação) foram calculados e exportados do programa do equipamento após ajuste do valor *threshold* para os ciclos de amplificação em 0,1 para todos os genes e todas as placas. O valor do *threshold* foi determinado arbitrariamente de forma que ficasse acima do sinal *background* e abaixo do ponto de viragem da

3. MATERIAL E MÉTODOS

curva de amplificação. A partir dos valores de Cq, os valores de expressão relativa *fold change* e *fold regulation* foram computados numa planilha (Numbers; MacOS X) usando a técnica do $\Delta\Delta Cq$. Dentre os 5 genes de referência *housekeeping* (HKGs), foram escolhidos para a normalização (ΔCq) os que apresentaram uma variabilidade menor do que 1,5 ciclos entre as replicatas experimentais. Alternativamente, no caso de não se obter qualquer HKG com variabilidade menor a 1,5 ciclos, foram escolhidos 2-5 genes do painel total de genes alvo cuja expressão não foi alterada pelo tratamento e que apresentaram uma variabilidade menor do que 1,5 ciclos entre as replicatas experimentais. A normalização foi então realizada para cada um dos genes alvo subtraindo-se do valor Cq correspondente, a média geométrica do Cq dos genes de referência escolhidos. O valor de expressão gênica foi apresentado como expressão relativa (*fold change*; $2^{-\Delta\Delta Cq}$) ao controle (PBS) das células tratadas ou relativo à expressão gênica das células JM-1 no caso da comparação do perfil de expressão das duas linhagens celulares. As comparações estatísticas foram feitas empregando-se apenas os valores Cq normalizados pelos genes de referência e linearizados pela função exponencial de base 2 ($2^{-\Delta Cq}$). Além dos 5 genes HKG, cada placa incluiu um controle de DNA genômico (GDC), um controle de eficiência da transcrição reversa (RTC) e um controle positivo de ampliação (PPC) para testar a repetibilidade (consistência intra-placa) e reprodutibilidade (consistência inter-placas). Este último controle foi avaliado em triplicata técnica e consistiu em sequências artificiais de DNA previamente validadas pelo fabricante.

3.6. MÉTODOS DE ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Definiram-se como replicatas técnicas, as repetições nas análises instrumentais que foram feitas a partir de um mesmo experimento e como replicatas experimentais, aos experimentos feitos em dias e passagens celulares diferentes. Cada experimento (replicata experimental) consistiu no tratamento de células em cultura durante tempos e com doses de NaBu específicas, conforme indicado em cada ensaio. As análises estatísticas foram realizadas com as replicatas experimentais. No caso dos experimentos com replicatas técnicas, foi utilizada a média como valor único desse experimento na análise estatística.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A distribuição, simetria e obliquidade (*skewness*) dos dados em cada experimento foram avaliadas graficamente por histogramas de frequências ou densidade e por gráficos de quantis e probabilidades normais. A presença de *outliers* e o nível de variabilidade dos dados foram também avaliadas graficamente empregando-se gráficos de *box and whiskers*. A análise gráfica exploratória foi realizada no pacote estatístico STATA 13 (STATA corp, EUA) e os gráficos finais apresentados neste trabalho foram desenhados no programa Prism 7 (GraphPad Software Inc, USA) e no programa DataGraph 4.3 (Visual Data Tools, Inc.EUA)

Na análise de viabilidade celular pelo método de redução do MTT, foram feitos ajustes não lineares e modelos de regressão não linear de curvas dose-resposta sigmoidal de 4 parâmetros e inclinação (*slope*) variável no programa PRISM 7. A partir do valor das três curvas (replicatas experimentais) estimou-se, com um 95% de confiança, o valor da dose efetiva 50% (ED₅₀) do NaBu para cada uma das linhagens celulares em cada um dos tempos avaliados.

Já no caso dos ensaios de citometria de fluxo, foram usados testes *t* não pareados ou testes não paramétricos de *Mann-Whitney* para as comparações entre as células tratadas com NaBu e seus controles (PBS). A escolha do tipo de teste baseou-se na análise exploratória das distribuições e dos resíduos. No caso dos testes *t*, foi estimado o tamanho do efeito das diferenças pela estatística do *eta* quadrado (η^2) cuja interpretação é análoga ao coeficiente de regressão r^2 usado em regressão linear.

Para o perfil de expressão gênica em *arrays* de RT-qPCR, utilizaram-se painéis de testes *t* não pareados, cujos valores *p* foram corrigidos pelas comparações múltiplas seguindo-se a estratégia do controle do FDR (*False discovery rate*). Cada gene foi avaliado de forma independente sem assumir variâncias iguais (*non-pooled standard deviations*) e a correção pelo FDR foi feita diretamente nos valores de *p* obtidos, gerando valores *q* pelo método *step-up* de duas fases de Benjamini, Krieger e Yekutieli (BENJAMINI; KRIEGER; YEKUTIELI, 2006). Foram consideradas descobertas (*Discoveries*; equivalente a significância estatística) os genes que apresentavam valores $q < 0,1$ (Q = 10%). Os painéis de testes *t* assim como as correções FDR para comparações múltiplas foram feitas no programa Prism 7 (GraphPad Software Inc, USA). Exceto no caso dos perfis de expressão gênica em que foi empregada a

3. MATERIAL E MÉTODOS

abordagem estatística do FDR, no resto das análises estatísticas foi adotado como valor crítico de significância $P=0,05$ (95% de confiança).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. CITOTOXICIDADE DO BUTIRATO DE SÓDIO EM DUAS LINHAGENS CELULARES DE CARCINOMA HEPATOCELULAR MURINO

Visando, primeiramente, confirmar se o ácido butírico apresenta potencial antineoplásico em células com características de células tronco tumorais e com o intuito de determinar as concentrações em que exerce este efeito, foi avaliada a citotoxicidade do butirato de sódio (NaBu) em diferentes concentrações nas linhagens celulares JM-1 e GP7TB durante 24, 48 ou 72 horas por meio da técnica de redução do MTT (**figura 2**).

As curvas de viabilidade celular mostraram um comportamento semelhante nos dois tipos celulares. Porém, a ordem de grandeza do efeito foi diferente nas duas linhagens celulares, pois as células JM-1 responderam a concentrações menores de NaBu do que as GP7TB (**figura 2**). Às 24 h, o NaBu não resultou em alterações relevantes na viabilidade das duas linhagens, mesmo em concentrações maiores do que 10 mM, em que houve uma redução máxima de até 15% na viabilidade. Já no caso das 48 e 72 h de tratamento, a citotoxicidade induzida pelo NaBu foi mais evidente nas duas linhagens e apresentou um comportamento de dose-resposta com uma queda significativa na viabilidade celular a partir dos 2,5 mM.

Tanto nas células JM-1 como nas células GP7TB, as curvas de 48 e 72 h foram semelhantes, mas a inclinação da porção linear das curvas foi maior às 72 h. Uma observação interessante foi de que as concentrações menores de NaBu (abaixo de 1 mM) apresentaram um pequeno aumento da viabilidade das células GP7TB, em particular nas curvas de 48 e 72 h. Este aumento na fração de células viáveis pode ser interpretado como um aumento na proliferação em concentrações reduzidas de NaBu. As células JM-1 não apresentaram aumento na proliferação em qualquer concentração de NaBu testada.

Contudo, o tempo de tratamento com NaBu que evidenciou o melhor comportamento dose-resposta nas duas linhagens celulares foi o de 72 h, o que fez com que este fosse utilizado nos experimentos subsequentes.

4. RESULTADOS

Figura 2. Citotoxicidade do NaBu em duas linhagens de carcinoma hepatocelular murino, JM-1 e GP7TB

A citotoxicidade induzida por diferentes concentrações de NaBu foi avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento por meio da técnica de redução do MTT. O NaBu mostrou um efeito citotóxico nas duas linhagens celulares a partir das 48 h, partindo de concentrações de 0,8 mM (JM-1) e 2 mM (GP7TB). Cada ponto na curva representa a média de viabilidade celular relativa ao controle sem tratamento de 3 experimentos e as barras de erro representam a variabilidade em erro padrão da média (SEM). NaBu: butirato de sódio.

Em seguida, empregando-se as curvas de viabilidade de 72h, foram realizados os ajustes e as regressões não lineares para a determinação da Dose Efetiva de NaBu capaz de reduzir em 50% (NaBu ED₅₀) a viabilidade das células JM-1 e GP7TB. Os ajustes das curvas mostraram uma alta correlação com os

4. RESULTADOS

dados, tanto nas células JM-1 ($R^2 = 0,9747$) como nas GP7TB ($R^2 = 0,9202$; **figura 3**).

Como mostra a **figura 3**, as células JM-1 apresentaram maior susceptibilidade ao NaBu ($ED_{50} = 5,2$ mM) do que as GP7TB ($ED_{50} = 7,7$ mM).

Figura 3. Determinação dos valores ED_{50} de NaBu após 72 h de tratamento nas linhagens celulares GP7TB e JM-1

Usando ajustes não lineares com modelos de regressão dose-resposta de 4 parâmetros e inclinação (*slope*) variável foi determinada a dose efetiva que reduziu em 50% (ED_{50} ou ED_{50}) a viabilidade relativa das células após 72 h de tratamento com NaBu. Cada ponto na curva representa a média de 3 (GP7TB) e 4 (JM-1) replicatas experimentais e as barras de erro, representam a variabilidade da média expressa como desvio padrão (SD). As duas linhas pontilhadas pretas que acompanham a curva de viabilidade delimitam o intervalo de 95% de confiança, estimado pela regressão não linear. São também apresentados os valores das inclinações da porção linear das curvas (*Hill's slope*) resultantes do ajuste não linear, assim como, as estatísticas R^2 (coeficiente de correlação) e $AICc$ (*Akaike information criterion*) como medidas de acerto no ajuste. NaBu: butirato de sódio.

