

LUCAS BARBOSA ROSSETTI

**FASCINA-1 COMO UM POSSÍVEL NOVO ALVO TERAPÊUTICO
PARA O TRATAMENTO DE GLIOBLASTOMA**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação de Biologia de Sistemas (Biologia Celular e Tecidual), do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2022

LUCAS BARBOSA ROSSETTI

**FASCINA-1 COMO UM POSSÍVEL NOVO ALVO TERAPÊUTICO
PARA O TRATAMENTO DE GLIOBLASTOMA**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação de Biologia de Sistemas (Biologia Celular e Tecidual), do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Alison Colquhoun

Versão original

São Paulo
2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Rossetti, Lucas Barbosa

Fascina-1 como um possível novo alvo terapêutico para o tratamento de glioblastoma / Lucas Barbosa Rossetti; Orientadora Alison Colquhoun. -- São Paulo, 2022.

79 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Câncer; 2. Glioblastoma; 3. Migração celular; 4. Fascina-1; 5. Cofilina-1. I. Colquhoun, Alison; II. Título

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Candidato: Lucas Barbosa Rossetti

Título da Tese: Fascina-1 como um possível novo alvo terapêutico para o tratamento de glioblastoma

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alison Colquhoun

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado em sessão pública realizada a _____/_____/_____, considerou o candidato:

Aprovado

Reprovado

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **849/2016** referente ao projeto intitulado: "*Efeito de prostaglandinas em fascina-1, em linhagens de glioblastomas humano*" sob a responsabilidade de **Lucas Barbosa Rossetti** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Alison Colquhoun**, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 13 de fevereiro de 2017.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo Marinho A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, cujo apoio foi essencial para a minha educação e formação.

Aos meus amigos, que se tornaram a minha família e meu apoio em São Paulo.

A todos os meus professores.

AGRADECIMENTOS

Durante o andamento deste trabalho, diversas transformações ocorreram na minha vida. Tais mudanças resultaram em amadurecimento pessoal, científico e profissional, e fico muito grato por isso. Muitas pessoas contribuíram direta ou indiretamente para essas transformações e para a conclusão deste projeto. Espero que eu sempre consiga lembrar de todos vocês e eternizá-los junto a este trabalho.

Agradeço aos meus pais e irmãos por todo suporte oferecido. Apesar das nossas diferenças, vocês me acompanharam durante minha jornada e sempre estiveram presentes nos momentos de incertezas e dúvidas.

Agradeço à assistência da minha psicóloga e psiquiatra, que aceleraram meu processo de autoconhecimento, me deram suporte durante a pandemia da COVID-19 e me auxiliaram nos momentos difíceis.

Agradeço aos meus amigos pelos nossos momentos de descontração, desabafo e fofoca. Também sou grato pelos momentos de discussões científicas sobre curiosidades, resultados gerados e protocolos de experimentos. Todos vocês ocupam um lugar especial no meu coração e espero que nossa amizade prospere por muitos anos.

Agradeço ao apoio do Departamento de Biologia Celular e Tecidual, dos professores e funcionários pela infraestrutura, resolução de burocracias, transmissão de conhecimento e convivência. Vocês são pessoas exemplares, que me inspiram a ser um profissional melhor.

Agradeço especialmente ao Laboratório de Metabolismo da Célula Tumoral que me acolheu ainda durante a graduação para fazer iniciação científica e depois no doutorado direto. Foi um lugar onde realmente pude me desenvolver como cientista e como pessoa, através da diversidade cultural e intelectual das pessoas.

Por fim, um agradecimento póstumo ao Tio Bauer, que não só alegrava o ambiente, como também era uma fonte valiosa de sabedoria. Ele também me mostrou que o avançar da idade pode deixar uma pessoa com o corpo mais limitado, mas não compromete o seu espírito, a sua essência. É possível ter uma idade avançada e ter uma mente aberta a novas ideias, sempre respeitando as pessoas, mesmo que elas sejam de gerações mais novas.

AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

Agradeço especialmente as agências de fomento que apoiaram a realização do presente trabalho:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através do processo 155322/2016-8.
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Fazer ciência é um investimento e, nem sempre os resultados são imediatos, mas sempre contribuem para o progresso e desenvolvimento intelectual da sociedade.

RESUMO

ROSSETTI, L. B. Fascina-1 como um possível novo alvo terapêutico para o tratamento de glioblastoma. 2022. 79 f. (79 folhas). Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Glioblastoma (GBM) é o tumor cerebral maligno mais comum e não há uma opção terapêutica eficiente. A migração celular e a invasão desempenham um papel importante na falha do tratamento de GBM. Fascin-1 (FSCN1) é uma proteína de ligação a actina e participa da formação de filopódios. A superexpressão de fascin está associada a tumores mais agressivos e alguns estudos sugerem que ela poderia ser usada como um marcador prognóstico de GBM. No entanto, seu papel na biologia, migração e tumorigênese do GBM ainda é pouco compreendido. Portanto, nosso objetivo foi investigar a contribuição de FSCN1 na migração de células GBM e seu potencial papel como alvo terapêutico. Assim, linhagens celulares de GBM humano (T98G e U87MG) foram usadas em nossos experimentos. Eles foram tratados com Fascin-G2 (FG2), um inibidor seletivo de Fascina, para medir sua capacidade de migração, viabilidade e fase do ciclo celular através de Cicatrização de Feridas ou Transwell, Contagem de Azul Tripán e Ensaios de Citometria de Fluxo, respectivamente. A inibição da fascin reduziu a migração celular após 12 horas em ambas as linhagens celulares. O tratamento com FG2 não alterou o número total de células ou células positivas Azul de Tripán após 24 horas. No entanto, 75 μ M de FG2 aumentou a população de T98G na fase sub-G1, enquanto reduziu as células em G1. Nas células U87MG, 50 μ M de FG2 aumentou a população em G1, enquanto reduziu as células em G2/M. Esses resultados sugerem que a inibição de Fascina afeta a migração de células de glioblastoma e a progressão do ciclo celular *in vitro* e pode ser usada como um alvo terapêutico para a terapia de glioblastoma.

Palavras-chave: Glioblastoma. Migração celular. Fascina-1

ABSTRACT

ROSSETTI, L. B. Fascin-1 as a potential therapeutic target for glioblastoma treatment. 2022. 79 p. (79 pages). PhD thesis (Cell and Tissue Biology). Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, 2022.

Glioblastoma (GBM) is the most common malignant brain tumor and there is no efficient therapeutic option. Cell migration and invasion play a major role in GBM treatment failure. Fascin-1 (FSCN1) is an actin-bundling protein and participates in filopodia formation. Fascin overexpression is associated with more aggressive tumors and some studies suggest that it could be used as a GBM prognostic marker. However, its role in GBM biology, migration, and tumorigenesis is still poorly understood. Therefore, our aim was to investigate FSCN1 contribution in GBM cell migration and its potential role as a therapeutic target. Thus, human GBM cell lines (T98G and U87MG) were used in our experiments. They were treated with Fascin-G2 (FG2), a Fascin inhibitor, to measure their migration capacity, viability, and cell cycle phase through Wound Healing or Transwell, Trypan Blue Counting, and Flow Cytometry Assays, respectively. Fascin inhibition reduced cell migration after 12 hours in both cell lines. FG2 treatment did not alter total cell number or Trypan Blue positive cells after 24 hours. Nevertheless, 75 μ M of FG2 increased T98G population in sub-G1 phase, while reduced cells in G1. In U87MG cells, 50 μ M of FG2 increased cell population in G1, while reduced cells in G2/M. These results suggest that Fascin inhibition impacts glioblastoma cells migration and cell cycle progression *in vitro* and could be used as a therapeutic target for glioblastoma therapy.

Keywords: Glioblastoma. Cell Migration. Fascin-1

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	ácido araquidônico
ANOVA	análise de variância
Arg	arginina
BLAST	ferramenta alinhamento local
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
COX	ciclo-oxigenases
Ct	<i>cycle thresholds</i>
DAVID	Banco de Dados para Anotação, Visualização e Descoberta Integrada
DEG	genes diferencialmente expressos
DEP	proteínas diferencialmente expressas
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeos
DTT	ditiotreitól
ECL	solução quimioluminescente
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
FC	<i>fold change</i>
FG2	Fascin-G2, inibidor de fascina
FSCN1	fascina-1
GBM	glioblastoma
G-DOC	banco de dados de câncer de Georgetown
GDP	difosfato de guanosina
GO	ontologia genética
GTP	trifosfato de guanosina
IDH	isocitrato desidrogenase
Ile	isoleucina
K247	lisina 247
K250	lisina 250

KEGG	Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto
Leu	leucina
MEC	matriz extracelular
Met	metionina
miRNA	microRNA
MMP	metaloproteinases de matriz
mRNA	RNA mensageiro
NAD	dinucleótido de nicotinamida e adenina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
pFSCN1	fascina-1 fosforilada
PG	prostaglandina
PGD ₂	prostaglandina D ₂
PGDS	prostaglandina-D sintase
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGES	prostaglandina-E sintase
PGF _{2α}	prostaglandina F _{2α}
PGFS	prostaglandina-F sintase
PGH ₂	prostaglandina H ₂
PGI ₂	prostaglandina I ₂ ou prostaciclina
PGIS	prostaglandina-I sintase
PGT	transportador de prostaglandinas
PI	iodeto de propídeo
PKC	proteína quinase C
PLA2	fosfolipase A2
qPCR	PCR quantitativo
REMBRANDT	Repositório de dados moleculares de neoplasias cerebrais
RNA	ácido ribonucleico
S274	serina 274
S39	serina 39
SDS	dodecil-sulfato de sódio

SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SN	sistema nervoso
SNC	sistema nervoso central
TBP	proteína de ligação ao TATA-box
TBS	solução salina tamponada com Tris
TBS-T	solução de TBS com adição de Tween® 20
TCGA	Atlas do Genoma do Câncer
TERT	transcriptase reversa da telomerase
TXA ₂	tromboxano A ₂
TXAS	tromboxano-A sintase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado da atuação das Rho GTPases na migração celular.	22
Figura 2. Esquema simplificado da síntese de prostaglandinas (PGs) e ligação aos seus receptores	24
Figura 3. Esquema dos domínios e sítios de ligação de fascina.	26
Figura 4. Volcano plot da expressão gênica comparando amostras de glioblastoma (GBM) e tecido cerebral não tumoral.	44
Figura 5. Termos enriquecidos de ontologia genética (GO) relacionados a Processos Biológicos.	45
Figura 6. Termos enriquecidos de ontologia genética (GO) relacionados a Componentes Celulares.	45
Figura 7. Termos enriquecidos de ontologia genética (GO) relacionados a Funções Moleculares.	46
Figura 8. Termos enriquecidos relacionados a Vias da KEGG.	46
Figura 9. Análise do gene <i>FSCN1</i> na plataforma GlioVis.	48
Figura 10. Análise de sobrevivência para o gene <i>FSCN1</i>	49
Figura 11. Migração das células da linhagem T98G.	50
Figura 12. Migração das células da linhagem U87MG.	51
Figura 13. Viabilidade das células T98G e U87MG após inibição de Fascina.	52
Figura 14. Ciclo celular das células T98G após inibição de Fascina.	54
Figura 15. Ciclo celular das células U87MG após inibição de Fascina.	55
Figura 16. Expressão gênica de <i>FSCN1</i>	57
Figura 17. Expressão proteica de <i>FSCN1</i>	58
Figura 18. Análise de enriquecimento das proteínas diferencialmente expressas nas células T98G.	64
Figura 19. Análise de enriquecimento das proteínas diferencialmente expressas nas células T98G.	65
Figura 20. Análise de enriquecimento das proteínas diferencialmente expressas nas células U87MG.	66
Figura 21. Análise de enriquecimento das proteínas diferencialmente expressas nas células U87MG.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das linhagens celulares T98G e U87MG.	31
Tabela 2. Sequência dos <i>primers</i> usados neste estudo.	34
Tabela 3. Características dos <i>primers</i> usados neste estudo.	35
Tabela 4. Proteínas diferencialmente expressas (DEPs) após o tratamento com PGE ₂	60
Tabela 5. Proteínas diferencialmente expressas (DEPs) após o tratamento com PGF _{2α}	61
Tabela 6. Proteínas diferencialmente expressas (DEPs) após o tratamento com PGE ₂	62
Tabela 7. Proteínas diferencialmente expressas (DEPs) após o tratamento com PGF _{2α}	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Glioblastoma.....	18
1.2	Classificação	19
1.3	Projeto REMBRANDT.....	20
1.4	Migração celular	21
1.5	Migração e invasão do glioblastoma.....	22
1.6	Prostaglandinas.....	23
1.7	Fascina.....	25
1.8	Justificativa.....	28
2	MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1	Reagentes e Drogas.....	29
2.2	Cultura de células.....	29
2.3	Tratamento das células	31
2.4	qPCR.....	32
2.4.1	Extração de RNA total	32
2.4.2	Síntese de cDNA	33
2.4.3	PCR quantitativo (qPCR).....	33
2.4.4	Padronização dos primers	34
2.4.5	Análise da expressão gênica relativa.....	35
2.5	Western Blot.....	36
2.6	Ensaio de Fechamento de Ferida	37
2.7	Ensaio com Transwell.....	38
2.8	Ensaio de contagem de células com Azul de Tripán.....	39
2.9	Citometria de Fluxo.....	39
2.10	Análise de dados do estudo REMBRANDT	40
2.11	Análise por espectrometria de massas	40
2.12	Análise de Enriquecimento	41
2.13	Análise Estatística	42
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1	Análise <i>in silico</i> dos dados do projeto REMBRANDT	43
3.1.1	Pré-processamento	43
3.1.2	Análise de Enriquecimento	44
3.1.3	Análise de expressão gênica de FSCN1 e análise de sobrevivência	48
3.2	Efeito da inibição de Fascina na migração celular	49

3.3	Viabilidade das células tratadas com inibidor de Fascina	51
3.4	Ciclo celular das células tratadas com inibidor de Fascina	53
3.5	Análise da expressão de FSCN1	56
3.6	Análise proteômica quantitativa após o tratamento com prostaglandinas	60
4	CONCLUSÃO	69
5	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Glioblastoma

O cérebro humano adulto é formado por cerca de 86 bilhões de neurônios e uma quantidade muito semelhante de células da glia (HERCULANO-HOUZEL, 2009). Estes tipos celulares são necessários para o desenvolvimento do sistema nervoso (SN), providenciando suporte estrutural e nutricional. As células da glia também participam de processos patológicos, por meio da detecção de dano neuronal, reconhecimento de patógenos, liberação de mediadores inflamatórios, entre outros (XU *et al.*, 2020).

Um dos tipos celulares que compõem a glia são os astrócitos. Eles podem interagir com neurônios, oligodendrócitos, microglia, células perivasculares e células circulantes do sistema imune. No SN central (SNC) sadio, astrócitos são responsáveis por regular a homeostase de íons e neurotransmissores, fornecer suporte metabólico aos neurônios, modular o fluxo sanguíneo local e responder a lesões (SOFRONIEW, 2020).

Astrócitos podem passar por um processo tumorigênico e formar um astrocitoma, entretanto este fenômeno ainda precisa ser estudado em maior profundidade. O que se sabe até o momento é que algumas condições genéticas e a exposição prévia a certas substâncias químicas e radiação são fatores de risco para o desenvolvimento de astrocitomas (KABEL *et al.*, 2018).

O glioblastoma (GBM) é um tipo de astrocitoma e corresponde a 54% dos diagnósticos de tumores cerebrais malignos em adultos (MILLER *et al.*, 2021). Em cortes histológicos, pode-se destacar a hiper celularidade, atipia nuclear, proliferação microvascular e necrose (D'ALESSIO *et al.*, 2019). Também se observa uma grande quantidade de células pseudopaliçadas ao redor dos focos necróticos; isto é, células migratórias que estão se distanciando da região de necrose (RONG *et al.*, 2006). O GBM também se caracteriza por ter uma elevada heterogeneidade intratumoral e entre pacientes. Devido às suas características genéticas, epigenéticas, celulares e teciduais, o tratamento para o GBM é ineficaz, com altas taxas de resistência às terapias utilizadas (DYMOVA; KULIGINA; RICHTER, 2021; FAYZULLIN *et al.*, 2019).

O protocolo terapêutico padrão atual para GBM é baseado em cirurgia de ressecção, radioterapia e quimioterapia (STUPP *et al.*, 2005). Essa abordagem se

mostrou melhor do que o protocolo anterior (em que somente a radioterapia era empregada) por aumentar cerca de dois meses a sobrevida dos pacientes, passando de 12 para 14 meses. Entretanto, é comum observar a recorrência do tumor, para o qual ainda não há um consenso sobre o tratamento universal (STUPP *et al.*, 2009). Nesses casos; o que se observa é uma maior dificuldade da sua remoção cirúrgica e menor efeito das drogas (CAMPOS *et al.*, 2016).

1.2 Classificação

A classificação de tumores é necessária para a padronização e harmonização da nomenclatura entre profissionais da saúde. Isso possibilita a melhor distinção dos tumores, melhor discussão de casos clínicos e, então, melhores diretrizes para o tratamento dos pacientes.

Para os tumores do SNC, a classificação se baseava principalmente em características anatopatológicas e histológicas até o final da década de 2000. Em 2007, a Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou a quarta edição do seu guia de classificação de tumores no SNC (LOUIS *et al.*, 2007). O documento traz uma classificação baseada em graus de malignidade e agressividade, utilizando achados histológicos majoritariamente. Os tumores são classificados em graus que variam de 1 a 4, sendo que o GBM recebeu o grau 4 de malignidade.

Já na quinta edição, lançada em 2016, a OMS acrescenta mais informações moleculares para a classificação dos tumores (LOUIS *et al.*, 2016). Assim, o GBM é subdividido em duas categorias, a partir da presença ou ausência de mutação no gene da isocitrato desidrogenase (IDH). O GBM com IDH-selvagem corresponde aos casos de GBM primário (ou *de novo*), enquanto o GBM com IDH-mutante está ligado aos casos em que houve a progressão de astrocitomas de graus inferiores (GBM secundário) (OHGAKI; KLEIHUES, 2013).

A edição mais recente do guia da OMS foi publicada em 2021, com a adição de mais características moleculares para a distinção entre os tumores (LOUIS *et al.*, 2021). Entre as mudanças estabelecidas, os astrocitomas com IDH-mutante passam a englobar também o conjunto de tumores classificados como GBM com IDH-mutante, que então passam a corresponder aos graus 2, 3 e 4. Além disso, passam a incorporar como características do GBM com IDH-selvagem: aumento no número de cópias do

receptor do fator de crescimento epidérmico (*EFGR*), mutação no promotor da transcriptase reversa da telomerase (*TERT*), duplicação do cromossomo 7 e perda do cromossomo 10. A presença de algum desses achados moleculares é suficiente para classificar o tumor como GBM, IDH-selvagem, ainda que não se observe características histológicas típicas de tumores de graus elevados (GRITSCH; BATCHELOR; GONZALEZ CASTRO, 2022).

1.3 Projeto REMBRANDT

No começo dos anos 2000, com o crescente entendimento sobre genética e o aumento da mortalidade por câncer, pesquisadores tiveram a iniciativa de obter mais informações moleculares sobre os tumores. A ideia era que, por meio de uma melhor caracterização de dados genômicos e a associação com informações clínicas, seria possível tornar o diagnóstico mais preciso e o prognóstico melhor aos pacientes.

Uma das iniciativas que surgiu nesse cenário foi o projeto REMBRANDT (do inglês, *REpository for Molecular BRAin Neoplasia DaTa*) (GUSEV *et al.*, 2018). Este trabalho foi uma iniciativa em conjunto de duas agências norte-americanas, o Instituto Nacional de Câncer e o Instituto Nacional de Doenças Neurológicas e Derrame. O objetivo principal do projeto foi coletar uma grande quantidade de dados clínicos e moleculares de pacientes com câncer cerebral.

Assim, a expressão e o número de cópias dos genes de 817 amostras de tumores originados de células da glia foram analisados e as informações clínicas dos pacientes foram integradas. Com o passar dos anos, outros dados foram adicionados para alguns tipos de tumores, como imagens de ressonância magnética, expressão de miRNAs e dados de metabolômica. Essas informações foram disponibilizadas publicamente e podem ser acessadas e analisadas por meio da plataforma virtual G-DOC (do inglês, *Georgetown Database Of Cancer*) (MADHAVAN *et al.*, 2011) (BHUVANESHWAR *et al.*, 2016).

1.4 Migração celular

A migração celular é um processo altamente complexo e fundamental em situações fisiológicas e patológicas, em que as células se locomovem de acordo com estímulos do ambiente onde se encontram. Falhas nesse processo podem levar a problemas na cicatrização de feridas, metástase de tumores, doenças autoimunes, entre outras complicações (SENGUPTA; PARENT; BEAR, 2021).

De modo geral, a migração celular pode ser entendida e dividida em algumas etapas. A primeira é a polarização da célula em duas porções, dianteira e traseira. A parte da frente projeta sua membrana citoplasmática, em uma estrutura chamada de lamelipódio ou filopódio. Lamelipódios são projeções largas, contendo filamentos de actina ramificados e lineares, enquanto os filopódios são projeções semelhantes a dedos, carregados com feixes lineares de actina (MEJILLANO *et al.*, 2004). A segunda etapa é caracterizada pela formação de complexos de adesão com o substrato, na porção dianteira da célula. Estes complexos de adesão se conectam à maquinaria contrátil da célula, permitindo que durante a contração do corpo celular, ocorra o seu deslocamento para frente. Por fim, as adesões da parte traseira são desfeitas e recicladas.

Apesar disso, nem todas as células se locomovem como descrito acima. Leucócitos, por exemplo, precisam inicialmente alterar sua morfologia para passar entre ou através das células endoteliais, antes de chegarem ao local da inflamação (NOURSHARGH; ALON, 2014). Alguns tipos celulares podem ainda migrar coletivamente. Neste caso, um grupo de células se comporta de forma unida e colaborativa, em que as células líderes da frente guiam o caminho, liberam metaproteinases para remodelar a matriz extracelular (MEC), aderem ao substrato e exercem a maior parte da força para trazer as células seguintes (MAYOR; ETIENNE-MANNEVILLE, 2016). Exemplos desse processo ocorrem durante a formação dos ductos mamários, reparo de feridas cutâneas e invasão de alguns tipos de cânceres (ILINA; FRIEDL, 2009). Na migração coletiva, as junções intercelulares são essenciais para que o processo aconteça de forma organizada e as células permaneçam unidas.