4. RESULTADOS

4.2. O NaBu INDUZ APOPTOSE DAS CÉLULAS GP7TB MAS NÃO ALTERA A TAXA DE APOPTOSE DAS JM-1

Para determinar se o efeito citotóxico do NaBu observado nas células JM-1 e GP7TB é consequência da indução de morte celular, as células foram marcadas com anexina V e 7-AAD e analisadas por citometria de fluxo. Na **figura 4** estão os resultados das citometrias tanto das células JM-1 como das GP7TB.

A fração de células em apoptose precoce corresponde ao quadrante inferior direito (Q3; Anexina V+, 7-AAD-) e o quadrante superior direito corresponde à fração celular de duplos positivos (Q2; Anexina V+, 7-AAD+) que pode incluir tanto células necróticas como células em apoptose tardia. A primeira observação interessante surgiu quando se comparou qualitativamente a apoptose basal (fração de células apoptóticas dos controles) nas duas linhagens. As células JM-1 apresentaram um valor relativamente maior de células apoptóticas em condições basais (sem intervenção) do que as GP7TB, como se observa nos quadrantes Q2 e Q3 dos controles nos experimentos representativos de cada linhagem celular (**figura 4**).

Após 72 horas de tratamento com NaBu ED₅₀, houve um aumento estatisticamente significativo ($p=0,009$) da porcentagem de células GP7TB em apoptose precoce quando comparadas com as células controle tratadas apenas com PBS. Porém, o total de células apoptóticas não foi superior aos 15% do total das células. Quanto as células necróticas ou em apoptose tardia, não foram observadas diferenças entre as células GP7TB tratadas com NaBu ED₅₀ e seu respectivo controle ($p=0,151$).

Embora as células JM-1 tratadas com NaBu ED₅₀ tenham também apresentado um leve aumento nas porcentagens de células em apoptose precoce comparado com as células controle, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,222$). Também não foram observadas diferenças nas frequências de células necróticas ou em apoptose tardia nesta linhagem celular ($p>0,999$). É importante ressaltar que a variabilidade dos resultados no caso das células JM-1 foi grande, maior do que a variabilidade observada nas frequências das células GP7TB.

4. RESULTADOS

Figura 4. Quantificação da apoptose induzida nas linhagens celulares GP7TB e JM-1 após 72h de tratamento com NaBu

A fração de células apoptóticas foi determinada por citometria de fluxo usando a marcação com anexina V e 7-AAD. Decorrente do tratamento com NaBu ED_{50} , houve um aumento significativo na porcentagem de células apoptóticas da linhagem GP7TB mas não das células JM-1. Do lado esquerdo, se mostram os *dotplots* correspondentes a experimentos representativos. Do lado direito, se apresentam os gráficos de dispersão de 5 replicatas experimentais realizadas com cada linhagem celular. As barras dos gráficos correspondem às medianas dos cinco experimentos e os valores de p , à significância estatística calculada a partir do teste de hipótese não paramétrico de *Mann-Whitney*. NaBu: butirato de sódio; NS: não significativa.

4.3. O NaBu INIBE A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS GP7TB E JM-1

Com o intuito de determinar se o efeito citotóxico do NaBu nas linhagens celulares JM-1 e GP7TB está relacionado ou não com a redução na proliferação celular, conduziu-se ensaios de citometria de fluxo baseados na marcação de CFSE após 72 h de tratamento das duas linhagens celulares com as correspondentes doses ED_{50} de NaBu (**figura 5**).

4. RESULTADOS

Figura 5. Efeito do NaBu na proliferação das linhagens celulares JM-1 e GP7TB após 72 h de tratamento

As mudanças nas taxas de proliferação das células foram determinadas por citometria de fluxo empregando-se a técnica de diluição do marcador fluorescente CFSE. Após 72 h de tratamento com NaBu, tanto as células JM-1 e como as células GP7TB apresentaram níveis reduzidos de proliferação. Na parte superior se mostram os resultados de um experimento representativo de cada linhagem celular. Os histogramas correspondem à distribuição dos eventos celulares (eixo “y”) conforme intensidade do sinal no canal FITC-CFSE (eixo “x”). Os histogramas azul-claros correspondem às células tratadas com NaBu ED_{50} por 72 h e os histogramas azul-escuro, às células controle. A média das medianas de fluorescência de 4 experimentos ($n=4$) são apresentados em gráficos de dispersão comparativos na parte inferior da figura. O valor de p das comparações entre as células tratadas com NaBu e os controles estimou-se a partir de testes t não pareados com correções de *Welch* para variâncias heterogêneas. NaBu: butirato de sódio; CFSE: *carboxyfluorescein succinimidyl ester*.

Como esperado, observou-se uma redução da proliferação celular nas duas linhagens de HCC, o que foi evidenciado por uma diferença significativa entre a intensidade de fluorescência do CFSE nas células tratadas com NaBu ED_{50} e seus respectivos controles, tanto no caso da linhagem JM-1 ($p=0,002$) como da linhagem GP7TB ($p=0,001$). Embora os histogramas de fluorescência

4. RESULTADOS

de CFSE mostraram maior superposição das curvas nas células JM-1, a distribuição das medianas de fluorescência foi semelhante à observada nas células GP7TB como se mostra nos gráficos de dispersão da **figura 5**. Além disso, a magnitude das diferenças entre as células tratadas com NaBu e as células controle resultou equivalente nas duas linhagens (JM-1, $\eta^2=0,814$; GP7TB, $\eta^2=0,844$), confirmando-se, então, que o efeito anti-proliferativo do NaBu foi independente do tipo celular.

4.4. AS LINHAGENS CELULARES JM-1 E GP7TB APRESENTAM MUDANÇAS MORFOLÓGICAS DECORRENTES DO TRATAMENTO COM NaBu

Em seguida, foram avaliadas as mudanças morfológicas nas células JM-1 e GP7TB resultantes do tratamento com NaBu. Isto, com o intuito de detectar possíveis indícios de diferenciação celular após as 72 h de tratamento.

Em condições basais de cultura *in vitro*, as linhagens JM-1 e GP7TB apresentam algumas diferenças morfológicas (**figura 6**, controles).

As células JM-1 são células menores e mais uniformes na arquitetura geral. Estas células possuem núcleo pequeno e mantem em sua relação de área citoplasma/núcleo pequena e constante, sendo raros os casos de células multinucleadas. Quando cultivadas em densidades reduzidas, as células JM-1 adquirem uma morfologia fibroblástica (*fibroblast-like*), predominantemente bipolar (fusiforme) ou tripolar e em menor grau, multipolar. A frequência das células parcialmente aderidas com estrutura esférica é grande.

As células JM-1 com morfologia fibroblástica crescem espalhadas ou em agregados pequenos, sem perder a estrutura bipolar/multipolar. Porém, quando atingem densidades maiores, a tendência de agregação aumenta e, neste momento, sua morfologia torna-se mais do tipo epitelial (*epithelial-like*), formando mosaicos espalhados de forma heterogênea na superfície de crescimento. Neste ponto de elevada densidade, coexistem os mosaicos de células tipo epiteliais com as células de morfologia fibroblástica em espaços mais abertos, assim como as células esféricas parcialmente aderidas que ficam espalhadas em toda a superfície de crescimento.

4. RESULTADOS

Figura 6. Micrografias das linhagens JM-1 e GP7TB após 72 h de tratamento com NaBu

As micrografias obtidas por microscopia de luz convencional num aumento de 200x mostram às células controle (coluna da esquerda) e as células submetidas ao tratamento com NaBu (coluna da direita) tanto das células GP7TB (linha superior) como das células JM-1 (linha inferior). Após 72 h de tratamento o NaBu induziu alterações na morfologia das células, em particular das GP7TB que aumentaram o tamanho do citoplasma adquirindo um fenótico hepatocítico. NaBu: butirato de sódio.

Devido a ao fato de que esta linhagem celular não atinge uma camada uniforme de células (100% de confluência), os experimentos deste trabalho foram realizados em culturas sub-confluentes (75-80%) com as características anteriormente descritas e como se observa na imagem das células controle na **figura 6**.

Já as células GP7TB apresentam maior tamanho, núcleos mais definidos e hipercromáticos e não são raros os casos de células multinucleadas. Seu citoplasma apresenta maior granulosidade do que a JM-1, exceto no caso dos mosaicos epiteliais das JM-1. Em densidades elevadas, predomina a morfologia fibroblástica de forma semelhante às células JM-1, exceto por umas poucas células grandes que apresentam morfologia ameboide.

As GP7TB fibroblásticas são mais diversificadas do que as JM-1, com algumas células bipolares fusiformes e algumas outras multipolares em formato

4. RESULTADOS

de estrela. Mesmo quando apresenta uma relação citoplasma/núcleo pequena, a área do citoplasma em relação ao núcleo parece maior do que nas JM-1. O crescimento desta linhagem celular é mais homogêneo e atingem uma morfologia tipo epitelial em menor tempo e com maior facilidade. A frequência de células esféricas parcialmente aderidas é menor e a tendência de formarem uniões intercelulares é maior. Em grandes densidades, são raras as células com morfologia fibroblástica. Neste ponto as células crescem em camadas mais ou menos uniformes (90% de confluência aproximadamente) e apresentam citoplasmas maiores. Perto do 100% de confluência reaparecem as células com morfologia fibroblástica, desta vez, espalhando-se por cima da camada com morfologia epitelial. Após 100% de confluência, as células da camada superior adquirem morfologia epitelial. Porém, desta vez, constituída por células poligonais menores e organizadas de forma mais compacta, como se observa nas células controle da **figura 6**.

Após 72 horas de tratamento com NaBu ED₅₀, foram observadas mudanças morfológicas nas duas linhagens celulares, sendo, porém, a linhagem GP7TB a que apresentou as mudanças mais evidentes (**figura 6**). No caso das células JM-1, tanto as células fibroblásticas como as em mosaicos de tipo epitelial, adquiriram uma morfologia poligonal e estrelada com projeções da membrana celular mais finas e ramificadas. Visualmente, o núcleo e o citoplasma de algumas das células estreladas eram maiores. Porém, o tamanho médio das células não foi, aparentemente, alterado. A área dos mosaicos com células ainda com morfologia epitelial diminuiu e as células dentro dos mosaicos pareciam perder as junções intercelulares.

Já nas células GP7TB, observaram-se mudanças mais drásticas decorrentes do tratamento com NaBu que sugerem um processo de diferenciação ou trans-diferenciação celular. Nestas células houve aumento do citoplasma e redução da sua granulosidade, assim como redução no grau de compactação das células. Os núcleos, agora menos hipercromáticos, apresentaram nucléolos bem definidos e as células fibroblásticas poligonais foram raras. Observaram-se algumas células fusiformes, porém, estas células bipolares não apresentavam projeções na membrana. A camada celular apresentou células de diversos tamanhos e não foi evidente a superposição das

4. RESULTADOS

células. Assim, as células GP7TB resultantes do tratamento com NaBu apresentaram uma morfologia mais hepatocítica (**figura 6**).

Com o objetivo de quantificar o aparente aumento no tamanho das células GP7TB, prosseguiu-se com uma análise indireta do tamanho celular por citometria de fluxo (**figura 7**).

Figura 7. Análise quantitativa das alterações no tamanho celular das células JM-1 e GP7TB após tratamento com NaBu

A dispersão da luz detectada no canal FSC (Forward scatter) do citómetro de fluxo é proporcional ao tamanho celular. Assim, comparando os valores do sinal no canal FSC, foram estimadas, indiretamente, as mudanças no tamanho celular. Após 72 h de tratamento com NaBu, tanto as células GP7TB como as células JM1 apresentaram alterações significantes no tamanho. As células GP7TB foram as que apresentaram as alterações más evidentes como se observa nos histogramas. A parte superior da figura mostra os histogramas de um experimento representativo de cada linhagem celular. Os histogramas azul-claro correspondem às células tratadas com NaBu ED₅₀ por 72 h e os histogramas azul-escuro correspondem às células controle. Os gráficos de dispersão comparativos da parte inferior da figura resumem os resultados de 5 experimentos realizados em cada tipo celular (n=5). As barras horizontais correspondem à média dos 5 experimentos e os valores de *p* indicados correspondem à significância estatística estimada a partir de testes *t* não pareados corrigidos pela técnica de Welch para variâncias heterogêneas. NaBu: butirato de sódio.

4. RESULTADOS

Conforme esperado, as células GP7TB tratadas com NaBu apresentaram aumento estatisticamente significativo do sinal no canal FSC ($p < 0,0001$; **figura 7**), o que confirma a observação qualitativa do microscópio. Além disso, a maior amplitude dos histogramas de FSC das células tratadas com NaBu em relação aos histogramas das células controle, sugere também que houve uma variabilidade ampla no tamanho das células confirmando mais uma vez o observado ao microscópio.

No caso das células JM-1, também foi observado aumento significativo no sinal do FSC ($p = 0,015$), mesmo existindo uma sobreposição dos histogramas das células tratadas e das células controle (**Figura 7**). De forma semelhante, a amplitude do histograma das células JM-1 tratadas com NaBu apresentou um aumento relativo às células controle.

4.5. EFEITO DO NaBu NO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS COM CÉLULAS TRONCO TUMORAIS NAS LINHAGENS CELULARES JM-1 E GP7TB

Utilizando-se um *macroarray* de RT-qPCR que contém genes associados com células tronco tumorais, comparou-se o perfil de expressão gênica das células submetidas ao tratamento com NaBu e as células controle nas duas linhagens celulares. Isto, visando-se, em primeira instância, confirmar o efeito modulador da diferenciação celular sugerido pelos resultados na avaliação morfológica das células tratadas com NaBu; assim como, buscando-se elucidar consequências funcionais que este novo fenótipo celular poderia ter na malignidade das células JM-1 e GP7TB.

O primeiro passo na determinação de perfis de expressão gênica associada com células tronco tumorais foi estabelecer as diferenças na expressão destes genes entre as duas linhagens celulares. Para isto, foram empregados os resultados obtidos nos *arrays* de expressão das células controle das duas linhagens celulares. Foram, então, calculados os valores de expressão (*fold change*) das células GP7TB relativos aos valores das células JM-1. Dos 84 genes estudados, 20 apresentaram maior expressão e 9 expressão reduzida na linhagem GP7TB em relação à linhagem JM-1 (**Figura 8**).

4. RESULTADOS

Figura 8. Expressão diferencial de genes associados com células tronco tumorais nas linhagens celulares JM-1 e GP7TB

Em condições basais de cultura, as células GP7TB expressaram diferencialmente 35% dos 84 genes avaliados em relação as células JM-1. O gráfico de vulcão mostra a posição dos genes conforme grau de expressão relativa ($\log_2(\text{Fold change})$) e nível de significância estatística ($-\log_{10}(\text{valor de } q)$). Os pontos vermelhos correspondem aos genes que apresentaram expressão relativa aumentada nas células GP7TB em relação as células JM-1 e os pontos verdes correspondem aos genes com expressão relativa reduzida. A linha horizontal representa o valor crítico de significância estatística ($Q=10\%$) e as linhas pontilhadas, indicam onde o valor de fold change é igual a 2 ou -2.

Dentre os genes cuja expressão foi aumentada na linhagem GP7TB, destacam-se aqueles associados com o fenótipo mesenquimal de células tronco, migração e metástase como *snai1* e 2, *twist2*, *zeb2*, *id1*, *axl* e *plat*, assim como genes envolvidos nas vias de sinalização *Hedgehog* (*smo* e *ptch1*) e *Hippo* (*yap1*, *taz* e *sav1*). Também apresentaram expressão aumentada os marcadores de células tronco *epcam* e *alcam*, além do *bmi1*, membro da família *polycom* (tabela 4).

4. RESULTADOS

Tabela 4. Genes diferencialmente expressos na linhagem GP7TB em relação à linhagem JM-1

Gene	Expressão relativa	Valor q	Gene	Expressão relativa	Valor q
Snai2	473,07	0,003200	Prom1	-411,97	0,033522
Smo	371,26	0,014744	Cd24	-110,32	0,008771
Foxa2	146,88	0,012335	Aldh1a1	-22,16	0,016486
Snai1	63,48	0,003376	Bmp7	-20,35	0,045842
Alcam	14,37	0,008771	Lin28b	-12,84	0,060305
Twist2	8,70	0,005763	Ptpcr	-9,26	0,025544
Epcam	7,26	0,069205	Cd34	-8,51	0,098885
Yap1	5,20	0,031385	Etfa	-3,00	0,011897
Axl	5,04	0,008771	Muc1	-2,05	0,016486
Taz	3,04	0,014612			
Bmi1	3,00	0,011897			
Ikbkb	2,98	0,039024			
Gata4	2,93	0,025011			
Plat	2,90	0,003376			
Jak2	2,88	0,009889			
Id1	2,88	0,085037			
Zeb2	2,67	0,085037			
Sav1	2,46	0,085037			
Ptch1	2,42	0,063620			
Egf	2,42	0,044968			

Já no caso dos genes que apresentaram níveis menores de expressão nas células GP7TB em relação às células JM-1, surpreendeu a presença de alguns marcadores de células tronco como *prom1* (CD133), *cd34* e *muc1*. Outra observação interessante é de que os genes associados com pluripotência como *sox2*, *pou5f1* (Oct4) e *nanog* não apresentaram diferenças no nível de expressão das duas linhagens. Em resumo, as células GP7TB apresentaram maior expressão em genes associados com células tronco tumorais do que as células JM-1 o que sugere que o nível de *stemness* das GP7TB poderia ser maior.

4. RESULTADOS

4.6. O TRATAMENTO COM NaBu ALTERA DIFERENCIALMENTE OS PADRÕES DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS CÉLULAS JM-1 E GP7TB

Em seguida, foram comparados os padrões de expressão gênica das células JM-1 e GP7TB tratadas 72 h com NaBu ED₅₀. Neste caso, os valores de expressão relativa foram calculados usando-se as células controle sem tratamento de cada linhagem. Em última instância, só as células GP7TB apresentaram mudanças estatisticamente significantes no padrão de expressão gênica (**Figura 9**).