Diferentes vias de sinalização estão envolvidas na migração de células. Uma das principais famílias de proteínas envolvidas é a das Rho GTPases, responsáveis por regular a transdução de sinal. Essas proteínas podem estar ativas ou inativas, quando ligadas a GTP ou GDP, respectivamente. As três proteínas mais estudadas

dessa família são: (i) Rho, que controla a formação de fibras de estresse e os complexos de adesões; (ii) Rac e (iii) Cdc42, que regulam a polimerização de actina para formar lamelipódios e filopódios, respectivamente (Figura 1) (RAFTOPOULOU; HALL, 2004).

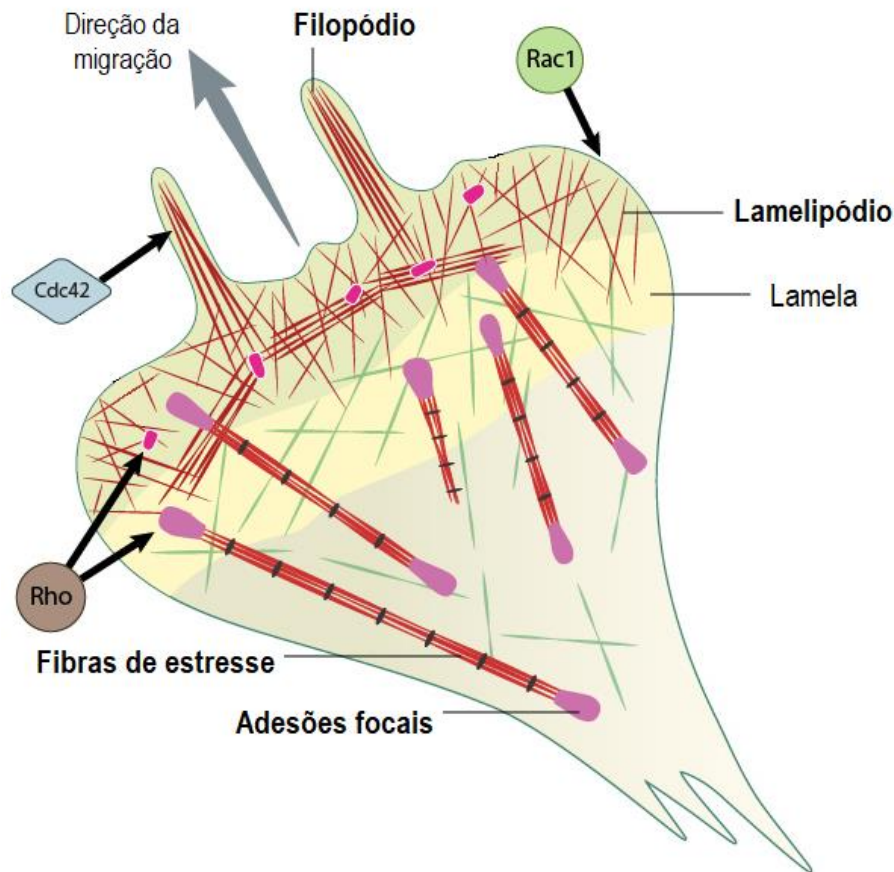


Figura 1. Esquema simplificado da atuação das Rho GTPases na migração celular. Cdc42 é necessária para estabelecer a polaridade e a formação de filopódios. Rac1 controla a polimerização de actina nos lamelipódios. Rho regula a montagem de adesões focais e a atividade contrátil da célula através das fibras de estresse. Imagem editada de Mechanobiology Institute, **MBINFO**.

1.5 Migração e invasão do glioblastoma

A migração e invasão das células de GBM é uma das principais causas da falha no tratamento e recorrência tumoral (DEMUTH; BERENS, 2004). Por invadir o tecido cerebral sadio, as células tumorais não são completamente retiradas na cirurgia de ressecção e podem sobreviver à quimioterapia e radioterapia, podendo formar novos focos tumorais.

As células de GBM se locomovem, basicamente, em dois compartimentos: o espaço perivascular e o parênquima cerebral (CUDDAPAH *et al.*, 2014). Elas utilizam os vasos sanguíneos ou axônios como “trilhos” para migrar, o que ocorre principalmente de modo individualizado, mas também pode acontecer de modo coletivo entre pequenos aglomerados de células.

No espaço intersticial do cérebro, a MEC é composta majoritariamente por proteoglicanas da família das lecticanas, ácido hialurônico e tenascinas. Sua organização ocorre pela ligação das proteoglicanas ao ácido hialurônico, enquanto as tenascinas se ligam às proteoglicanas e moléculas da superfície celular, criando uma matriz gelatinosa. As proteoglicanas mais abundantes no cérebro são agregam, versicam, neurocam, versicam e fosfocam (ZIMMERMANN; DOURS-ZIMMERMANN, 2008). Já nas regiões perivascularares, a MEC é composta principalmente por colágeno tipo IV, laminina, fibronectina e heparan sulfato. Essas moléculas se conectam a glicoproteínas e se ligam às integrinas presentes na superfície das células.

As células de GBM conseguem modificar a composição e dureza da MEC local. Já foi visto, por exemplo, que essas células produzem altas quantidades de tenascinas (sobretudo tenascina-C), que induzem a produção e liberação de metaloproteinases de matriz (MMPs), aumentam a angiogênese e possuem efeitos imunossupressores (MENTLEIN; HATTERMANN; HELD-FEINDT, 2012). A indução de proteases pode ainda liberar fatores de crescimento presentes na MEC, favorecendo a proliferação do GBM. Essa mudança na composição do microambiente pode aumentar a dureza da MEC em até 40 vezes, ativando processos mecanossensíveis, promovendo uma arquitetura mais retilínea dos componentes da MEC e favorecendo o aumento da migração e invasão tumoral (KHOONKARI *et al.*, 2022).

1.6 Prostaglandinas

Diversos fatores do ambiente em que a célula está inserida podem influenciar a migração celular, como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (DEVREOTES; HORWITZ, 2015). Outros mediadores que conseguem estimular ou reduzir a movimentação das células são as prostaglandinas (PGs).

As PGs são mediadores lipídicos bioativos que influenciam os processos de adesão, migração e invasão, tanto de células saudáveis, quanto de células tumorais

(MENTER; DUBOIS, 2012). A síntese de PGs se inicia com a liberação de ácido araquidônico (AA) a partir de fosfolipídios de membrana pela enzima fosfolipase A2 (PLA2) (Figura 2). Assim, o AA livre é convertido inicialmente em PGG₂ e posteriormente em PGH₂, pelas ciclo-oxigenases (COXs). PGH₂, por sua vez, serve como substrato para a síntese de um dos cinco prostanoides primários: prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), prostaglandina I₂ (PGI₂) ou tromboxano A₂ (TXA₂). Após a síntese, as PGs são exportadas para o meio extracelular por transportadores, como o transportador de prostaglandinas (PGT), e se ligam a receptores acoplados a proteína G, específicos aos seus ligantes (WANG *et al.*, 2022).

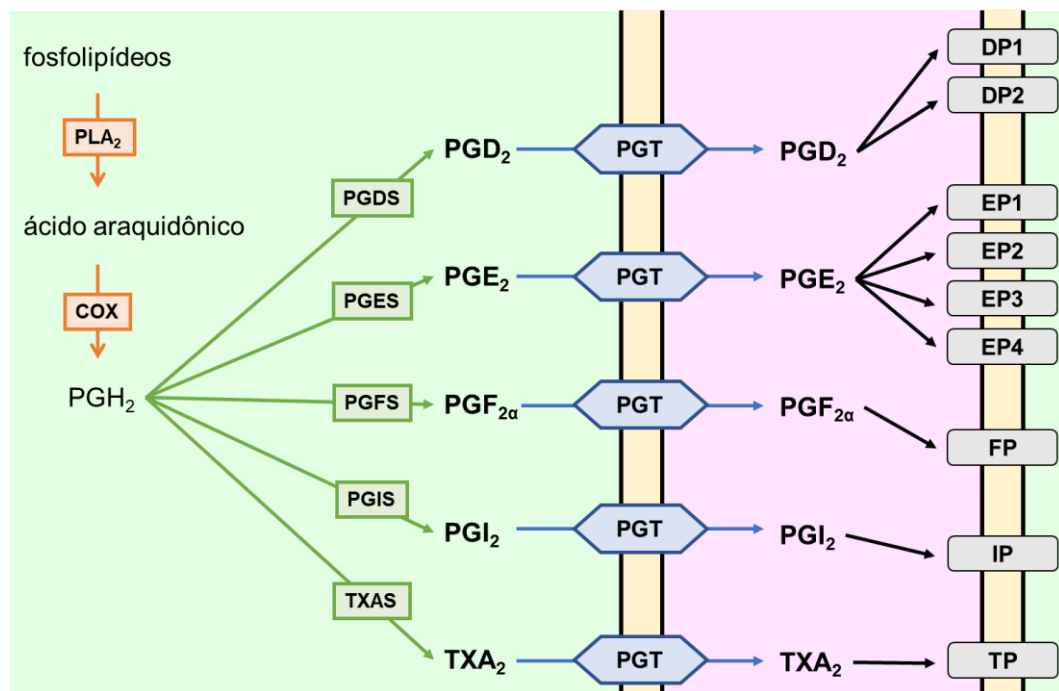


Figura 2. Esquema simplificado da síntese de prostaglandinas (PGs) e ligação aos seus receptores. A fosfolipase A2 (PLA2) libera o ácido araquidônico dos fosfolipídios de membrana. As enzimas ciclo-oxigenases (COXs) podem metabolizar o ácido araquidônico em PGH₂, que poderá ser convertida em PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ ou tromboxano A₂ (TXA₂). Esta etapa é feita por sintases específicas: PGDS, PGES, PGFS, PGIS e TBXAS, respectivamente. As PGs podem ser transportadas ao meio extracelular pelo transportador PGT. Fora das células, as PGs podem se ligar a receptores específicos presentes na própria membrana ou em células vizinhas. Baseado em (WANG *et al.*, 2022).

Diversos trabalhos já foram feitos mostrando que a inibição das COXs pode prevenir e auxiliar o tratamento de diferentes tipos de tumores (KHAN *et al.*, 2011). Entretanto, até o momento, os estudos clínicos mostraram efeitos adversos variados, sobretudo nos sistemas gastrointestinal e cardiovascular (WANG; DUBOIS, 2006).

Assim, mais estudos foram iniciados para tentar elucidar em maior detalhe a via das PGs e identificar possíveis alvos terapêuticos, com menor toxicidade aos pacientes.

Em GBM, assim como em outros tumores cerebrais, é comum encontrar níveis elevados de PGE₂ e PGF_{2α} (CASTELLI *et al.*, 1987; PANAGOPOULOS *et al.*, 2018). Os efeitos que esses prostanoídeos causam nas células de GBM ainda precisam ser melhor compreendidos. Até o momento, sabe-se que há aumento da proliferação e migração celular, com decréscimo da apoptose (GOMES; COLQUHOUN, 2012; GOMES; SOUZA; COLQUHOUN, 2018).

No caso dos efeitos na migração celular de GBM, ainda não se sabe em profundidade quais vias e proteínas estão envolvidas após a ligação de PGs aos seus receptores. Alguns estudos sugerem que o efeito no aumento da motilidade celular seja mediado por proteínas associadas ao citoesqueleto de actina, como é o caso da Fascina, proteína capaz de modificar as fibras e feixes de actina, facilitando a migração celular.

1.7 Fascina

Fascina é uma proteína pequena (cerca de 55 kDa), altamente conservada entre as espécies animais, que é responsável por conferir rigidez a filamentos de actina. Ela promove a migração celular através da sua interação com actina para a formação de filopódios e por outros mecanismos ainda pouco explorados. A isoforma 1 (fascina-1; FSCN1) é a mais ubíqua, sendo encontrada, por exemplo, em células do sistema nervoso e células endoteliais (MACHESKY; LI, 2010).

FSCN1 é uma proteína globular composta por quatro domínios beta-trefoil, organizados em dois lobos (LAMB; TOOTLE, 2020) (Figura 3). Cada lobo é capaz de se ligar a um filamento de actina e mutações em um dos sítios comprometem a ligação do outro sítio (YANG *et al.*, 2013). Ao se ligar aos filamentos de actina, FSCN1 confere rigidez ao sistema, criando feixes de actina e favorecendo a migração celular. Fascina também é essencial para a movimentação e deformação do núcleo durante a migração das células em espaços confinados (JAYO *et al.*, 2016). Além disso, FSCN1 também atua na renovação dos complexos de adesão focal e na dinâmica das fibras de estresse (ELKHATIB *et al.*, 2014).

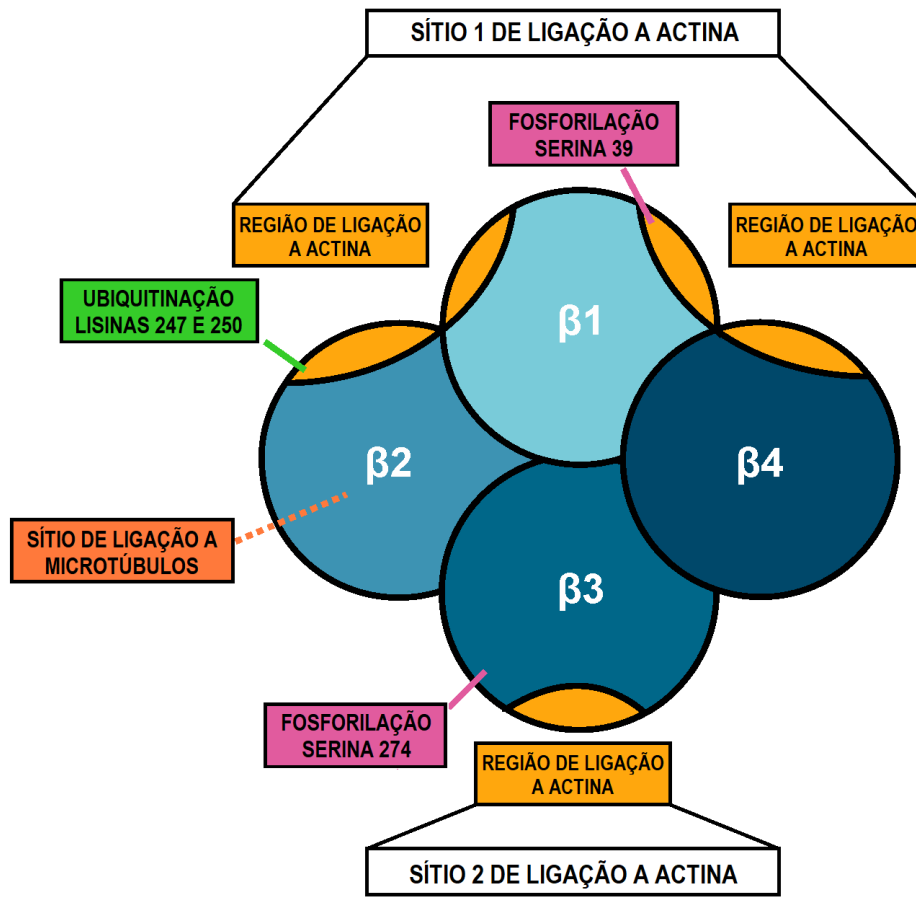


Figura 3. Esquema dos domínios e sítios de ligação de fascina. Os quatro domínios beta-trefoil estão coloridos em azul e as regiões de ligação a actina estão em amarelo. O sítio de interação com microtúbulos está em laranja. Os locais de mudanças pós-traducionais estão representados em roxo e verde, para fosforilação e ubiquitinação, respectivamente. Imagem editada de (LAMB; TOOTLE, 2020).

A regulação de FSCN1 é feita por mudanças pós-traducionais, interações com outras proteínas, pelo controle da transcrição e por algumas vias de sinalização. O mecanismo mais estudado e conhecido para a regulação de fascina é através da fosforilação do resíduo de serina 39 (S39). A proteína quinase C (PKC) é capaz de fosforilar o resíduo S39, inibindo a ligação de FSCN1 com actina e promovendo a ligação de FSCN1 a PKC (ANILKUMAR *et al.*, 2003). Além disso, a fosforilação de fascina é capaz de alterar a sua localização intracelular e mudar sua afinidade de ligação com outras proteínas, como os microtúbulos (LAMB; TOOTLE, 2020). FSCN1 fosforilada passa a ter uma localização mais próxima ao núcleo e/ou intranuclear e pode participar da maquinaria de transcrição gênica (SAAD *et al.*, 2016). A fosforilação do resíduo de serina 274 (S274) ainda precisa de maior elucidação, porém os estudos apontam que, quando S274 está fosforilada, fascina passa a ter maior afinidade para ligar a microtúbulos e perde a afinidade por actina no seu segundo sítio de ligação, no terceiro domínio beta-trefoil (VILLARI *et al.*, 2015).

Também foi visto *in vitro* que FSCN1 é capaz de ser regulada por ubiquitinação nos resíduos de lisina 247 (K247) e lisina 250 (K250) (LIN *et al.*, 2016). Essa modificação leva à perda de afinidade de FSCN1 pelos feixes de actina, favorecendo a sua desmontagem. Entretanto outros estudos são necessários para confirmar esse tipo de regulação de fascina.

Entre as vias de sinalização capazes de regular fascina, a via das PGs se destaca. As evidências mais sólidas foram obtidas em estudos com células de insetos. Utilizando a oogênese de *Drosophila* como modelo, foi visto que a falta da enzima análoga à COX impactou o processo de maturação dos oócitos, porém, ao superexpressar FSCN1, houve recuperação do fenótipo normal das células para continuar a oogênese (GROEN *et al.*, 2012). A falta de sinalização de PGs também reduz os níveis de FSCN1 na região perinuclear, alterando a arquitetura nuclear e prejudicando a oogênese (GROEN *et al.*, 2015). Por fim, um estudo feito com mariposas da espécie *Spodoptera exigua* sugere que a ação de PGE₂ em FSCN1 seja por meio de Cdc42 (AHMED; KIM, 2019).

Outro ponto de regulação de FSCN1 ocorre durante sua transcrição ou tradução, e a maioria dos trabalhos que investiga esse ponto é da área de oncologia. O interesse dos cientistas se deu após a observação de que a maioria dos tecidos epiteliais em adultos não expressam FSCN1, porém durante a carcinogênese se inicia sua expressão, resultando nos altos níveis de FSCN1 encontrados em carcinomas (HASHIMOTO; KIM; ADAMS, 2011). E essa expressão está correlacionada com maior agressividade dos tumores, piores taxas de sobrevividas e maior ocorrência de metástase (LIN *et al.*, 2021).

No caso do tecido cerebral, FSCN1 é detectada normalmente em neurônios, astrócitos e microglia, e a marcação imuno-histoquímica de FSCN1 parece estar associada com a agressividade de astrocitomas. Estudos avaliando a marcação de FSCN1 em GBM mostraram que os pacientes com marcação forte ou moderada para a proteína corresponderam aos que tiveram piores taxas de sobrevivida, sugerindo que FSCN1 é importante na agressividade do GBM e pode ser usada na predição de prognóstico de pacientes (GUNAL *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2016).

1.8 Justificativa

O tratamento do GBM continua sendo um desafio para o tratamento dos pacientes. As terapias atuais incluem cirurgia de ressecção, radioterapia e quimioterapia, entretanto essas abordagens são ineficientes. Novas terapias com alvo na migração celular do GBM poderiam corroborar com os tratamentos atuais. Assim, este projeto tem como objetivo principal estudar o papel da proteína ligante de actina Fascina-1 em células de GBM humano *in vitro*. Para isso, foi utilizada a droga Fascin-G2, que inibe a ligação de Fascina aos filamentos de actina e foram feitos ensaios de migração celular, viabilidade por Azul de Tripán e citometria de fluxo para avaliar o ciclo celular. Adicionalmente, também foi investigada a regulação de Fascina-1 pela via das prostaglandinas. Para isso, foi feita a análise de expressão gênica e proteica após os tratamentos com a adição exógena de PGE₂ e PGF_{2α}.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes e Drogas

Prostaglandina E₂ (PGE₂) e prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) foram adquiridas da Cayman Chemical (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI., EUA). O inibidor de Fascina, Fascin-G2 (FG2), foi produzido pela Xcessbio (Xcess Biosciences Inc, Chicago, IL., EUA). Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM); soro fetal bovino (SFB); solução de antibióticos (Penicilina e Estreptavidina); reagente TRIzol®; transcriptase reversa M-MLV; Planitium Taq DNA polimerase; Tris ultrapuro; SDS foram comprados da Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA., EUA). SYBR Green PCR *Master Mix* foi adquirido da Applied Biosystems® (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA., EUA). Anticorpo anti-fosfo-fascina-1 (nº cat. bs-0772R) foi produzido pela Bioss (Bioss Antibodies Inc., Woburn, MA., EUA). Anticorpo anti-fascina-1 (nº cat. 54545S) foi produzido pela Cell Signaling (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA., EUA). Anticorpos anti-coelho (nº cat. ab6802); e anti-camundongo (nº cat. ab6820) foram comprados da Abcam (Cambridge, MA., EUA). O inibidor de proteases (Halt Protease Inhibitor Cocktail) foi adquirido da Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA., EUA). O inibidor de fosfatases (PhosSTOP) foi adquirido da Roche (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basileia, Suíça). Triton X100 e Azul de Tripán foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (Merck KGaA Inc., St Louis, MO., EUA). Meio de montagem Entellan foi comprado da Merck (Merck KGaA Inc., St Louis, MO., EUA). Membranas de nitrocelulose foram adquiridas da GE Healthcare (General Electric Company, Chicago, IL., EUA). Iodeto de propídeo (PI) foi comprado da Molecular Probes (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA., EUA). Glicina; Metanol foram adquiridos da Synth (Labsynth, Diadema, SP, BRA). Clarity Western ECL Substrate foi comprado da Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

2.2 Cultura de células

Foram utilizadas duas linhagens celulares de glioblastoma humano para este estudo. As linhagens T98G e U87MG foram cordialmente cedidas pela Prof^a Dr^a Silvyia Stuchi Maria-Engler e pelo Prof Dr Carlos Frederico Martins Menck, respectivamente.

As células da linhagem T98G foram originadas a partir do tumor extraído de um paciente com 61 anos de idade (STEIN, 1979). Possuem formato poligonal, semelhante às células epiteliais, e crescem aderente ao substrato, formando pequenas ilhotas. As células T98G possuem mutação *missense* do gene supressor de tumor *TP53* (ATG>ATA), em que há substituição de aminoácido na posição 237 da proteína (Met>Ile), causando a perda de sua função anti-tumorigênica (PEDROTE *et al.*, 2020). Além disso, essas células expressam a versão mutada do gene *PTEN*, em que há mutação *missense*, responsável por troca de aminoácidos na posição 42 da proteína (Leu>Arg) (ISHII *et al.*, 1999; SCHMIDT *et al.*, 1999). Ademais, as células T98G não expressam o gene *CDKN2A* e não possuem capacidade tumorigênica, quando inoculadas em animais *nude*.

As células da linhagem U87MG foram originadas a partir do tumor extraído de uma paciente com 44 anos de idade (PONTÉN; MACINTYRE, 1968). Essas células são aderentes e apresentam a morfologia semelhante a fibroblasto e crescem de modo mais independente, sem formar ilhotas. As células U87MG possuem a versão selvagem do gene *TP53* (PEDROTE *et al.*, 2020). Porém, possuem mutação em *CDKN2A* e *PTEN* e são tumorigênicas em animais *nude* (ISHII *et al.*, 1999).

A Tabela 1 resume as características das células das duas linhagens.

As células T98G e U87MG foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos (50U/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina). Elas foram mantidas em uma estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Para o congelamento das células, foi utilizado DMEM com 20% de SFB e 10% de DMSO. O estoque de células congeladas foi mantido em nitrogênio líquido.

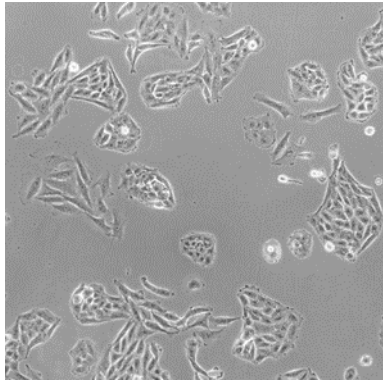
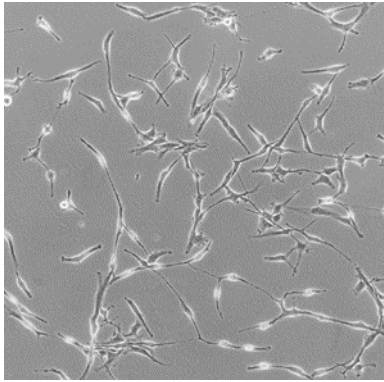
Características	T98G	U87MG
Células em baixa confluência		
Crescimento em cultura	Formação de ilhotas	Células independentes
Formato das células	Semelhante a células epiteliais	Semelhante a fibroblastos
Gene <i>TP53</i>	Mutação <i>missense</i> (R273I)	Selvagem
Gene <i>PTEN</i>	Mutação <i>missense</i> (L42R)	Deleção do exon 3
Gene <i>CDKN2A</i>	Deleção	Deleção
Tumorigenicidade	Incapaz de formar tumores	Capaz de formar tumores

Tabela 1. Características das linhagens celulares T98G e U87MG.

2.3 Tratamento das células

Para iniciar todos os experimentos, foram utilizadas somente células que estavam na fase exponencial de crescimento. Os tratamentos duraram 12 horas para os experimentos de migração celular e 24 horas para os demais ensaios. As análises de qPCR foram feitas nos dois pontos, 12 e 24 horas.

O inibidor Fascin-G2 (FG2) foi diluído em DMSO, seguindo a recomendação do fabricante. Inicialmente o tratamento foi realizado com 125 μM para o ensaio de migração celular. Posteriormente, foram testadas diferentes concentrações da droga nos ensaios com Azul de Tripán e citometria de fluxo, variando de 75 μM até 5 μM .

As prostaglandinas E_2 (PGE_2) e $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) foram diluídas em etanol absoluto. Ambas foram utilizadas na concentração de 5 μM , de acordo com estudos prévios do laboratório (GOMES; COLQUHOUN, 2012).

2.4 qPCR

As células T98G e U87MG foram tratadas por 12 e 24 horas com 5 μ M de E₂ PGE₂ e PGF_{2 α} em placas de 6 poços. Após o término do tratamento, as células foram coletadas e lavadas com uma solução salina tamponada com fosfato (PBS; 1x; pH = 7,4). Então, as células foram centrifugadas e os *pellets* foram ressuspensos com 1 ml do reagente TRIzol[®] e armazenados a -20°C.

2.4.1 Extração de RNA total

A extração do RNA total foi feita de acordo com o protocolo recomendado para o reagente TRIzol[®], com pequenas alterações. As amostras foram deixadas no gelo para descongelar e fez-se a homogeneização com uma pipeta. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Foi adicionado 200 μ l de clorofórmio e agitou-se os tubos por inversão. As amostras foram deixadas novamente em temperatura ambiente por mais 15 minutos. Em seguida, ocorreu a etapa de centrifugação a 10.600 rcf por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para novos tubos, onde se adicionou 500 μ l de isopropanol. Os tubos foram agitados por inversão e deixados em temperatura ambiente. Após 10 minutos, fez-se uma nova centrifugação a 10.600 rcf por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e foi adicionado 1 ml de etanol 95% gelado. Então, ocorreu outra centrifugação a 6.000 rcf por 10 minutos a 4°C. Novamente os sobrenadantes foram descartados para outra adição de 1 ml de etanol 95%, seguida de outra centrifugação (6.000 rcf por 10 minutos a 4°C). Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* de RNA foram deixados na bancada para secar. Por fim, foi usada água livre de RNase (tratada com DEPC e autoclavada) para ressuspender os *pellets* de RNA (30 – 50 μ l). Os tubos foram armazenados no freezer -20°C.

A quantidade e a pureza dos RNAs das amostras foram medidas utilizando o espectrofotômetro Epoch Microplate (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT., EUA). Os RNAs cuja razão A260/A280 estava entre a faixa de 1,8 e 2,1 foram selecionados para seguir com a etapa de síntese de cDNA.

2.4.2 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi feita usando a enzima M-MLV RT, de acordo com o protocolo da fabricante e utilizando 2 µg de RNA. Em tubos limpos, foram misturados RNA, água ultrapura autoclavada, 2 µl de *Random Primer* e 2 µl de uma mistura de dNTPs (10 mM). Esses tubos foram incubados a 65°C por 2 minutos no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Em seguida, os tubos foram colocados no gelo e adicionou-se 4 µl de *RT Buffer 5x*, 2 µl de DTT (100 nM) e 1 µl de inibidor de ribonuclease (20 U/µl). Fez-se uma nova incubação no termociclador a 37°C por 2 minutos. Então, as amostras voltaram para o gelo e foi adicionado 1 µl da enzima M-MLV RT em cada tubo. Por fim, os tubos foram colocados no termociclador para uma incubação de 25°C por 10 minutos, 37°C por 50 minutos e 70°C por 10 minutos. As amostras foram armazenadas no freezer -20°C para a realização posterior dos experimentos.

Foi feita eletroforese em gel de agarose (1%) para a visualização da integridade e análise qualitativa dos cDNAs das amostras. O equipamento G:Box (Syngene, Frederick, MD., EUA) foi usado para a captura de imagens.

2.4.3 PCR quantitativo (qPCR)

Foi utilizado o kit SYBR Green PCR Master Mix para as reações, seguindo as recomendações do fabricante. Em cada poço de uma placa óptica foram colocados 25 ng dos cDNAs, *primers* específicos e SYBR Green PCR Master Mix. Após a mistura dos reagentes, a placa foi centrifugada a 6.000 rcf por 5 minutos em temperatura ambiente. O equipamento 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc.), foi utilizado para a leitura e quantificação das amostras.

Antes de serem utilizados nessa etapa, os *primers* passaram por um processo de padronização e validação, que está descrito em mais detalhes no item 2.4.4.

2.4.4 Padronização dos primers

A sequência dos *primers* para *FSCN1* foi selecionada do artigo publicado por Hoa e colaboradores em 2015 (HOA *et al.*, 2015). E os *primers* para o gene da proteína de ligação ao TATA-box (*TBP*) foram desenhados usando o *software* *PerlPrimer* (MARSHALL, 2004). A Tabela 2 reúne a sequência dos *primers*.

Genes	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
<i>FSCN1</i>	ACGGCAACGTGACCTGCGAG	GACTGCAGCGACCAGCGACC
<i>TBP</i>	GAGCTGTGATGTGAAGTTTCC	TCTGGGTTTGATCATTCTGTAG

Tabela 2. Sequência dos *primers* usados neste estudo.

Foi utilizada a ferramenta virtual de alinhamento local BLAST (disponível em <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>) para determinar a especificidade e a probabilidade de formação de dímeros. A empresa ThermoFisher Scientific sintetizou todos os *primers*.

Para a determinação da melhor temperatura de anelamento, foi feita uma reação de PCR convencional para cada par de *primers*, de acordo com as recomendações para a enzima Platinum Taq DNA polimerase. Foram testadas cinco temperaturas diferentes: 54,2°C; 56,5°C; 59,1°C; 61,8°C; 64,5°C. Para cada reação, fez-se uma mistura de 34,5 µl de água ultrapura autoclavada, 5 µl de PCR Buffer 10x, 1 µl de uma mistura de dNTPs (10 mM), 1,5 µl de cloreto de magnésio (0,1 M), 1,5 µl de cDNA, 6 µl de cada par de *primers* de interesse e 0,5 µl da enzima Platinum Taq DNA polimerase. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizados no equipamento G:Box.

A fim de padronizar a melhor concentração de *primers* para a reação de PCR quantitativo, foram testadas as concentrações de 200 nM, 400 nM e 800 nM para cada par de *primers* em reações de PCR quantitativo. Assim, fez-se uma mistura dos *primers* de cada gene de interesse, 25 ng de cDNA e SYBR Green Master Mix. As amplificações foram realizadas no aparelho ABI Prism 7300 (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc.). O controle negativo da reação foi feito substituindo o cDNA por água ultrapura autoclavada.

Com o intuito de determinar a eficiência de cada par de *primer* na reação de PCR em tempo real, foi feita uma diluição seriada (1:2) do cDNA, começando com

50 ng de cDNA. Para cada reação de PCR em tempo real, fez-se uma mistura do cDNA com o par de *primers* na concentração determinada previamente e SYBR Green Master Mix. Foi utilizado o aparelho ABI Prism 7300 (Applied Biosystems) para realizar e monitorar a amplificação. O controle negativo foi feito com a substituição de água ultrapura autoclavada, ao invés de cDNA.

Para o cálculo da eficiência, a quantidade de cDNA foi convertida em escala logarítmica e os valores médios dos *cycle thresholds* (Cts) foram determinados. Assim, foi possível construir um gráfico com os dois parâmetros (quantidade de cDNA x Cts). A partir da equação da reta, foi possível determinar o coeficiente angular (*slope*) e a eficiência, de acordo com a Equação 1. Então, foi feita a conversão dos valores de eficiência para porcentagem, de acordo com a Equação 2. Foram aceitos os *primers* com eficiência entre 80% e 110%.

A Tabela 3 resume os resultados obtidos nesta etapa de padronização.

$$\text{Equação 1: } \textit{Eficiência} = 10^{-1/\textit{slope}}$$

$$\text{Equação 2: } \textit{Eficiência em porcentagem} = (\textit{Eficiência} - 1) \times 100$$

Genes	Temperatura de Anelamento	Concentração	Eficiência
<i>FSCN1</i>	61,8°C	400 nM	94,2 %
<i>TBP</i>	61,8°C	400 nM	104,9 %

Tabela 3. Características dos *primers* usados neste estudo.

2.4.5 Análise da expressão gênica relativa

O método de Pfaffl foi usado para determinar a expressão gênica relativa das amostras (PFAFFL, 2001). Nesse método matemático, é levado em consideração a eficiência dos *primers* utilizados e os valores de Ct dos genes endógeno e alvo nas condições experimentais (onde houve tratamento) e controle, de acordo com as Equações 3-5.

$$\text{Equação 3: } \Delta Ct(\textit{referência}) = Ct(\textit{controle}) - Ct(\textit{experimental})$$

Equação 4: $\Delta Ct(alvo) = Ct(controle) - Ct(experimental)$

Equação 5: $Expressão\ relativa = \frac{Eficiência(alvo)^{\Delta Ct(alvo)}}{Eficiência(referência)^{\Delta Ct(referência)}}$

Na Equação 3, é feita a subtração entre os Cts nas condições controle e experimental do gene de referência (*TBP*). Essa mesma operação é realizada para o gene alvo de estudo (*FSCN1*) (Equação 4). Em seguida, é feito o cálculo para a expressão relativa (Equação 5). Para isso, os valores da eficiência de amplificação dos *primers* para os genes alvo e de referência são considerados. Então é feita a divisão entre os valores de eficiência elevados a $\Delta Ct(alvo)$ ou a $\Delta Ct(referência)$.

2.5 Western Blot

As células foram tratadas com PGE₂ e PGF_{2α} por 24 horas. Os *pellets* foram coletados para a extração de proteínas. A lise das células foi feita utilizando uma solução com 1% de Triton X-100, 1 M de EDTA e inibidores de proteases e fosfatases. A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Lowry, usando a albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão (LOWRY *et al.*, 1951). As proteínas (30 µg) de cada amostra foram misturadas ao tampão Laemmli (62,5 mM de Tris; 69,3 mM de SDS; 14,9 µM de Azul de Bromofenol; 20% (v/v) de glicerol; 5% (v/v) de β-mercaptoetanol). Em seguida, as amostras foram colocadas em banho-maria (100°C) por 5 minutos e os tubos foram armazenados no freezer (-20°C) até a próxima etapa.

Assim, os extratos de proteínas foram submetidos a SDS-PAGE (eletroforese em gel de poli-acrilamida com dodecil-sulfato de sódio). Foram utilizados géis de empilhamento (4% de acrilamida; pH = 6,8) e géis de corrida (10% de acrilamida; pH = 8,8). A duração total da eletroforese foi de 2 horas, sob uma voltagem de 100 V. Foi utilizado o sistema Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad) e o tampão de corrida era composto por 25 mM de Tris, 192 mM de Glicina e 3,5 mM de SDS diluídos em água ultrapura, com pH igual a 8,3.

Após a conclusão da corrida, seguiu-se com a etapa de transferência. As proteínas do gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose por 1,5 hora a 100 V. O sistema Mini Trans-Blot® Cell foi novamente usado e, dessa vez, com um

tampão de transferência. Sua composição era de 25 mM de Tris, 190 mM de Glicina e 20% (v/v) de metanol diluídos em água ultrapura, com pH igual a 8,3.

Após a conclusão dessa etapa, as membranas foram incubadas com uma solução de Ponceau S (0,1% (m/v) de corante Ponceau S, diluído em uma solução aquosa com 5% (v/v) de ácido acético glacial) por cerca de 10 minutos, para a avaliação qualitativa da transferência. O equipamento G:Box (Syngene) foi utilizado para fotografar as membranas coradas.

Então, as membranas foram lavadas com uma solução salina tamponada com Tris (TBS; 1x; pH = 7,6) e incubadas com uma solução de BSA (5%) por 2 horas para o bloqueio. Em seguida foi feita a incubação com anticorpos anti-pFSCN1 (diluição 1:1000) ou anti-FSCN1 (diluição 1:2000) por 2 horas. Por fim, foi feita a marcação com anticorpos secundários (diluição 1:2000) por 1 hora. A detecção foi feita a partir de uma solução quimioluminescente (ECL) e as imagens foram adquiridas pelo G:Box (Syngene).

Após cada marcação para as proteínas de interesse, foi feito o *stripping* para a retirada dos complexos de anticorpos. Nesse processo, as membranas foram incubadas duas vezes com uma solução ácida de glicina (0,2 M de glicina; 3,5 mM de SDS; 0,01% de Tween[®] 20; preparada em água ultrapura). Em seguida, foram lavadas duas vezes com PBS (pH = 7,4) e, novamente, com TBS-T (solução de TBS com adição de Tween[®] 20). Para confirmar que os complexos de anticorpos foram completamente removidos, as membranas foram incubadas com ECL e visualizadas no G:Box (Syngene). Então, seguiu-se com as etapas de bloqueio e nova marcação. O *stripping* foi feito duas vezes em cada membrana, como descrito anteriormente.

A análise das imagens e quantificação das bandas foram feitas pelo software ImageJ. A marcação com beta-actina e a imagem das membranas coradas com Ponceau S foram usadas para a normalização dos valores e cálculo da expressão relativa das proteínas.

2.6 Ensaio de Fechamento de Ferida

Foram plaqueadas 3×10^5 células da linhagem T98G em placas de 24 poços. Elas foram mantidas na estufa para a adesão. Após 12 horas, foi feita uma ferida com uma ponteira de plástico, este foi considerado o tempo zero e início do experimento.

Cada poço foi lavado com PBS (pH = 7,4), para a retirada de células desaderidas. Então, foi adicionado meio com tratamento, os poços foram fotografados e a placa retornou à estufa. Após mais 12 horas, novas fotos foram tiradas.

Assim, cada poço foi fotografado duas vezes, no início e ao final do experimento. As fotos foram analisadas no software ImageJ, para o cálculo da área da ferida no tempo zero e após 12 horas de migração. Esses valores foram, então, transformados em porcentagem. Em cada caso, a área inicial foi considerada 100% e utilizada para calcular a porcentagem relativa da área final.

2.7 Ensaio com Transwell

A capacidade de migração das células U87MG foi avaliada por meio da utilização de insertos Transwell, com poros de 8 μm , e placas de 24 poços da Costar (Corning Inc., Corning NY, EUA).

Inicialmente, foram colocadas 2×10^3 células na parte superior do inserto. O meio de cultura foi adicionado na parte superior (300 μl) e no fundo do poço (700 μl). Após 12 horas, o meio foi substituído para o início do tratamento FG2 e a placa retornou para a estufa.

O tratamento teve duração de 12 horas. Após o seu término, os insertos foram lavados duas vezes, através da imersão em PBS (pH = 7,4), e em seguida fez-se a fixação com cristal violeta (0,05%, em etanol 70%) por 20 minutos. Por fim, as membranas foram lavadas por imersão em água para a remoção do excesso de corante e as células da parte superior dos insertos foram retiradas com uma haste de algodão. Depois de secas, as membranas foram cuidadosamente separadas dos insertos com um bisturi cirúrgico. Elas foram posicionadas em uma lâmina e cobertas por meio de montagem Entellan. Uma lamínula de vidro foi colocada em cima e bolhas de ar foram retiradas.

Então, as lâminas prontas foram visualizadas utilizando o microscópio Nikon Optiphot 2 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EUA). Dez campos aleatórios foram fotografados de cada membrana. As imagens foram analisadas para a contagem das células que passaram pelos poros da membrana. Por fim, os dados foram compilados para calcular o número médio de células por campo de cada condição experimental.

2.8 Ensaio de contagem de células com Azul de Tripán

As células foram plaqueadas em placas de 12 poços (6×10^4 células/poço) e deixadas na estufa por 12 horas. Após esse período, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com PBS (pH = 7,4). Então, foi adicionado meio contendo diferentes concentrações de FG2 (75, 50, 25, 10 e 5 μ M) ou o controle com DMSO. Após 12 horas de tratamento, as células foram fotografadas e, posteriormente, coletadas junto com os sobrenadantes. Foi feita uma centrifugação (200 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente) e os *pellets* foram ressuspensos em PBS. Após a homogeneização, uma alíquota de células foi transferida para um tubo limpo e foi adicionado o corante Azul de Tripán (0,4% (m/v) em PBS) (Sigma-Aldrich®, Merck Inc.). Assim, foi feita a contagem diferencial das células em uma câmara de Neubauer.

2.9 Citometria de Fluxo

As células foram preparadas da mesma forma que está descrito no item 2.8. O plaqueamento foi feito com a mesma quantidade de células iniciais, em placas de 12 poços e deixadas na estufa por 12 horas. O tratamento com as mesmas concentrações de FG2 foi iniciado e durou 12 horas também. Os sobrenadantes e as células foram coletados e centrifugados. Os *pellets* foram lavados com PBS (pH = 7,4) e, em seguida, ressuspensos em etanol (70% (v/v), diluído em água ultrapura) gelado para a fixação. Os tubos foram mantidos a 4°C até a marcação com iodeto de propídio (PI). Um dia antes da leitura, as amostras foram incubadas com PBS gelado por 10 minutos, para a reidratação. Em seguida, foi feita a incubação com uma solução de PI (2% de PI; 1% de RNase; 0,1% de Triton X100; preparada em PBS) por 30 minutos, no escuro, a temperatura ambiente. As amostras foram lavadas, ressuspensas em PBS e mantidas a 4°C, no escuro, durante a noite. Por fim, a leitura foi feita pelo citômetro de fluxo Guava EasyCyte Plus (Guava Technologies, Merck KGaA Inc.). 5.000 eventos foram adquiridos de cada amostra.

2.10 Análise de dados do estudo REMBRANDT

Durante 2004 e 2006, o estudo REMBRANDT coletou amostras de 671 pacientes para fazer algumas análises comparativas e os dados brutos e/ou pré-processados podem ser obtidos através de algumas plataformas (GUSEV *et al.*, 2018). Os dados foram acessados, obtidos e analisados por duas plataformas diferentes. A primeira foi o repositório *Gene Expression Omnibus* (GEO) (EDGAR; DOMRACHEV; LASH, 2002). A segunda foi o portal online GlioVis (BOWMAN *et al.*, 2017).

Através do número de acesso GSE108476 no portal GEO, os dados de expressão gênica (por *microarray*) foram comparados para a construção do Volcano Plot, utilizando 28 amostras não tumorais e 219 amostras de GBM. No total, foram analisados 17.716 genes codificadores de proteínas. Regiões intrônicas e RNAs regulatórios foram filtrados e não foram incluídos nas análises. Os genes diferencialmente expressos foram posteriormente submetidos a uma análise de enriquecimento.

No portal GlioVis, somente os dados referentes a amostras de GBM e tecido não-tumoral foram selecionados de pacientes adultos. A diferenciação dos tecidos foi feita por análise histológica. Assim, foi obtida a expressão comparativa de *FSCN1* nos dois grupos de amostras. Para a análise de sobrevivência, foi selecionado o método de Kaplan-Meier e a comparação foi entre amostras de GBM subdivididas em dois grupos, 25% das que mais expressam *FSCN1* e 25% das que menos expressam *FSCN1*.

2.11 Análise por espectrometria de massas

As células foram tratadas com PGE₂ ou PGF_{2 α} por 24 horas e os *pellets* foram coletados. As amostras tratadas e controles foram encaminhadas para a *facility* Biomass (CEFAP-USP) para as etapas seguintes.