O tratamento com NaBu alterou a expressão de 27 genes nas células GP7TB. Destes genes, 19 aumentaram sua expressão (22,6%) e 8 diminuíram (9%). Como se mostra na **tabela 5** e contrário ao esperado, os genes que mais aumentaram a expressão foram marcadores de superfície de células tronco tumorais como *thy1* (CD90), *epcam*, *cd34* e *pecam1*, assim como genes associados com pluripotência como *sox2*, *pou5f1* e *mycn*. Foi observado aumento na expressão de alguns genes envolvidos em vias de sinalização como *wwc1* e *mertk* da via Hippo, assim como o gene do receptor *fzd7* da via Wnt e os ligantes *bmp7* e *notch1* das vias BMP/smad e Notch, respetivamente. De forma interessante, os genes que foram inibidos são genes associados com fenótipo mesenquimal e invasão (*snai2* e *zeb2*) assim como do controle da proliferação e autorenovação celular (*bmi1* e *lin28b*).

As células JM-1 não apresentaram diferenças significantes no perfil de expressão após 72 h de tratamento com NaBu, mesmo no caso de genes com expressão relativa superior a 2 (**Figura 9**).

Destes genes, apenas 5 coincidem com os genes estimulados nas células GP7TB (*abcg2*, *bmp7*, *hdac1* e *cd34*) e 2 com os genes inibidos (*zeb2*, *bmi1*) (**tabela 6**). Curiosamente, o gene *mycn* que foi superexpresso nas células GP7TB após 72h de tratamento com NaBu, apresentou expressão reduzida nas JM-1.

4. RESULTADOS

Figura 9. Efeito do NaBu na expressão diferencial de genes associados com células tronco tumorais nas células JM-1 e GP7TB

Após 72 h de tratamento com NaBu ED₅₀, observou-se uma alteração no perfil de expressão gênica nas células GP7TB que não foi reproduzida nas células JM-1. O gráfico de vulcão mostra a posição dos genes conforme grau de expressão relativa ($\log_2(\text{Fold change})$) e nível de significância estatística ($-\log_{10}(\text{valor de } q)$). Os pontos vermelhos correspondem aos genes que apresentaram expressão relativa aumentada nas células tratadas com NaBu em relação às células controle e os pontos verdes correspondem aos genes com expressão relativa reduzida. A linha horizontal representa o valor crítico de significância estatística ($Q=10\%$) e as linhas pontilhadas, indicam onde o valor de fold change é igual a 2 ou -2.

4. RESULTADOS

Tabela 5. Genes diferencialmente expressos nas células GP7TB após 72h de tratamento com NaBu ED₅₀

Gene	Expressão relativa		valor <i>q</i>
Bmp7	764,22	↑	0,00695
Thy1	503,33	↑	0,00430
Epcam	98,48	↑	0,00899
Cd34	60,55	↑	0,00761
Pecam1	55,05	↑	0,01124
Sox2	31,57	↑	0,02060
Fzd7	19,46	↑	0,00742
Mertk	17,91	↑	0,04137
Mycn	14,55	↑	0,05406
Wwc1	13,92	↑	0,00493
Abcb5	9,88	↑	0,09155
Pou5f1	9,29	↑	0,03637
Itga6	3,92	↑	0,00695
Notch1	3,66	↑	0,05282
Plat	3,64	↑	0,00695
Hdac1	3,30	↑	0,00899
Abcg2	3,29	↑	0,04137
Id1	3,15	↑	0,00430
Gata3	2,19	↑	0,03768
Lin28b	-4,21	↓	0,04385
Bmi1	-3,87	↓	0,00511
Zeb2	-3,85	↓	0,03768
Snai2	-3,83	↓	0,00511
Smo	-3,49	↓	0,02482
Egf	-2,44	↓	0,04161
Dll1	-2,28	↓	0,09698
Sirt1	-2,04	↓	0,04137

4. RESULTADOS

Tabela 6. Genes diferencialmente expressos nas células JM-1 após 72h de tratamento com NaBu ED₅₀

Gene Symbol	Expressão relativa		Valor <i>p</i>	Valor <i>q</i>
Aldh1a1	58,16	↑	0,02105	0,27812
Abcg2	13,54	↑	0,04338	0,33404
Bmp7	6,43	↑	0,02796	0,28708
Snai1	6,18	↑	0,08290	0,48022
Foxa2	4,61	↑	0,00649	0,17526
Hdac1	3,38	↑	0,00270	0,17526
Cd34	3,20	↑	0,01361	0,25145
Jag1	3,09	↑	0,00755	0,17526
ErbB2	2,19	↑	0,02107	0,27812
Muc1	2,05	↑	0,00759	0,17526
Ptprc	2,04	↑	0,03699	0,31075
Zeb2	-5,96	↓	0,05288	0,37589
Dll4	-5,16	↓	0,09355	0,48022
Mycn	-3,19	↓	0,09220	0,48022
Gata3	-2,77	↓	0,05852	0,38622
Foxp1	-2,54	↓	0,08749	0,48022
Bmi1	-2,08	↓	0,03428	0,36322

4.7. VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DE Thy1.1 E CD44 POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para confirmar se o aumento na expressão gênica do marcador de células tronco Thy1.1 resulta também em aumento do marcador na superfície celular, foram marcadas e quantificadas por citometria de fluxo células GP7TB coletadas após 72 h de tratamento com NaBu. As células também foram marcadas com o anticorpo anti-CD44 para confirmar o padrão de expressão observado no item anterior. Como se observa na **figura 10** o NaBu aumenta de forma estatisticamente significativa ($p < 0.0001$) o número de células positivas para Thy1.1 mas não muda a porcentagem de células positivas para CD44.

4. RESULTADOS

Figura 10. Efeito do NaBu na expressão diferencial de genes associados com células tronco tumorais nas células JM-1 após ajuste das condições de seleção estatística

Reduzindo o rigor estatístico para a seleção dos genes que foram diferencialmente expressos nas células JM-1 tratadas 72 h com NaBu ED_{50} , foi possível identificar 11 genes cuja expressão foi altera após o tratamento com NaBu. O gráfico de vulcão mostra a posição dos genes conforme grau de expressão relativa ($\log_2(\text{Fold change})$) e nível de significância estatística ($-\log_{10}(\text{valor de } q)$). Os pontos vermelhos correspondem aos genes que apresentaram expressão relativa aumentada nas células JM-1 tratadas com NaBu em relação as células controle e os pontos verdes correspondem aos genes com expressão relativa reduzida. A linha horizontal representa o valor crítico de significância estatística ($Q=50\%$) e as linhas pontilhadas, indicam onde o valor de fold change é igual a 2 ou -2.

O efeito do NaBu na expressão de Thy1.1 parece responder diretamente ao tratamento com NaBu já que os níveis basais de células Thy1.1+ é mínimo e após 72 h de tratamento, mais de 90% das células resultaram positivas para esta proteína de membrana. A presença de populações duplas positivas Thy1.1+CD44+ nas células tratadas com NaBu sugere que a expressão destes marcadores não é exclusiva de subpopulações celulares (**figura 11**).

4. RESULTADOS

Figura 11. Quantificação da porcentagem de células GP7TB positivas para os marcadores Thy1.1 e CD44 após tratamento com NaBu

Foi determinada, por citometria de fluxo, a fração de células GP7TB que expressou as proteínas Thy1.1 e CD44 após 72 h de tratamento com NaBu ED₅₀. O NaBu aumentou de forma significativa a porcentagem de células que expressaram Thy1.1 e não alterou a fração celular que expressou CD44. Na parte superior, a figura mostra os resultados de um experimento representativo em que se analisaram os dois marcadores. Já na parte inferior, os gráficos mostram os resultados de 5 replicatas experimentais. As barras representam a média dos experimentos e os pontos, os valores específicos para cada experimento. O valor de *p* das comparações entre as células tratadas com NaBu e os controles estimou-se a partir de testes *t* não pareados com correções de *Welch* para variâncias heterogêneas. NaBu: butirato de sódio.

5. DISCUSSÃO

Apesar dos avanços na prevenção dos principais fatores de risco do HCC, a mortalidade associada a esta doença encontra-se ainda em aumento (LAFARO; DEMIRJIAN; PAWLIK, 2015; NORDENSTEDT; WHITE; EL-SERAG, 2010; TORRE *et al.*, 2016). A resistência aos quimioterápicos e a alta taxa de reincidência tornam necessária a busca de novas estratégias terapêuticas. Neste sentido, o butirato representa um alvo importante de estudo devido aos efeitos pleiotrópicos que tem apresentado em células de diversos tipos de câncer, incluindo próstata, mama, estômago e fígado (HEIDOR *et al.*, 2012, 2017).

Neste estudo foi caracterizado o efeito anti-neoplásico do butirato de sódio (NaBu) em duas linhagens celulares de rato, derivadas de neoplasias hepáticas de diferentes origens e com diferentes graus de diferenciação, com o intuito de determinar o mecanismo de ação em células neoplásicas com características tronco.

Conforme esperado, o NaBu teve um efeito citotóxico nas duas linhagens celulares. Embora as células com características tronco (GP7TB) apresentaram maior ED₅₀, a resposta tanto às 48h como às 72h foi muito semelhante à observada nas células derivadas de HCC bem diferenciado (JM-1). Os valores de ED₅₀ obtidos corroboram com os resultados de outros trabalhos que relataram valores de ED₅₀ na faixa de 5-10 mM (COOK *et al.*, 1985; LORENZ *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2013; WILLIAMS; COXHEAD; MATHERS, 2003).