Os *pellets* foram lisados utilizando um tampão de ureia (8M) com inibidores de protease. Em seguida, as amostras foram sonicadas e os lisados foram centrifugados a 10.600 rcf por 15 minutos a 4°C. O ácido tricloroacético e a acetona foram utilizados para precipitar as proteínas e remover impurezas. A quantificação das proteínas foi

realizada por fluorômetro Qubit (Thermo Fisher Scientific). 75 µg de proteínas foram digeridas com tripsina por 16 horas a 37°C (a reação foi parada com ácido fórmico).

Então as amostras foram purificadas utilizando colunas C18 hidrofóbicas (Thermo Fisher Scientific). Os peptídeos foram eluídos com um tampão de acetonitrila (70%) e ácido fórmico (0,1%). O concentrador de vácuo SpeedVac (Thermo Fisher Scientific) foi usado para secar as amostras. O equipamento Easy nLC conectado a LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific) foi usado para a injeção de peptídeos e análise de espectrometria de massa. O software MaxQuant foi usado para identificação de proteínas e quantificação *label-free*. O software Perseus foi usado para a pós-análise. As proteínas diferencialmente expressas e com diferença estatisticamente significativa foram posteriormente submetidas à análise de enriquecimento.

2.12 Análise de Enriquecimento

O Banco de Dados para Anotação, Visualização e Descoberta Integrada (DAVID; versão 6.8) é um conjunto online de ferramentas que permite a análise e anotação funcional de uma grande lista de genes (HUANG; SHERMAN; LEMPICKI, 2009; SHERMAN *et al.*, 2022). A lista de genes e proteínas diferencialmente expressos foram submetidas para uma análise de enriquecimento.

Previamente à essa análise, a lista de genes foi filtrada. Foram selecionados somente os genes com o valor de $p < 0,01$. A classificação de genes diferencialmente expressos (DEGs) se baseou no grau de mudança (*fold change*; FC) da expressão gênica. Foram selecionados DEGs com $FC \leq -2,0$ ou $FC \geq 2,0$, representando DEGs cuja expressão nas amostras de GBM era, no mínimo, metade ou o dobro, respectivamente. Para a lista de proteínas diferencialmente expressas (DEPs), foram selecionadas somente as DEPs com o valor de $p < 0,05$ e os mesmos parâmetros de FC.

A análise de enriquecimento foi feita para identificar termos GO (*Gene Ontology*) relacionados a processos biológicos (BPs), componentes celulares (CCs) e funções moleculares (MFs) e termos relacionados a vias da Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto (KEGG *pathway*). Foram selecionados somente os termos com o valor de $p < 0,05$ e grau de enriquecimento (*fold enrichment*) superior a 1,5.

2.13 Análise Estatística

Os resultados dos experimentos de qPCR e *Western Blot* foram avaliados por teste t de amostra única. Os dados do ensaio de Transwell foram analisados por teste t de Student com correção de Welch. O ensaio de fechamento de ferida e citometria de fluxo foram avaliados por ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. E os resultados do ensaio com Azul de Tripán foram analisados com ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett.

Os gráficos resultantes dos experimentos *in vitro* representam a média de valores e o erro padrão médio de, no mínimo, três experimentos independentes. O programa GraphPad Prism (versão 8.0.1) foi usado para as análises estatísticas. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de diferenças estatisticamente significantes e os valores de $p < 0,1$, como sugestivos de tendências.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise *in silico* dos dados do projeto REMBRANDT

3.1.1 Pré-processamento

A transformação de astrócitos saudáveis para o glioblastoma (GBM) é um processo complexo, que envolve a desregulação de diversos genes e proteínas que promovem a carcinogênese. O melhor entendimento desse processo pode contribuir para a melhor caracterização do tumor, a descoberta de novos alvos terapêuticos e/ou novos preditores de prognóstico aos pacientes. Nesse contexto, os projetos REMBRANDT e Atlas do Genoma do Câncer (TCGA) são fundamentais, pois disponibilizaram publicamente seus dados de análise de expressão gênica em larga escala e integraram informações clínicas dos pacientes com GBM (GUSEV *et al.*, 2018).

Por meio do repositório *Gene Expression Omnibus* (GEO), foi comparada a expressão gênica de 218 amostras de pacientes com glioblastoma (GBM) e 28 amostras de tecido cerebral não-tumoral (determinado por histologia). Foram analisados 17.715 genes (Figura 4).

Genes com o valor de p ajustado menor do que 0,01 foram classificados de acordo com o grau de mudança de expressão (*fold change*; FC). Genes diferencialmente expressos (DEGs) com expressão elevada e reduzida foram considerados quando FC era maior que 2,0 ou menor que -2,0, respectivamente. Assim, foram obtidos 1.916 DEGs superexpressos e 2.203 DEGs subexpressos, para as análises posteriores.

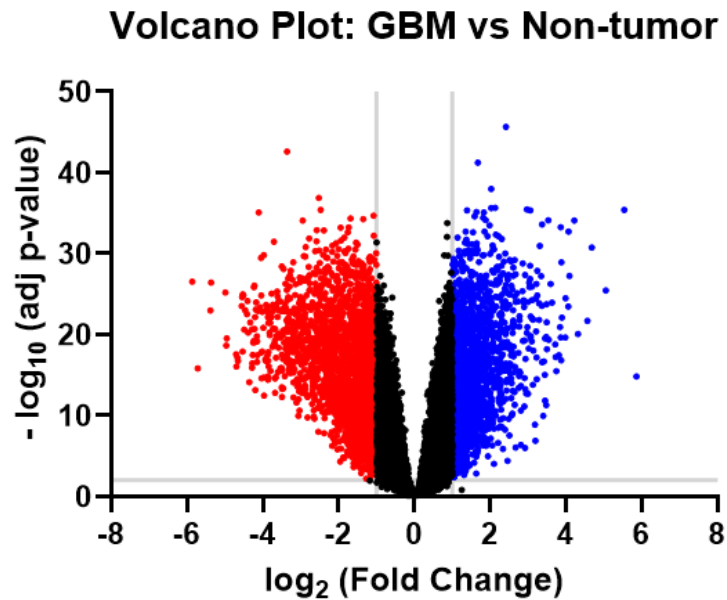


Figura 4. Volcano plot da expressão gênica comparando amostras de glioblastoma (GBM) e tecido cerebral não tumoral. Os dados foram obtidos a partir do repositório *Gene Expression Omnibus* (GEO). A expressão dos genes foi classificada de acordo com o valor de p ajustado e o grau de mudança na expressão (*fold change*). Genes superexpressos e subexpressos estão representados em azul e vermelho, respectivamente.

3.1.2 Análise de Enriquecimento

Os DEGs obtidos anteriormente foram submetidos a uma análise de enriquecimento utilizando o Banco de Dados para Anotação, Visualização e Descoberta Integrada (DAVID). Foram avaliados os termos de ontologia genética (GO) e vias da Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto (KEGG *pathways*) (Figuras 5-8).

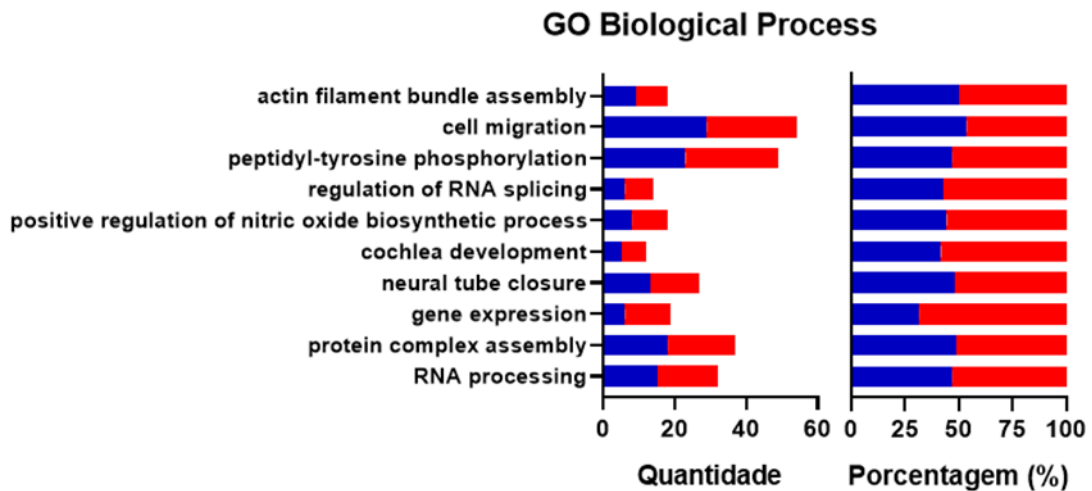


Figura 5. Termos enriquecidos de ontologia genética (GO) relacionados a Processos Biológicos. Os genes diferencialmente expressos (DEGs) foram avaliados pela ferramenta DAVID para uma análise de enriquecimento. Os 10 termos GO com os menores valores de p foram selecionados para esta figura. A quantidade de DEGs e a porcentagem dos superexpressos (em azul) e dos subexpressos (em vermelho) está representada para cada termo GO.

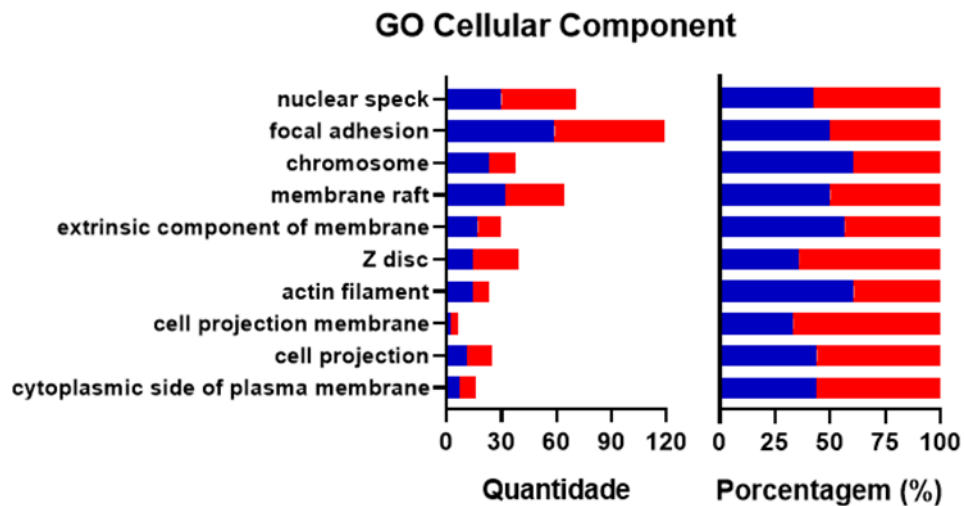


Figura 6. Termos enriquecidos de ontologia genética (GO) relacionados a Componentes Celulares. Os genes diferencialmente expressos (DEGs) foram avaliados pela ferramenta DAVID para uma análise de enriquecimento. Os 10 termos GO com os menores valores de p foram selecionados para esta figura. A quantidade de DEGs e a porcentagem dos superexpressos (em azul) e dos subexpressos (em vermelho) está representada para cada termo GO.

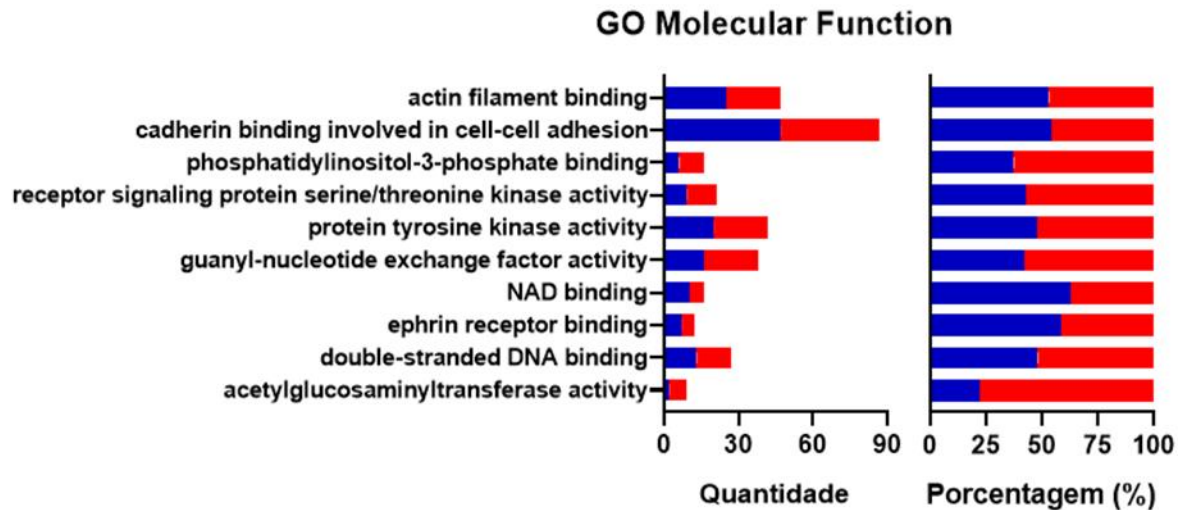


Figura 7. Termos enriquecidos de ontologia genética (GO) relacionados a Funções Moleculares. Os genes diferencialmente expressos (DEGs) foram avaliados pela ferramenta DAVID para uma análise de enriquecimento. Os 10 termos GO com os menores valores de p foram selecionados para esta figura. A quantidade de DEGs e a porcentagem dos superexpressos (em azul) e dos subexpressos (em vermelho) está representada para cada termo GO.

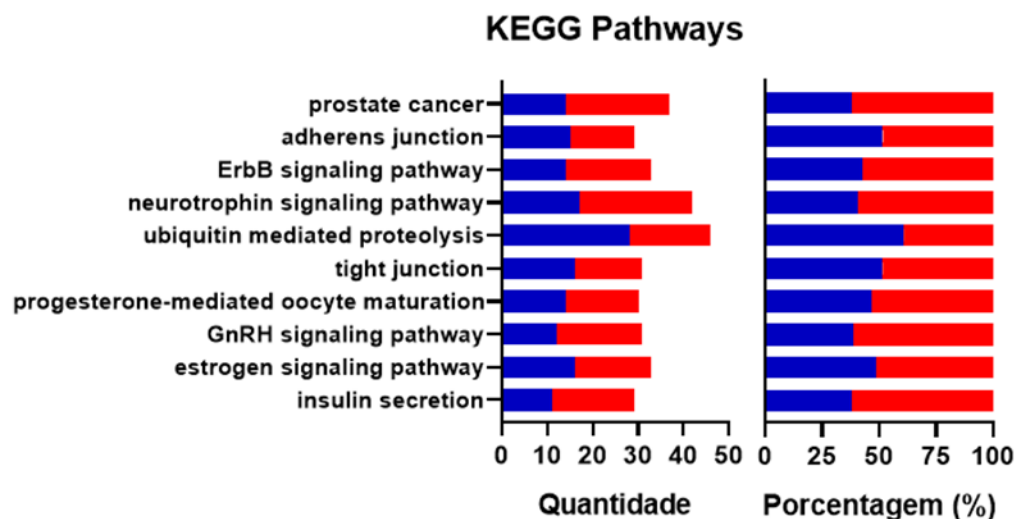


Figura 8. Termos enriquecidos relacionados a Vias da KEGG. Os genes diferencialmente expressos (DEGs) foram avaliados pela ferramenta DAVID para uma análise de enriquecimento. Os 10 termos GO com os menores valores de p foram selecionados para esta figura. A quantidade de DEGs e a porcentagem dos superexpressos (em azul) e dos subexpressos (em vermelho) está representada para cada termo GO.

Analisando os termos GO relacionados a Processos Biológicos (Figura 5), observa-se que os dois primeiros termos estão relacionados à movimentação da célula (montagem de feixes de filamentos de actina e migração celular). Também se nota termos referentes à transcrição de genes (*splicing* de RNA, processamento de

RNA e expressão gênica) e modificações em proteínas (fosforilação e montagem de complexos proteicos). Além disso, vê-se termos associados a eventos embrionários (desenvolvimento da cóclea e fechamento do tubo neural).

Quanto aos termos GO relativos à localização celular (Figura 6), observa-se termos associados à membrana celular (adesão focal, projeção celular, *raft* de membrana e membrana plasmática). Há também termos relacionados ao citoesqueleto (filamentos de actina e disco Z) e ao núcleo (cromossomo e *speckle*).

Pode-se notar que a maioria dos termos GO referentes à função molecular (Figura 7) estão relacionados principalmente a processos metabólicos e vias de sinalização (ligação de fosfatidilinositol-3-fosfato, atividade de receptores serina-treonina quinases, atividade de tirosina quinase, ligação a NAD). Além disso, os termos com menores valores de p estão relacionados ao citoesqueleto e à adesão célula-célula (ligação a filamento de actina e ligação à caderina).

Por fim, observando as vias KEGG (Figura 8), nota-se enriquecimento de termos associados a junções celulares (junções aderentes e de oclusão) e ao câncer de próstata. Entretanto, a maioria das vias está relacionada à sinalização por hormônios (maturação de oócitos mediada por progesterona, hormônio liberador de gonadotrofina, estrogênio e insulina).

Estes resultados estão de acordo com dados anteriores da literatura, nos quais o uso de bases de dados diferentes levou à identificação de DEGs superexpressos e subexpressos com padrões similares (TANG *et al.*, 2018; YANG; GAO; LI, 2019). Um trabalho de 2018 utilizou os dados do TCGA e verificou que os genes mais expressos na comparação entre GBM e tecido não-tumoral estavam relacionados à migração celular, ao controle do ciclo celular e à resposta imune (TANG *et al.*, 2018). Outro trabalho utilizou uma base de dados do Hospital Henry Ford, em que as amostras de GBM foram comparadas com amostras de pacientes com epilepsia, e viu que os genes superexpressos estão relacionados com ciclo celular, controle da proliferação celular e adesão focal (YANG; GAO; LI, 2019).

De fato, o GBM é um tipo tumoral altamente infiltrativo, cujas células possuem alta capacidade migratória e invasiva. Esta característica das células de GBM é um dos fatores relevantes na falha dos tratamentos atuais (DEMUTH; BERENS, 2004). Isso torna necessário a identificação de novas abordagens e novos alvos terapêuticos que possam comprometer a capacidade invasiva do GBM, para somar aos tratamentos atuais (LIU *et al.*, 2018).

3.1.3 Análise de expressão gênica de *FSCN1* e análise de sobrevida

Ao analisar os DEGs das amostras de GBM, o gene que codifica a proteína Fascina-1 (*FSCN1*) se destaca. *FSCN1* é uma proteína ligante de actina, importante para a formação de filopódios e para a migração das células. Sua relevância ganhou notoriedade em estudos oncológicos, já que os tecidos epiteliais adultos não expressam *FSCN1*, entretanto, em carcinomas sua expressão está diretamente relacionada com a agressividade dos tumores (HASHIMOTO; KIM; ADAMS, 2011; LIN *et al.*, 2021).

Através da plataforma GlioVis, foi investigada em maior detalhe a expressão de *FSCN1* em amostras de tecidos não-tumorais e de GBM (Figura 9). É possível observar que as amostras tumorais possuem alta variabilidade dos níveis de mRNA de Fascina-1. Apesar disso, a expressão média de *FSCN1* é maior em GBM do que no tecido não-tumoral.

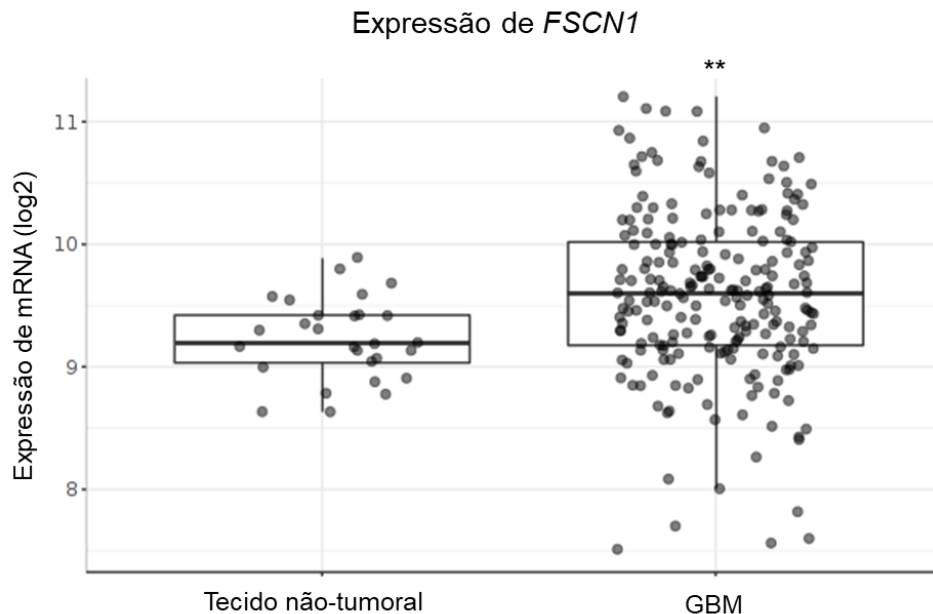


Figura 9. Análise do gene *FSCN1* na plataforma GlioVis. Os dados do estudo Rembrandt foram analisados na plataforma GlioVis, comparando a expressão gênica entre amostras de tecido não-tumoral e de GBM. Foi feito teste t de Student para avaliar estatisticamente os dados. ** $p < 0,01$

Na plataforma GlioVis, também foi feita uma análise de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier para *FSCN1* (Figura 10). Foram comparadas as amostras com os maiores e menores níveis de expressão do gene, de acordo com a mediana. Observa-

se que os pacientes cujas amostras correspondiam à maior expressão de FSCN1 (n=47) tiveram pior sobrevida do que os pacientes com menores níveis de expressão (n=46).

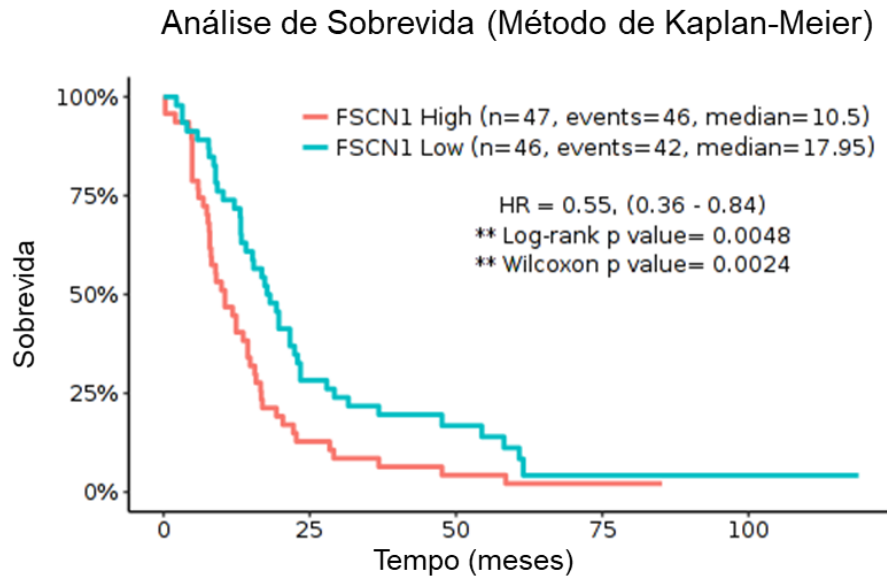


Figura 10. Análise de sobrevida para o gene *FSCN1*. Na plataforma GlioVis, as informações de sobrevida e expressão gênica foram correlacionadas, pelo método de Kaplan-Meier. A sobrevida dos pacientes com maior e menor expressão de *FSCN1* (de acordo com a mediana) foram comparadas pelos testes de log-rank e Wilcoxon. ** $p < 0,01$

Tais observações comprovam resultados anteriores de outros trabalhos da literatura científica. Foi visto que a expressão elevada de FSCN1 está relacionada com a agressividade tumoral, piores taxas de sobrevida e possa servir como um fator preditor de prognóstico aos pacientes (GUNAL *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2016; PERAUD *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2018).

3.2 Efeito da inibição de Fascina na migração celular

Para investigar ainda mais o papel de fascina neste tipo tumoral, este trabalho utilizou a pequena molécula Fascin-G2 (FG2) para inibir a ligação de FSCN1 com actina. FG2 foi inicialmente testada em células de câncer de mama MDA-MB-231 e modelos murinos, e foi observado que FG2 foi capaz de inibir seletivamente fascina, reduzindo a migração e invasão tumoral, sem alterar a viabilidade das células e com

baixa toxicidade aos animais (HUANG *et al.*, 2015). FG2 foi modificada quimicamente, originando a molécula NP-G2-044, que manteve os efeitos inibitórios sobre a migração e invasão tumoral (HAN *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2018). Dados obtidos em um teste clínico de fase 1 com tumores sólidos refratários e metastáticos mostraram que o uso de NP-G2-044 gerou uma resposta antitumoral e antimetastática (CHUNG *et al.*, 2021). Atualmente o grupo está recrutando pacientes com tumores ginecológicos para o seu estudo de fase 2 (identificador: NCT05023486) (CHUNG *et al.*, 2022).

Assim, para verificar o papel da Fascina na migração celular, foram utilizadas células imortalizadas de glioblastoma humano T98G e U87MG. Cada linhagem celular foi submetida a um teste para a avaliação da migração celular sob efeito do inibidor Fascin-G2 (FG2), que é capaz de interferir na ligação de Fascina aos filamentos de actina.

A capacidade migratória das células da linhagem T98G foi avaliada pelo ensaio de fechamento de ferida (Figura 11). Foi possível observar que, após 12 horas de tratamento com 125 μ M de FG2, havia muitas células não-aderidas à placa e que poucas células preenchiam o espaço livre disponível (Figura 11A). Ao medir a área da ferida no início e término do experimento, nota-se que as células T98G tratadas com FG2 não migraram após 12h, enquanto as células que receberam DMSO foram capazes de preencher cerca de 20% da área original da ferida (Figura 11B).

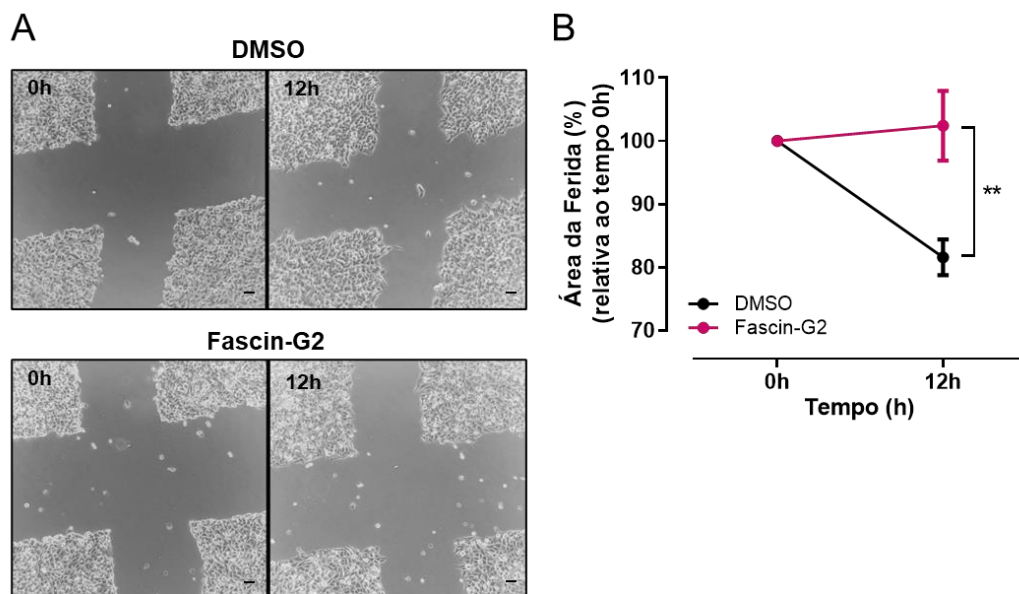


Figura 11. Migração das células da linhagem T98G. O ensaio de fechamento de ferida foi feito por 12 horas, quando as células estavam sob efeito de 125 μ M de Fascin-G2 ou o controle com DMSO. A placa de células foi fotografada logo após a ferida ter sido feita (tempo = 0h) e ao final do ensaio (tempo = 12h) (A). A área da ferida foi determinada pelo ImageJ e o gráfico foi construído pelo GraphPad Prism (B). Barras de escala correspondem a 100 μ m. Valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes feitos em duplicatas (n = 3). ** p<0,01

No caso das células U87MG, a migração celular foi mensurada pelo ensaio com Transwell (Figura 12). A duração do tratamento e a concentração de FG2 foram as mesmas que no experimento com as células T98G. Foram feitas lâminas com as membranas dos insertos, que foram fotografadas em 10 campos aleatórios. Nota-se que as células U87MG que receberam a adição de DMSO permaneceram com seus prolongamentos celulares típicos, enquanto as células tratadas com FG2 estavam mais arredondadas e com menos projeções (Figura 12A). Além da aparente alteração na morfologia, o número de células também reduziu drasticamente, cerca de 95% (Figura 12B).

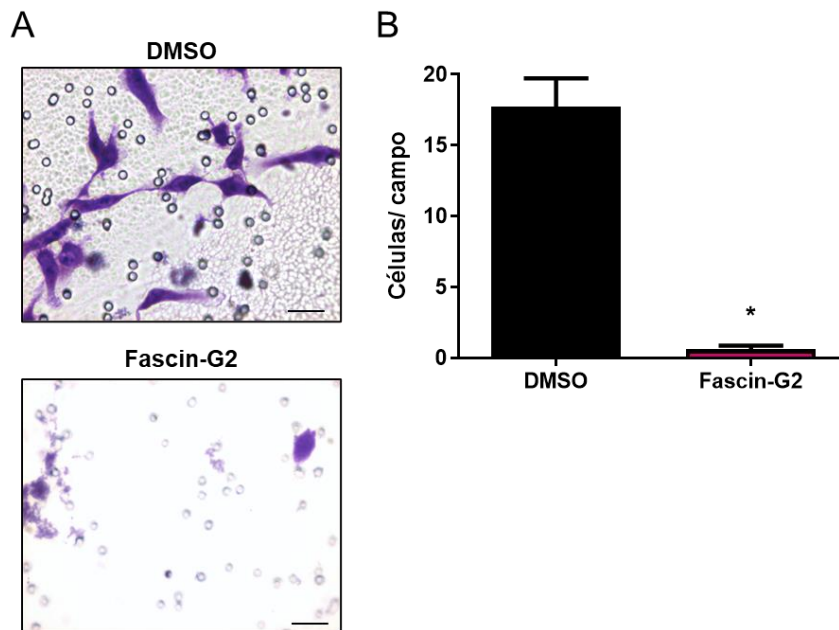


Figura 12. Migração das células da linhagem U87MG. O ensaio com Transwell foi feito por 12 horas e as membranas foram montadas em lâminas. Dez campos aleatórios foram fotografados em cada membrana (A) para determinar o número de células que migraram (B). Gráfico construído no GraphPad Prim. Barras de escala correspondem a 100 μ m. Valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes feitos em duplicatas (n = 3). * $p < 0,05$

3.3 Viabilidade das células tratadas com inibidor de Fascina

Neste estudo, o uso de FG2 nas células de glioblastoma humano T98G e U87MG reduziu drasticamente a migração celular (Figuras 11 e 12). Para esses experimentos, foi utilizada a concentração de 125 μ M de FG2, a mesma concentração do primeiro estudo que descreveu a molécula (HUANG *et al.*, 2015). Para garantir que

o efeito da droga é específico para a capacidade migratória das células, a concentração de FG2 foi reduzida (75 μM a 5 μM) e foi feito um ensaio de contagem de células com Azul de Tripán, para verificar a viabilidade celular.

Após 12 horas de tratamento com FG2, as células T98G e U87MG foram fotografadas antes de prosseguir com a contagem (Figura 13).

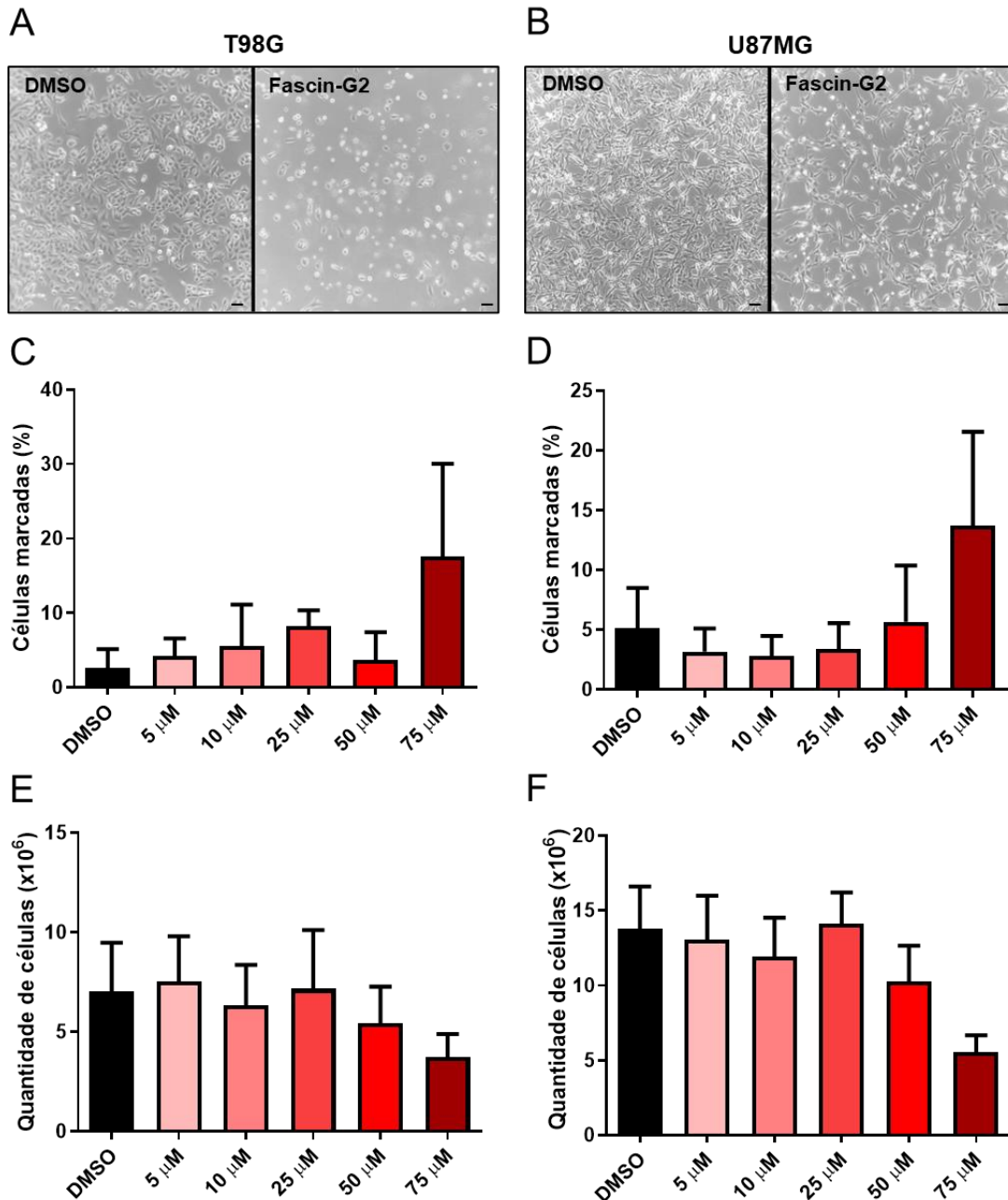


Figura 13. Viabilidade das células T98G e U87MG após inibição de Fascina. As células foram tratadas com Fascin-G2 nas concentrações de 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM e 75 μM . Após 12 horas de tratamento, os poços contendo as células T98G (A) e U87MG (B) foram fotografados. Seguiu-se com a quantificação de células T98G (C) e U87MG (D) marcadas com Azul de Tripán e a quantidade total de células T98G (E) e U87MG (F). Barras de escala correspondem a 100 μm . Valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes feitos em duplicatas (n = 3).

Nas células T98G tratadas com 75 μM de FG2, foi possível visualizar que havia uma menor quantidade aparente de células, muitas delas não estavam aderidas e as células que estavam aderidas possuíam uma morfologia mais arredondada em relação ao controle (Figura 13A). No caso da U87MG tratada com 75 μM de FG2, também se observou uma menor quantidade aparente de células, mas elas não pareciam ter sofrido qualquer mudança morfológica (Figura 13B). Entretanto, apesar da tendência de redução na viabilidade para ambas as linhagens, a contagem diferencial de células e análise estatística dos dados não foi capaz de detectar mudanças significativas no número total de células e de células coradas com Azul de Tripán (Figuras 13C–13F).

Talvez mais replicatas experimentais fossem necessárias para aumentar o poder estatístico e confirmar o efeito de FG2 sobre a quantidade de total e viabilidade das células. Ou ainda, sejam necessárias outras metodologias para avaliar melhor a viabilidade celular.

3.4 Ciclo celular das células tratadas com inibidor de Fascina

A fim de investigar ainda mais os efeitos do inibidor FG2 nas células, também foi avaliado o ciclo celular das amostras por meio da marcação com iodeto de propídeo (PI) e posterior leitura no citômetro de fluxo. Esta foi a primeira vez que o ciclo celular foi analisado após o tratamento com este inibidor. Foram utilizadas as mesmas concentrações de FG2 do ensaio com Azul de Tripán (75 μM a 5 μM).

As duas linhagens de células tiveram respostas diferentes (Figuras 14 e 15). A maior parte das células T98G tratadas com 75 μM estava na fase sub-G1 (46,9%), o que corresponde a cerca de 13 vezes mais células do que as amostras controle (3,7%) (Figura 14). Esse aumento foi concomitante com a diminuição média de 40% das células na fase G1 após receberem o tratamento com 75 μM de FG2. No caso das células U87MG, houve aumento de aproximadamente 20% da população em G1, ao comparar os tratamentos com 50 μM de FG2 e DMSO, e redução média de 75% das células em G2/M (Figura 15).

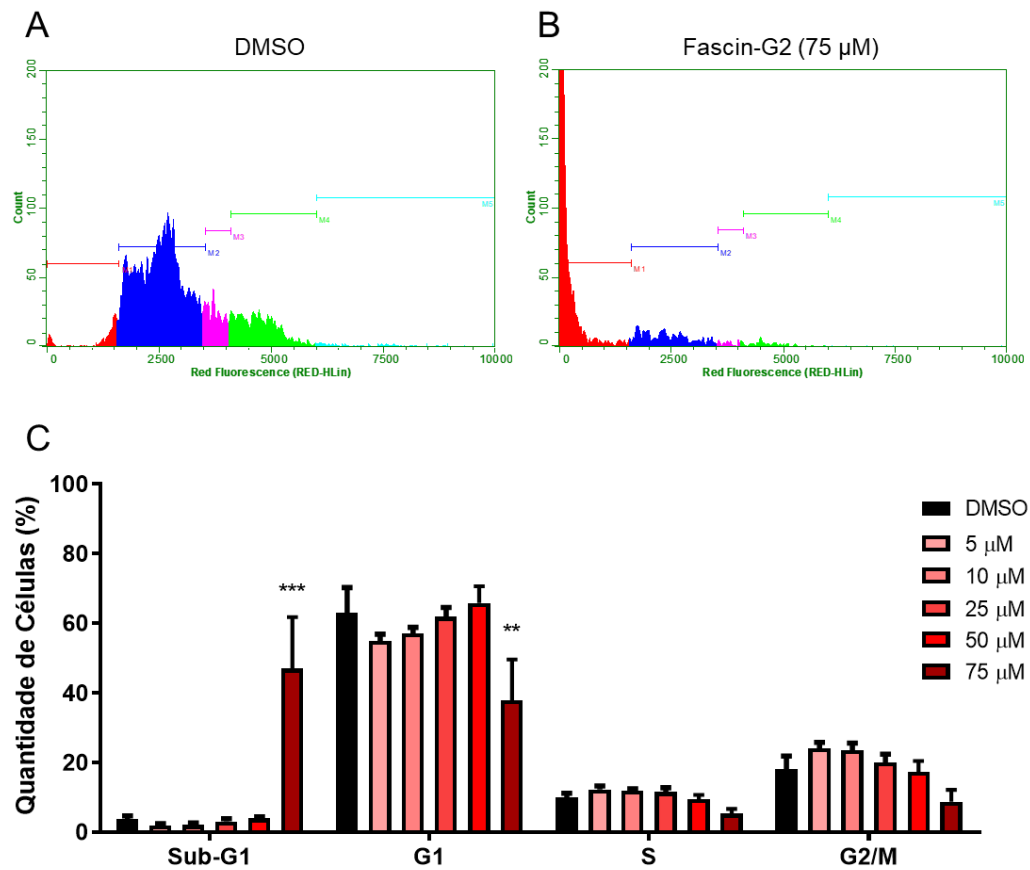


Figura 14. Ciclo celular das células T98G após inibição de Fascina. As células foram tratadas com Fascin-G2 (FG2) nas concentrações de 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM e 75 µM. Após 12 horas de tratamento, os sobrenadantes e as células foram coletados, fixados com Etanol (70%) gelado e marcados com Iodeto de Propídio. 5000 eventos de cada amostra foram adquiridos. Histograma representativo das amostras tratadas com DMSO (A) e 75 µM de FG2 (B). Dados compilados ao final do experimento (C). As cores vermelho, azul, lilás e verde do histograma representam as fases Sub-G1, G1, S, G2/M do ciclo celular, respectivamente. Valores representam a média ± SEM de três experimentos independentes feitos em duplicatas (n = 3). ** p<0,01; *** p<0,001

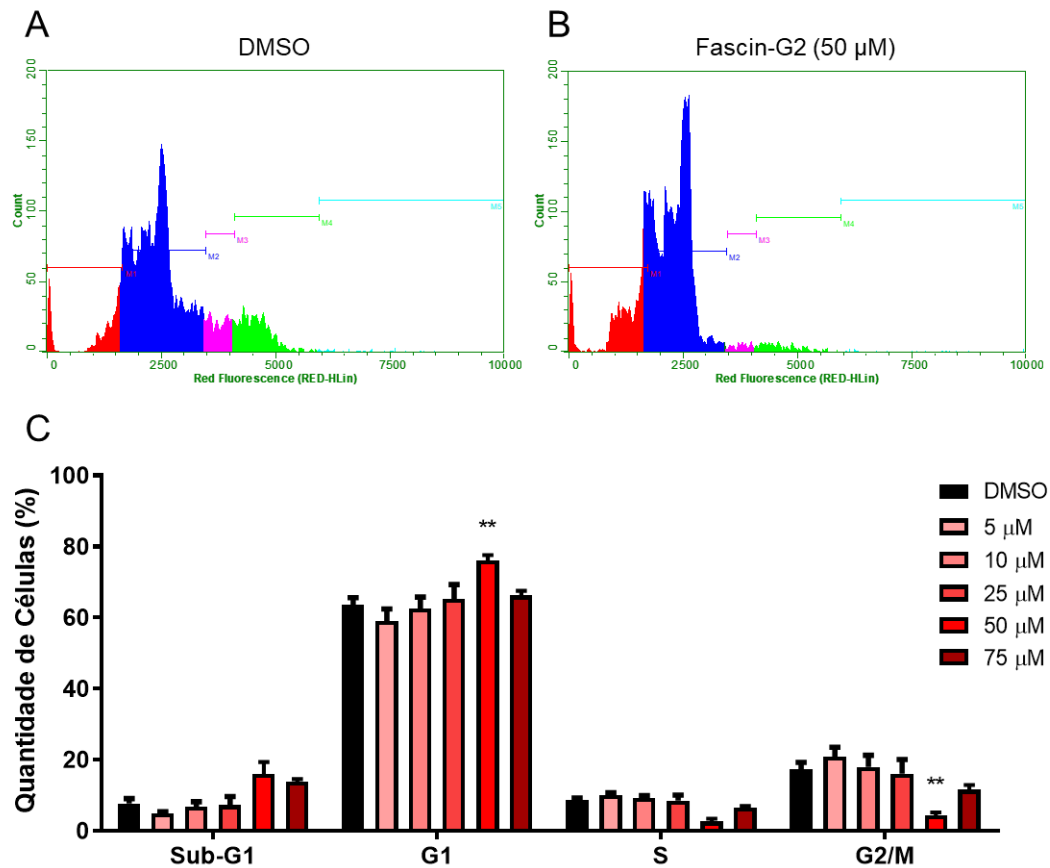


Figura 15. Ciclo celular das células U87MG após inibição de Fascina. As células foram tratadas com Fascin-G2 (FG2) nas concentrações de 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM e 75 µM. Após 12 horas de tratamento, os sobrenadantes e as células foram coletados, fixados com Etanol (70%) gelado e marcados com Iodeto de Propídio. 5000 eventos de cada amostra foram adquiridos. Histograma representativo das amostras tratadas com DMSO (A) e 50 µM de FG2 (B). Dados compilados ao final do experimento (C). As cores vermelho, azul, lilás e verde do histograma representam as fases Sub-G1, G1, S, G2/M do ciclo celular, respectivamente. Valores representam a média ± SEM de três experimentos independentes feitos em duplicatas (n = 3). ** p<0,01

O aumento em sub-G1 nas células T98G pode indicar células apoptóticas, fragmentação do DNA nuclear, aberrações cromossômicas ou células viáveis com uma estrutura de cromatina diferente (RICCARDI; NICOLETTI, 2006). Como FSCN1 também é encontrada no núcleo das células, sua ligação à actina nuclear é necessária para organizar e remodelar corretamente a cromatina, manter a estrutura e integridade nuclear e participar do reparo de DNA (LAWSON *et al.*, 2022). E talvez as células T98G estejam viáveis, porém com a estrutura da cromatina alterada, já que não se viu diferença estatisticamente significativa no ensaio com Azul de Tripán (Figura 13).