O fato das células GP7TB apresentarem um aumento na sobrevida quando tratadas com concentrações menores a 1 mM, sugere que o NaBu poderia também ter estimulado a proliferação celular nessas condições. Neste sentido, linhagens celulares de carcinoma (HT29) e adenoma (S/RG/C2) de cólon apresentam respostas semelhantes quando cultivadas em ausência de glicose. Em concentrações de 0,5 até 2,0 mM e na ausência de glicose, o butirato promoveu o crescimento celular das linhagens de cólon (SINGH; HALESTRAP; PARASKEVA, 1997). No caso dos colonócitos, acredita-se que este efeito oposto na modulação da sobrevida celular está associado com o equilíbrio energético da célula. Em concentrações menores, a célula metaboliza o butirato e, em última instância, promove o crescimento celular como resposta ao excesso

5. DISCUSSÃO

energético. Em concentrações maiores, o excesso de butirato que não é metabolizado fica disponível dentro da célula exercendo as funções não metabólicas relacionadas com a inibição da proliferação e da diferenciação celular (HAMER *et al.*, 2008; LEONEL; ALVAREZ-LEITE, 2012). Contudo, o aumento na viabilidade celular observada nas células GP7TB quando tratadas com concentrações menores de NaBu, sugere que estas células poderiam ter uma resposta trófica a este ácido graxo, mesmo em presença de fontes energéticas como glutamina e piruvato.

Em seguida, para determinar se a redução na viabilidade das duas linhagens induzida pelo NaBu estava relacionada com morte celular ou inibição da proliferação, as células foram analisadas após 72h de tratamento com NaBu ED₅₀. Tanto as células JM-1 como as GP7TB apresentaram redução na proliferação e apenas as células GP7TB mostraram aumento na porcentagem de células em apoptose. Embora o efeito apoptótico do NaBu nas células GP7TB tenha sido significativo, a porcentagem total de células mortas foi inferior a 15%. Isto sugere que a contribuição do efeito apoptótico na citotoxicidade observada é menor comparada com o efeito citostático.

Um dos mecanismos que explica o efeito antiproliferativo induzido pelo NaBu nas células do epitélio intestinal é a diferenciação terminal dos colonócitos (BARNARD; WARWICK, 1993; SIAVOSHIAN *et al.*, 2000). De forma análoga, diversos estudos têm observado que o NaBu induz a diferenciação de células neoplásicas pouco diferenciadas *in vitro* (CHEN *et al.*, 2007; LANGDON *et al.*, 1988; LITVAK *et al.*, 1998) incluindo linhagens celulares de HCC humano (SAITO *et al.*, 1994).

Neste trabalho foi observado que o NaBu alterou a morfologia das duas linhagens celulares e aumentou de forma significativa o tamanho das células. Este efeito tanto nas alterações morfológicas como no tamanho celular foi mais acentuado nas células GP7TB do que nas JM-1. Os resultados sugerem que o NaBu poderia estar desencadeando a diferenciação das células nas duas linhagens, embora as alterações morfológicas sejam menos evidentes no caso da linhagem JM1.

Qualitativamente, a morfologia observada nas células GP7TB após tratamento com NaBu enquadra-se melhor com a hipótese de as células terem se diferenciado em células semelhantes a hepatócitos (*Hepatocyte-like cells*). Já

5. DISCUSSÃO

as alterações morfológicas observadas nas JM-1 parecem refletir uma mudança no fenótipo, mas sem uma tendência clara que possa sugerir diferenciação ou trans-diferenciação celular.

Visando confirmar se a alteração na morfologia das células foi decorrente de um processo de diferenciação promovido pelo NaBu, foram avaliados perfis de expressão gênica utilizando um *array* de genes associados com células tronco tumorais (CSC). Primeiro foram estabelecidas as diferenças basais de expressão entre as duas linhagens celulares. Numericamente, as células GP7TB em relação às JM-1 apresentaram maior número de genes com expressão aumentada do que diminuída. Isto confirma que as células GP7TB possuem menor grau de diferenciação ou maior nível de *stemness* do que as JM-1. Funcionalmente, o perfil de expressão sugere que as células GP7TB apresentaram um fenótipo mesenquimal. Isto poderia explicar a grande plasticidade e adaptabilidade destas células e poderia ser traduzido em maior capacidade de migração e invasão (CHAFFER *et al.*, 2016).

Já as células JM-1 mostraram maior expressão de alguns marcadores de CSCs como *prom1*, *cd34*, *muc1* e *aldh1a1*. A princípio este resultado foi contraditório e inesperado. Porém, mesmo quando esses genes são utilizados no enriquecimento e isolamento de CSCs, sua expressão não é exclusiva de células com características tronco (TANAKA *et al.*, 2015).

A comparação dos padrões de expressão gênica das duas linhagens deve ser interpretada com cuidado. Devido ao fato de que a variabilidade nos valores de expressão relativa das células JM-1 ser maior do que das células GP7TB, os testes *t* precisaram ser corrigidos pelas variâncias heterogêneas. Isto reduziu o poder estatístico das comparações. Além disso, as diferenças observadas na expressão relativa foram calculadas considerando a linhagem JM-1 como referência de expressão. Não foram feitas comparações de expressão gênica de cada linhagem relativas à de hepatócitos não transformados para determinar se os genes avaliados foram, de fato, superexpressos ou sub-expressos. Assim, os genes que não se apresentaram diferencialmente expressos nesta análise poderiam ainda ter mostrado uma expressão alterada em relação a hepatócitos de ratos saudáveis.

Em seguida foi avaliado o efeito do NaBu na expressão de genes associados com CSCs. O tratamento com NaBu por 72h alterou diferencialmente

5. DISCUSSÃO

o padrão de expressão de genes associados com CSCs nas células GP7TB e JM-1. Porém, nestas últimas, não houve significância estatística para qualquer gene. Vale ressaltar ainda que alguns genes com aparente expressão aumentada ou reduzida coincidiram com genes diferencialmente expressos nas células GP7TB. Por exemplo *bmi1* e *zeb2* (reduzida), assim como *abcg2*, *bmp7* e *cd34* (aumentada)

Nas células GP7TB observaram-se maiores alterações na expressão de genes associados com diversas funções nas CSCs. O NaBu reduziu a expressão de genes importantes no controle do fenótipo mesenquimal de CSCs como *zeb2* e *snai2* (slug); assim como de genes responsáveis pelo controle da autopreservação e proliferação (*bmi1* e *lin28b*). Desta forma, o NaBu poderia estar tanto reduzindo a taxa de proliferação como o grau de plasticidade celular por meio da regulação gênica. Estes resultados estão de acordo com o observado nos ensaios de proliferação celular e na análise morfológica após tratamento com NaBu.

A redução na expressão tanto de *zeb2* como de *snai2* é um indicador da transição mesênquimo-epitelial (MET, do inglês *mesenchymal-epithelial transition*) que acontece em células tronco e em células neoplásicas em que a capacidade invasiva tem sido inibida (TAM; WEINBERG, 2013). O desenvolvimento de metástases é um processo de múltiplas etapas em que as células de um tumor ganham características adaptativas que lhes conferem capacidade de migração, invasão de novos tecidos e colonização desses novos microambientes (STEEG, 2016). Sugere-se que este processo aconteça pelo surgimento de células tronco com plasticidade fenotípica e capacidade de adaptação. Acredita-se que o surgimento destas células aconteça por meio da trans-diferenciação das células neoplásicas em um processo conhecido como transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*) em que as células perdem a expressão de genes e proteínas epiteliais e adquirem fenótipos mesenquimais equivalentes aos observados nas células tronco embrionárias (CHAFFER *et al.*, 2016). A EMT é controlada por um conjunto de fatores de transcrição e reguladores de *enhancers* que ativam genes mesenquimais e inibem os genes epiteliais. Quando estes fatores, como no caso de Zeb2 e Snai2, são inibidos, a repressão dos genes epiteliais é liberada e as características mesenquimais são revertidas em um processo conhecido como

5. DISCUSSÃO

transição mesenquimo-epitelial (MET) (BRABLETZ *et al.*, 2018; SINGH; SETTLEMAN, 2010).

Por sua vez, os produtos dos genes *bmi1* e *lin28b* contribuem na regulação da divisão celular e promovem a auto renovação das células tronco por meio da supressão epigenética de genes de especificação tecidual (SMITH; SINDHU; MEISSNER, 2016). Desta forma, evitam que as células tronco prossigam com o programa de diferenciação celular e mantenham ativas as vias de divisão celular assimétrica (BORAH *et al.*, 2015).

O Bmi-1 é uma proteína do grupo *polycom* (PcG) de fatores reguladores da diferenciação de células tronco embrionárias (JIANG; LI; SONG, 2009). Em neoplasias é considerado um oncogene e um marcador de mau prognóstico em câncer de cólon (LI *et al.*, 2010), estômago (LIU *et al.*, 2008), pâncreas (SONG *et al.*, 2010), bexiga (QIN *et al.*, 2009) e HCC (WANG *et al.*, 2008). O mecanismo de ação nas neoplasias não foi ainda esclarecido, mas acredita-se que regula a expressão de agrupamentos (*clusters*) de genes por mecanismos epigenéticos (JIANG; LI; SONG, 2009). A atividade do Bmi-1 também está envolvida na EMT. Embora o mecanismo não seja ainda conhecido, a inibição do Bmi-1 pode levar à inibição da proliferação e bloqueio da EMT (BORAH *et al.*, 2015).