Por outro lado, o aumento das células U87MG na fase G1 e redução na fase G2/M podem indicar que houve parada do ciclo em G1. Assim, pode-se supor que o tratamento com FG2 inibiu a progressão do ciclo celular e, como as U87MG possuem

a versão selvagem do gene *TP53*, talvez p53 participe dessa parada do ciclo. Um estudo de 2013 mostrou que células de melanoma com expressão reduzida de fascina possuem o ciclo celular mais lento, com aumento da população celular em G1 e redução na fase S (MA *et al.*, 2013). Em duas linhagens de carcinoma pulmonar de células escamosas, ao reduzir a expressão de fascina, também se observou aumento da fase G1, redução das fases S e G2/M e aumento de células apoptóticas (GAO *et al.*, 2019).

O próximo passo seria avaliar em maior profundidade quais os mecanismos envolvidos nas alterações observadas no ciclo celular de cada linhagem, já que a literatura nessa área é escassa, sobretudo com células de glioblastoma humano.

3.5 Análise da expressão de *FSCN1*

Como a via das prostaglandinas é capaz de regular fascina, decidiu-se investigar um pouco os níveis de mRNA e proteína após o tratamento com PGE₂ ou PGF_{2α}. Inicialmente foi feita a análise da expressão gênica por RT-qPCR (Figura 16) e posteriormente os níveis de proteína foram analisados por *Western Blot* (Figura 17).

Foi possível observar que nas células da linhagem T98G houve diminuição da expressão de *FSCN1*. Em 12 horas, foi visto uma redução média de quase 40% da expressão após o tratamento com PGF_{2α} (Figura 16A). Esse efeito se manteve após 24 horas, quando se viu uma diminuição média de 45% dos níveis de mRNA (Figura 16B). O tratamento com PGE₂ mostrou uma tendência de 15% de redução da expressão de *FSCN1*. Entretanto, as células U87MG não tiveram a expressão de *FSCN1* alterada nas condições analisadas (Figuras 16C e 16D).

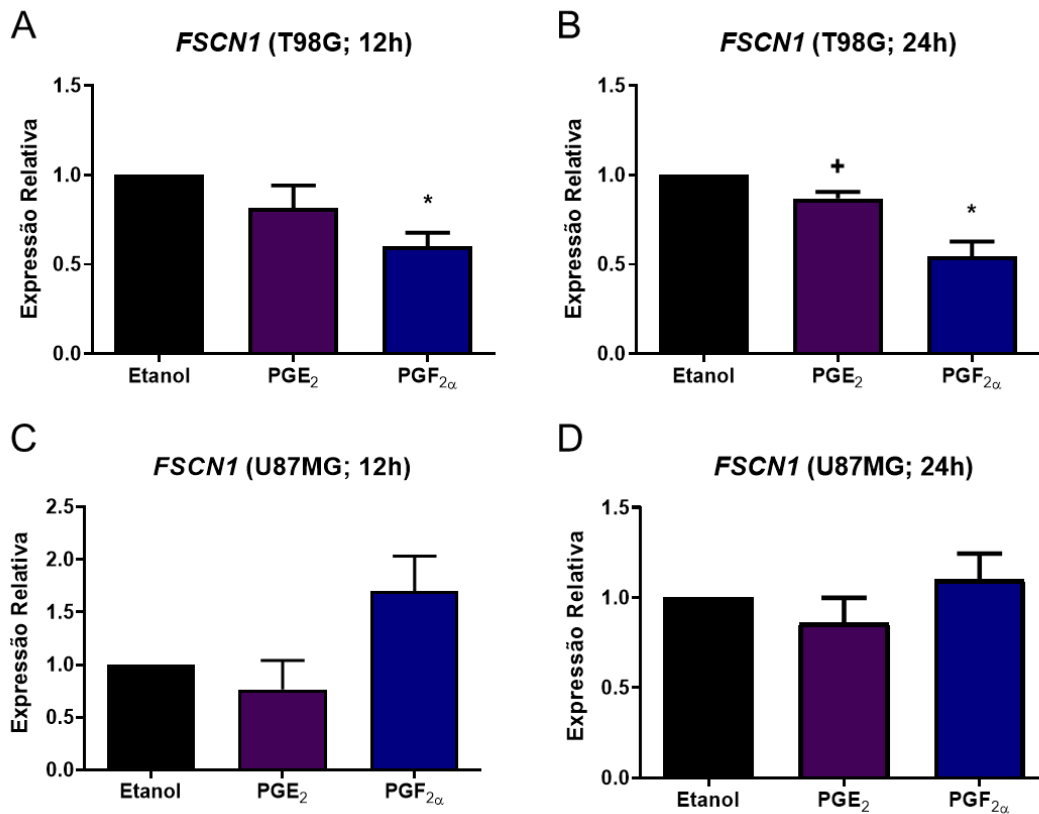


Figura 16. Expressão gênica de FSCN1. As células T98G (A e B) e U87MG (C e D) foram tratadas com 5 μ M de PGE₂ e PGF_{2 α} por 12 horas (A e C) ou 24 horas (B e D). Após o tratamento, o RNA foi extraído e convertido em cDNA para a análise por RT-qPCR. Valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes feitos em duplicatas (n = 3). + p<0,1; * p<0,05

Após os resultados da análise de expressão gênica, as células foram tratadas novamente com as PGs por 24 horas para a avaliação dos níveis proteicos de FSCN1 total e fosforilada (S39) (pFSCN1) (Figura 17). Foi observado que ambas as células produzem FSCN1, mas somente nas células T98G foram detectadas as bandas de pFSCN1 (Figura 17A). Os níveis relativos de FSCN1 nessa linhagem aumentaram discretamente após o tratamento com PGE₂ e PGF_{2 α} (17% e 23%, respectivamente) (Figura 17B), enquanto nas células U87MG, não foram alterados (Figura 17E).

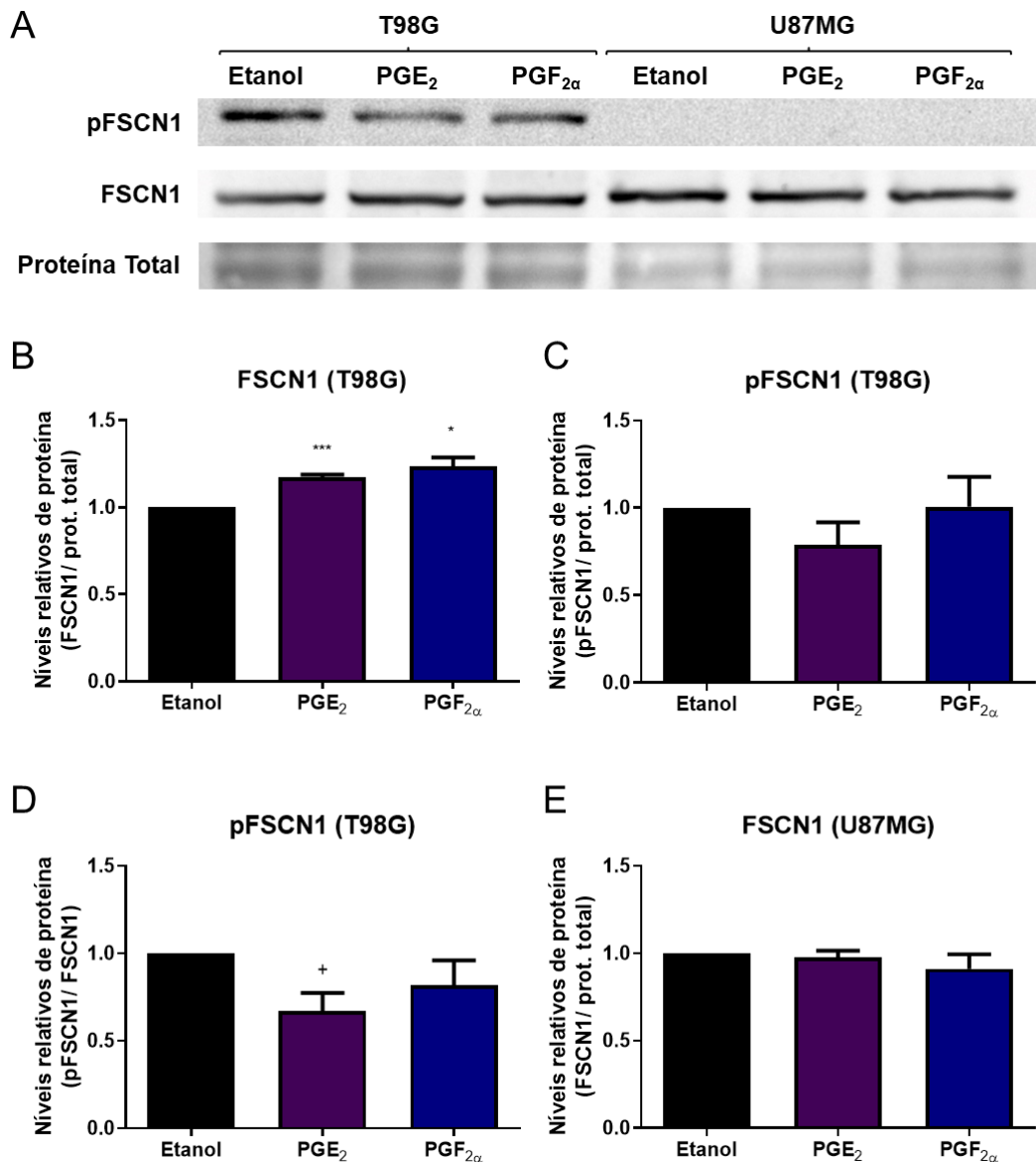


Figura 17. Expressão proteica de FSCN1. As células T98G e U87MG foram tratadas com 5 μ M de PGE₂ e PGF_{2 α} por 24 horas. Após o tratamento, as proteínas foram extraídas e foi feito Western Blot por SDS-PAGE. Foi feita a marcação com anticorpos para FSCN1 e pFSCN1, as membranas foram fotografadas (A) e os dados foram compilados em gráficos (B-E). Os níveis relativos de proteína foram calculados e normalizados com base na intensidade da banda de proteínas totais coradas com Ponceau S ou na banda de FSCN1. Valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes (n = 3). + p<0,1; * p<0,05; *** p<0,001

A normalização dos níveis relativos de pFSCN1 foi feita de duas formas, com base na intensidade da banda das proteínas totais coradas com Ponceau S e com as bandas da proteína não-fosforilada. A normalização feita da primeira forma não indicou mudanças nos níveis de pFSCN1 (Figura 17C), entretanto, quando foi feita baseada em FSCN1, mostrou uma tendência de redução de 34% após o tratamento com PGE₂ (Figura 17D). Essas observações sugerem que os níveis totais de FSCN1

aumentam discretamente, porém os níveis da proteína fosforilada em S39 não são alterados.

Todas essas análises de expressão geraram resultados inesperados, pois a expectativa era de que PGs aumentassem a expressão gênica e proteica de FSCN1 em ambas as linhagens celulares. Talvez a regulação de FSCN1 seja rigidamente controlada pela célula e os tempos analisados (12 e 24 horas) tenham sido muito tardios para a análise do efeito de PGs. Se esse for o caso, o decréscimo dos níveis de mRNA nas células T98G poderiam representar um evento posterior a um aumento induzido pelos prostanoides e a tentativa de reestabelecer um equilíbrio. No caso dos níveis proteicos de FSCN1 total e fosforilada, a mesma suposição é válida.

Em um estudo com PGE₂ em células de adenoma colorretal, foi observado que o efeito induzido sobre a expressão dos genes da ciclooxigenase-2 (COX-2) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) teve o seu pico após duas horas de tratamento, em seguida a expressão gênica retornou a valores próximos ao controle (MAURITZ *et al.*, 2006). No mesmo estudo, também foi visto que os níveis de fosforilação de ERK e p38 atingiram o pico após quatro e duas horas, respectivamente, depois retornaram a valores próximos ao controle sem a adição de PGE₂.

Além disso, talvez o efeito dos prostanoides na expressão de FSCN1 nas células U87MG seja mais rápido do que nas células T98G, o que poderia indicar uma capacidade da linhagem U87MG de reestabelecer a homeostase mais rapidamente. Outra possibilidade que pode explicar os resultados com essas células é a sua capacidade de autoproduzir prostanoides. Consequentemente, talvez os receptores de PGE₂ e PGF_{2α} já estejam saturados nas células U87MG e a adição exógena de 5 μM de PGs não foi suficiente para obter o efeito esperado.

Até o momento, nenhum outro estudo analisou a expressão de FSCN1 após a adição exógena de PGs. O que as pesquisas mostraram foi que a via de sinalização de PGs é capaz de regular diferentes processos biológicos através de fascina, como espreadimento das células (AHMED; KIM, 2019), morfologia do núcleo (GROEN *et al.*, 2015), adesão ao substrato mediada por integrinas (FOX *et al.*, 2020).

3.6 Análise proteômica quantitativa após o tratamento com prostaglandinas

A fim de verificar outras proteínas que pudessem ter seus níveis alterados após o tratamento com PGs, foi feita uma análise proteômica quantitativa. As células foram tratadas, os *pellets* foram coletados e as proteínas foram extraídas, purificadas e injetadas no espectrômetro de massas. A quantidade de cada proteína foi comparada entre os grupos experimentais e controle, gerando tabelas com proteínas diferencialmente expressas (DEPs) em cada condição (Tabelas 4-7).

T98G: CONTROLE vs PGE ₂		
Proteínas	Nome completo oficial	Diferença (log2)
TBCA	Tubulin Folding Cofactor A	1,9880098
CPNE1	Copine 1	1,8471152
RRBP1	Ribosome Binding Protein 1	0,2471002
PKM	Pyruvate Kinase M1/2	0,2209018
CDC42	Cell Division Cycle 42	-0,49899991
SNRPA1	Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide A'	-1,00622622
CTNNA2	Catenin Alpha 2	-1,15069962
RAB8A	Ras-Related Protein Rab-8A	-1,28878212
P4HA2	Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Alpha 2	-1,30324491
PROCR	Protein C Receptor	-1,31870715
ACTBL2	Actin Beta Like 2	-1,44580650
RANGAP1	Ran GTPase Activating Protein 1	-1,52302361
CTSL	Cathepsin V	-2,67093086
WDR1	WD Repeat-Containing Protein 1	-3,70750682

Tabela 4. Proteínas diferencialmente expressas (DEPs) após o tratamento com PGE₂. As células T98G foram tratadas com 5 µM de PGE₂ por 24 horas. As proteínas foram extraídas e purificadas antes da injeção no espectrômetro de massas. A expressão diferencial está em escala logarítmica.

T98G: CONTROLE vs PGF_{2α}		
Proteínas	Nome completo oficial	Diferença (log2)
APRT	Adenine Phosphoribosyltransferase	2,4142729
TIMM50	Translocase Of Inner Mitochondrial Membrane 50	1,0281862
LDHA	Lactate Dehydrogenase A	0,4644245
LDHB	Lactate Dehydrogenase B	0,3646641
RPSA	Ribosomal Protein SA	0,3001502
HSP90AB1	Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class B Member 1	0,2796926
PKM	Pyruvate Kinase M1/2	0,2788041
TPI1	Triosephosphate Isomerase 1	0,2784058
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	0,2339226
DDX39B	DExD-Box Helicase 39B	0,2325932
TUBB	Tubulin Beta Class I	0,2305930
SERPINH1	Serpin Family H Member 1	0,1643991
ETFA	Electron Transfer Flavoprotein Subunit Alpha	-0,17548275
HIST1H2BM	Histone Cluster 1 H2B Family Member M	-0,25240485
RPL4	Ribosomal Protein L4	-0,26301670
HSPE1	Heat Shock Protein Family E (Hsp10) Member 1	-0,29861736
MLEC	Malectin	-1,23412832
CCT6A	Chaperonin Containing TCP1 Subunit 6A	-1,37446404
CPOX	Coproporphyrinogen Oxidase	-1,50626437
BCAS2	BCAS2 Pre-mRNA Processing Factor	-1,57526207
PC	Pyruvate Carboxylase	-1,67759514
PSPC1	Paraspeckle Component 1	-2,12718074
SEPT8	Septin 8	-3,08366013
CSNK1A1	Casein Kinase 1 Alpha 1	-3,46858279

Tabela 5. Proteínas diferencialmente expressas (DEPs) após o tratamento com PGF_{2α}. As células T98G foram tratadas com 5 μM de PGF_{2α} por 24 horas. As proteínas foram extraídas e purificadas antes da injeção no espectrômetro de massas. A expressão diferencial está em escala logarítmica.

U87MG: CONTROLE vs PGE₂		
Proteínas	Nome completo oficial	Diferença (log2)
CDC5L	Cell Division Cycle 5 Like	2,2660135
ITGA5	Integrin Subunit Alpha 5	2,0860202
BCAP31	B Cell Receptor Associated Protein 31	2,0544027
DDX1	DEAD-Box Helicase 1	1,6244774
MLEC	Malectin	1,4773623
NDUFS8	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit S8	1,2978566
SLC25A13	Solute Carrier Family 25 Member 13	0,8785426
RPS14	Ribosomal Protein S14	0,6018591
PSME3	Proteasome Activator Subunit 3	0,5749696
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A	0,4360361
ECHS1	Enoyl-CoA Hydratase, Short Chain 1	0,4222167
TXNDC5	Thioredoxin Domain Containing 5	0,3697055
HSPD1	Heat Shock Protein Family D (Hsp60) Member 1	0,2961890
HNRNPA1	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1	0,2731059
ACTN4	Actinin Alpha 4	-0,27326107
RPS8	Ribosomal Protein S8	-0,34564177
RPL14	Ribosomal Protein L14	-0,38169384
EEF1A1	Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Alpha 1	-0,39118163
HSP90AB1	Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class B Member 1	-0,41878541
YWHAZ	Tyrosine 3/ Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta	-0,42131424
LDHB	Lactate Dehydrogenase B	-0,43923251
RPL7A	Ribosomal Protein L7a	-0,54830106
EIF3C	Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit C	-0,61096382
RPL9	Ribosomal Protein L9	-0,64786084
EIF3I	Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit I	-0,66159376
RAB7A	Ras-Related Protein Rab-7a	-0,73686536
VAPA	VAMP Associated Protein A	-0,79255104
RTN4	Reticulon 4	-0,80312856
SF3B3	Splicing Factor 3b Subunit 3	-0,83562406
HSP90AA1	Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class A Member 1	-0,89762878
RPL30	Ribosomal Protein L30	-0,98144341
NDUFA5	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit A5	-1,07830493
HPRT1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1	-1,08364042
GNAI2	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	-1,08465703
IQGAP1	Ras GTPase-Activating-Like Protein with IQ Motifs	-1,12264315
NACA	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	-1,22623316
CCT4	Chaperonin Containing TCP1 Subunit 4	-1,23927879
UTP18	UTP18 Small Subunit Processome Component	-1,80413628
TRAP1	TNF Receptor Associated Protein 1	-1,86088689
PSMA1	Proteasome Subunit Alpha 1	-2,19466782
CPOX	Coproporphyrinogen Oxidase	-3,75121943

Tabela 6. Proteínas diferencialmente expressas (DEPs) após o tratamento com PGE₂. As células U87MG foram tratadas com 5 µM de PGE₂ por 24 horas. As proteínas foram extraídas e purificadas antes da injeção no espectrômetro de massas. A expressão diferencial está em escala logarítmica.

U87MG: CONTROLE vs PGF_{2α}		
Proteínas	Nome completo oficial	Diferença (log2)
TP11	Triosephosphate Isomerase 1	0,4767294
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	0,3709234
ALDOA	Aldolase, Fructose-Bisphosphate A	0,3306869
ENO1	Enolase 1	0,3171269
PKM	Pyruvate Kinase M1/2	0,3082434
MYL6	Myosin Light Chain 6	0,2394931
ATP5B	ATP Synthase F1 Subunit Beta	-0,36515713
ACTN4	Actinin Alpha 4	-0,40359243
PABPC1	Polyadenylate-binding protein 1	-0,53105545
RPS8	Ribosomal Protein S8	-0,61825339
HIST2H2BE	Histone Cluster 2 H2B Family Member E	-0,78381634
TPM3	Tropomyosin 3	-1,15942701
RPS25	Ribosomal Protein S25	-1,18541654
TRAP1	TNF Receptor Associated Protein 1	-1,19518280
HLA-B	Major Histocompatibility Complex, Class I, B	-1,23101298
IGF2BP2	Insulin Like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 2	-1,25133260
ITGB1	Integrin Subunit Beta 1	-1,25444794
PFN1	Profilin 1	-1,27454631
CALU	Calumenin	-1,29686610
RPL30	Ribosomal Protein L30	-1,30538114
SCP2	Sterol Carrier Protein 2	-1,41803487
ATP5F1	ATP Synthase Peripheral Stalk-Membrane Subunit B	-1,42757289
RPS9	Ribosomal Protein S9	-1,43654950
CD44	Extracellular Matrix Receptor III	-1,47606214
TCP1	T-Complex 1	-1,59300613
CHP1	Calcineurin Like EF-Hand Protein 1	-1,60193570
GOT2	Glutamic-Oxaloacetic Transaminase 2	-1,69620514
PSMA1	Proteasome Subunit Alpha 1	-1,80647850
ACAT1	Acetyl-CoA Acetyltransferase 1	-1,80653763
EIF3A	Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit A	-1,87019984
NOP56	Nucleolar Protein 56	-2,00711060
TRA2A	Transformer 2 Alpha Homolog	-2,43966611
RHOG	Rho-Related GTP-Binding Protein RhoG	-2,50039991
COPB2	Coatomer Protein Complex Subunit Beta 2	-2,92318535
CYB5B	Cytochrome B5 Type B	-2,93758456
TALDO1	Transaldolase 1	-3,19036865
RAB14	Ras-Related Protein Rab-14	-3,54027176
CPOX	Coproporphyrinogen Oxidase	-4,56666056

Tabela 7. Proteínas diferencialmente expressas (DEPs) após o tratamento com PGF_{2α}. As células U87MG foram tratadas com 5 μM de PGF_{2α} por 24 horas. As proteínas foram extraídas e purificadas antes da injeção no espectrômetro de massas. A expressão diferencial está em escala logarítmica.

Ao avaliar o efeito dos tratamentos com PGE₂ e PGF_{2α} em cada linhagem celular, foi observado que houve aumento da quantidade da piruvato quinase M1/2 (PKM) nas células T98G. Já nas células U87MG, houve redução dos níveis de alfa-actinina-4 (ACTN4), subunidade alfa-1 do proteassomo S20 (PSMA1), proteína 1 associada ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAP1), proteína ribossomal S8 (RPS8) e L30 (RPL30) e coproporfirinogênio oxidase (CPOX).

Analisando os efeitos de cada tratamento em ambas as linhagens de células, foi visto, inicialmente, que o tratamento com PGE₂ altera proteínas diferentes nos dois tipos celulares. Mas foi observado que a PGF_{2α} levou ao aumento de PKM, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e triose fosfato isomerase 1 (TPI1), com a redução de CPOX.

Em seguida, as proteínas diferencialmente expressas (DEPs), foram submetidas a uma análise de enriquecimento de termos de ontologia genética (GO) e de vias do KEGG (Figuras 18-21).

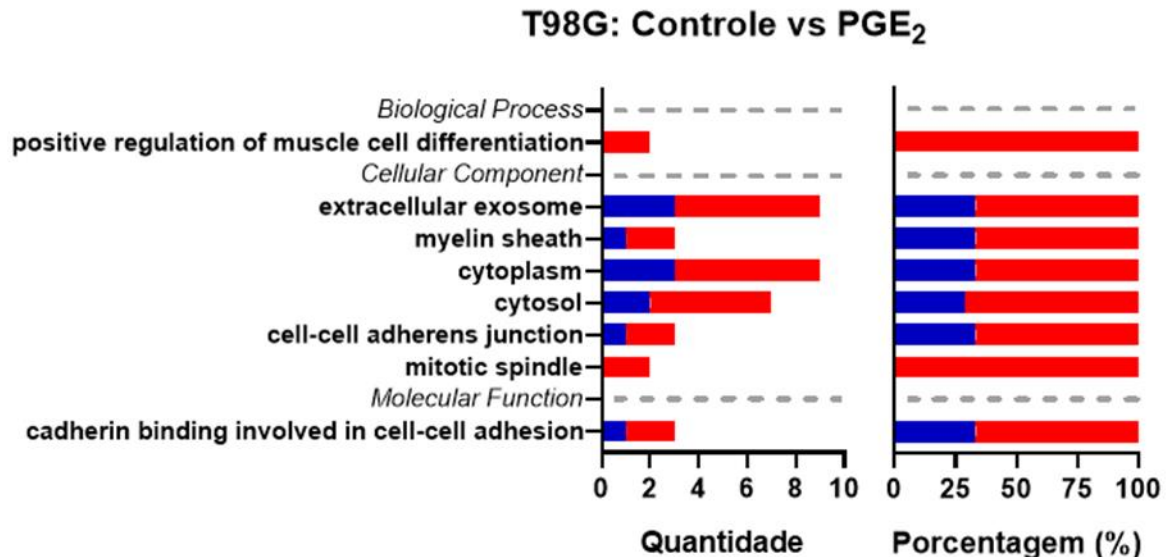


Figura 18. Análise de enriquecimento das proteínas diferencialmente expressas nas células T98G. As proteínas diferencialmente expressas (DEPs) após o tratamento com PGE₂ foram avaliadas pela ferramenta DAVID para uma análise de enriquecimento. Os termos de ontologia genética (GO) com os menores valores de p estão ordenados. A quantidade de DEPs e a porcentagem das superexpressas (em azul) e das subexpressas (em vermelho) está representada para cada termo.

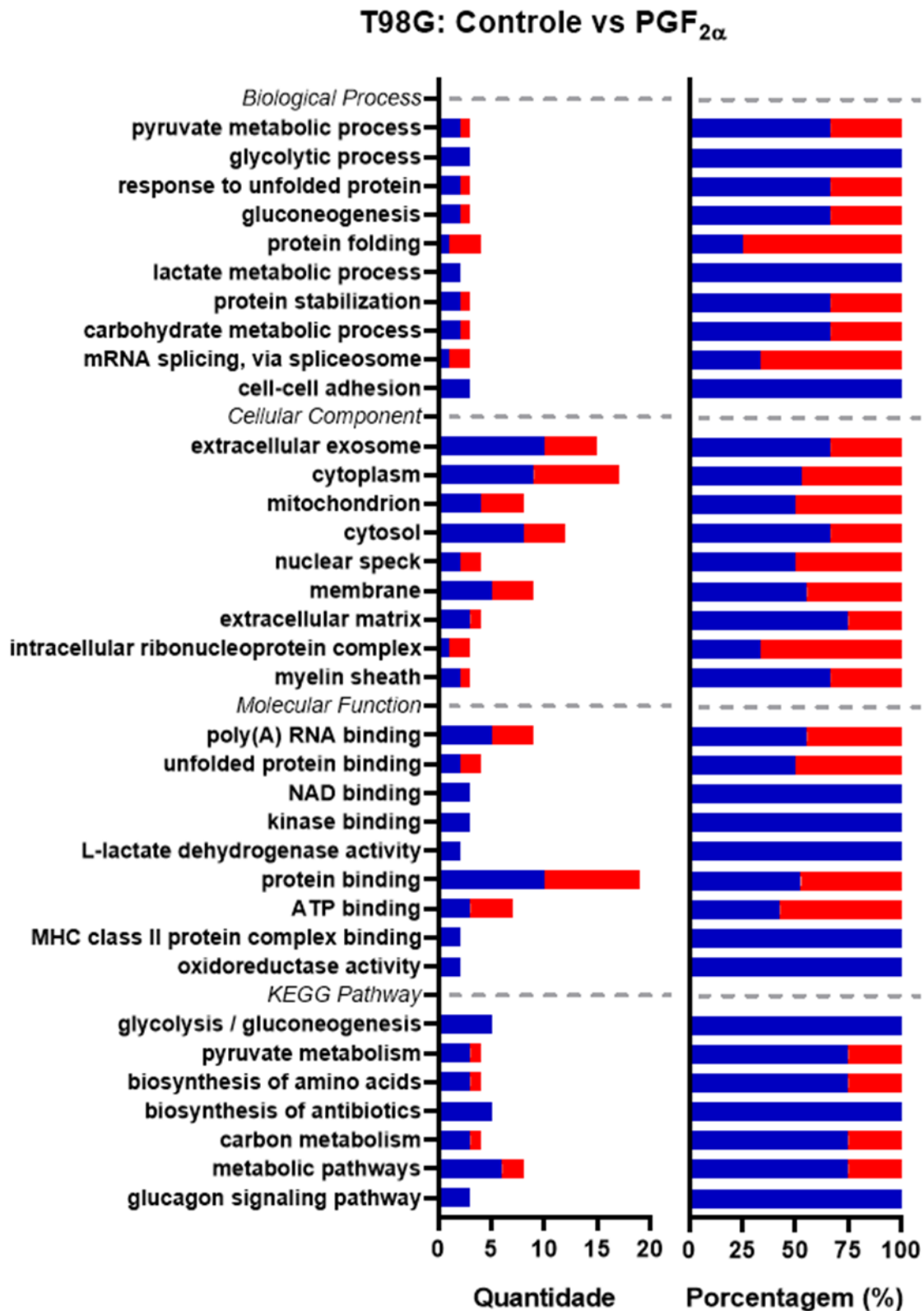


Figura 19. Análise de enriquecimento das proteínas diferencialmente expressas nas células T98G. As proteínas diferencialmente expressas (DEPs) após o tratamento com PGF_{2α} foram avaliadas pela ferramenta DAVID para uma análise de enriquecimento. Os termos de ontologia genética (GO) com os menores valores de p estão ordenados. A quantidade de DEPs e a porcentagem das superexpressas (em azul) e das subexpressas (em vermelho) está representada para cada termo.

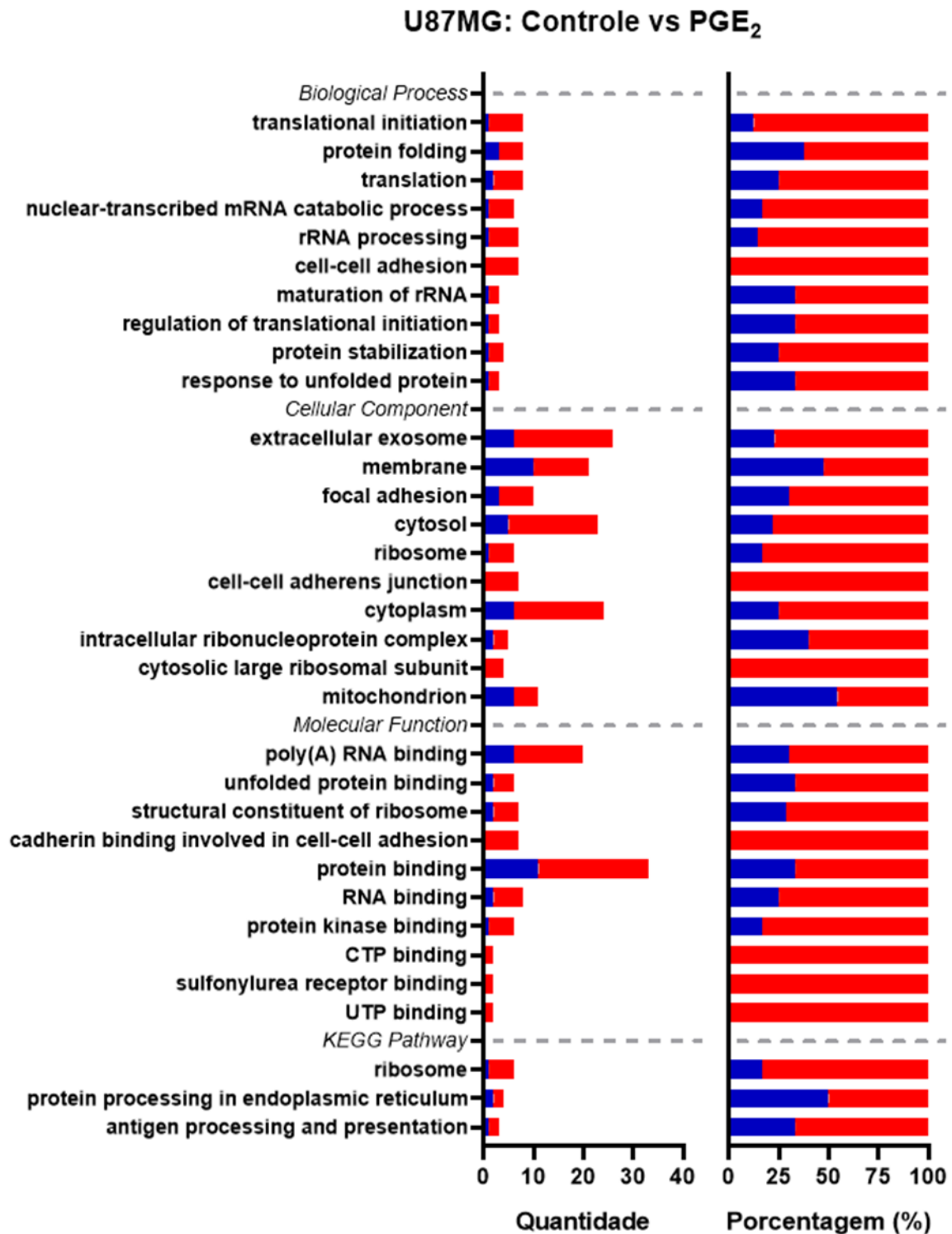


Figura 20. Análise de enriquecimento das proteínas diferencialmente expressas nas células U87MG. As proteínas diferencialmente expressas (DEPs) após o tratamento com PGE₂ foram avaliadas pela ferramenta DAVID para uma análise de enriquecimento. Os termos de ontologia genética (GO) com os menores valores de p estão ordenados. A quantidade de DEPs e a porcentagem das superexpressas (em azul) e das subexpressas (em vermelho) está representada para cada termo.

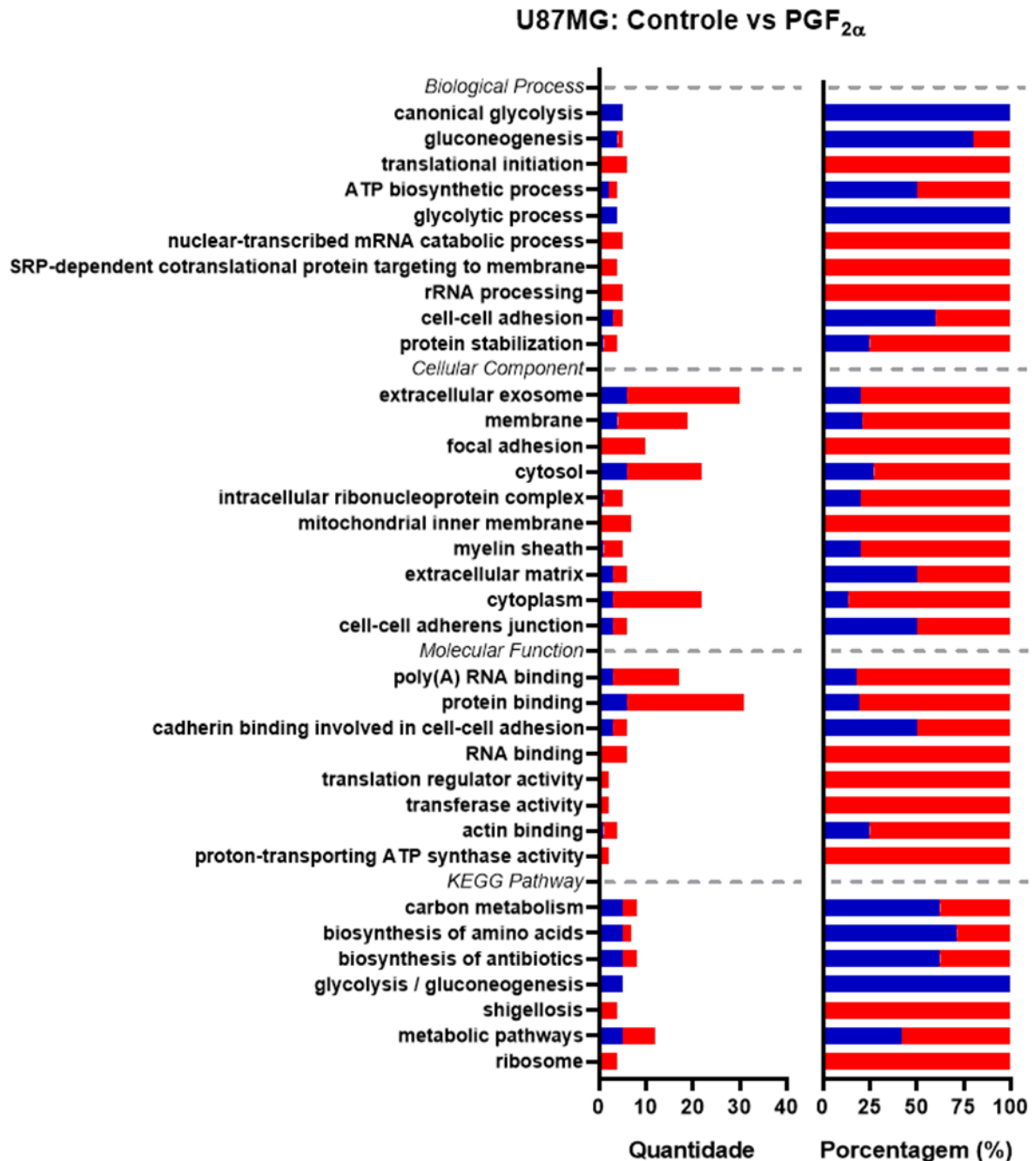


Figura 21. Análise de enriquecimento das proteínas diferencialmente expressas nas células U87MG. As proteínas diferencialmente expressas (DEPs) após o tratamento com PGF_{2α} foram avaliadas pela ferramenta DAVID para uma análise de enriquecimento. Os termos de ontologia genética (GO) com os menores valores de p estão ordenados. A quantidade de DEPs e a porcentagem das superexpressas (em azul) e das subexpressas (em vermelho) está representada para cada termo.

Foi observado que nas células T98G tratadas com PGE_2 , de modo geral, houve redução dos níveis de proteínas localizadas em exossomos, nas junções aderentes entre células, fuso mitótico. As proteínas que foram agrupadas nas junções aderentes também estão relacionadas com a ligação à caderina envolvida na adesão célula-células (Figura 18). No caso do tratamento com $PGF_{2\alpha}$, foi visto o enriquecimento de processos e vias relacionados ao metabolismo de certas moléculas (piruvato, lactato e carboidratos), ao metabolismo energético (glicólise e gliconeogênese) e à adesão intercelular. (Figura 19).

Já para as células U87MG, a análise de enriquecimento após o tratamento com PGE_2 mostrou que houve alteração de processos relacionados à transcrição, tradução e adesão celular (Figura 20). E, por fim, a análise referente ao tratamento com $PGF_{2\alpha}$ apontou o enriquecimento de processos associados ao metabolismo energético, adesão celular e tradução (Figura 21).

Esse estudo foi o pioneiro em fazer uma análise proteômica após o tratamento com PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$ em células de GBM humano (Tabelas 4 a 7). De modo geral, foi visto pelas análises de enriquecimento que as PGs alteram os processos de transcrição e tradução, metabolismo celular e adesão das células (Figuras 18 a 21). Esses dados sugerem que o maior impacto das PGs na migração celular ocorra pela modulação da adesão intercelular e/ou adesão à ECM. As adesões que as células fazem entre si interferem no modo de migração. Quanto menor a quantidade de adesões, maior será o número de células migrando individualmente; enquanto que, quanto maior a quantidade e a rigidez das adesões, maior será a migração coletiva (FRIEDL; MAYOR, 2017; SHIH; YAMADA, 2012).

4 CONCLUSÃO

Os dados mostrados neste projeto indicam que Fascina-1 desempenha um papel na migração e no ciclo celular de células de glioblastoma humano T98G e U87MG, além de ter relevância clínica.

- i. A análise *in silico* dos dados do projeto REMBRANDT mostram que os genes diferencialmente expressos estão enriquecidos em processos biológicos relacionados à migração celular, reorganização do citoesqueleto e adesão célula-célula.
- ii. Os dados do projeto REMBRANDT ainda mostram que Fascina-1 é superexpressa em amostras de glioblastoma, em comparação com o tecido não-tumoral, e sua expressão é relevante na sobrevida dos pacientes.
- iii. A inibição de Fascina pela pequena molécula Fascin-G2 reduziu drasticamente a migração das células T98G e U87MG *in vitro*.
- iv. Fascin-G2 não mostrou qualquer efeito na viabilidade das células, porém causou alterações no ciclo celular.
- v. A via das prostaglandinas é capaz de modular a expressão de FSCN1 nas células T98G em 12 e 24 horas, mas parece não ter efeito nas células U87MG nos tempos analisados.
- vi. A análise proteômica quantitativa das células tratadas com prostaglandinas apontam que há um enriquecimento de proteínas relacionadas à adesão célula-célula.

Em conjunto, os dados sugerem que a modulação de proteínas que interagem com o citoesqueleto da célula, como Fascina-1, pode impactar a migração celular e a sua inibição pode ter efeitos benéficos em uma possível terapia adjuvante para o tratamento de glioblastoma.