A expressão de *bmi-1* pode ser controlada por vias de transdução de sinal como *Hedgehog* (LIU *et al.*, 2006). Esta via foi descrita inicialmente em *Drosophila* e foi associada com o desenvolvimento embrionário. Em muitas neoplasias, a atividade da via *Hedgehog* encontra-se aumentada, promovendo o crescimento celular e controlando aspectos das CSCs como a auto-renovação (BORAH *et al.*, 2015). Neste sentido, um dos principais pontos de regulação da via é por meio do controle da proteína de membrana SMO (MERCHANT; MATSUI, 2010). No presente, estudo foi possível observar que houve também uma diminuição na expressão relativa de *smo* nas células GP7TB tratadas com NaBu. Isto sugere que pode existir uma relação funcional entre a inibição dos genes *bmi1* e *smo* no controle da proliferação e auto-renovação das células GP7TB.

Já o *lin28b* codifica uma proteína com função inibidora da família let-7 de microRNAs (miRNA). Lin28b, e seu homólogo Lin28a, exercem suas funções de forma cronológica na diferenciação de células tronco embrionárias por meio, principalmente, da inibição da família let-7 (PISKOUNOVA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2015; ZHU *et al.*, 2011). O *lin28b* foi descoberto em amostras de HCC

5. DISCUSSÃO

humano, cuja expressão encontra-se elevada (GUO *et al.*, 2006). Este aumento tem sido associado com mau prognóstico em tumores de ovário, cólon, pulmão, HCC, adenoma gástrico e carcinoma oral de célula escamosa (WANG *et al.*, 2015) e se considera um gene *driver* na carcinogênese hepática (NGUYEN *et al.*, 2014). Acredita-se que ele estimule a proliferação de células neoplásicas por meio de ao menos cinco mecanismos: modulação de reguladores do ciclo celular, estimulação de vias de sinalização, ativação de fatores de transcrição, aumento da síntese de proteínas ribossomais e estimulação do metabolismo (THORNTON; GREGORY, 2012; WANG *et al.*, 2015).

O *lin28a/b* está também envolvido com a invasão e metástase por meio da indução da EMT. Neste caso, a inibição do let-7 por Lin28a/b aumenta a expressão de HMGA2 (*non-histone chromosomal high mobility group*) o que desencadeia a estimulação dos genes *snai1* e *snai2* (WANG *et al.*, 2015).

De forma inesperada, foi observado um aumento na expressão gênica de marcadores de CSCs e genes de pluripotência, decorrente do tratamento com NaBu nas células GP7TB. A respeito dos marcadores de CSCs, *thy1* foi o gene que se destacou pela magnitude da expressão relativa. Porém, os genes *epcam*, *cd34* e *pecam1* também apresentaram níveis aumentados de expressão relativa, superiores a 50 vezes. Este resultado contraditório poderia ser explicado pela natureza reversível dos efeitos do NaBu na expressão gênica e o metabolismo celular deste ácido graxo.

Acredita-se que o NaBu modula a expressão gênica principalmente por meio das modificações no padrão de acetilação de histonas que acontecem decorrentes da sua atividade inibidora de HDACs (HEIDOR *et al.*, 2017). Em ausência do NaBu, as HDACs podem desacetilar os resíduos de lisina das histonas recuperando o padrão de expressão de muitos dos genes cuja expressão tinha sido alterada pelo efeito do NaBu (VERDIN; OTT, 2014; VIDALI *et al.*, 1978).

Por outro lado, o butirato pode ser metabolizado pelas células menos diferenciadas, reduzindo o estoque intracelular (SHARMA *et al.*, 2006). Embora as células neoplásicas tenham um metabolismo particularmente glicolítico, as CSCs têm demonstrado um metabolismo com menor dependência pela glicose e maior metabolismo mitocondrial (PASTÒ *et al.*, 2014). Além disso, a MET poderia também alterar o metabolismo da célula, reduzindo a taxa glicolítica e

5. DISCUSSÃO

aumentando a fosforilação oxidativa (SANCHO *et al.*, 2015). Isto, em última instância, poderia aumentar o consumo de ácidos graxos.

Assim, se os níveis de butirato diminuíssem por causa do metabolismo celular, a expressão de alguns genes que tinha sido alterada pelo efeito epigenético do NaBu poderia ser revertida. Uma vez que as alterações epigenéticas forem revertidas, a expressão dos genes seria aumentada. Porém, esta hipótese não pode ser confirmada com os resultados obtidos neste trabalho. Seria necessário monitorar as concentrações de NaBu durante as 72 h de tratamento para confirmar se houve uma diminuição na disponibilidade de NaBu no meio de cultura. A realização de experimentos em que o NaBu é retirado das células após um tempo de incubação, assim como de ensaios em que o meio contendo o NaBu é substituído por meio com tratamento fresco cada 24 h, poderiam também ajudar a esclarecer esta hipótese.

Quanto aos genes de pluripotência *sox2*, *pou5f1* (Oct4), *mycn* e *gata3* tiveram suas expressões aumentadas após 72h de tratamento com NaBu nas células GP7TB. Em primeira instância, isto sugere que o butirato aumentou o grau de *stemness* destas células. Porém, isto não estaria de acordo com os resultados antineoplásicos obtidos anteriormente, em que foi observada diminuição da proliferação e mudanças morfológicas acentuadas nas células GP7TB.

De forma análoga aos marcadores de CSCs, o aumento na expressão destes genes poderia ser também consequência da eventual queda nas concentrações de NaBu e a reversão do fenótipo epitelial. Isto poderia estar acontecendo mesmo quando a morfologia das células não mostrava sinais de MET, pois a reprogramação nuclear poderia estar ainda em fase precoce.

Uma hipótese alternativa é de que o aumento na expressão dos genes de pluripotência foi de fato estimulada pelo NaBu. Em estudos de reprogramação de células somáticas, o NaBu foi empregado no processo de formação de células tronco pluripotentes induzidas (iPSCs). O processo de reprogramação de células somáticas consiste na incorporação de fatores de transcrição embrionários exógenos que induzem uma profunda reprogramação nuclear e, em última instância, a formação de células tronco pluripotentes semelhantes às células embrionárias (BUGANIM *et al.*, 2013; SMITH; SINDHU; MEISSNER, 2016).

5. DISCUSSÃO

Os 4 fatores clássicos empregados neste procedimento são conhecidos como OSKM, pela primeira letra de cada fator: Oct4, Sox2, Klf4 e Myc. Atualmente, estratégias com outros fatores embrionários e com substâncias adjuvantes que aumentam a eficiência e reduzem a mortalidade celular estão sendo testadas (SMITH; SINDHU; MEISSNER, [S.d.]). Neste sentido, foi demonstrado que o NaBu aumenta a eficiência da reprogramação em associação aos 4 fatores OSKM. O NaBu não aumenta apenas a eficiência de geração de iPSCs, mas também o número de genes embrionários que são superexpressos após reprogramação (LIANG *et al.*, 2010).

Em outro estudo, foi observado que o NaBu foi capaz de substituir ao Klf4 ou ao Myc quando as células foram reprogramadas com a estratégia dos fatores OSKM. Acredita-se que o mecanismo de ação do NaBu na reprogramação está relacionado com o aumento de acetilação da histona H3, a desmetilação de promotores no DNA e a expressão de genes de pluripotência (MALI *et al.*, 2010)

No presente estudo, o aumento na expressão dos genes de pluripotência poderia, então, estar relacionada com algum processo de reprogramação parcial promovido pelo NaBu. Neste cenário, os genes poderiam estar contribuindo com a MET ou seriam a consequência de um estado de reprogramação parcial. Existe evidência que sugere que o estado de pluripotência das células tronco depende das concentrações destes fatores, em particular de Oct4, e dos níveis de expressão dos genes. Concentrações menores de Oct4 sensibilizam as células ao efeito de outros fatores de pluripotência, mantendo um estado desdiferenciado e pluripotente estável. Porém, concentrações maiores de Oct4 promovem a saída do estado de pluripotência e sensibilizam as células aos estímulos de diferenciação celular (KARWACKI-NEISIUS *et al.*, 2013).

São necessários mais estudos para poder determinar se o aumento na expressão relativa de *sox2*, *pou5f1* (Oct4), *mycn* e *gata3* foi decorrente da reversão da MET ou foi consequência direta de um processo de reprogramação nuclear mediada pelo NaBu nas células GP7TB. Neste sentido, a determinação dos níveis proteicos destes fatores de pluripotência, assim como o monitoramento das alterações na expressão gênica em diferentes pontos no tempo, poderiam ajudar a esclarecer os resultados obtidos.

Foi também avaliada a expressão proteica de Thy1.1 (CD90.1) e CD44 na superfície das células GP7TB tratadas com NaBu com o objetivo de validar os

5. DISCUSSÃO

resultados observados no *array* de RT-qPCR para os correspondentes genes. O gene *thy1* foi o segundo gene com maior aumento na expressão gênica relativa decorrente do tratamento com NaBu e o *cd44* foi um gene que não apresentou diferenças na expressão relativa. Tanto Thy1.1 como CD44 são considerados marcadores de superfície de CSCs (CASTELLI; PELOSI; TESTA, 2017; HE; SMITH; MISHRA, 2015) e sua expressão tem sido associada tanto com CSCs derivadas de HCC (FENG *et al.*, 2014; XIAO *et al.*, 2017) como de células progenitoras hepáticas (KON *et al.*, 2009).