5 REFERÊNCIAS

- AHMED, S.; KIM, Y. PGE(2) Mediates Cytoskeletal Rearrangement of Hemocytes via Cdc42, a Small G Protein, to Activate Actin-Remodeling Factors in *Spodoptera Exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 102, n. 4, p. e21607, dez. 2019.
- ANILKUMAR, N.; PARSONS, M.; MONK, R.; NG, T.; ADAMS, J. C. Interaction of Fascin and Protein Kinase Calpha: A Novel Intersection in Cell Adhesion and Motility. **The EMBO journal**, v. 22, n. 20, p. 5390–5402, out. 2003.
- BHUVANESHWAR, K.; BELOUALI, A.; SINGH, V.; JOHNSON, R. M.; SONG, L.; ALAOUI, A.; HARRIS, M. A.; CLARKE, R.; WEINER, L. M.; GUSEV, Y.; MADHAVAN, S. G-DOC Plus - an Integrative Bioinformatics Platform for Precision Medicine. **BMC bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 193, abr. 2016.
- BOWMAN, R. L.; WANG, Q.; CARRO, A.; VERHAAK, R. G. W.; SQUATRITO, M. GlioVis data portal for visualization and analysis of brain tumor expression datasets. **Neuro-Oncology**, v. 19, n. 1, p. 139–141, 1 jan. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/neuonc/now247>>.
- CAMPOS, B.; OLSEN, L. R.; URUP, T.; POULSEN, H. S. A comprehensive profile of recurrent glioblastoma. **Oncogene**, v. 35, n. 45, p. 5819–5825, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/onc.2016.85>>.
- CASTELLI, M. G.; BUTTI, G.; CHIABRANDO, C.; COZZI, E.; FANELLI, R.; GAETANI, P.; SILVANI, V.; PAOLETTI, P. Arachidonic Acid Metabolic Profiles in Human Meningiomas and Gliomas. **Journal of neuro-oncology**, v. 5, n. 4, p. 369–375, 1987.
- CHUNG, V.; JHAVERI, K. L.; VON HOFF, D. D.; HUANG, X.-Y.; GARMEY, E. G.; ZHANG, J.; TSAI, F. Y.-C. Phase 1A clinical trial of the first-in-class fascin inhibitor NP-G2-044 evaluating safety and anti-tumor activity in patients with advanced and metastatic solid tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 39, n. 15_suppl, p. 2548, 20 maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.2548>.
- CHUNG, V.; TSAI, F.; CHEN, W.; VON HOFF, D. D.; GARMEY, E. G.; ZHANG, J. J.; HUANG, X. Y. 96 (PB086) - NP-G2-044, a First-in-Class Fascin Inhibitor, Inhibits Growth and Metastasis of Gynecologic Cancers. **European Journal of Cancer**,

- v. 174, p. S34, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804922008917>>.
- CUDDAPAH, V. A.; ROBEL, S.; WATKINS, S.; SONTHEIMER, H. A Neurocentric Perspective on Glioma Invasion. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 15, n. 7, p. 455–465, jul. 2014.
- D’ALESSIO, A.; PROIETTI, G.; SICA, G.; SCICCHITANO, B. M. Pathological and Molecular Features of Glioblastoma and Its Peritumoral Tissue. **Cancers**, v. 11, n. 4, abr. 2019.
- DEMUTH, T.; BERENS, M. E. Molecular Mechanisms of Glioma Cell Migration and Invasion. **Journal of neuro-oncology**, v. 70, n. 2, p. 217–228, nov. 2004.
- DEVREOTES, P.; HORWITZ, A. R. Signaling Networks That Regulate Cell Migration. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 8, p. a005959, ago. 2015.
- DYMOVA, M. A.; KULIGINA, E. V; RICHTER, V. A. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Glioblastoma. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 12, jun. 2021.
- EDGAR, R.; DOMRACHEV, M.; LASH, A. E. Gene Expression Omnibus: NCBI Gene Expression and Hybridization Array Data Repository. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 1, p. 207–210, jan. 2002.
- ELKHATIB, N.; NEU, M. B.; ZENSEN, C.; SCHMOLLER, K. M.; LOUVARD, D.; BAUSCH, A. R.; BETZ, T.; VIGNJEVIC, D. M. Fascin Plays a Role in Stress Fiber Organization and Focal Adhesion Disassembly. **Current biology : CB**, v. 24, n. 13, p. 1492–1499, jul. 2014.
- FAYZULLIN, A.; SANDBERG, C. J.; SPREADBURY, M.; SABERNIAK, B. M.; GRIEG, Z.; SKAGA, E.; LANGMOEN, I. A.; VIK-MO, E. O. Phenotypic and Expressional Heterogeneity in the Invasive Glioma Cells. **Translational oncology**, v. 12, n. 1, p. 122–133, jan. 2019.
- FOX, E. F.; LAMB, M. C.; MELLENTINE, S. Q.; TOOTLE, T. L. Prostaglandins Regulate Invasive, Collective Border Cell Migration. **Molecular biology of the cell**, v. 31, n. 15, p. 1584–1594, jul. 2020.
- FRIEDL, P.; MAYOR, R. Tuning Collective Cell Migration by Cell-Cell Junction Regulation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 9, n. 4, abr. 2017.
- GAO, W.; ZHANG, C.; LI, W.; LI, H.; SANG, J.; ZHAO, Q.; BO, Y.; LUO, H.; ZHENG, X.; LU, Y.; SHI, Y.; YANG, D.; ZHANG, R.; LI, Z.; CUI, J.; ZHANG, Y.; NIU, M.; LI, J.; WU, Z.; GUO, H.; XIANG, C.; WANG, J.; HOU, J.; ZHANG, L.; THORNE,

- R. F.; CUI, Y.; WU, Y.; WEN, S.; WANG, B. Promoter Methylation-Regulated MiR-145-5p Inhibits Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Progression by Targeting FSCN1. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 27, n. 2, p. 365–379, fev. 2019.
- GOMES, R. N.; COLQUHOUN, A. E series prostaglandins alter the proliferative, apoptotic and migratory properties of T98G human glioma cells in vitro. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 171, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-171>>.
- GOMES, R. N.; SOUZA, F. da C.; COLQUHOUN, A. Eicosanoids and cancer. **Clinics**, v. 73, p. e530s, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1807593222011358>>.
- GRITSCH, S.; BATCHELOR, T. T.; GONZALEZ CASTRO, L. N. Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. **Cancer**, v. 128, n. 1, p. 47–58, 1 jan. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cncr.33918>>.
- GROEN, C. M.; JAYO, A.; PARSONS, M.; TOOTLE, T. L. Prostaglandins Regulate Nuclear Localization of Fascin and Its Function in Nucleolar Architecture. **Molecular biology of the cell**, v. 26, n. 10, p. 1901–1917, maio 2015.
- GROEN, C. M.; SPRACKLEN, A. J.; FAGAN, T. N.; TOOTLE, T. L. Drosophila Fascin Is a Novel Downstream Target of Prostaglandin Signaling during Actin Remodeling. **Molecular biology of the cell**, v. 23, n. 23, p. 4567–4578, dez. 2012.
- GUNAL, A.; ONGURU, O.; SAFALI, M.; BEYZADEOGLU, M. Fascin Expression [Corrected] in Glial Tumors and Its Prognostic Significance in Glioblastomas. **Neuropathology: official journal of the Japanese Society of Neuropathology**, v. 28, n. 4, p. 382–386, ago. 2008.
- GUSEV, Y.; BHUVANESHWAR, K.; SONG, L.; ZENKLUSEN, J.-C.; FINE, H.; MADHAVAN, S. The REMBRANDT study, a large collection of genomic data from brain cancer patients. **Scientific Data**, v. 5, n. 1, p. 180158, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/sdata.2018.158>>.
- HAN, S.; HUANG, J.; LIU, B.; XING, B.; BORDELEAU, F.; REINHART-KING, C. A.; LI, W.; ZHANG, J. J.; HUANG, X.-Y. Improving Fascin Inhibitors to Block Tumor Cell Migration and Metastasis. **Molecular oncology**, v. 10, n. 7, p. 966–980, ago. 2016.

- HASHIMOTO, Y.; KIM, D. J.; ADAMS, J. C. The Roles of Fascins in Health and Disease. **The Journal of pathology**, v. 224, n. 3, p. 289–300, jul. 2011.
- HERCULANO-HOUZEL, S. The Human Brain in Numbers: A Linearly Scaled-up Primate Brain. **Frontiers in human neuroscience**, v. 3, p. 31, 2009.
- HOA, N. T.; GE, L.; ERICKSON, K. L.; KRUSE, C. A.; CORNFORTH, A. N.; KUZNETSOV, Y.; MCPHERSON, A.; MARTINI, F.; JADUS, M. R. Fascin-1 Knock-down of Human Glioma Cells Reduces Their Microvilli/Filopodia While Improving Their Susceptibility to Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity. **American journal of translational research**, v. 7, n. 2, p. 271–284, 2015.
- HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and Integrative Analysis of Large Gene Lists Using DAVID Bioinformatics Resources. **Nature protocols**, v. 4, n. 1, p. 44–57, 2009.
- HUANG, F.-K.; HAN, S.; XING, B.; HUANG, J.; LIU, B.; BORDELEAU, F.; REINHART-KING, C. A.; ZHANG, J. J.; HUANG, X.-Y. Targeted inhibition of fascin function blocks tumour invasion and metastatic colonization. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 7465, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ncomms8465>>.
- HUANG, J.; DEY, R.; WANG, Y.; JAKONCIC, J.; KURINOV, I.; HUANG, X.-Y. Structural Insights into the Induced-Fit Inhibition of Fascin by a Small-Molecule Inhibitor. **Journal of molecular biology**, v. 430, n. 9, p. 1324–1335, abr. 2018.
- ILINA, O.; FRIEDL, P. Mechanisms of collective cell migration at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 18, p. 3203–3208, 15 set. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1242/jcs.036525>>.
- ISHII, N.; MAIER, D.; MERLO, A.; TADA, M.; SAWAMURA, Y.; DISERENS, A. C.; VAN MEIR, E. G. Frequent Co-Alterations of TP53, P16/CDKN2A, P14ARF, PTEN Tumor Suppressor Genes in Human Glioma Cell Lines. **Brain pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 9, n. 3, p. 469–479, jul. 1999.
- JAYO, A.; MALBOUBI, M.; ANTOKU, S.; CHANG, W.; ORTIZ-ZAPATER, E.; GROEN, C.; PFISTERER, K.; TOOTLE, T.; CHARRAS, G.; GUNDERSEN, G. G.; PARSONS, M. Fascin Regulates Nuclear Movement and Deformation in Migrating Cells. **Developmental cell**, v. 38, n. 4, p. 371–383, ago. 2016.
- KABEL, A. M.; MODAIS, K.; SALIM, A.; AHMAD, R.; AHMAD, A.; ALNUMARI, K. A. Astrocytoma: Insights into Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Management. **Journal of Cancer Research and Treatment**, v. 6, n. 3, p. 70–73, 17 ago. 2018. Disponível em: <<http://pubs.sciepub.com/jcrt/6/3/2>>.

- KHAN, Z.; KHAN, N.; TIWARI, R. P.; SAH, N. K.; PRASAD, G. B. K. S.; BISEN, P. S. Biology of Cox-2: An Application in Cancer Therapeutics. **Current drug targets**, v. 12, n. 7, p. 1082–1093, jun. 2011.
- KHOONKARI, M.; LIANG, D.; KAMPERMAN, M.; KRUYT, F. A. E.; VAN RIJN, P. Physics of Brain Cancer: Multiscale Alterations of Glioblastoma Cells under Extracellular Matrix Stiffening. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 5, maio 2022.
- LAMB, M. C.; TOOTLE, T. L. **Fascin in Cell Migration: More Than an Actin Bundling Protein** *Biology* 2020.
- LAWSON, C. D.; PEEL, S.; JAYO, A.; CORRIGAN, A.; IYER, P.; BAXTER DALRYMPLE, M.; MARSH, R. J.; COX, S.; VAN AUDENHOVE, I.; GETTEMANS, J.; PARSONS, M. Nuclear Fascin Regulates Cancer Cell Survival. **eLife**, v. 11, ago. 2022.
- LIN, S.; LU, S.; MULAJ, M.; FANG, B.; KEELEY, T.; WAN, L.; HAO, J.; MUSCHOL, M.; SUN, J.; YANG, S. Monoubiquitination Inhibits the Actin Bundling Activity of Fascin. **The Journal of biological chemistry**, v. 291, n. 53, p. 27323–27333, dez. 2016.
- LIN, S.; TAYLOR, M. D.; SINGH, P. K.; YANG, S. How Does Fascin Promote Cancer Metastasis? **The FEBS journal**, v. 288, n. 5, p. 1434–1446, mar. 2021.
- LIU, C.-A.; CHANG, C.-Y.; HSUEH, K.-W.; SU, H.-L.; CHIOU, T.-W.; LIN, S.-Z.; HARN, H.-J. Migration/Invasion of Malignant Gliomas and Implications for Therapeutic Treatment. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 4, abr. 2018.
- LOUIS, D. N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; CAVENEE, W. K.; BURGER, P. C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B. W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. **Acta neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, ago. 2007.
- LOUIS, D. N.; PERRY, A.; REIFENBERGER, G.; VON DEIMLING, A.; FIGARELLA-BRANGER, D.; CAVENEE, W. K.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; KLEIHUES, P.; ELLISON, D. W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. **Acta neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, jun. 2016.
- LOUIS, D. N.; PERRY, A.; WESSELING, P.; BRAT, D. J.; CREE, I. A.; FIGARELLA-BRANGER, D.; HAWKINS, C.; NG, H. K.; PFISTER, S. M.; REIFENBERGER, G.; SOFFIETTI, R.; VON DEIMLING, A.; ELLISON, D. W. The 2021 WHO

- Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. **Neuro-oncology**, v. 23, n. 8, p. 1231–1251, ago. 2021.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951.
- MA, Y.; LI, A.; FALLER, W. J.; LIBERTINI, S.; FIORITO, F.; GILLESPIE, D. A.; SANSOM, O. J.; YAMASHIRO, S.; MACHESKY, L. M. Fascin 1 Is Transiently Expressed in Mouse Melanoblasts during Development and Promotes Migration and Proliferation. **Development (Cambridge, England)**, v. 140, n. 10, p. 2203–2211, maio 2013.
- MACHESKY, L. M.; LI, A. Fascin: Invasive Filopodia Promoting Metastasis. **Communicative & integrative biology**, v. 3, n. 3, p. 263–270, maio 2010.
- MADHAVAN, S.; GUSEV, Y.; HARRIS, M.; TANENBAUM, D. M.; GAUBA, R.; BHUVANESHWAR, K.; SHINOHARA, A.; ROSSO, K.; CARABET, L. A.; SONG, L.; RIGGINS, R. B.; DAKSHANAMURTHY, S.; WANG, Y.; BYERS, S. W.; CLARKE, R.; WEINER, L. M. G-DOC: A Systems Medicine Platform for Personalized Oncology. **Neoplasia**, v. 13, n. 9, p. 771–783, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1476558611800308>>.
- MARSHALL, O. J. PerlPrimer: Cross-Platform, Graphical Primer Design for Standard, Bisulphite and Real-Time PCR. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 20, n. 15, p. 2471–2472, out. 2004.
- MAURITZ, I.; WESTERMAYER, S.; MARIAN, B.; ERLACH, N.; GRUSCH, M.; HOLZMANN, K. Prostaglandin E2 stimulates progression-related gene expression in early colorectal adenoma cells. **British Journal of Cancer**, v. 94, n. 11, p. 1718–1725, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603146>>.
- MAYOR, R.; ETIENNE-MANNEVILLE, S. The Front and Rear of Collective Cell Migration. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 17, n. 2, p. 97–109, fev. 2016.
- Mechanobiology Institute. **MBInfo**. Universidade Nacional de Singapura. Singapura. Disponível em: <https://www.mechanobio.info/what-is-mechanosignaling/what-is-the-extracellular-matrix-and-the-basal-lamina/what-are-focal-adhesions/what-is-the-role-of-rho-gtpases-in-the-regulation-of-focal-adhesion-assembly/>. Acesso em: 10 de novembro de 2022.

- MEJILLANO, M. R.; KOJIMA, S.; APPLEWHITE, D. A.; GERTLER, F. B.; SVITKINA, T. M.; BORISY, G. G. Lamellipodial versus Filopodial Mode of the Actin Nanomachinery: Pivotal Role of the Filament Barbed End. **Cell**, v. 118, n. 3, p. 363–373, ago. 2004.
- MENTER, D. G.; DUBOIS, R. N. Prostaglandins in Cancer Cell Adhesion, Migration, and Invasion. **International journal of cell biology**, v. 2012, p. 723419, 2012.
- MENTLEIN, R.; HATTERMANN, K.; HELD-FEINDT, J. Lost in Disruption: Role of Proteases in Glioma Invasion and Progression. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1825, n. 2, p. 178–185, abr. 2012.
- MILLER, K. D.; OSTROM, Q. T.; KRUCHKO, C.; PATIL, N.; TIHAN, T.; CIOFFI, G.; FUCHS, H. E.; WAITE, K. A.; JEMAL, A.; SIEGEL, R. L.; BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 5, p. 381–406, 1 set. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3322/caac.21693>>.
- NOURSHARGH, S.; ALON, R. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. **Immunity**, v. 41, n. 5, p. 694–707, nov. 2014.
- OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 19, n. 4, p. 764–772, fev. 2013.
- PANAGOPOULOS, A. T.; GOMES, R. N.; ALMEIDA, F. G.; DA COSTA SOUZA, F.; VEIGA, J. C. E.; NICOLAOU, A.; COLQUHOUN, A. The prostanoid pathway contains potential prognostic markers for glioblastoma. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 137, p. 52–62, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S109888231830042X>>.
- PARK, K.-S.; LEE, H. W.; PARK, S.-H.; PARK, T. I.; HWANG, J.-H. The Clinical Significance of Fascin Expression in a Newly Diagnosed Primary Glioblastoma. **Journal of neuro-oncology**, v. 129, n. 3, p. 495–503, set. 2016.
- PEDROTE, M. M.; MOTTA, M. F.; FERRETTI, G. D. S.; NORBERTO, D. R.; SPOHR, T. C. L. S.; LIMA, F. R. S.; GRATTON, E.; SILVA, J. L.; DE OLIVEIRA, G. A. P. Oncogenic Gain of Function in Glioblastoma Is Linked to Mutant P53 Amyloid Oligomers. **iScience**, v. 23, n. 2, p. 100820, fev. 2020.
- PERAUD, A.; MONDAL, S.; HAWKINS, C.; MASTRONARDI, M.; BAILEY, K.; RUTKA, J. T. Expression of Fascin, an Actin-Bundling Protein, in Astrocytomas of Varying Grades. **Brain tumor pathology**, v. 20, n. 2, p. 53–58, 2003.

- PFAFFL, M. W. A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, maio 2001.
- PONTÉN, J.; MACINTYRE, E. H. Long Term Culture of Normal and Neoplastic Human Glia. **Acta pathologica et microbiologica Scandinavica**, v. 74, n. 4, p. 465–486, 1968.
- RAFTOPOULOU, M.; HALL, A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. **Developmental Biology**, v. 265, n. 1, p. 23–32, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001216060300544X>>.
- RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of Apoptosis by Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry. **Nature protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458–1461, 2006.
- RONG, Y.; DURDEN, D. L.; VAN MEIR, E. G.; BRAT, D. J. ‘Pseudopalisading’ Necrosis in Glioblastoma: A Familiar Morphologic Feature That Links Vascular Pathology, Hypoxia, and Angiogenesis. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 65, n. 6, p. 529–539, 1 jun. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/00005072-200606000-00001>>.
- SAAD, A.; BIJIAN, K.; QIU, D.; DA SILVA, S. D.; MARQUES, M.; CHANG, C.-H.; NASSOUR, H.; RAMOTAR, D.; DAMARAJU, S.; MACKEY, J.; BISMAR, T.; WITCHER, M.; ALAOUI-JAMALI, M. A. Insights into a Novel Nuclear Function for Fascin in the Regulation of the Amino-Acid Transporter SLC3A2. **Scientific reports**, v. 6, p. 36699, nov. 2016.
- SCHMIDT, E. E.; ICHIMURA, K.; GOIKE, H. M.; MOSHREF, A.; LIU, L.; COLLINS, V. P. Mutational Profile of the PTEN Gene in Primary Human Astrocytic Tumors and Cultivated Xenografts. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 58, n. 11, p. 1170–1183, nov. 1999.
- SENGUPTA, S.; PARENT, C. A.; BEAR, J. E. The principles of directed cell migration. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 22, n. 8, p. 529–547, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41580-021-00366-6>>.
- SHERMAN, B. T.; HAO, M.; QIU, J.; JIAO, X.; BASELER, M. W.; LANE, H. C.; IMAMICHI, T.; CHANG, W. DAVID: A Web Server for Functional Enrichment Analysis and Functional Annotation of Gene Lists (2021 Update). **Nucleic acids research**, v. 50, n. W1, p. W216-21, mar. 2022.
- SHIH, W.; YAMADA, S. N-Cadherin as a Key Regulator of Collective Cell Migration in a 3D Environment. **Cell adhesion & migration**, v. 6, n. 6, p. 513–517, 2012.

- SOFRONIEW, M. V. Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. **Trends in immunology**, v. 41, n. 9, p. 758–770, set. 2020.
- STEIN, G. H. T98G: An Anchorage-Independent Human Tumor Cell Line That Exhibits Stationary Phase G1 Arrest in Vitro. **Journal of cellular physiology**, v. 99, n. 1, p. 43–54, abr. 1979.
- STUPP, R.; HEGI, M. E.; MASON, W. P.; VAN DEN BENT, M. J.; TAPHOORN, M. J. B.; JANZER, R. C.; LUDWIN, S. K.; ALLGEIER, A.; FISHER, B.; BELANGER, K.; HAU, P.; BRANDES, A. A.; GIJTENBEEK, J.; MAROSI, C.; VECHT, C. J.; MOKHTARI, K.; WESSELING, P.; VILLA, S.; EISENHAUER, E.; GORLIA, T.; WELLER, M.; LACOMBE, D.; CAIRNCROSS, J. G.; MIRIMANOFF, R.-O. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 5, p. 459–466, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470204509700257>>.
- STUPP, R.; MASON, W. P.; VAN DEN BENT, M. J.; WELLER, M.; FISHER, B.; TAPHOORN, M. J. B.; BELANGER, K.; BRANDES, A. A.; MAROSI, C.; BOGDHORN, U.; CURSCHMANN, J.; JANZER, R. C.; LUDWIN, S. K.; GORLIA, T.; ALLGEIER, A.; LACOMBE, D.; CAIRNCROSS, J. G.; EISENHAUER, E.; MIRIMANOFF, R. O. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **The New England journal of medicine**, v. 352, n. 10, p. 987–996, mar. 2005.
- TANG, J.; HE, D.; YANG, P.; HE, J.; ZHANG, Y. Genome-Wide Expression Profiling of Glioblastoma Using a Large Combined Cohort. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 15104, out. 2018.
- VILLARI, G.; JAYO, A.; ZANET, J.; FITCH, B.; SERRELS, B.; FRAME, M.; STRAMER, B. M.; GOULT, B. T.; PARSONS, M. A Direct Interaction between Fascin and Microtubules Contributes to Adhesion Dynamics and Cell Migration. **Journal of cell science**, v. 128, n. 24, p. 4601–4614, dez. 2015.
- WANG, D.; DUBOIS, R. N. Prostaglandins and Cancer. **Gut**, v. 55, n. 1, p. 115–122, jan. 2006.
- WANG, Q.; MORRIS, R. J.; BODE, A. M.; ZHANG, T. Prostaglandin Pathways: Opportunities for Cancer Prevention and Therapy. **Cancer Research**, v. 82, n. 6,

p. 949–965, 15 mar. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-2297>>.

- XU, S.; LU, J.; SHAO, A.; ZHANG, J. H.; ZHANG, J. Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 294, 2020.
- YANG, S.; GAO, K.; LI, W. Identification of Hub Genes and Pathways in Glioblastoma by Bioinformatics Analysis. **Oncology letters**, v. 17, n. 1, p. 1035–1041, jan. 2019.
- YANG, S.; HUANG, F.-K.; HUANG, J.; CHEN, S.; JAKONCIC, J.; LEO-MACIAS, A.; DIAZ-AVALOS, R.; CHEN, L.; ZHANG, J. J.; HUANG, X.-Y. Molecular Mechanism of Fascin Function in Filopodial Formation. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 1, p. 274–284, jan. 2013.
- ZHANG, H.; CONG, Q.-X.; ZHANG, S.-G.; ZHAI, X.-W.; LI, H.-F.; LI, S.-Q. High Expression Levels of Fascin-1 Protein in Human Gliomas and Its Clinical Relevance. **Open medicine (Warsaw, Poland)**, v. 13, p. 544–550, 2018.
- ZIMMERMANN, D. R.; DOURS-ZIMMERMANN, M. T. Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 130, n. 4, p. 635–653, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00418-008-0485-9>>.