Os resultados da imunofenotipagem por citometria de fluxo confirmaram que o Thy1.1 aumenta sua expressão após 72h de tratamento com NaBu. Aproximadamente 85% das células tratadas resultaram positivas. Já no caso do CD44, a abundância relativa da proteína na membrana de células tratadas não mudou de forma significativa comparada com as células controle. Assim, foi demonstrado que tanto o gene *thy1.1* como a proteína na membrana plasmática aumentaram em resposta ao tratamento com NaBu.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- O NaBu apresenta atividade citotóxica tanto nas células JM-1 como nas células GP7TB, a partir das 48 h de tratamento.
- O efeito citotóxico do NaBu nas duas linhagens celulares parece estar associado, principalmente, com a redução da proliferação celular.
- O NaBu também atua aumentando a taxa de apoptose, mas este efeito parece acontecer somente nas células GP7TB.
- O grau de diferenciação celular que promove o tratamento com NaBu parece ser maior nas células GP7TB.
- As células GP7TB apresentam menor grau de diferenciação celular do que as JM-1, e parecem possuir maior potencial invasivo/metastático.
- O NaBu poderia estar reduzindo o potencial invasivo e a capacidade de auto-renovação das células GP7TB por meio de uma transição mesênquimo-epitelial.
- São necessários mais estudos para validar os resultados observados nos perfis de expressão gênica e para elucidar a relação entre o aumento na expressão de genes de pluripotência e a diminuição nos genes associados com a MET nas células GP7TB.

REFERÊNCIAS

- ADILAH, R. Effect of dietary macronutrients on aflatoxicosis: a mini-review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 8, p. 2277–2281, 2017.
- ASSELAH, T.; MARCELLIN, P.; SCHINAZI, R. F. Treatment of hepatitis C virus infection with direct-acting antiviral agents: 100% cure? **Liver International**, v. 38, n. S1, p. 7–13, 2018.
- BARNARD, J. A.; WARWICK, G. Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells. **Cell growth and differentiation**, v. 4, p. 495–495, 1993.
- BENJAMINI, Y.; KRIEGER, A. M.; YEKUTIELI, D. Adaptive linear step-up procedures that control the false discovery rate. **Biometrika**, v. 93, n. 3, p. 491–507, 2006.
- BORAH, A. *et al.* Targeting self-renewal pathways in cancer stem cells: clinical implications for cancer therapy. **Oncogenesis**, v. 4, n. 11, p. e177, 2015.
- BRABLETZ, T. *et al.* EMT in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 2, p. 128, 2018.
- BRAY, F. *et al.* Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. **The lancet oncology**, v. 13, n. 8, p. 790–801, 2012.
- BRUIX, J. *et al.* Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. **Journal of hepatology**, v. 35, n. 3, p. 421–430, 2001.
- BRUIX, J. *et al.* Prognostic factors and predictors of sorafenib benefit in patients with hepatocellular carcinoma: Analysis of two phase III studies. **Journal of Hepatology**, v. 67, n. 5, p. 999–1008, 2017.
- BUGANIM, Y. *et al.* Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 6, p. 427–439, 2013.
- BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- CASTELLI, G.; PELOSI, E.; TESTA, U. Liver Cancer: Molecular Characterization, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. **Cancers**, v. 9, n. 9, p. 127, 2017.
- CHAFFER, C. *et al.* EMT, cell plasticity and metastasis. **Cancer and**

REFERÊNCIAS

Metastasis Reviews, v. 35, n. 4, p. 645–654, 2016.

CHEN, T. H. *et al.* Sodium butyrate activates ERK to regulate differentiation of mesenchymal stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 355, n. 4, p. 913–918, 2007.

CHU, Y. *et al.* Aflatoxin B1 exposure increases the risk of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 4, p. 711–720, 2017.

COLEMAN, W. B. *et al.* Regulation of the differentiation of diploid and some aneuploid rat liver epithelial (stemlike) cells by the hepatic microenvironment. **The American journal of pathology**, v. 142, n. 5, p. 1373, 1993.

COOK, J. R. *et al.* Effect of sodium butyrate on alpha-fetoprotein gene expression in rat hepatoma cells in vitro. **Cancer research**, v. 45, n. 7, p. 3215–9, 1985.

DONTU, G. *et al.* Stem cells in normal breast development and breast cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, n. s1, p. 59–72, 2003.

FARAZI, P. A.; DEPINHO, R. A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 9, p. 674–687, 2006.

FARBER, E. Pre-cancerous steps in carcinogenesis Their physiological adaptive nature. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 738, p. 171–180, 1984.

FENG, D. *et al.* Surface markers of hepatocellular cancer stem cells and their clinical potential. **Neoplasma**, v. 62, n. 05, p. 505–13, 2014.

GBODLC: AKINYEMIJU, T. *et al.* The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. **JAMA oncology**, v. 3, n. 12, p. 1683-1691, 2017.

GILBERTSON, R. J.; RICH, J. N. Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 10, p. 733–736, 2007.

GINSBURG, E. *et al.* Growth Inhibition and Morphological Changes Caused by Lipophilic Acids in Mammalian Cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 8, p. 2457–2461, 1973.

GUO, Y. *et al.* Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma. **Gene**, v. 384, p. 51–61, 2006.

GUPTA, P. B.; CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. Cancer stem cells: mirage or reality? **Nature Medicine**, v. 15, n. 9, p. 1010, 2009.

REFERÊNCIAS

- HAMER, H. M. *et al.* The role of butyrate on colonic function. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 27, n. 2, p. 104-119, 2008.
- HE, A. R.; SMITH, D. C.; MISHRA, L. Targeting cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. **Gastrointestinal Cancer Targets Therapy**, v. 5, 2015.
- HEIDOR, R. *et al.* Anticarcinogenic Actions of Tributyrin, A Butyric Acid Prodrug. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 14, p. 17201729, 2012.
- HEIDOR, R.; VARGAS-MENDEZ, E.; MORENO, F. S. Histone Deacetylase Inhibitor Tributyrin and Vitamin A in Cancer. **Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics**, p. 1-23, 2017.
- HUANG, M. N. *et al.* Genome-scale mutational signatures of aflatoxin in cells, mice, and human tumors. **Genome Research**, v. 27, n. 9, p. 1475–1486, 2017.
- IRIGARAY, P.; BEMPOMME, D. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 2, p. 135-148, 2009.
- JIANG, L.; LI, J.; SONG, L. Bmi-1, stem cells and cancer. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 41, n. 7, p. 527-534, 2009.
- KARWACKI-NEISIUS, V. *et al.* Reduced Oct4 Expression Directs a Robust Pluripotent State with Distinct Signaling Activity and Increased Enhancer Occupancy by Oct4 and Nanog. **Cell Stem Cell**, v. 12, n. 5, 2013.
- KIM, B. H. *et al.* Temporal improvement in survival of patients with hepatocellular carcinoma in a hepatitis B virus-endemic population. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 33, n. 2, p. 475–483, 2018.
- KON, J. *et al.* Thy1-positive cells have bipotential ability to differentiate into hepatocytes and biliary epithelial cells in galactosamine-induced rat liver regeneration. **The American journal of pathology**, v. 175, n. 6, p. 2362–2371, 2009.
- LAFARO, K. J.; DEMIRJIAN, A. N.; PAWLIK, T. M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. **Surgical Oncology Clinics**, v. 24, n. 1, p. 1-17, 2015.
- LANGDON, S. P. *et al.* Effect of sodium butyrate and other differentiation inducers on poorly differentiated human ovarian adenocarcinoma cell lines. **Cancer research**, v. 48, n. 21, p. 6161-6165, 1988.
- LAPIDOT, T. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. **Nature**, v. 367, n. 6464, p. 645, 1994.
- LEDER, A.; LEDER, P. Butyric acid, a potent inducer of erythroid differentiation in cultured erythroleukemic cells. **Cell**, v. 5, n. 3, p. 319-322, 1975.

REFERÊNCIAS

- LEE, J. S. *et al.* Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. **Hepatology**, v. 40, n. 3, p. 667–676, 2004.
- LEONEL, A. J.; ALVAREZ-LEITE, J. I. Butyrate: implications for intestinal function. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 15, n. 5, p. 474-479, 2012.
- LI, D. *et al.* Expression level of Bmi-1 oncoprotein is associated with progression and prognosis in colon cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 136, n. 7, p. 997–1006, 2010.
- LIANG, G. *et al.* Butyrate Promotes Induced Pluripotent Stem Cell Generation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25516–25521, 2010.
- LITVAK, D. A. *et al.* Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is associated with apoptosis and early induction of p21Waf1/Cip1 and p27Kip1. **Surgery**, v. 124, n. 2, p. 161–170, 1998.
- LIU, H. *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. **Cell stem cell**, v. 3, n. 6, p. 587–590, 2008.
- LIU, S. *et al.* Hedgehog Signaling and Bmi-1 Regulate Self-renewal of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells. **Cancer Research**, v. 66, n. 12, p. 6063–6071, 2006.
- LOBO, N. A. *et al.* The biology of cancer stem cells. **Annual Reviews of Cell and Developmental Biology**, v. 23, p. 675-699, 2007.
- LOEB, L. A.; HARRIS, C. C. Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective. **Cancer Research**, v. 68, n. 17, p. 6863–6872, 2008.
- LORENZ, V. *et al.* Sodium butyrate induces cellular senescence in neuroblastoma and prostate cancer cells. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 7, n. 1, p. 265–272, 2011.
- LUCH, A. Nature and nurture—lessons from chemical carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 2, p. 113, 2005.
- LYONS, A. B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, n. 1–2, p. 147–154, 2000.
- MALI, P. *et al.* Butyrate Greatly Enhances Derivation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Promoting Epigenetic Remodeling and the Expression of Pluripotency-Associated Genes. **Stem cells**, v. 28, n. 4, 2010.
- MARTEL, C. *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 6, p. 607–615,

REFERÊNCIAS

2012.

MERCHANT, A. A.; MATSUI, W. Targeting Hedgehog – a Cancer Stem Cell Pathway. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 12, 2010.

NEPHEW, K. P.; HUANG, T. H. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. **Cancer letters**, v. 190, n. 2, p. 125-133, 2003.

NGUYEN, L. V. *et al.* Cancer stem cells: an evolving concept. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 2, p. 133–143, 2012.

NGUYEN, L. V. *et al.* Lin28b Is Sufficient to Drive Liver Cancer and Necessary for Its Maintenance in Murine Models. **Cancer Cell**, v. 26, n. 2, p. 248–261, 2014.

NORDENSTEDT, H.; WHITE, D. L.; EL-SERAG, H. B. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. **Digestive and Liver Disease**, v. 42, p. S206–S214, 2010.

NOVICKI, D. L.; JIRTLE, R. L.; MICHALOPOULOS, G. Establishment of two rat hepatoma cell strains produced by a carcinogen initiation, phenobarbital promotion protocol. **In Vitro**, v. 19, n. 3, p. 191–202, 1983.

NOWELL, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, v. 194, n. 4260, p. 23–28, 1976.

PARDAL, R.; CLARKE, M.; MORRISON, S. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 12, p. 895–902, 2003.

PASTÒ, A. *et al.* Cancer stem cells from epithelial ovarian cancer patients privilege oxidative phosphorylation, and resist glucose deprivation. **Oncotarget**, v. 5, n. 12, p. 4305–4319, 2014.

PISKOUNOVA, E. *et al.* Lin28A and Lin28B Inhibit let-7 MicroRNA Biogenesis by Distinct Mechanisms. **Cell**, v. 147, n. 5, p. 1066–1079, 2011.

PITOT, H. C.; DRAGAN, Y. P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **The FASEB journal**, v. 5, n. 9, p. 2280-2286, 1991.

QIN, Z. K. *et al.* Expression of Bmi-1 is a prognostic marker in bladder cancer. **BMC Cancer**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2009.

REYA, T. *et al.* Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, v. 414, n. 6859, p. 105, 2001.

ROSKAMS, T. *et al.* Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man. **Journal of Hepatology**, v. 29, n. 3, p. 455-463, 1998.

ROSKAMS, T. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and

REFERÊNCIAS

- cholangiocarcinoma. **Oncogene**, v. 25, n. 27, p. 3818–3822, 2006.
- SAITO, H. *et al.* Changes of antigen expression on human hepatoma cell lines caused by sodium butyrate, a differentiation inducer. **Journal of Gastroenterology**, v. 29, n. 6, p. 733–739, 1994.
- SANCHO, P. *et al.* MYC/PGC-1 α Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 4, p. 590–605, 2015.
- SCHINAZI, R. F. *et al.* Towards HBV curative therapies. **Liver International**, v. 38, n. S1, p. 102–114, 2018.
- SHARMA, N. S. *et al.* Sodium butyrate-treated embryonic stem cells yield hepatocyte-like cells expressing a glycolytic phenotype. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p. 1053–1063, 2006.
- SHERMAN, M. Hepatocellular carcinoma: New and emerging risks. **Digestive and Liver Disease**, v. 42, p. S215-S222, 2010.
- SIAVOSHIAN, S. *et al.* Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. **Gut**, v. 46, n. 4, p. 507–514, 2000.
- SINGH, B.; HALESTRAP, A. P.; PARASKEVA, C. Butyrate can act as a stimulator of growth or inducer of apoptosis in human colonic epithelial cell lines depending on the presence of alternative energy sources. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 6, 1997.
- SINGH, A.; SETTLEMAN, J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 34, p. 4741, 2010.
- SMITH, Z.; SINDHU, C.; MEISSNER, A. Molecular features of cellular reprogramming and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 3, p. 139–154, 2016.
- SONG, W. *et al.* Bmi-1 is related to proliferation, survival and poor prognosis in pancreatic cancer. **Cancer Science**, v. 101, n. 7, p. 1754–1760, 2010.
- STEEG, P. S. Targeting metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 4, p. 201, 2016.
- SUDA, G. *et al.* Treatment of hepatitis C in special populations. **Journal of Gastroenterology**, p. 1–15, 2018.
- TAM, W. L.; WEINBERG, R. A. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, p. 1438–1449, 2013.
- TANAKA, K. *et al.* ALDH1A1-overexpressing cells are differentiated cells but

REFERÊNCIAS

- not cancer stem or progenitor cells in human hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v. 6, n. 28, p. 24722–24732, 2015.
- THORNTON, J. E.; GREGORY, R. I. How does Lin28 let-7 control development and disease? **Trends in cell biology**, v. 22, n. 9, p. 474-482, 2012.
- TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 3, p. 1031–64, 2001.
- TORRE, L. A. *et al.* Global cancer incidence and mortality rates and trends – an update. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 25, n. 1, p. 16-27, 2016.
- VARTANIAN, V. *et al.* NEIL1 protects against aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 16, p. 4207–4212, 2017.
- VERDIN, E.; OTT, M. 50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 4, p. 258–264, 2014.
- VIDALI, G. *et al.* Reversible effects of Na-butyrate on histone acetylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 82, n. 1, p. 223–227, 1978.
- VISVADER, J. E.; LINDEMAN, G. J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. **Nature reviews cancer**, v. 8, n. 10, p. 755, 2008.
- WANG, T. *et al.* Aberrant regulation of the LIN28A/LIN28B and let-7 loop in human malignant tumors and its effects on the hallmarks of cancer. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2015.
- WANG, T. *et al.* Anticancer effects of sodium butyrate on hepatocellular carcinoma cells in vitro. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 31, n. 4, p. 967–74, 2013.
- WANG, H. *et al.* Increased polycomb-group oncogene Bmi-1 expression correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 134, n. 5, p. 535–541, 2008.
- WILLIAMS, E. A.; COXHEAD, J. M.; MATHERS, J. C. Anti-cancer effects of butyrate: use of micro-array technology to investigate mechanisms. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, n. 1, p. 107–115, 2003.
- XIAO, Y. *et al.* The Recent Advances on Liver Cancer Stem Cells: Biomarkers, Separation, and Therapy. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2017, 2017.
- YANG, B. *et al.* Adiposity across the adult life course and incidence of primary

REFERÊNCIAS

liver cancer: The NIH-AARP cohort. **International journal of cancer**, v. 141, n. 2, p. 271–278, 2017.

YANG, J. D.; ROBERTS, L. R. Hepatocellular carcinoma: a global view. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, n. 8, p. 448, 2010.

ZHU, H. *et al.* The Lin28/let-7 Axis Regulates Glucose Metabolism. **Cell**, v. 147, n. 1, p. 81–94, 2011.

Anexo 1 – Ficha do aluno

18/02/18 09:35

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9132 - 8842244/1 - Ernesto Vargas Mendez

Email: evargas@usp.br
Data de Nascimento: 13/01/1982
Cédula de Identidade: RNE - V959757-1 - DF
Local de Nascimento: Costa Rica
Nacionalidade: Costarriquenha
Graduação: Bachillerato en Biología - Universidad de Costa Rica - Costa Rica - 2004

Curso: Doutorado Direto
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Nutrição Experimental
Data de Matrícula: 21/10/2013
Início da Contagem de Prazo: 21/10/2013
Data Limite para o Depósito: 19/02/2018
Orientador: Prof(a). Dr(a). Fernando Salvador Moreno - 21/10/2013 até o presente. Email: rmoreno@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 21/10/2013
Prorrogação(ões): 120 dias
Período de 21/10/2017 até 18/02/2018
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 15/01/2016
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 21/10/2013
Prorrogação em 28/08/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9132 - 8842244/1 - Ernesto Vargas Mendez

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBA5712-6/1	Fisiologia da Nutrição I	19/05/2014	29/06/2014	90	6	90	A	N	Concluída
QBQ5781-7/1	Fundamentos da Citometria de Fluxo – Aplicações em Biologia Celular, Molecular e Bioquímica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	26/05/2014	01/06/2014	30	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
HNT5707-6/3	Métodos para Avaliação do Estado Nutricional de Populações (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	01/08/2014	04/09/2014	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
VPT5781-1/2	Hepatologia Experimental e Comparada (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	22/09/2014	26/10/2014	90	6	85	A	N	Concluída
QBQ5747-8/1	Animais de Laboratório (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	24/11/2014	30/11/2014	15	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBA5899-2/4	Biodisponibilidade de Nutrientes e de Substâncias Bioativas em Alimentos e Dietas	02/03/2015	12/04/2015	90	6	100	A	N	Concluída
FBA5897-2/2	Nutrigenômica do Câncer	03/08/2015	09/08/2015	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5753-3/2	Processos de Invasão Celular	01/03/2016	11/04/2016	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
ICB5753-1/1	Citometria de Fluxo: Uma Abordagem Teórico-prática (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	09/09/2016	21/10/2016	75	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBT5776-5/3	Tópicos Especiais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	17/10/2016	30/10/2016	30	2	100	A	N	Concluída
BMH5774-1/1	Metabolismo da Célula Tumoral (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/04/2017	15/05/2017	60	4	100	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
Para exame de qualificação		Para depósito de tese
Disciplinas:	0	25
Estágios:		26
Total:	0	25

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018

Impresso em: 18/02/2018 09:32:13

Anexo 2 – Informações para os membros de bancas

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de 30 minutos.
2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de 30 minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de 30 minutos para sua resposta.
 - 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até 60 minutos por examinador.
 - 2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.
 - 4.1 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
 - 4.2 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 26 de maio de 2011.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP