

PAPEL DA *STRESS INDUCIBLE PHOSPHOPROTEIN ONE* (STI1) E DA PROTEÍNA PRION CELULAR NA ANGIOGÊNESE TUMORAL

RODRIGO TEODORO CARTAXO

Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Tiago Góss dos Santos

São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Cartaxo, Rodrigo Teodoro

Papel da *Stress Inducible Phosphoprotein One (STI1)* e da proteína prion celular na angiogênese tumoral / Rodrigo Teodoro Cartaxo – São Paulo, 2018.

237p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.

Orientador: Tiago Góss dos Santos

Descritores: 1. Proteína de Prion/Prion Proteins. 2. Glioma/Glioma.
3. Neovascularização Patológica/Neovascularization, Pathologic.
4. Stress-induced-phosphoprotein 1, human.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, com quem tenho aprendido
que os dissabores da vida enriquecem a
caminhada, e que fé e confiança em si próprio são
tudo o que temos para seguir em frente.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Tiago Góss dos Santos, por ter me dado uma oportunidade no momento em que mais precisava, e por ter confiado em mim desde o início, permitindo que eu tivesse espaço para tomar decisões e, assim, amadurecesse meu senso crítico e minhas habilidades científicas. Objetividade na organização das ideias talvez tenha sido o meu maior aprendizado com ele durante o doutorado. Infelizmente, não pudemos evitar as falhas que trazemos nesta tese, mas a experiência da frustração também tem seu valor, e tenho convicção de que isso me levará mais longe na próxima jornada.

Ao Centro Internacional de Pesquisas (CIPE) do A.C. Camargo Cancer Center, por disponibilizar uma infraestrutura física incrível, que viabilizou a rápida implementação de tantos métodos distintos, descritos nesta tese, necessários a uma maior abrangência do processo de angiogênese tumoral, linha de pesquisa que ainda não havia sido abordada, em profundidade, pela instituição.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Cartaxo RT. **Papel da *Stress Inducible Phosphoprotein One (STI1)* e da proteína prion celular na angiogênese tumoral**. São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Proteínas multifuncionais podem ser consideradas uma vantagem evolutiva celular, ao passo que uma única proteína divide-se, simultaneamente, entre suas funções intracelulares e a sinalização extracelular para complementar mecanismos de responsividade tecidual. No papel de co-chaperona, a STI1 se complexa com HSP70/90, auxiliando no dobramento de proteínas. Reciprocamente, a secreção não convencional da STI1, em geral associada a vesículas extracelulares, permite a sua integração dinâmica com a demanda fisiológica pelas suas funções neurotróficas, ou até vasculogênicas, pelo recrutamento de precursores endoteliais para a regeneração do tecido cerebral durante a isquemia, sendo ambas mediadas via receptor PrP^C (proteína príon). Em glioblastomas, a sinalização via STI1-PrP^C também se mostrou determinante para a progressão tumoral. Dessa maneira, a STI1 apresenta um grande potencial de estudo como agente regulador dos processos angiogênicos tumorais em glioblastomas. As funções da STI1 foram avaliadas no modelo de glioma murino GL261 *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* em relação à invasão perivascular e à angiogênese peritumoral. A secreção de STI1 pelas células GL261 ocorre de maneira abundante, em sua maior parte na forma solúvel, não associada a vesículas extracelulares, por mecanismos ainda a serem desvendados, mas não controlados por hipóxia. O papel da STI1 no estímulo à angiogênese sobre células endoteliais foi verificado em ensaios de formação de tubos (2D) e microvasos (3D) e em anéis aórticos. Porém, a contaminação por LPS nas preparações bacterianas de STI1 recombinante tornou inválidos nossos esforços e os ensaios foram interrompidos. Os ensaios *in vivo* foram realizados por meio da injeção intracerebral (ortotópica) de células GL261 em animais tipo-selvagem, haploinsuficientes (STI1^{+/-}) e superexpressores de STI1 (TgA). A sobrevivência dos animais STI1^{+/-} e TgA foi estatisticamente superior a dos animais tipo-selvagem. Imunofluorescências com o marcador de células endoteliais CD31 indicaram uma maior vascularização

intratumoral nos animais STI1^{+/-}, enquanto animais TgA apresentaram marcação menor que animais tipo-selvagem. Tratamentos com anticorpos neutralizantes para STI1, da mesma forma que implantes ortotópicos de GL261 em animais deficientes para PrP^C (PrP^{0/0}), não produziram alterações no crescimento tumoral, que apresentou o mesmo padrão de invasão perivascular e de angiogênese peritumoral. A ausência de resposta também se reproduziu nos ensaios *ex vivo* dos tumores de GL261, a partir de co-culturas organotípicas com fatias de cérebros de animais STI1^{+/-} e PrP^{0/0}, em relação aos animais tipo-selvagem. Como abordagem final, as células GL261, previamente silenciadas para a expressão de STI1 ou HIF-1 α , foram implantadas ortotopicamente no cérebro de animais tipo-selvagem. Apesar de terem sido selecionados os clones com menor nível de expressão de cada proteína, novamente não se verificaram alterações do crescimento tumoral e da angiogênese. Em conjunto, os resultados indicam que a proteína STI1 não possui efeito sobre o crescimento dos tumores de GL261, especialmente no que diz respeito à invasão perivascular e a vascularização intra/peritumoral. Linhagens celulares, porém, como a GL261, podem perder sua assinatura genética pela pressão seletiva a que são submetidas durante o seu período em cultura, o que compromete a sua representatividade *in vivo* em relação ao fenótipo tumoral infiltrativo próprio dos gliomas. A função extracelular de STI1 como modulador da angiogênese sobre células endoteliais ainda pode ser determinada com a utilização de proteína recombinante livre de LPS, ou sendo esta produzida por sistema heterólogo não-bacteriano.

SUMMARY

Cartaxo RT. **[The role of Stress Inducible Phosphoprotein One (STI1) and cellular prion protein in tumor angiogenesis]**. São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Multifunctional proteins might provide cells with an evolutionary advantage since a sole protein engages in concerted mechanisms of tissue responsiveness by simultaneously acting as a mediator of complementary intracellular and extracellular signaling pathways. Intracellularly, the co-chaperone STI1 is an adaptor protein that aids in the folding of client proteins through the HSP90/70 complex. Conversely, the availability of cellular stocks of STI1 enables its dynamic mobilization by unconventional secretion, mostly associated with extracellular vesicles, in order to meet physiological demands extracellularly. Originally described as a neurotrophic growth factor, STI1 also holds vasculogenic functions, given the recruitment of endothelial progenitor cells positive for PrP^C (prion protein) receptors from bone marrow to ischemic regions of mice brain, where it prompts vascular and functional recovery. In glioblastomas, signaling via STI1-PrP^C axis was also showed to govern tumor progression. Thus, STI1 represents a potential target for modulation of tumor angiogenesis in glioblastomas (GBMs). We used the GL261 murine GBM cell line as an *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* model to evaluate the role of STI1 in certain aspects of perivascular invasion and peritumoral angiogenesis. GL261 cells secrete large amounts of freely soluble STI1, which is not influenced by hypoxia, and a small proportion associated to extracellular vesicles, in agreement with previously studied human GBM cell lines, although the mechanism for this protein segregation is still unknown. Recombinant STI1 apparently stimulated the endothelial sprouting as verified in 2D and 3D *in vitro* assays (matrigel tube formation and microcarrier-based microvessels formation), besides 3D *ex vivo* aortic ring assays. However, during these experiments, we found our recombinant protein with a high level of LPS contamination, due to failures in the established purification techniques used to process our bacterial preparations, which prevented the confirmation of STI1 as a pro-angiogenic factor. Orthotopic tumors were obtained by intracerebral injection of GL261

cells in wild-type, superexpressing STI1 (TgA) and haploinsufficient for STI1 (STI1^{+/-}) C57BL/6J mice. Survival of STI1^{+/-} and TgA mice was statistically higher compared to wild-type ones. Immunofluorescence staining of brain tissue sections with the endothelial cell marker CD31 revealed enhanced intratumoral vascularization, related to the wild-type controls, in STI1^{+/-} mice, whereas TgAs presented as the least vascularized. Despite variations in intratumoral vascularization, tumor growth remained encapsulated within the brain parenchyma, without the typical diffuse infiltration of GBMs associated with peritumoral angiogenesis. Even when tumors in wild-type mice were treated with neutralizing antibody for STI1, or GL261 cells were orthotopically implanted in PrP^{0/0} mice brains, tumor histology remained the same, reproducing results from organotypic co-cultures of wild-type, STI1^{+/-} and PrP^{0/0} mice brain slices with GL261 tumors *ex vivo*. Unexpectedly, the highest knockdown of STI1 or HIF-1 α obtained by lentiviral transduction in selected GL261 cell clones equally produced no effect over orthotopic tumor growth, perivascular invasion, and both intratumoral and peritumoral angiogenesis in wild-type mice brains. Taken together, our results show that STI1 might not affect GL261 tumor growth, and also raises conceptual caveats to the experimental utility of cancer cell lines as an *in vivo* representative of tumor phenotype. Future experiments might reveal the true angiogenic potential of LPS-free recombinant STI1 produced by a non-bacterial heterologous system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classificação histológico-molecular dos diferentes tipos de gliomas.....	25
Figura 2	Inter-relação entre vias de sinalização compensatórias de GBMs para a sobrevivência celular e crescimento tumoral.....	32
Figura 3	Mecanismo de reprogramação celular do tecido endotelial para a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese fisiológica)	48
Figura 4	Mecanismo de ativação de HIF-1 α durante a hipóxia.....	52
Figura 5	Diversidade da sinalização inter-celular dentro do microambiente tumoral para adaptação das células tumorais e controle das respostas angiogênicas.....	58
Figura 6	Perfil infiltrativo dos GBMs por redes neurais ou vasculares formando as estruturas secundárias de Scherer decorrentes da sua disseminação pelo cérebro associada a essas estruturas pré-existentes.....	69
Figura 7	Modelo hidrodinâmico de migração das células dos gliomas e sua possível contribuição para as variações histopatológicas tumorais em diferentes regiões cerebrais.....	72
Figura 8	Metabolismo glicolítico e glutamatérgico compartilhado entre neurônios e astrócitos, de modo que estes formam a barreira hematoencefálica com os vasos sanguíneos, mas se encontram dissociados dessa pela invasão perivascular de células dos gliomas	78
Figura 9	Sistema de infusão de fármacos por bombas micro-osmóticas Alzet [®]	130
Figura 10	Imunofluorescência <i>in toto</i> (whole mount) da vascularização de embriões E10.5 com expressão de STI1 em diferentes níveis constitutivos	135
Figura 11	Perfil de secreção de STI1 no meio condicionado por <i>Western blot</i>	136
Figura 12	Comparação entre as eficiências dos métodos de extração de proteínas, a partir da linhagem LN18, para a detecção de HIF-1 α por <i>Western blot</i>	139
Figura 13	Teste de especificidade da detecção de HIF-1 α por <i>Western blot</i> utilizando anticorpos anti- HIF-1 α de diferentes marcas/catálogos.....	140

Figura 14	Expressão de HIF-1 α por <i>Western blot</i> na linhagem LN18 submetida a diferentes tempos de hipóxia ou de tratamento com CoCl ₂ 400 μ M (controle positivo)	141
Figura 15	Expressão de p-STAT3 e p-ERK por <i>Western blot</i> na linhagem LN18 submetida a diferentes tempos de hipóxia ou de tratamento com CoCl ₂ 400 μ M (controle positivo)	142
Figura 16	Secreção de STI1 total no meio condicionado de GL261, e sua expressão nessas células, durante normóxia e hipóxia, avaliadas por <i>Western blot</i>	143
Figura 17	Padronização das condições do ensaio de formação de tubos com o matrigel HC	145
Figura 18	Quantificação do número de elementos de vasos formados pelas HUVECs em Matrigel HC após os tratamentos com SFB, BSA, STI1- Δ e STI1, que foram incorporados à matriz ou adicionados às células sobre esta plaqueadas	146
Figura 19	Quantificação do número de elementos de vasos formados pelas HUVECs em Matrigel Basal após os tratamentos com SFB, STI1- Δ e STI1, que foram adicionados às células plaqueadas sobre a matriz	147
Figura 20	Quantificação do número de elementos de vasos formados pelas HUVECs em Matrigel GFR após os tratamentos com SFB e STI1, que foram adicionados às células plaqueadas sobre a matriz	149
Figura 21	Angiogênese em gel de fibrina: Culturas 3D em microcarreadores e Tumores Pré-Vascularizados.....	153
Figura 22	Anéis aórticos de neonatos (P6) de C57BL/6J STI1 ^{+/+} com ramificações de microvasos, marcados por IB ₄ -Alexa Fluor [®] 488, após o tratamento com o controle positivo (VEGF 30 ng/mL), ou diferentes concentrações de STI1 e STI1 Δ , e cultura por 7 dias	155
Figura 23	Anéis aórticos de neonatos (P6) de C57BL/6J STI1 ^{+/-} (haploinsuficientes) com ramificações de microvasos, marcados por IB ₄ -Alexa Fluor [®] 488, após o tratamento com o controle positivo (VEGF 30 ng/mL), ou diferentes concentrações de STI1 e STI1 Δ , e cultura por 7 dias.....	156
Figura 24	Anéis aórticos de neonatos (P6) de C57BL/6J PrP ^{0/0} com ramificações de microvasos, marcados por IB ₄ -Alexa Fluor [®] 488, após o tratamento com o controle	

	positivo (VEGF 30 ng/mL), ou diferentes concentrações de STI1 e STI1Δ, e cultura por 7 dias	157
Figura 25	Anéis aórticos de neonatos (P6) de C57BL/6J STI1 ^{+/+} com ramificações de microvasos visualizadas por microscopia de campo claro após o tratamento, e cultura por 7 dias, com diferentes concentrações de LPS, proporcionais às encontradas nas diluições de STI1 que apresentaram efeito, em comparação com a própria STI1 e o controle positivo (VEGF 30 ng/mL)	159
Figura 26	Imunodepleção de STI1 do meio condicionado de GL261 por <i>beads</i> magnéticas.....	161
Figura 27	Curva de crescimento <i>in vivo</i> de tumores ortotópicos de GL261-LUC em camundongos C57BL/6J avaliada por bioluminescência.....	163
Figura 28	Crescimento de tumores ortotópicos de GL261-LUC em camundongos C57BL/6J WT, STI1 ^{+/-} e TgA acompanhado por bioluminescência	165
Figura 29	Vascularização dos tumores ortotópicos de GL261-LUC em camundongos C57BL/6J WT, STI1 ^{+/-} e TgA observada através da marcação específica de endotélio com CD31 (Alexa Fluor [®] 488) por imunofluorescência dos cortes congelados (5 μm) de cérebro	167
Figura 30	Esquema representativo da hipótese sobre a hipervascularização dos tumores ortotópicos de GL261-LUC em camundongos C57BL/6J STI1 ^{+/-} previamente observada por imunofluorescência	168
Figura 31	Microvasculatura cerebral ao redor dos implantes de astrócitos (controle negativo), ou células GL261-RFP, em fatias de cérebro provenientes de camundongos C57BL/6J neonatos (P6-P7) avaliada por imunofluorescência.....	170
Figura 32	Perfil vascular das culturas organotípicas de cérebro de camundongos C57BL/6J WT, STI1 ^{+/-} e PrP ^{0/0} neonatos (P6-P7), e seu grau de responsividade aos implantes de GL261-RFP e astrócitos (controle negativo), ou tratamento com VEGF (controle positivo), avaliado por imagens de projeções 2D da vasculatura (séries Z) obtidas a partir da imunofluorescência com anti-laminina (Alexa Fluor [®] 488) por microscopia confocal.....	172

Figura 33	Crescimento de tumores ortotópicos de GL261-LUC em camundongos C57BL/6J WT, PrP ^{0/0} e WT-C2 em resposta ao tratamento intratumoral com anti-STI1 por bombas micro-osmóticas.....	175
Figura 34	Detecção de células GL261 expostas a condições de hipóxia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> utilizando o kit Hypoxyprobe TM e marcação por imunofluorescência.....	176
Figura 35	Padrões histológicos de tumores ortotópicos de GL261-RFP em camundongos C57BL/6J que variam em função de métodos distintos de implantação das células em regiões alternadas do cérebro, conforme observado por imunofluorescência.....	181
Figura 36	Níveis de silenciamento de STI1 e HIF-1 α avaliados por <i>Western blot</i> após transdução lentiviral de células GL261-RFP com 5 clones virais para cada proteína.....	188
Figura 37	Níveis de silenciamento de STI1 analisados por <i>Western blot</i> em clones derivados dos <i>pools</i> 456 (4C1-14) e 567 (5C1-18).....	190
Figura 38	Níveis de silenciamento de HIF-1 α analisados por <i>Western blot</i> em clones derivados do <i>pool</i> 220 (2C1-18) previamente tratados com CoCl ₂ 400 μ M por 16h (CC16).....	191
Figura 39	Níveis de silenciamento de HIF-1 α nos clones do <i>pool</i> 220 selecionados para reavaliação por <i>Western blot</i>	193
Figura 40	Níveis de expressão de STI1 nos clones com <i>knockdown</i> de STI1 e HIF-1 α selecionados para reavaliação, e níveis de ativação de HIF-1 α pelos clones deficientes em STI1 selecionados.....	194
Figura 41	Estágio final de formação dos tumores ortotópicos de GL261-RFP WT, shSTI1 ou shHIF-1 α em camundongos C57BL/6J e sua vascularização, comparados com tumores das linhagens GL26 e GL261 retratados na literatura.....	196
Figura 42	Análise histológica de tumores ortotópicos de GL261-RFP em camundongos C57BL/6J pela coloração de cortes de cérebro (5 μ m) com hematoxilina-eosina (H&E).....	197

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
CSC	Cancer Stem Cell
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EBM-2	Endothelial Growth Basal Medium
ECM	Extracellular Matrix
EGM-2	Endothelial Cell Growth Medium-2
EU	Endotoxin Units
FAP	Fundação Antônio Prudente
FGF	Fibroblast Growth Factor
GBM	Glioblastoma
GL261	Glioma 261
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HIF-1α	Hypoxia-inducible factor 1 α
HSP	Heat Shock Proteins
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LGG	Low Grade Gliomas
LPS	Lipopolysaccharide
LUC	Luciferase
MEM	Minimum Essential Medium
MOI	Multiplicity of Infection
NOS	Not Otherwise Specified
NSC	Neural Stem Cells
NT	Non-Target
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate-Buffered Saline

PFA	Paraformaldehyde
PrP^C	Cellular Prion Protein
RFP	Red Fluorescent Protein
RPM	Rotações por Minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
shRNA	Short Hairpin RNA
SNC	Sistema Nervoso Central
STI1	Stress Inducible Phosphoprotein 1
TBS	Tris-Buffered Saline
TCA	Trichloroacetic Acid
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization
WT	Wild-Type
ZSV	Zona Sub-Ventricular

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Gliomas: Da Origem a sua Classificação Integrada Histopatológica-Genotípica	1
1.2	Glioblastomas: Perfis Moleculares revelando Biomarcadores e Alvos Terapêuticos	27
1.3	Heterogeneidade Celular nos GBMs e sua reprodutibilidade em Modelos Animais.....	44
1.4	Angiogênese como Resposta Tumoral à Hipóxia.....	46
1.5	Glioblastomas: Da Invasão Perivascular inicial à Hipóxia tardia induzindo angiogênese.....	59
1.6	Glioblastomas: Invasividade Tumoral e a Importância de sua Abordagem Terapêutica	63
1.7	A proteína STI1	79
1.8	STI1 e sua interação com a proteína prion celular	80
1.9	Secreção de STI1 como resposta à isquemia	81
1.10	STI1 como Proteína Bifuncional?	82
1.11	Modelos <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i> para o estudo da Angiogênese.....	84
1.12	Modelo de GL261 <i>in vivo</i> para estudo do Glioblastoma	89
2	JUSTIFICATIVA	92
3	OBJETIVO	93
3.1	Objetivo Geral.....	93
3.2	Objetivos Específicos	93
4	MATERIAIS E MÉTODOS	96
4.1	Animais e genotipagem	96
4.2	Cultura de Células	96

4.3	Geração de linhagens GL261 modificadas por Transdução Lentiviral	97
4.3.1	GL261-Luciferase	97
4.3.2	GL261 shSTI1 e shHIF-1 α : Knockdown e Seleção dos Clones	98
4.4	Produção de STI1 e STI1- Δ Recombinantes.....	100
4.5	Dosagem de LPS nas preparações de STI1 e STI1- Δ recombinantes.....	102
4.6	Depleção de STI1 do meio condicionado de GL261	103
4.7	Isolamento de Células Endoteliais Microvasculares de Cérebro de Camundongo (MBMEC)	106
4.8	Ensaio de Formação de Tubos Endoteliais em Matrigel – Angiogênese <i>in vitro</i>	109
4.9	Ensaio de Angiogênese 3D sobre beads em gel de fibrina	110
4.10	Modelo Tridimensional <i>in vitro</i> de Tumores Prevascularizados (PVT).....	111
4.11	Ensaio de Anel Aórtico	113
4.12	Culturas primárias de astrócitos	114
4.13	Culturas Organotípicas de Cérebro de Camundongo e Co-Culturas com GL261	115
4.14	Isolamento de Exossomos do Meio Condicionado de GL261 para análise da secreção de STI1	118
4.15	Análise por Western blot da expressão e secreção de STI1 e da resposta celular à hipóxia	119
4.16	Imunofluorescência para marcação <i>in vitro</i> de GL261 submetidas à hipóxia	122
4.17	Implantes ortotópicos intracerebrais de células GL261	123
4.17.1	Protocolo 1	123
4.17.2	Protocolo 2	124
4.18	Implantação de bombas micro-osmóticas para tratamento intratumoral com anti-STI1	127

4.19	Perfusão dos animais para fixação dos tecidos e processamento dos cérebros dos camundongos para análise histológica por coloração com hematoxilina-eosina e imunofluorescência.....	131
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	134
5.1	Secreção de STI1 por GL261	136
5.2	Resposta das células GL261 à hipóxia.....	137
5.3	Efeito da STI1 recombinante sobre a formação de estruturas vasculares por ensaios <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>	143
5.3.1	Ensaio de formação de tubos em Matrigel	144
5.3.2	Angiogênese em gel de fibrina: Culturas 3D em Microcarreadores e Tumores Pré-Vascularizados (PVT)	151
5.3.3	Ensaio de Anel Aórtico	154
5.4	Implantes Intracerebrais Ortotópicos de células GL261 e Crescimento Tumoral <i>in vivo</i> : Correlação com o remodelamento vascular <i>ex vivo</i>	162
5.5	Implantes Ortotópicos de células GL261 silenciadas para STI1 e HIF-1 α	185
6	CONCLUSÕES	206
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	208

1 INTRODUÇÃO

1.1 GLIOMAS: DA ORIGEM A SUA CLASSIFICAÇÃO INTEGRADA HISTOPATÓLOGICA-GENOTÍPICA

Entre os tumores que se desenvolvem no cérebro, ou demais regiões do sistema nervoso central (SNC), existe uma distinção clara relacionada às células neoplásicas de origem: provenientes de metástases de outros órgãos, ou dos próprios precursores neurogliais, constituindo os tumores genuinamente primários, que derivam dos tecidos onde são estabelecidos (WELLER et al. 2015). As metástases cerebrais são provocadas por 20-40% dos tumores em estágio avançado, mais comumente pelos carcinomas de pulmão e mama, que são aqueles de maior incidência em todo o mundo, segundo dados do GLOBOCAN 2012 (*Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*), além dos melanomas de pele malignos (NAYAK et al. 2012; FERLAY et al. 2015). Apesar de representarem apenas 2% da incidência mundial relativa a outros tipos de câncer, os melanomas malignos, que podem ser facilmente evitáveis e tratados com maior eficácia terapêutica (WEBSTER e MENTZER 2014; SCHADENDORF et al. 2015), ainda evoluem para formas de estágio avançado e de prognóstico ruim, assim como os próprios tumores de SNC, também considerados raros, que são, portanto, proporcionalmente menos frequentes que os tumores de etiologia extracraniana, os quais ocorrem com frequência 5-10 vezes maior que os tumores cerebrais primários. Destes, os meningiomas e gliomas, ou tumores de células gliais, são os tipos mais comuns, os últimos contabilizando cerca de 30% de todos os casos, sendo 80% destes com perfil maligno, os quais respondem pela maioria das mortes causadas por esse tipo de tumor (WELLER et al. 2015).

As células gliais foram primeiro descritas no século XIX como uma espécie de tecido conectivo preenchendo os espaços entre as redes neuronais (corpos celulares, dendritos e axônios), razão pela qual ganharam

este nome baseado no termo grego “glía”, que encontra um correspondente direto no inglês “glue”, ou cola em português, refletindo a tese da época de que essas células teriam a função de manter o tecido cerebral coeso (JÄKEL e DIMOU 2017). Sua importância, no entanto, vai muito além disso, ao ocuparem porção substancial do sistema nervoso central de mamíferos adultos, constituindo cerca de 50% da massa cerebral humana, o que pode variar em função da densidade neuronal, também ligada ao perfil de tamanhos variáveis dos neurônios entre as diferentes estruturas cerebrais, podendo chegar, proporcionalmente, a 92% em regiões fora do córtex cerebral e cerebelo, embora a densidade das próprias células gliais se mantenha constante independente das estruturas onde se encontrem. Considera-se que tal relação glia/neurônios se estabelece, durante o período pós-natal, pela consolidação do arcabouço neuronal, quando precursores gliais passam a ser responsáveis por expandir a massa cerebral, até que esta atinja seu volume definido evolutivamente, e os progenitores gliais cheguem a uma densidade ideal para cessar a sua proliferação, que será a mesma, independente da densidade neuronal, para o mesmo volume ocupado em diferentes estruturas cerebrais (HERCULANO-HOUZEL 2014). Do ponto de vista histológico/funcional, as células gliais podem ser divididas em diferentes tipos celulares com funções específicas na manutenção neuronal, formando sub-populações espacialmente bem segregadas: astrócitos, oligodendrócitos (mais abundantes no córtex cerebral), células ependimais, micróglia e progenitores NG2-glia (JÄKEL e DIMOU 2017). Astrócitos, como o nome sugere, são células de morfologia estrelada que desempenham funções essenciais, entre elas, como componente da barreira hemato-encefálica, na viabilidade de neurônios, em processos relacionados a formação, intensidade e *turnover* de sinapses. Os oligodendrócitos são responsáveis pela produção e envelopamento dos axônios com a bainha de mielina, para a condução saltatória dos potenciais de ação, além de contribuir para a integridade axonal, ao fornecer lactato (sub-produto de seu metabolismo) para os neurônios em condições de déficit energético, e para a neuroplasticidade (FÜNFSCILLING et al. 2012; DOMINGUES et al. 2016).

Os endotélioformos formam uma camada de células ciliadas de morfologia epitelial, a qual reveste os ventrículos cerebrais, agindo como uma barreira física entre o parênquima cerebral e o líquido cefalorraquidiano (LCR), que essas próprias células secretam e regulam seu fluxo, por batimento ciliar, entre os ventrículos. Ao mesmo tempo, essas células metabolizam toxinas, e modulam o gradiente de moléculas quimiotáticas para orientar a migração diferencial de progenitores neurais gerados na zona germinativa (ZG), que posteriormente dá origem a zona subventricular (ZSV) no indivíduo adulto, também sob o estímulo de fatores secretados pelos endotélioformos, que vão se diferenciar nas células gliais do cérebro, ou até mesmo em interneurônios, à distância, no bulbo olfatório, desde o período pós-natal até a vida adulta (SAWAMOTO et al. 2006; GENZEN et al. 2009; WOLBURG, WOLBURG-BUCHHOLZ, MACK 2009). A micróglia desempenha o papel da resposta imune inata dentro do SNC, e possui uma origem embrionária diferente da linhagem comum de progenitores neurais da neuroectoderme, que produzem tanto astrócitos quanto oligodendrócitos e endotélioformos, sendo derivada de células-tronco hematopoiéticas provenientes do saco vitelínico que migram para o SNC no início da embriogênese, conferindo a essa população uma capacidade de auto-renovação e longevidade superior a de macrófagos, apesar de ter, comparativamente, uma função imune mais limitada (DOMINGUES et al. 2016).

O postulado base sobre a teoria do câncer estabelece que são necessárias de 4 a 7 mutações independentes em células somáticas normais, com capacidade proliferativa, para que se adquira um fenótipo tumoral. A hipótese mais aceita para os tumores gliais gira em torno da possibilidade de que a transformação maligna ocorra a partir de precursores indiferenciados residindo em zonas neurogenéticas, como a ZSV, que persiste no cérebro adulto como uma camada sub-endotélioformal, adjacente aos ventrículos, de células com potencial proliferativo parcialmente conservado do período de embriogênese, que dão continuidade à neurogênese e à gliogênese também nos mamíferos adultos. Embora a maioria dos gliomas em humanos se distribua entre os lobos frontal (40%), temporal (29%) e

parietal (14%) (LARJAVAARA et al. 2007), supõe-se que a ZSV seja a região mais provável onde esses tumores se originem, especificamente a partir de progenitores gliais NG2-positivos, para depois migrarem e se desenvolverem ocupando outras estruturas cerebrais. Células neuroepiteliais primitivas, que também podem ser chamadas de células-tronco neurais (NSCs) precisam ser moduladas intrínseca (fatores de transcrição) e extrinsecamente (fatores de crescimento), de modo a ativar múltiplas cascatas de sinalização que levem a sua diferenciação, primeiro localmente em células neuronais, e posteriormente, após migrarem e proliferarem à distância, em células gliais. Muitas das características das células malignas durante o desenvolvimento dos gliomas remetem aos progenitores neurais durante a citogênese: formas blásticas, com capacidade proliferativa e de migração e potencial de diferenciação. Ao serem induzidas inicialmente com estímulos para diferenciação, as NSCs passam por um estágio intermediário em que seus progenitores exibem um fenótipo transitório que se assemelha ao de células malignas, caracterizado, principalmente, por aneuploidia (alteração no número de cópias de cromossomos), perda da inibição por contato do seu crescimento, perturbações do ciclo celular e insensibilidade a fatores de crescimento, o qual desaparece, em condições normais, quando se consolida o processo de diferenciação. Porém, acredita-se que o acúmulo de mutações nas NSCs durante a vida, ao perpetuar assinaturas genéticas tumorais, mantendo, por exemplo, o ciclo celular desregulado, pode desviar alguns intermediários para iniciarem o processo de tumorigênese através da geração de células-tronco de tumores cerebrais (BTSCs) ou células iniciadoras de tumores cerebrais (BTICs). Essas parecem adaptar os mecanismos de auto-renovação e capacidade proliferativa das NSCs, conservando os marcadores de células-tronco neurais, como CD133 e Nestina, para o contexto de malignidade, intensificando propriedades favoráveis (invasividade) em uma pequena sub-população de células, enquanto essas conseguem evadir respostas aos estímulos de diferenciação durante o desenvolvimento tumoral, as quais representariam a perda de seu potencial tumorigênico (SCHIFFER et al. 2010).

Nesse sentido, a hipótese das BTSCs se torna ainda mais plausível pela demonstração de que, ao encontrarem-se intimamente associadas a capilares em áreas do tumor com alta densidade microvascular, as células tumorais Nestina⁺/CD133⁺ formam um nicho perivascular, resgatando um traço característico das NSCs, que compartilham a mesma origem embrionária com o sistema vascular, a partir do tubo neural, para conferir aos tumores mais agressivos uma das suas principais peculiaridades, discutida em maiores detalhes adiante: o crescimento infiltrativo por meio da invasão perivascular. O neuroepitélio em desenvolvimento passa a ser permeado por ramificações do plexo vascular, originado da crista neural, o que corresponde, no indivíduo adulto, à associação dos vasos sanguíneos com a lâmina basal da ZSV, responsável por gerar novos neurônios e células gliais. As BTSCs estabelecem, por sua vez, uma relação simbiótica com as células endoteliais, as quais potencializam suas capacidades proliferativa e de auto-renovação, ao serem estimuladas a secretar VEGF, que também induz a vascularização dos tumores mais agressivos em estágio avançado, sustentando a continuidade do seu crescimento. Na medida em que se distanciam da massa tumoral, as células tumorais que infiltram pelo parênquima cerebral, as quais derivam das mesmas BTSCs precursoras, acumulam cada vez mais mutações que convertem seu fenótipo original em maior capacidade tumorigênica, gerando um círculo vicioso. Em se tratando de marcadores de células-tronco, no entanto, nem sempre é possível estabelecer uma relação direta entre BTSCs e NSCs, principalmente em relação a Nestina e CD133, bastante relacionados a células progenitoras, mas que, se considerados individualmente, também podem aparecer em células endoteliais ou, de maneira variável, em gliomas independente do seu grau de malignidade ou região tumoral (núcleo x periferia), não possuindo portanto valor prognóstico sobre o seu grau de desenvolvimento, apesar de células CD133⁺ tumorais terem sido associadas ao surgimento de resistência ao tratamento quimio e radioterápico. Astrócitos neurogênicos CD133⁻, também conhecidos como células-tronco astrocíticas multipotentes (MASCs) embrionárias, ou células progenitoras

neurais adultas humanas (AHNPs), podem responder por uma parcela das BTSCs, que demonstram as mesmas propriedades das células CD133⁺ em relação a clonogenicidade (potencial de proliferar indefinidamente), formação de neuroesferas pelo crescimento não-aderente e capacidade tumorigênica. As BTSCs podem ser encontradas tanto em gliomas benignos quanto malignos, mas se correlacionam melhor como precursores diretos das formas mais agressivas, conhecidas por glioblastomas, ao invés de atuarem como intermediários na progressão a partir de tumores com menor grau de malignidade, o que traz a tona o dilema sobre qual seria a célula de origem comum dos gliomas (SCHIFFER et al. 2010).

Nos gliomas humanos, ainda não é possível rastrear, com exatidão, qual o tipo celular em que ocorreu o evento original que iniciou o processo de transformação maligna, uma vez que as células neoplásicas aparecem organizadas como massas tumorais ao serem passíveis de detecção pelos métodos diagnósticos disponíveis. Histologicamente, os tumores gliais são compostos por uma mistura de células cuja morfologia remete a diferentes estágios da citogênese. Em geral, porém, não chegam ao mesmo nível de diferenciação das células maduras do tecido, o que suscita o debate sobre a célula de origem que sofreu a transformação maligna convertendo-se em BTSCs, que pode ocorrer tanto em uma célula indiferenciada, como as NSCs, ou em células que se desdiferenciaram pelo processo de anaplasia, quando essas apresentam uma capacidade mitótica mais proeminente, tornando-se pleomórficas por alterações no seu formato resultantes de um volume celular avantajado e uma alta relação núcleo-citoplasma, além de expressar marcadores de células-tronco como a Nestina, enquanto perdem aqueles de sua origem histológica. Os clones anaplásicos, assim como as NSCs, podem se originar pelo acúmulo de mutações ao longo do tempo, sendo posteriormente selecionados pela sua vantagem proliferativa na formação dos tumores, o que pode ter relação com a predominância dos casos diagnosticados de glioblastomas em indivíduos acima dos 60 anos de idade (WELLER et al. 2015). Independente disso, são as alterações genéticas de base que vão determinar as características morfológicas

primitivas que as células tumorais indiferenciadas irão assumir, permitindo que os tumores sejam reconhecidos e classificados por associação anatomopatológica a determinado tipo histológico. Como exemplo, células progenitoras de ratos, que foram modificadas para superexpressar Akt ou K-Ras, produzem tumores com fenótipo de glioblastomas (astrocitomas de maior agressividade), os quais, de fato, também podem possuir mutações nesses genes em humanos, enquanto que a superexpressão de PDGFR β produz tumores com fenótipo de oligodendrogliomas. Poderíamos dizer, então, que o acúmulo de mutações em células-tronco determina como a sua multipotencialidade será explorada para garantir a progressão tumoral, da mesma forma que a regulação por fatores de crescimento nas zonas germinativas modula a proporção em que se originam as linhagens celulares diferenciadas: PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*) e EGF (*Epidermal Growth Factor*) estimulam a passagem das NSCs para precursores de astrócitos; ao mesmo tempo, PDGF e bFGF (*Beta-Fibroblastic Growth Factor*) levam à geração de progenitores O2A a partir de NSCs e precursores prévios, mas inibem a diferenciação de O2A em oligodendrócitos, que é promovida por CNTF e EGF, demonstrando a diversidade de variáveis que podem influenciar na composição tumoral e que, em última instância, podem contribuir para a heterogeneidade celular, com células em diferentes estágios de diferenciação, que respondem pela natureza multimolecular dos glioblastomas multiformes (SCHIFFER et al. 2010).

De uma perspectiva histórica, a busca pelo entendimento da biologia dos tumores cerebrais, entre o final do século 19 e início do século 20, marcou os avanços das técnicas cirúrgicas para localização e remoção assumidamente precisas das massas tumorais, da mesma forma que descartou, posteriormente, sua utilidade como modalidade terapêutica curativa dos tumores gliais. A primeira cirurgia para remoção de um tumor cerebral foi realizada em 1884 pelo cirurgião londrino Rickman Godlee, valendo-se de descobertas básicas, mas primordiais, do século 19 que viabilizavam o processo cirúrgico. Em 1867, Joseph Lister introduziu o uso

de ácido carbólico, ainda na forma de creosoto (destilação do óleo de alcatrão de carvão, originalmente empregado para preservar madeiras do apodrecimento em construções como navios, pontes e dormentes de estradas de ferro), adaptando suas propriedades antissépticas para conter infecções e, ao mesmo tempo, cauterizar feridas ou incisões cirúrgicas. Com a aplicação também de procedimentos higiênicos nos hospitais, estimulados pelo controle dos casos de sepse por Semmelweiss, baseado nas demonstrações anteriores de Pasteur e Koch sobre a origem bacteriana das infecções, as cirurgias intracranianas tornavam-se uma nova possibilidade. Até a introdução da anestesia, em 1846 por William Morton, utilizando éter como sedativo e anestésico, também não era possível conduzir procedimentos neurocirúrgicos mais minuciosos por longas horas, como para a retirada de tumores. Os métodos diagnósticos também evoluíram nesse período: de uma época em que os tumores eram visíveis apenas quando deformavam o crânio, extravasando a caixa craniana, ou por depressões nessa, ou durante a trepanação para o tratamento de epilepsia ou dores de cabeça de origem desconhecida, a cirurgia de 1884 foi a primeira da era moderna a localizar o tumor unicamente por métodos neurológicos, a partir de um paciente com epilepsia motora focal e hemiparesia progressiva, conforme experimentos prévios de Robert Bartholow em 1874, pelos quais foi possível observar a correlação entre estímulos elétricos de determinadas áreas cerebrais e o controle motor, com a geração de contrações e até mesmo convulsões. Dispositivos estereotáxicos, nas suas variadas versões, foram então criados para localizar estruturas cerebrais com base em pontos externos da anatomia craniana, fornecendo um sistema coordenado, preso firmemente ao crânio, concebido para aumentar o nível de acurácia das neurocirurgias. No entanto, as variações naturais da posição do crânio em relação ao cérebro e a ausência de ferramentas radiológicas e de imagem para guiar o procedimento dificultaram essa tarefa (KAYE e LAWS 2012).

Antes que as cirurgias intracranianas pudessem avançar, porém, o progresso impulsionado pela invenção da microscopia óptica permitiu que

Schleiden e Schwann desenvolvessem a teoria celular e, a partir daí, o patologista alemão Rudolf Virchow chegasse ao seu enunciado do conceito de que as mudanças fundamentais para o surgimento de doenças ocorreriam como manifestação de alterações ocorridas primeiro nas células, as unidades básicas que constituem os seres vivos. Da caracterização precária, apenas pelo aspecto visual das massas tumorais obtidas através de autópsia, documentando tumores difusos pelo tecido cerebral, aos quais podia-se atribuir uma morfologia distinta deste, embora não se detectasse uma margem que claramente distinguisse ambos, Virchow propôs a primeira descrição histomorfológica abrangente dos tumores gliais em 1865, época em que era considerado o “Papa da medicina”. Por essa, dizia que os tumores malignos seriam entidades independentes que se originavam das células gliais, mas que, a nível microscópico, podiam ser distinguidas da morfologia tecidual das estruturas cerebrais sadias por onde se disseminavam, o que lhe motivou a cunhar o termo *glioma* para estas lesões. As observações de Virchow também preconizaram uma caracterização fenotípica que diferenciava os tumores com base em seu nível de celularidade e no quanto se destacavam dos tecidos normais (o que Virchow chamava de contraste), uma classificação primária dos gliomas, posteriormente refinada com associação à progressividade dos graus de agressividade destes tumores (KAYE e LAWS 2012, STOYANOV e DZHENKOV 2018).

Por volta de 1900, no entanto, o entusiasmo inicial com as pioneiras cirurgias cerebrais havia se dissipado pela sua ineficácia em curar os pacientes, ou sequer prolongar sua sobrevivência, tanto que acabaram se tornando o último recurso de tratamento. No intuito de atingir melhores resultados com a remoção dos tumores, o neuropatologista americano Percival Bailey e Harvey Cushing, considerado o pai da neurocirurgia moderna pela introdução de técnicas cirúrgicas precisas, fruto de seus procedimentos metódicos, se uniram para avaliar, de maneira sistemática, a histologia de um extenso número de casos de tumores cerebrais, resultando em um trabalho seminal, publicado em 1929, pelo qual se estabeleceram as

bases para a classificação moderna dos gliomas apoiadas em dois eixos principais: um deles referente à histogênese ou à correlação histológica com a suposta célula de origem e seus diferentes níveis de diferenciação, e o outro fazendo a ponte entre a progressão clínica da doença com a atipia histológica. Sendo assim, adotou-se uma nomenclatura para designar os tumores que refletia a semelhança entre a morfologia das células que os formavam e as células gliais normais. Além disso, alguns desses tumores com células atípicas receberam a descrição adicional de anaplásicos, que se caracterizavam por apresentar um pior prognóstico (MAHER et al. 2001; KAYE e LAWS 2012, STOYANOV e DZHENKOV 2018). A classificação de Bailey/Cushing passou a ser amplamente aceita ao se provar clinicamente relevante, servindo então de plataforma comum tanto para clínicos quanto pesquisadores relativizarem seus dados e reavaliarem conceitos para adoção de novos protocolos de tratamento ao longo do século passado (OTANI et al. 2017). Mais importante ainda, Cushing descobrira a razão central das falhas em suas técnicas apuradas, que visavam minimizar ao máximo os vestígios tumorais deixados em seus pacientes, capazes de retomar o crescimento da massa tumoral: o perfil altamente difuso do processo infiltrativo dos gliomas, com células dispersas, e não apenas em grupos ou prolongamentos diretamente associados ao núcleo tumoral, invadindo radialmente os tecidos cerebrais (MAHER et al. 2001). A ressecção neurocirúrgica com finalidade curativa tornou-se obsoleta desde então para tumores difusos, tendo como questão de base a impossibilidade de se considerar margens cirúrgicas de segurança além das margens visíveis dos próprios tumores, que são adotadas para tumores em outros órgãos, como forma de garantir sua completa remoção, mas não para o cérebro, em que seria difícil prever a extensão das perdas funcionais que ocorreriam em qualquer uma de suas estruturas vitais. Na prática clínica atual, as cirurgias, hoje chamadas de citoredutoras, se fazem necessárias quando a ressecção, embora incompleta, dos tumores seja indicada para maximizar os efeitos de tratamentos posteriores (adjuvantes) em benefício dos pacientes (HUSE e ALDAPE 2014).

O progresso histórico da descrição histopatológica dos gliomas e, por consequência, do seu diagnóstico, recebeu ainda as contribuições do neuropatologista alemão Hans-Joachim Scherer, que postulou o diagnóstico histomorfológico baseado em amostras tumorais totais e não apenas em células tumorais individuais presentes neste material. Conceito este que encontra aplicação ainda hoje nas cirurgias citoredutoras, de forma a se obter material suficiente para um diagnóstico mais preciso e para a classificação histológica dos tumores, levando em consideração que, nos casos de GBM, a heterogeneidade celular pode representar um viés na análise de amostras limitadas, como biópsias, por serem menos representativas do tumor como um todo, e apenas revelarem partes compatíveis com outros tipos tumorais (HUSE e ALDAPE 2014; STOYANOV e DZHENKOV 2018). Os GBMs foram, na verdade, o foco de estudo de Scherer, que revelou, pela análise morfológica ostensiva de 100 casos, a relação existente entre astrocitomas e os GBMs baseado na origem aparentemente comum de suas células precursoras, a partir da qual poderia-se sugerir que os GBMs evoluiriam por dois mecanismos distintos: como tumores secundários, derivados de astrocitomas mais brandos, sendo, portanto, denominados por Scherer de GBMs secundários; ou aqueles originados *de novo*, surgindo primariamente como tumores avançados, recebendo a definição de GBMs primários. A nomenclatura criada por Scherer ainda permanece até hoje para descrever tumores que, apesar de compartilharem as mesmas características histomorfológicas, divergem em suas propriedades biológicas, refletindo em manifestações clínicas e perfis de progressão distintos – enquanto os GBMs primários são extremamente agressivos, com um curso clínico marcado por uma baixa sobrevida, os GBMs secundários apresentam uma progressão mais lenta, cursando com um melhor prognóstico para os pacientes (STOYANOV e DZHENKOV 2018). Scherer também foi o primeiro a descrever, em 1938, o padrão infiltrativo difuso dos gliomas como resultado da migração seletiva das células tumorais ao longo de estruturas pré-existentes como neurônios e vasos sanguíneos. Desde então, a organização das células tumorais ao

redor destas estruturas passou a ser referida como “estruturas secundárias de Scherer”, dando origem ao conceito de invasão perineuronal e perivascular como base do perfil infiltrativo dos gliomas (ZAGZAG et al. 2008).

No decorrer do século 20, as técnicas cirúrgicas chegaram ao ponto de garantir a excisão segura dos tumores cerebrais para prevenir possíveis sequelas, contando com o auxílio de novas tecnologias, como dispositivos de aspiração ultrasônica, e lasers de diferentes intensidades para ablação específica em relação a determinados tipos tumorais. Os aparatos estereotáxicos, assim como os exames de imagem, como a tomografia computadorizada (CT) e o imageamento por ressonância magnética (MRI), também evoluíram para um maior nível de detalhamento na detecção e exposição de tumores mais profundos, e quando combinados com a precisão dos lasers, permitem a sua excisão mesmo próximo a regiões vitais do cérebro. O desenvolvimento do escaneamento por CT revolucionou a prática neurocirúrgica moderna, que pode ser dividida entre as eras “pré-CT” e “pós-CT”, a partir do final da década de 1970, na medida em que a reconstrução cerebral por imagens sequenciais de raios-X, obtidas radialmente, permite diferenciar tumores de hemorragias, calcificações, necroses e edemas, reduzindo significativamente seu tempo de diagnóstico, que antes dependia do uso de técnicas invasivas guiadas por imagens de raio-X unidimensionais. Alguns anos mais tarde, utilizando os princípios da ressonância magnética nuclear (RMN), a obtenção de imagens tridimensionais ou multi-planares por MRI, com o auxílio de agentes de contraste, como o elemento químico gadolínio (que amplifica o efeito do campo magnético sobre os átomos de hidrogênio, aumentando ou diminuindo o seu período de oscilação nuclear após o pulso de radiofrequência), contribuiu para aprimorar a resolução das estruturas intracerebrais observadas, incluindo tumores, em comparação com CT, e com tal nível de detalhamento que viabilizou a detecção precisa de lesões importantes, como os schwannomas vestibulares, ou da medula espinhal (KAYE e LAWS 2012; KIRKMAN 2015). O crescimento infiltrativo dos

gliomas tem representado um desafio não só para a sua remoção cirúrgica, mas também para os tratamentos adjuvantes que se seguiram. Em 1920, a radioterapia já era utilizada no tratamento dos gliomas e, apesar de ainda ser empregada como parte da estratégia terapêutica, seu efeito é capaz apenas de prolongar em alguns meses a sobrevivência de pacientes, da mesma forma que a combinação com a ressecção cirúrgica e quimioterápicos, ou mais recentemente as imunoterapias pelo uso de anticorpos monoclonais, não fizeram mais do que combater a doença de maneira limitada, adicionando mais alguns meses ao tempo de vida durante o tratamento no caso dos tumores mais agressivos (KAYE e LAWS 2012; SHERGALIS et al. 2018).

Nesse sentido, a documentação das várias formas assumidas pelos tumores gliais, a depender do tipo de célula glial ao qual estejam associados, estruturada na forma de um guia em que se definam os critérios gerais para o diagnóstico preciso de cada variante, representa um passo importante na direção de uma linguagem clínico-metodológica unificada, de modo que a eficácia de novos tratamentos possa ser avaliada com o rigor científico da caracterização histopatológica de cada tipo de tumor, assim como a combinação bem-sucedida de tratamentos já existentes possa ser reproduzida e validada entre diferentes centros de pesquisa pelo mundo (LOUIS et al. 2007). Assim nasceu a classificação dos tumores elaborada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que ficou conhecida, posteriormente, pelo projeto dos “livros azuis” (*WHO Blue Books*), divulgados de tempos em tempos com atualizações realizadas em consenso por uma junta multidisciplinar envolvendo, no caso da Classificação dos Tumores do Sistema Nervoso Central, principalmente neuropatologistas, neurooncologistas clínicos e cientistas oriundos de diferentes nações, escolas de pensamento e posições argumentativas divergentes (SCHEITHAUER 2009). Com o objetivo de adequar conceitos que incorporassem evidências obtidas tanto pela revisão da abordagem tradicional histopatológica, quanto pela aplicação de novas tecnologias, como microscopia eletrônica e, mais recentemente, para a determinação dos

perfis de expressão gênica, lançaram-se as bases para uma classificação molecular da tumorigênese (WHO 2018a). Partindo do propósito central de fornecer uma classificação aceita internacionalmente, para fundamentar estudos epidemiológicos e ensaio clínicos, a primeira edição da classificação divulgada pela OMS, em desalinho com manuais mais completos e ricamente ilustrados, na forma de atlas, disponíveis à época e adotados como referência por quase 3 décadas, se baseou, na verdade, em uma adaptação dos critérios classicamente definidos pela classificação de Bailey/Cushing: sítio anatômico, tipo histológico tumoral e grau de malignidade, elemento proposto inicialmente por Kernohan para descrever de forma mais clara os estágios de progressão tumoral (SCHEITHAUER 2009; OTANI et al. 2017). Motivada por uma resolução de 1956, da direção executiva da OMS, a partir de uma análise por especialistas sobre a aplicabilidade de uma classificação, a publicação de 1967 introduzia os termos diagnósticos aceitos clinicamente em conjunto com o código histológico ICD-O (Classificação Internacional de Doenças para Oncologia), que reúne, até hoje, dados de incidência e mortalidade estratificados utilizando critérios histopatológicos, além de breves descrições histológicas, para auxiliar no diagnóstico patológico primariamente baseado em microscopia óptica de cortes histológicos corados por hematoxilina-eosina. A segunda edição publicada entre 1982-2002 complementou essas informações histológicas com a caracterização imunohistoquímica de linhagens celulares por marcadores específicos, ilustrando cada caso com uma imagem representativa de sua histologia. Nos anos seguintes, a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) assumiu a responsabilidade a partir da terceira edição, que foi dividida em 10 volumes publicados separadamente entre 2000-2005, passando por uma profunda renovação de conteúdo ao incluir seções dedicadas à epidemiologia, sinais clínicos e sintomas, fatores preditivos e prognóstico, e contando ainda com maior detalhamento dos parâmetros histológicos acompanhado por extensa documentação por imagens. Pela primeira vez também, foi apresentada uma visão geral sobre os perfis genéticos dos diferentes tipos tumorais, sugerindo

sua aplicação como critério diagnóstico (SCHEITHAUER 2009; WHO 2018b).

A diversidade histopatológica dos gliomas, seguindo o critério presumível da correlação histogênica evidenciada por esses manuais, revelam a complexidade do seu diagnóstico, o qual deve aliar características morfológicas precisas do tumor a um sistema de gradação refletindo uma escala de malignidade em que se pode prever sua progressão para um fenótipo mais agressivo, sendo este um dos fatores chave para decisão terapêutica, principalmente entre o uso da radioterapia ou de quimioterápicos específicos, na prática clínica. Como um dos poucos tumores malignos, senão o único, com baixa propensão para metástases à distância, os gliomas tem seu prognóstico baseado, quase exclusivamente, em termos do seu grau de malignidade, ao invés do seu estadiamento (MAHER et al. 2001). A previsão de resposta terapêutica, assim como do prognóstico geral de cada paciente, depende de uma combinação de critérios, que vão além do tipo e do grau de desenvolvimento tumoral preconizados pela OMS, entre eles: informações clínicas, como idade, desempenho neurológico e localização do tumor; observações radiológicas, como aumento do contraste nas imagens; extensão da ressecção cirúrgica; índices proliferativos; e, nos últimos anos, alterações genéticas (LOUIS et al. 2007).

Os tumores histologicamente classificados como astrocíticos são os tipos de gliomas mais comuns em adultos, especificamente aqueles de crescimento difuso, sendo, por isso, contínua e sistematicamente avaliados para atribuição dos graus crescentes de malignidade recomendados pela OMS (I-IV), que diferenciam os tumores além da sua capacidade infiltrativa, mas por aspectos de seu desenvolvimento que podem intensificar este seu potencial. Dentro dessa classificação, também entram os tumores de crescimento circunscrito, considerados como grau I por não apresentarem qualquer nível de invasividade, como os astrocitomas pilocíticos (referente ao seu padrão de diferenciação), que são mais comuns em crianças. Entre os tumores difusos, aqueles possuindo apenas atipia/pleomorfismo celular

são classificados como grau II (astrocitoma difuso); caso comecem a apresentar evidências histológicas de malignidade, como anaplasia e atividade mitótica, tornam-se de grau III (astrocitoma anaplásico), e os pacientes com esses tumores recebem radio- e/ou quimioterapia adjuvantes após a ressecção cirúrgica; adicionando-se a isso proliferação microvascular e/ou necrose, tipicamente associados com uma rápida evolução pré- e pós-operatória apesar dos tratamentos adjuvantes, chega-se ao grau IV de malignidade (glioblastoma), último estágio de desenvolvimento e, portanto, o mais agressivo pela extensão das áreas infiltradas nos tecido cerebrais adjacentes (LOUIS et al. 2007). Além dos astrocitomas difusos, em adultos, também são comuns os oligodendrogliomas, e alguns casos mais raros sugestivos de oligoastrocitomas ambos variando entre os graus II e III pela aquisição de anaplasia. Os parâmetros histológicos questionáveis para a classificação morfológica dos oligoastrocitomas, e a sua recente caracterização molecular, descrita adiante, tem colocado em desuso o seu diagnóstico na clínica. Por outro lado, crianças desenvolvem mais comumente gliomas difusos da linha média, incluindo aqueles previamente descritos como gliomas pontinos intrínsecos difusos de vários graus (DIPG), além dos astrocitomas pilocíticos, que aparecem com menos frequência em adultos, da mesma forma que os xantoastrocitomas pleomórficos e os ependimomas, e estão associados com melhor evolução clínica dos pacientes (MAHER et al. 2001; WELLER et al. 2015). Essa seria uma maneira didática de demonstrar a evolução dos gliomas astrocíticos pelos mesmos princípios lineares de aquisição de malignidade. No entanto, muitas variações em relação aos critérios basicamente histológicos adotados podem levar a divergências entre os diagnósticos por diferentes patologistas, o que tem reflexos diretos na escolha da estratégia terapêutica mais apropriada. Por isso, a OMS recomendava, até recentemente, que a distinção entre os graus II e III, quando houvesse uma baixa proporção de figuras mitóticas observáveis por microscopia, fosse realizada por meio de índices específicos de detecção, utilizando o anticorpo monoclonal MIB-1, do antígeno nuclear Ki-67, cuja expressão se restringe apenas às fases ativas

do ciclo celular, quando as células estão em processo de divisão mitótica (PRAYSON 2005; AUNE et al. 2011). Em se tratando dos glioblastomas, alguns autores aceitam o parâmetro de proliferação endotelial na forma de múltiplas camadas de endotélio, enquanto a OMS também aceita como indício as formações glomerulóides microvasculares, desde que curse com regiões necróticas de qualquer tipo, envolvidas por uma camada hiper celularizada com justaposição de células viáveis (LOUIS et al. 2007). Os núcleos das células desta zona perinecrotica geralmente aparecem alongados e dispostos em um mesmo alinhamento circundando o tumor, o que remete, morfológicamente, às cercas construídas com estacas de madeira, unidas umas às outras, para delimitar e proteger o perímetro das casas americanas entre os séculos 18 e 19, as quais recebiam o nome de paliçadas. Quando os núcleos apresentam uma tendência natural de se organizarem formando este padrão, dependendo do tipo de tumor, essas camadas de células recebem o nome de paliçadas primárias. Em relação aos glioblastomas, porém, os alinhamentos de núcleos ocorrem como resposta à morte do tecido tumoral subjacente por necrose, sendo assim denominados de paliçadas secundárias ou pseudopaliçadas (WIPPOLD et al. 2006), que são uma característica única dos gliomas malignos, servindo ainda como fator prognóstico de sua progressão (RONG et al. 2006).

A atribuição de níveis crescentes de malignidade também acompanha o avanço clínico dos pacientes. Enquanto os tratamentos para tumores grau II permitem uma sobrevida acima de 5 anos, chegando a décadas, dependendo do caso, os pacientes com tumores grau III sobrevivem, no máximo de 2 a 3 anos, ainda bem mais que os portadores de glioblastomas (grau IV) que, em geral, não passam dos 15 meses de vida, mas podem se beneficiar, pelo menos com o controle da doença por alguns meses adicionais, de terapias-alvo combinadas ao esquema quimioterápico padrão (CLOUGHESY et al. 2014). Por outro lado, casos extremos de recuperação terapêutica podem ser mencionados para outros tumores grau IV, como os meduloblastomas cerebelares e os tumores de células germinativas (germinomas), que podem ser rapidamente fatais se não tratados a tempo,

mas respondem bem aos ciclos de radio/quimioterapia, resultando em sobrevida de até 5 anos em, respectivamente, mais de 60% e 80% dos pacientes (LOUIS et al. 2007).

Por décadas, o diagnóstico histopatológico, combinando achados histológicos com a detecção de marcadores imunohistoquímicos, supriu uma demanda clínica que estava menos preocupada com a classificação morfológica precisa dos tipos tumorais, mas que tinha como foco a correlação dos níveis de agressividade tumoral com ajustes na aplicação dos limitados regimes terapêuticos disponíveis, baseados no aumento de doses e intensificação de ciclos em paralelo ao seguimento contínuo dos pacientes (LOUIS et al. 2007 e 2016). Ao mesmo tempo em que se acumulavam relatos de casos sobre cursos clínicos incompatíveis com a sua previsão a partir de uma determinada classificação histológica diagnosticada, observava-se que a reprodutibilidade questionável do exame patológico, confiado unicamente à percepção do analista de características celulares microscópicas, muitas vezes ambíguas à luz de simples colorações dos tecidos, contrastava com uma literatura crescente nos últimos 20-30 anos, resultado de esforços independentes ou de consórcios, como o que viabilizou o “Atlas do Genoma do Câncer” (*The Cancer Genome Atlas – TCGA*), que revelam um número recorrente de mutações ou aberrações em determinados genes, ou conjuntos de assinaturas gênicas, pelas quais se tornou possível uma redistribuição dos gliomas em sub-categorias que melhor contemplem sua variabilidade biológica (PARSONS et al. 2008; KILLELA et al. 2014; HUSE e ALDAPE 2014; WELLER et al. 2015; OTANI et al. 2017).

Uma ampla revisão dos manuais da OMS tem marcado, desde o lançamento da quarta edição da Classificação dos Tumores em 2006, até sua conclusão em 2018, a transição de uma abordagem tradicional, predominantemente histopatológica, para o reconhecimento da integração de marcadores mutacionais como parâmetro diagnóstico complementar, e sua relevância para uma maior acurácia no prognóstico e previsão da resposta terapêutica, assim como na elucidação de novos alvos que possam

ser abordados, futuramente, no desenvolvimento de terapias personalizadas para determinados sub-tipos tumorais (HUSE e ALDAPE 2014; LOUIS et al. 2016; WHO 2018b). Nos 12 volumes publicados da edição mais recente, as alterações genéticas canônicas foram primeiramente introduzidas apenas como informações adicionais, para contextualizar a histologia convencional com potenciais fatores prognósticos ou preditivos. A rápida expansão da caracterização genética dos gliomas pela comunidade científica fez com que, novamente, juntas de patologistas e cientistas se reunissem para reformular volumes específicos da atual edição, antes mesmo que uma nova tivesse sido previamente cogitada. Em 2016, então, a OMS publicou a sua versão atualizada referente à classificação dos Tumores de SNC, a exemplo do que fez, em 2017, para os Tumores de Tecidos Hematopoiéticos e Linfóides (WHO 2018b). Por esta nova abordagem, os tumores molecularmente díspares são agrupados em categorias próprias, ainda que seja necessário as mesmas estarem atreladas a uma correlação histológica de base, para se confirmar uma relação causal com os gliomas difusos a partir do diagnóstico convencional, eliminando assim a possibilidade de outros tipos de tumores. A manutenção dos critérios histológicos se sustenta enquanto não se criam soluções tecnológicas que possibilitem o mapeamento genético dos tumores em larga escala, sendo, desta forma, o meio mais direto para se atribuir os graus de malignidade aos tumores ou preencher lacunas na descrição de tumores fenotipicamente raros pela aplicação dos parâmetros mutacionais ainda incipientes (entidades histológicas que passaram a ser definidas como “ *not otherwise specified* ” – NOS). O conceito de diagnóstico integrado surge assim da necessidade de conciliar um vasto conjunto de evidências genéticas, que permitem avanços na compreensão biológica dos gliomas, revertendo em benefícios para o tratamento dos pacientes, às limitações técnicas e estruturais relacionadas à implantação de tecnologias, como o sequenciamento de DNA, que apesar de serem comuns em laboratórios de pesquisa e estarem disponíveis a custos cada vez mais acessíveis, são alheias à rotina dos laboratórios de patologia tradicionais. Mudanças de paradigma como esta demandam tempo

e, por isso, a OMS reagiu prontamente ao colocar em perspectiva a consideração das assinaturas genéticas tumorais como parte efetiva do diagnóstico, apresentando, ao mesmo tempo, alternativas imunohistoquímicas para suprir as novas demandas. Dessa maneira, seus guias de classificação passam a fazer a ponte, nas edições seguintes, entre os métodos microscópicos, indispensáveis para a caracterização histopatológica dos tumores, e os métodos mais avançados de genotipagem para sua confirmação fenotípica, preparando o terreno para a criação de protocolos de diagnóstico cada vez mais precisos e integrados (LOUIS et al. 2016).

O princípio da era genômica na classificação dos gliomas difusos pode ser datado de um passado bastante recente, em que as pesquisas eram motivadas pela rápida e implacável letalidade dos tumores de alto grau de malignidade. Investimentos pioneiros em técnicas genômicas de larga escala permitiram a descoberta inesperada e a caracterização, em glioblastomas, há pouco mais de 10 anos, das mutações nos genes *IDH1* e *IDH2* pela análise transcricional completa dos tumores, quebrando com a tendência vigente de restringir os estudos a perfis mutacionais pré-estabelecidos (HUSE e ALDAPE 2014). Curiosamente, esse primeiro trabalho encontrou mutações recorrentes no sítio ativo da isocitrato desidrogenase 1 (*IDH1*) em apenas 7% das amostras de GBMs primários, definidos pelo seu diagnóstico clínico de tumores que se desenvolvem originalmente (*de novo*) como lesões de estágio avançado. Em contrapartida, a quase totalidade dos GBMs secundários, aqueles com evidências clínicas, radiológicas e histopatológicas de progressão maligna a partir de tumores de grau intermediário (II-III) pré-existent, que são mais comuns em pacientes com idade média de 45 anos (ao contrário dos que desenvolvem GBM primário, em geral acima dos 60 anos) apresentavam mutações em *IDH1*, estando associados a uma sobrevida média quase quatro vezes maior que a de pacientes de GBM primário portadores do gene normal (COHEN et al. 2013; PARSONS et al. 2014). As mutações de *IDH1*, que também podem ocorrer com menor frequência em *IDH2*, de maneira

mutuamente exclusiva, representaram então um marco no reconhecimento de um valor prognóstico de base genética capaz de permitir que tumores de alto grau, indistinguíveis histopatologicamente, pudessem ser correlacionados com sua origem mutacional em detrimento da ambiguidade dos critérios clínicos previamente adotados (desconsiderando que GBMs podem evoluir silenciosamente a partir de lesões secundárias), embora ainda não se tenha alcançado um valor preditivo mensurável em relação à resposta terapêutica (COHEN et al. 2013; HUSE e ALDAPE 2014; WELLER et al. 2015). Nos GBMs primários, o *IDH1* tipo-selvagem, que representa cerca de 90% dos casos, coincide especificamente com assinaturas relativas à alteração no número de cópias de DNA, descritas há mais de 20 anos (KIM et al. 1995; FUJISAWA et al. 2000; LOPEZ-GINES et al. 2005; OHGAKI e KLEIHUES 2009; CRESPO et al. 2011) e revisitadas pelo TCGA mais recentemente (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2008), envolvendo a monossomia do cromossomo 10 e a trissomia do cromossomo 7, comuns em 80-90% dos GBMs histopatologicamente diagnosticados, além da amplificação em 7p incluindo o gene *EGFR*, que ocorre em 40-50% destes casos, enquanto o mesmo não se aplica aos GBMs secundários (10% de todos os GBMs), que carregam o *IDH1* mutante (COHEN et al. 2013; HUSE e ALDAPE 2014; LOUIS et al. 2016). Estudos contemporâneos à descoberta de *IDH1* como fator prognóstico para GBMs reforçaram a tese de que gliomas secundários evoluem a partir de lesões de baixo grau, pelo fato do *IDH1* mutante também ser encontrado em cerca de 80% dos gliomas de grau II-III, entre esses, astrocitomas e oligodendrogliomas, nos quais a alta frequência de mutações sugere que estas desencadeiam ou decorram de eventos precursores da patogênese molecular destes tumores a partir de uma mesma célula de origem (COHEN et al. 2013; HUSE e ALDAPE 2014).

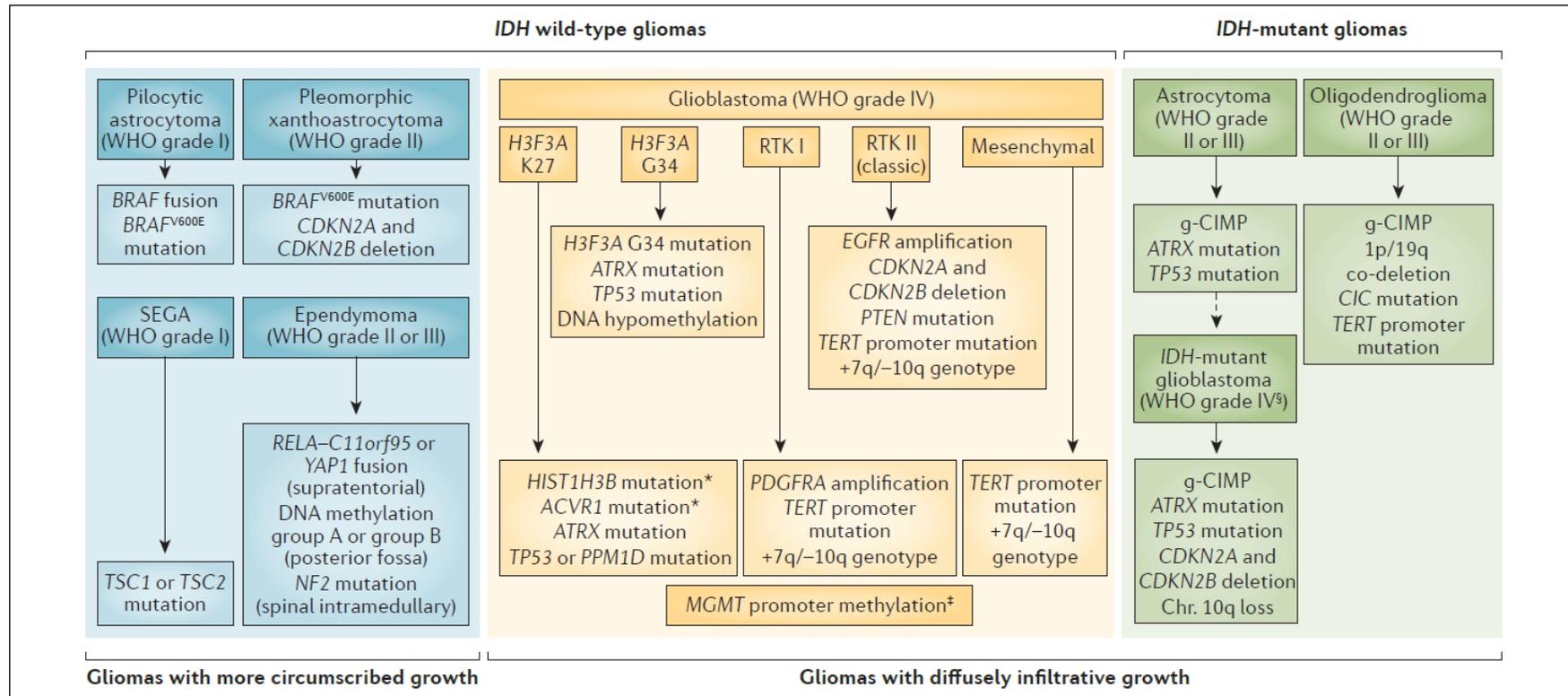
As enzimas IDH1/2 normalmente atuam no citosol e mitocôndrias para catalisar a descarboxilação oxidativa de isocitrato em α -cetoglutarato (α -KG) convertendo NADP⁺ em NADP reduzido (NADPH) independente do ciclo de Krebs. A mutação missense heterozigota mais comum no gene *IDH1* ocorre no códon 132 com a substituição de arginina por histidina (R132H), resíduo

este localizado no sítio ativo da enzima, inibindo a sua capacidade de se ligar ao isocitrato, abolindo, portanto, sua atividade catalítica normal. A deficiência na produção de α -KG e NADPH, importantes cofatores necessários para a manutenção de níveis celulares normais de glutatona reduzida (GSH) na eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS), pode predispor as células ao estresse oxidativo. Soma-se a isso que a IDH1 mutada torna-se capaz de catalisar a redução NADPH-dependente do α -KG em R(-)-2-hidroxi-glutarato (2-HG), oncometabólito que, em altos níveis, é responsável pela inibição competitiva da atividade de dioxigenases dependentes de α -KG, incluindo demetilases de histonas e hidroxilases 5-metilcitosina da família TET (*ten-eleven translocation*), levando a um aumento na metilação de histonas e, principalmente, à hipermetilação de múltiplas ilhas CpG (sequências de DNA de 500-1500 pares de base constituídas por uma razão CG:GC maior que 0,6, presentes em regiões promotoras de genes constitutivos para manutenção das funções celulares básicas) (GOLDMAN 2001; SLEUTELS e BARLOW 2002), considerada como um marcador epigenético dos gliomas com *IDH* mutado, aos quais se atribuiu a denominação de gliomas com fenótipo metilador de ilhas CpG (g-CIMP) e que, por conseguinte, está relacionado ao silenciamento transcricional dos genes associados (COHEN et al. 2013; HUSE e ALDAPE 2014; WELLER et al. 2015). A proposta aventada de início era de que a ampla modificação epigenética do genoma, derivada da mutação precursora em *IDH1*, seria suficiente para a transformação oncogênica, baseado no risco aumentado de desenvolvimento de gliomas em síndromes causadoras de hemangiomas e tumores cartilagosos, provocadas pelo mosaïcismo somático em R132H de *IDH1* e *IDH2*, hipótese que passou a ser abandonada quando, ainda atendo-se a uma visão histológica das células de origem tumoral, mutações em genes *IDH* induzidas em astrócitos não levaram a formação de tumores, da mesma forma que em camundongos geneticamente modificados para expressar essas mutações (COHEN, HOLMEN, COLMAN 2013; WELLER et al. 2015). Mesmo assim, de acordo com o modelo mais aceito para o surgimento dos gliomas, a correlação com

outras alterações genéticas adquiridas por células-tronco neurogliais, ou seus progenitores, possibilitou a divisão dos gliomas *IDH* mutados entre dois subtipos molecularmente bastante distintos, ainda mantendo-se correspondentes ao diagnóstico histológico clássico para astrocitomas ou oligodendrogliomas (Figura 1). A mútua exclusão entre ambos os perfis biológicos sugere uma hierarquia de eventos genômicos coordenados que divergem em determinado ponto para conferir aos tumores um fenótipo astrocítico, caracterizado por mutações em *TP53* (proteína tumoral p53) e no gene *ATRX* (*α-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked*), ou oligodendroglioma, definido pela co-deleção dos braços cromossômicos 1p e 19q em associação à mutação no promotor de *TERT* (*telomerase reverse transcriptase*). Nem sempre, porém, essa correlação pode ser feita, de maneira fidedigna, pela análise histológica, considerando que, em certos casos, a morfologia celular não reflete o genótipo das células tumorais, ao qual deve-se dedicar maior atenção pelo seu caráter preditivo da progressão tumoral (WELLER et al. 2015; LOUIS et al. 2016). Outro problema recorrente de confusões sobre critérios histopatológicos dúbios tinha relação com o diagnóstico de oligoastrocitomas, que molecularmente representam apenas raros casos em que se podem encontrar populações de ambas as linhagens (astrocíticas e oligodendrogliais) em um mesmo tumor, mas que, na maioria das vezes, eram diagnosticados erroneamente, quando ainda não se aliava fenótipo a genótipo para detectar que se tratavam, na verdade, de astrocitomas ou oligodendrogliomas propriamente ditos. Por isso, a OMS passou a recomendar, a partir de 2016, a designação de oligoastrocitomas, NOS e oligoastrocitomas anaplásicos, NOS na impossibilidade de se realizar os testes genéticos (LOUIS et al. 2016). À medida que progredem para GBMs secundários, os tumores astrocíticos passam a apresentar deleção homozigótica do locus *CDKN2A-CDKN2B*, sendo que *CDKN2A* abriga os genes *INK4* e *ARF*, que codificam, respectivamente, *RB1* e *p53*, além de outras alterações genômicas cumulativas, como a perda do braço longo do cromossomo 10, semelhante ao que acontece nos GBMs primários. Exceções à regra incluem por volta de 5-10% dos glioblastomas *IDH*

mutantes/g-CIMP positivos, que parecem não apresentar, em seu histórico, lesões precursoras de menor grau, enquanto a progressão a partir de tais gliomas pré-existentes de grau II e III, como certos astrocitomas anaplásicos ou xantastrocitomas pleomórficos, que estão entre os 10-20% dos casos com *IDH* tipo-selvagem/g-CIMP negativo, também pode originar GBMs secundários (HUSE e ALDAPE 2014; WELLER et al. 2015).

Pela nova classificação da OMS, em resumo, separam-se os gliomas em duas classes nosológicas (referente ao ramo da medicina dedicado a sistematizar o conhecimento das doenças de acordo com seus fatores causais, isto é, sua etiopatogenia), as quais desconsideram os critérios histológicos primariamente adotados, para agrupar tipos de tumores conforme seu padrão de crescimento decorrente de assinaturas genéticas afins: os gliomas difusos incluem agora os tumores astrocíticos e oligodendrogliais graus II e III, os glioblastomas (grau IV), assim como os gliomas difusos pediátricos; os astrocitomas de crescimento circunscrito se apresentam como uma entidade específica, apesar de morfologicamente semelhantes aos astrocitomas difusos, nos quais não são encontradas mutações em genes da família *IDH*, sendo caracterizados, em sua maioria, por alterações em *BRAF* (astrocitomas pilocíticos, xantastrocitomas pleomórficos) ou mutações em *TSC1/TSC2* (astrocitomas de células gigantes subependimais) (LOUIS et al. 2016).



Fonte: Adaptado de WELLER et al. (2015)

Figura 1 – Classificação histológico-molecular dos diferentes tipos de gliomas, combinando a caracterização histopatológica, preconizada pela OMS, com os respectivos perfis de alterações genéticas, que podem ser utilizados como marcadores moleculares a serem considerados na rotina diagnóstica. Entre os gliomas difusos, a mutação no gene *IDH* agrupa os tumores que apresentam melhores prognósticos, enquanto os mais agressivos (GBMs), com o gene normal, podem ser mais suscetíveis ao tratamento com agentes alquilantes de DNA, como a temozolomida, caso possuam o gene para a enzima de reparo MGMT inativado por hipermetilação de sua região promotora, tornando-se um fator preditivo de resposta para orientar a seleção de pacientes que receberão benefício terapêutico na clínica.

A conduta diagnóstica, em geral, acompanhou esse movimento da OMS, incluindo a detecção eficiente da mutação mais comum e descritiva atualmente dos gliomas, IDH^{R132H} , por meio da imunohistoquímica de cortes histológicos tumorais com um anticorpo altamente específico (WELLER et al. 2015). No entanto, a marcação negativa para IDH^{R132H} precisa ser confirmada pelo pirosequenciamento, em conjunto ou individualmente, de mutações nos códons 132 e 172 de $IDH1$ e $IDH2$ respectivamente, quando forem encontradas uma das situações seguintes: tumores com indicação histológica de grau II e III, já que astrocitomas difusos com IDH tipo-selvagem são bastante incomuns e precisam ser avaliados com cautela para evitar confusão com lesões de baixo grau, como os gangliogliomas; glioblastomas em jovens adultos, conhecidos por evoluírem secundariamente aos astrocitomas grau II-III com IDH mutante; e astrocitomas anaplásicos com IDH tipo-selvagem, que também são raros, sendo que a maioria deles apresentarão um perfil molecular altamente característico dos glioblastomas IDH tipo-selvagem. Nestes casos, em não havendo condições para a se realizar a confirmação pelo sequenciamento, a OMS recomenda complementar a classificação inicial histológica (astrocitoma difuso, glioblastoma ou astrocitoma anaplásico) utilizando a designação NOS, conforme mencionado anteriormente, denotando a incerteza do diagnóstico para estimular sua posterior revisão. A dispensa de confirmação, porém, pode ser aceita para os glioblastomas IDH tipo-selvagem em pacientes acima dos 55 anos de idade, faixa etária em que são comuns os GBMs primários. Em relação aos graus de malignidade, a nova classificação ainda não descarta o seu valor diagnóstico para utilizar, como critério exclusivo, as mutações em genes IDH , uma vez que ainda não foi possível comprovar que de fato exista, como apontam alguns estudos, uma diferença pouco relevante entre os prognósticos de astrocitomas difusos grau II e III IDH mutantes (LOUIS et al. 2016). Por outro lado, a interpretação dos resultados genéticos deve ser ainda mais cuidadosa pelo fato de não se ter considerado, até o momento, a ocorrência de outras mutações em $IDH1$ e $IDH2$, as quais chegam a contabilizar de 10 a 20% de todos os casos de

gliomas *IDH*-mutantes, enfatizando a importância de técnicas genômicas cada vez mais abrangentes e acessíveis, que auxiliem os patologistas no diagnóstico molecular (HUSE e ALDAPE 2014).

1.2 GLIOBLASTOMAS: PERFIS MOLECULARES REVELANDO BIOMARCADORES E ALVOS TERAPÊUTICOS

Como os gliomas mais frequentes e malignos, os glioblastomas respondem por aproximadamente 45% da sua incidência relativa, acometendo de 0,59 a 3,69 pessoas/100.000 habitantes em todo o mundo, com destaque para Estados Unidos e Europa, principalmente países nórdicos, segundo dados coletados pelos serviços de vigilância governamentais, ou pelos registros dos sistemas de saúde de cada país (SANT et al. 2012; OSTROM et al. 2014). No Brasil, os GBMs correspondem a 2,5% de todos os tumores, somando de 2 a 3 mil casos registrados entre 2015 e 2016 (Ministério da Saúde 2018), abaixo dos 10.000 diagnosticados a cada ano nos Estados Unidos (CLOUGHESY et al.; MISCHER 2014). Apesar de, no geral, a maioria dos casos ocorrer em pacientes acima dos 50 anos de idade, os GBMs ainda apresentam uma condição agravante de também se desenvolverem em qualquer faixa etária. Com a maior disponibilidade de tecnologias cada vez mais acessíveis de sequenciamento, capazes de abranger todo o genoma e epigenoma, tornou-se possível atribuir aos GBMs que surgem em diferentes idades perfis de mutação e de metilação de DNA específicos, permitindo classificá-los em ao menos cinco subtipos moleculares (Figura 1). Entre eles, dois são relativos à glioblastomas pediátricos, que podem se caracterizar por mutações missense no gene *H3F3A* para histona H3.3, gerando substituições de aminoácidos em K27, especialmente para tumores talâmicos e pontinos de pior prognóstico, ou em G34, quando se trata de lesões hemisféricas associadas com hipometilação de DNA global (STURM et al. 2012; CLOUGHESY et al. 2014; WELLER et al. 2015). Nos adultos jovens, são mais comuns os glioblastomas de melhor prognóstico *IDH*-mutantes/*g*-CIMP-

positivos e com um perfil de expressão gênica proneural (que remete a marcadores de neuroblastos ou progenitores neurais), incluindo os GBMs secundários. Ambos os sub-grupos *H3F3A*-mutante e *IDH*-mutante frequentemente carregam também as mutações em *TP53* e *ATRX*, compatível com fenótipo astrocítico dos glioblastomas. Os tumores em adolescentes e adultos jovens podem formar, por outro lado, um quarto sub-grupo, também com assinatura proneural, mas com amplificação do gene *PDGFRA* (*platelet-derived growth factor receptor- α*), que apresentam alterações, incluindo os genes *CDK4*, *CDK6* e *MET*, dentro da classe dos “receptores tirosina quinase I” (RTKI). A maioria dos casos, com pico em pacientes de 75-84 anos (OSTROM et al. 2014), se divide entre dois sub-grupos distintos epigeneticamente, designados como GBMs “clássicos” (ou “RTK II”, com maior tendência à amplificação de *EGFR* do que em outros sub-grupos, associado a perdas de *PTEN* e *CDKN2A*) e “mesenquimais”, pela presença conjunta de marcadores astrocíticos e mesenquimais, provavelmente como resquícios da transição epitélio-mesênquima ligados a mecanismos de desdiferenciação ou transdiferenciação (caracterizado por mutação e/ou perda de *NF1*, *TP53* e *CDKN2A*) (PHILLIPS et al. 2006; BRENNAN et al. 2013; CLOUGHESY et al. 2014; WELLER et a. 2015).

O mapeamento genômico global dos GBMs tem revelado que as alterações no número de cópias de DNA e as mutações somáticas mais frequentes estão envolvidos com três vias de sinalização centrais: 1) ativação do receptor tirosina quinase/RAS/fosfatidilinositol 3 quinase (RTK/RAS/PI3K) em 88% dos GBMs; 2) regulação p53-dependente da apoptose em 87% de todos os casos; e 3) regulação RB1-dependente (proteína do retinoblastoma 1) da progressão do ciclo celular em 78% dos mesmos casos, o que denota uma sobreposição recorrente entre mecanismos de progressão tumoral. As duas últimas vias são classicamente descritas no câncer com função especializada para supressão tumoral, indicando que pode haver uma inibição coordenada de ambas nos GBMs, servindo de base para a tumorigênese (CLOUGHESY et al. 2014).

Considerando todos os marcadores de desenvolvimento dos GBMs, as amplificações de *EGFR* em cerca de 40-50% dos tumores constituem um dos alvos terapêuticos mais promissores. Cerca de metade dos GBMs com *EGFR* amplificado possuem uma mutação com ganho de função por meio de um rearranjo deste gene caracterizado pela deleção dos exons 2-7, que codificam o domínio extracelular de interação com o ligante do respectivo receptor. A variante III de EGFR (EGFRvIII) carrega um epítipo extracelular específico codificado pela fusão dos exons 1 e 8, gerando um receptor tirosina quinase oncogênico constitutivamente funcional, capaz de ativar a via PI3K de maneira mais intensa do que os receptores normais, tornando-se passível de modulação terapêutica por inibidores farmacológicos ou imunoterapia baseada em anticorpos. No entanto, mesmo que os GBMs sejam, em boa parte, dependentes da sinalização via EGFR para a formação de tumores, os inibidores tirosina quinase erlotinibe e gefitinibe não produziram os benefícios clínicos esperados. Os mecanismos de resistência que reduzem a eficácia desses inibidores giram em torno de manter a cascata de sinalização ativa a partir de PI3K, que pode ocorrer de duas formas: pela perda da expressão de PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) ou sua fosforilação dependente de FGFR ou SRC, inibindo sua atividade fosfatase para desfosforilar PI3K e assim controlar seu nível de ativação, o que tornaria necessário um aumento considerável na concentração do fármaco inibidor para se conseguir bloquear a atividade de PI3K; pela seleção de células com expressão aumentada de outros receptores tirosina quinase, como PDGFRA e MET, que também sinalizam através de PI3K, criando assim um mecanismo de compensação. Os inibidores atuando em EGFR podem ter ainda efeito sobre a alternância para RTKs “dormentes”, demonstrando como os GBMs podem explorar diferentes rotas de evasão ao tratamento, como quando conseguem utilizar a suspensão da regulação fisiológica sobre PDGFR β (*platelet-derived growth factor receptor β*), decorrente da supressão das vias PI3K/AKT/mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) e ERK (*extracelular signal-related kinase*), controladas por EGFR, para canalizar a sinalização através

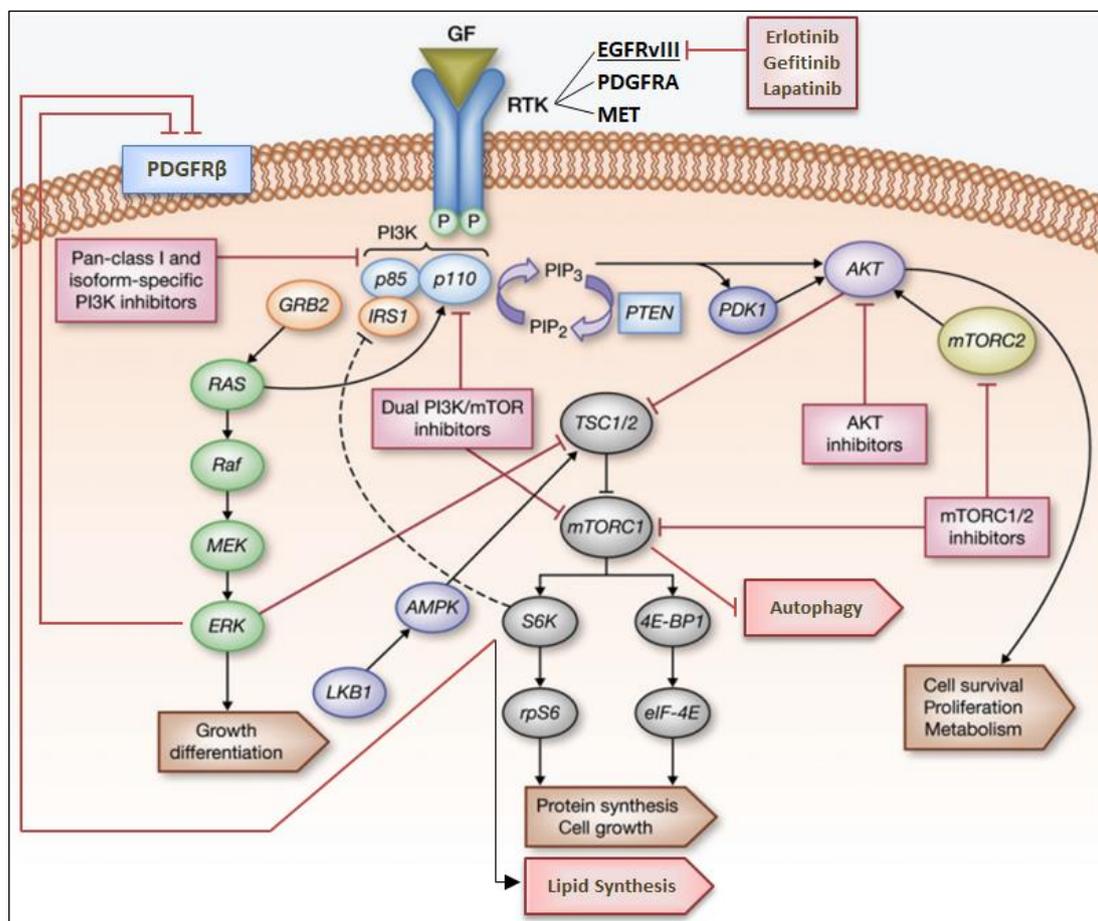
desse receptor substituto, e assim garantir a manutenção da sobrevivência celular e do crescimento tumoral. Essa plasticidade dos GBMs na reprogramação das suas vias de sinalização ajudam a explicar porque mesmo inibidores de EGFR tipo II, como o lapatinibe (inibidor múltiplo de quinases, incluindo EGFR e HER-2) (PEARSON e REGAD 2017), o qual se mostrou ligar de maneira mais eficiente à conformação inativa do domínio extracelular de EGFRs mutados, ao contrário do erlotinib utilizado para câncer de pulmão, em que as mutações de EGFR atingem apenas o domínio quinase do receptor, produz uma baixa eficácia terapêutica independente do ajuste de dosagens para inibir completamente EGFR, o que impediria a sua fosforilação, enfraquecendo assim mecanismos de resistência compensatórios. Da mesma forma, inibidores de primeira geração de PI3K e de seu efetor AKT (*protein kinase B*), que estão ativados em cerca de 90% dos GBMs (também por mutações em *PIK3CA*) podem passar pelos mesmos problemas durante sua avaliação pelos ensaios clínicos sendo conduzidos (Figura 2) (CLOUGHESY et al. 2014; WELLER et al. 2015).

Uma das principais intersecções entre vias de sinalização, integrando vários processos celulares, passa pelo controle multifuncional de mTOR, sendo esta quinase crítica para a sustentação do fenótipo tumoral dos GBMs (Figura 2). Ainda assim, a inibição alostérica de mTORC1 pelo ligante específico rapamicina não atinge níveis suficientes para bloquear totalmente sua atividade (por ainda ser possível detectar atividade mitótica pela marcação com Ki67), além de se reproduzirem mecanismos correlatos de resistência observados com os inibidores de EGFR, pela interrupção do bloqueio sobre vias coletarais, responsáveis por redistribuir o fluxo de sinalização (pela reativação de AKT) para resgatar as funções perdidas com o tratamento. Existem dois tipos de complexos de mTOR, que diferem entre si em termos da sua regulação, função e responsividade a rapamicina: mTORC1 e mTORC2. O primeiro forma complexo com seis outros componentes, incluindo a proteína raptor, fazendo parte de vias iniciadas em receptores de fatores de crescimento com ativação de PI3K, atuando como

intermediário no estímulo para a hiper-regulação de proteínas envolvidas com a proliferação celular através das quinases S6K1 e 4E-BP, importantes nas etapas iniciais do processo de tradução (NAWROTH et al. 2011). Como consequência das alterações de RTKs, mutações de PI3K e perda de PTEN, recorrentes em GBMs, mTORC1 apresenta, frequentemente, altos níveis de ativação nesses tumores. PI3K promove a atividade de mTORC1 através da fosforilação de AKT, para que esta fosforile TSC1 e TSC2 (também conhecidas como hamartina e tuberina), removendo sua ação inibitória sobre Rheb (*RAS homolog enriched in brain*), que promove uma intensa atividade de mTORC1, a qual fosforila S6K1 para promover a tradução protéica via fosforilação da proteína ribossomal S6 e de PDCD4, um supressor tumoral que atua sobre a helicase eIF4A, necessária para a ligação de mRNAs a subunidade ribossomal 40S. mTORC1 também fosforila 4E-BPs diminuindo sua capacidade de se ligar e inibir a proteína 4E, a qual fica disponível para interagir com eIF4G1 e/ou eIF4G2 e assim permitir a tradução de mRNAs destinados a iniciação e progressão tumoral. A fosforilação de S6K1 por mTORC1 também serve ao propósito de regular o nível de ativação de PI3K por meio de um *feedback* negativo.

As funções de mTORC1 requerem que a célula tenha um suprimento de aminoácidos suficiente (estimulando sua ativação por membranas lisossomais) e um estado energético compatível com o crescimento tumoral. Em resposta a baixos níveis de ATP, a quinase AMPK (*adenosine monophosphate-activated protein kinase*) torna-se fosforilada e, por sua vez, fosforila raptor para suprimir a atividade de mTORC1. Outras funções controladas por mTORC1 incluem o aumento do metabolismo glicolítico por seus efeitos sobre HIF-1 α , fator de transcrição central durante resposta à hipóxia (discutida nas próximas seções); o controle transcricional sobre o regulador-chave transcricional da lipogênese, SREBP1 (*sterol regulatory element-binding transcription factor 1*), regulando também sua localização nuclear e função pela fosforilação de lipina 1; e a supressão da autofagia pela fosforilação e inativação do complexo de quinases ULK1/ATG13/FIP200, que é revertida sob condições de deficiência de

nutrientes ou estresse energético, ou quando a sinalização por mTORC1 é interrompida, podendo ser alvo de combinações efetivas de inibidores PI3K/mTOR com agentes lisomórficos, como a hidroxicloroquina, que bloqueiam a progressão da autofagia.



Fonte: Adaptado de DIENSTMANN et al. (2014)

Figura 2 – Inter-relação entre vias de sinalização compensatórias para a sobrevivência celular e crescimento tumoral. Os GBMs se reprogramam como forma de resistência à modulação de proteínas-chave nesse processo, quando essas constituem alvos terapêuticos independentes para os respectivos inibidores sendo avaliados em diferentes fases de estudos clínicos. AMPK, *AMP-dependent protein kinase*; GF, fator de crescimento; GRB2, *growth factor receptor-bound protein 2*; IRS1, *insulin receptor substrate 1*; PDK1, *phosphoinositide-dependent kinase 1*; PIP2, *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*; PIP3, *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*.

Em relação a mTORC2, ainda não se estabeleceu um panorama completo de todo o seu espectro de funções, mas sabe-se que também pode fosforilar AKT para obter sua máxima atividade no controle de respostas, como sobrevivência celular, o que pode contribuir para a resistência à rapamicina, conforme observado clinicamente, que possui uma baixa afinidade de ligação a esse complexo. Alternativamente, os GBMs podem sustentar seu crescimento pela via EGFRvIII/mTORC2/NF- κ B, além de já ter sido mostrado que a perda de PTEN também pode favorecer, provavelmente via PI3K, a patogênese dos GBMs pela potente ativação de mTORC2, somando mais uma via de escape resultante do controle descentralizado da progressão tumoral (CLOUGHESY et al. 2014).

Décadas de estudo foram necessárias para que se transitasse do conceito de epigenética e de sua importância como modulador da atividade gênica, a partir da década de 70, para o desenvolvimento de tecnologias que possibilitassem a descrição do epigenoma (DEICHMANN 2016). No entanto, em contraste com a versatilidade e poder de processamento das técnicas atuais, o conhecimento acumulado ao longo de vários anos também contribuiu para pavimentar o caminho que revelaria os mecanismos de ação, e posteriormente de resistência, dos primeiros quimioterápicos utilizados até hoje para o tratamento dos glioblastomas (RAMIREZ et al. 2013; THOMAS et al. 2013). Assim como a penicilina revolucionou o tratamento de infecções bacterianas em meio a Segunda Guerra Mundial, os agentes alquilantes foram a primeira classe de fármacos a ser empregada no tratamento do câncer, a partir dos anos 1940, seguindo-se também a uma descoberta acidental do seu potencial efeito terapêutico observado pela associação com seus efeitos tóxicos. Durante a Primeira Guerra, o gás mostarda de enxofre foi utilizado como arma militar, uma das mais devastadoras e mortíferas por seus efeitos vesicantes, como irritação da pele, cegueira e danos pulmonares. A observação, porém, de que tropas e civis sobreviventes desses ataques tinham, em comum, quadros de supressão da medula óssea e aplasia linfóide motivou os estudos do gás como agente antitumoral. Pela síntese orgânica de análogos químicos com menor toxicidade, foi possível

revelar a eficácia dos mostardas de nitrogênio em ensaios clínicos com pacientes de linfoma, que apresentaram regressão dos tumores favorecendo o alívio dos sintomas. Esses primeiros resultados encontraram novos investimentos em pesquisas acadêmicas e por companhias farmacêuticas para o desenvolvimento de derivados com maior eficácia terapêutica e menor toxicidade para os pacientes. Dessa forma, surgiram múltiplas opções de agentes alquilantes divididas nas sub-classes de nitrosouréias, alquil sulfonatos, etileniminas e triazinas, utilizadas, em geral, com maior impacto sobre neoplasias de crescimento lento, como as leucemias crônicas, mas logo foram propostas aplicações para tumores sólidos, para tratamento de câncer de pulmão, ovário, mama, linfomas, sarcomas, mieloma e doença de Hodgkin, tendo os carcinomas de células escamosas sido uma das primeiras indicações desses tratamentos para tumores sólidos (COLVIN 2003; RALHAN e KAUR 2007; GATE e TEW 2011).

As propriedades químicas características dos agentes alquilantes, a princípio descritas em termos da sua reatividade direta, como aceptores eletrófilos, ou gerando espécies eletrofílicas após ativação metabólica, formando ligações covalentes com centros nucleofílicos (amino, carboxil, fosfato e sulfidril) de macromoléculas biológicas (DNA, RNA e proteínas), despertaram grande interesse científico, iniciado durante os anos 60, quando trabalhos independentes demonstraram, em paralelo, que esses compostos apresentavam efeitos opostos e indissociáveis como carcinógenos e quimioterápicos, devido a sua maior afinidade com as moléculas de DNA, podendo alquilar qualquer átomo de nitrogênio e oxigênio das bases púricas ou pirimídicas (DEXTER 2000; MITRA 2007; GATE e TEW 2011). Não obstante a seletividade nucleofílica para a posição N7 de guaninas (62% dos adutos formados), a formação de O⁶-alquilguanina (O⁶-alquilG) ou O⁶-metilguanina (O⁶-metilG), correspondente a 7% das lesões, possui uma relação direta com a citotoxicidade desses compostos, da mesma forma que seu potencial mutagênico foi inicialmente atribuído, em 1969, ainda que ocorram em menor proporção, a erros de pareamento com timina, sendo posteriormente demonstrado, em 1974, que decorreria de um acúmulo de O⁶-

metilG, conforme observado em gliomas induzidos por N-metil-N-nitrosouréia em camundongos (GERSON 2004; MITRA 2007; GATE e TEW 2011). Os agentes alquilantes podem ser monofuncionais, por reagirem apenas com uma fita de DNA, ou bifuncionais, quando bases de ambas as fitas são ligadas por reação cruzada covalente. Neste último caso, forma-se uma ponte entre as fitas que impede a sua separação durante a sua transcrição ou duplicação. A monoalquilação, ou mesmo a ligação desses agentes a dois sítios N7 da mesma fita, não afeta a separação da dupla hélice, mas dificulta que as enzimas da maquinaria de replicação ou de transcrição consigam progredir na leitura do DNA, interrompendo sua atividade. Por um terceiro mecanismo, a alquilação pode acontecer enquanto enzimas de reparo tentam substituir bases previamente alquiladas, o que pode resultar na fragmentação do DNA por sucessivos processos de depuração (RALHAN e KAUR 2007). Alterações como essas no DNA levam a uma resposta imediata de parada do ciclo celular, para que as enzimas de reparo tenham tempo de regenerar os resíduos alquilados, ou mesmo prevenir pontos de quebra no DNA, mas dependendo da extensão dos danos, as células não conseguem se recuperar e ativam vias que convergem para sua auto-destruição por apoptose (DEXTER 2000; GERSON 2004; RALHAN e KAUR 2007; GATE e TEW 2011). A aplicação dos agentes alquilantes para o tratamento do câncer se dá justamente pelo fato de células com alta capacidade proliferativa, como as células tumorais, serem mais sensíveis a sua atuação por se encontrarem, na maior parte do tempo, nas fases G1 e S do ciclo celular, quando o material genético é duplicado previamente à divisão celular, amplificando o ataque dessas moléculas ao DNA em comparação com as células em estado quiescente (RALHAN e KAUR 2007). A consequência dessa atividade sobre moléculas de DNA mais disponíveis está relacionada à toxicidade dos agentes alquilantes sobre tecidos normais com alta taxa de renovação celular, como o epitélio gastrointestinal e a medula óssea, onde ocorre a hematopoiese das linhagens celulares sanguíneas, o que explica seu efeito mielossupressor observado décadas atrás (SANDERSON e SHIELD 1996; GATE e TEW 2011). Outros efeitos

colaterais clássicos incluem as toxicidades gonadal e pulmonar, alopecia (também por comprometer as células dos folículos capilares), teratogenicidade e imunopressão pela inibição da produção de anticorpos (SCHWAB 2011).

Terapeuticamente, os agentes bifuncionais são tradicionalmente considerados mais eficazes, principalmente aqueles com múltiplos grupos funcionais, os quais, apesar de formarem monoaddutos, também atuam formando reações cruzadas, como o busulfan, thiotepa, os mostardas de nitrogênio e 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosouréia (BCNU), um dos primeiros fármacos a demonstrar atividade contra GBM, em conjunto com 1-(2-cloroetil)-3-ciclohexil-1-nitrosouréia (CCNU). Algumas nitrosouréias, porém, como N-metil-N-nitrosouréia (MNU), este um composto carcinogênico, e clorozotocina (CNU), são agentes monofuncionais, similares à dacarbazina (DTIC), um pró-fármaco cuja conversão enzimática dá origem a sua forma ativa alquilante 5-(3-metiltriazin-1-il)-imidazol-4-carboxamida (MTIC) (SANDERSON e SHIELD 1996; GERSON 2004; THOMAS et al. 2013). A síntese dessa classe de imidazotetrazinonas foi preconizada por cientistas ingleses no final da década de 70, incluindo o composto que se convencionou denominar, posteriormente, de temozolomida (TMZ), pró-fármaco quimicamente análogo a DTIC para gerar o mesmo metabólito ativo alquilante. A vantagem terapêutica da TMZ, no caso dos tumores de SNC (embora tenha sido avaliado inicialmente para melanoma), além de suas propriedades lipofílicas que compartilha com as nitrosouréias, pela qual se favorece sua passagem através da membrana hematoencefálica, está em seu tamanho molecular reduzido e a maior biodisponibilidade pela distribuição uniforme entre os tecidos, inclusive o cérebro, em modelos animais, atrelado a sua conversão espontânea em MTIC ao atingir pH fisiológico. Por outro lado, DTIC apresentava baixa eficácia clínica pela sua reduzida taxa de metabolização em humanos, mas, apesar disso, foi largamente utilizado para o tratamento de melanoma metastático, entre o fim de 1970 e o início de 1980, e, com algum sucesso, em gliomas (GATE e TEW 2011; THOMAS et al. 2013). Enquanto os tratamentos com os

primeiros agentes alquilantes, como BCNU, passaram a ser incorporados avidamente na prescrição clínica para gliomas, pela carência de alternativas terapêuticas que combatessem o avanço da doença, a sua alta toxicidade, principalmente devido à mielossupressão, limitou seu uso a casos de progressão de malignidade, mesmo que não representassem um ganho significativo de sobrevida em relação à radioterapia de primeira linha (THOMAS et al. 2013).

Os ensaios clínicos com TMZ tiveram início em 1992, após os testes em animais confirmarem a cinética de distribuição comparável entre os tecidos e a sua tolerabilidade, em função da mielotoxicidade menos severa e frequente do que a encontrada para seu análogo prévio, mitozolomida. Os primeiros estudos, que avaliaram pacientes com astrocitomas e gliomas de alto grau recorrentes, detectaram, por meio de tomografia computadorizada, uma melhora clínica proeminente, gerando expectativas na comunidade de neurooncologia para os ensaios de fase II realizados em seguida. Embora tenha-se alcançado um ganho de sobrevida livre de progressão de apenas 4 semanas, no ano de 1999, TMZ foi o primeiro fármaco a ser aprovado, em 20 anos, para o tratamento de pacientes de glioma, tanto pela agência reguladora americana *Food and Drug Administration* (FDA), quanto pela europeia (*European Medicines Evaluation Agency*). Em 2002, os estudos americanos e europeus de fase II voltaram-se para o tratamento concomitante pós-cirúrgico de radioterapia com TMZ, obtendo resultados de sobrevida média de 3-4 meses além dos 12 meses alcançados com cirurgia seguida de radioterapia apenas, chamando a atenção o dobro de sobreviventes no período de 2 anos (26,5% contra 10,4% segundo o estudo europeu). Como o único benefício oferecido aos pacientes pelo tratamento seria pelo prolongamento da sobrevida e não pela cura, o TMZ estava associado aos melhores níveis de qualidade de vida, que não pioraram em combinação com a radioterapia, a não ser por um leve aumento na mielossupressão, diferente dos mesmos regimes de tratamento com BCNU e CCNU, que apresentaram maior leucopenia dose-limitante. Por isso, a radioterapia concomitante a TMZ se tornou rapidamente o protocolo de

rotina clínica no tratamento de glioblastomas diagnosticados primariamente tanto nos Estados Unidos quanto na Europa (THOMAS et al. 2013). Desde então, nenhum outro agente citotóxico se apresentou mais eficiente, e mesmo com os avanços no desenvolvimento de terapias-alvo dos últimos anos, a taxa de sobrevida ainda não passa de 5% em pacientes de GBM após 5 anos do diagnóstico, sendo que, na grande maioria desses, os tumores são recorrentes em razão do padrão altamente infiltrativo das células tumorais, que dificultam o estabelecimento de margens de resecção seguras, o que é agravado pela geração de células resistentes ao tratamento radioquimioterápico, as quais são capazes de reconstituir a massa tumoral (GERSON 2004; RAMIREZ et al. 2013; OSTROM et al. 2014).

Ironicamente, o entendimento sobre o mecanismo de resistência à TMZ partiu da elucidação do mecanismo de mutagênese induzida pelos agentes alquilantes, pela qual se chegou à descoberta, em 1977, do gene da O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT), primeiro em *E. coli*, e logo depois em leveduras, roedores e humanos, o qual codifica a enzima O⁶-alquilguanina-DNA-alquiltransferase (AGT), reconhecidamente umas das vias de reparo de DNA mais estudadas ao longo de mais de 30 anos e conservadas evolutivamente (MARGISON et al. 2002; GERSON 2004; MITRA 2007; WELLER et al. 2010; SILBER et al. 2012). A indicação clínica dos agentes alquilantes até o final dos anos 1980, antes de começarem a ser utilizados para o tratamento anti-tumoral, envolvia sua aplicação como imunossupressores, no controle de doenças inflamatórias do tecido conectivo e em terapias experimentais para esclerose múltipla. Em comum, aos pacientes assim tratados seguiam-se ocorrências de neoplasias malignas, principalmente leucemias, também associadas, no mesmo período, ao tratamento da doença de Hodgkin e dos cânceres de mama e ovário (SANDERSON e SHIELD, 1996). Apesar de se acreditar, até o final da década de 70, que a mutagenicidade dos agentes alquilantes estava condicionada à formação de O⁶-alquilG, a sua baixa proporção entre as múltiplas alquilações de bases e resíduos fosfato levou os pesquisadores a

testarem o efeito da incorporação no DNA de uma O⁶-metilG sintética marcada radioativamente, demonstrando, pela primeira vez, que havia um mal-pareamento da base metilada com timina (T), ao invés de sua base complementar citosina (MITRA 2007). Esse viria a ser o mecanismo de ação dos agentes metilantes DTIC e TMZ, que vieram em seguida, sobre o DNA genômico, a partir de um rearranjo unimolecular causado pela presença de oxigênios nucleofílicos, aos quais são transferidos os grupos metila, formando então adutos de O⁶-metilG persistentes (GERSON 2004; SARKARIA et al. 2008). Os primeiros relatos conclusivos de que o reparo de DNA por AGT pode prevenir o câncer, em meados da década de 1990, utilizaram um modelo murino de linfoma induzido por MNU, pelo qual a superexpressão de MGMT humana no timo desses animais impediu o desenvolvimento de linfomas pela remoção eficiente dos adutos de O⁶-metilG após sua exposição a doses de MNU moderadas. O reparo dos erros nas sequências de DNA introduzidos pela metilação se faz essencial para garantir a integridade celular, uma vez que, durante a replicação, as DNA polimerases param sobre esses pontos e acabam inserindo, em 90% das vezes, uma base incorreta pareada com a base metilada (O⁶-metilG:T) na nova dupla fita sendo produzida. Doses excessivas de MNU naquele modelo de linfoma superaram a capacidade protetora de MGMT, fazendo com que essas mutações, incluindo O⁴-metiltimina (O⁴-metilT) formando pareamento errôneo com guanina em 1-2% dos casos, se acumulassem levando à formação dos linfomas (GERSON 2004). Uma das explicações para isso pode ter relação com a função evolutivamente adaptada de AGT, atuando como “enzima suicida” para proteger as células da mutagenicidade provocada pelos agentes alquilantes, sendo que a cada remoção de um grupo metila da posição O⁶ de uma guanina, uma molécula de AGT é irreversivelmente inativada pela transferência covalente desta metila para o seu sítio ativo, o que leva a um rearranjo molecular responsável por desligar a enzima do DNA e encaminhá-la para ubiquitinação e posterior degradação (MARGISON et al. 2002; GERSON 2004; THOMAS et al. 2013). A carcinogenicidade das mutações em geral está condicionada a um

determinado nível limítrofe em que ocorrem, de modo que mesmo após o tratamento com agentes alquilantes na presença de MGMT, ainda existe um grande percentual de mutações não mediadas por O⁶-metilG que permanecem remanescentes (GERSON 2004). Os níveis de O⁶-metilG no DNA de pacientes em tratamento com agentes antitumorais metiladores são de ordens de grandeza muito maiores do que aqueles observados em pacientes não tratados, tornando-os susceptíveis a seus efeitos carcinogênicos quando se consegue estender o tempo de sobrevida a longo prazo. Em pacientes com linfoma, por exemplo, a incidência de leucemia mielóide aguda chega a 20% após regimes terapêuticos que tenham incluído agentes metiladores (MARGISON et al. 2002). Nesse contexto, os pareamentos de O⁶-metilG:T, que persistem pelo desequilíbrio entre o excesso de alquilação e o *turnover* insuficiente de AGT, são reparados, de forma aberrante, pela via acessória MMR (*DNA mismatch repair*). Ao contrário do reparo prévio de G:T por MGMT, durante a replicação do DNA, a DNA polimerase repete o pareamento errôneo da base metilada com timina, que passa a ser detectado pelas proteínas da via MMR, as quais, no entanto, conseguem fazer apenas a reposição de timina por citosina. Enquanto isso, as fitas contendo O⁶-metilG permanecem nas células, gerando “ciclos fúteis” sucessivos de reparo, os quais, por fim, induzem a quebras na dupla fita, ativando vias p53-dependentes de parada do ciclo celular e apoptose (GERSON 2004; SARKARIA et al. 2008). A morte celular funciona então como um mecanismo de contenção para que as mutações não sejam perpetuadas, tanto que animais com duplo nocaute de MGMT e da proteína de MMR, Mlh1, se apresentaram altamente sensíveis à mutagênese, ao mesmo tempo em que tornaram-se resistentes a morte celular induzida por fármacos alquilantes (GERSON 2004).

No início da década de 1990, esse balanço entre mecanismos de reparo de DNA e morte celular passou a ser explorado em termos da resistência tumoral ao tratamento com nitrosouréias cloroetilantes e agentes metilantes. As cloroetilnitrosouréias como BCNU, que já foi amplamente utilizada para o tratamento de gliomas e linfomas, introduzem modificações

também em guaninas formando O⁶-cloroetilguaninas, que logo são convertidas em ligações cruzadas de G-C por pontes covalentes imobilizando a dupla fita de DNA, as quais são dificilmente reparadas por mecanismos como BER (*base excision repair*), sendo por isso pouco carcinogênicas (2-5 ligações cruzadas são letais para as células ao passo que mais de 5000 adutos de O⁶-metilG são necessários para o mesmo efeito), considerando que a forquilha de replicação não consegue passar pelos vários pontos de mutação, o que leva, gradualmente, à morte celular. Em modelos animais comparando ambos os tratamentos, xenoenxertos de tumores humanos de cérebro, rhabdomyosarcoma e com linhagens celulares de câncer de cólon que expressavam MGMT foram completamente resistentes a doses máximas toleráveis, ao contrário daqueles que não a expressavam, tornando-se bem mais sensíveis (GERSON 2004; SARKARIA et al. 2008).

Os níveis de expressão de MGMT variam consideravelmente entre órgãos com maior atividade de AGT, como fígado, seguido de pulmão e rins, em relação àqueles com menor atividade, como cérebro, pâncreas, células hematopoiéticas e tecidos linfóides. Células tumorais, por outro lado, frequentemente exibem níveis de expressão de MGMT maiores do que seus tecidos de origem, como é o caso dos tumores de cólon, mama, pulmão, pâncreas, linfomas não-Hodgkin, mielomas e dos gliomas (GERSON 2004; WELLER et al. 2010). Esses níveis, no entanto, são variáveis mesmo entre tumores do mesmo tipo, de modo que em cerca de 30% dos gliomas, a expressão de MGMT simplesmente não é encontrada. Como o gene não aparecia comumente mutado ou deletado, levantou-se a hipótese, no final dos anos 1990, de que a perda de sua expressão seria consequência de modificações epigenéticas, as quais não alteram a informação genética das células. De fato, descobriu-se que, assim como outros genes para proteínas de reparo de DNA e supressores tumorais, as ilhas CpG da região promotora de MGMT encontram-se hipermetiladas em cerca de 40% dos gliomas, o que não é comum em tecidos normais, silenciando o gene por alterações na conformação da cromatina que impedem a ligação de fatores

de transcrição. Essa foi a razão pela qual os pacientes com esse perfil de metilação responderam melhor ao tratamento com BCNU, apresentando regressão tumoral e sobrevida geral e livre de doença prolongadas (ESTELLER et al. 2000; WELLER et al. 2010). Ainda que a hipermetilação do promotor de MGMT tenha um valor prognóstico por se correlacionar com melhor sobrevida geral em gliomas *IDH*-mutado/g-CIMP-positivos, 50% dos casos g-CIMP-negativos também possuem essa metilação, a qual, portanto, pode não ser resultante desse fenótipo metilador que caracteriza os gliomas *IDH*-mutados. Metilações, no entanto, também podem ocorrer em ilhas CpG dentro do gene de MGMT, estando mais próximas de um critério prognóstico para gliomas g-CIMP-positivos em pacientes acima dos 65 anos de idade (MUR et al. 2015).

Da mesma forma encontrada para BCNU, o gene MGMT tem atraído cada vez mais atenção recentemente, desde a publicação, em 2012, de um estudo fase III com pacientes de glioblastoma, mostrando que aqueles portando MGMT tumoral com promotores metilados tiveram maior sobrevida quando tratados apenas com TMZ (tratamento neoadjuvante, ou seja, destinado a reduzir o tamanho tumoral, antes que possa ser realizada a remoção cirúrgica), comparado a pacientes que carregavam o gene normal. Ensaio clínico randomizado posteriores avaliaram, pela análise de amostras de tecido tumoral, que pacientes idosos com gliomas malignos que possuíam a hipermetilação do promotor de MGMT se beneficiavam apenas da quimioterapia com TMZ em relação à radioterapia isolada, sobrevivendo mais tempo na comparação com os portadores de gliomas com o gene normal. A partir daí, a utilidade clínica da hipermetilação do promotor de MGMT como marcador preditivo tem sido cada vez mais reconhecida e aplicada pelos neuro-oncologistas para a seleção de pacientes idosos, os quais respondam melhor a TMZ como tratamento de primeira linha, principalmente para aqueles que não tolerem o regime combinado de radioquimioterapia (WELLER et al. 2010; THOMAS et al. 2013; WELLER et al. 2015). Alguns estudos também apontam uma clara sobreposição entre MGMT, como fator preditivo de resposta a TMZ, e seu condicionamento ao

valor prognóstico de tumores com *IDH*-mutante, uma vez que a hipermetilação de *MGMT* aparece presente em todos os casos de glioblastomas g-CIMP-positivos, embora esses dados ainda precisem ser confirmados. Seguindo a tendência atual de terapias personalizadas, os pacientes acometidos por glioblastomas portando hipermetilação de *MGMT* podem ser diagnosticados, atualmente, por técnicas modernas de PCR metilação-específica ou pirosequenciamento de DNA, abandonando os exames por imunohistoquímica que geravam resultados com margem para interpretação entre diferentes analistas, sendo então beneficiados pelo tratamento com TMZ, ao contrário daqueles que apresentam o gene tumoral não metilado, os quais ainda permanecem sem alternativas terapêuticas (HUSE e ALDAPE 2014; WELLER et al. 2015). Análises genômicas comparando diferentes subtipos de GBM podem refinar, ainda mais, a seleção de pacientes previstos como respondedores ao tratamento com TMZ, levando em consideração que, segundo Brennan et al. (2013), a presença de mutações no promotor do gene *MGMT* teria aplicação como biomarcador preditivo específico apenas em pacientes com GBM do subtipo mutacional/epigenômico “clássico” (RTKII). O custo do tratamento com TMZ, porém, mesmo para os pacientes clinicamente elegidos, é a rápida aquisição de resistência pelos tumores, seja por meio da seleção gradual de células com expressão de *MGMT* (considerando a variabilidade celular dos GBMs) para retomar a formação tumoral, ou pelo acúmulo de mutações aleatórias, características do mecanismo de ação dos agentes alquilantes, podendo também favorecer a repopulação dos tumores com células que tenham vias alternativas de sobrevivência ativadas. Uma delas estaria associada ao silenciamento de proteínas envolvidas com MMR nas células tumorais, como nos gliomas, seja por alguma mutação em si, ou mesmo por metilações dos promotores de determinados genes, rompendo a última barreira de contenção reminiscente das células de origem responsável por impedir que mutações se perpetuem no DNA, fazendo com que o acúmulo genômico de pareamentos O⁶-metilG:T não seja detectado pelas células tumorais, e essas passem a contribuir, sofrendo número exponencial de novas

mutações somáticas, para o fenótipo de agressividade progressiva dos gliomas (GERSON 2004; SARKARIA et al. 2008; RAMIREZ et al. 2013; OSUKA e VAN MEIR 2017).

1.3 HETEROGENEIDADE CELULAR NOS GBMS E SUA REPRODUTIBILIDADE EM MODELOS ANIMAIS

O componente multiforme dos glioblastomas foi preconizado na tentativa de descrever, histologicamente, a grande diversidade morfológica das células tumorais, inicialmente proposta como um modelo de organização hierárquica originado a partir de uma subpopulação de células-tronco tumorais (CSC), as quais seriam responsáveis por estabelecer um núcleo gerador de células tumorais capaz de reconstituir a multicelularidade dos tumores como resultado de sua resistência terapêutica. A presença dessas CSCs tem sido demonstrada em GBMs pela marcação de proteínas de superfície celular como CD133, integrina 6 e CD15, além da sua capacidade variável de formar neuroesferas e de tumorigenicidade *in vivo* dependendo da sua expressão gênica altamente mutável. Atualmente, no entanto, com a descrição molecular dos GBMs, um dos tumores mais bem caracterizados geneticamente, o sequenciamento de células tumorais individuais tem lançado luzes sobre a possibilidade de que os GBMs talvez não tenham uma célula de origem comum, mas sejam compostos por uma miscelânea de células com perfis mutagênicos divergentes e aparentemente aleatórios, o que, reciprocamente, aumenta suas chances de serem selecionadas as subpopulações funcionalmente mais equipadas para oferecer resistência aos tratamentos anti-tumorais. Um exemplo disso está na observação de que ampliações de *EGFR*, *PDGFRA* e *MET* podem ocorrer simultaneamente, ou serem diferencialmente expressas entre células de uma mesma amostra de tumor. O silenciamento epigenético também pode responder por uma parcela dessas assinaturas moleculares aleatórias, mas mecanismos não genéticos, como a sinalização intercelular, mesmo que indiretamente, influenciam na manutenção da heterogeneidade celular. Como no caso da

expressão de EGFRvIII, que leva à secreção de um conjunto de citocinas para a ativação de EGFR tipo-selvagem nas células vizinhas, resultando em um crescimento tumoral acelerado à medida que favorece o surgimento de sub-populações molecularmente diversas (CLOUGHESY et al. 2014).

As origens mutacionais, e não as células de origem, têm sido consideradas, mais recentemente, como fator determinante para o surgimento de GBMs, as quais podem ser validadas, a partir de dados do TCGA sobre as vias de sinalização centrais comumente envolvidas no processo de tumorigênese, por meio de modelos murinos geneticamente modificados pela deleção e superexpressão condicionais de genes supressores tumorais e oncogenes, respectivamente. Entre as evidências disso, destacam-se: a combinação da deleção de INK4A/ARF com a superexpressão de EGFRvIII em células-tronco neurais, assim como em astrócitos, que é suficiente para promover a formação de gliomas de alto grau, independente da célula de origem; a tumorigenicidade de EGFRvIII ocorre em um contexto de perda de PTEN e CDKN2; a formação de gliomas de alto grau também pode depender da sinalização combinada de RAS e AKT ou da perda de NF1/p53, individualmente ou em combinação com a perda de PTEN e RB; a perda de p53 e NF1 em neurônios maduros, além da perda de PTEN e ativação de RAS em astrócitos, convergem para o mesmo efeito de indução tumoral. O encadeamento temporal de mutações sugere ainda uma pressão seletiva para que as células desenvolvam um determinado fenótipo, como no caso da perda de p53/PTEN, que coopera, em termos de sinalização, para a perda de RB1, a qual acelera as ampliações de receptores tirosina quinase (RTK) durante a progressão dos gliomas. Embora os modelos genéticos mimetizem o processo de tumorigênese, a heterogeneidade molecular dos tumores humanos pode ser reproduzida, alternativamente, a partir do estabelecimento de xenotransplantes cerebrais murinos, com amostras tumorais diretamente extraídas dos pacientes, que podem ser aplicadas para avaliação de respostas terapêuticas previamente ao tratamento em humanos (CLOUGHESY et al. 2014).

1.4 ANGIOGÊNESE COMO RESPOSTA TUMORAL À HIPÓXIA

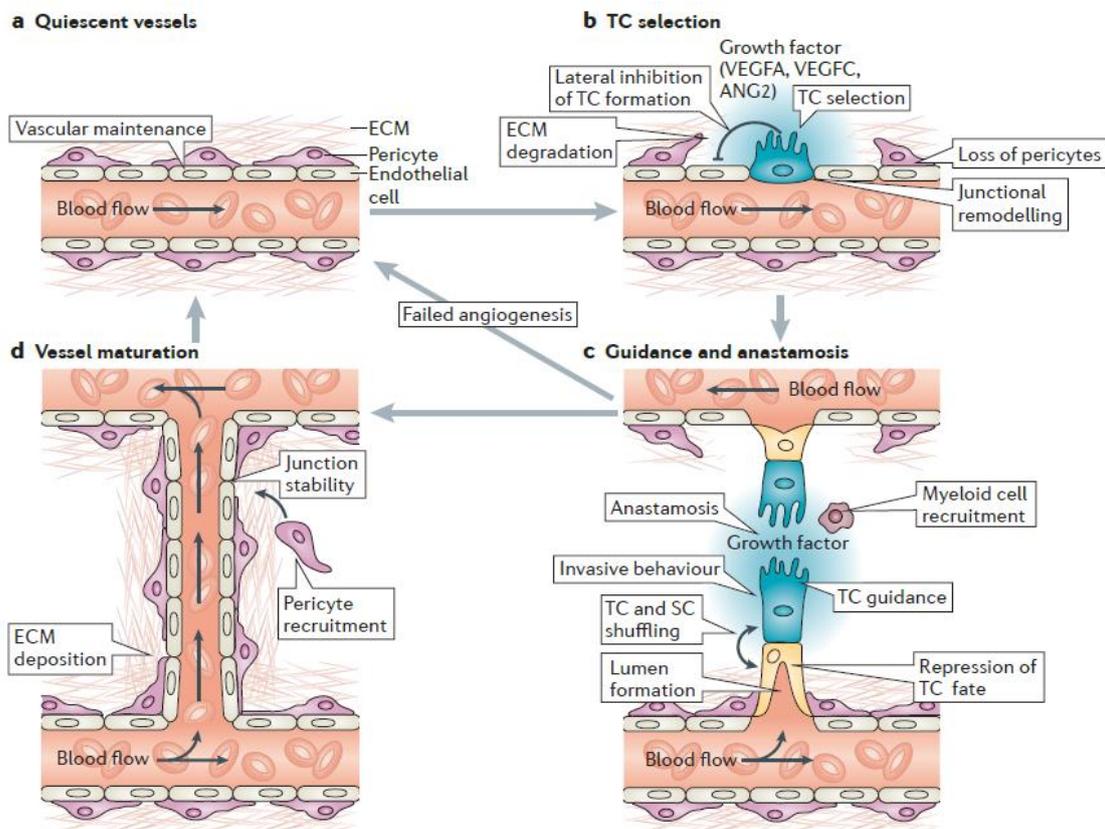
A formação de novos vasos sanguíneos a partir de ramificações da vasculatura pré-existente, processo conhecido como angiogênese, está intimamente ligada a importantes mecanismos fisiológicos. Estes envolvem desde o remodelamento vascular durante o desenvolvimento embrionário, para dar origem ao sistema circulatório do indivíduo adulto, até a regeneração tecidual, quando capilares são estimulados a se organizar em um novo arcabouço microvascular, que permeiam os tecidos de cicatrização. Tecidos também gerados *de novo* durante o ciclo menstrual, na preparação do sistema reprodutivo para a gestação, requerem este aporte sanguíneo complementar (CHUNG et al. 2010).

Da mesma forma que existe uma complexa regulação da produção de novos tecidos pelo organismo, a angiogênese, que alimenta tal sistema, é produto de um balanço sensível à variações de fatores pró- e anti-angiogênicos secretados por células adjacentes aos vasos, e que pode ser alterado quando esses tecidos se encontram em carência de suprimento sanguíneo – além de estar condicionado ao recrutamento de células murais (que dão suporte funcional aos vasos em formação) e a presença de determinadas proteínas da matriz extracelular. Algumas condições patológicas, por outro lado, também são responsáveis por romper este equilíbrio para garantir sua própria sustentação, por meio de uma angiogênese aberrante, como acontece nas doenças inflamatórias e no desenvolvimento de tumores sólidos (NAKATSU e HUGHES 2008).

A angiogênese constitui um processo de múltiplas etapas, como uma sequência de eventos coordenados em que células endoteliais quiescentes são ativadas por fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), angiopoietinas, entre outros. Em vasos estáveis, as células endoteliais (ECs) se apresentam, tipicamente, como blocos que formam uma monocamada de células inativas delimitando a superfície luminal (interna) na configuração de tubos vasculares. Este fenótipo quiescente é mantido até que as ECs

detectem sinais pró-angiogênicos, os quais induzem alterações fundamentais em seu comportamento. Como resposta, as ECs perdem as junções aderentes que mantêm a rígida estrutura fechada do endotélio por justaposição celular, ativam proteases que degradam a membrana basal e a matriz extracelular circundante, e adquirem intensa motilidade e atividade invasiva para iniciar a ramificação de um novo vaso sanguíneo em direção ao estímulo angiogênico. As ECs então se multiplicam, ainda mantendo-se fracamente ligadas umas às outras e ancoradas ao vaso de origem, formando uma coluna de migração que avança pelo espaço perivascular, ao mesmo tempo em que reconfiguram novamente sua morfologia e adesão celular para a recomposição das estruturas tubulares características do tecido. Uma vez iniciada, a ramificação continua até atingir o foco do estímulo, quando passa a interagir com os vasos adjacentes, o que leva à perda do fenótipo invasivo das ECs do vaso nascente, à reativação das junções aderentes e, finalmente, a sua fusão ao vaso receptor, formando um lúmen contínuo que permite a circulação sanguínea, processo este conhecido por anastomose. Depois disso, o recrutamento de outras células acessórias se torna um fator crítico para a subsequente maturação da vasculatura nascente. Fatores como PDGFB (*platelet-derived growth factor B*) e TGF β 1 (*transforming growth factor- β 1*) recrutam células murais (pericitos e células musculares lisas) para dar estabilidade e reforçar as paredes da vasculatura recém-formada. Por último, com a deposição da membrana basal sobre a superfície abluminal (externa) e o fortalecimento das junções célula-célula, as ECs voltam ao seu estado basal desativando, por completo, vias de sinalização pró-angiogênicas para reestabelecer o fenótipo quiescente de vasos maduros (Figura 3) (BERGERS e BENJAMIN 2003; HERBERT e STAINIER 2011). Durante estas etapas, as células endoteliais passam por várias transições morfológicas e alterações da expressão gênica, necessárias principalmente para o remodelamento da matriz extracelular, pela secreção de proteases, e o recrutamento de pericitos, células musculares lisas e fibroblastos, que envolvem os vasos

recém-formados, garantindo a sua estabilização (NAKATSU e HUGHES 2008; DE ROSSI et al. 2013).



Fonte: Adaptado de HERBERT e STAINIER (2011).

Figura 3 – Mecanismo de reprogramação celular do tecido endotelial para a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese fisiológica).

No decorrer dos últimos 50 anos, a construção do conhecimento sobre o papel central da neovascularização, por uma reorientação dos vasos sanguíneos do hospedeiro, a qual permite a progressão tumoral com ganho de malignidade e sua disseminação metastática pelo organismo, se deu a partir de duas descobertas fundamentais divididas, tanto pela linha temporal quanto pelas formas de abordagem, entre dois nomes que se destacaram como referência na área: Judah Folkman e Gregg L. Semenza. Em meio a estudos de soluções de hemoglobina que serviriam como alternativa à transfusão sanguínea, Folkman analisava a viabilidade celular da glândula

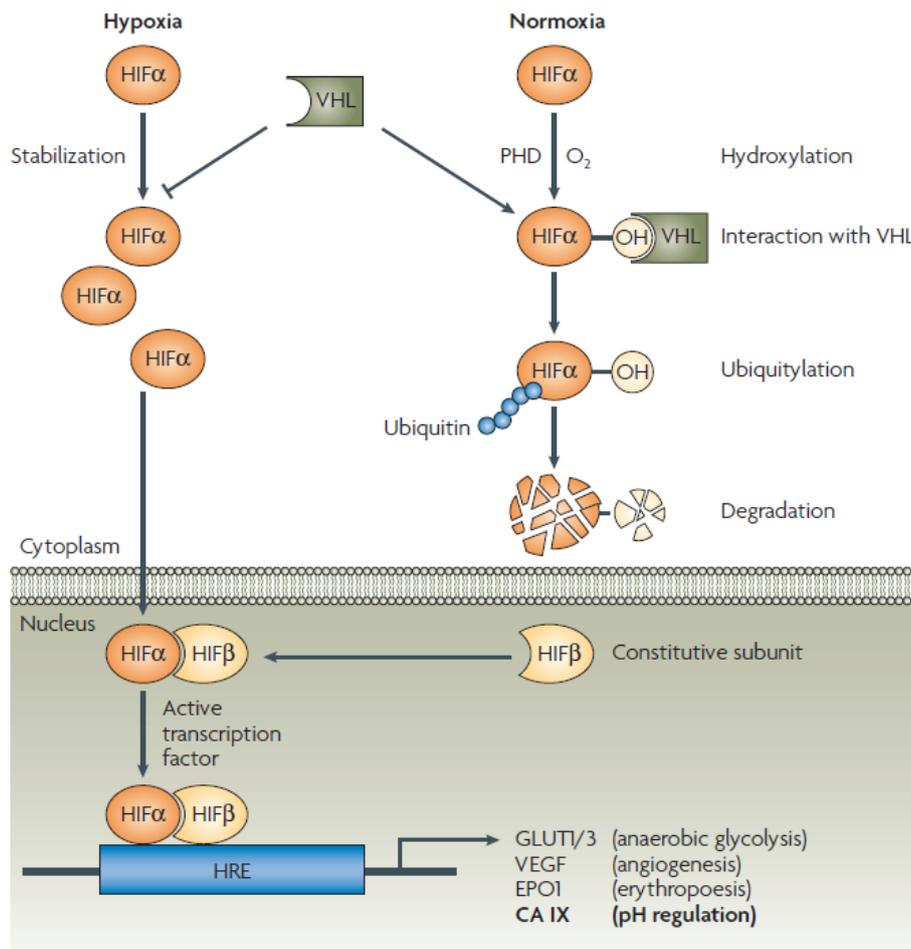
tireóide canina durante a perfusão arterial contínua com essas soluções. Para determinar se os órgãos perfundidos poderiam sustentar o crescimento celular enquanto estivessem viáveis, observou-se que células de melanoma de camundongo neles injetadas formavam pequenos tumores que paravam de crescer quando atingiam 1-2 mm de diâmetro. No entanto, quando eram transplantados para tecidos normais de camundongos, esses tumores cresciam rapidamente, ultrapassando 1 cm³, e se tornavam altamente vascularizados, apontando a neovascularização como fator limitante para o crescimento tumoral. A mudança de paradigma representada pelo trabalho de Folkman, quando a teoria mais aceita na época era de que a vasculatura tumoral seria consequência de uma reação inflamatória ao processo de morte celular, o qual levaria às regiões de necrose dentro do tumor, abriu um universo de novas possibilidades para a abordagem terapêutica de suas descobertas, pelo o que ele próprio passou a chamar de anti-angiogênese. Nos anos seguintes, Folkman também demonstrou que o recrutamento à distância de novos vasos sanguíneos em direção ao tumor era dependente da secreção de fatores de crescimento, o que levou à descrição do *tumor angiogenesis factor* (TAF), pavimentando o caminho para que grupos de pesquisa em todo mundo reconhecessem o potencial terapêutico de bloquear a neovascularização para controlar o crescimento tumoral (RIBATTI 2008).

O marco seguinte que estabeleceu o conceito de progressão tumoral pela angiogênese revelou a necessidade de mecanismos secundários e complementares para que eventos oncogênicos, responsáveis pela tumorigênese, não se perdessem em apenas estimular a proliferação celular ilimitada, característica do câncer, mas criassem uma condição favorável para que as células tumorais acumulassem mutações somáticas e alterações epigenéticas necessárias a sua adaptação ao principal limitante fisiológico ao crescimento de qualquer tecido: o suprimento sanguíneo de oxigênio e nutrientes. A maioria das funções de células normais ou transformadas é modulada primariamente de acordo com a concentração de oxigênio disponível em seu microambiente. Por isso, nos tumores em

crescimento, as células mais próximas dos vasos sanguíneos estão expostas a concentrações relativamente altas de oxigênio, as quais diminuem gradativamente em direção ao núcleo tumoral, onde chegam a níveis nulos gerando a morte celular por necrose. Na interface deste gradiente entre viabilidade e morte celular, encontram-se células capazes de apresentar respostas adaptativas à baixa disponibilidade de oxigênio (hipóxia), principalmente pela ativação do fator de transcrição *hypoxia-inducible factor 1 α* (HIF-1 α) (SEMENZA 2010). Enquanto tentava identificar as sequências de DNA que controlavam a expressão diferencial tecido-específica do gene *EPO*, que codifica para a produção do hormônio eritropoietina pelos rins para estímulo à eritropoiese na medula óssea, Semenza passou a observar que sua expressão era regulada pela presença de oxigênio. Pela identificação, por volta de 1991, da região 3' flanqueando o gene, que era ativada pela hipóxia em linhagens celulares humanas, como tal denominada de elemento de resposta à hipóxia (HRE), experimentos inserindo mutações nessa região davam indícios de que seria controlada por uma proteína ligante bastante específica, a qual foi descrita, quatro anos depois, como HIF-1, um complexo heterodimérico formado pelas subunidades HIF-1 β , constitutivamente expressa, e HIF-1 α , responsiva à hipóxia (SEMENZA et al. 1991; WANG et al. 1995; KE e COSTA 2006; MASOUD e LI 2015).

A regulação da atividade de HIF-1 α compreende, em condições normais, reações de hidroxilação da molécula, catalisadas em diferentes resíduos da proteína por enzimas utilizando oxigênio e α -cetoglutarato como substratos, que levam a sua degradação dentro das células. Desses resíduos, a hidroxilação mais comum ocorre em prolinas nas posições 402 e/ou 564 pela ação da prolil hidroxilase 2 (PHD2), modificação que cria uma interface para interação com a proteína supressora tumoral von Hippel-Lindau (VHL), a qual recruta a ligase de proteína-ubiquitina E3 para catalisar a poliubiquitinação de HIF-1 α e assim submetê-lo à degradação proteossômica. Um mecanismo auxiliar envolve a hidroxilação da asparagina-803 pelo fator de inibição de HIF-1 (FIH-1), a qual bloqueia a

interação de HIF-1 α com seus co-ativadores P300 e CBP para a formação, juntamente com HIF-1 β e STAT3, de um complexo transcricional capaz de se ligar a regiões promotoras de genes alvo. Isso acontece em condições de hipóxia, quando não existe oxigênio suficiente para as atividades enzimáticas de hidroxilação, levando ao acúmulo de HIF-1 α e sua dimerização com HIF-1 β para que possam se ligar a HREs contendo a sequência consenso 5'-RCGTG-3' (sendo R uma purina A ou G) e então recrutar seus co-ativadores para iniciar o processo de transcrição (Figura 4). De acordo com dados de sequenciamento combinados com resultados de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) em escala genômica, foram descobertos, até o momento, em torno de 800 genes diretamente associados ao controle transcricional pela família de proteínas HIF (ao menos 1 em cada 30 genes humanos), incluindo a subunidade HIF-2 α , muito similar, em termos de sequência genética, a HIF-1 α , além de ser regulada também por hidroxilações em prolina e asparagina e formar o mesmo tipo de complexo transcricional, levando à sobreposição parcial de genes alvo entre ambas as subunidades, mas com alguns deles ainda exclusivos. A abrangência de processos regulados por HIF se torna ainda mais ampla pelo seu controle indireto sobre a expressão gênica, modulando a transcrição de microRNAs e enzimas modificadoras de cromatina. Uma terceira subunidade, HIF-3 α , atua como inibidor de HIF-1 α , o qual também controla sua expressão, para manter sua própria atividade em níveis controlados por mecanismo de *feedback* negativo (SEMENZA 2010; SEMENZA 2012).



Fonte: Adaptado de SUPURAN (2008)

Figura 4 – Mecanismo de ativação de HIF-1 α durante a hipóxia, o qual leva à sua atuação como fator de transcrição, juntamente com a subunidade constitutiva HIF-1 β , de proteínas envolvidas principalmente com adaptação celular ao metabolismo anaeróbio, ou secretadas como resposta à perfusão sanguínea deficiente, através do estímulo à angiogênese.

Revelado seu evidente protagonismo como “disjuntor” geral das vias de sinalização celular, não demorou para que surgissem evidências histopatológicas, a partir de 1999, da associação entre níveis aumentados de HIF-1 α com maior risco de mortalidade principalmente para pacientes portadores de câncer de mama, cervical e endometrial em estágios iniciais, que geralmente tem relação com prognósticos favoráveis. Assim como em modelos animais, a maior expressão de HIF-1 α , e também de HIF-2 α , em tumores humanos se correlaciona com o aumento da atividade proliferativa,

da vascularização e do surgimento de metástases, que são estimulados pelo mecanismo básico de hipóxia intratumoral, como acontece nos tumores de mama, por exemplo, cujos níveis de oxigenação vão de 65 mm Hg, no tecido normal, para 10 mm Hg dentro do tumor. Os dados transcriptômicos obtidos para células tumorais *in vitro*, aliados a ensaios de validação funcionais, foram os alicerces sobre os quais foi possível descrever o alcance dos processos celulares modulados, em especial por HIF-1 α , com a expressão induzida de proteínas críticas à aquisição de um fenótipo maligno: proliferação, sobrevivência, angiogênese, resistência a radiação e quimioterapia, instabilidade genômica, imortalização, reprogramação do metabolismo e regulação do pH, evasão imune, invasão, transição epitélio-mesênquima, metástase e manutenção de células-tronco (mais associada a HIF-2 α , principalmente em neuroblastomas e glioblastomas) (WIGERUP et al. 2016). No entanto, apenas uma parcela dos genes envolvidos nessas vias será de fato ativada ou mesmo responsiva à HIF-1 α ou HIF-2 α , dependendo das alterações genéticas que levam a sua hiperativação durante a transformação maligna. Algo que ocorre até mesmo com HIF-1 α em alguns tipos de tumores, nos quais se mantem constantemente ativado, independente das condições de hipóxia, tanto pelo ganho de função de oncogenes, como no sarcoma de Kaposi, em que a infecção por herpesvírus ativa proteínas responsáveis por aumentar a meia-vida, a localização nuclear e a atividade de HIF-1 α , quanto pela perda de função de supressores tumorais, como o VHL, reduzindo a degradação de HIF-1 α no carcinoma de células renais (ARJUMAND e SULTANA 2012). A demonstração mais nítida desta atividade sustentada de HIF-1 α , em ambos os tumores, pode ser observada por sua vascularização precoce e abundante, ressaltando ainda mais sua importância na indução da angiogênese tumoral e na adaptação metabólica durante a hipóxia, como respostas cruciais e imediatas para garantir a sobrevivência celular. Por outro lado, no caso da resposta à hipóxia, enquanto centenas de genes tem sua expressão aumentada diretamente por HIF-1 α , um número equivalente desses, com efeitos contrários aos daqueles ativados, deixa de ser

expresso, indiretamente, pela atuação de HIF-1 α sobre seus repressores transcricionais. A perda da expressão de caderina, por exemplo, é essencial para invasão e metástase tumoral e, para isso, HIF-1 α ativa a transcrição dos genes para TCF3, ZFHX1A e ZFHX1B, que se ligam ao promotor do gene de E-caderina para suprimir sua expressão. Em outro mecanismo, HIF-1 α pode ser recrutado, durante a hipóxia, por SP1 para o promotor dos genes MSH2 e MSH6, onde compete para deslocar Myc, seu ativador transcricional, deste sítio, levando a uma menor produção do complexo MutSalpa, proteína destinada ao reparo de mal-pareamentos de DNA, o que promove, conseqüentemente, maior instabilidade genética para favorecer a progressão tumoral (KOSHIJI et al. 2005; SEMENZA 2010; SEMENZA 2012).

O principal efeito de HIF-1 α sobre a angiogênese durante a hipóxia, ou pela sua ativação constitutiva, está em atuar como fator de transcrição de VEGF, potente indutor de células endoteliais, embora não seja o único, para a formação de novos vasos. Como consequência disso, muitas das terapias-alvo atuais (discutidas nas próximas seções, dentro do contexto dos glioblastomas), bloqueando vias de sinalização selecionadas por sua hiperativação tumoral, também possuem efeitos anti-angiogênicos secundários, que aparecem, em grande parte, por convergirem para a inibição mTOR-dependente da tradução dos transcritos de HIF-1 α em proteína, reduzindo sua disponibilidade nas células. Entre elas estão os inibidores das seguintes vias, em diferentes tipos de tumores: BCR-ABL por imatinibe (Gleevec), utilizado para o tratamento de leucemias; EGFR por gefitinibe (Iressa) para tratar câncer de pulmão de não pequenas células, erlotinibe (Tarceva) também para não pequenas células, além de tumores pancreáticos não ressecáveis ou metastáticos, e cetuximabe (C225) para câncer de cabeça e pescoço e colorretal metastático; HER2^{neu} por trastuzumabe (Herceptin) para câncer de mama; e mTOR por rapamicina (empregada como imunossupressor em transplantes de medula óssea), temsirolimus (CCI-779) e everolimus (RAD-001), ambos para carcinomas de células renais, sendo que o último também pode ser utilizado, em conjunto

com exemestane, para tratar tumores de mama avançados HER2-negativos, além de certos tipos de tumores pancreáticos, de pulmão e neuroendócrinos gastrointestinais. A inibição das vias de PI3K, que também controla mTOR, ou de ERK, quando também alteradas em tumores por mutações oncogênicas, reduz os níveis de HIF-1 α e SP1 por elas controladas, sendo que ambas podem se ligar ao promotor do gene de VEGF e impedir sua expressão (SEMENZA 2010).

Da mesma forma que as células tumorais utilizam HIF-1 α como mola mestra de sua resposta adaptativa às próprias adversidades do crescimento tumoral, principalmente em função da carência de suprimento sanguíneo, a citotoxicidade dos tratamentos antitumorais converte esse mesmo padrão de atividade em mecanismos de resistência eficientes. Os agentes quimioterápicos tradicionais, incluindo inibidores de topoisomerase I (topotecan), estabilizadores de microtúbulos (docetaxel) e agentes intercalantes de DNA, como a equinomicina e as antraciclinas doxorubicina e daunorubicina, são utilizadas com o mesmo propósito de produzir efeitos anti-proliferativos e de danificação do material genético, levando à morte principalmente de células em constante atividade mitótica, como aquelas encontradas no início da formação tumoral. Sua toxicidade, porém, exige que o tratamento seja realizado em ciclos, com intervalos de 2-3 semanas, para que a medula óssea possa restabelecer suas populações de células-tronco hematopoiéticas, que também precisam proliferar constantemente a fim de repor as linhagens celulares sanguíneas. Como nenhum tratamento citotóxico consegue eliminar todas as células tumorais sem eliminar também células normais, ainda restam clones, em função da diversidade genética dos tumores, que se diferenciam da maioria das outras células, ou por consequência de suas mutações de base, que levam a vias compensatórias de sobrevivência, ou por adquiri-las caso os danos ao DNA não sejam muito extensos, mas compatíveis com a manutenção das células auxiliada pela inibição de vias que levam à morte celular. A reincidência de tumores, portanto, se dá pela pressão seletiva do tratamento inicial para gerar células resistentes, as quais, senão controladas por novas modalidades

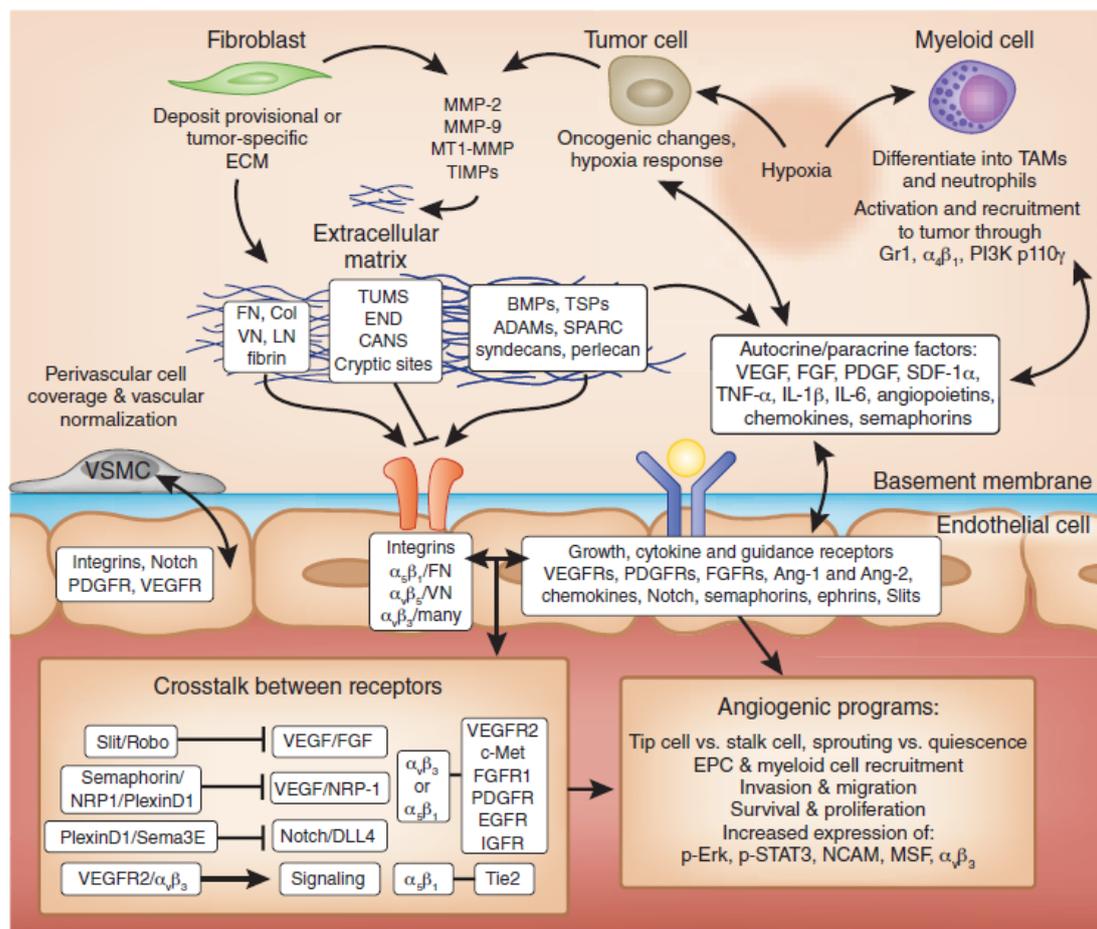
terapêuticas, farão com que os tumores evoluam rapidamente e levem o paciente à morte. Em estágios avançados, os resultados das abordagens citotóxicas são ainda menos expressivos, apesar de serem potentes inibidores de HIF-1 α devido aos fármacos intercalantes bloquearem sua ligação ao DNA para ativar a transcrição gênica. Mesmo assim, a expressão pré-existente de HIF-1 α reduz a proliferação das células tumorais como um dos primeiros mecanismos de adaptação às condições de hipóxia (SEMENZA 2010).

Sabendo da modulação inespecífica de HIF-1 α por quimioterápicos, seria coerente esperar que também houvesse alguma interferência na angiogênese. O grupo de Folkman foi então o primeiro a demonstrar que doses mais baixas e mais frequentes de ciclofosfamida, um agente alquilante de DNA, além de prevenir a toxicidade para a medula óssea, podiam levar a menor proliferação ou à morte de células endoteliais. Para além da angiogênese, porém, tratamentos com doxorubicina revelaram que xenoenxertos murinos de tumores de próstata deixam de secretar VEGF, SDF-1 (descrito adiante) e SCF (*stem cell factor*), os quais atuam não mais localmente para estimular a ramificação de novos vasos em direção ao tumor, mas à distância, recrutando células angiogênicas circulantes a partir da medula óssea, pela ligação aos receptores VEGFR2, CXCR4 e CD117, respectivamente, o que resulta em uma reduzida vascularização tumoral com reflexos em seu baixo crescimento (LEE et al. 2009; SEMENZA 2010). Mecanismo similar ocorre durante o desenvolvimento embrionário, período em que angioblastos precisam se diferenciar, após serem recrutados por mediadores químicos, em células endoteliais para compor a vasculatura em formação, processo conhecido como vasculogênese, que também pode ser aproveitado pelos tumores durante seu desenvolvimento, fugindo à visão clássica de que a rede vascular cerebral seria apenas uma extensão da vasculatura cerebral derivada da angiogênese (WEIS e CHERESH 2011).

A complexa relação do tumor com o seu microambiente torna este cenário ainda mais diverso, onde a sinalização tumoral através de seus fatores secretados, decorrente da transformação oncogênica ou do estímulo

por hipóxia, exerce efeitos variados sobre as células normais vizinhas, controlando suas funções em favor do desenvolvimento tumoral, além de remodelar a composição da matriz extracelular (ECM), de maneira a fornecer ligantes que sinalizem para a ancoragem das células tumorais em um meio onde possam sustentar o crescimento e a progressão tumoral. Sendo assim, os fibroblastos são induzidos a depositar proteínas de ECM, que preparam o estroma para a expansão tumoral, e também a liberar enzimas que modificam uma membrana basal quiescente, a qual envolve os vasos sanguíneos, expondo sítios de ligação crípticos pela fragmentação de seus componentes, ou formando artefatos que afetam a adesão de células adjacentes, que é mediada por integrinas presentes na superfície celular, ao substrato. O compartimento de ECM também contém componentes como as proteínas morfogenéticas (BMPs), trombospondinas (TSPs), proteínas da família ADAM (desintegrinas e metaloproteinases), proteínas SPARC (secretadas, acídicas e ricas em cisteína), sindecano e perlecano, que possuem, em conjunto, a capacidade de efetuar o sequestro ou a liberação de fatores solúveis dentro da matriz. Células tumorais e células endoteliais ativadas liberam uma gama de outros fatores que induzem a mobilização e a reprogramação de células mielóides da medula óssea para sua diferenciação em macrófagos associados a tumores ou neutrófilos. Em meio a essa prolífica sinalização extracelular, integrinas e receptores na superfície das células endoteliais reconhecem e também se ligam a fatores deste meio, respondendo a esses pela ativação de suas vias de sinalização, as quais levam a alterações fenotípicas para promover migração, invasão, sobrevivência e proliferação, necessárias, de maneira coordenada, para o processo de angiogênese. Receptores controlando vias que produzem efeitos opostos podem interagir para suprimir ou reforçar a ativação celular (Figura 5). A interação entre células endoteliais e seu microambiente regula sua associação a células perivasculares ou macrófagos associados a tumores e determinam, em pontos específicos, quais delas se destacarão dos vasos para migrar, com alta motilidade, em direção ao estímulo angiogênico detectado pelas suas numerosas extensões filopódicas (*tip*

cells), enquanto as que permanecem no leito vascular passam a proliferar e seguir a trilha deixada pelas células precursoras, embora com menor motilidade, de modo a se organizarem nas paredes coesas de novos vasos para a morfogênese do lúmen (*stalk cells*) (Figs. 3,5) (HERBERT e STAINIER 2011; WEIS e CHERESH 2011; BLANCO e GERHARDT 2012).



Fonte: Adaptado de WEIS e CHERESH (2011).

Figura 5 – Diversidade da sinalização inter-celular dentro do microambiente tumoral, que estabelece condições favoráveis para adaptação das células tumorais ao substrato, garantindo sua fixação à ECM, onde podem proliferar e se expandir na forma de massas tumorais, além do controle das respostas angiogênicas, expressas pelas células endoteliais, correspondente ao intercâmbio de fatores de crescimento entre essas, células mielóides, como neutrófilos e TAMs (macrófagos associados a tumor), e células tumorais.

Prováveis cooperações entre as múltiplas formas de remodelamento vascular incluem ainda a transdiferenciação de células-tronco tumorais em células endoteliais, ou a participação das células tumorais na formação da parede vascular como um todo ou parcialmente, para preencher pontos de vazamento em substituição às células endoteliais (*vascular mimicry*). O microambiente tumoral, portanto, associado a uma rede, em constante alteração, de comunicações celulares inter-dependentes, propicia uma redundância de vias de sinalização extracelulares que atuam, reciprocamente, para garantir a vascularização tumoral, o que contribui para a baixa eficácia e previsível aquisição de resistência quando se consideram estratégias terapêuticas anti-angiogênicas centradas em alvos isolados (WEIS e CHERESH 2011).

1.5 GLIOBLASTOMAS: DA INVASÃO PERIVASCULAR INICIAL À HIPÓXIA TARDIA INDUZINDO ANGIOGÊNESE

Gliomas malignos, em geral, compartilham o fenótipo característico de crescimento infiltrativo, de maneira difusa, dentro do parênquima cerebral (CUDDAPAH et al. 2014), diferente dos astrocitomas de baixo grau (*Low Grade Gliomas* – LGG), que se apresentam como tumores de crescimento mais lento e circunscrito, formados a partir de células diferenciadas, e, portanto, mais passíveis de tratamento por ressecção cirúrgica (HUSE e ALDAPE 2014; HANSEN et al. 2016). No entanto, o processo de progressão tumoral raramente leva (5-10% dos casos) tumores difusos de menor grau (OMS graus II-III) a progredirem para tumores de alto grau (GBM secundário) (CLOUGHESY et al. 2014), embora a sua recorrência pós-tratamento esteja associada a GBMs de rápida evolução (HUSE e ALDAPE 2014). Apesar de as assinaturas genéticas específicas de cada tipo de tumor permitirem que os GBMs primários (OMS grau IV), os gliomas mais frequentes e letais, evoluam sem uma lesão precursora de baixo grau (DAVIS 2016), o curso clínico e perfis histopatológicos e moleculares de desenvolvimento dos tumores cerebrais fornecem as bases para o

entendimento de como se dá o ganho de agressividade que os classifica (CLOUGHESY et al. 2014).

A hipótese originalmente aceita para o desenvolvimento de tumores, independente do seu tecido de origem, era de que esses precisariam evoluir ao longo de duas fases distintas. No início, os tumores estão confinados a 1-2 mm de diâmetro, dependendo exclusivamente da difusão de nutrientes e oxigênio dos vasos sanguíneos adjacentes, sem contar com uma vasculatura própria, período chamado de fase avascular. Como consequência, tem-se o início de uma fase vascular, quando as células tumorais passam a induzir ativamente a vascularização tumoral (WICKI e CHRISTOFORI 2007). Ao contrário dessa hipótese, os gliomas difusos se formam a partir de duas fases vasculares (ZAGZAG et al. 2000b). Isso se dá porque os tumores que se desenvolvem em órgãos altamente vascularizados, como cérebro e pulmão (diferente daqueles predominantemente avasculares, como o colo uterino), se distribuem ao longo de vasos sanguíneos, exaurindo seu aporte de oxigênio e nutrientes, até que esses se degeneram por apoptose (ZAGZAG et al. 2000b). A queda na perfusão pela perda de vasos, também resultante da compressão exercida pela massa tumoral em crescimento, restringe, portanto, a oxigenação intratumoral (JAIN et al. 2007). A tensão normal de O_2 nos tecidos varia de 2-9%, estado esse denominado de normóxia. Quando existe uma deficiência no aporte sanguíneo, os tecidos podem entrar em condição de hipóxia, que se caracteriza por níveis de O_2 abaixo de 2% (BERTOUT, PATEL, SIMON 2008), desencadeando uma série de respostas celulares, principalmente metabólicas, sob o controle central de HIF-1 α (SEMENZA 2013). Células normais se adaptam a essa condição, pelo menos em curto prazo, sustentando um metabolismo glicolítico anaeróbico, até o momento em que suas reservas de ATP não sejam mais suficientes para suprir as demandas energéticas que mantêm seu equilíbrio osmótico (MICHIELS 2004). Por outro lado, as células tumorais possuem uma propriedade em comum de utilizar preferencialmente o metabolismo glicolítico, mesmo que existam condições aeróbicas normais para a fosforilação oxidativa,

fenômeno este conhecido como efeito Warburg. Essa vantagem adaptativa favorece a alta taxa proliferativa dessas células, uma vez que, apesar da baixa eficiência na produção de ATP, os sub-produtos da via glicolítica podem ser canalizados, em abundância, para o anabolismo de componentes essenciais à geração de novas células (nucleotídeos, ácidos graxos e proteínas). Em condições de hipóxia, esse fenótipo se torna ainda mais pronunciado, permitindo que as células tumorais resistam mais tempo do que as células normais aos baixos níveis de oxigenação (AGNIHOTRI e ZADEH 2015; PAVLOVA e THOMPSON 2016). Ainda sob o ponto de vista adaptativo, o estresse hipóxico submete as células tumorais a um estado de instabilidade genética extrema, criando uma pressão seletiva sobre variantes mutacionais, as quais conferem maior resistência a uma sub-população dominante de clones, que passam a ser capazes de sobreviver ao microambiente inóspito produzido pela hipóxia. Os clones selecionados desenvolvem mecanismos tanto para contrapor os efeitos anti-proliferativos de HIF-1 α (parada do ciclo celular, diferenciação e apoptose), quanto para amplificar seus efeitos associados à transformação maligna, como invasão e angiogênese (MICHIELS 2004; VAUPEU e HARRISON 2004; SEMENZA 2012; EALES et al. 2016). A própria sinalização oncogênica, inclusive, favorece esse processo, principalmente por estar relacionada a mecanismos evasivos anti-apoptóticos e de promoção da invasividade, induzindo até mesmo a geração de células com capacidade metastática (HARRIS 2002; PENNACCHIETTI et al. 2003). Desta forma, as células conseguem escapar de regiões necróticas intratumorais (VAUPEU 2004; VAUPEU e HARRISON 2004; SCHITO e SEMENZA 2016), as quais se formam, a princípio, pela exposição do núcleo tumoral a longos períodos de hipóxia ou anóxia (BERTOUT, PATEL, SIMON 2008), levando à morte celular (MARIÑO et al. 2014; QIU et al. 2015), ao mesmo tempo em que a seleção clonal, pela hipóxia, das sub-populações de células constituindo a margem tumoral (SEMENZA 2010) deriva de mecanismos adquiridos de resistência à apoptose. Entre eles, a perda do gene supressor tumoral p53 (regulado por HIF-1 α) ou a presença de versões deste com mutações oncogênicas

(GRAEBER et al. 1996; AN et al. 1998; SEMENZA 2000), a inibição de alterações conformacionais necessárias às funções da proteína pró-apoptótica Bax (WEINMANN, et al. 2004), ou a superexpressão da proteína anti-apoptótica Bcl-X_L, que impede a oligomerização de Bax juntamente com Bak para a permeabilização da membrana mitocondrial externa, pela via intrínseca da apoptose (DONG e WANG 2004; WESTPHAL et al. 2011). Células resistentes podem se converter ainda em células-tronco tumorais (CSCs) nos fenótipos de maior agressividade (HEDDLESTON et al. 2010; NASSAR e BLANPAIN 2016; MAHASE et al. 2017), o que pode se sobrepor ao processo de transição epitélio-mesênquima para geração de células metastáticas em alguns tipos tumorais (SULLIVAN e GRAHAM 2007), diferindo, no entanto, do perfil predominantemente infiltrativo dos glioblastomas. As células dos gliomas difusos não apenas migram para longe das regiões necróticas, mas possuem a propriedade de invadir continuamente os tecidos normais adjacentes (ao longo de feixes neuronais e pela membrana basal de vasos sanguíneos), formando as chamadas regiões de pseudopaliçada, caracterizadas por anéis hipercelulares dispersos pelo parênquima cerebral, e com infiltrações à distância, circundando um núcleo necrótico (HAMBARDZUMYAN e BERGERS 2015). Simultaneamente à aquisição de um perfil invasivo (PENNACCHIETTI et al. 2003), a hipóxia também desencadeia a liberação de fatores pró-angiogênicos pelas células tumorais, que permitem amplificar a vascularização tumoral, promovendo ainda mais sua agressividade. Porém, diferente das condições fisiológicas, em que existe um equilíbrio entre os níveis de fatores pró- e anti-angiogênicos, secretados por células em resposta a isquemia, por exemplo, quando se restabelecem de suas demandas metabólicas por nutrientes e oxigênio, as células tumorais perdem essa capacidade, estimulando constantemente a formação de novos vasos pelo excesso de fatores pró-angiogênicos secretados. Essa potencialização da angiogênese, conhecida como “*angiogenic switch*” (WICKI e CHRISTOFORI 2007; WEIS e CHERESH 2011) leva à formação de uma vasculatura aberrante permeando o tumor, a qual, comparada aos

vasos normais, não têm tempo suficiente para consolidar sua estrutura devido ao excesso de estimulação, resultando em vasos tortuosos, irregulares e com vários pontos de vazamento. Somado à ausência de cobertura pelas células de suporte (pericitos e células de músculo liso), esses vasos se tornam pouco funcionais e mais favoráveis à coagulação (devido a perturbações e inconstâncias do fluxo sanguíneo) e ao edema local (BERGERS e BENJAMIN 2003; EALES et al. 2016). Por isso, apesar da vascularização abundante, porém ineficiente, as células tumorais são expostas a flutuações cíclicas de fluxo sanguíneo, gerando uma simbiose entre o ganho de agressividade pela hipóxia e a aceleração do crescimento tumoral, impulsionado por ondas intercaladas de indução da angiogênese, o que leva a heterogeneidades na absorção de fármacos pelo tumor, uma das principais variáveis para a resistência ao tratamento quimioterápico.

1.6 GLIOBLASTOMAS: INVASIVIDADE TUMORAL E A IMPORTÂNCIA DE SUA ABORDAGEM TERAPÊUTICA

De um ponto de vista histopatológico, a evolução dos GBMs, mesmo daqueles que surgem *de novo*, considerados primários, pode ser compreendida a partir da transição entre tumores gliais de diferentes graus de malignidade. Os astrocitomas difusos (OMS grau II) apresentam células tumorais infiltrando de maneira difusa no cérebro, começando como tumores não angiogênicos que têm a capacidade de absorver o suprimento sanguíneo da microvasculatura pré-existente. Ao progredirem para astrocitomas anaplásicos (OMS grau III), a densidade de células tumorais aumenta, a proliferação celular e a anaplasia nuclear se tornam evidentes, e percebe-se um ligeiro aumento na densidade vascular. Os GBMs representam o estágio final de evolução tumoral, marcada por profundas alterações histológicas diretamente associadas a sua abundante vascularização, pela qual se formam agregados, que se parecem com “nódulos” vasculares, chamados de corpos glomerulóides, em função do comportamento altamente proliferativo das células endoteliais. Nos

diagnósticos por imagem, os exames de MRI revelam os GBMs como massas amorfas de alto contraste contendo um centro necrótico, enquanto que, pela análise microscópica, observa-se uma invasão tumoral disseminada pelo parênquima cerebral, além de múltiplos pontos de hipóxia na região de pseudopaliçada ao redor do tumor, em que a marcação de HIF-1 α aparece mais intensa próxima ao centro necrótico, estando ausente no fronte de invasão, onde as células tumorais se encontravam adjacentes à microvasculatura cerebral e, portanto, em contato com a oxigenação normal do tecido (KAUR et al. 2005).

Em suma, a principal diferença entre as duas fases vasculares pelas quais passam os GBMs é que, no início, a vasculatura tumoral corresponde aos vasos sanguíneos cerebrais nativos que são parasitados pelas células tumorais, contrastando com a segunda fase, em que ocorre a formação de novos vasos a partir dessa mesma microvasculatura cerebral, os quais estão, na sua maioria, concentrados periféricamente, permeando as regiões de pseudopaliçada (ZAGZAG et al. 2000b). No entanto, a característica prototípica dos GBMs de constante invasão do parênquima cerebral, primeiramente proposta por Scherer e confirmada por modelos animais utilizando células tumorais e células-tronco de gliomas humanos, de camundongos e ratos, culturas primárias de GBM e de carcinoma mamário metastático humano, além da geração espontânea de GBMs em animais geneticamente modificados para suprimir a expressão de *p53* e introduzir o oncogene *NRAS*, ocorre ao longo de toda a progressão tumoral, conforme demonstrado, inclusive, pelo acompanhamento *in vivo* da formação tumoral por microscopia intravital. Atrelado a esse fenótipo, nasceu o conceito de “auto-vascularização” para explicar como os tumores cerebrais podem ser capazes de sustentar seu crescimento unicamente por meio da invasão perivascular, sem ativar mecanismos de estímulo à neoangiogênese (VEGF-dependentes) sobre a microvasculatura cerebral para que ocorra a vascularização *per se* tumoral (Figura 6A,B). Por isso, então, os fármacos antiangiogênicos, como o anticorpo monoclonal neutralizante de VEGF-A, Bevacizumab (aprovado em 2009 pelo FDA para o tratamento de diversos

tumores, inclusive GBM), inicialmente concebido para o tratamento de GBMs porque, em teoria, interromperia a ramificação de vasos em direção ao tumor, levando a sua degeneração pela ausência de suprimento sanguíneo, acabou não conferindo, em contraste com os estudos pré-clínicos, uma sobrevida estendida aos pacientes em estudos clínicos de fase III, mesmo em combinação com radioterapia e temozolomida, a qual ainda é utilizada na clínica por conferir maiores períodos de sobrevida livre de progressão, mantendo níveis de qualidade de vida satisfatórios para os pacientes (CHINOT et al. 2014; GILBERT et al. 2014). Inevitavelmente, os tumores tratados com Bevacizumab progridem rapidamente e tornam-se resistentes a outros tratamentos, potencialmente em função da capacidade intrínseca dos gliomas de se adaptarem e adquirirem fenótipos mais agressivos quando enfrentam condições adversas de hipóxia, as quais se amplificam pela ação deste fármaco. Provavelmente, o efeito transitório obtido com Bevacizumab, pela regressão tumoral observada em exames de imagem, decorre do período necessário para que uma população diminuta de células resistentes seja selecionada para reconstituir a massa tumoral (MAHASE et al. 2017). No entanto, o Bevacizumab pode oferecer como benefício terapêutico alternativo a chamada normalização da vasculatura intratumoral, pela qual se resgata, ajustando o regime de dosagens, a arquitetura vascular própria do tecido normal ao se restabelecer o balanço entre fatores pró- e anti-angiogênicos alterado pelas células tumorais, o que recupera a perfusão sanguínea (ampliando o acesso de quimioterápicos, como TMZ, ao tumor) e reduz o edema vasogênico (a principal causa de morbidade de fundo neurológico dos GBMs, decorrente do aumento da pressão intersticial pelo acúmulo peritumoral de flúidos plasmáticos, os quais ficam confinados ao redor do cérebro em função da ausência de um sistema linfático cerebral responsável por drenar seus excessos). Por outro lado, embora contribua também para aliviar a compressão intracerebral de regiões eloquentes, foi demonstrado, em modelos animais, que o Bevacizumab produz esse efeito ao colaborar como estímulo deletério para uma invasão tumoral ainda mais intensa e difusa (JAIN et al. 2007; BAKER et al. 2014; JAIN 2014).

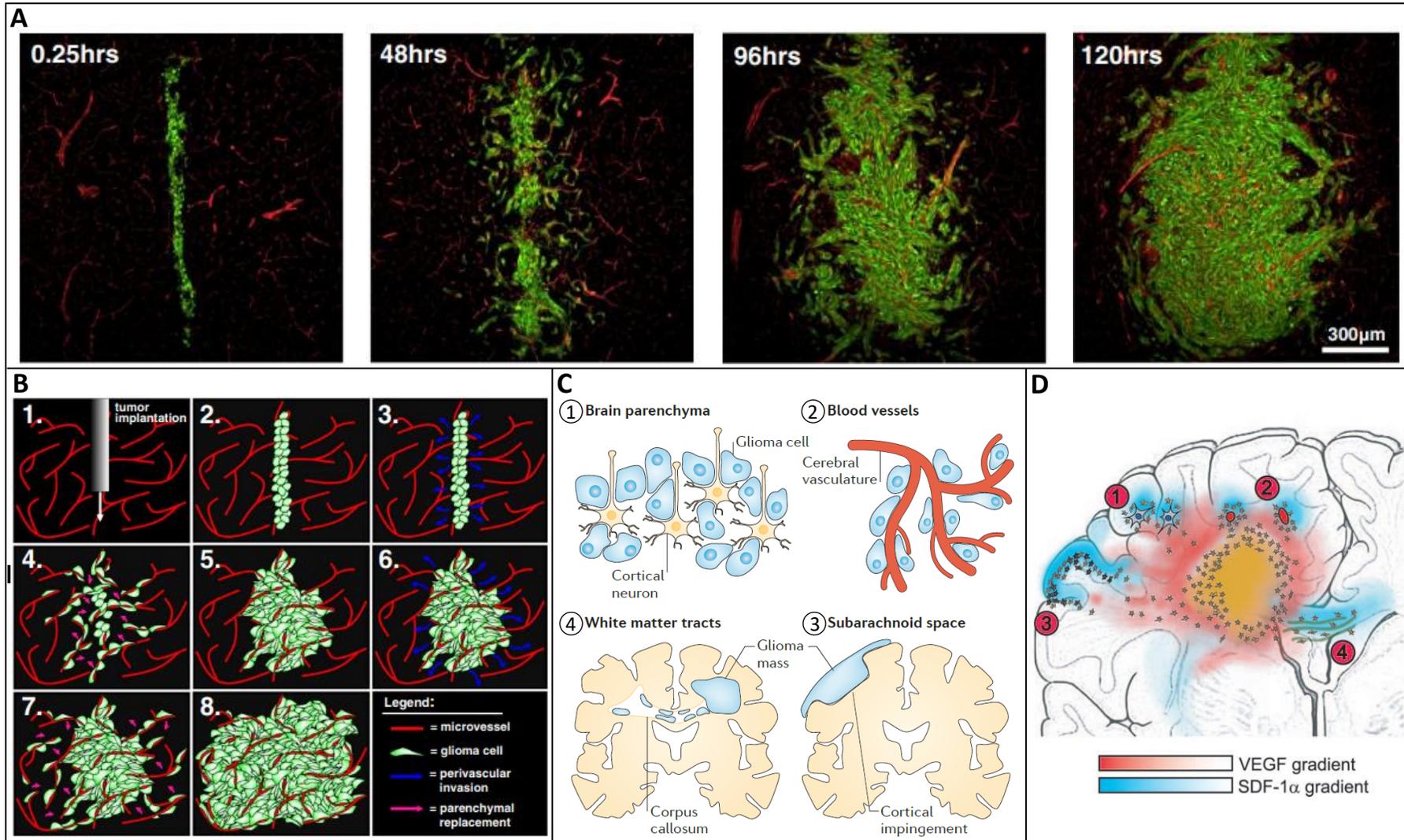
O comportamento de invasividade agressiva dos gliomas parece remeter a uma raiz neurobiológica, em que células embrionárias ou células-tronco no cérebro adulto migram, de maneira similar, ao longo de rotas extracelulares, frequentemente explorando a vasculatura cerebral ou, após perda celulares por eventos lesivos, feixes neurais como guias, o que entra em acordo com as hipóteses envolvendo a célula de origem dos gliomas a partir de NSCs (SCHIFFER et al. 2010), que tenham acumulado mutações suficientes ao longo do tempo para iniciar o processo de tumorigênese. Em termos de neurogênese subependimal, conforme observado em roedores, os precursores dos interneurônios olfatórios gerados na ZSV migram por meio de uma extensão desta que chega aos bulbos olfatórios, a qual, em conjunto com o fluxo tangencial ordenado dessas células utilizando como arcabouço migratório a disposição unidirecional de vasos sanguíneos paralelos em alta densidade, ficou conhecida como Corrente Rostral Migratória (*Rostral Migratory Stream, RMS*). Para a regeneração tecidual, o cérebro parece recuperar sua plasticidade intensificando a neurogênese nas zonas subependimal e subgranular para que diferentes tipos celulares, como as células NG2 e os neuroblastos, que migram através da massa branca e cinzenta corticais utilizando vasos sanguíneos ou fibras mielínicas como substratos, possam atingir os sítios de lesão, enquanto outros, como os astrócitos, permanecem estacionários (CUDDAPAH et al. 2014).

A vantagem biológica adquirida pelos gliomas, relativa à sua migração ao longo de vasos sanguíneos, pode ser considerada multifatorial em vista da importância observada para este processo, pelo qual células de tumores humanos, quando implantadas no cérebro de roedores, procuram, em sua grande maioria, por volta de 85%, se associar ativamente aos vasos mais próximos (BAKER et al. 2014). A busca por esta interação provavelmente tem relação com a necessidade de extrair oxigênio, glicose e outros nutrientes diretamente da corrente sanguínea para suprir a demanda metabólica de células neoplásicas com alta capacidade proliferativa, principalmente em relação às grandes quantidades de glicose captadas pelo cérebro, essenciais para manter o seu metabolismo glicolítico (Figura 6A,B).

Em relação ao seu comportamento pró-invasivo que se sucede ao primeiro contato com a vasculatura, apesar de ser um traço fenotípico herdado de suas prováveis origens celulares precursoras, o espaço perivascular oferece menor resistência física à passagem das células dos gliomas, se comparado aos espaços extracelulares estreitos e tortuosos entre feixes nervosos e células gliais do parênquima cerebral. Além disso, a membrana basal que recobre a superfície externa dos microvasos é rica em proteínas de matriz extracelular (ECM), como laminina, fibronectina e vitronectina, que se caracterizam por serem altamente glicosiladas, estando disponíveis como parceiros de ligação para integrinas, receptores transmembrana responsáveis por mediar os processos de adesão e migração, além de ativar vias de sinalização que garantam a sobrevivência das células (BAKER et al. 2014; CUDDAPAH et al. 2014). Integrinas são heterodímeros compostos de múltiplas subunidades, cuja composição determina a sua especificidade para determinado substrato, e as vias de sinalização que serão ativadas em sequência. A maior expressão da subunidade $\beta 1$ está ligada ao aumento da invasividade dos gliomas, enquanto $\alpha \beta 3$ e $\alpha \beta 5$ controlam a indução tumoral da angiogênese. O bloqueio seletivo da integrina $\alpha \beta 5$ pelo peptídeo sintético cilengitide desempenhou, no entanto, uma atividade antitumoral modesta, não conferindo aumento de sobrevida em ensaios clínicos. Embora constitua uma rota favorável para as células tumorais, essas ainda precisam abrir caminho através da densa ECM que preenche o espaço perivascular. Para isso, secretam um grande número de proteases, desintegrinas e metaloproteinases (MMPs), recrutando ainda micróglia, astrócitos e células endoteliais também para secretar proteases e, assim, auxiliar no remodelamento da ECM que permita a invasão tumoral, ao mesmo tempo em que regulam a atividade de fatores de crescimento e quimiocinas que aceleram a proliferação e migração dos gliomas. Assim como para integrinas, porém, inibidores de MMPs não alcançaram sucesso na clínica (CUDDAPAH et al. 2014).

O recrutamento das células dos gliomas em direção aos vasos sanguíneos ocorre pela ação quimiotática de pelo menos dois peptídeos

secretados por células endoteliais: fator derivado de célula estromal (SDF-1 α) e bradicinina. Revisitando os trabalhos de Scherer sobre as estruturas cerebrais secundárias formadas pelos gliomas, ZAGZAG et al. (2008) avaliaram novas amostras de GBM extraídas de diferentes regiões do cérebro acometidas, variando entre os 31 pacientes considerados para o estudo, e encontraram que as células tumorais do fronte de invasão ao redor do tumor expressavam o receptor de SDF-1 α (CXCR4) e organizavam-se ao redor e ao longo de estruturas positivas para a marcação de SDF-1 α (também expresso pelos neurônios em seus feixes axonais). Pelo modelo murino de GBM utilizando a linhagem celular GL261, o mesmo padrão foi encontrado para os tumores ortotópicos, o qual estaria associado a uma resposta alternativa à hipóxia. Durante este estágio da fase vascular dos GBMs, a secreção tumoral de VEGF, além de propiciar a vascularização tumoral, seria capaz de induzir o aumento da expressão e secreção de SDF-1 α nas células endoteliais, formando um gradiente de concentrações para o qual as células tumorais expressando CXCR4, também modulado pela hipóxia, são atraídas (Figura 6C,D). Em relação à bradicinina, a ligação a seus receptores B2R acoplados à proteína G ativa aumentos dependentes de IP3R3 (*inositol-1,4,5-trisphosphate receptor-3*) da concentração de Ca⁺² intracelular em células de gliomas. As variações cíclicas resultantes nos níveis de Ca⁺² controlam a abertura de outros canais iônicos, que permitem às células alterar sua morfologia e volume para se adaptar a restrições do espaço extracelular por onde trilham seu caminho de invasão. Em modelos pré-clínicos de gliomas, o inibidor de B2R, Icatibant, aprovado em 2011 pelo FDA para o tratamento de angioedema hereditário, reduziu significativamente a porcentagem de células tumorais associadas a vasos sanguíneos de 77% a 19%, o que restringiu a migração celular para o interior do parênquima cerebral, resultando em menores massas tumorais (CUDDAPAH et al. 2014).

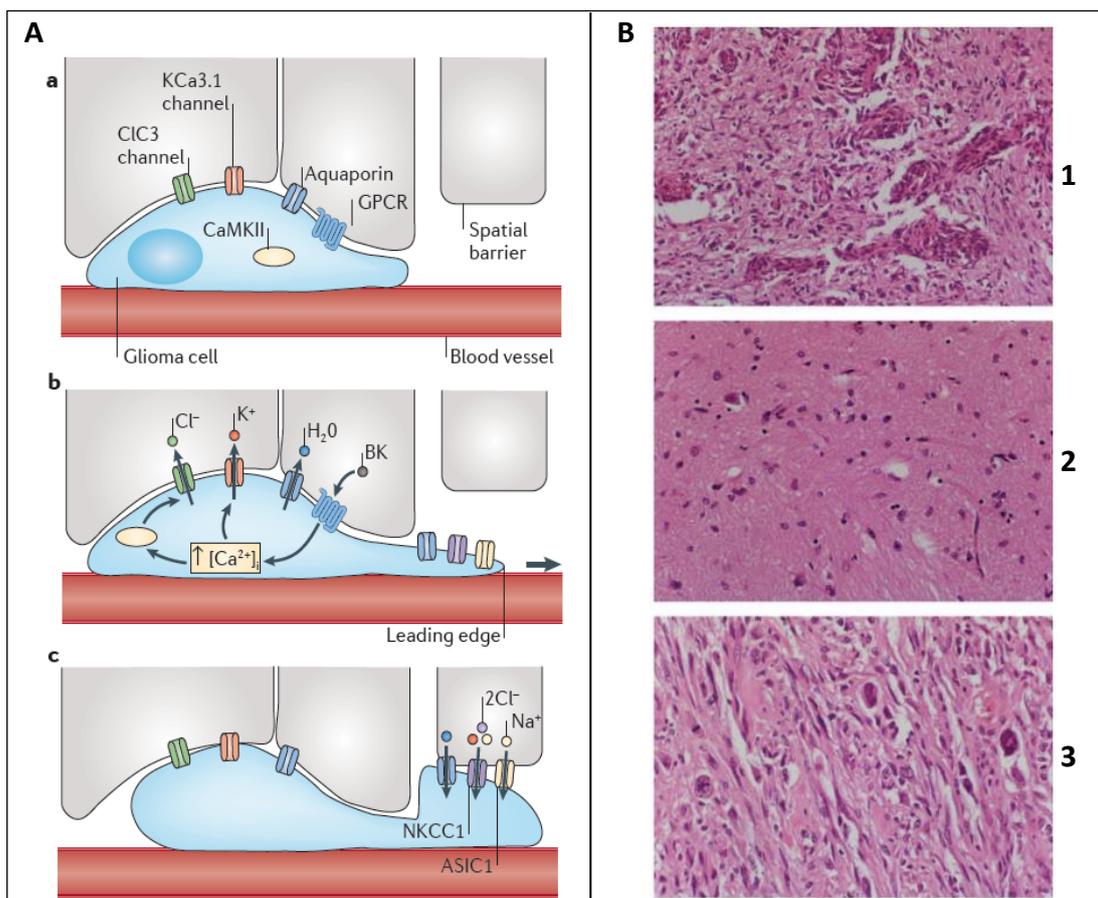


Fonte: Adaptado de BAKER et al. (2014) (A) e (B); CUDDAPAH et al. (2014) (C); ZAGZAG et al. (2008) (D)

Figura 6 – Perfil infiltrativo dos GBMs por redes neurais ou vasculares formando as estruturas secundárias de Scherer decorrentes da sua disseminação pelo cérebro associada a essas estruturas pré-existentes. **A)** Acompanhamento pós-implantação (em horas) da invasão perivascular de células GL26 (verde) em cérebro de camundongo (microvasos em vermelho). **B)** Esquema representativo do processo iterativo de invasão perivascular, em que, logo após a implantação das células GL26, etapas de infiltração alternam-se com a proliferação celular, permitindo a “auto-vascularização” tumoral à medida que o parênquima cerebral, adjacente aos microvasos, vai sendo substituído por células tumorais, e essas continuam a infiltrar se estendendo pela rede vascular. **C)** Principais rotas utilizadas pelas células de GBM para migrar através do cérebro: 1- Perineuronal; 2- Perivascular; 3- Perifascicular, intrafascicular ou intrafibrilar, ao redor de fibras mielínicas; 4- Espaço subaracnóide abaixo das meninges. **D)** Correlação dessas rotas com o gradiente de SDF-1 α formado em diferentes regiões cerebrais expostas ao VEGF secretado pelo tumor (centro, amarelo) durante a hipóxia. Células GL261 da margem tumoral, nessas condições, são induzidas a expressar CXCR4, receptor de SDF-1 α , pelo qual se orientam para invadir o parênquima adjacente ao tumor seguindo o seu gradiente.

Observações histológicas registradas por Scherer estimularam ainda a descoberta recente do mecanismo hidrodinâmico de migração celular (Figura 7A), que fundamenta a capacidade das células dos gliomas de adaptar a sua morfologia à estrutura cerebral que ocupam durante a invasão, de modo que as células de um mesmo tumor não formam apenas um tipo de estrutura de Scherer, mas podem, ao invés, aparecer com diferentes formatos dependendo de como ocorra a sua migração, seja ao longo de vasos, fibras nervosas ou espaço subaracnóide (Figura 7B). As dimensões restritas do espaço extracelular cerebral (38-64 nm), impõem às células dos gliomas a necessidade de perder periodicamente, entre os processos de extensão e retração, cerca de 33% do seu volume para que se comprimam o suficiente por esses espaços durante a sua trajetória de migração através do parênquima. Para conseguir isso, as células invasivas precisam expulsar praticamente toda a água citoplasmática livre, que não esteja ligada a proteínas, ácidos nucleicos e macromoléculas, restando o volume ocupado pelas organelas, correspondente a 50% de todo o conteúdo

das células de mamíferos. O modelo hidrodinâmico (Figura 7A) sugere que os gliomas reconfiguram seus canais iônicos, que normalmente cumprem a função de regular o potencial de membrana, com o propósito de acumular íons Cl^- contra o seu gradiente de concentração, por meio de seu cotransportador 1 de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ (NKCC1) constitutivamente expresso, de modo a gerar uma força motriz pela abertura de canais de Cl^- voltagem-dependente, como o CIC3, que induz o efluxo da água citoplasmática por omeose através dos canais de aquaporinas (AQP1 e AQP4). A manutenção da eletroneutralidade celular pelo balanço do efluxo de Cl^- com o aumento de Ca^{+2} intracelular, através dos canais KCa1.1 e KCa3.1, permite o recomeço deste ciclo. Em excesso, o influxo de Ca^{+2} decorrente da hiperatividade de KCa1.1 também é responsável por aumentar a condutância dos canais de K^+ e Cl^- , incluindo CIC3, podendo atuar potencializando o efeito da bradicinina via IP3R, o qual depende, da mesma forma, da ativação desses canais. As amplificações de *EGFR* em 40% dos glioblastomas primários podem responder pela ativação intrínseca do influxo de Ca^{+2} a partir da ativação, por EGF, deste receptor tirosina quinase, o qual controla as atividades tanto de IP3R, quanto do canal catiônico não-seletivo TRPC1, aumentando a permeabilidade ao Ca^{+2} extracelular, e ativando CIC3 para impulsionar a migração. Pela via de AKT, EGFR também ativa NKCC1 com a fosforilação prévia da proteína quinase WNK3, mantendo-o disponível para sua dupla função nos gliomas de propiciar alterações no volume celular, assim como regular a velocidade de migração através da sua interação com o citoesqueleto de actina, aumentando a contratilidade das células à medida que migram sobre o substrato. O seu provável uso como alvo terapêutico levou o bumetanide, um inibidor de NKCC1 aprovado pelo FDA como diurético, a ser usado em ensaios pré-clínicos para o tratamento de gliomas, pelos quais foi possível observar uma redução significativa dos níveis de invasão tumoral (CUDDAPAH et al. 2014).



Fonte: Adaptado de CUDDAPAH et al. (2014) (A); FORSHEW et al. (2013) (B)

Figura 7 – Modelo hidrodinâmico de migração das células dos gliomas e sua possível contribuição para as variações histopatológicas tumorais em diferentes regiões cerebrais. **A)** Modelo hidrodinâmico de migração das células dos gliomas. GPCR, *G protein-coupled receptors*; CaMKII, *calmodulin-dependent protein kinase II*; ASIC1, *acid-sensing ion channel 1*. **B)** Cortes de cérebro *post mortem*, analisados por coloração de hematoxilina-eosina (H&E), de um caso clínico raro em que três tipos de gliomas, em três regiões diferentes do cérebro, foram encontrados em um mesmo paciente: 1- Tumor pontino (ponte central): GBM (OMS IV); 2- Gânglio basal direito: Astrocitoma fibrilar (OMS II); 3- Região frontal esquerda: Gliosarcoma (OMS IV). Sendo que 1 e 2 faziam parte da mesma massa tumoral. As variações morfológicas entre os tumores, embora possam ser explicadas pelos seus graus de malignidade, ou pelas alterações genéticas de base que tenham adquirido ao se distribuir pelo cérebro, partindo do tumor original, ilustram as observações de Scherer sobre como as células dos GBMs pareciam adaptar seu formato, mimetizando a conformação celular em que os tecidos se organizam dentro de uma determinada região cerebral, além dos desafios que impõem para um diagnóstico histopatológico preciso.

Em se tratando dos canais iônicos, a clorotoxina, um peptídeo inibidor de CIC3 extraído do veneno do escorpião *Leiurus quinquestriatus*, demonstrou ser capaz de se ligar especificamente a células de glioma humano e bloquear sua migração. Sua principal aplicação, ainda em caráter experimental, no entanto, levando em conta sua baixa toxicidade em ensaios clínicos de fase I/II, tem sido para demarcar, mais precisamente, a extensão do tecido tumoral em exames de imagem, além de auxiliar na definição das margens de ressecção cirúrgica dos tumores (CUDDAPAH et al. 2014).

A resiliência dos gliomas em sua tendência natural de invadir o espaço perivascular, ainda que seu tropismo em direção às células endoteliais e sua capacidade de vencer a resistência imposta pela alta densidade celular cerebral, ao mesmo tempo em que abrem caminho pela ECM, tornem esta a rota mais propícia ao seu fenótipo invasivo, as suas células precisam, antes de tudo, desagregar os componentes de um mecanismo protetor crucial para a homeostase cerebral: a barreira hematoencefálica. Como forma de proteger as células neuronais, os astrócitos lançam prolongamentos citoplasmáticos, chamados de *endfeet*, que englobam os vasos sanguíneos e, em conjunto, recobrem 99% da vasculatura cerebral, exercendo o papel de uma espécie de filtro que impede a exposição direta de células neuronais a toxinas da corrente sanguínea. A composição dessa interface astrócito-vascular possui entre as duplas membranas citoplasmáticas, endoteliais e astrocíticas, uma ou duas camadas de membrana basal, que funcionam como uma barreira física secundária, associadas, respectivamente, a células contráteis em contato direto com os vasos (pericitos sobre capilares), ou localizadas entre as membranas basais (células musculares lisas sobre arteríolas e artérias). Os processos *endfeet* astrocíticos impedem que os neurônios tenham acesso direto à glicose da corrente sanguínea, controlando a sua entrada no cérebro ao expressarem, em sua superfície, transportadores de glicose GLUT1 para sua captação. Com isso, os astrócitos evoluíram para se tornar células altamente glicolíticas, enquanto neurônios exibem níveis reduzidos de glicólise em função de sua baixa expressão de enzimas glicolíticas, o que

evidencia uma relação simbiótica entre ambas as células. A baixa atividade da piruvato desidrogenase (PDH), enzima que converte piruvato em Acetil-CoA, de astrócitos resulta em uma menor entrada de piruvato derivado da glicólise no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), e seu consequente desvio para a geração de lactato. Por meio da via de captação intercelular de lactato astrócito-neurônio, os transportadores monoamino carboxilase (MCT) atuam coordenadamente para exportar este sub-produto de astrócitos (MCT4), o qual será internalizado por neurônios (MCT2), onde tem a função de fornecer carbonos para a geração de energia pelo ciclo do TCA e para a síntese do neurotransmissor glutamato. O metabolismo de glutamina/glutamato também acontece de forma cooperativa entre astrócitos e neurônios, expressando a importância de seu controle descentralizado para a manutenção da sinalização excitatória glutamatérgica, que responde por mais de 80% das sinapses cerebrais. Após a neurotransmissão, os astrócitos captam o glutamato que foi liberado na fenda sináptica para facilitar a condução do sinal por meio de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs), etapa essencial para que o excesso de glutamato extracelular não cause excitotoxicidade e lesão neuronal. Pela sua metabolização nos astrócitos, a enzima específica de células gliais glutamina sintetase converte glutamato em glutamina, que é transportada de volta aos neurônios por transportadores de aminoácidos neutros ligados a sódio (SNATs), onde é revertido para glutamato, para ser usado na transmissão sináptica, por uma glutaminase específica de neurônios (Figura 8A) (CUDDAPAH et al. 2014; VENNETI e THOMPSON 2017).

O metabolismo tumoral dos gliomas, no entanto, espelha a alta atividade glicolítica das células em máxima taxa proliferativa encontradas durante o desenvolvimento neural embrionário, provavelmente pelo resgate da expressão de enzimas glicolíticas nas suas isoformas específicas de células-tronco neuronais. Desta forma, os gliomas mimetizam sua capacidade de compensar o baixo rendimento de ATP pela glicólise aeróbica (com a geração de 2 moléculas frente a 38 pela fosforilação oxidativa) com a rápida conversão de piruvato à lactato, favorecida pela abundância de

glicose disponível no microambiente cerebral, também captada por transportadores GLUT1, suprimindo, portanto, a sua demanda energética metabólica, ao mesmo tempo em que produz precursores essenciais para a síntese de DNA, RNA, proteínas e lipídeos, necessários ao ganho de biomassa celular durante a proliferação. A produção de lactato a partir de piruvato pela enzima lactato desidrogenase gera NAD^+ , que mantém o balanço oxidativo das células tumorais e pode ser utilizado para manter o processo glicolítico ao servir de coenzima para uma de suas etapas, em que 3-fosfoglicerato é metabolizado em 1,3-bis-fosfoglicerato. Uma parte das moléculas de 3-fosfoglicerato, como exemplo do aproveitamento de carbonos para a constituição de biomassa, também pode ser desviada para a síntese de purinas e aminoácidos, como cisteína, glicina e serina. Com a exposição das células tumorais a condições de hipóxia, esse fenótipo glicolítico, que leva também à secreção de lactato (Figura 8A), torna-se mais pronunciado com a sua adaptação ao estresse metabólico pelo aumento na expressão de várias enzimas glicolíticas e transportadores de glicose (GLUT1 e GLUT3), assim como de bombas de efluxo de lactato e reguladores de pH, como MCTs e anidrases carbônicas. A estabilização de HIF-1 α durante a hipóxia estimula ainda mais o fluxo glicolítico pela ativação de aldolases, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, lactato desidrogenase, das anidrases carbônicas 9 e 12, além de intensificar a expressão de proteínas controladas pela via de PI3K/AKT/mTOR (regulador central do metabolismo de glicose e glutamina), como MCT4 e hexoquinase 2 (HK2), a primeira enzima da glicólise e um mediador crítico, preferencialmente expresso para a reprogramação metabólica de GBMs em comparação com astrocitomas de baixo grau e o cérebro normal. Para demonstrar como HK2 exerce um papel determinante na manutenção do fenótipo glicolítico, sua depleção *in vitro* de células de GBM inibiram a glicólise aeróbica, aumentaram o metabolismo oxidativo normal e, ao mesmo tempo, induziram apoptose, levando a melhores índices de sobrevivência na formação de tumores *in vivo*. O efeito de HIF-1 α também se estende para suprimir o ciclo do TCA pela ativação da piruvato desidrogenase quinase 1 (PDK1), inibidor da

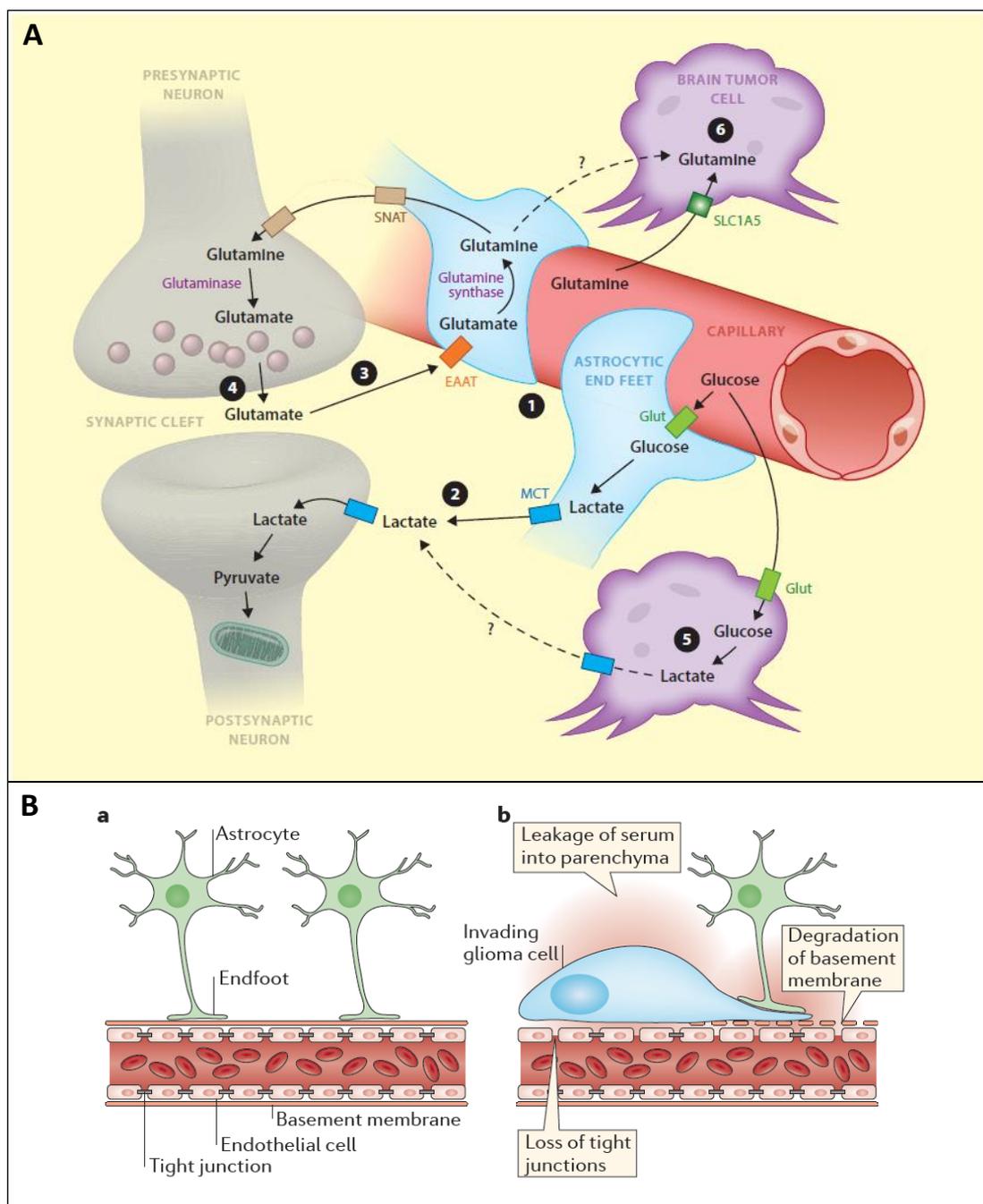
atividade mitocondrial de PDH que atenua a oxidação de piruvato, deixando que fique disponível no citosol para a geração de lactato. Paradoxalmente, o bloqueio da incorporação de carbonos de moléculas de piruvato para a produção mitocondrial de citrato (obtido pela fusão de acetil-CoA com oxaloacetato), que posteriormente é carregado para o citoplasma onde será utilizado na síntese de ácidos graxos, leva à supressão do crescimento celular (AGNIHOTRI e ZADEH 2015; VENNETI e THOMPSON 2017).

Ambas as vias constitutivamente ativadas e manifestadas em condições de hipóxia parecem convergir para que o lactato seja constantemente secretado, dado à multiplicidade de funções adaptativas que desempenha secundariamente a sua acidificação do microambiente para viabilizar a progressão tumoral: favorecendo a invasão por estimular a atividade de metaloproteinases, de modo que a inibição do efluxo de lactato em modelos animais diminui a capacidade invasiva dos gliomas; criando uma barreira ao acesso de células da vigilância imune, como células *natural killer* (NK), permitindo a evasão tumoral ao seu reconhecimento; desencadeando, por outro lado, uma resposta inflamatória para a qual são atraídos macrófagos, cuja secreção de citocinas e fatores de crescimento também potencializa o crescimento e invasão tumoral. Por essas razões, a resposta à hipóxia pela ativação de HIF-1 α , para além da visão clássica de promover a agressividade pelo estímulo à vascularização tumoral em estágios avançados de esgotamento vascular, pode ser alternativamente mais rápida para permitir o escape das células dos gliomas deste microambiente nocivo, através da mobilização de recursos adicionais que aprimorem ainda mais seu desempenho invasivo genotipicamente determinado (AGNIHOTRI e ZADEH 2015; VENNETI e THOMPSON 2017).

Coerente com a derivação dos gliomas ocorrendo em meio à sinalização extracelular cerebral, o glutamato atua como outro metabólito também importante para as células tumorais (Figura 8A), podendo constituir um nutriente alternativo para a produção de energia, ou um fator de crescimento para estímulo motogênico. O excesso de glutamato produzido a partir da glutamina, e secretado pelo sistema co-transportador x_c^- de

cisteína-glutamato, que aparece altamente expresso nos gliomas humanos, eleva suas concentrações extracelulares a níveis tóxicos causando hiperexcitabilidade e eventual morte neuronal, possivelmente associadas à etiologia das crises convulsivas que acometem cerca de 80% dos pacientes com tumores cerebrais primários. As células tumorais, no entanto, secretam grandes quantidades de glutamato para se aproveitar do seu efeito autócrino (sobre si mesmas) de promoção da invasividade. Como não possuem a subunidade GluR2 do receptor ionotrópico transmembrana AMPA de glutamato, a interação com o seu ligante torna essas células mais permeáveis à entrada de Ca^{+2} , levando a oscilações da sua concentração intracelular que estimulam a motilidade celular. Estudos pré-clínicos têm demonstrado que a sulfasalazina, fármaco originalmente aprovado pelo FDA para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais, pode reduzir a frequência de eventos epiléticos através da inibição do sistema x_c^- de secreção de glutamato, o que aponta sua possível utilidade clínica como adjuvante terapêutico, além de restringir seu efeito pró-migratório nos gliomas, via receptor AMPA, resultando em um nível 50% menor de infiltração tumoral (CUDDAPAH et al. 2014).

Durante o processo de invasão propriamente dito, pelo espaço perivascular, as células dos gliomas parecem desalojar, à medida que degradam a membrana basal, os processos *endfeet* astrocíticos normalmente acoplados à vasculatura, induzindo os astrócitos a alternarem para um estado reativo, pelo qual passam a retrair seus processos em resposta à desagregação da unidade neurovascular. Como consequência disso, a barreira hematoencefálica se desfaz por tempo indeterminado, abrindo brechas nas paredes dos vasos, possivelmente pela ausência de sinais provenientes da membrana basal que estimulem a formação de junções aderentes para manter a coesão do tecido endotelial (Figura 8B). Os processos astrocíticos também deixam de atuar, através da liberação de substâncias vasoativas, como mediadores da transdução neural sobre o ajuste regional do fluxo sanguíneo, da mesma forma que os vasos envolvidos pelos gliomas perdem a sua sensibilidade a essa estimulação.



Fonte: Adaptado de VENNETI e THOMPSON (2017) (A); CUDDAPAH et al. (2014) (B)

Figura 8 – Metabolismo glicolítico e glutamatérgico compartilhado entre neurônios e astrócitos. **A)** Processamento inter-dependente de glicose (1 e 2) e glutamina (3 e 4) para o metabolismo simbiótico entre neurônios e astrócitos, e sua possível implicação nos mecanismos adaptativos dos tumores gliais, que expressam receptores para ambos (5 e 6), ao microambiente. **B)** Desestabilização da barreira hematoencefálica (unidade neurovascular) pelo íntimo contato das células dos gliomas com os vasos sanguíneos, utilizados como “conduítes” durante sua invasão pelo parênquima cerebral.

Com a sinalização astrocítica ausente também há o comprometimento da atividade das células musculares lisas, embora permaneçam responsivas, dificultando, de maneira generalizada, o aporte sanguíneo para as células neuronais (CUDDAPAH et al. 2014).

A teoria da normalização vascular pelo uso de agentes anti-angiogênicos descrita anteriormente, que tem o propósito de corrigir os pontos de vazamento da vasculatura aberrante recém-formada pelo tumor para aumentar a sua perfusão e, conseqüentemente, ampliar a penetração de fármacos em seu interior, contrapõe uma visão mais neurocêntrica (relativa à exclusiva interação dos gliomas com o cérebro), de que pontos focais de ruptura da barreira hematoencefálica, pela desagregação neurovascular, podem funcionar muito melhor como porta de entrada para quimioterápicos, especialmente aqueles de ação anti-invasiva. Com a possibilidade de conter o avanço da infiltração tumoral, um dos problemas centrais no tratamento dos GBMs, os fármacos anti-invasivos podem ser associados à terapias-alvo que levem à rápida morte das células tumorais, evitando, portanto, que tenham a chance de escapar ou resistir ao tratamento (CUDDAPAH et al. 2014; JAIN 2014).

1.7 A PROTEÍNA STI1

A STI1 (também denominada de *Hsp70/Hsp90 organizing protein* ou Hop) é uma co-chaperonina citoplasmática capaz de se associar diretamente com proteínas de choque térmico (Hsp) de 70 e 90kDa, modulando o dobramento de proteínas clientes (LEE et al. 2012). STI1 é evolutivamente conservada, identificada em humanos, camundongos, insetos, leveduras, plantas, parasitas e vírus (HONORÉ et al. 1992; JOSHI et al. 1993; HERNÁNDEZ et al. 2002; TORRES et al. 1995; BLATCH et al. 1997; WEBB et al. 1997; DEMAND et al. 1998; ADAMs et al. 2000; WOOD et al. 2002; ZHANG et al. 2003). A expressão de STI1 é abundante e ubíqua desde os estágios iniciais do desenvolvimento (HAJJ et al. 2009) e tem sido encontrada em diferentes localizações celulares (HONORÉ et al. 1992),

trafegando de maneira dinâmica no citoplasma, onde é mais predominante, para o núcleo (LONGSHAW et al. 2009; SOARES et al. 2013) e também pode ser encontrada no espaço extracelular (EUSTACE e JAY 2004; DANIEL et al. 2008), onde sua secreção ocorre de maneira não-convencional através de microvesículas de origem endossomal (HAJJ et al. 2013).

1.8 STI1 E SUA INTERAÇÃO COM A PROTEÍNA PRÍON CELULAR

A forma secretada da STI1 é capaz de interagir com a proteína prion celular (PrP^C) na membrana plasmática, modulando diferentes fenômenos biológicos (LINDEN et al. 2008; MARTINS et al. 2010). PrP^C é uma glicoproteína constitutivamente expressa em diferentes tecidos de mamíferos, porém mais abundante no sistema nervoso central. PrP^C, quando convertida na isoforma infecciosa, (PrP^{SC}, para prion scrapie) está associada a doenças neurodegenerativas fatais e incuráveis chamadas encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs) (HAJJ et al. 2012). O papel fisiológico de PrP^C permanece controverso, uma vez que camundongos deficientes para a proteína são viáveis e sem nenhum fenótipo aparente (BÜELER et al. 1992). Entretanto, muitos trabalhos demonstram que PrP^C apresenta diversas funções, a maioria delas descritas no desenvolvimento e plasticidade do sistema nervoso (LINDEN et al. 2008; MARTINS et al. 2010). PrP^C apresenta um padrão de expressão espaço-temporal similar à STI1, sendo detectado a partir de estágios iniciais de desenvolvimento murino [dia embrionário (E), 7] (HAJJ et al. 2009; MIELE et al. 2003; TREMBLAY et al. 2007). Logo após a caracterização do complexo PrP^C-STI1, vários achados tem relacionado STI1 como um componente necessário para a indução de efeitos neurotróficos mediado por PrP^C (ZANATA et al. 2002; CHIARINI et al. 2002; LIMA et al. 2007; COITINHO et al. 2007; ARANTES et al. 2009). Trabalhos do nosso grupo demonstraram que a interação entre STI1 e PrP^C é capaz de ativar vias de sinalização

celular importantes para diversos processos biológicos, como as vias de PI3K-Akt-mTOR e Erk (LOPES et al. 2005; ARANTES et al. 2009; ROFFÉ et al. 2010). Além disso, o complexo STI1-PrP^C pode atuar na manutenção de células tronco-neurais, pela regulação positiva da auto-renovação e proliferação de células tronco/progenitoras neurais (SANTOS et al. 2011). Uma associação direta entre o complexo STI1-PrP^C e a agressividade tumoral também foi observada em astrocitomas, especialmente os de alto grau, como o glioblastoma (LOPES et al. 2015). A interação entre as duas proteínas ativa a via de ERK-PI3K, promovendo a proliferação celular, efeito este que pode ser bloqueado com peptídeos que competem e deslocam a ligação entre as duas proteínas (ERLICH et al. 2007; LOPES et al. 2015). Considerando todas as evidências que demonstram a versatilidade de STI1, um estudo mais aprofundado sobre as funções de STI1 em mamíferos torna-se fundamental para a elucidação de suas propriedades fisiológicas.

1.9 SECREÇÃO DE STI1 COMO RESPOSTA À ISQUEMIA

O envolvimento do complexo STI1-PrP^C na formação de vasos também pode ter uma importante implicação na biologia de tumores sólidos. A STI1 já foi demonstrada como um importante regulador da angiogênese, capaz de estimular a polarização e migração de células endoteliais (LI et al. 2012). Adicionalmente, dados do grupo indicam que células de melanoma são capazes de secretar STI1 e estimular o recrutamento de células da medula óssea que expressam PrP^C, de maneira similar ao demonstrado em modelos de isquemia (LEE et al. 2013). Por este modelo, a STI1 se demonstrou capaz de atuar também à distância, recrutando progenitores endoteliais PrP^C-positivos da medula óssea para recuperação vascular e funcional de regiões cerebrais isquêmicas. Da mesma forma, as células PrP^C-positivas ocupam os sítios pré-metastáticos e podem favorecer a colonização e crescimento tumoral à distância (COSTA-SILVA e LYDEN dados não publicados). Estes achados fortalecem a ideia de que o complexo STI1-PrP^C pode estar associado à angiogênese tumoral.

Segundo BERALDO et al. (2013), astrócitos de camundongos C57BL/6J seriam capazes de secretar cerca de 3 vezes mais STI1 durante períodos de isquemia, durante os quais as células são submetidas à privação de glicose e oxigênio. Essa quantidade extra de STI1 seria responsável por prevenir a morte celular de culturas neuronais nestas mesmas condições, através de um mecanismo PrP^C-dependente. A função protetora da STI1 secretada por células em regiões de isquemia cerebral pode se estender ainda para complementar a ação de mediadores angiogênicos clássicos como VEGF, bFGF, Ang-2, todos eles sob o controle transcricional central de HIF-1 α (LEE et al. 2013). No entanto, ainda não se conhece o papel da STI1 nos moldes da neoangiogênese tumoral, que ocorre por um processo bem menos controlado que a resposta fisiológica a estímulos angiogênicos, de forma que, apesar de passar pelos estágios iniciais de formação tubular, os vasos intratumorais dificilmente chegam a se consolidar formando vasos maduros, e até mesmo progredir para eventos posteriores de remodelamento e regressão (morte) vascular, como acontece com a vasculatura normal.

1.10 STI1 COMO PROTEÍNA DE INTER-RELAÇÃO FUNCIONAL INTRA/EXTRACELULAR?

A dupla funcionalidade da STI1 como co-chaperona (intracelular) e fator de crescimento (extracelular) pode ser reconhecida dentro do conceito, ainda sendo explorado, de que uma única proteína, mesmo que com diferenças topológicas, seria capaz de exercer funções distintas em lados opostos da membrana plasmática, porém de maneira coordenada para controlar mecanismos específicos que garantam o funcionamento de processos e a responsividade tecidual a estímulos externos. Organismos complexos desenvolveram, ao longo do tempo, diversas estratégias para aumentar a complexidade do genoma sem a necessidade de criar mais genes, uma vez que um único gene pode exercer efeitos complexos e dinâmicos através de processos que multiplicam as funções de seus

produtos. O *splicing* alternativo pode criar diferentes transcritos que codificam proteínas com funções desconexas, e até mesmo antagônicas, a partir de um mesmo gene. Além disso, modificações pós-traducionais podem alterar a estabilidade, atividade, localização subcelular e até funções básicas das proteínas. Proteínas multifuncionais, apesar de se originarem de um mesmo gene, podem apresentar resíduos ou grupos funcionais distintos a depender de seu mecanismo de ação. A função nuclear de HMGB1 como moduladora do empacotamento de cromatina e da transcrição gênica requer, respectivamente, um domínio C-terminal ácido, assim como uma sequência DDDDE (D- Ácido Aspártico / E-Ácido Glutâmico) ligada a esse mesmo domínio. Seu correspondente extracelular, anfoterim, depende de um resíduo específico de ligação ao seu receptor, que compreende os aminoácidos 150-183, para exercer seu efeito quimiotático, de indução da motilidade celular, e como citocina mediadora de respostas inflamatórias. Como um traço de aquisição de vantagem evolutiva, considerando ainda a presença de STI1 desde leveduras até mamíferos e humanos, nos quais recebe o nome de HOP (*Human Hsp70/Hsp90 organizing protein*), conservando a mesma atividade co-chaperona (RÖHL et al. 2015), a multifuncionalidade de proteínas provenientes de um mesmo transcrito pode ter raízes em um processo oportunístico conhecido como recrutamento, pelo qual proteínas com especificidade para determinados ligantes intracelulares são expostas a possíveis ligantes externos, de modo que, em havendo alguma resposta percebida pela célula, os sítios de ligação pré-existentes são remodelados pelas células a fim de explorar novas interações funcionais. Assim como outras proteínas intra/extracelularmente funcionais, a STI1 não possui o peptídeo sinal reconhecido pela via secretória formada pelo Retículo Endoplasmático (RE) – Complexo de Golgi, sendo, portanto, secretada por via não convencional, representada, no seu caso, por diferentes populações de vesículas extracelulares derivadas de corpos multivesiculares (MVB) da via endossomal (HAJJ et al. 2013). Mecanismos alternativos de secreção dessas proteínas precisaram ser criados para evitar que o transporte através de ER-Golgi resultasse em modificações em sua

estrutura (como glicosilações) que comprometessem a sua função extracelular. Por outro lado, enquanto a presença de um forte sinal de excitose na proteína demandaria um grande gasto de energia para evitar sua secreção pela via ER-Golgi, as vias não convencionais podem ter surgido em primeiro lugar, durante a evolução, por permitir uma regulação mais flexível e dinâmica de como as proteínas de intercâmbio funcional seriam utilizadas pela célula em função dos estímulos internos ou externos, levando a uma resposta adaptativa muito mais rápida pelo balanço imediato entre as suas funções intra- e extracelulares (RADISKY et al. 2009).

1.11 MODELOS *IN VITRO* E *EX VIVO* PARA O ESTUDO DA ANGIOGÊNESE

O ponto crítico do estudo da angiogênese está na ausência de um ensaio “padrão-ouro” *in vitro* ou *in vivo* que não apenas reproduza a complexidade e permita a modulação, a nível de sinalização, de todas as etapas deste processo, mas que simule ainda a heterogeneidade entre células endoteliais existente ao longo da rede vascular (necessária para resposta adaptativa rápida à flutuações do aporte sanguíneo para regiões específicas do organismo), assim como dos tipos celulares e de matriz extracelular (ECM) encontrados em determinado microambiente. A maioria dos ensaios *in vitro* concentra seu enfoque nas capacidades proliferativa, de migração e, principalmente, diferenciação das células endoteliais, que são centrais durante a angiogênese. No entanto, essas células se comportam de modo diferente quando em contato com as células acessórias de suporte (pericitos, células musculares lisas), ECM e/ou membrana basal, e em resposta ao fluxo sanguíneo exercendo pressão no interior dos vasos. Por isso, os ensaios *in vitro* atualmente disponíveis, apesar de serem mais simples, rápidos, reprodutíveis e de fácil quantificação, não permitem o estudo das interações fisiológicas mais complexas que ocorrem *in vivo*, por não abrangerem, por exemplo, possíveis efeitos indiretos de um determinado agente pró-angiogênico em teste sobre células não-endoteliais,

as quais podem, por sua vez, produzir algum fator ou substância ligante com atividade sobre as células endoteliais. Razões essas pelas quais um princípio ativo pode não ter atividade *in vitro*, mas funções detectadas apenas *in vivo*, ou vice-versa, quando este, apesar de promissor *in vitro*, pode falhar nos testes em animais (STATON et al. 2009).

Fisiologicamente, as células endoteliais *in vivo* são em geral quiescentes, enquanto aquelas cultivadas *in vitro* assumem um comportamento proliferativo, o que pode ser um problema em potencial quando se avalia em cultura o efeito de fatores pró- ou anti-angiogênicos, tendo em vista que essas células já foram previamente estimuladas a desenvolver um fenótipo angiogênico. Com isso, o uso de culturas primárias que mantenham suas propriedades fisiológicas normais órgão-específicas está restrito a um baixo número de passagens, de modo que as células não sofram alterações no seu estado de ativação, cariótipo, expressão de antígenos de superfície celular e das propriedades de crescimento (STATON et al. 2009). A grande maioria dos ensaios de angiogênese *in vitro* adota como referência de perfil angiogênico as células endoteliais derivadas da veia umbilical humana (HUVEC), muito em função da sua disponibilidade favorável, facilidade e baixo custo de isolamento e relativa pureza das células isoladas, além de se tratar de uma célula humana, com maior relevância para se correlacionar com os estudos do câncer. Entretanto, células macrovasculares como as HUVECs (isoladas a partir de vasos de grande calibre) diferem em diversos aspectos bioquímicos e estruturais das células microvasculares, componentes dos vasos de pequeno calibre, que são considerados o sítio específico para o desenvolvimento de processos envolvidos na angiogênese (SMITH e STATON 2007). Devido a isso, embora os resultados com as HUVECs possam ser relativizados entre diferentes estudos independentes, salvo algumas interferências provenientes da variabilidade na coleta de células de diferentes doadores, e dos métodos de isolamento dessas células, pode-se observar, na literatura, uma tendência no uso de células microvasculares, em conjunto com as HUVECs, como forma de comprovar os efeitos angiogênicos de fatores secretados por

células tumorais, por exemplo, sobre a microvasculatura de um determinado tecido onde se encontra o tumor. Por outro lado, já foi demonstrado que as HUVECs são capazes de desenvolver um fenótipo mais microvascular, na medida em que formam vasos quando incorporadas em gel de fibrina, alternando sua expressão gênica para a maquinaria de angiogênese (NAKATSU e HUGHES 2008). Alternativas também já foram testadas para utilizar linhagens de células endoteliais imortalizadas, em substituição às culturas primárias, que nem sempre são de fácil acesso. Mas, mesmo com o ganho de reprodutibilidade nos ensaios, o processo de imortalização, assim como as passagens constantes em cultura, alteram significativamente as características dessas células. Neste sentido, mais recentemente, Heiss et al. (2015) avaliaram que culturas primárias de HUVECs, quando imortalizadas pela modulação de uma biblioteca de genes (no controle de processos como ciclo celular, apoptose e manutenção de células-tronco) geram linhagens celulares com expansão clonal ilimitada sem, no entanto, a ativação de oncogenes, que produzem, como em outros métodos de imortalização, instabilidade genômica e perdas fenotípicas (LIPPS et al. 2018). Por este novo modelo, as linhagens geradas mantiveram o mesmo fenótipo e funções das culturas primárias precursoras, produzindo resultados altamente reprodutíveis, mesmo após várias passagens, em relação aos ensaios de angiogênese (HEISS et al. 2015).

De todos os ensaios *in vitro*, atrás apenas das estratégias microfluídicas mais recentes (SOBRINO et al. 2016; PHAN et al. 2017a e b), o ensaio 3D em gel de fibrina pode ser considerado o que melhor mimetiza as variáveis encontradas *in vivo*, não apenas por empregar o sistema de cultura em 3D, onde as células endoteliais são envolvidas por uma matriz polimérica assim como acontece no organismo vivo, mas também por abranger a maioria das etapas fundamentais do processo de angiogênese: degradação da membrana basal, permitindo a migração e proliferação das células endoteliais; formação de lúmen; ramificação e anastomose dos microvasos recém-formados. Em linhas gerais, o método consiste no revestimento, em suspensão, de esferas microcarreadoras (*beads*), que

possuem uma superfície de ancoragem para células endoteliais. As *beads* contendo, neste caso, as HUVECs em passagens baixas (P2-P4), o que é necessário para que estas estejam propícias à ramificação e formação de microvasos com lúmen, são incorporadas em gel de fibrina. Sobre este, são plaqueados fibroblastos, responsáveis então por fornecer os co-fatores essenciais para sustentar todas estas etapas da angiogênese (NAKATSU e HUGHES 2008).

Como os eventos posteriores, envolvendo a participação das células de suporte e alterações induzidas por variações do fluxo sanguíneo, só podem ser estudados por modelos *in vivo*, os ensaios 3D fornecem, em contrapartida, vantagens exclusivas de acompanhamento em tempo real da formação de vasos e, principalmente, de manipulação e análise da expressão gênica das células endoteliais, diretamente extraídas dos microvasos maduros ao final de cada experimento, ou durante as fases de migração e formação do lúmen, quando ainda estão em formação (NAKATSU et al. 2003).

Entre os ensaios *ex vivo* (cultura de explantes de órgãos), o ensaio de anel aórtico também figura entre os que melhor mimetizam o processo fisiológico de angiogênese *in vivo*, por se tratar também de um ensaio 3D, em que ramificações vasculares são obtidas a partir de segmentos de aorta de camundongo incorporados em matrizes poliméricas (colágeno, fibrina ou Matrigel). Diferente dos ensaios *in vitro*, a formação dos microvasos é acompanhada do seu revestimento por células de suporte (pericitos, células de músculo liso), um dos eventos finais da angiogênese. No momento do explante da aorta também, as células endoteliais se encontram quiescentes para responder *in vitro* aos estímulos angiogênicos, reproduzindo a sequência natural de etapas envolvendo proliferação, migração a partir da aorta e diferenciação em tubos (STATON et al. 2009). No entanto, este ensaio pode ser considerado representativo apenas da angiogênese fisiológica, uma vez que apesar de ser possível testar a resposta dos anéis frente ao meio condicionado de células tumorais, essas, mesmo em cocultura, não interagiriam diretamente com os vasos como no microambiente

tumoral. Além disso, a obtenção de resultados espécie-específicos não associados com a resposta de tecidos humanos, a possível variabilidade dentro dos mesmos grupos de tratamento e a questão controversa da angiogênese, um processo primariamente microvascular, ocorrendo em um vaso de grande calibre como a aorta, podem ser apontados como outras desvantagens deste ensaio (AUERBACH et al. 2003; STATON et al. 2009). Porém, o baixo custo de execução e a relativa simplicidade do método, além do rendimento considerável de anéis por aorta de cada animal, associado à possibilidade de manipulação genética em nível de hospedeiro ou da própria artéria (por transfecção de siRNA), tornam este um ensaio bastante robusto como ferramenta indicativa de potenciais fatores moduladores da angiogênese (BAKER et al. 2012).

Os ensaios *in vitro* e *ex vivo* podem ser agrupados em uma mesma categoria, na medida em que refletem uma angiogênese ectópica, que é independente das particularidades do microambiente cerebral. Nenhum desses modelos se desenvolve em condições que reproduzem a integridade do tecido cerebral, a fisiologia do seu meio extracelular, ou a sinalização dependente da conectividade entre suas células, fatores que são determinantes para os processos observados *in vivo*. Entretanto, a utilização de fatias (*slices*) de cérebro obtidas a fresco aproximam-se dos modelos *in vivo* com maior fidedignidade (GHOCHANANI et al. 2016). O método se baseia nas culturas organotípicas *in vitro* de fatias de cérebro, que podem ser co-cultivadas com células tumorais expressando algum marcador fluorescente, ou com astrócitos embrionários normais, também marcados, que são utilizados como controle. As células são injetadas na região cortical de cada fatia, e o crescimento e invasão tumoral podem então ser acompanhados por imagem, assim como a angiogênese induzida pelo tumor pode ser avaliada por imunofluorescência de marcadores endoteliais das fatias fixadas. Segundo Ghoochani et al. 2016, que padronizou este método, entre outras linhagens, para GL261, após adesão e invasão da fatia, essas células secretam fatores angiogênicos, induzindo a formação de uma densa e aberrante rede vascular ao redor do tumor, de maneira similar ao que

acontece *in vivo*, a qual pode ser avaliada quantitativamente. Portanto, este método representa uma ferramenta versátil e robusta para avaliação do microambiente cerebral por parâmetros, além da angiogênese, de morte celular neuronal e atividade da micróglia, durante o desenvolvimento tumoral dentro de uma arquitetura preservada do tecido cerebral. Características que podem conferir a este método funções preditivas para redução do número de animais a serem utilizados nos ensaios *in vivo*.

1.12 MODELO DE GL261 *IN VIVO* PARA ESTUDO DO GLIOBLASTOMA

Modelos animais são convencionalmente adotados por oferecer meios experimentais que permitem compreender e interferir na dinâmica do desenvolvimento tumoral em organismos vivos, tornando-se instrumentos ideais na transposição dos mecanismos biológicos observados *in vivo* para a concepção de ensaios pré-clínicos preditivos de novos fármacos. Os transplantes ortotópicos murinos (em que células tumorais são implantadas em seu tecido de origem no hospedeiro) são um exemplo bem-sucedido desta abordagem (RUGGERI et al. 2014).

Em relação aos modelos de implante subcutâneo, os transplantes ortotópicos apresentam a vantagem de introduzir as células tumorais diretamente em seu microambiente natural, onde se pode mimetizar o desenvolvimento tumoral em todos os aspectos encontrados na clínica, incluindo até mesmo a influência da resposta imune do hospedeiro no tumor, quando se usam animais imunocompetentes ao invés dos imunodeficientes, conhecidos como *nudes*. Para o estudo de gliomas, a linhagem GL261 se desenvolve em cérebro de camundongos C57BL/6J (de onde foi originalmente isolada após exposição destes animais a substância carcinógena), reproduzindo, com bastante eficiência e representatividade, todas as etapas do crescimento tumoral observadas na doença humana, as quais levam cerca de 4 semanas para atingir o fenótipo de maior agressividade, passando por 5 estágios específicos: I – implantação; II –

invasão perivascular; III – fase proliferativa; IV – regressão vascular levando à hipóxia e consequente secreção de VEGF; V – neovascularização das áreas tumorais perinecroticas. Ao mimetizar as mesmas fases da progressão tumoral, que podem ainda ser igualmente monitoradas por métodos de imagem, o modelo de GL261 compartilha muitas das características, a nível histológico e molecular, que são específicas do glioblastoma humano, como seu perfil invasivo, com bordas irregulares e invaginações de células tumorais no parênquima cerebral adjacente, reveladas pela análise microscópica e marcação com p53/GFP. Sendo comparável ainda pelos parâmetros celulares de anaplasia, proliferação e necrose, além dos padrões de expressão envolvidos com regressão vascular (Ang-2), hipóxia (HIF-1 α) e angiogênese (VEGF) (NEWCOMB 2009; ZAGZAG et al. 2000b).

O monitoramento do crescimento de tumores GL261, assim como da linhagem correlata GL26, *in vivo* por microscopia intravital (WINKLER et al. 2009, BAKER et al. 2014) tem fornecido evidências de que a infiltração de células tumorais individuais, preferencialmente pelo espaço perivascular (menos denso em matriz extracelular que o parênquima cerebral), e a consequente indução da angiogênese a partir de ramificações da microvasculatura cerebral em sítios distantes do tumor primário, pode contribuir para o fenótipo de alta invasividade dos gliomas, assim como para seu crescimento, inicialmente restrito à colonização dos vasos adjacentes ao tumor. A invasão perivascular de GL261 pode revelar uma sobreposição entre os mecanismos de invasão e angiogênese, muitas vezes ativados pelas células tumorais através da secreção dos mesmos fatores de crescimento e citocinas. O processo se inicia, provavelmente, pelo contato direto das células dos gliomas com as células endoteliais do hospedeiro, gerando um intercâmbio de sinais em que a angiogênese retroalimenta os eventos de invasão, na medida em que as células tumorais podem se estender ao longo da rede vascular recém-formada. Para isso, vias de sinalização correlatas são ativadas tanto em células tumorais quanto endoteliais, para que ambas degradem a matriz extracelular e a membrana basal, de modo a criar um microambiente pró-invasivo, em que sua interação

com os componentes protéicos destas matrizes (como as integrinas) permita abrir caminho para a formação de novos vasos, ou para a difusão das células tumorais no cérebro. Apesar de ser impossível observar tumores murinos avasculares, mesmo nas fases iniciais de sua progressão, uma vez que as células tumorais requerem um amplo fluxo de glicose sanguínea para abastecer seu metabolismo glicolítico, esses ainda atingem mais tardiamente, mas de maneira rápida, tamanhos que limitam sua completa perfusão, levando a condições de hipóxia e à respectiva ativação das vias previstas pelo mecanismo clássico de indução da angiogênese. Baseado nessas observações, discute-se que o modelo de desenvolvimento do glioma GL261 seja mais dinâmico do que aquele proposto anteriormente, com eventos de colonização e regressão vascular ocorrendo simultaneamente aos de hipóxia e angiogênese (ZAGZAG et al. 2000a; AGHI et al. 2006; MÉNDEZ et al. 2010; WANG et al. 2012).

2 JUSTIFICATIVA

A proteína STI1 e seu receptor PrP^C atuam em conjunto modulando diversos fenômenos biológicos essenciais para a manutenção celular. Evidências apontam para um provável envolvimento deste complexo na biologia de precursores vasculares e na formação de vasos sanguíneos. Espera-se encontrar uma associação entre os níveis de expressão de STI1, e sua provável associação com a proteína príon, com a formação de vasos durante a tumorigênese de gliomas pelo modelo ortotópico de GL261 murino. Para determinar se a STI1 é capaz de modular a complexa sequência de eventos que permite às células endoteliais se organizarem em novos vasos sanguíneos, processo conhecido como angiogênese, se faz necessária a combinação de diferentes ensaios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* que mimetizem, de forma complementar, o maior número possível de etapas deste processo. Desta forma, será possível traduzir os mecanismos validados *in vitro* para um modelo pré-clínico que venha a reproduzir o desenvolvimento do glioblastoma humano.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar como a proteína STI1 secretada pelos tumores de GL261 ortotópicos pode modular a vascularização e progressão tumoral, por meio da interação com seu respectivo receptor PrP^C na microvasculatura cerebral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliação do efeito da STI1 recombinante sobre a formação de tubos e microvasos *in vitro* pelos ensaios 2D em Matrigel e 3D em gel de fibrina, respectivamente.

Abordagem: Como a formação das estruturas que mimetizam microvasos é induzida por fatores pró-angiogênicos solúveis presentes no meio, testamos se a STI1 recombinante, assim como o VEGF, nosso controle positivo, seria capaz de exercer efeito modulador sobre as células endoteliais.

- 2 Avaliação do efeito da STI1 recombinante sobre a angiogênese fisiológica em anéis aórticos de camundongos tipo-selvagem (WT) e haploinsuficientes (STI1^{+/-}) para STI1, além daqueles deficientes para PrP^C (*Prnp*^{0/0})

Abordagem: A principal aplicação do ensaio de anel aórtico em nosso trabalho foi definir como os explantes reagem ao tratamento com STI1, assumindo que este seja um protótipo da resposta fisiológica encontrada *in vivo*, buscando ainda comprovar se o mecanismo de ação da STI1 ocorre via PrP^C ou outro receptor nas células endoteliais de animais que não expressam esta proteína.

- 3 Avaliação do desenvolvimento tumoral e do impacto na vascularização dos tumores de células GL261-RFP e dos implantes de astrócitos embrionários em co-culturas organotípicas de cérebro de camundongos tipo-selvagem (WT) e haploinsuficientes (STI1^{+/-}) para STI1, além daqueles deficientes para PrP^C (*Prnp*^{0/0})

Abordagem: Esperávamos poder avaliar como a densidade vascular peritumoral varia, nos diferentes hospedeiros, em função do contato direto entre o tumor e a microvasculatura cerebral, considerando a influência dos níveis de secreção de STI1 pelo tumor, e a sua possível interação com PrP^C nas células endoteliais das fatias de cérebro hospedeiro.

- 4 Avaliação da angiogênese intra/peritumoral e da invasão perivascular em cérebros de camundongos tipo-selvagem (WT), haploinsuficientes (STI1^{+/-}) e superexpressores (TgA) de STI1, além daqueles deficientes para PrP^C (*Prnp*^{0/0}) injetados ortotopicamente com as células de tumor glial murino GL261-RFP e GL261-RFP-LUC.

Abordagem: As células foram implantadas ortotopicamente no cérebro de camundongos e seu crescimento tumoral foi monitorado *in vivo* através da emissão de bioluminescência (GL261-LUC). Os tumores foram processados, em diferentes períodos pós-implantação, para análise histológica da progressão tumoral pelos parâmetros de invasão e vascularização avaliados por imunofluorescência.

- 5 Tratamento intratumoral com anti-STI1 dos tumores ortotópicos de GL261-LUC gerados em animais tipo-selvagem (WT) e deficientes para PrP^C (*Prnp*^{0/0}) por bombas micro-osmóticas.

Abordagem: A partir do primeiro sinal de bioluminescência registrado para cada tumor, os animais foram implantados subcutaneamente com as bombas micro-osmóticas, ligadas a uma cânula, para liberação controlada

intratumoral de anti-STI1. O sinal de bioluminescência continuou sendo acompanhado até que o animal chegasse ao estágio avançado da doença, e o cérebro fosse processado para análise histológica da invasão e vascularização tumoral por imunofluorescência.

- 6 Avaliação da angiogênese intra/peritumoral e da invasão perivascular em cérebros de animais tipo-selvagem (WT) injetados ortotopicamente com a célula de tumor glial murino GL261 selvagem (WT), *non-target* (NT) ou *knockdown* para STI1 ou HIF-1 α

Abordagem: As células GL261 foram infectadas, individualmente, com lentivírus contendo sequências específicas para o silenciamento de STI1 ou HIF-1 α . Após o implante ortotópico de cada tipo de célula gerada, utilizando como controle as células tipo-selvagem (WT) e *non-target* (NT), os tumores em estágios terminais da doença foram processados para análise histológica da invasão e vascularização tumoral por imunofluorescência.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E GENOTIPAGEM

Foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus*, de ambos os sexos, linhagem C57BL/6J e linhagens derivadas transgênicas. Os animais C57BL/6J foram considerados como tipo-selvagem, as linhagens transgênicas são: haploinsuficientes (STI1^{-/+}), que superexpressam STI1 (TgA) (6), animais deficientes para a proteína príon celular (*Prnp*^{0/0}). A geração de animais haploinsuficientes foi realizada através do acasalamento entre camundongos haploinsuficientes (STI1^{-/+}) e C57BL/6J (tipo-selvagem). Os animais TgA foram gerados a partir de acasalamentos entre machos C57BL/6J e fêmeas TgA. Os filhotes foram genotipados para a identificação dos indivíduos, segundo protocolo estabelecido por Beraldo et al. 2013 (6). Os animais foram mantidos durante todo o período experimental em biotério SPF (*Specific Pathogen Free*), onde os animais são livres de patógenos específicos, para os quais os mesmos foram periodicamente testados. Os camundongos foram mantidos em microisoladores à temperatura controlada de 22° C e sob ciclo de luz de 12 horas, tratados com água autoclavada e ração irradiada *ad libitum*. Todos os animais foram utilizados de acordo com o projeto de pesquisa nº 074/16 aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Antônio Prudente (CEUA/FAP).

4.2 CULTURA DE CÉLULAS

As células GL261 tipo-selvagem expressam também uma proteína fluorescente vermelha (RFP) e são cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Os fibroblastos primários de tecido pulmonar humano foram obtidos da ATCC (PCS-201-013) e mantidos em DMEM High Glucose com 10% de SFB. As culturas primárias de HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) foram gentilmente cedidas pela

Profa. Verônica Morandi do Departamento de Biologia Celular e Genética da UERJ, na passagem P2 e mantidas até a passagem P5, em meio M199 suplementado com 20%SFB e 50 µg/mL de ECGS. Antes de serem utilizadas nos ensaios de gel de fibrina, as HUVECs foram pré-condicionadas por 24h em meio EGM-2 (Lonza).

4.3 GERAÇÃO DE LINHAGENS GL261 MODIFICADAS POR TRANSDUÇÃO LENTIVIRAL

4.3.1 GL261-Luciferase

Em uma placa de 96 poços, as células GL261-RFP foram plaqueadas na densidade de 5×10^3 células/poço em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após 24h de incubação a 37°C / 5%CO₂, os poços foram lavados com PBS e as células infectadas com as partículas lentivirais carregando o vetor de expressão para luciferase-firefly (AMSBIO), utilizando como reagente de transfecção o polímero catiônico Polibreno[®] (Sigma-Aldrich H9268) à 10 µg/ml em um volume final de 100 µL em meio DMEM + SFB 10%. Para medir a eficiência de transdução do vírus, foi estabelecida uma curva de concentrações das respectivas unidades de transfecção (TU)/célula/poço a partir dos valores de multiplicidade de infecção (MOI = n° TU / n° céls plaqueadas por poço) escolhidos arbitrariamente, ficando assim divididos os grupos experimentais, em duplicatas: controle de crescimento; MOI 20; MOI 30; e controles negativos com puromicina 1 e 2 µg/mL – antibiótico para o qual o vetor carrega uma marca de seleção que confere resistência às células em que a sequência foi incorporada ao genoma. Para se definir a concentração de puromicina a ser utilizada, foi realizada, previamente, uma curva de viabilidade em placa de 96 poços, em que, após 10 dias de tratamento, repondo o meio com puromicina a cada 3 dias, a menor concentração capaz de eliminar completamente todas as células dos poços da triplicata foi escolhida para selecionar os clones resistentes. Dessa forma, as células infectadas por 24h foram novamente lavadas com PBS e tratadas, a cada 2 dias, com

puromicina 1 µg/mL por aproximadamente 3 semanas, até que restassem apenas colônias de células resistentes, que estariam expressando luciferase. Estas colônias foram então expandidas gradualmente (placa 4 poços > 6 poços > garrafa 25 cm²), sempre mantendo-se o antibiótico na mesma concentração, até se obter quantidade suficiente de células para realizar o ensaio de atividade de luciferase. Este é realizado pela adição de luciferina 150 µg/mL a 1,0x10⁵ células suspensas em 1 mL de PBS, seguido de leitura da luminescência, por 30s, em luminômetro. A metabolização do substrato, gerando a emissão de luz (bioluminescência) como resultado da reação, confirma a presença da enzima luciferase nas células modificadas em níveis proporcionais ao sinal detectado, e confere um meio de monitoramento da linhagem GL261-LUC produzida.

4.3.2 GL261 shSTI1 e shHIF-1α: *Knockdown* e Seleção dos Clones

O silenciamento de genes por vetores virais fornecidos pela linha MISSION shRNA da Sigma-Aldrich requer o uso de pelo menos 05 clones virais ou sequências diferentes de shRNA, para que se garanta pelo menos 70% de *knockdown* dos transcritos-alvo nas células infectadas. Além disso, também se recomenda o uso de controles adequados que permitam primeiro avaliar a eficiência de transdução (controle positivo), assim como uma interpretação precisa dos resultados, confirmando a especificidade do *knockdown* de determinado gene (controle negativo). Para isso, foram adquiridos os seguintes controles: MISSION[®] TRC2 pLKO.5-puro-CMV-TurboGFP[™] Transduction Particles (SHC203V), que contém o gene que codifica a proteína fluorescente GFP (*green fluorescent protein*), a qual permite determinar facilmente a eficiência de transdução por microscopia; e o MISSION[®] TRC2 pLKO.5-puro Non-Mammalian shRNA Control Transduction Particles (SHC202V), que carrega uma sequência definida para não alterar qualquer gene humano ou murino, mas cujo transcrito será processado pela via de RNA de interferência (RNAi) até ser incorporado ao complexo de silenciamento RISC, servindo então como referência de um eventual efeito da transdução e da ativação da maquinaria de RNAi sobre a

expressão dos genes de interesse. Os clones de shRNA para *knockdown* de STI1 e HIF-1 α , compatíveis com as sequências de camundongo, também foram adquiridos em partículas lentivirais prontas para transdução: STIP1 MISSION shRNA pLKO.1 Lentiviral Transduction Particles (SHCLNV-NM_016737), clones TRCN0000115456, TRCN0000325639, TRCN0000325640, TRCN0000325641 e TRCN0000325567; HIF1A MISSION shRNA pLKO.1 Lentiviral Transduction Particles (SHCLNV-NM_010431), clones TRCN0000232219, TRCN0000232221, TRCN0000232223, TRCN0000232222 e TRCN0000232220.

As células GL261-RFP foram plaqueadas em placa de 96 poços, $1,6 \times 10^4$ células/poço, e incubadas a 37°C/5% CO₂ por 2 dias até atingirem a confluência de 70% ideal para a infecção com os lentivírus. O meio foi então removido dos poços para a adição de 110 μ L de meio completo contendo 8 μ g/mL de brometo de hexadimetrina (Polibreno[®], Sigma-Aldrich H9268). A placa foi gentilmente agitada e as partículas lentivirais adicionadas individualmente, em duplicatas de MOI 0,5 e MOI 2,0 (número de partículas por célula) para cada clone e controle. Agitou-se novamente para homogeneizar e incubou-se a placa por 20h a 37°C/5% CO₂. O meio contendo as partículas foi então removido e repostado por 120 μ L de meio completo, no qual as células foram mantidas até o dia seguinte. Para selecionar as células que tiveram as sequências definitivamente incorporadas em seu genoma e passaram, dessa forma, a expressar, de maneira estável, os respectivos shRNAs, assim como o gene de resistência, as células foram tratadas com puomicina 2 μ g/mL a cada 2 dias, para eliminar aquelas que não haviam sido transduzidas, até que restassem apenas as colônias resistentes, por volta de 16 dias de tratamento. As colônias correspondentes a cada MOI e clone viral testado foram expandidas em *pool* para placas de 12 poços, mantendo-se o tratamento com puomicina, e dessas para placas de 60 mm, dividindo-se o *pool* para avaliar os níveis de expressão de cada proteína por Western blot em comparação com o controle *non-target* e as células GL261-RFP originais. Como a integração dos lentivírus ao genoma acontece de maneira aleatória, foi

possível observar, pelo controle positivo, que as células apresentavam níveis variáveis de expressão de GFP, e o mesmo, portanto, seria encontrado para as células silenciadas. Sendo assim, foram selecionados três *pools* de células que apresentaram a maior diminuição na expressão das proteínas, conforme observado por *Western blot*, os quais derivaram de dois clones virais para shSTI1 e de um para shHIF-1 α . Esses *pools* foram plaqueados na densidade de 500 células em uma placa de 100 mm, de modo que cada célula formaria uma colônia isolada da outra. Dessa forma, após 12 dias de cultivo, entre 14-18 colônias foram coletadas de cada placa em 100 μ L de meio, e transferidas, individualmente, para placas de 12 poços. Quando atingiram confluência, esses clones celulares foram novamente divididos em placas diferentes para avaliação da expressão das proteínas por *Western blot* e manutenção das culturas. Destes clones, 4 deles originários de cada lentivírus, com maior ou menor *knockdown* para STI1 ou HIF-1 α foram mais uma vez avaliados por *Western blot* para confirmar os níveis de silenciamento. Por último, os três clones com menor expressão de cada proteína foram selecionados para os implantes ortotópicos.

4.4 PRODUÇÃO DE STI1 E STI1- Δ RECOMBINANTES

Utilizando um sistema escalonado de expressão, visando à quantidade em massa de cada proteína a ser obtida, partimos da cepa de *Escherichia coli* DH-5 α (Stratagene) contendo o vetor de expressão His₆-STI1 ou o His₆-STI1- Δ (com deleção para a sequência de aminoácidos 230-245, correspondente ao sítio de ligação a PrP^C). Com o pré-inóculo, no dia anterior, em meio LB contendo 0,1% de ampicilina, para a qual o vetor carrega um gene de resistência, procedemos à expansão da cultura para 2L do meio, por 4-6h em shaker a 37°C e 150 RPM, até que a absorbância a 600 nm, acompanhada de tempos em tempos, atingisse valores entre 0,6 e 0,8 para se começar a indução da expressão de cada proteína com IPTG (isopropil- β -D-galactopiranosídeo) – o qual é responsável por deslocar proteínas repressoras, codificadas pelo próprio vetor, de seu sítio do

operador LacO, induzindo a transcrição a partir da região promotora do gene-alvo. Após 4h de indução em shaker a 37°C e 150 RPM, as respectivas bactérias foram centrifugadas a 6000 RPM por 10 min, e os pellets congelados a -80°C, até o momento em que foram ressuspensos em 60 mL de tampão de lise (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0, 300 mM NaCl e 10 mM imidazol) contendo inibidores de protease (cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche), na proporção de 1 comprimido/10 mL, para que as bactérias fossem lisadas sob alta pressão em French Press (Thermo Scientific). O lisado foi então centrifugado a 9000 RPM por 30 min a 4°C, e o sobrenadante obtido foi incorporado, em tubo Falcon™, a 15-20 mL de uma resina de Ni-NTA-Agarose (Qiagen), previamente lavada 3x com tampão de lise para a remoção do tampão conservante, de modo que houvesse a ligação da proteína à resina durante homogeneização *overnight* em câmara fria, com o uso de agitador por inversão. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados a 2500 RPM por 5 min, e a resina, contendo a STI1 purificada, foi lavada 3x com o tampão de lavagem (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0, 300 mM NaCl e 30 mM imidazol) para a montagem da coluna sobre lã de vidro e coleta das frações, de até 1 mL, em tampão de eluição (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0, 300 mM NaCl e 0,5 M imidazol). Cada fração foi então avaliada pelo método colorimétrico de quantificação protéica de Bradford, a partir de um volume de 5 µL, para triagem do espectro de eluição da STI1, e assim definir quais seriam combinadas em duas soluções diferentes, contendo maior ou menor concentração da proteína purificada, que ficaria como reserva da solução mais concentrada, preferencialmente utilizada por minimizar problemas nos controles com o diluente em experimentos funcionais. Em seguida, cada solução foi colocada em sacos de diálise, os quais, após devidamente fechados com grampos plásticos, foram mergulhados em becker contendo 4 L de TBS 1X, mantido *overnight* sob agitação magnética na câmara fria para a extração do imidazol, o qual, usado inicialmente para competir com a ligação de STI1 à resina, pode comprometer também os ensaios funcionais com a proteína por afetar a atividade de diferentes enzimas celulares. As soluções foram então quantificadas novamente pelo

método de Bradford, para se saber a concentração exata de cada STI1, e alíquotadas para serem armazenadas em freezer -80°C. Algumas também foram reservadas para análise de pureza por *Western blot* e coloração do gel por Comassie Blue, avaliando, respectivamente, tanto a marcação específica de STI1, quanto à detecção sensível do seu perfil de degradação. Para evitar problemas com a estabilidade da STI1, as alíquotas uma vez descongeladas não foram reutilizadas em ensaios de atividade.

4.5 DOSAGEN DE LPS NAS PREPARAÇÕES DE STI1 E STI1-Δ RECOMBINANTES

A presença de endotoxinas contaminantes, derivadas da lise bacteriana durante a produção de STI1 recombinante, foi quantificada pelo ensaio colorimétrico enzimático de LAL (Lisado de Amebócitos de *Limulus*). Os amebócitos do crustáceo *Limulus polyphemus* possuem uma enzima altamente sensível à fragmentos de parede bacteriana (lipopolissacarídeos), levando a uma coagulação intra-vascular generalizada, que é fatal para esses organismos quando da infecção por gram-negativos. A reação, baseada no kit da Lonza QCL-1000™, consiste na fase inicial da resposta dos amebócitos às endotoxinas, pela conversão de uma pró-enzima específica presente no lisado em sua forma ativa, para que esta catalise então a liberação de paranitroanilina (pNA) a partir de um substrato sintético, produzindo uma coloração amarelada. Como a ativação enzimática varia proporcionalmente em relação à concentração de endotoxinas presentes na amostra, existe uma correlação linear entre esta e a absorvância de pNA (405-410nm) em um intervalo de 0,1 a 1,0 EU/mL. As amostras de STI1 e STI1-Δ precisaram, portanto, ser diluídas até que sua concentração (EU/mL) pudesse ser calculada com base nos pontos da curva de calibração da endotoxina padrão de *E. coli* (que acompanha o kit), assim como em relação a outro padrão (Sigma-Aldrich, L-6143) do qual se conhecia o conteúdo em massa por unidade de endotoxina. Para garantir a precisão dos resultados, o kit fornece, além desta endotoxina padrão, o “LAL Reagent Water” (no qual é

reconstituída com agitação vigorosa em vórtex por 15 minutos), de modo a evitar possíveis contaminações por endotoxinas de outras fontes, o qual também recomenda que se garanta o uso de materiais (tubos, pipetas) apirogênicos. Sendo assim, utilizando técnicas assépticas, o ensaio foi realizado em placa de 96 poços previamente mantida à 37°C sobre uma chapa de aquecimento, adicionando-se primeiro 50 µL dos pontos da curva padrão (0; 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 EU/mL), do LPS-Sigma (0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 EU/mL) e das diluições das amostras em triplicata. Como se tratam de reações com cinéticas definidas de ativação e catálise, respectivamente, a ordem e velocidade de pipetagem do lisado contendo a pró-enzima (50 µL) em T = 0 min, do substrato (100 µL) em T = 10 min e do reagente de parada (100 µL) em T = 16 min, foi mantida poço-a-poço, com homogeneização por pipetagem e reposição da tampa ao final de cada tempo para manter a temperatura de reação. Após se definir, pelos valores de absorbância em 410 nm, três diluições das amostras (1:50.000; 1:100.000 e 1:200.000) em que era possível calcular sua concentração, foi verificada a presença de possíveis contaminantes nessas amostras que pudessem interferir com a reação de LAL, aumentando ou diminuindo as leituras de absorbância. Utilizando como padrão interno duas concentrações da endotoxina padrão do kit (0,25 e 0,5 EU/mL), obtidas pela diluição 1:1 dos padrões com 2x as diluições das amostras que apresentaram concentrações próximas ao centro da curva padrão (1:100.000 para ST11 e 1:200.000 para ST11-Δ), onde se garante a sua linearidade, a diferença de absorbância em relação às diluições sem o padrão interno não variou mais que 25% do valor referente à concentração conhecida de endotoxina. Com base nos valores corrigidos pela curva padrão para o LPS-Sigma, em EU/mL, foram calculadas as concentrações de LPS, em µg/mL, nas preparações de ST11 e ST11-Δ.

4.6 DEPLEÇÃO DE ST11 DO MEIO CONDICIONADO DE GL261

A ST11 secretada pelas células GL261 carenciadas em cultura foi capturada por anticorpos anti-ST11, previamente biotinizados para ligação ao

revestimento de estreptavidina de *beads* magnéticas, segundo protocolo adaptado do kit Dynabeads[®] FlowComp[™] Flexi, part A (Invitrogen[™], Cat. no. 11061D). Embora seja indicado para o isolamento de células de sangue total ou da camada leucocitária, por meio do método indireto de marcação das células pelo anticorpo biotinilado, seguida da sua recuperação pelas *beads*, os reagentes do kit de biotinição de anticorpos (DSB-X[™] Biotin Protein Labeling Kit – Molecular Probes, D-20655), que acompanha as Dynabeads, foram otimizados para aqueles que são IgG purificados, como o anti-STI1 utilizado para este fim. O éster succinimidil do ligante biotina DSB-X (derivado de um precursor estável da biotina), fornecido por este kit, foi desenhado para aumentar ainda mais a sua capacidade de ligação à estreptavidina das *beads*. Considerando ainda que a ligação dos anticorpos de captura aos receptores na superfície celular está condicionada a porções restritas de determinados epítopos, além do fato de que o isolamento de células inteiras demanda uma alta eficiência desta ligação, o método utilizando ambos os kits daria robustez suficiente para a depleção completa de STI1 do meio condicionado de GL261, célula altamente secretora desta proteína, e ainda permitiria a sua purificação para estudos funcionais. O anti-STI1 IgG purificado a partir do soro em tampão fosfato de sódio, sem a presença de proteínas contaminantes, pôde ser diretamente submetido à biotinição pelo protocolo em microescala do kit, para anticorpos de concentração 0,5-3 mg/mL. Em um tubo de reação com agitador magnético, adicionou-se 200 µL de anti-STI1 (2,2 mg/mL) e 20 µL de bicarbonato de sódio 1M preparado a fresco. Utilizando como referência valores tabelados da proporção de biotina DSB-X (preparada por reconstituição em 40 µL de DMSO apenas antes do uso) necessária para satisfazer as condições de reação pré-estabelecidas, que resultariam em 3-8 moléculas de biotina por molécula de anticorpo, adicionou-se, sob agitação, 5 µL de biotina da solução estoque. A reação foi mantida com agitação contínua por 1,5h à temperatura ambiente. Enquanto isso, preparou-se a resina de purificação em coluna para eluição por centrifugação, de modo a purificar os anticorpos biotinilados com eficiência, a partir de pequenos volumes dos reagentes

iniciais. A suspensão, previamente homogeneizada, foi adicionada à coluna até atingir o empacotamento de 1,5 mL com drenagem, por gravidade seguido de leve pressão por êmbolo, da solução em que se encontrava. Centrifugou-se a coluna empacotada e acoplada ao tubo coletor por 3 min a 1100 xg utilizando um rotor *swing-out*. O volume de reação foi então adicionado ao centro da coluna e, após sua absorção pela resina, a coluna foi novamente centrifugada por 5 minutos a 1100 xg trocando-se o tubo coletor. Enquanto a biotina livre é retida pela coluna, juntamente com os anticorpos que não reagiram, o eluato de aproximadamente 200 µL continha apenas os anticorpos biotinilados em PBS pH 7,2 com 2 mM de azida sódica. Como a eficiência de biotilação varia de 80 a 90%, a concentração aproximada dos anticorpos biotinilados obtidos pôde ser considerada o quociente de 85% da quantidade inicial, em miligramas, de anticorpo adicionado à reação pelo volume final de eluato.

A concentração de anticorpos a ser usada na captura das moléculas de proteína secretadas é um dos fatores limitantes para se obter bons resultados de depleção. Por isso, levando-se em conta dados de outros experimentos, em que se observou que 1×10^6 células secretam cerca de 5 µg de STI1 em 4 mL de meio, das 374 mg de anticorpo biotinilado obtidas segundo o cálculo anterior, metade disso, ligada às Dynabeads em um tubo FalconTM contendo 45 mL de meio condicionado, teria um excesso de anticorpos cerca de 3 vezes a quantidade de proteína secretada. Sendo assim, seguindo a recomendação do kit de usar 10 µg de anticorpo biotinilado para revestir 1 mg de Dynabeads (estoque de 3 mL a 15 mg/mL), essas foram ressuspendidas e divididas em 2 tubos FalconTM de 50 mL para duas lavagens de 5 min com 10 mL de PBS pH 7,4 em agitador tipo gangorra. Apesar de as Dynabeads serem magnéticas, o volume utilizado não foi compatível com o uso do magneto para concentrá-las, de modo que as lavagens foram feitas por centrifugação a 3000 RPM por 1 min para que as essas fossem peletadas. Cada tubo contendo as Dynabeads recebeu então cerca de 187 µg de anti-STI1 biotinilada, e foi incubado por 30 min a temperatura ambiente sob agitação. As *beads* foram novamente lavadas 5

vezes em PBS e ressuspendidas em 40 mL de meio condicionado de GL261. Incubou-se os tubos a 4°C por 15 min, sob agitação constante, para captura da STI1 pelas *beads*, que foram novamente lavadas 3 vezes em PBS. Com a finalidade de recuperar a STI1 isolada de volta na sua forma livre original em solução, pode-se utilizar tanto soluções de alta força iônica (com altas concentrações de eletrólitos), quanto soluções de pH baixo ou alto, que são capazes de romper as ligações STI1-anticorpo. Tendo em vista que a diálise para remoção do excesso de sal pode comprometer a estabilidade e o rendimento do processo, foi utilizada solução de glicina 0,15 M pH 3,0 (200 µL/tubo) por 2 min com agitação intermitente, seguida de neutralização por 20 µL de Tris 1M pH 7,5. Após centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e precipitado por TCA, conforme descrito adiante, para análise por Western blot.

4.7 ISOLAMENTO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS MICROVASCULARES DE CÉREBRO DE CAMUNDONGO (MBMEC)

Culturas de células primárias constituem, em geral, um meio mais fidedigno de reproduzir *in vitro* as condições e características encontradas *in vivo* em relação às linhagens celulares. As MBMECs isoladas em cultura são capazes de formar monocamadas altamente justapostas, que são mantidas por proteínas de junção intercelular e inibição do crescimento por contato. Esta mesma configuração pode ser encontrada compondo a barreira hematoencefálica, na qual as células endoteliais exercem suas funções de controle transcelular do transporte de moléculas, e paracelular do tráfego de fluidos e células dos vasos sanguíneos para o parênquima cerebral, garantindo condições fisiológicas para o funcionamento do sistema nervoso central. Considerando a alta afinidade das células endoteliais por fibronectina, proteína adesiva da matriz extracelular, o protocolo descrito por Ruck et al. 2014, recomenda o revestimento prévio, *overnight* a 4°C, dos poços de uma placa de 24 poços com uma solução de 160 µg/mL de colágeno IV e 10 µg/mL de fibronectina. Em função do baixo rendimento de

MBMECs isoladas por cérebro, foram utilizadas cinco fêmeas de C57BL/6J de 12 semanas, da mesma geração, de modo a evitar variações nas propriedades biológicas que comprometessem a obtenção de culturas homogêneas. Após eutanásia por deslocamento cervical, os cérebros foram coletados em 5 mL de PBS estéril e transferidos para placa de petri para remoção, com pinça, do tronco cerebral, cerebelo e tálamo. As meninges foram cuidadosamente descoladas por rolamento da porção resultante dos cérebros (prosencéfalo) sobre membrana de nitrocelulose (de uso para Western blot), e estes transferidos para tubo FalconTM de 50 mL contendo 13,5 mL de DMEM. Os tecidos foram dissociados primeiro com uma pipeta de 25 mL e depois com uma de 10 mL, até que o meio se tornasse leitoso, sendo então digeridos com uma mistura de 0,6 mL de colagenase CLS2 (Worthington, LS004176) 10 mg/mL em DMEM e 0,2 mL de DNase I (Sigma-Aldrich, DN25) 1 mg/mL em PBS, por 1h a 37°C em um agitador orbital a 180 RPM. Para interromper a reação, adicionou-se 10 mL de DMEM à suspensão de tecido, e centrifugou-se as células a 1000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em BSA-DMEM 20% m/v, para remoção de mielina, e homogeneizado 25 vezes com pipeta de 25 mL. A suspensão foi novamente centrifugada a 1000 x g por 20 minutos a 4°C. Forma-se então uma camada espessa e densa de mielina cobrindo o sobrenadante, que foi primeiro descartada utilizando uma pipeta Pasteur de ponta larga, para depois se descartar a fase contendo BSA. Em nova etapa de digestão, o pellet foi ressuspendido em 9 mL de DMEM, e à suspensão foram adicionados 1 mL de colagenase/dispase (Roche, 10 269 638 001), na concentração final de 1 mg/mL, e 0,1 mL da solução de DNase para incubação por 1h a 37°C em agitador orbital a 180 RPM. Enquanto isso, preparou-se o gradiente de densidade de Percoll (Pharmacia, 17089101) misturando 19 mL de PBS 1x, 1 mL de PBS 10x, 1 mL de soro fetal bovino e 10 mL de Percoll, solução que foi esterilizada por filtração em tubo FalconTM de 50 mL e centrifugada a 3000 x g por 1h a 4°C, no programa de aceleração com o freio da centrífuga desativado. Ao conteúdo digerido do tubo, adicionou-se mais 10 mL de DMEM e a suspensão foi

centrifugada novamente a 1000 x g por 10 minutos a 4°C. O pellet foi ressuspenso em 2 mL de DMEM e cuidadosamente pipetado sobre o gradiente de Percoll, pelas bordas do tubo, que foi centrifugado a 700 x g por 10 minutos a 4°C sem aceleração e freio desativado. As células podem ser vistas então como uma interfase turva no gradiente de Percoll. Cerca de 12 mL dessa interfase foram aspirados com uma seringa de 0,8 x 30 mm (21G) e transferidos para um novo tubo Falcon™ de 50 mL contendo 5 mL de DMEM. As células isoladas foram centrifugadas uma última vez a 1000 x g por 10 minutos a 4°C, e ressuspenso em 1,5 mL de meio DMEM suplementado com 20% de Plasma Derivado de Soro (First Link UK Ltd., 60-00-850), 5 µg/mL de bFGF, 0,1% de heparina e 2 mg/mL de puromicina (a ser adicionada apenas nos 2 primeiros dias de cultura). Este volume foi dividido em 3 poços da placa previamente tratada com colágeno/fibronectina e posteriormente lavada com PBS duas vezes. A cultura foi mantida em estufa a 37°C/5% CO₂ e o meio trocado a cada 2 dias, até que as células atingissem 90% de confluência, para que fossem tripsinizadas com tripsina 0,05% e expandidas para os ensaios funcionais.

Pelo gradiente de Percoll é possível selecionar a população de células endoteliais, mas outras células contaminantes ainda permanecem em cultura, as quais podem ser eliminadas pelo efeito citotóxico da puromicina. As MBMECs são mais resistentes a esse tratamento por expressarem altos níveis de uma diversidade de bombas de efluxo, o que tem relação com sua propriedade de regular a passagem de quimioterápicos e antibióticos pela barreira hematoencefálica no organismo vivo. Desta forma, enquanto as MBMECs aderem rapidamente à placa, pela sua alta afinidade com as proteínas de matriz do revestimento, as células contaminantes morrem por apoptose ou necrose, induzidas pela puromicina nos dois dias seguintes ao isolamento (depois disso passa a ser tóxica também para as MBMECs), levando a uma pureza de até 99% das culturas.

4.8 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE TUBOS ENDOTELIAIS EM MATRIGEL – ANGIOGÊNESE *IN VITRO*

A diferenciação da linhagem de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) para se organizar em estruturas pseudo-capilares foi avaliada na presença de um extrato de matriz da membrana basal do endotélio, disponível comercialmente em três variantes dependendo de seu conteúdo em proteínas ou fatores de crescimento: Matrigel[®] HC (Corning[®] Cat.No. 354248) Matrigel[®] *Standard* (Corning[®] Cat.No. 354234) e Matrigel[®] GFR (Corning[®] Cat.No. 354230), conforme descrito anteriormente (ARNAOUTOVA e KLEINMAN 2010). Após o descongelamento *overnight* a 4°C, o frasco contendo Matrigel[®] foi mantido em gelo em função da sua polimerização a temperatura ambiente. Uma camada de 50 µL foi então aplicada em cada poço de uma placa de 96 poços, também mantida sobre gelo, a qual foi centrifugada a 300 x *g* e 4°C por 10 minutos para remoção das bolhas que podem ficar aprisionadas na matriz durante a pipetagem. A placa foi então incubada à 37°C em estufa de cultura de células, por 30 min, para a gelificação da matriz. O efeito angiogênico da ST11, assim como da proteína mutante para deleção do sítio de ligação a PrP^C (aminoácidos 230-245) ST11-Δ, foi avaliado, em relação a dose, tanto pela incorporação das proteínas na matriz, assim como pelo tratamento da suspensão de células HUVEC, que foram plaqueadas sobre a matriz gelificada na densidade de 1,0 a 1,5 x 10⁴ células/poço, em meio DMEM ou EBM-2. Como controle positivo foi utilizado soro fetal bovino (SFB 1-2%). Com 12 horas de incubação em estufa à 37°C / 5% CO₂, a formação de tubos foi observada ao microscópio em contraste de fase, no aumento de 40x, e as imagens de 5 campos aleatórios por poço foram obtidas. A quantificação em número e das extensões dos elementos de vaso (segmentos e junções), além das áreas formadas pela disposição dos tubos/cordões de HUVEC em rede (*meshes*) foi realizada pelo mapeamento das imagens utilizando o plugin *Angiogenesis Analyzer*, desenvolvido para o software *ImageJ* (CARPENTIER 2012), sendo

considerados os valores médios de todos os campos das triplicatas de cada experimento.

4.9 ENSAIO DE ANGIOGÊNESE 3D SOBRE BEADS EM GEL DE FIBRINA

HUVECs previamente mantidas em meio EGM-2 foram tripsinizadas, usando tripsina 0,05%, e combinadas com *beads* microcarreadoras (Cytodex™ 3, GE Healthcare) na proporção de 1×10^6 células / 2500 *beads* em EGM-2 (sem o suplemento de VEGF), adicionando-se volumes de 1,5 mL da suspensão em tubos de citometria com tampa. Após incubação de 3h em estufa a 37°C/5% CO₂, agitando a cada 20 minutos, as *beads* revestidas com HUVECs (com aspecto similar a bolas de golfe) foram transferidas para uma garrafa de 25cm² contendo 5 mL de EGM-2 e novamente incubadas *overnight* em estufa. A suspensão da garrafa foi então transferida para um tubo Falcon™ de 15 mL para que as *beads* sedimentassem e fossem ressuspensas em 1 mL de EGM-2 sem VEGF, e novamente transferidas para um tubo eppendorf de 1,5 mL. As *beads* foram lavadas 3 vezes neste meio com auxílio de uma P1000, sendo que, na última lavagem, alíquotas de 10 µL foram retiradas e pipetadas sobre uma lamínula para contagem. Cerca de 500 *beads*/mL foram ressuspensas em uma solução de fibrinogênio (Sigma-Aldrich, F8630) 2 mg/mL contendo 0,15 U/mL de aprotinina (Sigma-Aldrich, A1153). Para a formação do gel de fibrina, 0,3125 U de trombina (Sigma-Aldrich, T4648) foi adicionada em cada poço de uma placa de 24 poços, e homogeneizada de 4-5 vezes com 0,5 mL da suspensão de fibrinogênio/*beads*, evitando-se a formação de bolhas durante a pipetagem. Para que as *beads* não ficassem concentradas no centro de cada poço, realizou-se a homogeneização movendo, ao mesmo tempo, a ponteira em círculos concêntricos para garantir a distribuição uniforme das *beads* dentro do poço. As placas foram mantidas no mesmo lugar por pelo menos 5 minutos à temperatura ambiente para a coagulação do gel, e só então transferidas para a estufa a 37°C/5% por mais 15 minutos para se concluir o

processo, evitando assim qualquer perturbação que pudesse levar a quebras do gel e a consequentes falhas na formação dos microvasos. Adicionou-se 1,0 mL de EGM-2 sem VEGF (exceto no controle positivo) contendo diferentes concentrações de STI1 sobre cada poço por gotejamento, e 20.000 células/poço de fibroblastos primários de pulmão. O meio foi trocado a cada 2 dias, sendo possível observar os primeiros microvasos exibindo lúmen e ramificações a partir do dia 5, e até anastomoses após o dia 8, com o acompanhamento por microscopia de campo claro (NAKATSU e HUGHES 2008).

4.10 MODELO TRIDIMENSIONAL IN VITRO DE TUMORES PREVASCULARIZADOS (PVT)

Co-culturas em esferóides multicelulares são consideradas um passo a frente na direção do campo em ascendência da engenharia de tumores, pelo fato de reconstruir, em uma configuração 3D, as características estruturais, químicas, funcionais e de sinalização intercelular dentro do microambiente tumoral. O modelo PVT reproduz, ainda que parcialmente, a heterogeneidade celular em que os tumores estão imersos no organismo, avaliando como a interação direta de células normais (células endoteliais e fibroblastos) com o tumor pode influenciar a sua progressão. Em linhas gerais, o método desenvolvido por Ehsan et al. (2014) é uma adaptação do ensaio de angiogênese em gel de fibrina, (Seção 4.9), de modo que os esferóides formados pela combinação de GL261 e HUVECs são incorporados em uma matriz de fibrina contendo uma suspensão de fibroblastos. Da mesma forma que se observa com as *beads*, as HUVECs, inicialmente concentradas ao redor dos esferóides, são capazes de formar microvasos com lúmen, que se ramificam e se estendem por toda matriz, ao mesmo tempo em que passam a infiltrar os esferóides, recriando *in vitro* uma rede vascular intratumoral. Como o gel de fibrina mimetiza também o microambiente dos glioblastomas, o modelo PVT foi empregado para

explorar a possibilidade de avaliar mecanismos relacionados à invasão perivascular, condição básica para o desenvolvimento desse tipo de tumor. Os esferoides foram preparados em uma placa de 96 poços de fundo redondo de baixa aderência (Nunc™ 268200) pelo plaqueamento de 1000 células/poço, as quais foram previamente ressuspensas em 150 µL de EGM-2 contendo 15% de methocel, uma solução de alta densidade composta por 8% de metilcelulose (Sigma-Aldrich, M6385) em meio DMEM. O methocel faz com que todas as células se agreguem no fundo de cada poço, formando uma única esfera após incubação *overnight* a 37°C. Para as co-culturas, as HUVECs foram combinadas com as células GL261 na proporção de 3:1, enquanto esferoides contendo apenas HUVECs foram usados como controle. Os fibroblastos foram tripsinizados com tripsina 0,05% e ressuspensos em fibrinogênio (Sigma-Aldrich, F8630) 2,5 mg/mL em PBS a 1×10^6 células/mL. Desta suspensão, alíquotas de 50 µL foram utilizadas para ressuspender conjuntos de 5 esferóides, separados em tubos eppendorf de 1,5 mL. O conteúdo de cada tubo foi homogeneizado com 2,5 µL de soro fetal bovino, evitando-se formar bolhas, e adicionado aos poços de uma placa de 96 poços de fundo chato contendo 1 µL de trombina (Sigma-Aldrich, T4648) 50 U/mL. Homogeneizou-se novamente, mantendo a ponteira na posição vertical, e com cuidado para não desfazer os esferoides, de modo que esses ficassem bem distribuídos dentro dos poços. A placa foi mantida no mesmo lugar por 5 minutos, à temperatura ambiente, para que o gel se formasse homogeneamente dentro dos poços, sendo então incubada em estufa a 37°C por 30 minutos para que se completasse a sua polimerização. Sobre cada plugue de PVTs adicionou-se 200 µL de EGM-2 pelas bordas do poço, e incubou-se a placa novamente a 37°C/5%CO₂ por 12 dias, trocando-se o meio a cada 2 dias. Os microvasos bem estruturados, assim como evidências da migração de GL261, puderam ser observados por microscópio de campo claro e de fluorescência, respectivamente, a partir do quarto dia em cultura.

4.11 ENSAIO DE ANEL AÓRTICO

Camundongos C57BL/6J neonatos de 5 dias foram eutanasiados em câmara de CO₂ para retirada da artéria aorta, a qual foi mantida em Opti-MEM + 1% Gentamicina em gelo até o momento do corte dos anéis. Com auxílio de lupa estereoscópica, a camada de gordura que envolve a artéria, assim como suas ramificações em vasos menores foram removidos com uso de pinça relojoeiro e tesoura cirúrgica oftálmica. Para garantir a formação de vasos a partir da aorta durante o experimento, o sangue remanescente em seu interior foi cuidadosamente ejetado da artéria pela injeção, com seringa de insulina, de cerca de 0,5 mL de Opti-MEM por uma de suas extremidades. Secções de 0,5 mm cada foram obtidas através de cortes da artéria com bisturi sobre régua cirúrgica e auxílio de uma lupa estereoscópica, e os anéis carenciados *overnight* à 37°C/5% CO₂ em Opti-MEM + 1% Gentamicina. No dia do experimento, os anéis foram incorporados em uma solução de colágeno 1 mg/mL, preparada em gelo pela diluição da solução de estoque em água destilada estéril e meio DMEM High Glucose 5X suplementado com 1 mM de piruvato de sódio, seguido do ajuste de pH pela adição de aproximadamente 2 µL de NaOH 5N por cada mL da solução de trabalho, ou até que o indicador vermelho de fenol presente no meio passasse de amarelo (ácido em função do estoque de colágeno) para rosa (ligeiramente básico). Em uma placa de 96 poços, adicionou-se 50 µL/poço desta solução, alguns poços por vez, na medida em que os anéis são transferidos com pinça, individualmente, da placa de carenciamento para cada poço, antes que a matriz comece a polimerizar a temperatura ambiente. Após distribuir todos os anéis nos poços, a placa foi mantida em repouso por 10-15 min e então incubada a 37°C/5% CO₂ por 1h para completa polimerização da matriz. Para o tratamento dos anéis, adicionou-se 150 µL/poço de Opti-MEM + 1% Gentamicina suplementado com 2,5% de soro fetal bovino (SFB) e, por último, além dos controles positivos SFB, na concentração total de 10%, e VEGF 30 ng/mL, as diferentes concentrações da curva de STI1 recombinante ou LPS (Sigma-

Aldrich, L6143), ambos diluídos em PBS. As placas foram então incubadas a 37°C/5% CO₂ por 3 a 4 dias, quando as primeiras ramificações de vasos começam a aparecer e o meio será trocado pela remoção de 130 µL e posterior adição de 150 µL/poço de meio fresco sem adição dos fatores. A partir do primeiro dia de troca do meio também, imagens em contraste de fase foram obtidas para acompanhamento e quantificação dos microvasos, a qual, por sua vez, pode ser feita manualmente, pela média da contagem, em aumento de 40x, do número de ramificações por anel, ou com o uso de softwares para o mapeamento automatizado dessas estruturas, que precisam, porém, ser previamente marcadas por imunofluorescência (BAKER et al. 2012).

Imunofluorescência dos anéis aórticos: Os poços foram lavados duas vezes com 100 µL de PBS e os anéis fixados em 100 µL de paraformaldeído (PFA) 4% por 30 minutos a temperatura ambiente. Os anéis foram então permeabilizados com 100 µL de PBS + 0,25% (v/v) de Triton X-100 por duas incubações de 15 min a temperatura ambiente, seguido do bloqueio com 01 gota de *Protein Block, serum free* (DAKO, cód. X0909) por poço e incubação a 37°C por 30 min. Para marcação dos microvasos, utilizou-se a isolectina IB4 conjugada ao fluoróforo Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen™, I21411) diluída 1:100 em PBLEC (PBS + MnCl₂ 1 M + 1% Tween-20), adicionando-se 50 µL/poço e incubando a placa *overnight* a temperatura ambiente e protegida da luz. Os poços foram então lavados 3x de 15 min com PBS + 0,1% (v/v) de Triton X-100 e uma última lavagem com água destilada (BAKER et al. 2012).

4.12 CULTURAS PRIMÁRIAS DE ASTRÓCITOS

Fêmeas de camundongo C57BL/6J prenhas de 17 dias pós-coito foram eutanasiadas, por deslocamento cervical, para que seus embriões (8-10) fossem retirados e também eutanasiados por hipotermia, o que foi obtido mantendo-se os embriões em gelo, sobre uma placa de cultura, até que fossem processados para o isolamento dos astrócitos. Os cérebros foram

extraídos com auxílio de lupa estereoscópica e duas pinças de ponta fina, também usadas na remoção das meninges, para serem fragmentados com bisturi e divididos em 3 tubos de 15 mL contendo 7 mL de DMEM. A massa de tecido resultante foi submetida à dissociação enzimática com tripsina 0,25% por 20 min, a 37° C, sob agitação de 800 RPM em Thermomixer (Eppendorf®). Após centrifugação a 2000 RPM por 2 minutos, o pellet foi lavado com HBSS (Gibco™, 14170), centrifugado novamente e ressuspendido em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Fragmentos de tecido remanescentes foram dissociados hidromecanicamente com auxílio de uma micropipeta P1000, e a suspensão de células foi dividida em 2 placas de 100 mm para cultivo em estufa a 37°C/5%CO₂. Os astrócitos aderiram às placas e atingiram confluência em até 1 semana, com trocas de meio a cada 2 dias, sendo então repicados e utilizados nas co-culturas organotípicas (ARANTES et al. 2009).

4.13 CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE CÉREBRO DE CAMUNDONGO E CO-CULTURAS COM GL261

Animais C57BL/6J neonatos de 5-7 dias foram eutanasiados por decapitação para remoção do cérebro, que foi mantido em gelo, no meio DMEM-F12 + 6 µg/mL de gentamicina, até o momento da realização dos cortes e implantação das células, de acordo com o modelo VOGIM (*Vascular Organotypic Glioma Impact Model*) desenvolvido por Ghoochani et al. (2016). Em cabine de fluxo laminar, os cérebros foram dissecados pela remoção dos bulbos olfatórios e do cerebelo, com auxílio de uma navalha de aço estéril. Fatias (*slices*) de 300 µm no plano sagital foram obtidas utilizando um vibrátomo vertical (McIlwain tissue chopper, Vibratome®). Com o auxílio de lupa estereoscópica, as fatias cortadas foram separadas, utilizando-se pinças cirúrgicas, em placa de Petri contendo DMEM-F12 + 6 µg/mL de gentamicina, sendo essas depois transferidas, com o uso de pipeta Pasteur plástica (com a ponta cortada, ampliando o seu diâmetro, para não danificar as fatias ao serem aspiradas junto com o meio de cultura),

para insertos de membrana de policarbonato com poros de 3,0 μm (Corning[®], cód. #3414), colocadas sobre poços de uma placa de 6 poços contendo 1 mL de meio MEM-HBSS (2:1) suplementado com 25% de soro de cavalo 2% de glutamina 2,64 mg/mL de glicose, 1:100 de N-2 Supplement e 6 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina. Desta forma, as fatias, posteriormente incubadas a 37°C/5% CO_2 , podem se manter viáveis absorvendo os nutrientes do meio por capilaridade, enquanto o oxigênio do ar continua disponível para suas células. No dia seguinte à obtenção das fatias, foi realizado o implante das células GL261-RFP ou astrócitos (controle negativo), previamente marcados, por 30 min em DMEM, com CellTracker[™] CM-Dil Dye (Invitrogen[™], C7001) 2 μM , e iniciado o acompanhamento da viabilidade celular por marcação com iodeto de propídeo, PI (Sigma-Aldrich, P4170). As células foram tripsinizadas e ressuspensas em PBS na densidade de 30.000 células/0,2 μL , volume que foi aspirado e mantido na ponteira por 2 min para que as células sedimentassem e o micro pellet formado fosse, cuidadosamente, depositado na superfície de cada fatia, em algum ponto da interface entre o hipocampo e o córtex cerebral. Uma vez na superfície, as células são absorvidas pela fatia em alguns minutos, formando um bolsão de células concentradas logo abaixo do ponto de aplicação. Como as GL261-RFP expressam a proteína fluorescente vermelha (RFP), e os marcadores Dil e PI também emitem fluorescência na mesma faixa do espectro, o ensaio de viabilidade com PI não poderia ser realizado nas fatias em que as células fossem implantadas. Deste modo, foram escolhidas, para cada dois dias de experimento, duas fatias somente para a realização do ensaio de viabilidade, sendo uma delas usada como controle positivo (incubação por 2 min com metanol). Ambas as fatias foram incubadas com PI 7,5 μM por 1 hora a 37°C, e com as leituras de fluorescência foi possível determinar a cinética de regressão do número de células viáveis. Em geral, o sinal de PI, detectado por microscópio de epifluorescência, aumentou ligeiramente com o tempo em relação à marcação basal observada no início. Os experimentos em que as fatias de teste apresentaram perda considerável da viabilidade, se aproximando da proporção de células mortas nos

controles positivos, durante qualquer momento da cultura, mesmo após a injeção das células, foram desconsiderados. A formação dos tumores foi acompanhada por um período de 8 dias, até que as fatias foram então fixadas e a sua vasculatura revelada por imunofluorescência com marcadores de endotélio (CD31) e de lâmina basal (laminina).

Análise por Imunofluorescência da Angiogênese Peritumoral em Fatias de Cérebro: Para fixação das fatias, o meio foi removido das placas e em seguida adicionou-se paraformaldeído (PFA) 4% em volume suficiente para cobrir as fatias mantidas ainda nos insertos. Após 1h de incubação à temperatura ambiente, as membranas do inserto contendo as fatias aderidas são recortadas e transferidas para os poços correspondentes da placa. As fatias foram lavadas e permeabilizadas em PBS + 0,5% (v/v) de Triton X-100 por 3x de 15min sob agitação suave, seguido do bloqueio com solução de soro de cavalo 3% em PBS + 0,2% (v/v) de Triton X-100 à temperatura ambiente por 1h sob agitação suave. Os anticorpos primários anti-mCD31 (ReD, cód. AF3628) ou anti-laminina (produzido em coelho) foram diluídos 1:100 em PBS + 0,2% (v/v) de Triton X-100 + soro de cavalo 3%, e adicionados às fatias (1,5 mL/poço), que foram incubadas por 48h a 4°C sob agitação suave. Após nova etapa de lavagem em PBS + 0,2% (v/v) de Triton X-100 por 3x de 20 min, adicionaram-se os anticorpos secundários anti-goat conjugado a Alexa Fluor® 488 (Invitrogen™, cód. A-21467) e anti-rabbit conjugado a Alexa Fluor® 488 (Invitrogen™, cód. A-21206), respectivamente, diluídos 1:800 na mesma solução dos primários, e as fatias foram novamente incubadas por 1h à temperatura ambiente sob agitação suave, seguido de mais 3 lavagens de 20 min cada e troca da solução por PBS + 0,02% azida sódica, quando necessário armazenar as fatias em geladeira. A quantificação foi baseada em séries Z de toda a fatia nos aumentos de 200X e 400X, combinando tanto a fluorescência do tumor (vermelha) quanto dos vasos (verde), para a identificação da zona peritumoral imediatamente ao redor da massa tumoral. Pela análise automatizada do plugin *Angiogenesis Analyzer* do *ImageJ*, a densidade vascular nestas regiões pôde ser estimada em função de parâmetros como número e extensão dos vasos, e relativizada

pelo tipo de célula implantada (astrócitos x GL261) (GHOOCHANI et al. 2016).

4.14 ISOLAMENTO DE EXOSSOMOS DO MEIO CONDICIONADO DE GL261 PARA ANÁLISE DA SECREÇÃO DE STI1

Partindo de 3 garrafas de 175 cm² com confluência de 60-70%, as células foram carenciadas em 20 mL/garrafa de meio DMEM por 48h, o qual foi então coletado em tubos FalconTM de 50 mL mantidos em gelo. A centrifugação diferencial é considerada o padrão-ouro para o isolamento de exossomos, e consiste em incrementos na velocidade de centrifugação de modo à peletar, sequencialmente, componentes indesejados e mais pesados do meio condicionado, a fim de obter uma fração enriquecida em exossomos (FONTANA et al. 2017). Inicialmente, com a centrífuga sempre a 4°C, o meio foi centrifugado a 300 x g por 10 min, para remover células vivas intactas, que porventura tenham se soltado no meio; depois a 2000 x g por 10 min, eliminando células mortas e corpos apoptóticos; e a 10.000 x g por 30 min, velocidade que concentra debris de células e microvesículas – vesículas em geral maiores (50-1000 nm) derivadas de projeções da membrana plasmática, diferentes dos exossomos, que são vesículas menores (40-100 nm) derivadas da via endocítica. O meio contendo os exossomos isolados foi então ultracentrifugado a 100.000 x g por 2 horas, sendo realizada a lavagem do pellet em DPBS (Gibco®, 14190-144), que é um tampão livre de materiais particulados, por mais 2 horas na mesma velocidade. O pellet final foi ressuspensionado em 20 µL de DPBS e diluído 1:1000, nesse mesmo tampão, para análise da concentração e do perfil de variação de tamanho dos exossomos pelo rastreamento de nanopartículas (NTA), que é realizado pelo equipamento NanoSight LM10 (NanoSight Ltd., Amesbury, Reino Unido). O princípio do NTA se baseia na focalização de um feixe de laser sobre as partículas em suspensão, as quais, ao dispersarem a luz incidida, podem ser detectadas pela objetiva de 20X de um microscópio acoplado a uma câmera. Com isso, o software do NanoSight pode então determinar o

número de partículas, assim como rastrear seu movimento browniano para calcular, juntamente com dados de temperatura e viscosidade do líquido, a distribuição de tamanho das partículas em suspensão (GARDINER et al. 2013). O volume restante foi adicionado de 10 µL de tampão de amostra 4X (SDS 8%, Glicerol 40%, Tris-HCl pH 6,8 240 mM, β-mercaptoetanol 40%, EDTA 5 mM e azul de bromofenol 0,08%), fervido a 95°C por 5 min e analisado por Western blot para avaliação do nível de secreção de STI1 associada a exossomos, conforme descrito na próxima seção.

4.15 ANÁLISE POR WESTERN BLOT DA EXPRESSÃO E SECREÇÃO DE STI1 E DA RESPOSTA CELULAR À HIPÓXIA

Para fins de comparação entre as linhagens celulares LN18 (glioma humano), GL261 (glioma murino) e HUVEC (célula endotelial humana), que foram mantidas em meio DMEM Low suplementado com gamicina e 10% de soro fetal bovino (SFB), a expressão do fator de transcrição HIF-1α (*Hypoxia Inducible Factor*) foi validada em condições de normóxia vs. hipóxia, além de outros marcadores de hipóxia, em conjunto com a determinação do perfil concomitante de secreção de STI1 no meio condicionado. As células foram então plaqueadas em placas de 60 mm e, ao atingirem confluência de 70-80%, foram carenciadas com DMEM Low sem SFB por mais 48h. Decorrido este tempo o meio foi novamente trocado, e as placas transferidas para uma câmara de hipóxia modular (Billups-Rothenberg, Inc., CA) onde foram incubadas à 37°C por períodos intermitentes ou constantes de exposição à hipóxia, em paralelo ao tratamento com o agente estabilizador de HIF-1α, CoCl₂ 400 µM (controle positivo). A tensão de O₂ dentro da câmara foi mantida em torno de 1% (condição que caracteriza hipóxia) pela injeção simultânea de nitrogênio (19 L/min) e dióxido de carbono (1 L/min) e controle dos níveis de O₂ pelo sensor de gás único Dräger Pac[®] 3500, constituindo uma atmosfera estável de 94% N₂ / 5% CO₂ / 1% O₂, que se manteve após o fechamento da câmara, e rápida reabertura posterior, 90 min depois, para aliviar a pressão

causada pela expansão dos gases durante a incubação na estufa. **Secreção de STI1:** Em cada intervalo de exposição à hipóxia, o meio condicionado foi coletado em gelo e submetido a uma bateria de centrifugações iniciais para remoção de debris celulares (300 x g, 10 min > 2000 x g, 10 min > 10.000 x g, 30 min) antes de ser concentrado em filtros para centrífuga Amicon® Ultra-4 10K a 6000 x g, por 15 min, a 4°C. Após a concentração, os meios foram precipitados com 15% de ácido tricloroacético (TCA) e incubados *overnight* a 4°C, sendo então centrifugados a 14.000 RPM por 30 min, seguido da lavagem dos pellets com acetona em gelo e nova centrifugação por mais 15 min. Os pellets foram então deixados para secar a temperatura ambiente e depois ressuspensos em solução 2:10 de tampão TRIS-Base 1M em tampão de Uréia 0,6 M (contendo Tris 5 mM e SDS 0,1%), com adição posterior do tampão de amostra 1:1 e incubação à 95°C por 5 min para análise por Western blot. **Extração de Proteínas Celulares Totais e Nucleares:** Logo em seguida à separação do meio condicionado, as células foram rapidamente coletadas em PBS, com as placas sempre mantidas em gelo, e centrifugadas a 1000 x g por 10 min a 4°C. Os pellets foram ressuspensos novamente em PBS, sendo 40% deste volume transferido para outro tubo em que seria obtido o extrato total. Com a segunda lavagem a 1000 x g por 10 min, o pellet do segundo tubo foi ressuspendido em tampão de lise (RIPA) contendo inibidores de protease e fosfatase, enquanto o restante foi utilizado para a extração de proteínas nucleares, conforme protocolo validado pela Novus Biologicals para HIF-1 α (5). Primeiramente, o pellet da segunda lavagem foi lentamente ressuspendido com 500 μ L de tampão hipotônico e incubado em gelo por 15 min, quando foram adicionados 25 μ L de NP-40 10% a cada tubo, o qual foi agitado em vórtex por cerca de 10s na velocidade máxima e centrifugado, em seguida, a 1200 x g por 10 min, a 4°C. O sobrenadante, contendo a fração citoplasmática, foi reservado e congelado à -20°C, enquanto o pellet, que correspondia à fração nuclear, foi ressuspendido no tampão de extração celular recomendado, e incubado por 30 min em gelo, com agitação manual a cada 10 min. Ao final da extração, os tubos contendo o extrato total e nuclear

foram centrifugados a 14.000 RPM, por 30 min a 4°C e transferidos para tubos novos, onde foram armazenados em freezer -20°C. **Western blot:** As amostras de extrato total foram inicialmente quantificadas para proteínas pelo método de Bradford (extratos totais) e BCA (extratos nucleares e proteínas secretadas) e, assim como os extratos nucleares e de meio condicionado, foram adicionadas de tampão de amostra e fervidas a 95°C por 5 min para posterior aplicação e desenvolvimento do SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida), com tampão de corrida contendo 25 mM Tris, 192 mM Glicina e 0,25% SDS. As proteínas do gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose no mesmo tampão contendo 20% de metanol (tampão de transferência), e o perfil de bandeamento foi observado pela coloração com Ponceau. Após lavagem em TBS-T (*Tris-Buffered Saline* + 0,05% de Tween 20), as membranas foram incubadas com solução de leite 5% em TBS-T para bloqueio por 1 hora, e lavadas novamente, por 3x de 5 min com TBS-T, para incubação *overnight*, a 4°C, com os seguintes anticorpos primários diluídos em solução de BSA 5% em TBS-T: anti-HIF-1 α 1:1000 (Cell Signaling, #3716 e #14179), anti-TBP 1:1000 (Cell Signaling, #8515), anti- β -actin 1:1000 (Sigma-Aldrich, A5441), anti-PARP 1:1000 (Cell Signaling, #9532), anti-STAT3 1:1000 (Cell Signaling, #9132), anti-pSTAT3 1:500 (Cell Signaling, #4113), anti- α -Tubulina 1:5000 (Sigma-Aldrich, T9026), anti-STI1 1:10.000 (IgG purificada 2,2 μ g/ μ L), anti-ERK1/2 1:1000 (Cell Signaling, #9102), anti-pERK1/2 (Cell Signaling, #9101). As soluções dos anticorpos foram removidas, e as membranas novamente lavadas por 3x de 5min com TBS-T, para incubação, por 1h à temperatura ambiente, com os anticorpos secundários também diluídos em solução de BSA 5% em TBS-T: ECL anti-rabbit IgG-HRP 1:3000 (GE Healthcare, NA9340) e ECL anti-mouse IgG-HRP 1:3000 (GE Healthcare, NA931V). A detecção das bandas foi realizada pelo método de quimioluminescência, pela adição do substrato de HRP (Horseradish Peroxidase) Pierce™ ECL Western Blotting Substrate sobre a membrana, e captura das imagens no fotodocumentador (Uvitec Cambridge, UK), ajustando-se os tempos de exposição de acordo com a intensidade do sinal,

que foi quantificado pelo software ImageJ para plotagem dos dados de experimentos individuais.

4.16 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA MARCAÇÃO *IN VITRO* DE GL261 SUBMETIDAS À HIPÓXIA

As células foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro circulares de 12 mm (Warner Instruments, 64-0712), previamente colocadas no fundo dos poços de uma placa de 24 poços, sendo 2×10^4 células/poço. Após 2 dias de incubação a 37°C/5% CO₂, quando atingiram confluência, as células foram tratadas com 200 µM de pimonidazol, reagente que, durante o período seguinte de 1h em que as células foram expostas à hipóxia, conforme descrito na seção anterior, é convertido em sua forma reduzida, que é capaz de se ligar covalentemente a grupos tióis de proteínas, formando adutos estáveis detectáveis por anticorpo específico. As células foram rapidamente fixadas em PFA 4% por 1h a temperatura ambiente. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS, e as células, permeabilizadas por 5 min com Triton X-100 0,5% em PBS. Para o bloqueio de sítios inespecíficos à ligação de anticorpos, as lamínulas foram incubadas, nos próprios poços, com uma solução de BSA 5% em PBS por 1h. Em seguida, essas foram retiradas com pinça dos poços, vertendo-se a face onde as células estavam aderidas sobre a tampa da placa previamente forrada com Parafilm M[®], formando uma superfície lisa, onde foram distribuídas gotas de 50 µL do anticorpo primário anti-pimonidazole (PAb2627AP), Hypoxyprobe[™] HP3-XXX, este diluído 1:100 em tampão contendo BSA 1% em PBS + Tween 20 0,1%. As lamínulas foram drenadas do excesso de PBS, secando pelas bordas com lenço de papel, e dispostas, individualmente, sobre as gotas de anticorpo para incubação *overnight* a 4°C em câmara úmida. Foram lavadas 3 vezes de 5 minutos em PBS a temperatura ambiente e incubadas 1h com o anticorpo secundário anti-rabbit conjugado a Alexa Fluor[®] 488 (Invitrogen, A11008) diluído no tampão de BSA 1%, utilizando a mesma técnica de incubação para o anticorpo primário. Depois de mais 3 lavagens de 5 min

em PBS e drenagem do excesso de líquido, as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro, vertendo-se novamente a face contendo as células sobre o meio de montagem FluorSave™ Reagent (Merck, 345789). As lâminas foram mantidas *overnight* ao abrigo da luz, em local seco e fresco, para secagem do meio de montagem, e então analisadas por microscopia confocal.

4.17 IMPLANTES ORTOTÓPICOS INTRACEREBRAIS DE CÉLULAS GL261

4.17.1 Protocolo 1

Camundongos C57BL/6J de ambos os sexos, com idades entre 8 e 12 semanas foram utilizados. As células GL261-RFP ou GL261-LUC foram tripsinizadas, lavadas 3 vezes em PBS e ressuspendidas na proporção de 3×10^4 células / 5 μ L de PBS, sendo mantidas em gelo até o momento da injeção. Para as células GL261-LUC, realizou-se a checagem prévia dos níveis de bioluminescência *in vitro*, conforme descrito na Seção 4.3, obtendo-se valores entre 0,8 e $2,0 \times 10^6$ RLU (*relative light units*), confirmando a expressão da enzima luciferase. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma solução de quetamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) e, após checagem do efeito anestésico pelo reflexo de retração das patas, foi feita a depilação da região da cabeça com creme depilatório. O procedimento cirúrgico realizado em fluxo laminar, fazendo-se a antisepsia prévia do escalpo com iodopovidona 10%, consistiu na exposição da caixa craniana por meio de uma pequena incisão seguindo a linha média do crânio com bisturi estéril, e na abertura de um orifício no osso frontal, próximo à bregma (equidistante 1 mm, anteriormente à sutura coronal e lateralmente ao alinhamento da sutura sagital), de modo a acessar a região do corpo estriado direito, com uma agulha hipodérmica de 13 x 0,45 mm (26G). Essa tem um calibre um pouco maior ao da agulha da microseringa de 10 μ L (27G) utilizada, em seguida, para injeção das células (Hamilton®, Model 1701 SN SYR). Para isso, as células foram primeiro

homogeneizadas, e 5 μL da suspensão foram coletados na microseringa. Inseriu-se a agulha pelo orifício aberto anteriormente, até uma profundidade de 4 mm (limitada por uma capa plástica envolvendo a agulha), e enquanto se segurava a agulha no local da injeção, os animais foram transferidos para uma plataforma, onde foram posicionados para que as microseringas fossem fixadas, verticalmente, pelo suporte de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, PHD 2000 Infusion). As células foram então injetadas a uma velocidade de 50 $\mu\text{L}/\text{h}$, formando um bolsão estável de células dentro do parênquima. Após a injeção, os animais foram mantidos como estavam por 5 minutos, para que as células sedimentassem e não houvesse refluxo pelo orifício de injeção. Em seguida, a pele do escalpo foi suturada com grampos cirúrgicos, e os animais foram mantidos sobre manta térmica, por cerca de 1h, até que se recuperassem da anestesia.

4.17.2 Protocolo 2

A metodologia original foi adaptada, segundo YADAV et al. (2016), com o objetivo de utilizar uma técnica mais apurada para a injeção das células, de modo a minimizar ao máximo os danos ao tecido, permitindo que as células ficassem confinadas em apenas um ponto central do caudado/putâmen (corpo estriado dorsal), de onde precisariam expressar sua capacidade infiltrativa para invadir o tecido adjacente, o que caracterizaria o desenvolvimento de um tumor difuso que reproduzisse o glioblastoma humano. Desta forma, a bomba de infusão foi associada a um estereotáxico (Stoelting Co., 51615), onde foi afixada uma agulha de 32G, que foi ligada, por uma cânula de polietileno (BD Intramedic[®] PE-10, I.D. 0,28mm / O.D. 0,61 mm) previamente preenchida com PBS, à agulha de uma microseringa Hamilton[®] de 10 μL presa ao suporte da bomba. Nessa configuração, um pouco antes da injeção, o êmbolo da microseringa foi recuado 2 μL para que entrasse ar na cânula e não houvesse contato do PBS com a suspensão de células que foi aspirada, a seguir, pela agulha de 32G, até o volume de 8 μL na microseringa. O preenchimento com PBS é

utilizado para melhorar a condução do líquido dentro da cânula, contribuindo para uma velocidade de injeção constante da suspensão de células.

Camundongos C57BL/6J de ambos os sexos, com idades entre 6 e 8 semanas foram utilizados. As células GL261-RFP, GL261-LUC, GL261 shHIF-1 α , GL261 shSTI1 e GL261 Non-Target foram tripsinizadas, lavadas 1 vez em PBS e ressuspendidas na proporção de 3×10^4 células/ μ L de DMEM sem soro, sendo mantidas em temperatura ambiente até o momento da injeção. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma solução de quetamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) e, após checagem do efeito anestésico pelo reflexo de retração das patas, foi feita a depilação da região da cabeça com creme depilatório. Após a antissepsia do escalpo com iodopovidona 10%, em fluxo laminar, foi realizada uma pequena incisão, com bisturi estéril, seguindo a linha média do crânio, desde o nível dos olhos até atrás das orelhas do animal. O tecido conectivo que envolve o crânio foi então removido com auxílio de um cotonete embebido em peróxido de hidrogênio 3%, que altera a consistência deste tecido, facilitando sua retirada com pinça relojoeiro. Ao mesmo tempo, o peróxido de hidrogênio evidencia as suturas do crânio ao entrar em contato com a catalase das hemácias do sangue, formando uma espuma branca persistente pela liberação de oxigênio ao longo das suturas, além de cauterizar vasos do crânio, reduzindo sangramentos, e atuar como antisséptico (WILLIAMS 1996). O animal foi então posicionado no estereotáxico, sendo a cabeça fixada pelo osso parietal próximo ao arco zigomático, de modo que ficasse alinhada em relação ao ponto de fixação pelos dentes incisivos. Seguindo as representações esquemáticas das estruturas cerebrais presentes nos atlas de anatomia de camundongos, a localização dessas estruturas se dá pelo alinhamento, no mesmo plano, dos pontos de encontro entre as suturas: bregma (junção da sutura sagital com a coronal) e lambda (junção da sutura sagital com a lambdoide). Utilizando-se a agulha de injeção como referência, os pontos de fixação do crânio foram movidos verticalmente, até que o braço do estereotáxico, onde a agulha estava fixada, marcasse a mesma medida ao tocar ambas as junções,

conforme observado com auxílio de lupa. Com o crânio alinhado e nivelado, a agulha foi colocada exatamente acima da bregma, de onde se ajustou as coordenadas de injeção para: +0,5 mm AP (antero-posterior), ou 0,5 mm anterior à bregma; e +2,5 mm ML (médio-lateral), ou 2,5 mm à direita da bregma. O ponto definido foi demarcado com caneta de marcação cirúrgica (TEXTA extra fine, No. 500) para abertura de um orifício com uma broca de 1,5 mm, até se chegar às meninges. Uma agulha de 26G foi então utilizada para perfurar as meninges e aparar arestas do orifício aberto. A suspensão de células foi preparada para injeção, conforme descrito anteriormente, e para remover células que tivessem ficado na superfície externa da agulha de 32G, foi utilizado um cotonete embebido em etanol 70°GL, evitando-se que tumores secundários crescessem também na região cortical, além do sítio de injeção. Para minimizar os danos ao tecido pela perfuração do cérebro, a agulha foi introduzida, lentamente e de maneira constante, através do orifício, durante 5 minutos, até atingir sua última coordenada: +3,5 mm DV (dorso-ventral), ou 3,5 mm de profundidade. No ponto de injeção, a agulha foi mantida por mais 5 minutos, até que a bomba fosse acionada para injetar 1 μ L da suspensão a uma velocidade de 3 μ L/h. Ao final, aguardou-se mais 7 minutos, para que as células sedimentassem, e retirou-se lentamente a agulha, novamente durante 5 minutos, para que não houvesse refluxo das células pelo canal de injeção. O animal foi retirado do estereotáxico, e após suturar a pele do escalpo com grampos cirúrgicos, o mesmo foi mantido sobre manta térmica até que se recuperasse da anestesia.

Os animais foram monitorados semanalmente para acompanhamento da perda de peso, já que este é um dos primeiros sinais físicos de evolução da doença, além da análise do sinal de bioluminescência dos tumores gerados pelas células GL261-LUC através de imageamento intravital. As células GL261-LUC foram modificadas para expressar a enzima luciferase e, portanto, metabolizar o substrato luciferina, gerando emissão de luz (luminescência) como resultado da reação, a qual pôde ser detectada e medida pelo equipamento In-Vivo MS FX PRO (Bruker). Antes disso, grupos de 3 animais foram previamente anestesiados por inalação com isofluorano

3%, durante 5 min, em câmara de indução do sistema de anestesia da E-Z Anesthesia (EZ-6100 Imaging Anesthesia System), pelo qual se faz a vaporização do anestésico em oxigênio, ajustando-se a vazão do gás para 1,5 mL/min. Da câmara de indução, os animais foram transferidos para outra câmara presente no compartimento de aquisição de imagens do equipamento da Bruker, onde foram posicionados em decúbito dorsal. Essa outra câmara também estava conectada a respiradores alimentados pelo mesmo sistema de anestesia, onde a concentração de isoflurano foi reduzida para 1,5%, enquanto se manteve a mesma vazão do gás. A solução estéril de luciferina, preparada em PBS, foi então administrada aos animais, dentro desta câmara, na dose de 100 mg/Kg por via intraperitoneal. Os sinais de bioluminescência foram detectados após 20 min de injeção da luciferina, de acordo com a cinética de metabolização desta pelas GL261-LUC, e analisados pelo software Molecular Imaging (Bruker MI). As imagens geradas foram sobrepostas às imagens de raio-X adquiridas em seguida, de modo a avaliar parâmetros de distribuição do gradiente de intensidades do sinal demarcando o tumor (o sinal aumenta em direção ao centro do tumor, onde atinge intensidade máxima), assim como sua localização relativa ao ponto de injeção e a possível difusão de células para outras regiões do cérebro. Os animais foram retirados da câmara e dispostos sobre uma manta térmica, mantida a 37°C, por aproximadamente 5 minutos, até que recobrassem os sentidos e pudessem ser devolvidos para as respectivas gaiolas de criação.

4.18 IMPLANTAÇÃO DE BOMBAS MICRO-OSMÓTICAS PARA TRATAMENTO INTRATUMORAL COM ANTI-STI1

A infusão contínua de quimioterápicos, em comparação com os regimes intermitentes de tratamento, constitui uma maneira eficaz de maximizar os efeitos terapêuticos que precisam ser observados em longo prazo, além de permitir o uso otimizado do tempo de experimentação com os animais (WALKER et al. 1998). As bombas osmóticas (Model 1004, Alzet®)

permitem a liberação controlada de agentes bioativos a partir de um reservatório feito de material flexível em seu interior, o qual é envolvido por uma camada esponjosa com alta concentração de sais, que induz, por osmose, o fluxo de água do tecido circundante, onde a bomba é implantada, para o seu interior, comprimindo o reservatório e fazendo com que a solução do quimioterápico seja impulsionada para injeção. O influxo de água e, portanto, a vazão do volume injetado, são controlados por uma membrana semipermeável que reveste a superfície externa da bomba (THEEUWES e YUM 1976). O acesso direto intracerebral e intratumoral pelo kit de infusão (Brain Infusion Kit 3, Alzet[®]), composto basicamente de um cateter ligado a uma cânula de aço inoxidável de 3 mm de comprimento, permite que o ativo seja administrado exatamente no local onde se quer avaliar seus efeitos (tumor), sem que variáveis ligadas a sua circulação periférica interfiram na análise dos resultados (WANG et al. 2015). Antes da sua implantação, as bombas montadas com o kit de infusão foram pré-condicionadas em salina (0,9%) estéril a 37°C por 48h em estufa, de forma que se atingisse, posteriormente, uma vazão constante (0,11 µL/h) durante a infusão do anticorpo dentro do tumor no decorrer de, no máximo 28 dias, conforme a capacidade do reservatório do modelo utilizado (90 µL), a qual excede o volume necessário para que se complete o tratamento. Esse período de incubação reduz as chances de coagulação de sangue dentro da cânula, ou sua oclusão pelo tecido cerebral, além de não ter afetado, aparentemente, a estabilidade do anticorpo. O preenchimento e montagem das bombas foram realizados com técnicas assépticas, em cabine de fluxo laminar, utilizando-se pinças estéreis para a manipulação dos seus componentes. Com a bomba na posição vertical, a solução de anti-STI1 em PBS (suficiente para uma dose de 400 ng/dia) foi injetada, lentamente, para evitar a formação de bolhas, com uma agulha de 27 G (fornecida juntamente com as bombas), acoplada a uma seringa de 1,0 mL, até se formar uma gota sobre o orifício de injeção.

Para a montagem, uma cânula reta de aço inoxidável de 1 cm, que também acompanha o kit das bombas, foi introduzida até a metade em uma

das extremidades de um cateter de cloreto polivinílico de 2,5 cm de comprimento; na outra ponta introduziu-se um dos braços da cânula em “L”, para infusão dentro do tecido, até o ponto de junção. Enquanto se segurava esse aparato de infusão na horizontal com uma das pinças, este foi preenchido com PBS pela cânula reta, utilizado a mesma agulha do passo anterior, previamente lavada com o veículo, evitando-se a formação de bolhas visíveis no cateter, de modo que, ao mesmo tempo em que se injetava o PBS, a agulha era retirada lentamente da cânula, até que se formasse uma gota quando as pontas fossem separadas. Com a bomba preenchida ainda na posição vertical, verteu-se o aparato de infusão, encaixando-se a porção livre da cânula reta dentro do orifício da bomba. O sistema montado foi rapidamente colocado na posição horizontal, para evitar que entrasse ar pela cânula de infusão, e mantido assim até que fosse imerso em PBS dentro de um tubo FalconTM de 50 mL, de onde foi retirado, em seguida, para a implantação (Figura 9).

Os animais selecionados ao apresentarem níveis baixos do sinal de bioluminescência, que é quando os tumores começam a ganhar massa, foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma solução de quetamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg). Em fluxo laminar, a região da cabeça foi depilada com creme depilatório, para aplicação do antisséptico tópico iodopovidona 10%. Para evitar ressecamento durante o procedimento, os olhos foram cobertos com PBS. Com um bisturi estéril, foi feita uma incisão medial no escalpo seguindo a linha sagital, desde o nível dos olhos até atrás das orelhas do animal para expor o crânio. O tecido conectivo que envolve o crânio foi então removido com auxílio de um cotonete e pinça relojoeiro, de modo a garantir uma boa adesão da cola que é usada posteriormente para prender a cânula de infusão. A pele de um dos lados do dorso do animal foi divulsionada com pinça hemostato, a partir da incisão, para criar um bolsão subcutâneo onde foi inserida a bomba (sempre mantida na horizontal) com auxílio de pinça anatômica, ao mesmo tempo em que se posicionava a cânula de infusão sobre o orifício deixado, previamente, pelo implante ortotópico das células tumorais. A cânula de infusão fica embutida

em uma base de plástico com uma aba superior, a qual pode ser manuseada enquanto se espalha, nesta base, uma cola universal em gel para que a mesma seja fixada ao crânio após se introduzir a cânula no orifício de infusão. Com a secagem da cola após alguns minutos, a aba de plástico foi cortada e a pele reposicionada sobre o cateter, de maneira que todo o sistema de infusão ficasse acomodado subcutaneamente (Figura 9). Por fim, a pele foi suturada com clips cirúrgicos. Os animais foram monitorados até a completa recuperação dos movimentos e uma dose diária de 100 μL de analgésico (Tramal 2 mg/Kg) foi administrada, intraperitonealmente, até o segundo dia pós-implantação. O sinal de bioluminescência foi avaliado a cada dois dias, e os animais foram eutanasiados, ao apresentarem os sintomas de comprometimento neurológico da doença, para avaliação histológica.

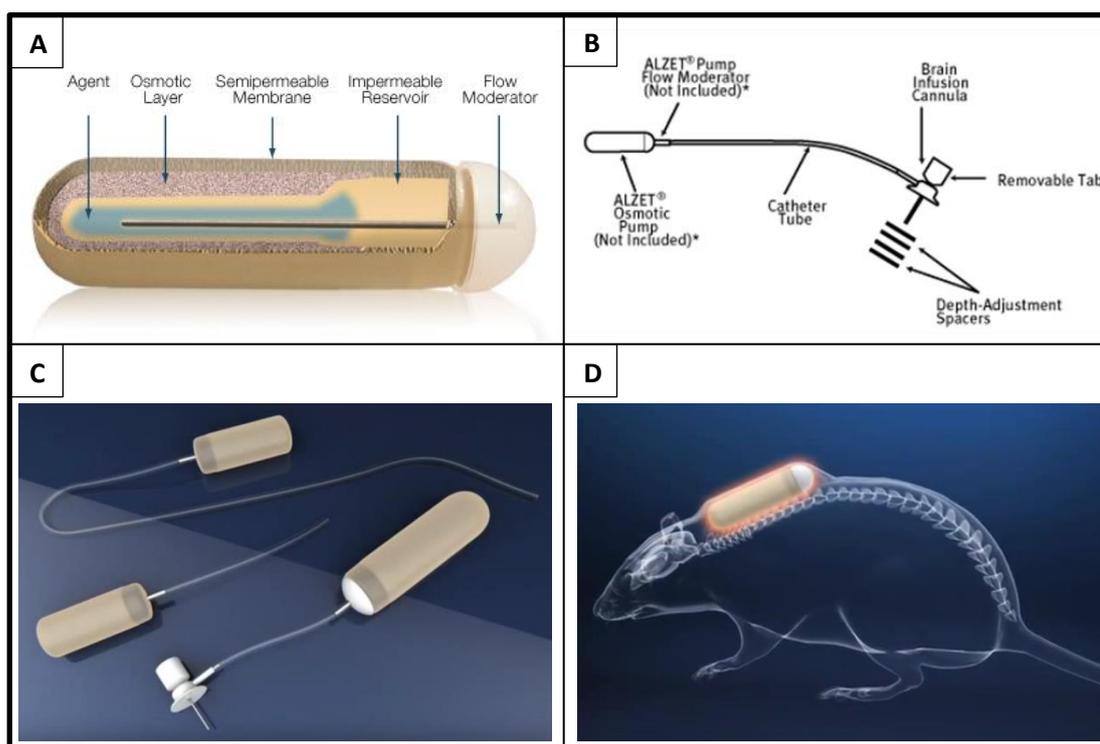


Figura 9 – Sistema de infusão de fármacos por bombas micro-osmóticas Alzet®: **A)** Estrutura interna das mini-bombas; **B)** Esquema de montagem do kit de infusão cerebral conectado a uma bomba; **C)** Imagem ilustrativa de bombas acopladas a cateteres e à cânula para tratamento intracerebral; **D)** Representação da implantação subcutânea das bombas no dorso dos camundongos para infusão intracerebral.

4.19 PERFUSÃO DOS ANIMAIS PARA FIXAÇÃO DOS TECIDOS E PROCESSAMENTO DOS CÉREBROS DOS CAMUNDONGOS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA POR COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA-EOSINA E IMUNOFLUORESCÊNCIA

Ao apresentarem sinais clínicos de comprometimento neurológico avançado, como postura encurvada, perda de peso intensa e perda parcial dos movimentos ou até hemiparalisia (quando o tumor atinge volume estimado de 80 mm³), os animais foram primeiramente submetidos ao imageamento (quando injetados com a célula GL261-LUC) para a leitura dos sinais no ponto final de crescimento tumoral.

Com os animais ainda anestesiados pelo isoflurano foi realizada a injeção, pela veia da cauda, de 60 mg/Kg de pimonidazol (HypoxprobeTM HP3-XXX), utilizado para detecção de regiões de hipóxia nos cortes histológicos. Estes serão reservados por 1 hora para que sejam, então, ou diretamente eutanasiados por aprofundamento intraperitoneal de anestesia com uma mistura 10:1 de ketamina (100 mg/mL) e xilazina (100 mg/mL), ou submetidos a perfusão transcardíaca. Para isso, os animais são anestesiados com xilazina/quetamina como realizado antes dos implantes intracerebrais, e posicionados na mesa cirúrgica com imobilização das patas para se proceder à abertura da caixa torácica e exposição do coração. Utilizando um equipo de infusão endovenosa com agulha de 23G, acessou-se o ventrículo esquerdo pela face mais inferior do coração, infundindo, com auxílio de uma bomba peristáltica 20-40 mL da solução de lavagem de Tyrode (NaCl 0,8%; CaCl₂.2H₂O 0,026%; NaH₂PO₄.H₂O 0,0038%; Glicose 0,1%; NaHCO₃ 0,1%; KCl 0,02%), seguida de 200 mL de PFA 4% gelado, a uma vazão de 2 gotas/s, que foi aumentada gradativamente para 6 gotas/s até o término da perfusão (PUNTEL et al. 2010).

Os cérebros removidos após a eutanásia direta ou perfusão dos animais foram processados de duas formas:

- 1) Fixados com paraformaldeído (PFA 4%) *overnight* em geladeira, quando foram lavados com PBS e criopreservados pela troca gradual, a cada dois

dias, de soluções de sacarose à 20% e 30% em PBS, conservadas à 4°C em geladeira. Utilizando o meio de inclusão Tissue-Tek OCT Compound, os cérebros foram emblocados para a realização dos cortes, em criostato, com 5 µm de espessura sobre lâminas adesivas (Superfrost® Excell™ Microscope Adhesion Slides, Thermo Scientific®), que foram, ao final, armazenadas em freezer -20°C.

Para a marcação fluorescente, as lâminas foram colocadas à temperatura ambiente, e os cortes cuidadosamente reidratados com PBS para incubação, por cerca de 1h, com a solução de bloqueio de soro de cabra 20% em PBS, em uma câmara úmida protegida da luz. O excesso de bloqueio, após se verter a lâmina sobre papel absorvente, foi removido aspirando-se o volume residual próximo ao corte com vácuo, para a adição de volumes suficientes que cobrissem cada corte das respectivas soluções de anticorpos primários (anti-CD31 1:100, R&D Systems AF3628; anti-PrP^C 1:50, Soro Purificado; anti-STI1 1:200, IgG purificada 2,2 µg/µL; anti-laminina 1:100, IgG purificada 0,18 mg/mL) diluídos em soro de cabra 1%, seguido da incubação *overnight* das lâminas dentro da câmara úmida, à 4°C, em câmara fria. Novamente, verteu-se a solução do anticorpo, e os cortes foram cuidadosamente lavados 3x com PBS, para a incubação com os anticorpos secundários (anti-goat A21467, anti-mouse A11001 e anti-rabbit A11008 conjugados a Alexa Fluor® 488, Invitrogen), também diluídos 1:750 em soro de cavalo 1% juntamente com o corante fluorescente DAPI 1:1000 (contra-coloração de DNA e núcleo), por no máximo 1h à temperatura ambiente, mantendo-se a umidade da câmara úmida. Seguindo-se à mais 3 lavagens com PBS e drenagem dos cortes, aplicou-se sobre as lâminas o meio de montagem FluorSave™ (Merck Millipore), para a preservação dos cortes e da marcação fluorescente, e cobriu-se com lamínula, evitando a formação de bolhas. As lâminas foram então deixadas secando, à temperatura ambiente e protegidas da luz, até o dia seguinte, quando foi realizada a análise por microscopia confocal (Leica TCS SP5 II) de campos representativos da interação entre as regiões do corte de parênquima cerebral e tecido tumoral.

2) Fixados com paraformaldeído (PFA 4%) + 20% de sacarose *overnight* em geladeira. Cortes de 50 µm foram realizados, da mesma forma, em criostato, e armazenados em placas de 6 poços para cultura de células com 2 mL de PBS + 0,02% de Azida Sódica/poço para evitar contaminação. As lâminas foram montadas posteriormente em PBS, posicionando-se os cortes com um pincel de ponta fina.

Após secagem ao ar livre para adesão dos cortes à lâmina, realizou-se a imunofluorescência segundo protocolo específico para cortes congelados (R&D SYSTEMS, INC. *Protocol for the Preparation and Fluorescent IHC Staining of Frozen Tissue Sections*). Para o bloqueio, as lâminas foram cobertas com soro de cavalo 1% em PBS + 0,02% de Azida Sódica, e incubadas por 1h30min em câmara úmida a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados os anticorpos primários diluídos em tampão de incubação contendo 1% BSA, 1% soro de cavalo, 0,3% Triton[®] X-100 e 0,01% Azida Sódica em PBS: anti-CD31 1:100, ReD BAF3628; anti-pimonidazole (PAb2627AP) 1:100, Hypoxyprobe[™] HP3-XXX. Os cortes foram incubados por 48h em câmara úmida a temperatura ambiente e então lavados 3 vezes por 15 min com PBS + 0,02% de Azida Sódica para adição dos anticorpos secundários diluídos no mesmo tampão de incubação: Alexa Fluor[®] 488 Estreptavidina Conjugada 1:800, Invitrogen[™] S32354; Alexa Fluor[®] 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) 1:800, Invitrogen[™] A11008. Após incubação de 2h em câmara úmida a temperatura ambiente, os cortes foram novamente lavados 3 vezes por 15 min com PBS + 0,02% de Azida Sódica. Utilizando FluorSave[™] (Merck Millipore) como meio de montagem, as lâminas foram seladas com lamínulas e conservadas em local fresco e seco até sua secagem, no dia seguinte, para análise por microscopia confocal.

* Como forma de otimizar o uso dos animais, os experimentos de anel aórtico e culturas organotípicas de cérebro foram realizados em paralelo, para o aproveitamento das aortas e cérebros, respectivamente, a partir dos mesmos neonatos de camundongo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossa hipótese inicial se baseou em duas evidências centrais, uma delas derivada de achados do próprio grupo, pelos quais o silenciamento de STI1 em camundongos levava à morte prematura dos embriões próximo ao décimo dia de gestação (E10.5) (BERALDO et al. 2013). Na ocasião, uma das possibilidades que foram levantadas foi a de que poderia haver algum comprometimento da formação vascular da região anterior dos embriões, o qual ocorreria por meio de falhas na diferenciação de células da crista neural em tipos celulares envolvidos com a formação de estruturas vasculares (Figura 10). Outra evidência que baseou este trabalho foi extraída do estudo de Lee et al. (2013), o qual descreve a relação entre hipóxia, a secreção de STI1 e a recuperação funcional de regiões cerebrais submetidas à isquemia, pelo recrutamento de precursores endoteliais PrP^C-positivos da medula óssea. Apesar de não ter relação direta com o desenvolvimento de tumores cerebrais, ambas as evidências relacionavam funções conhecidas da STI1 com efeitos sobre a angiogênese: a primeira reconhecia a importância da função co-chaperona para que proteínas essenciais às células entrassem na sua configuração funcional, alçando a STI1 ao mesmo nível de importância de proteínas como HIF-1 α (KOH e POWIS 2012), VEGF (CARMELIET et al. 1996), VEGFR-3 (DUMONT et al. 1998), Snail1/Notch1 (Wu et al. 2014), VHL (GNARRA et al. 1997; HONG et al. 2006) e JAGGED1 (XUE et al. 1999). Quando silenciadas em camundongos, a ausência dessas proteínas também gera a morte de embriões por volta de E10.5 devido a má-formações vasculares durante a embriogênese, podendo estar também diretamente envolvidas na vasculogênese e angiogênese de estruturas extra-embrionárias, como, respectivamente, para a deleção de VHL, que coincide, a princípio, com a ausência de vascularização placentária, ou de JAGGED1 (ligante de Notch) e VEGFR-3, que estão associadas ao remodelamento ineficiente do plexo vascular primário do saco vitelínico. A outra evidência adicionava uma nova função da STI1, como mediador

extracelular pró-angiogênico, ao rol de efeitos neurotróficos relacionados à preservação da atividade neuronal por astrócitos em condições fisiológicas (LOPES et al. 2005; LIMA et al. 2007; BERALDO et al. 2013).

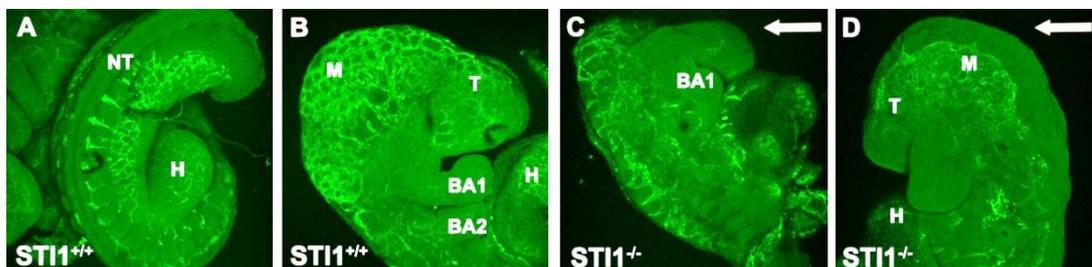


Figura 10 – Imunofluorescência *in toto* (whole mount) de embriões E10.5. Os embriões foram fixados e marcados com anti-CD31, marcador de células endoteliais, as imagens foram adquiridas por microscopia de confocal. (A-C) região truncal. (B-D) região cefálica, vista lateral. As setas indicam a região cefálica dos embriões. NT – tubo neural; H – coração; M – mesencéfalo; T – telencéfalo; - BA1 – primeiro arco branquial; - BA2 – segundo arco branquial.

Por isso, acreditamos que uma proteína tão importante como a STI1 teria também um papel decisivo na angiogênese de glioblastomas, mais ainda por dados prévios do grupo terem mostrado que linhagens celulares de glioblastoma humano, como LN-229, U87MG, A172 e U118MG, possuem um perfil de maior secreção de STI1 em relação a culturas primárias de astrócitos (RODRIGUES et al. artigo submetido). Do ponto de vista funcional, a ligação ao seu receptor PrP^C é o único elo conhecido da STI1 com a modulação dos glioblastomas, conforme já descrito por nosso grupo (LOPES et al. 2015). Em geral, os níveis de STI1 e PrP^C são proporcionais ao grau de malignidade dos astrocitomas humanos, o que pôde ser confirmado pelos implantes ortotópicos de U87 silenciada para PrP^C em camundongos, ou tratamento dos tumores com peptídeo bloqueador de STI1, levando a um efeito global de limitação do seu crescimento, com ganho potencial de sobrevida.

5.1 SECREÇÃO DE STI1 POR GL261

As células GL261 foram adotadas em nosso estudo como modelo de desenvolvimento tumoral *in vivo* para mimetizar a formação dos glioblastomas humanos em camundongos. O perfil de secreção de STI1 por estas células em cultura resulta em concentrações incrivelmente altas da sua forma livre ou solúvel presentes no meio condicionado, muito mais expressiva do que a quantidade secretada por células humanas, LN18 (glioblastoma) e HUVEC (endotélio), e uma menor proporção associada a exossomos (Figura 11).

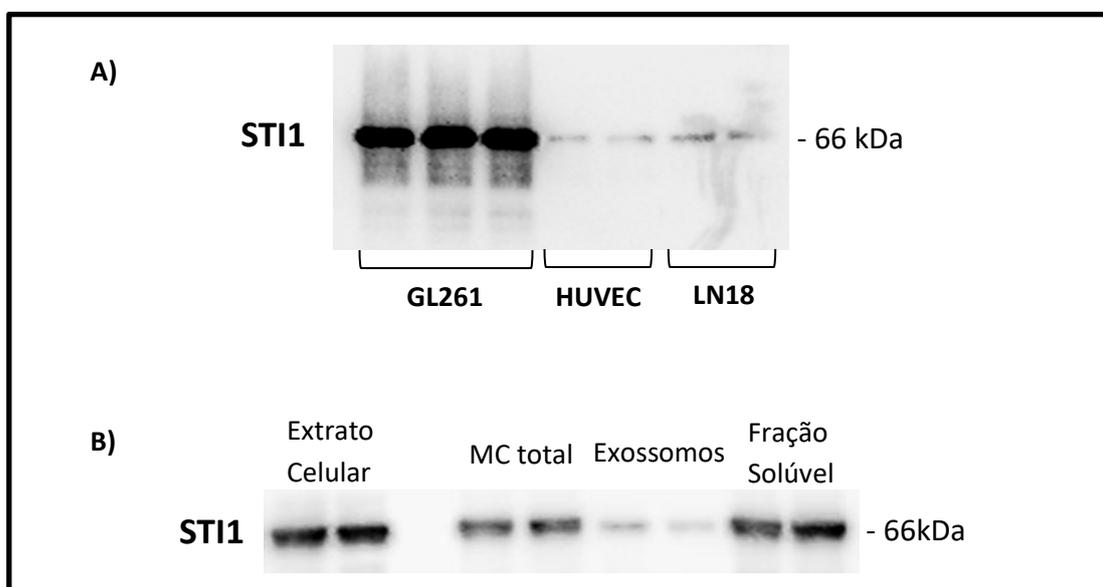


Figura 11 – Perfil de secreção de STI1 no meio condicionado por *Western blot*. **A)** O nível de secreção de STI1 total das células GL261 (murina) foi comparado com o de LN18 e HUVEC (células humanas). Para isso, o meio condicionado de cada célula, ao atingir 80% de confluência, foi precipitado com 15% (v/v) de TCA, e os extratos de proteínas totais foram quantificados para aplicação de 20 µg por canaleta do mesmo gel. **B)** Níveis de secreção de STI1 por GL261 em diferentes frações do meio condicionado total (MC total): Após ultracentrifugação foram obtidas as frações de proteínas solúveis ou livres no meio e daquelas ligadas a exossomos (extraídas diretamente em tampão de amostra). Como o rendimento do número de exossomos é baixo, mesmo para grandes volumes de MC total, todo o extrato de proteínas desta fração foi aplicado no gel, em conjunto com 20 µg dos extratos de cada fração e das próprias células GL261 inicialmente utilizadas para o condicionamento do meio.

As vesículas extracelulares são classificadas como microvesículas, exossomos, micropartículas e corpos apoptóticos, de acordo com o seu tamanho (VAN DER POL et al. 2012). Os exossomos são vesículas com tamanho entre 40 e 100 nm, formados a partir de vesículas intraluminais (VAN DER POL et al. 2012; SIMONS e RAPOSO 2009). Devido a sua origem endossomal os exossomos carregam proteínas envolvidas no transporte e fusão de membrana (SIMONS e RAPOSO 2009). Os exossomos participam de diversos processos fisiológicos e patológicos, possuindo diferente composição e funções conforme suas células de origem (MAAS et al. 2017). Algumas células podem usar os exossomos como uma via de eliminação de biomoléculas, mas nos últimos anos tem sido demonstrado que essas vesículas podem atuar na comunicação intracelular (LUDWIG e GIEBEL 2012).

A secreção de moléculas com atividade biológica em associação com exossomos é um dos mecanismos de modulação de inúmeros fenômenos celulares, como proliferação, migração, resistência à morte celular, entre outros (YÁÑEZ-MÓ et al. 2015). Já foi demonstrado que os exossomos podem carregar, além de proteínas e lipídios, RNA mensageiro e miRNA, permitindo que o estado de expressão gênica da célula receptora pode ser modificado pela atividade dessas vesículas (BECKER et al. 2016). Interessantemente, os exossomos podem ser detectados em diversos fluidos corporais, entre eles o plasma sanguíneo que, por sua vez, pode fornecer informações diagnósticas e auxiliar em decisões terapêuticas em pacientes com câncer (YANG e ROBBINS 2011).

5.2. RESPOSTA DAS CÉLULAS GL261 À HIPÓXIA

Como nos baseamos nas evidências de Lee et al. (2013), de que HIF-1 α atuaria como fator de transcrição sobre a região promotora do gene de STI1 em culturas primárias de células do córtex cerebral, levando a uma maior expressão e secreção de STI1, e a consequente recuperação neurológica de áreas isquêmicas *in vivo*, além do papel central de HIF-1 α

como mediador da neoangiogênese tumoral em resposta à hipóxia, avaliamos então de que forma as GL261 modulam sua expressão de HIF-1 α e STI1, e a secreção de STI1, quando submetidas a condições de hipóxia *in vitro*.

A padronização dos ensaios para detecção dos níveis de HIF-1 α após ativação por hipóxia passou por várias etapas: desde a opção pelo preparo de extratos nucleares ao invés da lise total das células, de modo a obter frações enriquecidas de HIF-1 α no núcleo, onde este exerce sua função como fator de transcrição (Figura 12); passando pelas várias trocas de anticorpos anti- HIF-1 α , de diferentes marcas e lotes, que fossem capazes de detectar a proteína expressa por GL261 (murina) através de Western blot (Figura 13), em comparação com a de LN18 (humana), visto que o primeiro anticorpo que utilizamos reconhecia apenas a proteína humana, servindo de base para validar o método de avaliação do perfil de ativação tempo-dependente de HIF-1 α (Figura 14); até a troca do controle de carregamento de PARP, que poderia sofrer interferência de um possível estímulo à apoptose decorrente das condições de hipóxia, pela proteína ligante de TATA-box (TBP), que é expressa constitutivamente e tem a função de formar o complexo de pré-iniciação de transcrição nas regiões TATA-box de cerca de um quarto de todos os genes, as quais precedem as regiões de ligação para diferentes fatores de transcrição (JOCHMANS-LEMOINE et al. 2016). Desta forma, dados consistentes sobre o perfil de expressão de HIF-1 α por GL261 foram obtidos apenas ao se avaliar os níveis de *knockdown* da proteína nas células submetidas ao silenciamento por shRNA (descrito adiante), quando tínhamos disponível no laboratório o último anticorpo anti-HIF-1 α que havíamos adquirido, o qual acabou sendo o único capaz de detectar a proteína murina por Western blot (Figura 13).

Concomitante à avaliação da ativação de HIF-1 α também avaliamos outra via classicamente envolvida na hipóxia, a de STAT3. A hipóxia leva à ativação, de maneira tempo-dependente, de pSTAT3, assim como da sua via *downstream*, sugerida pela ativação também de pERK (T202/T204), em relação à normóxia, permitindo distinguir entre intervalos curtos de hipóxia

(Figura 15), conforme descrito por YU et al. (2015) para diferentes linhagens, inclusive a LN18, de glioblastoma humano.

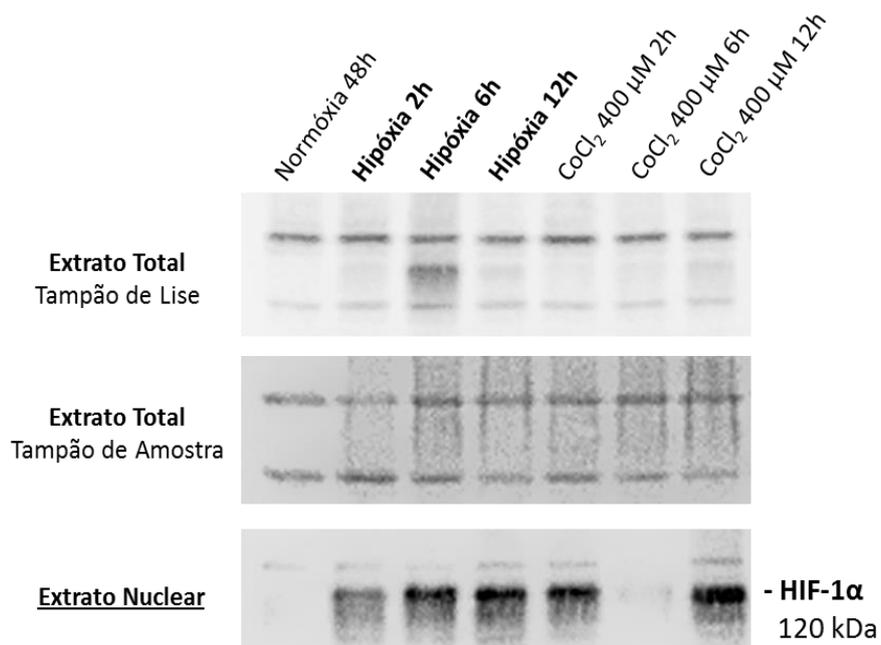


Figura 12 – Comparação entre as eficiências dos métodos de extração de proteínas, a partir da linhagem LN18, para a detecção de HIF-1α por *Western blot* (Cell Signaling, #3716), sendo possível diferenciar, apenas pelo extrato nuclear, o controle de normóxia (condição em que HIF-1α é degradado no citoplasma, não sendo translocado para o núcleo) dos diferentes tempos de hipóxia e de tratamento com o CoCl₂ (controle positivo responsável por estabilizar HIF-1α e impedir a sua degradação, assim como acontece na sua ativação durante a hipóxia).

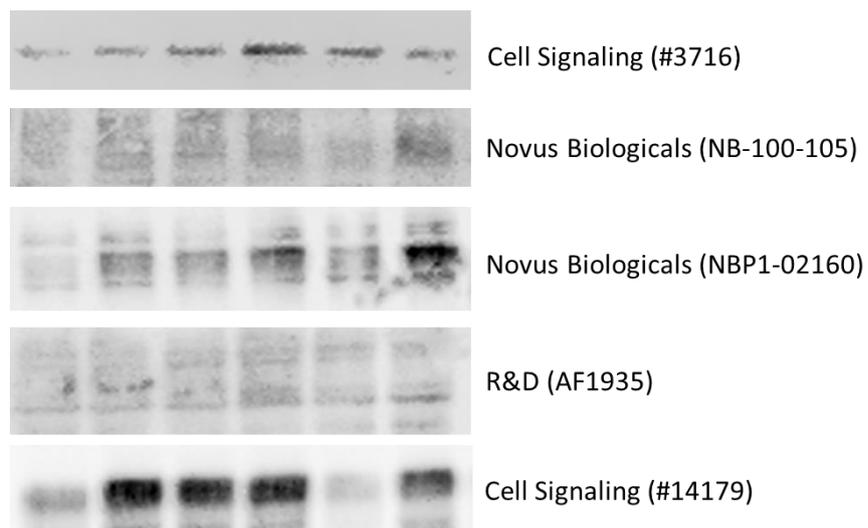


Figura 13 – Teste de especificidade da detecção de HIF-1 α por Western blot utilizando anticorpos anti- HIF-1 α de diferentes marcas/catálogos. O anticorpo da Cell Signaling, cat.no. #14179 (última sequência de bandas abaixo) foi o único capaz de detectar especificamente as bandas únicas de HIF-1 α na altura de 120 kDa. A primeira banda, correspondente ao extrato de proteínas de células GL261 mantidas em condições de normóxia, é seguida por 3 bandas correspondentes a diferentes tempos de exposição a CoCl₂ 400 μ M (controle positivo).

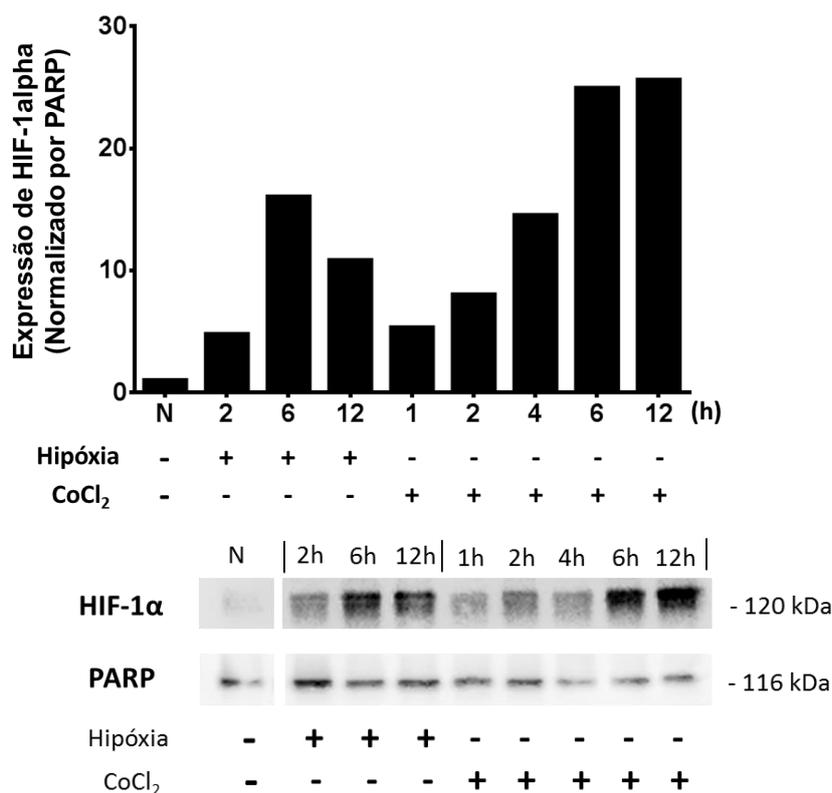


Figura 14 – Expressão de HIF-1 α por *Western blot* na linhagem LN18 submetida a diferentes tempos de hipóxia ou de tratamento com CoCl₂ 400 μ M (controle positivo). Extratos de proteínas nucleares foram analisados por *Western blot*. Normalização por PARP e relativização pelo controle negativo (normóxia, N).

A p-STAT3 tumoral, ausente em astrócitos normais, é um componente *upstream* da via de ativação de HIF-1 α induzida por hipóxia, atuando da mesma forma que este, como fator de transcrição no aumento da expressão, estabilidade do mRNA e síntese protéica de seu alvo, HIF-1 α . Os efeitos da ativação, também tempo-dependente, de STAT3 durante a hipóxia podem contribuir diretamente para uma maior migração celular e angiogênese nas regiões perinecróticas do tumor, sendo a pSTAT3 essencial para a formação de um complexo com HIF-1 α , o qual se liga ao promotor de VEGF, levando a sua máxima ativação transcricional (KANG et al. 2010).

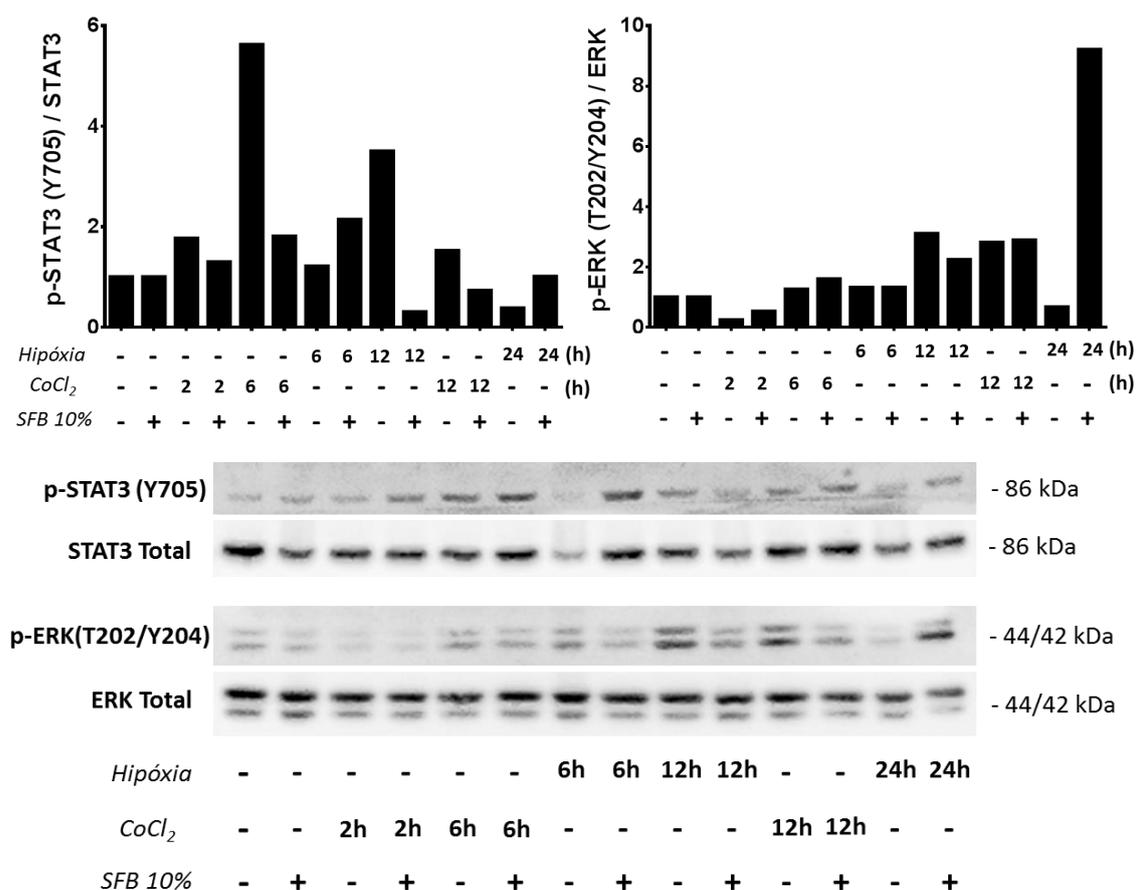


Figura 15 – Expressão de p-STAT3 e p-ERK por *Western blot* na linhagem LN18 submetida a diferentes tempos de hipóxia ou de tratamento com CoCl₂ 400 μM (controle positivo). Em cada condição foram comparadas células previamente carenciadas por 24h ou mantidas em meio completo (SFB 10%). A normalização foi feita pelas respectivas proteínas totais e a relativização pelo controle negativo (normóxia).

Em relação à hipóxia, tanto a expressão quanto a secreção de STI1 por GL261 não diferem das condições de normóxia. O acúmulo de STI1, inclusive, pela alta atividade secretora dessas células, fez com que tomássemos controles de normóxia para cada período de exposição à hipóxia, de modo a relativizar os níveis de expressão entre esses períodos (Figura 16).

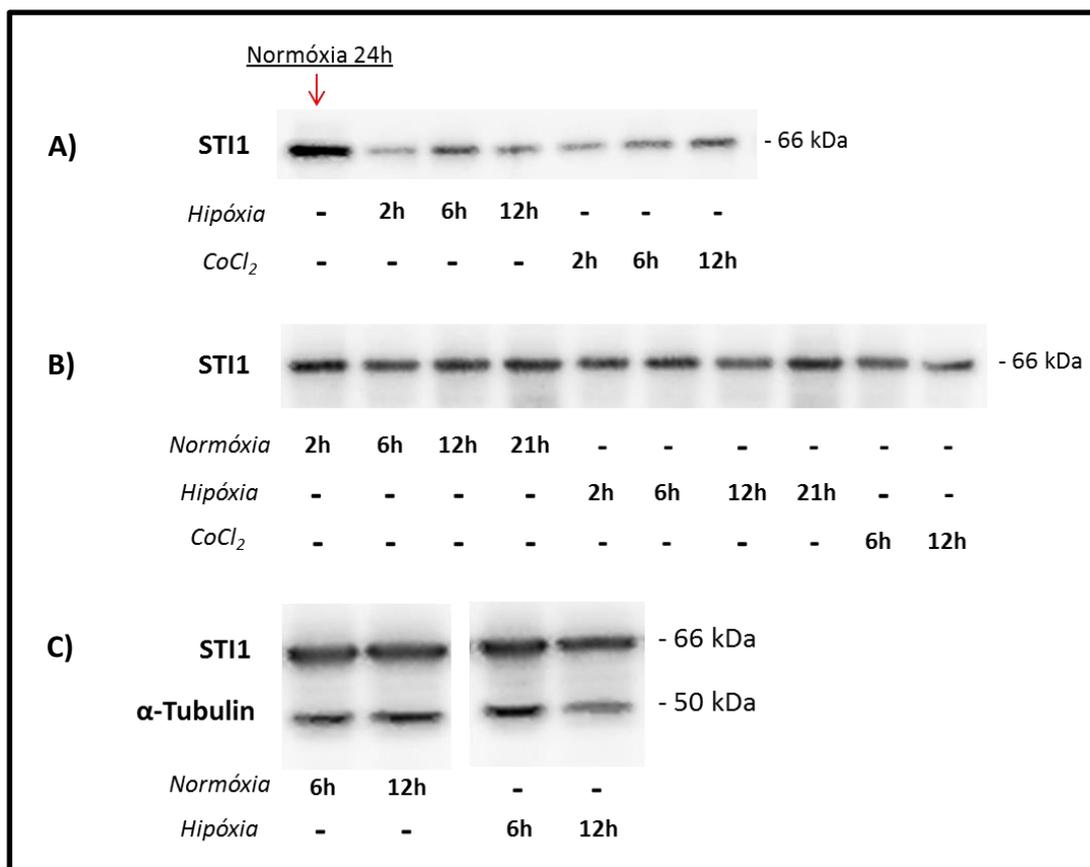


Figura 16 – Secreção de STI1 total no meio condicionado de GL261 e sua expressão nessas células, durante normóxia e hipóxia, avaliadas por Western blot. **A)** Acúmulo tempo-dependente de STI1 em normóxia, comparado aos níveis secretados nos meios condicionados em função dos períodos de exposição à hipóxia ou tratamento com CoCl₂ (controle positivo). **B)** Controles de normóxia realizados para cada tempo de hipóxia. **C)** Expressão de STI1 por células GL261 em normóxia e hipóxia (extratos de proteínas celulares totais), utilizando α-tubulina como controle de carregamento.

5.3 EFEITO DA STI1 RECOMBINANTE SOBRE A FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS VASCULARES POR ENSAIOS *IN VITRO* E *EX VIVO*

O meio mais simples e direto de se testar a atividade de uma proteína secretada por células tumorais consiste em produzi-la artificialmente, por expressão heteróloga em bactérias (*E. coli*), muito pelo fato de se obter um alto rendimento dessas proteínas, a baixo custo, utilizando técnicas acessíveis, que foram desenvolvidas e se estabeleceram como referência ao longo de décadas. O processo consiste, basicamente, na clonagem do gene

de interesse em vetores de expressão induzíveis para transformação das bactérias competentes, que irão sintetizar em massa a respectiva proteína, a qual será, por sua vez, recuperada e purificada para ser utilizada na avaliação das suas atividades *in vitro*, sem mencionar suas várias aplicações como biofármacos (insulina/diabetes, intéferons/câncer) para o tratamento de doenças (DUDLEY 2006; ASSENBERG et al. 2013; DE MARCO 2013; ROSANO e CECCARELLI 2014; SANCHEZ-GARCIA et al. 2016).

Com a STI1 recombinante, padronizamos então diferentes modelos experimentais que contemplassem a maioria dos eventos associados ao complexo processo de angiogênese, de modo que se detectasse como a STI1 poderia interferir na formação de novos vasos por células endoteliais *in vitro* e *ex vivo*, sugerindo uma possível atividade correlata da STI1 secretada pelas células GL261 no desenvolvimento tumoral.

5.3.1 Ensaio de Formação de Tubos em Matrigel

O potencial angiogênico da STI1 foi primeiro avaliado pelo ensaio de triagem de formação de tubos com células HUVEC, que foram tratadas com a proteína STI1 recombinante selvagem e mutante (STI1 Δ), com deleção da região entre os aminoácidos 230-245, domínio de interação com a proteína prion (ZANATA et al. 2002).

Na tentativa de otimizar as melhores condições de formação de tubos frente a diferentes tratamentos, foram utilizados três tipos de Matrigel: *High Concentrated* ou HC (com alto conteúdo protéico), *Growth Factor Reduced* ou GFR (parcialmente depletado de fatores de crescimento) e *Standard* ou Basal (matriz na sua constituição original). Também foram testadas diferentes diluições de matrigel e tipos de meio de cultura (DMEM e EBM-2). Inicialmente, testamos o matrigel HC, pelo qual obtivemos a primeira demonstração de que a diluição da matriz não seria uma alternativa viável, em razão da formação deficiente de tubos em qualquer condição que altere a sua composição, o que também foi determinado como função da densidade de células plaqueadas (fixada em $1,5 \times 10^4$), do tempo excessivo

de tripsinização (acima de 3 min) e do número de passagens em que as HUVECs se encontravam (Figura 17).

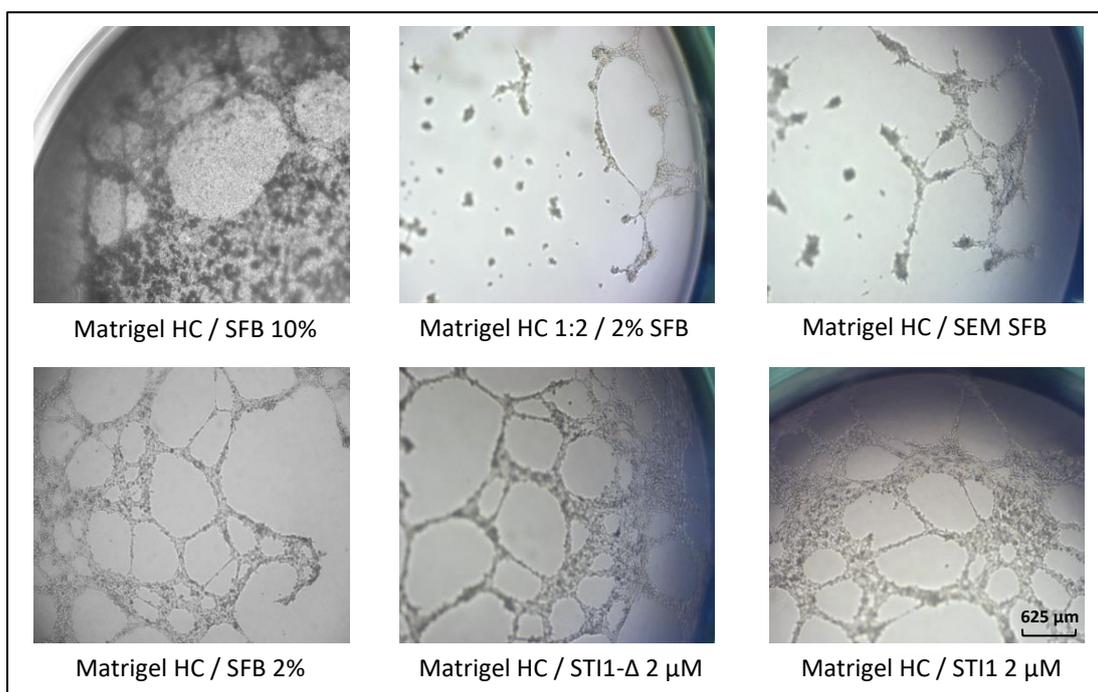


Figura 17 – Padronização das condições do ensaio de formação de tubos com o matrigel HC: Efeito da diluição do matrigel e diferenças do meio sem e com indução pelo soro fetal bovino (SFB), comparado aos tratamentos com STI1-Δ e STI1.

Avaliamos também uma variação do método onde a STI1 foi incorporada diretamente ao matrigel HC, no intuito de verificar o potencial angiogênico da matriz previamente enriquecida com STI1. Porém, não foi possível obter um dado confiável, uma vez que o controle utilizado (matriz enriquecida com albumina bovina, BSA) estimulou a formação dos tubos na mesma proporção que STI1 e SFB (Figura 18).

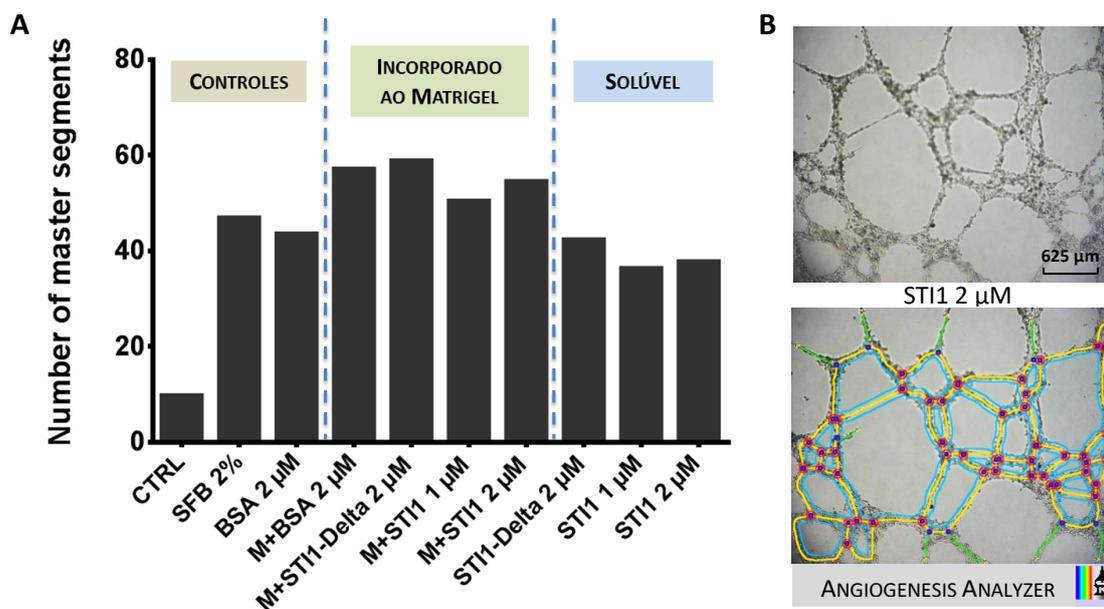


Figura 18 – Quantificação do número de elementos de vasos formados pelas HUVECs em Matrigel HC, sob diferentes tratamentos. **A)** Em destaque estão os diferentes grupos testados – Controles: Basal, Positivo (SFB 2%) e Negativo (BSA*); Incorporado ao Matrigel: As proteínas foram primeiro incorporadas à matriz, sobre a qual foram plaqueadas as HUVECs; Solúvel: O tratamento com as proteínas foi realizado diretamente no meio de cultura em que as células foram plaqueadas. **B)** Imagens representativas do mapeamento dos tubos pelo *plugin* do ImageJ, *Angiogenesis Analyzer*.
* O controle com BSA foi desconsiderado por ter apresentado uma atividade estimulatória de origem desconhecida.

O matrigel basal foi avaliado somente pelo tratamento direto das HUVECs com as proteínas adicionadas ao meio de cultura, antes do plaqueamento, em cada poço da placa de 96 poços. As células foram incubadas com concentrações crescentes de ST11 e ST11 Δ durante 12 horas, quando foi possível observar um aumento na formação de tubos na presença de ST11 (Figura 19). O mesmo não foi observado com a ST11 Δ , sugerindo uma possível dependência da proteína príon neste efeito.

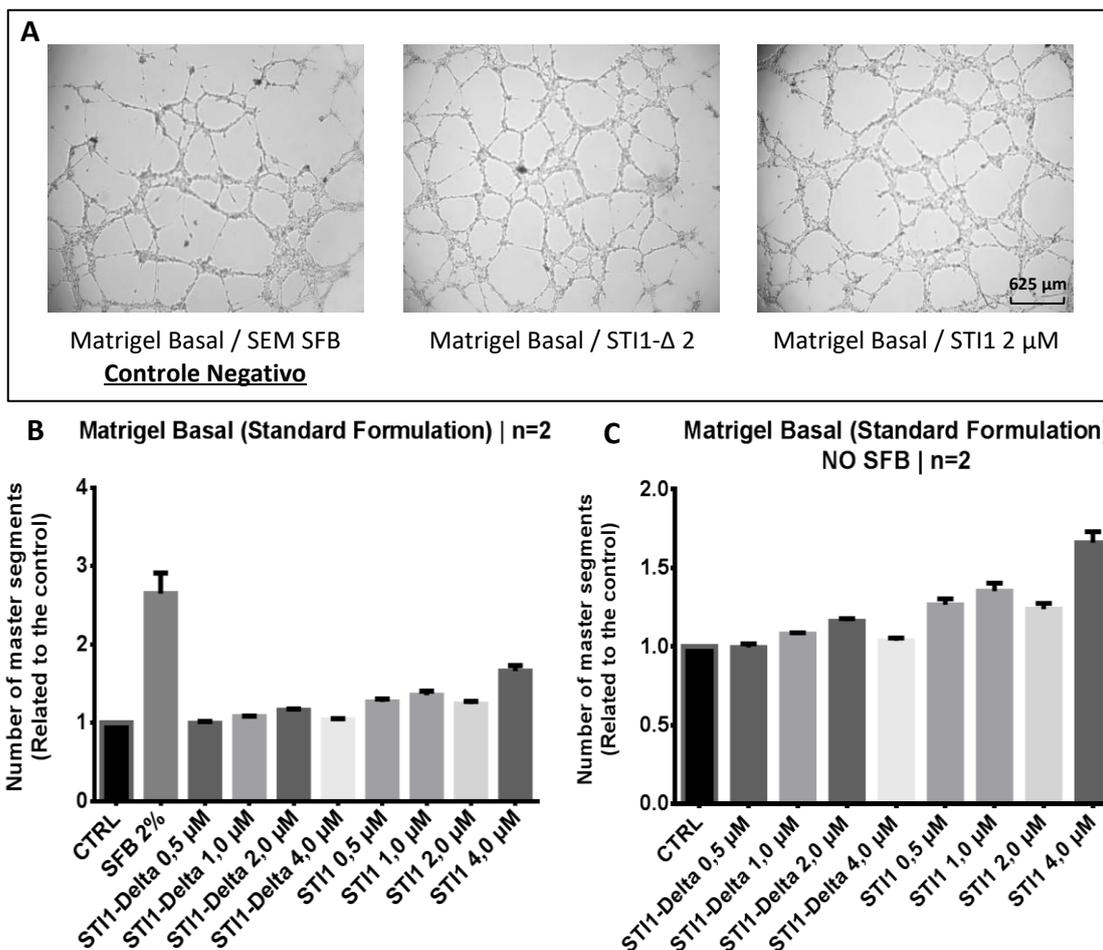


Figura 19 – Quantificação do número de elementos de vasos formados pelas HUVECs em Matrigel Basal. **A)** Imagens representativas do ensaio de formação de tubos. **B)** Gráfico da quantificação do número de elementos de vasos formados pelas HUVECs em Matrigel Basal, sob diferentes tratamentos. No gráfico **(C)** removemos o grupo controle com SFB 2%, pela forte indução que apresentou, para melhor visualizar o efeito dose-dependente da STI1. Normalização pelo controle negativo.

O processo de padronização deste ensaio nos permitiu perceber uma grande variabilidade entre os experimentos e, especialmente, entre diferentes lotes de Matrigel adquiridos do fabricante. Isso nos levou a buscar alternativas para diminuir esta variabilidade e, conseqüentemente, nos dar poder estatístico para confirmar os efeitos angiogênicos de STI1 a partir dos resultados que apresentamos. Algumas alterações no protocolo se mostraram necessárias, como o carenciamento das células por 24h, para

aumentar o limiar de resposta aos estímulos angiogênicos, e contagem seguida do plaqueamento das HUVECs nos poços já contendo o tratamento, para evitar assim um número subestimado de células, em função da perda durante as lavagens para retirada do soro e sucessivas diluições e homogeneizações com meio para plaqueamento. Pequenas variações nessas etapas podem ter reflexos importantes na obtenção de uma densidade ideal de células, o que é crucial para a formação apropriada de tubos. Seguindo ainda o protocolo de ARNAOUTOVA e KLEINMAN (2010), passamos a empregar o EBM-2 (*Endothelial Basal Medium*), específico para o cultivo de células endoteliais. As células foram mantidas em DMEM e, antes de serem plaqueadas para o ensaio sobre o Matrigel, passaram por um período de 2 dias em meio EBM-2, que foi mantido durante o ensaio propriamente dito.

A indução basal de formação de tubos de HUVECs em Matrigel GFR se mostrou menos intensa do que a obtida no matrigel basal e HC (Figura 20). De certa maneira, isto poderia ser esperado uma vez que este tipo de matriz tem uma menor proporção de fatores de crescimento. Portanto, sua propriedade angiogênica intrínseca também está mais limitada. Em teoria, seria mais fácil observar o efeito de fatores pró-angiogênicos do que nas outras matrizes anteriores. Como controle positivo, utilizamos duas concentrações de SFB (1 e 2%), que foram capazes de induzir um nível máximo de estímulo sem ultrapassar o limite em que as HUVECs começassem a se agregar, ao invés de apenas se organizarem em tubos (como observado na Figura 17).

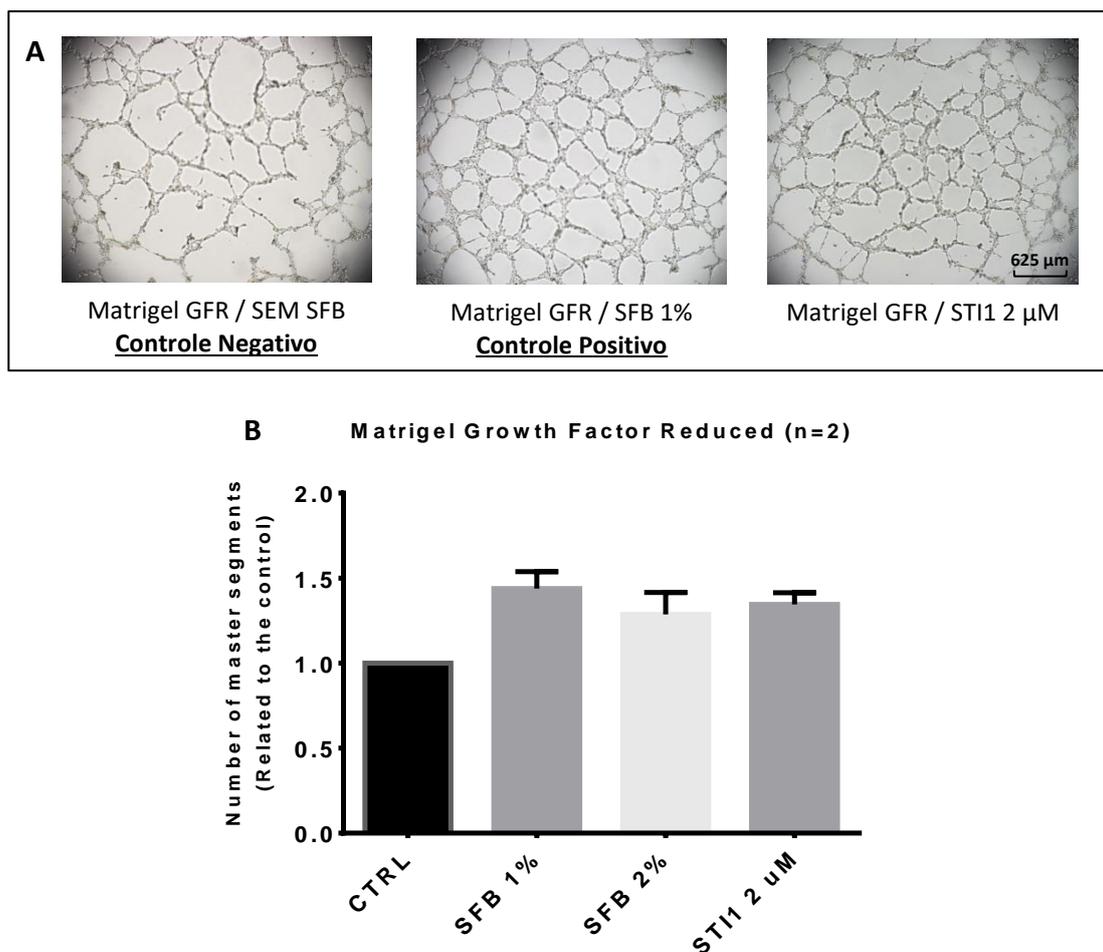


Figura 20 – Quantificação do número de elementos de vasos formados pelas HUVECs em Matrigel GFR. **A)** Imagens representativas do ensaio de formação de tubos. **B)** Gráfico da quantificação do número de elementos de vasos formados pelas HUVECs em Matrigel GFR, sob diferentes tratamentos. Normalização pelo controle negativo.

Sendo assim, depois de vários experimentos de padronização e contratempos em relação aos lotes de Matrigel GFR, alguns aparentemente menos depletados dos fatores de crescimento, e até mesmo por algumas passagens de HUVECs pouco responsivas, além do meio EBM-2 (pela provável degradação dos nutrientes, em função de sucessivos processos de aquecimento/resfriamento do frasco de estoque para uso na cultura), que acabaram atrasando a conclusão dos experimentos por terem levado a interpretações errôneas dos efeitos observados, nossos resultados demonstraram, afinal, um perfil pró-angiogênico da ST11, em um nível abaixo

do SFB, mas visualmente observável pelas imagens, e comprovado pela quantificação dos elementos de vasos.

Embora não seja possível reproduzir toda a complexidade do processo angiogênico mimetizado pelos ensaios *in vivo* – abrangendo além das células endoteliais, as células de sustentação dos vasos, como pericitos e células de músculo liso, fibroblastos, células tumorais, mesenquimais e circulantes, assim como fatores diversos presentes em cada microambiente específico – que devem ser conduzidos em paralelo para confirmar a relevância dos achados *in vitro*, a utilização de linhagens endoteliais permite estudar, isoladamente, o mecanismo de ação de agentes pró/anti-angiogênicos (evitando a sua perda por metabolização), ou o efeito da regulação exógena da expressão de determinada proteína (superexpressão x *knockdown*) implicada no processo (STATON et al. 2004; ARNAOUTOVA e KLEINMAN 2010). Em contraste com a potencial vantagem de reunir, em um único experimento, a observação simultânea de características das células endoteliais necessárias a angiogênese, como adesão, migração e diferenciação em tubos (reproduzindo algumas das etapas que acontecem *in vivo*), associada à praticidade de execução do método e à rápida obtenção de resultados (entre 12-16h) facilmente quantificáveis, o ensaio de formação de tubos deve ser considerado com cautela na sua interpretação. Uma das principais limitações do método está na natureza bi-dimensional em que as estruturas tubulares se formam, remetendo mais a cordões ou processos celulares do que a tubos propriamente ditos contendo lúmen, o que se torna um viés, levando-se em conta que outros tipos celulares, como fibroblastos e células tumorais, inclusive de glioblastoma humano, como a U87, também se comportam desta maneira quando em contato com o Matrigel. Outra desvantagem se encontra na robustez dos efeitos pró-angiogênicos, uma vez que mesmo usando preparações especiais de Matrigel GFR, com redução dos fatores de crescimento naturalmente presentes na matriz, os altos níveis basais de formação de tubos nos controles negativos (ideais para o estudo de agentes anti-angiogênicos) restringem a janela de observação do estímulo (GOODWIN 2007), tanto no controle positivo, como

no tratamento com a STI1, o que acabou requerendo ajustes finos na padronização do nosso ensaio para se conseguir medidas reprodutíveis.

5.3.2 Angiogênese em Gel de Fibrina: Culturas 3D em Microcarreadores e Tumores Pré-Vascularizados

Os modelos tridimensionais *in vitro* foram padronizados em paralelo à obtenção dos resultados pelos ensaios de anel aórtico (descritos adiante), em função da sua maior flexibilidade para elucidar mecanismos responsáveis pelo potencial efeito pró-angiogênico da STI1. Diferente dos anéis aórticos, por se tratarem de explantes avaliados *ex vivo*, com a presença de pericitos e células de músculo liso (células de suporte) diretamente associados às células endoteliais, os modelos 3D *in vitro* se baseiam na formação de microvasos propriamente ditos (contendo lúmen) a partir de uma única população de células endoteliais (HUVECs), que podem ser previamente modificadas geneticamente (para silenciar PrP^C por exemplo), ou analisadas pelo seu perfil de expressão global de proteínas após o tratamento com STI1 ou co-cultura com as GL261, variando também entre condições de normóxia e hipóxia. Da mesma forma, havíamos planejado utilizar células endoteliais microvasculares que foram isoladas dos cérebros de camundongos da mesma linhagem que utilizamos para os implantes ortotópicos, conforme metodologia descrita nesta tese. Assim, teríamos ferramentas para avaliar se a STI1 secretada pelo tumor de GL261 poderia atuar diretamente sobre as células microvasculares cerebrais, influenciando a angiogênese peritumoral.

As metodologias utilizadas foram reproduzidas de trabalhos que preconizaram esses modelos para um estudo abrangente da angiogênese, tanto do ponto de vista estrutural quanto bioquímico (NAKATSU e HUGHES 2008). O ensaio sobre microcarreadores (*beads*) foi desenvolvido como base experimental para se entender como vias de sinalização estimuladas por diferentes fatores solúveis levam a efeitos promotores ou inibitórios da angiogênese sobre as HUVECs, células amplamente utilizadas como

modelo em estudos de biologia vascular. Por outro lado, a construção *in vitro* de tumores pré-vascularizados (PVT) permite expandir as aplicações das matrizes 3D para simular as interações entre células tumorais e endoteliais encontradas no microambiente tumoral. Concebido a partir de uma adaptação do ensaio sobre microcarreadores, no ensaio de PVT, as células tumorais não encontram uma rede vascular pré-existente como acontece quando são implantadas no organismo vivo, mas são combinadas às HUVECs na forma de esferoides no início do experimento. Mesmo assim, os microvasos intratumorais observados por este ensaio seguem o mesmo padrão da vasculatura tumoral *in vivo* (apresentando uma morfologia irregular, com diâmetros heterogêneos e maior número de ramificações), derivando da infiltração de uma rede vascular normal formada primeiro pela reorganização das HUVECs ao redor dos esferoides, a qual se estende radialmente pela matriz como nos ensaios com microcarreadores. Além disso, os PVTs também revelaram que, a partir da formação dessa vasculatura intratumoral (3 a 4 dias após o início do experimento), linhagens celulares altamente metastáticas, como a SW620, de câncer de cólon, ainda eram capazes de ativar mecanismos de EMT (transição epitélio-mesênquima) que permitiam resgatar seu fenótipo para migração intravascular (EHSAN et al. 2014). Por essa razão, considerando a íntima relação que existe entre as células de glioma e o endotélio, decidimos explorar este ensaio de modo a verificar se as GL261, assim como as SW620, seriam capazes de resgatar seu fenótipo, e utilizar os microvasos recém-formados de HUVEC como guia também para invasão perivascular. Com isso, teríamos, assim como para a angiogênese, um modelo *in vitro* igualmente manipulável geneticamente, e possível de ser analisado em relação ao perfil de expressão das células envolvidas, o qual seria utilizado para mimetizar os estágios iniciais de progressão dos glioblastomas, que antecedem os eventos de angiogênese. Imagens representativas da padronização de ambos os ensaios encontram-se na Figura 21, assim como aquelas que exemplificam o trabalho de EHSAN et al. (2014).

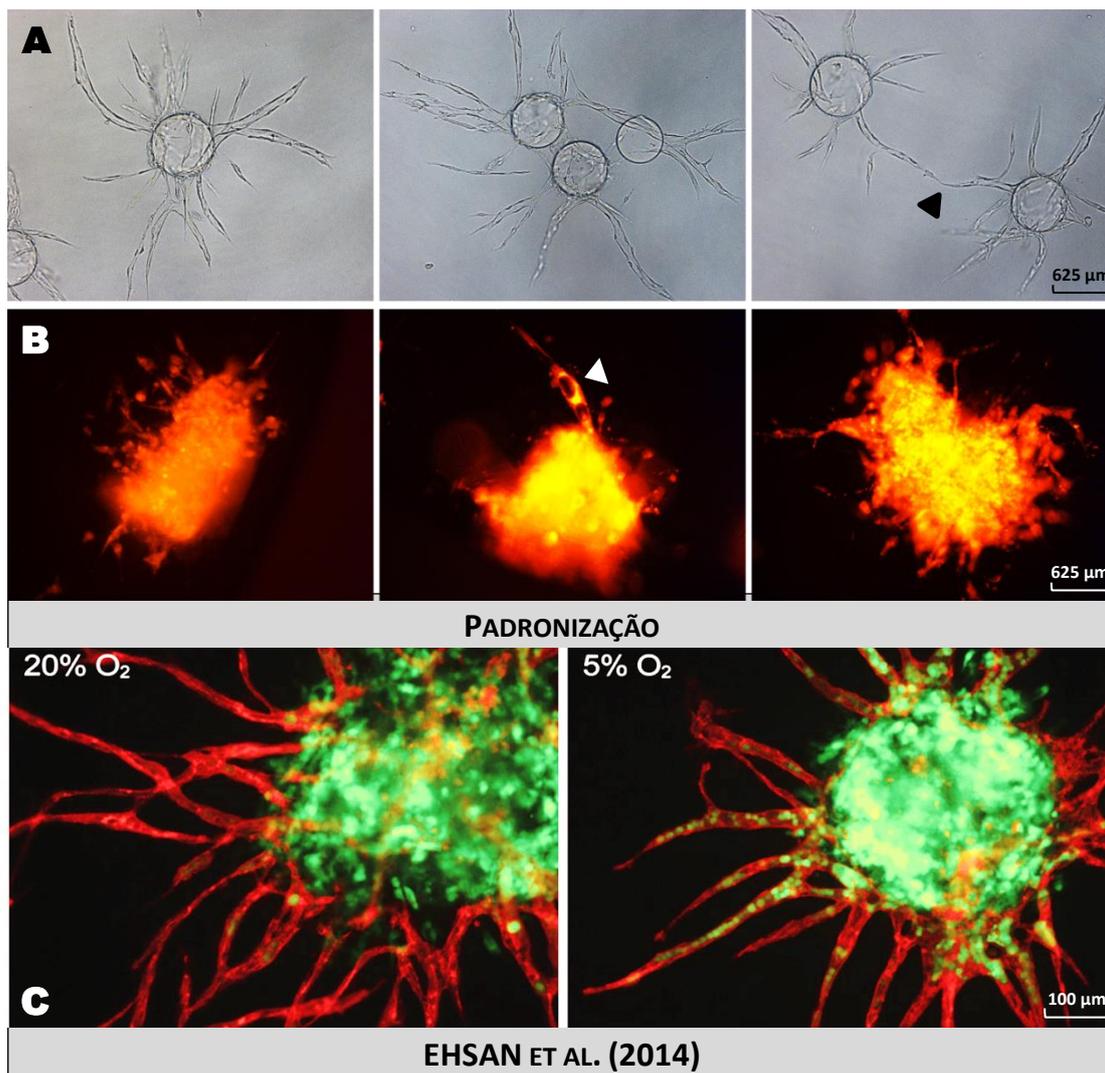


Figura 21 – Padronização dos ensaios de angiogênese em gel de fibrina. **A)** Microvasos de HUVEC ancorados por *beads* em gel de fibrina após 7 dias de cultura: Seta preta indica a formação de uma anastomose entre microvasos provenientes de *beads* diferentes. **B)** Células GL261-RFP, visualizadas por fluorescência, migrando a partir de Tumores Pré-Vascularizados (PVT) por HUVECs em gel de fibrina após 12 dias de cultura: Seta branca mostra célula tumoral possivelmente envolvendo um microvaso. **C)** Imagens extraídas do trabalho de EHSAN et al. (2014) demonstrando o funcionamento do ensaio de PVT: Intravasamento induzido por hipóxia de células SW620 (linhagem de câncer de cólon) transduzidas com EGFP (verde) em microvasos de HUVECs marcadas por imunofluorescência com CD31 (vermelho), após co-cultura combinada de esferoides contendo ambas as células.

Não obstante a padronização bem-sucedida da formação de microvasos sobre microcarreadores, os experimentos precisaram ser descontinuados tanto pelo problema de contaminação da STI1 revelado

através dos ensaios de anel aórtico (a seguir apresentados), quanto pela ausência de resultados *in vivo*, também realizados em paralelo, que fossem positivos para invasão perivascular. Em relação ao ensaio de PVT, infelizmente não contávamos, a época, com o lentivírus para expressão de GFP nas HUVECs, por isso as imagens mostram apenas os esferoides de GL261-RFP, observados por microscopia de fluorescência (Figura 21B). Estes não apresentaram uma capacidade de invasão evidente, já que um baixo número de pequenas projeções de células aparecem migrando para longe do tumor. Mesmo assim, no entanto, era possível sugerir, por microscopia de campo claro, que existia uma associação dessas projeções ao longo dos microvasos.

Para demonstrar este dado, as imagens de fluorescência dos esferoides de GL261 poderiam ter sido sobrepostas às imagens de campo claro dos microvasos, mas a visualização dentro da matriz foi comprometida pela presença dos fibroblastos em suspensão, tornando pouco nítida a visualização dessa associação.

5.3.3 Ensaio de Anel Aórtico

A proposta deste ensaio surgiu da necessidade de se comprovar, pelo modelo que melhor mimetizasse as etapas envolvidas na angiogênese e mais se aproximasse do processo observado *in vivo*, a atividade pró-angiogênica da STI1 recombinante que havia sido sugerida, inicialmente, pelo ensaio de formação de tubos. Desta forma, buscamos descobrir se a STI1 seria capaz de estimular diretamente as células endoteliais contidas nos explantes de aorta, em condições fisiológicas, para então determinarmos, posteriormente, seu possível papel na angiogênese tumoral. Para isso, utilizamos explantes de aorta de camundongos C57BL/6J, mesma linhagem utilizada para o modelo tumoral ortotópico, de modo a verificar se a STI1 secretada pelas GL261 poderia mesmo funcionar como um fator pró-angiogênico, ao qual as células do hospedeiro seriam responsivas.

Uma série de experimentos foi então realizada com o intuito de determinar a menor concentração em que a STI1 poderia exercer seu efeito pró-angiogênico em anéis extraídos de animais tipo-selvagem neonatos, assim como avaliar se a STI1 Δ ainda manteria essa mesma propriedade, apesar de ter sido deletado na sua estrutura o sítio de ligação a PrP^C (Figura 22), além da resposta angiogênica dos anéis derivados de animais STI1^{+/-} (Figura 23) e PrP^{0/0} (Figura 24) ao tratamento com ambas as proteínas.

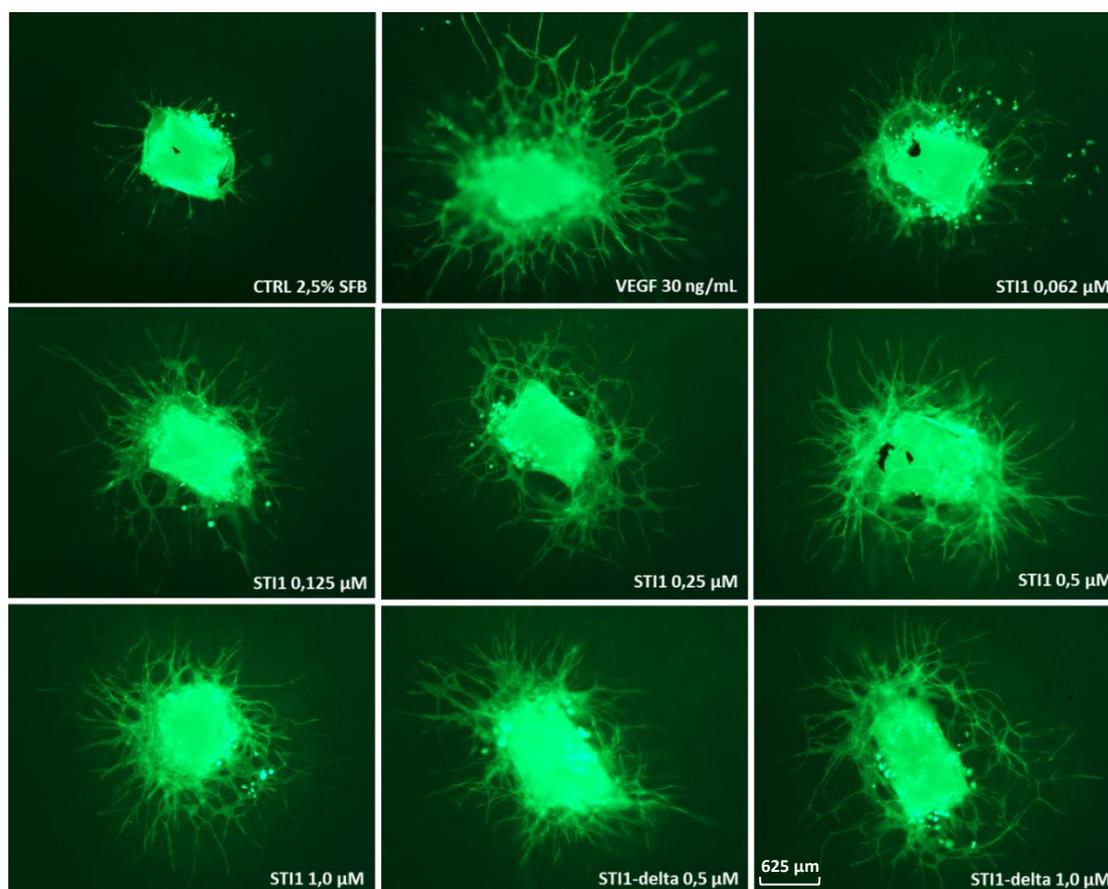


Figura 22 – Anéis aórticos de neonatos (P6) de C57BL/6J STI1^{+/+} com ramificações de microvasos, marcados por IB₄-Alexa Fluor[®] 488, após o tratamento com o controle positivo (VEGF 30 ng/mL), ou diferentes concentrações de STI1 e STI1 Δ , e cultura por 7 dias. O controle negativo continha apenas 2,5% de soro fetal bovino (SFB), que é a condição basal para que o tratamento possa estimular a formação consistente de microvasos.

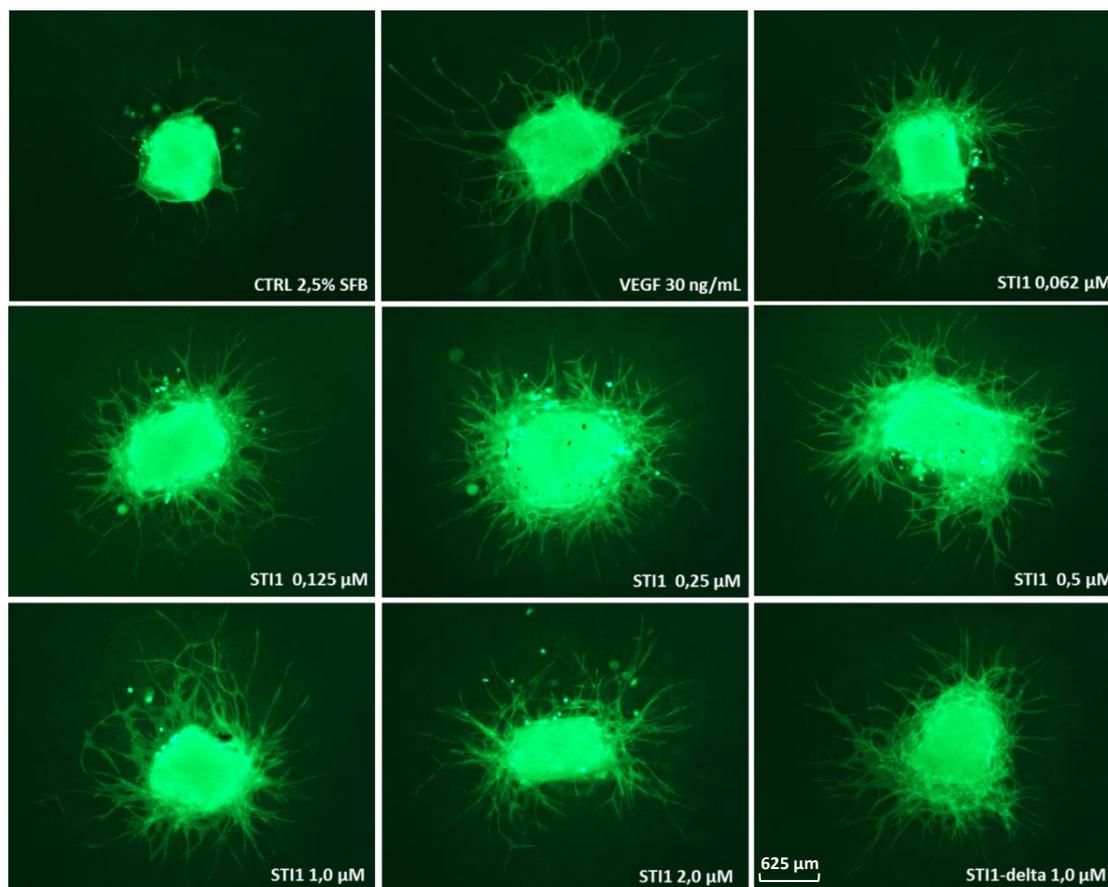


Figura 23 – Anéis aórticos de neonatos (P6) de C57BL/6J $STI1^{+/-}$ (haploinsuficientes) com ramificações de microvasos, marcados por IB₄-Alexa Fluor[®] 488, após o tratamento com o controle positivo (VEGF 30 ng/mL), ou diferentes concentrações de STI1 e STI1 Δ , e cultura por 7 dias. O controle negativo continha apenas 2,5% de soro fetal bovino (SFB), que é a condição basal para que o tratamento possa estimular a formação consistente de microvasos.

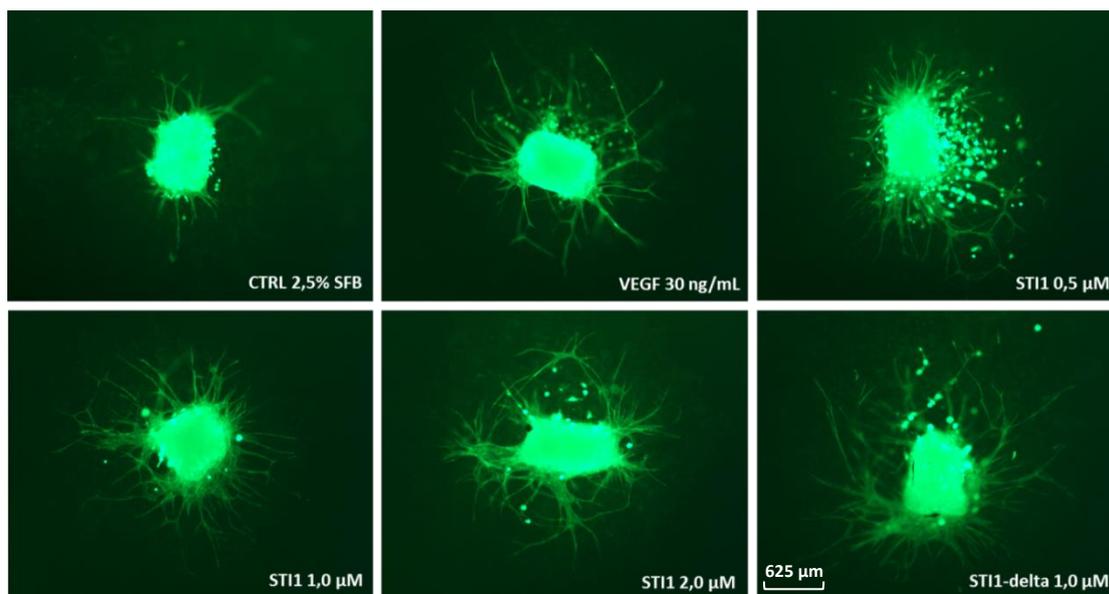


Figura 24 – Anéis aórticos de neonatos (P6) de C57BL/6J PrP^{0/0} com ramificações de microvasos, marcados por IB₄-Alexa Fluor[®] 488, após o tratamento com o controle positivo (VEGF 30 ng/mL), ou diferentes concentrações de STI1 e STI1Δ, e cultura por 7 dias. O controle negativo continha apenas 2,5% de soro fetal bovino (SFB), que é a condição basal para que o tratamento possa estimular a formação consistente de microvasos.

Porém, negligenciamos o fato de que proteínas recombinantes carregam uma alta contaminação por lipopolissacarídeos (LPS), decorrente da lise das bactérias nas quais foram produzidas, apesar das etapas de purificação subsequentemente realizadas. Infelizmente, este é um fator que se mostrou altamente limitante para a interpretação dos resultados que foram apresentados até aqui, sugerindo um efeito de estimulação da angiogênese pela STI1 recombinante. O LPS, conforme descrito na literatura (APLIN et al. 2014), é capaz de induzir a formação de microvasos, a partir de anéis aórticos, em concentrações mínimas de até 1 ng/mL. Pela dosagem que fizemos em nossa preparação de STI1 recombinante, encontramos uma concentração de 29,2 μg/mL de LPS, razão pela qual não seria possível, mesmo fazendo várias diluições, testar o efeito da STI1 em uma faixa de concentrações nas quais é comum se observar outros de seus efeitos, geralmente entre nano e micromolares (ERLICH et al. 2007; BERALDO et al. 2010; SANTOS et al. 2011; TSAI et al. 2012; BERALDO et al. 2013;

SANTOS et al. 2013). Além disso, não poderíamos ignorar o fato de que uma molécula tão reativa quanto o LPS traria interferências imprevisíveis para a elucidação de um possível mecanismo, ou que sua presença, mesmo em baixas concentrações, seria responsável pelos efeitos erroneamente atribuídos à proteína recombinante, como aconteceu em nosso trabalho (Figura 25), similar a exemplos encontrados na literatura (GAO e TSAN 2003; TAYLOR et al. 2005; WAKELIN et al. 2006). No caso específico das células endoteliais, sua maquinaria pró-inflamatória constitutiva confere uma maior sensibilidade a endotoxinas (LPS, seu componente bioativo), que são liberadas em abundância na circulação pela lise de bactérias gram-negativas após o tratamento com antibióticos. Essa função fisiológica que as células endoteliais desempenham (mediada pelos receptores *Toll-like* – TLR) constitui uma das barreiras do organismo contra a disseminação de infecções. Após alcançarem os vasos sanguíneos, bactérias, vírus e fungos podem levar, em casos extremos de resistência ao tratamento antibiótico, ao choque séptico, que ocorre pela queda na pressão sanguínea em decorrência de uma vasodilatação sistêmica. Esse efeito resulta de uma resposta leucocitária (liberação de NO, citocinas, enzimas líticas e espécies reativas de oxigênio – ROS) excessiva e deletéria para as células endoteliais que contribuíram inicialmente para a sua ativação. Com a subsequente baixa oxigenação dos tecidos, em função do maior extravasamento de fluidos sanguíneos através de discontinuidades da parede vascular, atrelado à vasodilatação pela secreção leucocitária de NO, além da oclusão de vasos pela fragmentação de coágulos após se exaurir a capacidade de regeneração vascular, pode-se chegar ao quadro terminal de falência dos órgãos (DUDLEY 2006; OPAL e POLL 2015).

Mesmo diante de todas essas evidências, a grande maioria dos artigos desconsidera a possibilidade de contaminação por endotoxinas nas proteínas recombinantes produzidas em bactérias, ao que DUDLEY (2006) sugere uma ampla revisão dos resultados apresentados na literatura, assim como a inclusão de controles de ensaio utilizando uma proteína mutante ou inativa obtida pelo mesmo processo de produção/purificação, especialmente

se o objetivo for testar efeitos anti-angiogênicos, ou que envolvam qualquer tipo de resposta das células endoteliais (TAYLOR et al. 2005).

A comparação com os efeitos gerados pelo LPS contaminante nas preparações de STI1 e STI1 Δ pode ser feita pela Figura 25, que mostra a atividade pró-angiogênica do LPS puro ao ser avaliado, de acordo com a sua dosagem prévia, em concentrações equivalentes aos menores níveis de contaminação encontrados em diluições mantendo a atividade de ambas as proteínas recombinantes.

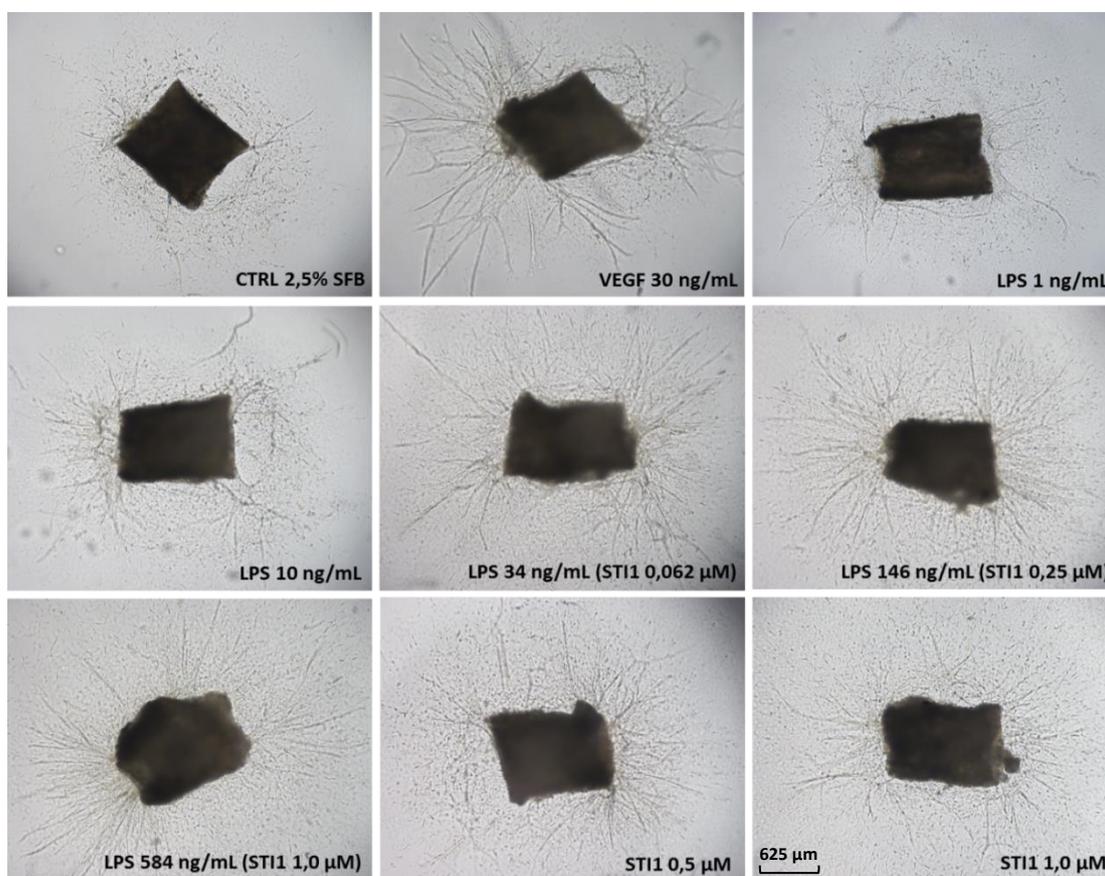


Figura 25 – Anéis aórticos de neonatos (P6) de C57BL/6J STI1^{+/+} com ramificações de microvasos visualizadas por microscopia de campo claro após o tratamento, e cultura por 7 dias, com diferentes concentrações de LPS, proporcionais às encontradas nas diluições de STI1 que apresentaram efeito, em comparação com a própria STI1 e o controle positivo (VEGF 30 ng/mL). O controle negativo continha apenas 2,5% de soro fetal bovino (SFB), que é a condição basal para que o tratamento possa estimular a formação consistente de microvasos.

Em vista destes resultados, os altos níveis de STI1 secretados pelas células GL261 se mostraram, na ocasião, uma alternativa viável ao uso da proteína recombinante, considerando a sua baixa associação a vesículas extracelulares e, conseqüentemente, a sua maior proporção disponível na forma solúvel. Uma vez que fosse possível isolar a STI1 do meio condicionado, garantindo a sua estabilidade em solução, seríamos capazes de testar seu efeito inibitório/estimulatório nos experimentos de angiogênese descritos anteriormente. Para isso, fizemos a biotinylation de anticorpos anti-STI1 e sua ligação a *beads* magnéticas revestidas com estreptavidina. O meio condicionado foi então incubado com essas *beads* e posteriormente precipitado com 15% de TCA (v/v) para avaliação da capacidade de depleção de STI1. Apesar de termos obtido um meio livre de STI1 após o tratamento com as *beads*, não conseguimos recuperar a STI1 isolada em função da sua baixa estabilidade no meio ácido utilizado para a quebra das ligações antígeno-anticorpo, independente do tempo de reação testado (Fig 26A). A coloração prévia das membranas de Western blot com Ponceau (Figura 26B) revelou a especificidade de captura da STI1 pelos anticorpos anti-STI1 imobilizados nas *beads*, sendo possível observar o perfil de secreção compatível de outras proteínas pelas GL261 no meio total, em comparação com o meio depletado. Outra maneira de romper as ligações anti-STI1-STI1 seria utilizando soluções de alta força iônica (com altas concentrações de eletrólitos), mas tornaria-se inevitável uma etapa adicional de diálise para a remoção do excesso de eletrólitos. Mesmo que este processo tivesse maior sucesso em manter a estabilidade da STI1 isolada, por ser um método mais brando em relação às condições de pH baixo (o que seria mais crítico ainda para a forte ligação anti-STI1-STI1, dificilmente desfeita quando realizada por *Western blot*), o período necessário para o desligamento da STI1 das *beads*, somado à diálise *overnight* da solução de eluição, poderiam levar a perdas no rendimento de recuperação da proteína, além dos volumes necessários para eluição da STI1 poderem diluir a preparação, a ponto de dificultar a sua utilização nas concentrações estabelecidas para os ensaios funcionais. Como não tínhamos à disposição

outro método para o isolamento de STI1, que aliasse eficiência a rendimento, precisamos abandonar esta estratégia.

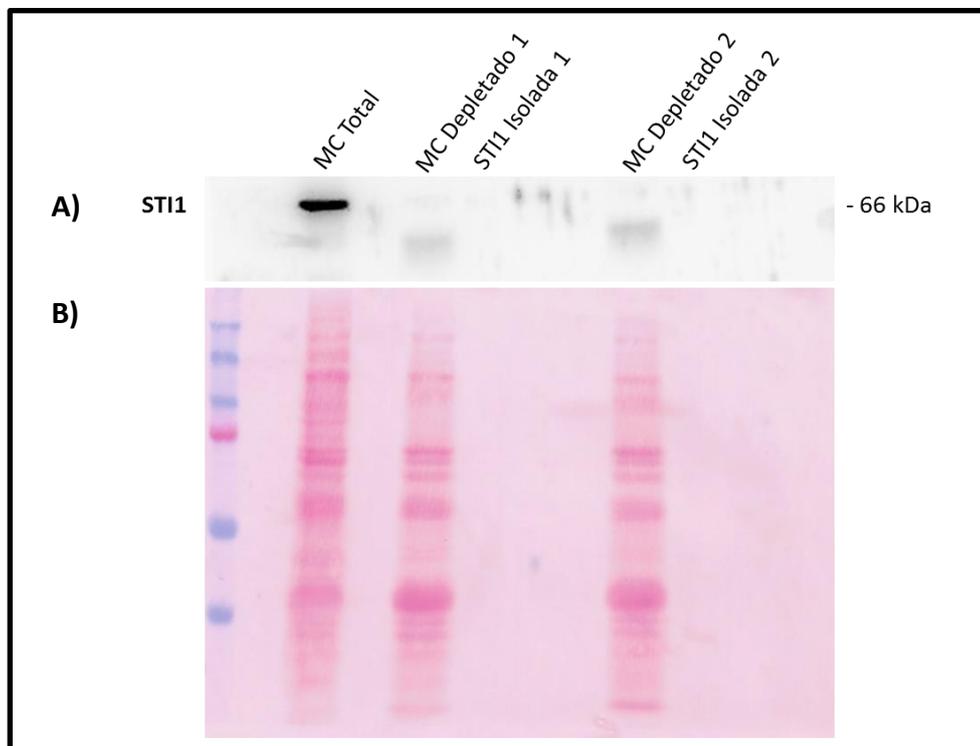


Figura 26 – Imunodepleção de STI1 do meio condicionado de GL261 por *beads* magnéticas. **A)** Detecção de STI1 por Western blot no meio condicionado total (MC total) e ausência da banda específica tanto para os meios depletados, como para a eluição de STI1 das *beads*. A diferença entre as duas depleções foi o tempo de exposição das *beads* à glicina 0,15 M pH 3,0 para recuperação da STI1 (MC 1: 1 min; MC 2: 2 min), sendo ambos os meios depletados obtidos da mesma forma. **B)** Coloração prévia por Ponceau da mesma membrana utilizada para detecção de STI1, representada na imagem A, mostrando o perfil de secreção das proteínas de GL261 no meio total e depletado.

Sendo assim, os resultados da avaliação da atividade angiogênica da STI1 precisaram ser invalidados pela ausência de uma preparação de STI1 recombinante livre de LPS, ou que pudesse ser obtida sem perdas consideráveis de rendimento pela baixa eficiência do kit de remoção de LPS disponível no laboratório.

5.4 IMPLANTES INTRACEREBRAIS ORTOTÓPICOS DE CÉLULAS GL261 E CRESCIMENTO TUMORAL *IN VIVO*: CORRELAÇÃO COM O REMODELAMENTO VASCULAR *EX VIVO*

Neste ponto, como não havia mais perspectivas de determinar o perfil funcional da STI1 em relação aos ensaios de angiogênese *in vitro* e *ex vivo*, nos concentramos em determinar como a STI1 secretada pelos tumores ortotópicos de GL261 influenciaria diretamente o desenvolvimento tumoral.

O modelo murino foi inicialmente padronizado em termos do número de células a ser implantado por camundongo, por meio de uma curva de crescimento *in vivo*. O primeiro grupo de animais recebeu células GL261-RFP nas densidades de 10×10^4 e $2,5 \times 10^4$, e GL261-LUC na de 5×10^4 . O exame histopatológico não revelou diferenças entre os tumores gerados pelas células originais ou modificadas, ambos com grandes extensões de crescimento tumoral (como visto na Figura 41), não havendo, portanto, interferência da expressão de luciferase no fenótipo das células GL261, conforme previamente descrito na literatura (CLARK et al. 2014). Os tumores originados das injeções de 10×10^4 e 5×10^4 células, porém, evoluíram muito rapidamente, em no máximo 20 dias de acompanhamento (quando os animais atingem um estado de acometimento tumoral severo), se distanciando das condições ideais otimizadas para este modelo, o qual prevê cinco fases de desenvolvimento tumoral (I – implantação; II – organização perivascular; III – fase proliferativa; IV – regressão vascular levando à hipóxia e consequente secreção de VEGF; V – neovascularização das áreas tumorais perinecroticas) ocorrendo no período de 1 mês após a implantação (NEWCOMB 2009). O excesso de células implantadas poderia favorecer uma progressão atípica dos tumores, induzindo a formação precoce de uma massa tumoral, que passaria a crescer mesmo que não houvesse, necessariamente, a difusão das células infiltrando o tecido adjacente, que é a principal característica dos tumores gliais de alto grau reproduzidos por esse modelo. Por outro lado, como a implantação de $2,5 \times 10^4$ células gerou tumores com tempo de evolução mais próximo do

esperado, testamos uma nova curva de crescimento: $3,0 \times 10^4$, $2,0 \times 10^4$ e $1,0 \times 10^4$ GL261-LUC (Figura 27).

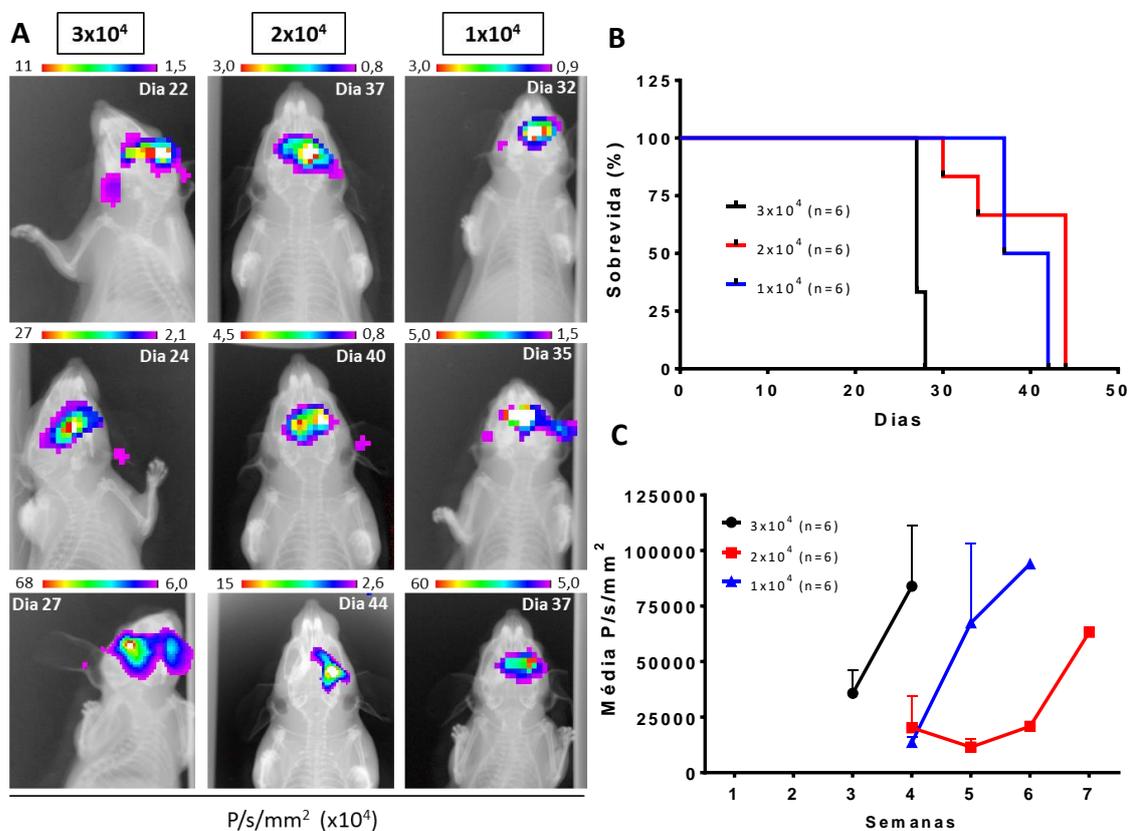


Figura 27 - Curva de crescimento *in vivo* de tumores ortotópicos de GL261-LUC em camundongos C57BL/6J avaliada por bioluminescência. **A)** Imagens representativas de bioluminescência sobrepostas ao raio-X de cada animal que recebeu o implante intracraniano de células em diferentes densidades. **B)** Curva de sobrevivência, Log-rank test $p = 0.005$. **C)** Curva das intensidades médias de bioluminescência tumoral. Sinal de bioluminescência expresso em fótons/segundo/mm² (P/s/mm²) e resultados em média±erro padrão.

Com este experimento, fomos capazes de estabelecer um limite mínimo para a implantação das células, que foi utilizado para os experimentos seguintes, uma vez que nem todos os animais dos grupos que receberam $2,0 \times 10^4$ e $1,0 \times 10^4$ células desenvolveram tumores, enquanto todos os que receberam 3×10^4 células evoluíram de maneira muito similar, atingindo os estágios avançados da doença por volta de 1 mês pós-implantação. Os animais sem indícios de formação tumoral, por exame

microscópico, até 60 dias após a implantação foram excluídos da análise para se eliminar um possível viés relacionado à eventual perda de células durante os procedimentos de injeção intracraniana (refluxo, morte celular).

O imageamento intravital de bioluminescência revelou-se bastante robusto para a detecção de massas tumorais com 2 semanas de crescimento, bem antes dos primeiros sinais neurológicos ou da perda de peso, que começaram a surgir a partir da 3^o semana. Acompanhando a expansão do tumor pelo cérebro, o sinal aumentou progressivamente, em intensidade e extensão, até atingir níveis máximos quando os animais passavam a apresentar sinais clínicos de doença avançada.

Na busca por uma relação entre a STI1 e o desenvolvimento tumoral, utilizamos camundongos geneticamente modificados para avaliar se níveis variáveis da proteína nesses hospedeiros poderiam interferir no microambiente, modulando a interação das células GL261 com o parênquima cerebral. Sendo assim, as células GL261-LUC foram implantadas na densidade de 3×10^4 células/animal, conforme padronizado anteriormente, em animais *wild-type* (WT), haploinsuficientes para STI1 (STI1^{+/-}) e com superexpressão (2-3 vezes) de STI1 (TgA). Os animais do grupo controle apresentaram menor sobrevida, além de menores ganhos na intensidade de bioluminescência e maior perda de peso ao longo do tempo, em relação aos outros dois grupos, que não diferiram significativamente entre si em nenhum destes parâmetros avaliados (Figura 28). A sobrevida dos animais STI1^{+/-} e TgA variou entre 29 e 54 dias, em contraste com a do grupo WT, que se manteve em torno de 30 dias. Um dos primeiros sinais de evolução da doença, as perdas de peso puderam ser observadas somente a partir da terceira semana, em paralelo ao aumento da bioluminescência, com destaque para tumores crescendo em animais STI1^{+/-}, que passaram a apresentar, em média, os sinais mais intensos, ou ocupando áreas maiores, nas mesmas proporções da maioria dos tumores de TgA, embora alguns desses se aproximassem mais dos controles. Da mesma forma que houve uma grande variação na sobrevida de animais STI1^{+/-} e TgA, o perfil de crescimento tumoral avaliado por bioluminescência também se apresentou

bastante heterogêneo dentro de cada grupo, ao contrário dos níveis equivalentes de bioluminescência obtidos para os animais do grupo controle.

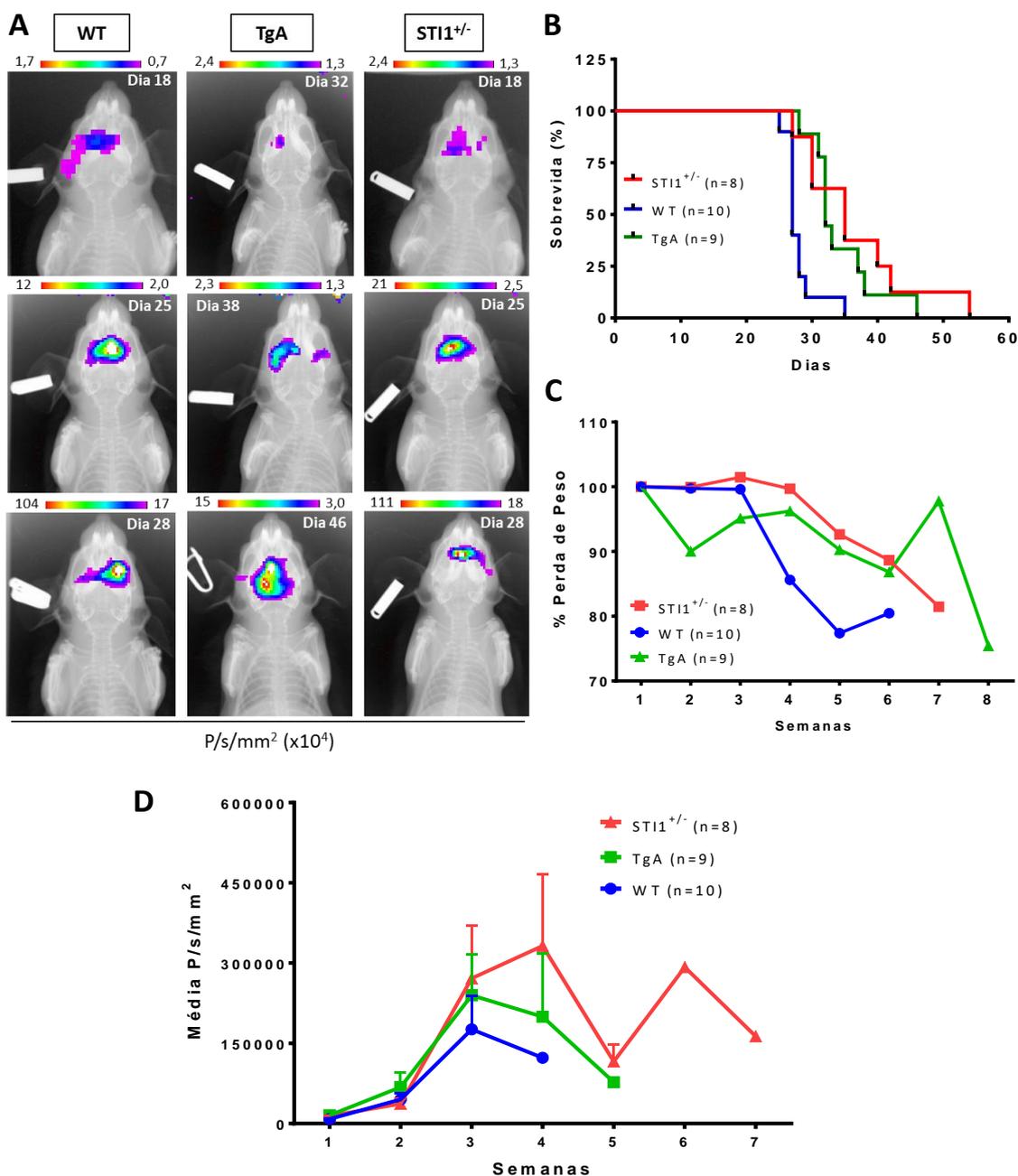


Figura 28 – Crescimento de tumores ortotópicos de GL261-LUC em camundongos C57BL/6J WT, STI1^{+/-} e TgA acompanhado por bioluminescência. **A)** Imagens representativas de bioluminescência sobrepostas ao raio-X dos animais de cada grupo que receberam implantes intracranianos na densidade padronizada de $3,0 \times 10^4$ células/animal. **B)** Curva de sobrevivência, Log-rank test $p = 0.005$. **C)** Gráfico da porcentagem de perda de peso. **D)** Curva das intensidades médias de bioluminescência tumoral. Sinal de bioluminescência expresso em fótons/segundo/mm² (P/s/mm²) e resultados em média±erro padrão.

Do ponto de vista histológico, observou-se uma clara distinção entre os grupos de animais testados, considerando a marcação específica de endotélio com CD31 por imunofluorescência dos cortes de cérebro (Figura 29). A densidade de vasos intratumorais em cérebros de animais haploinsuficientes (STI1^{+/-}), que expressam metade dos níveis normais de STI1 em seus tecidos, foi aparentemente muito mais abundante em relação aos animais controle. Em contraste, os tumores de animais TgA apresentaram-se bem menos vascularizados que o normal, não raro havendo marcações praticamente nulas de vasos em alguns campos, tornando questionável a dependência intrínseca, relatada na literatura (ZAGZAG et al. 2000b; ZAGZAG et al. 2008; BAKER et al. 2014), do crescimento tumoral em relação à vasculatura cerebral para este modelo ortotópico. Por este mesmo raciocínio, os tumores de STI1^{+/-}, pela sua maior vascularização, deveriam evoluir muito mais rapidamente em função do maior suprimento sanguíneo, mas ao contrário, se igualaram aos de TgA em tempos de crescimento, refletindo, portanto, em curvas de sobrevivência indistinguíveis (Figura 28).

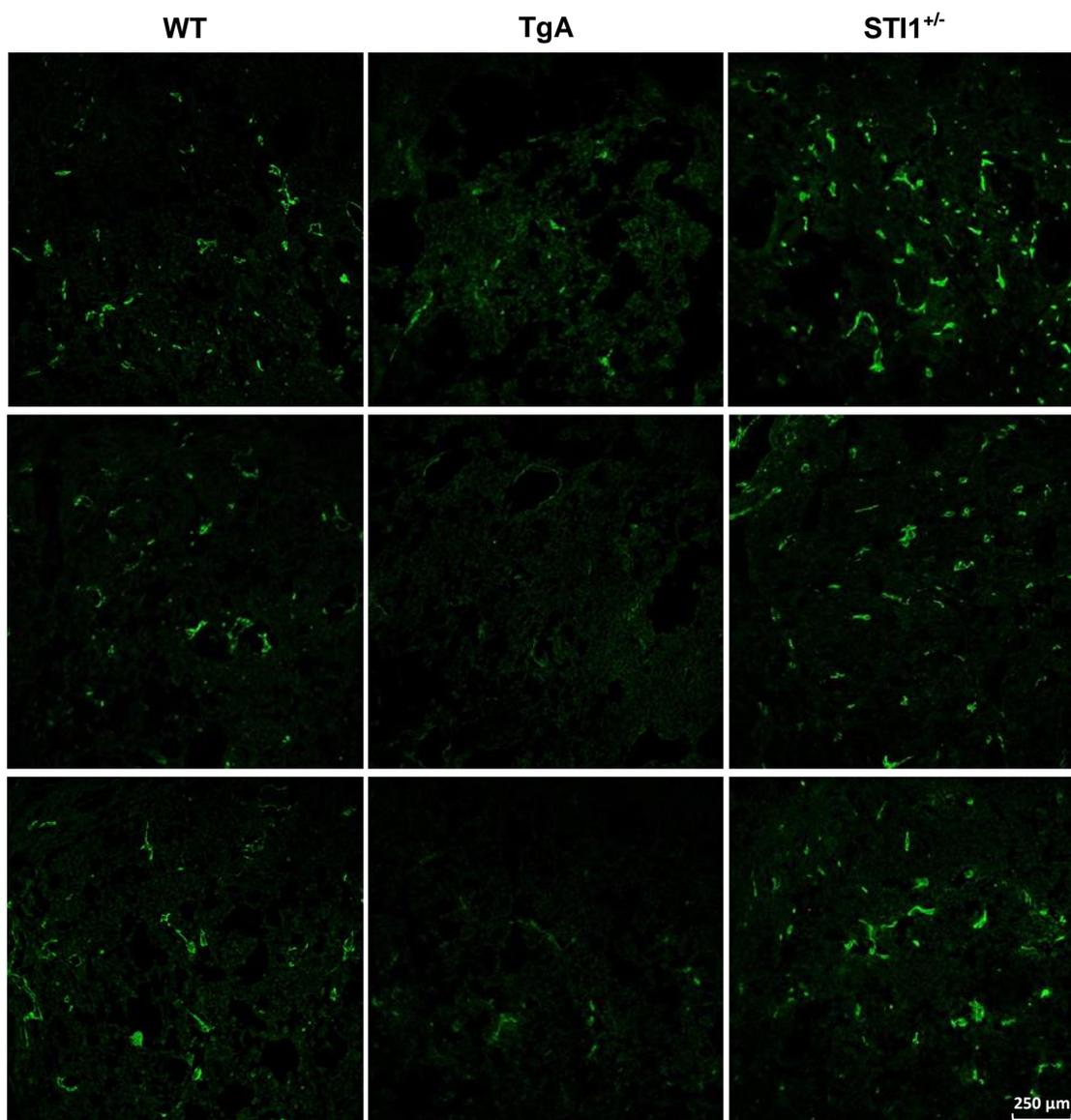


Figura 29 – Vascularização dos tumores ortotópicos de GL261-LUC em camundongos C57BL/6J WT, ST11^{+/-} e TgA observada através da marcação específica de endotélio com CD31 (Alexa Fluor® 488) por imunofluorescência dos cortes congelados (5 μm) de cérebro.

Baseado nas grandes quantidades de STI1 secretadas pelas células GL261, conforme observamos pelos experimentos *in vitro* (Figura 11A), nossa hipótese, até então, era de que o excesso de STI1 no microambiente tumoral poderia funcionar, em animais haploinsuficientes, como um hiperestímulo para células microvasculares cerebrais. Desta forma, haveria um gradiente de indução angiogênica acima do limiar de estimulação basal do

organismo, mais baixo em haploinsuficientes que nos controles, que romperia o equilíbrio homeostático em favor de uma formação exagerada de novos vasos, contribuindo então para uma vascularização tumoral precoce e mais intensa (Figura 30).

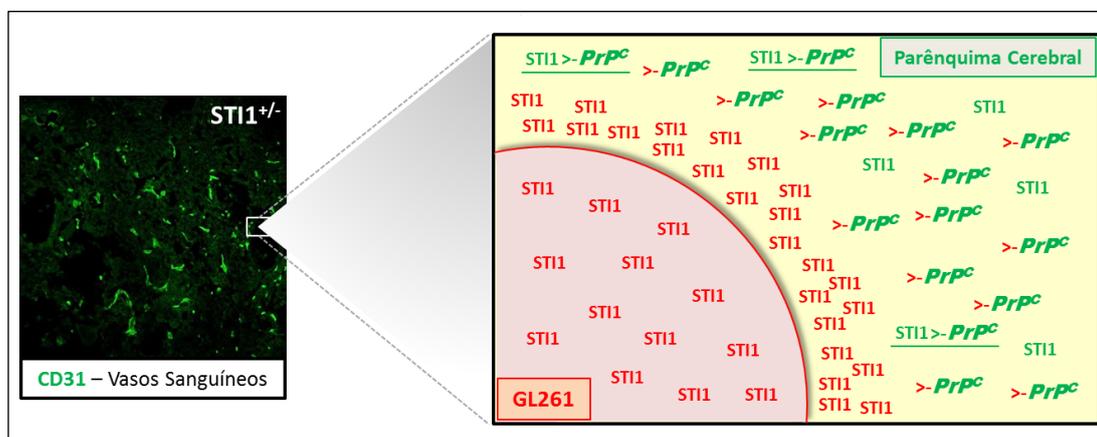


Figura 30 – Esquema representativo da hipótese sobre a hipervascularização dos tumores ortotópicos de GL261-LUC em camundongos C57BL/6J STI1^{+/-} previamente observada por imunofluorescência. Por este modelo, a massa tumoral secretando altos níveis de STI1 (vermelho) hiperestimularia receptores em células endoteliais do hospedeiro (provavelmente PrP^C, representadas em verde e negrito), os quais estariam mais disponíveis pela baixa expressão de STI1 (verde) no parênquima cerebral, gerando um desequilíbrio homeostático que induziria a ramificação da microvasculatura em direção ao tumor, desde as fases iniciais de seu desenvolvimento.

No entanto, a angiogênese tumoral pode acontecer por três mecanismos básicos: indução de células endoteliais locais, recrutamento de progenitores endoteliais da medula óssea (processo conhecido como vasculogênese) ou transdiferenciação das células tumorais em endoteliais (RICCI-VITIANI et al. 2010; WANG et al. 2010; PING e BIAN 2011; EKLUND et al. 2013). Pelos resultados que obtivemos, a relação inversa entre o nível de expressão constitutiva de STI1 nos camundongos e a proporção de vasos intratumorais poderia estar associada a qualquer um desses mecanismos. As culturas organotípicas de cérebro de camundongo surgiram então como uma solução nesse sentido, para comprovar se a STI1 secretada pelo tumor teria mesmo um efeito local também por este modelo, ou se atuaria a

distância, e se o acompanhamento, em tempo real, das células GL261 revelaria alguma alteração fenotípica durante a formação do tumor, mesmo sob as condições artificiais do experimento, quando se utiliza fatias de cérebro cultivadas *in vitro*. Como já foi descrito na literatura, utilizando o próprio modelo de GL261, que progenitores endoteliais provenientes da medula óssea não têm participação relevante na formação de novos vasos no cérebro (MACHEIN et al. 2003), e considerando ainda que as células GL261 não co-localizavam, nos tumores ortotópicos, com as marcações específicas de endotélio por CD31, a hipótese de que o tumor induziria a angiogênese da microvasculatura cerebral parecia então ser mais plausível.

Os explantes de cérebro conservam a sua arquitetura e viabilidade celular durante o período em cultura, mantendo a capacidade da vasculatura de se remodelar em função dos fatores secretados pelas células tumorais implantadas, apesar da ausência de perfusão sanguínea nas fatias (HUMPEL 2015; GHOOCHANI et al. 2016). O desenvolvimento ectópico dos tumores pode ser então modulado *in situ* para avaliação de seu potencial invasivo ou estimulador da angiogênese peritumoral.

Aquém da capacidade infiltrativa pela qual as células GL261 são conhecidas, o micro pellet implantado no parênquima cerebral apenas aumentou em tamanho, crescendo radialmente na forma de uma massa globular bem delimitada. Por outro lado, a rede vascular parecia estar mais ramificada na região adjacente ao tumor do que ao redor do pellet de astrócitos primários, utilizado como controle negativo. Essa diferença pode ser observada nas imagens da Figura 31, juntamente com a quantificação de parâmetros como extensão da rede vascular total ou de suas ramificações, que pôde ser obtida através do *plugin* para ImageJ, *Angiogenesis Analyzer*, utilizado anteriormente para análise da formação de tubos *in vitro*. A densidade vascular, porém, acabou se tornando inconclusiva para avaliação da angiogênese, uma vez que, pelas fatias sem tumores, a vascularização cerebral parece não variar em função das células tumorais, considerando as mesmas regiões utilizadas para a sua implantação. Isso pôde ser confirmado

quando descartamos a possibilidade de que houvesse alguma perda na responsividade das fatias, já que o tratamento com VEGF 30 ng/mL, nos últimos 3 dias de cultura, aumentou visualmente, de maneira sutil, o número de vasos e de ramificações, formando uma rede um pouco mais compacta de vasos, mesmo em fatias com implantes de GL261-RFP realizados em conjunto (Figura 32). Quando observadas no aumento de 20X, o mesmo padrão inalterado da vascularização peritumoral parecia se repetir em fatias de cérebro de animais ST11^{+/-} e Prp^{0/0} (*knockout* para PrP^C), não sendo possível observar diferenças evidentes em relação aos WT, considerando uma faixa maior do parênquima ao redor dos tumores. Porém, ao se analisar a região peritumoral em maiores detalhes, no aumento de 40X, foi possível inferir um aumento, novamente sutil, na densidade vascular em ST11^{+/-}, ao mesmo tempo em que se podia sugerir uma vascularização pouco responsiva às células GL261 em Prp^{0/0}, variando pouco em relação ao controle com astrócitos (Figura 32).

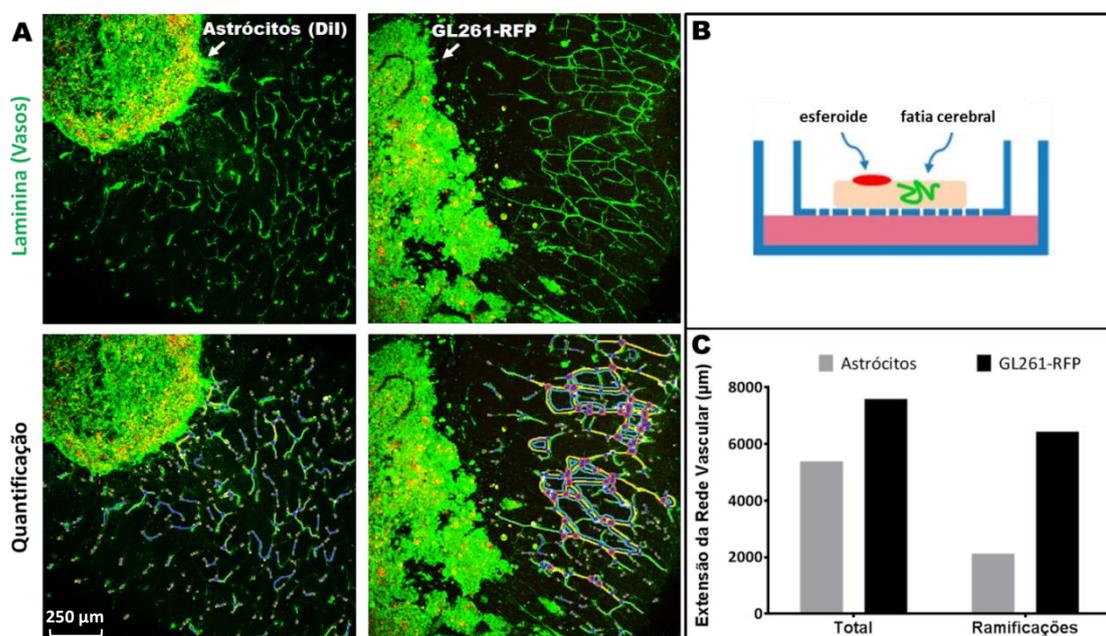


Figura 31 – Microvasculatura cerebral ao redor dos implantes de astrócitos (controle negativo), ou células GL261-RFP, em fatias de cérebro provenientes de camundongos C57BL/6J neonatos (P6-P7) avaliada por imunofluorescência. **A)** Imagens representativas das projeções vasculares em 2D, obtidas por microscopia confocal (séries Z) das fatias marcadas com anti-laminina (Alexa Fluor[®] 488), e o mapeamento dos vasos pela ferramenta *Angiogenesis Analyzer* do software

ImageJ, cobrindo toda a extensão da vasculatura. **B)** Esquema mostrando a configuração do experimento realizado em culturas organotípicas de cérebro: os esferoides de células são depositados na superfície das fatias, que ficam sobre insertos de membrana porosa em contato com o meio de cultura, de onde difundem rapidamente pelo tecido, interagindo totalmente com o parênquima. **C)** Resultados da quantificação dos vasos pelo ImageJ: extensão total dos vasos em cada imagem e extensão total das ramificações, que excluem da análise os vasos que não formam uma árvore vascular principal ou, pelo menos, aqueles que apareçam isolados (representados em azul), ou sem conexão com outros vasos (representados em verde).

No entanto, a vascularização das fatias de Prp^{0/0} como um todo, apresentava-se menos intrincada (deficiente em ramificações), tornando a interpretação dos resultados pouco conclusiva. Por sua vez, as células GL261-RFP, embora a marcação com anti-laminina se sobreponha a essas, parecendo reconhecê-las, foram dificilmente detectadas pelo canal de fluorescência vermelha (dados não apresentados) mostrando que, diferente dos astrócitos, essas células perderam, inesperadamente, boa parte da sua expressão de RFP ao longo dos experimentos, em comparação com o dia da implantação. Embora esse tenha sido um resultado inesperado, a aparente perda de expressão de RFP, no entanto, não estaria relacionada com a perda de viabilidade das GL261, já que a morfologia das células formando os tumores se manteve visível pela mesma marcação com anti-laminina, ou com a perda das suas características originais pela geração de clones de células-tronco tumorais, o que dependeria, para acontecer, de uma condição extrema como a hipóxia, a qual não foi avaliada.

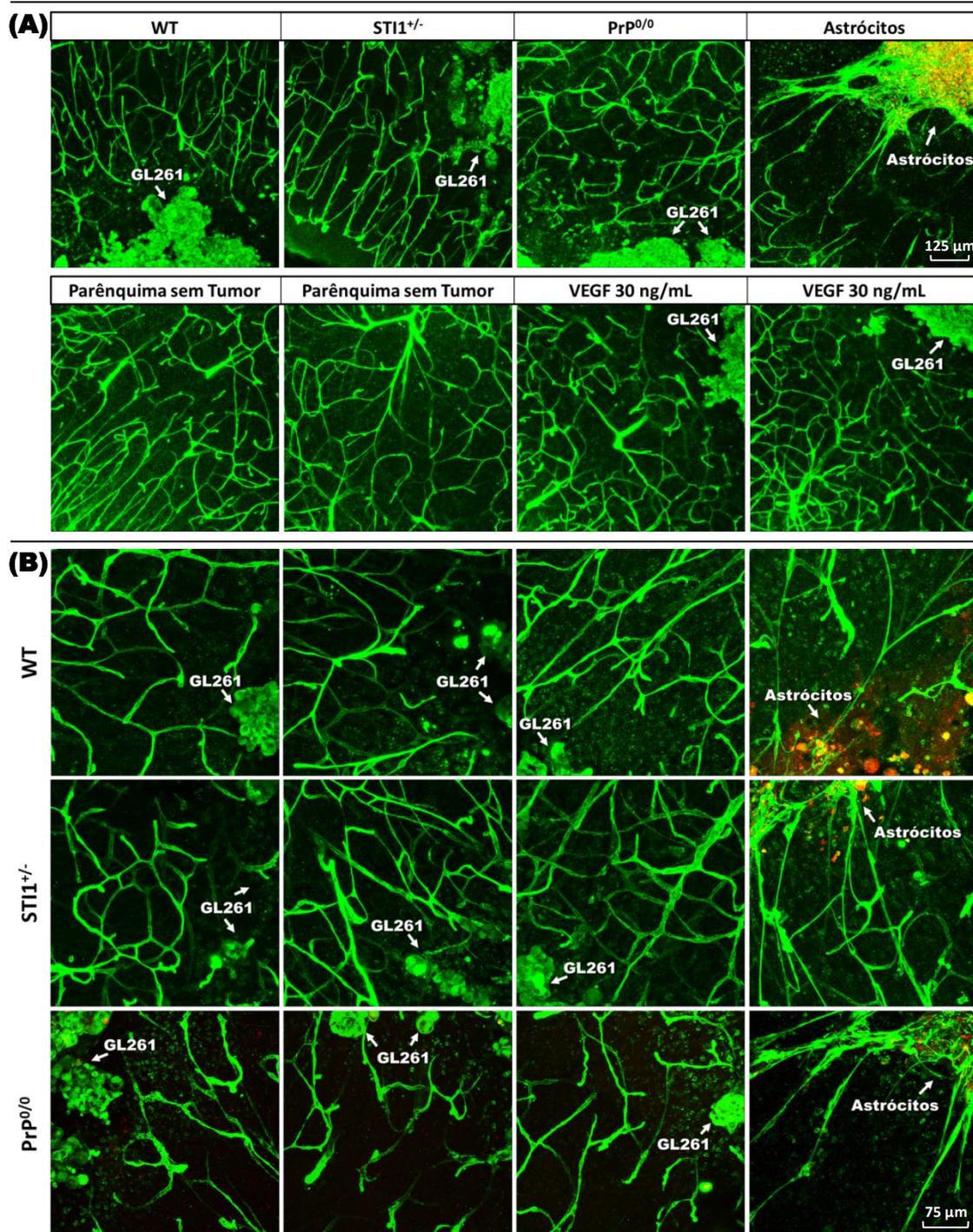


Figura 32 – Perfil vascular das culturas organotípicas de cérebro de camundongos C57BL/6J WT, STI1^{+/-} e PrP^{0/0} neonatos (P6-P7), e seu grau de responsividade aos implantes de GL261-RFP e astrócitos (controle negativo), ou tratamento com VEGF (controle positivo), avaliado por imagens de projeções 2D da vasculatura (séries Z) obtidas a partir da imunofluorescência com anti-laminina (Alexa Fluor[®] 488) por microscopia confocal. **A)** Imagens no aumento de 20X, em que não se observa diferenças na densidade vascular entre os genótipos, se assemelhando bastante àquela do parênquima de fatias que não receberam implantes. Devido ao maior número de ramificações curtas, as fatias tratadas com VEGF 30 ng/mL apresentaram uma vascularização ligeiramente mais densa. **B)** Imagens no aumento de 40X, pelas quais se pode avaliar, com maior precisão, a angiogênese peritumoral adjacente ao tumor, tornando possível diferenciar as fatias que tiveram maior vascularização em resposta aos tumores (STI1^{+/-}), daquelas menos vascularizadas (PrP^{0/0}), em comparação com os níveis basais encontrados em WT, e com os controles negativos usando astrócitos.

Devido às respostas ambíguas que obtivemos tentando reproduzir o processo tumoral nas culturas organotípicas conforme descrito na literatura, tanto em relação à modulação da angiogênese peritumoral (GHOOCHANI et al. 2016) quanto à invasão perivascular (YADAV et al. 2016), o que foi dificultado também por limitações técnicas enfrentadas na padronização de um método alternativo para a implantação das células, voltamos nossos esforços para os implantes ortotópicos, que poderiam nos dar respostas mais diretas sobre o grau de dependência que os tumores de GL261 teriam do sistema STI1-PrP^C para o seu desenvolvimento. Iniciamos trabalhando em duas frentes simultâneas para bloquear os efeitos da STI1 secretada pelo tumor: a primeira, destinada a reduzir os níveis de STI1 disponíveis, pelo tratamento intratumoral com anticorpos anti-STI1, e a segunda visando determinar, pelo uso de animais PrP^{0/0} e células GL261-LUC, o efeito da ausência de PrP^C na formação dos tumores ortotópicos. Mais adiante, realizamos também o tratamento intratumoral em animais PrP^{0/0} para verificar se haveria algum efeito aditivo da supressão de ambas as proteínas sobre a interação do tumor com o parênquima cerebral.

Adotando-se como referência os estágios iniciais de desenvolvimento tumoral para o início do tratamento com anti-STI1, estabelecemos o primeiro sinal de bioluminescência detectável como parâmetro para definir o

momento de implantação das bombas micro-osmóticas contendo o anticorpo. Pelo acompanhamento das leituras de bioluminescência, foi possível observar um aumento acentuado da intensidade e da extensão dos sinais, que surgiu, em geral 2-3 dias após a implantação das bombas micro-osmóticas, e se manteve até que os animais fossem eutanasiados após desenvolverem sinais clínicos severos (Figura 33). As análises histológicas e de sobrevivência, porém, não revelaram qualquer diferença entre os tumores desenvolvidos em animais WT ou PrP^{0/0}, tratados ou não com anti-STI1, tanto do ponto de vista do crescimento não infiltrativo, como da vascularização peritumoral, que também permaneceu inalterada em relação à densidade vascular normal do cérebro. Ao contrário dos tumores de U87 mencionados anteriormente (LOPES et al. 2015), podíamos sugerir que as células GL261 não dependem do complexo STI1-PrP^C para o crescimento e progressão tumoral. Como não foi possível observar qualquer diferença entre os grupos testados, apresentamos, em caráter ilustrativo, imagens representativas dos tumores encapsulados, cujos fenótipos não variaram em relação aos resultados seguintes, que podem ser encontradas na Figura 41.

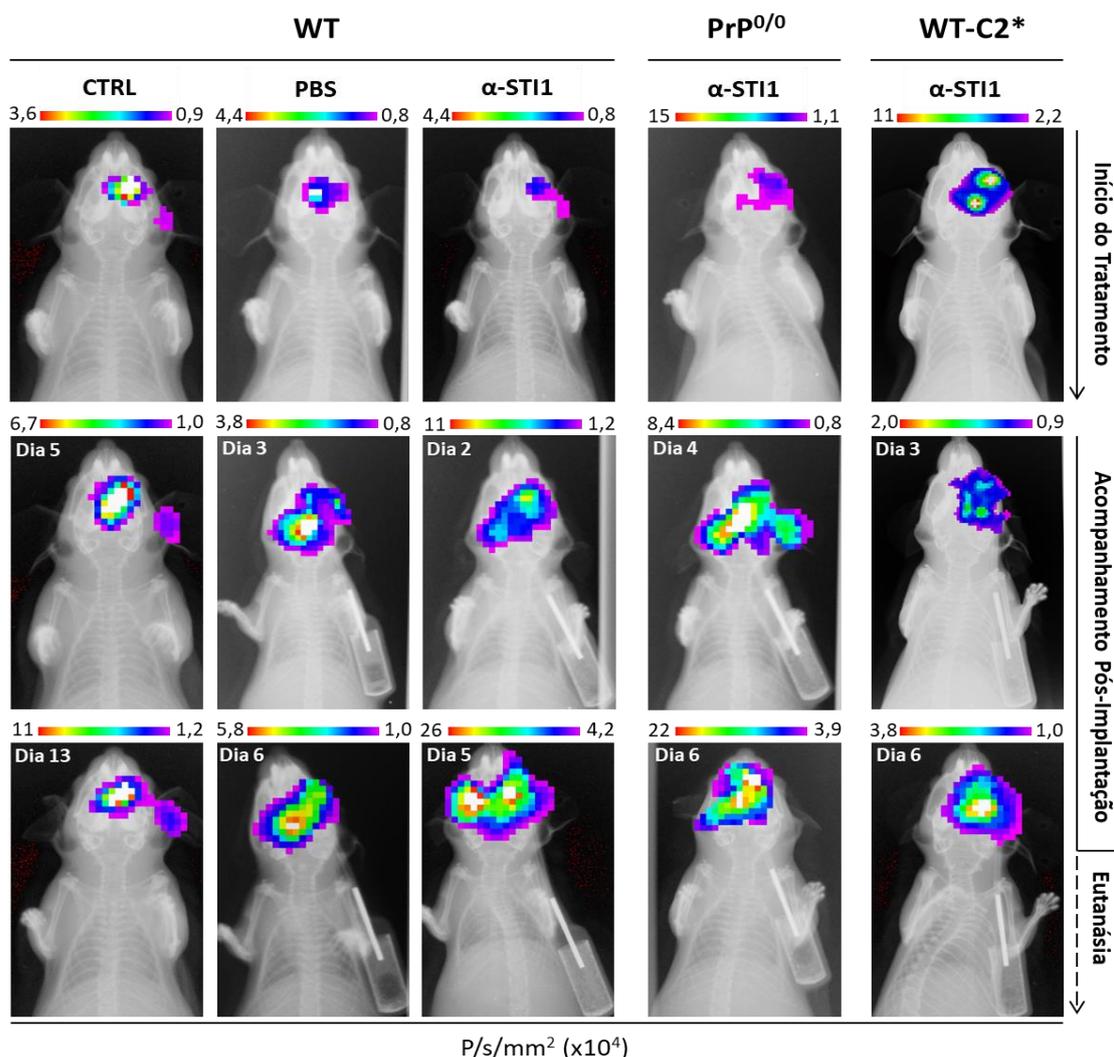


Figura 33 – Crescimento de tumores ortotópicos de GL261-LUC em camundongos C57BL/6J WT (n=10), PrP^{0/0} (n=6) e WT-C2* (n=3) em resposta ao tratamento intratumoral com anti-STI1 por bombas micro-osmóticas. Imagens representativas de bioluminescência são apresentadas, sobrepostas às de raio-X, relativas ao acompanhamento dos animais de cada grupo que receberam implantes intracranianos de $3,0 \times 10^4$ células/animal. Para o início do tratamento, os animais foram selecionados quando apresentassem o primeiro sinal de bioluminescência detectável pelo equipamento, exceto para aqueles implantados com GL261-LUC utilizando novas coordenadas de injeção para o núcleo caudado/putâmen (WT-C2*), os quais foram tratados ao serem observados com tumores bem desenvolvidos. Como controle (CTRL), foram acompanhados animais implantados, em paralelo, com as células, mas que não receberam o tratamento. Ao apresentarem os sintomas avançados da doença, os animais foram submetidos às últimas capturas de imagem antes de serem eutanasiados. Sinal de bioluminescência expresso em fótons/segundo/mm² (P/s/mm²).

Por outro lado, as marcações das regiões de hipóxia intratumorais com Hypoxyprobe™ (Figura 34) se mostraram efetivas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, circundando zonas necróticas do tumor, mas também não revelaram diferenças entre os grupos testados.

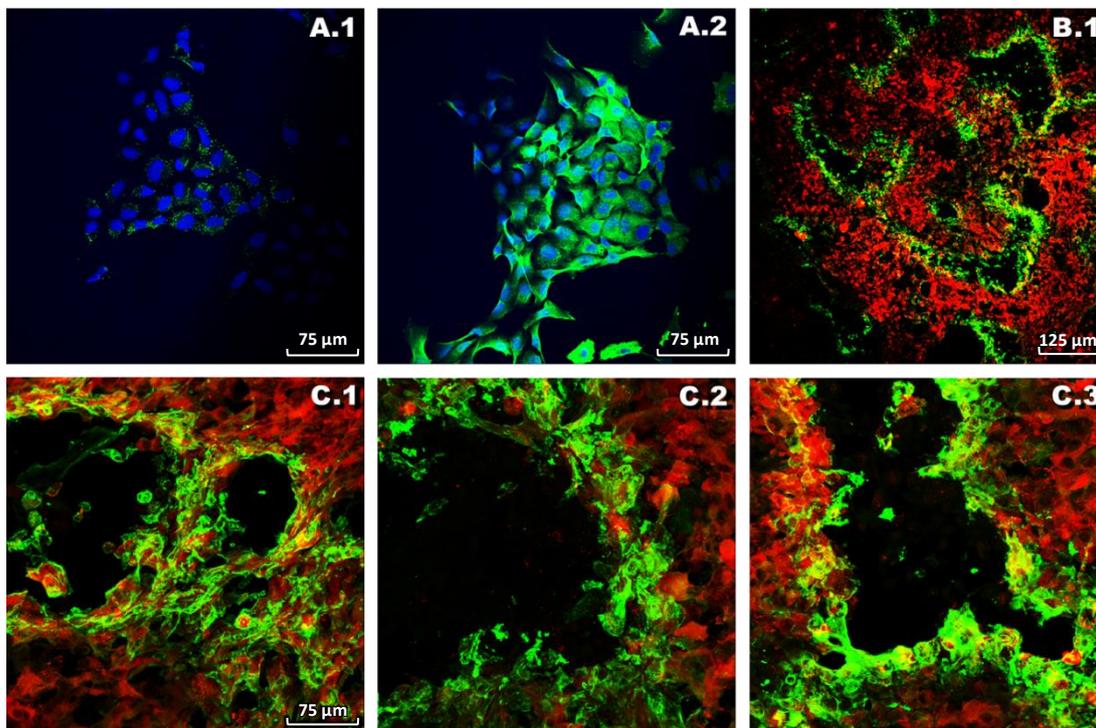


Figura 34 – Detecção de células expostas a condições de hipóxia *in vitro* e *in vivo* utilizando o kit Hypoxyprobe™ e marcação por imunofluorescência. **A)** Teste da reação *in vitro* pelo tratamento de células GL261 com 200 μM de pimonidazol em normóxia (**A.1**), ou durante exposição à hipóxia por 1h (1% O₂ / 37°C / 5% CO₂) para avaliação do acúmulo de adutos, dessa molécula com proteínas celulares, detectados por anticorpo anti-pimonidazol e secundário Alexa Fluor® 488 (**A.2**). Núcleos marcados com DRAQ5™ e representados em azul. **B, C)** Regiões intratumorais de hipóxia em cortes congelados (50 μm) de cérebros contendo tumores ortotópicos de GL261-RFP, extraídos de animais previamente tratados intraperitonealmente com 60-80 mg/Kg de pimonidazol, de 60 a 90 min antes da eutanásia. Imagens nos aumentos de 20X (**B.1**) e 40X (**C.1-C.3**) com as células GL261 marcadas (Alexa Fluor® 488) delimitando núcleos necróticos dentro do tumor.

Percebemos então, com o decorrer dos implantes ortotópicos, que o crescimento encapsulado dos tumores com margens bem delimitadas (Figura 35) não era coerente com o que se encontrava descrito na maioria dos artigos envolvendo a linhagem GL261 (ZAGZAG et al. 2000b; CHA et al. 2003; ZAGZAG et al. 2003; NEWCOMB et al. 2006; SZATMÁRI et al. 2006;

ZHAI et al. 2011; CONIGLIO et al. 2012; GAROFALO et al. 2015; KUNDU et al. 2016; GAROFALO et al. 2017) ou a linhagem correlata GL26 (CANDOLFI et al. 2007; YADAV et al. 2016), que mostram bordas irregulares com células se destacando do núcleo tumoral central, individualmente ou em pequenos grupos, e infiltrando pelo parênquima adjacente – apesar de alguns trabalhos terem relatado esse mesmo crescimento encapsulado (BEHNAN et al. 2014; CHEN et al. 2014; CORTES-SANTIAGO et al. 2016). As únicas duas razões que podíamos atribuir a essa provável perda do fenótipo da nossa linhagem GL261-RFP estariam relacionadas a alguma alteração genética das células, em função do seu período em cultura ou das condições de cultivo (especificamente pela falta de alguma suplementação, embora não se tenha encontrado nada a respeito na literatura para esta linhagem), ou ao possível equívoco na escolha da estrutura cerebral onde implantávamos as células, de acordo com metodologia utilizada pelo laboratório do Prof. Webster Cavenee, do Instituto Ludwig de San Diego. Assim, deixamos de injetar as células no corpo estriado ventral, para seguir o recomendado pela maioria das referências para tumores ortotópicos cerebrais, que preconizam o implante no corpo estriado dorsal (núcleo caudado e putâmen). Seguindo, além disso, o trabalho de YADAV et al. (2016), pelo qual se obteve uma ampla margem de infiltração de células GL26 em cérebros de camundongos NSG (*NOD scid gamma mice*), utilizamos as suas coordenadas de injeção nos C57BL/6J, de modo a avaliar se as células GL261, quando inseridas em uma arquitetura diferente do tecido cerebral, se comportariam de outra maneira, explorando o seu fenótipo infiltrativo perivascular. Para esses animais, também foram realizados tratamentos intratumorais com anti-STI1 (Figura 33), que diferiram daqueles realizados anteriormente, pela implantação das bombas micro-osmóticas quando os tumores atingiam estágios avançados, manifestados por um sinal de bioluminescência de alta intensidade. Como os tratamentos a partir dos primeiros sinais detectáveis pareciam acelerar, de alguma forma, a progressão tumoral, precisávamos confirmar se isso seria o resultado inverso de uma estimulação (e não da

inibição) das células tumorais, ou de um possível efeito rebote, pelo qual as células resistentes selecionadas teriam um alto potencial proliferativo, recuperando e expandindo rapidamente a massa tumoral. A redução considerável do sinal (da ordem de 80%) após o tratamento por apenas 3 dias de uma massa tumoral bem formada (Figura 33) evidencia que, de fato, pode existir um efeito inibitório inicial dos anticorpos anti-STI1, fazendo o tumor regredir, mas que logo pode ser compensado por células resistentes, permitindo que o tumor cresça novamente e recupere parcialmente o sinal anterior, levando o animal à morte poucos dias depois.

Adaptações de metodologia foram necessárias também para uma observação mais detalhada da interação tumor-parênquima, especificamente relacionada à invasão perivascular. Para isso, passamos a realizar a fixação do cérebro por perfusão prévia dos animais, o que permite uma marcação mais efetiva de vasos em cortes histológicos realizados na espessura de 50 µm, sendo possível visualizar a estrutura tridimensional da rede vascular pela reconstrução a partir das imagens geradas por microscopia confocal (PUNTEL et al. 2010).

A fixação por simples imersão do espécime no fixador é o meio mais comumente utilizado para fixação de tecidos, em função da praticidade da técnica e de não haver, em geral, grandes perdas na detecção de antígenos (BEACH et al. 1987; ADICKES et al. 1997). Porém, este tipo de fixação funciona melhor para amostras pequenas ou fragmentos de tecido, não sendo tão efetiva para órgãos inteiros como o cérebro, em função do tempo de difusão do fixador, que dificulta a fixação simultânea de todas as regiões do tecido (GAGE et al. 2012). O método de imersão requer pelo menos 1h de fixação para cada camada de 1 mm de espessura em que o fixador avance dentro do órgão e vença, posteriormente, a resistência das camadas superficiais já fixadas, tempo que seria subestimado pelos protocolos convencionais, que recomendam períodos entre *overnight* e 24h de pós-fixação. Enquanto isso, as células são expostas a um gradiente do fixador em diferentes pontos do tecido. No início, baixas concentrações podem ser metabolizadas pelas células, e até que aumentem o suficiente para reagir e

reter as proteínas no seu estado momentâneo, as vias metabólicas vão sendo desligadas em tempos diferentes, causando efeitos espúrios à condição original das células (SRINIVASAN et al. 2002). Somado a isso, tem-se que as células das regiões mais profundas do órgão começam a entrar em estado de anóxia, causando danos que também podem prejudicar a análise histopatológica (BACALLAO et al. 2006). A alternativa para contornar esses problemas se baseou na fixação por meio da perfusão transcárdica, de modo que todos os tecidos do organismo podem ser rapidamente e simultaneamente fixados, utilizando a rede cardiovascular para circular internamente o fixador e amplificar a sua capacidade de difusão (GAGE et al. 2012).

Pela nossa experiência, a fixação de cérebros por imersão rendeu marcações descontínuas da rede vascular por imunofluorescência com o marcador de endotélio CD31, em comparação com aqueles fixados através da perfusão. Nosso protocolo foi baseado em referências específicas na literatura, voltadas para se estabelecer a relação entre as células tumorais e a vasculatura cerebral durante a progressão dos tumores gliais (REIS et al. 2012, ZAGZAG et al. 2000B, BAKER et al. 2014, YADAV et al. 2016). Para melhorar ainda mais a eficiência deste processo, que começa pela ejeção de todo o sangue do animal, perfundimos uma solução tamponada contendo heparina e previamente aerada com oxigênio, com o objetivo de se manter a oxigenação do cérebro enquanto se previne a coagulação do sangue para uma perfusão completa. Essa breve oxigenação, imediatamente antes da perfusão com o fixador (PFA 4%), é capaz de manter as células viáveis e ainda favorecer a reação de fixação (PUNTEL et al. 2010).

Conforme o esperado, a alteração das coordenadas de injeção das células GL261-RFP teve uma grande influência no perfil de infiltração do tumor em seus estágios iniciais de formação (entre 1 e 2 semanas pós-implantação), com projeções de células alinhadas aos vasos sanguíneos, formando bordas na forma de “franjas” ao redor do local de implantação, no parênquima do núcleo caudado/putâmen (Figura 35). O primeiro sinal de bioluminescência detectável também foi utilizado neste caso, pelo menos

inicialmente, como referência para se determinar em que ponto o tumor se encontrava no seu estágio mais inicial de desenvolvimento, quando se poderia observar as células invadindo ativamente o parênquima pelo espaço perivascular. Demonstramos, porém, que isso acontecia, em geral, a partir da primeira semana, antes de o tumor alcançar massa suficiente para ser detectado por bioluminescência.

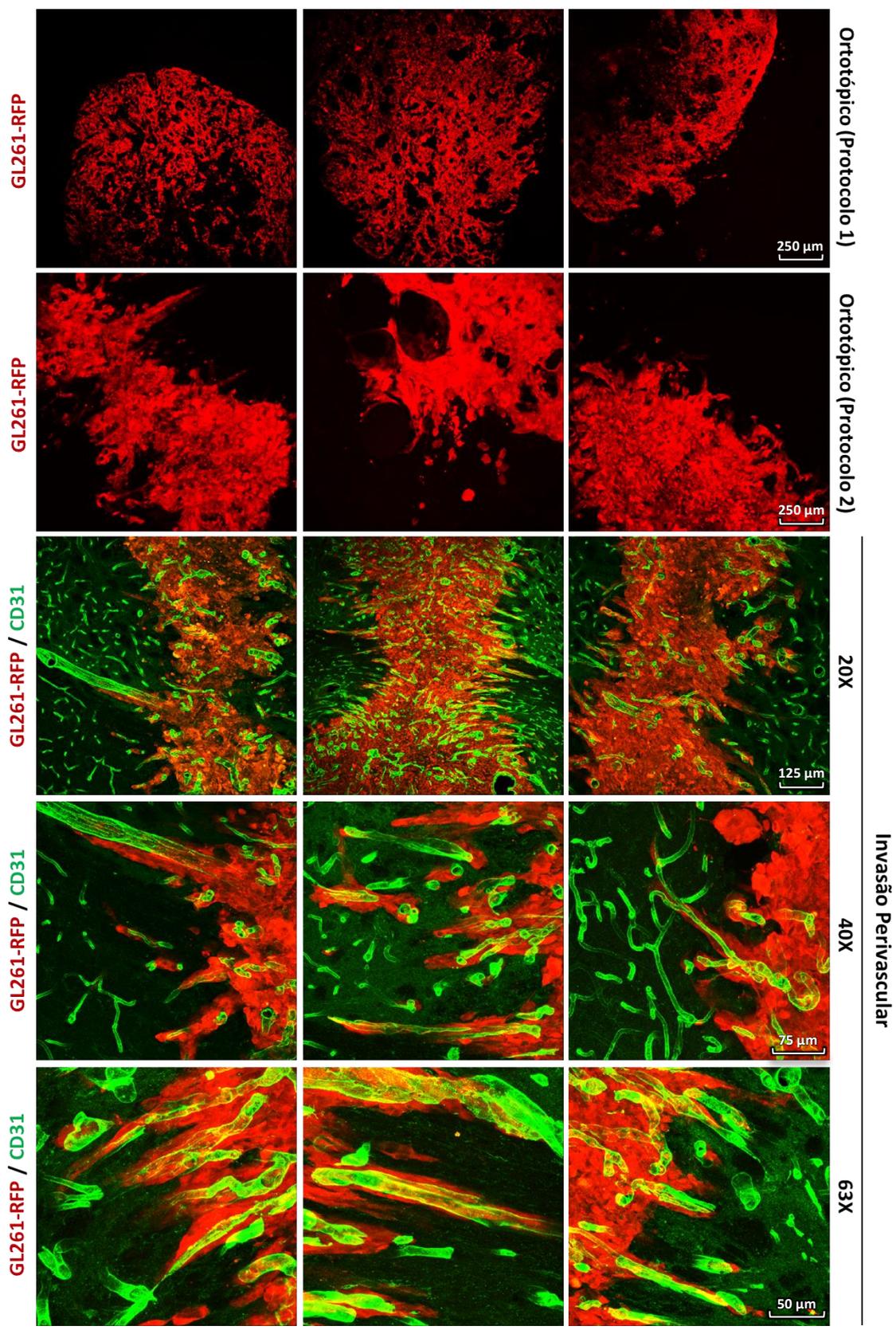


Figura 35 – Padrões histológicos de tumores ortotópicos de GL261-RFP em camundongos C57BL/6J que variam em função de métodos distintos de implantação das células em regiões alternadas do cérebro, conforme observado por imunofluorescência. Os animais foram eutanasiados após 1-2 semanas da realização dos implantes, antes, portanto, de atingirem os estágios avançados da doença, que surgem por volta da quarta semana pós-implantação. As imagens apenas das GL261-RFP revelam que os tumores desenvolvidos no corpo estriado dorsal (Protocolo 2) possuem bordas mais irregulares, compatível com o que está descrito na literatura para a linhagem GL261, diferente daqueles formados no corpo estriado ventral (Protocolo 1), que aparecem encapsulados pelo parênquima cerebral. Quando se associa a marcação específica de endotélio com CD31 (Alexa Fluor® 488), é possível observar que o perfil infiltrativo das GL261-RFP, nos estágios iniciais dos tumores, depende da sua capacidade de invasão utilizando os espaços perivasculares.

Inesperadamente, esse padrão não persistiu até os estágios finais da progressão tumoral, quando uma massa tumoral compacta passou a ocupar boa parte do hemisfério direito do cérebro, perdendo sua capacidade invasiva ao longo de uma interface aparentemente dissociada do parênquima. Tentamos também aprimorar ainda mais o método de implantação intracraniana das células GL261, de modo que se favorecesse sua maior interação, desde o início, com o parênquima cerebral, e essas pudessem explorar sua principal característica: a invasividade. Além das coordenadas adaptadas (Protocolo 2 da Seção 4.17.2), reduzimos o volume e a velocidade de injeção da suspensão de células (ainda mantendo a mesma densidade de 3×10^4 , mas em um volume de 1 μ L), assim como o calibre da agulha, para minimizar os danos ao tecido decorrentes do procedimento (KOBAYASHI et al. 1980; PLUNKETT et al. 1988; MORREALE et al. 1993; ZAGZAG et al. 2000b; YAMADA et al. 2004; BAUMANN et al. 2012; YADAV et al. 2016), porém não conseguimos reproduzir, como pretendíamos, baseado na literatura, as características histológicas do glioblastoma humano, conforme representado na Figura 41. Tecnicamente, porém, este método teria sido muito bem aproveitado para a implantação das células também nas fatias de cérebro para culturas organotípicas, caso houvesse alguma indicação positiva para o seu uso.

Notamos, então, que o comportamento dos tumores de GL261 se reproduzia desde as co-culturas organotípicas de GL261 em fatias de cérebro, onde também não se observava a migração das células (Figura 31-32), apesar de outros autores já terem observado isso tanto com as próprias GL261 (MARKOVIC et al. 2009), relatando inclusive a sua associação ao longo de vasos sanguíneos (MARKOVIC et al. 2005), da mesma forma que para linhagens de tumores que podem ter metástases cerebrais, como as células tumorais de mama (CHUANG et al. 2013; WANG et al. 2017), além de esferoides de linhagens e culturas primárias de glioblastoma humano (BOÛARD et al. 2002; JENSEN et al. 2016) e murino, também pela modulação da invasão por tratamento com inibidores (EISEMANN et al. 2018), assim como esferoides de meduloblastoma em culturas organotípicas de cerebelo (NEVE et al. 2017). Embora a linhagem C6 de glioma de ratos, também adotada como modelo de glioblastoma, tenha falhado em reproduzir, por este modelo, seu fenótipo de invasão *in vivo*, observou-se, por outro lado o perfil infiltrativo da linhagem humana GL15, que se caracteriza pela invasão ativa das células irradiando pelo parênquima cerebral, se distanciando da massa tumoral central, também utilizando vasos sanguíneos como rota de infiltração (BOÛARD et al. 2002). Essas características também foram encontradas para as células iniciadoras tumorais (*Brain-Initiating Tumor Cells - BITC*) mantidas em condições de cultivo de células-tronco neurais (NSC), tanto em relação à invasão (SELIGER et al. 2016), para aquelas derivadas de culturas primárias de gliomas malignos humanos, como quando essa invasão se dá por associação à vasculatura (MARQUES-TORREJON et al. 2018). Neste caso, pode-se observar que o fenótipo de uma linhagem murina previamente caracterizada (*Ink4A/Arf*^{-/-} com superexpressão de EGFRvIII) seria similar ao de *BTICs* geradas artificialmente pela superexpressão do gene H-Ras^{V12} em células progenitoras neurais, as quais mantêm suas características de células-tronco ao mesmo tempo em que se tornam tumorigênicas (SAMPETREAN et al. 2011). Tomando como base as células U87, uma das linhagens de glioblastoma humano mais estudadas, aparte a divergência

direta entre os autores Eisemann et al. (2018) e Jensen et al. (2016), que confrontam uma invasão proeminente com outra simplesmente não observável, respectivamente, a partir de neuroesferas dessas células (que são obtidas pelo cultivo em meio livre de soro e enriquecido com fatores de crescimento, mimetizando os tumores primários) implantadas em fatias de cérebro de camundongo, pode-se notar que esta linhagem, quando cultivada em monocamada, assim como as células C6 descritas por Boüard et al. (2002), de fato não deve ser considerada um modelo fidedigno de reprodução da invasividade do glioblastoma. Porém, o fenótipo infiltrativo pode ser resgatado em função de uma resposta dependente de HIF-1 α à hipóxia (FUJIWARA et al. 2007), ou pela modulação da expressão de proteínas-chave para a migração celular (BURGOYNE et al. 2009; SHIMAMURA et al. 2013), ou ao se utilizar fatias de cérebro humano, nas quais as U87 parecem reconhecer seu tecido de origem (JUNG et al. 2001; JUNG et al. 2006), de modo comparável a fragmentos de tumores primários (JUNG et al. 2002). A linhagem U87 é conhecida por gerar tumores ortotópicos, em camundongos imunodeficientes, com bordas bem definidas pelo parênquima cerebral (NEWCOMB 2009), bastante similar aos tumores GL261 que obtivemos. Por isso, não é surpresa o fato de que essas células tenham capacidade invasiva somente em condições bastante específicas nos ensaios de cultura organotípica. No entanto, coloca-se em dúvida a suficiência das células-tronco geradas a partir de linhagens como essa (*glioma stem cells – GSC*) para a observação dos efeitos esperados, mesmo que as GSCs sejam, em geral, uma condição determinante para a tumorigênese (LATHIA et al. 2015). Pelo nosso modelo de GL261, especificamente, o enriquecimento de GSCs em neuroesferas, principalmente aquelas CD133⁺ (WU et al. 2008), ou com assinatura molecular mesenquimal, também encontrada para amostras de glioblastoma humano (BEHNAN et al. 2014), não seria, a princípio, um fator crítico para se favorecer o crescimento tumoral ortotópico infiltrativo esperado dessas células, uma vez que baixas proporções dessas sub-populações, presentes nas culturas em monocamada, seriam suficientes para a tumorigênese. Além

do que, não existem evidências consistentes, ao contrário do descrito por Yi et al. (2013), garantindo que neuroesferas seriam tão eficientes no desenvolvimento de tumores com amplas margens de infiltração (BROADLEY et al. 2011).

5.5 IMPLANTES ORTOTÓPICOS DE CÉLULAS GL261 SILENCIADAS PARA STI1 E HIF-1 α

Considerando todas as evidências negativas que havíamos acumulado até o momento, pela insensibilidade dos tumores ao tratamento com anti-STI1, a baixa responsividade das culturas organotípicas e as possíveis alterações fenotípicas das células GL261, tornou-se claro que só conseguiríamos respostas conclusivas se interferíssemos diretamente no sistema, modulando a expressão de proteínas e avaliando a resposta tumoral. Embora níveis variáveis de STI1 nos hospedeiros tenham influenciado na densidade da vascularização intratumoral, seria difícil inferir mecanismos a partir desta simples associação, uma vez que não teríamos como prever efeitos secundários, ou até sistêmicos (como os relacionados à resposta imune), dessas modificações, que poderiam ser inespecíficas ou ter a STI1 como gatilho de uma rede complexa de sinalização. Por isso, concentramos essas modificações nas células GL261, que foram silenciadas para STI1 e HIF-1 α , de modo que potenciais variações de crescimento dos tumores ortotópicos formados a partir dessas células nos animais selvagens, principalmente em relação a sua capacidade invasiva e de estímulo à angiogênese peritumoral, dariam indícios muito mais concretos, principalmente pela análise histológica de marcadores conhecidos, dos mecanismos intracelulares ativados ou suprimidos para conferir tais características. O *knockdown* de HIF-1 α funcionaria como um controle para comparação com os possíveis efeitos do *knockdown* de STI1, por se tratar de uma proteína-chave na progressão dos tumores, estabelecendo assim parâmetros de variações do crescimento desde a primeira fase invasiva e de

alta vascularização, até sua fase terminal, com grandes núcleos necróticos e, possivelmente, intensa infiltração marginal.

Partindo do racional descrito na Seção 4.3.2 dos Materiais e Métodos, obtivemos níveis de silenciamento variáveis com 5 clones virais para cada proteína (Figura 36), e por isso selecionamos três *pools* de células correspondentes aos clones virais que geraram a menor expressão das respectivas proteínas (2 com *knockdown* de STI1 e 1 de HIF-1 α) para a expansão clonal de colônias com níveis de silenciamento homogêneos entre as células geradas (Figura 37-38). Desses clones, 4 de cada grupo foram reavaliados para se confirmar os níveis de expressão, sendo assim escolhidos 3 deles (2 shSTI1 e 1 shHIF-1 α) com maior nível de silenciamento (Figura 39-40), que foram implantados ortotopicamente para geração dos tumores. Optou-se por 2 clones distintos com *knockdown* para STI1 devido a uma diferença morfológica marcante entre as células em cultura, o que poderia refletir em fenótipos diversos *in vivo*.

A seleção dos *pools* e clones de células foi baseada na análise da expressão de STI1 e HIF-1 α por *Western blot* em duplicatas de experimentos independentes. Como a detecção de HIF-1 α foi prejudicada por uma sequência de anticorpos que falharam em reconhecer a banda específica da proteína, o *pool* 220 (clone viral TRCN0000232220) foi selecionado ainda utilizando-se o anticorpo da R&D Systems (cód. AF1935). Este, apesar de ter marcado fortemente toda a membrana, foi capaz de revelar o acúmulo da proteína nos controles positivos (células GL261-NT ou GL261-GFP tratadas com CoCl₂) na região ao redor de 120 kDa, correspondente ao peso molecular de HIF-1 α , assim como sua ausência para as células do *pool* 220, também tratadas com CoCl₂ pelo mesmo tempo que os controles (16h). Ainda que não se pudesse confirmar esse resultado (a duplicata não repetiu o mesmo padrão dos controles mostrado na Figura 36), as células do *pool* 220 apresentavam um fenótipo característico para a sua tendência de perda da aderência à placa de cultura, mesmo quando se encontravam em baixa confluência, o que as diferenciava dos demais *pools* (inclusive dos controles GL261-NT e GL261-

GFP) e das células *wild-type* (WT), indicando um possível efeito do silenciamento, mais evidente neste *pool* talvez pela menor expressão de HIF-1 α . Felizmente, os clones derivados do *pool* 220 apresentaram, de fato, altos níveis de silenciamento para HIF-1 α (ao redor de 90%), em comparação com o *pool* 219, por exemplo (Figura 38). Essa confirmação só foi possível a partir do momento em que foi utilizado um anticorpo mais eficiente (Cell Signaling, #14179) para a detecção tanto da proteína murina quanto da proteína humana nas células LN18 (Figura 38), que já haviam sido utilizadas, inicialmente, como controle para a padronização dos experimentos de hipóxia.

Os controles de carregamento foram omitidos para a normalização dos níveis de expressão, pelo menos até se chegar às análises dos clones selecionados para reavaliação do *knockdown*, pois a detecção inicial com anti- α -tubulina se apresentou bastante variável, apesar de não terem sido observadas diferenças entre as intensidades das bandas na coloração prévia das membranas com Ponceau. O problema foi resolvido quando passamos a utilizar anti- β -actina, que produziu um padrão de marcação mais homogêneo. Em relação aos extratos nucleares, o controle por anti-TBP funcionou de maneira bastante consistente, desde o início, sendo utilizado para normalização dos valores de expressão de HIF-1 α quando podíamos dispor de uma detecção eficiente desta proteína.

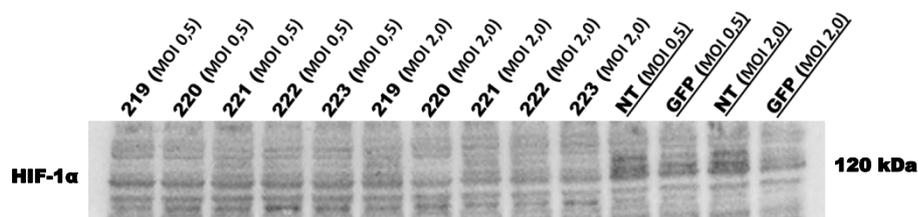
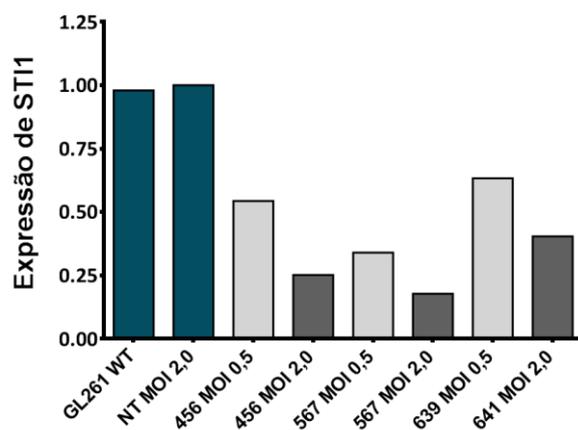
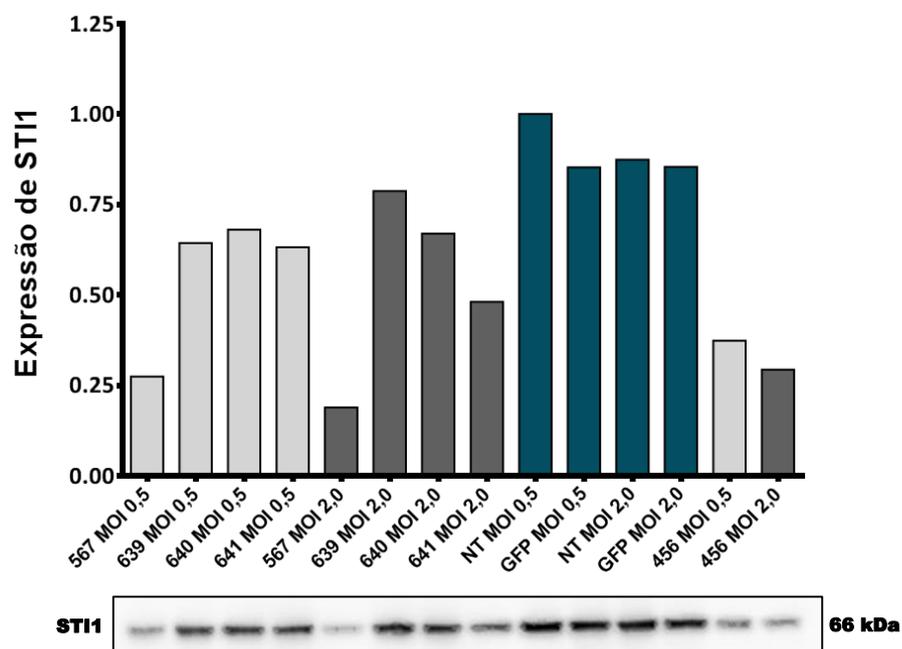
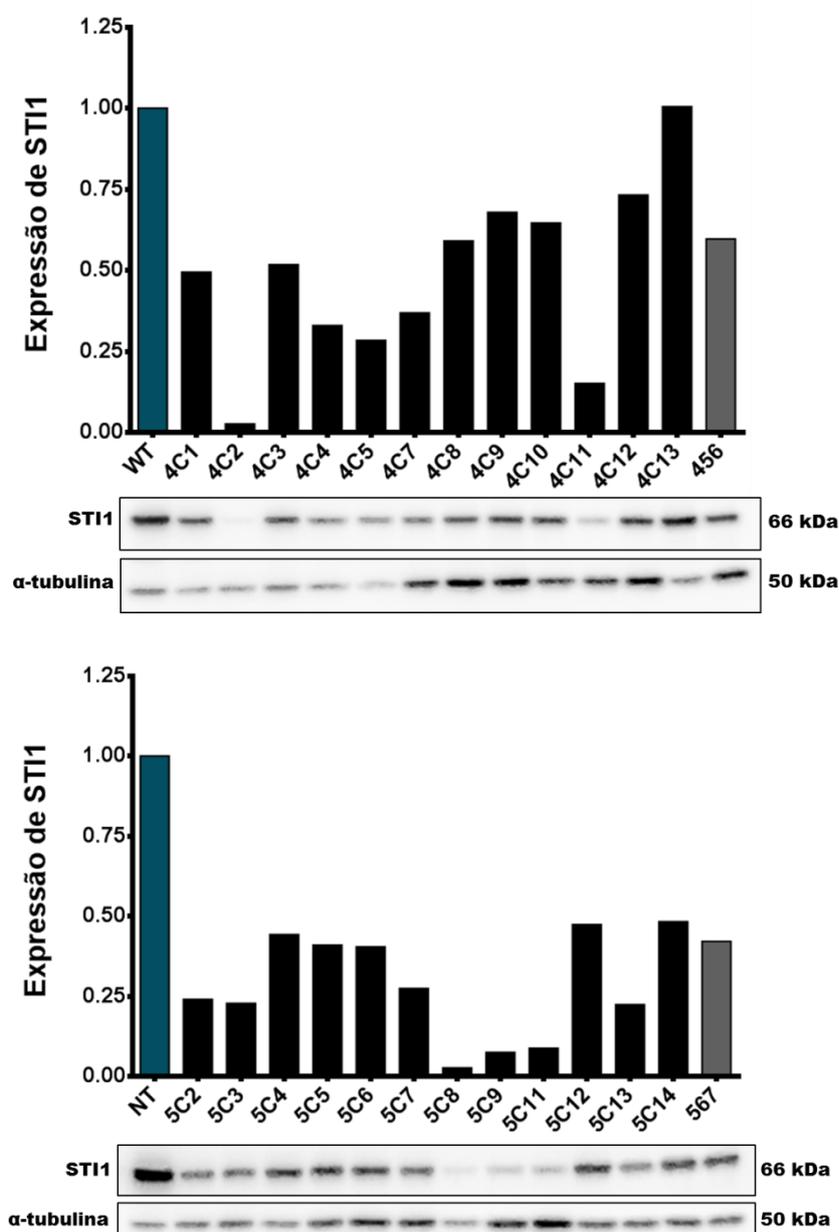


Figura 36 – Níveis de silenciamento de STI1 e HIF-1 α avaliados por *Western blot* após transdução lentiviral de células GL261-RFP com 5 clones virais para cada proteína. Células GL261-RFP foram infectadas, em *pools* individuais, com MOI 0,5 e MOI 2,0 de partículas lentivirais para cada clone viral. Em paralelo, o mesmo processo foi realizado para os controles positivo (GFP) e negativo (NT) para verificar, respectivamente, a eficiência de transdução lentiviral e o efeito da ativação da via RNAi nas células GL261-RFP por uma sequência *non-target* inespecífica. A identificação dos clones foi feita pelos três últimos dígitos dos identificadores das bibliotecas TRC de shRNA. STI1: TRCN0000115456, TRCN0000325639, TRCN0000325640, TRCN0000325641 e TRCN0000325567. HIF-1 α : TRCN0000232219, TRCN0000232221, TRCN0000232223, TRCN0000232222 e TRCN0000232220. Relativização dos valores de expressão de STI1 em relação aos controles NT MOI 0,5 e WT, respectivamente.



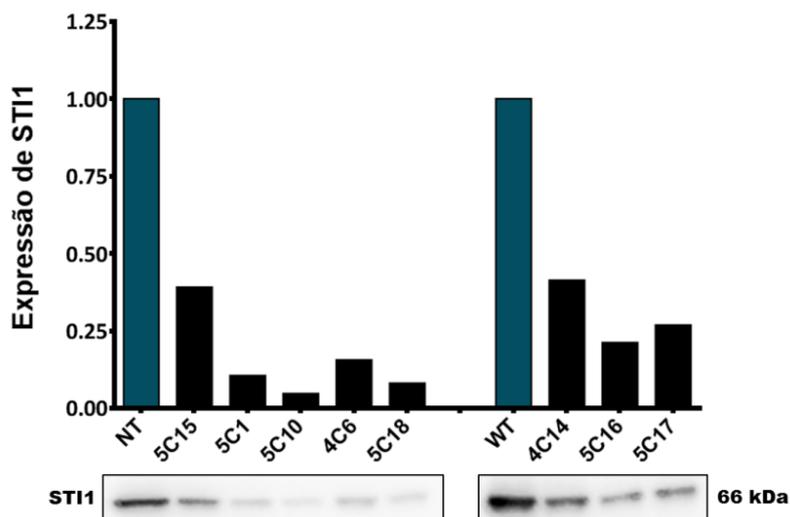
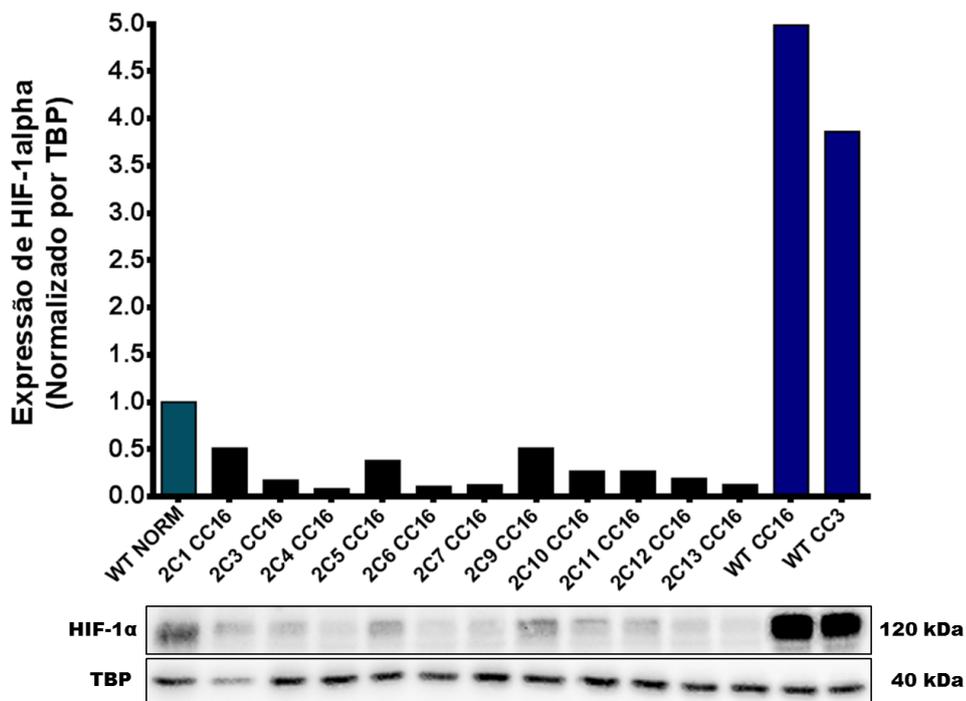


Figura 37 – Níveis de silenciamento de STI1 analisados por *Western blot* em clones derivados dos *pools* 456 (4C1-14) e 567 (5C1-18). A relativização dos valores de expressão foi realizada pelos controles WT ou NT MOI 2,0. Os *pools* 456 MOI 2,0 e 567 MOI 2,0 também foram comparados pelo mesmo experimento. Imagens das bandas de α -tubulina foram apresentadas embora não tenham sido consideradas para a normalização dos níveis de expressão, devido à variabilidade na detecção da proteína pelo anticorpo primário.



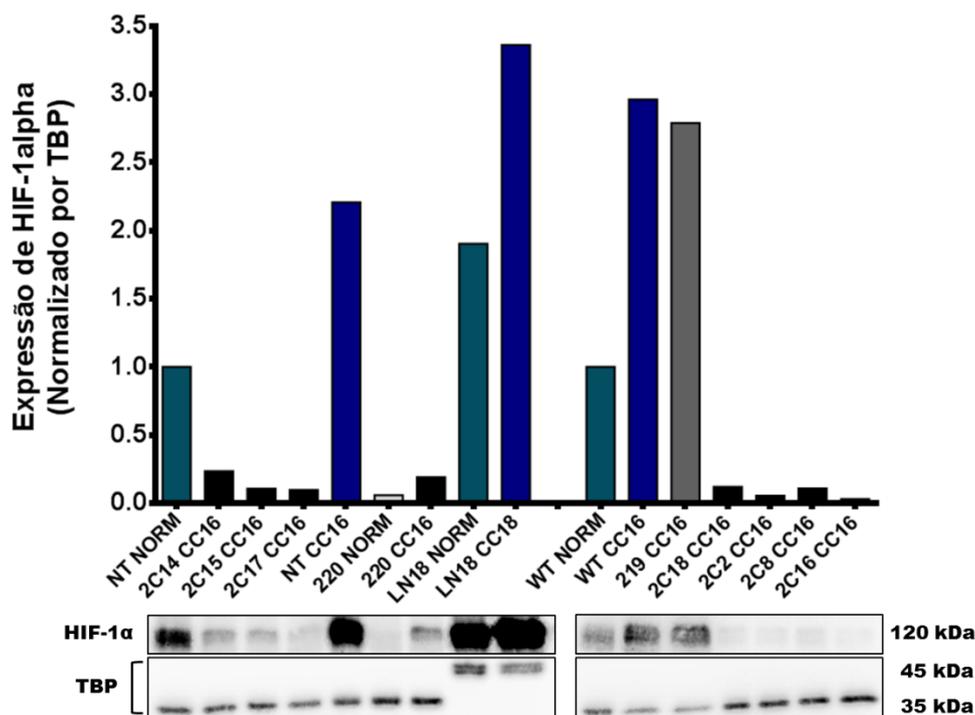


Figura 38 – Níveis de silenciamento de HIF-1 α analisados por *Western blot* em clones derivados do *pool* 220 (2C1-18) previamente tratados com CoCl₂ 400 μ M por 16h (CC16). Controles negativos utilizando células WT ou NT MOI 2,0 submetidas à condição de normóxia (NORM) foram utilizados para a relativização dos valores de expressão. Para os controles positivos, as células WT foram tratadas com CoCl₂ 400 μ M por 3h (WT CC3) e 16h (WT CC16), da mesma forma que as NT (NT CC16). Em paralelo, os *pools* 219 MOI 2,0 (219 CC16) e 220 MOI 2,0 (220 NORM e 220 CC16) também foram avaliados para confirmação de seus níveis de ativação de HIF-1 α , em conjunto com as células LN18. A normalização dos níveis de HIF-1 α foi realizada pelo controle de carregamento TBP (proteína ligante de TATA-box).

Uma avaliação mais precisa do silenciamento de HIF-1 α , e de seus efeitos nas células, teria sido realizada, no entanto, se os clones tivessem sido expostos a condições controladas de hipóxia, em paralelo aos controles positivos, com tratamento por CoCl₂, e negativos, com células em normóxia. Os resultados de expressão de HIF-1 α em hipóxia aqui apresentados, porém, são derivados de experimentos em que as células foram expostas a condições de anóxia, em função de problemas técnicos com o nosso sensor portátil de O₂, que não puderam ser resolvidos em tempo. Desta forma, a injeção da mistura de gases na câmara de hipóxia (95% N₂ e 5% CO₂) foi realizada por tempo suficiente (2 min) até que todo o oxigênio disponível

para as células fosse removido, conforme protocolo previamente padronizado. A exposição prolongada à anóxia pode ter levado as células rapidamente às vias de morte celular, o que provavelmente explica os níveis de HIF-1 α abaixo daqueles encontrados para normóxia nas células WT e NT expostas à 15h de anóxia (Figura 39).

Exploramos também a possibilidade de o silenciamento de uma proteína interferir na expressão de outra, tomando como base a conhecida atividade co-chaperona da STI1, que poderia levar a moléculas de HIF-1 α mal-formadas e, portanto, não funcionais, que seriam rapidamente degradadas pelas células (ZUEHLKE e JOHNSON 2010), além da possível atuação de HIF-1 α sobre a região promotora do gene de STI1, intensificando a sua transcrição (LEE et al. 2013). No entanto, não encontramos tais relações para as células GL261, uma vez que os clones silenciados para STI1 apresentaram ativação normal de HIF-1 α quando tratados com CoCl₂, enquanto aqueles silenciados para HIF-1 α expressavam níveis de STI1 equivalentes aos das células *wild-type* (Figura 40). Em particular, neste caso, os experimentos de secreção de STI1, descritos anteriormente, já davam indícios consistentes de que sua expressão não dependeria da disponibilidade de HIF-1 α nas células GL261, pelo fato de se manter em níveis inalterados durante a hipóxia.

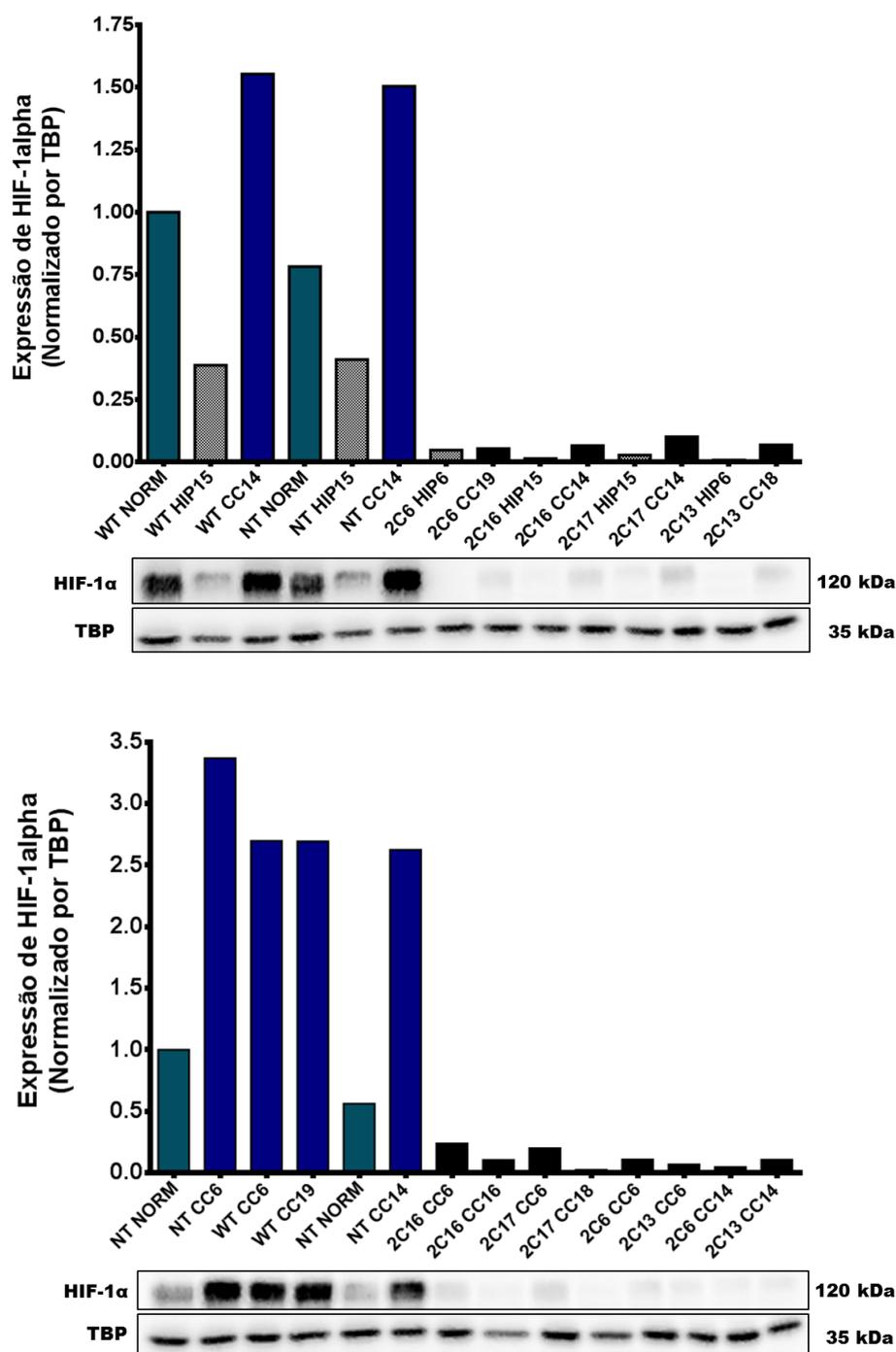


Figura 39 – Níveis de silenciamento de HIF-1 α nos clones do *pool* 220 selecionados para reavaliação por *Western blot*. Os clones foram tratados com CoCl₂ 400 μ M (CC) por intervalos de 6-19h, ou expostos à hipóxia/anóxia (HIP) por 6 ou 15h. Controles negativos utilizando células WT e NT MOI 2,0 submetidas à condição de normóxia (NORM) foram utilizados para a relativização dos valores de expressão. Para os controles positivos, as células WT e NT foram tratadas com CoCl₂ 400 μ M por 6, 14 ou 19h, sendo também avaliadas pela exposição a 15h de hipóxia/anóxia. A normalização dos níveis de HIF-1 α foi realizada pelo controle de carregamento TBP (proteína ligante de TATA-box).

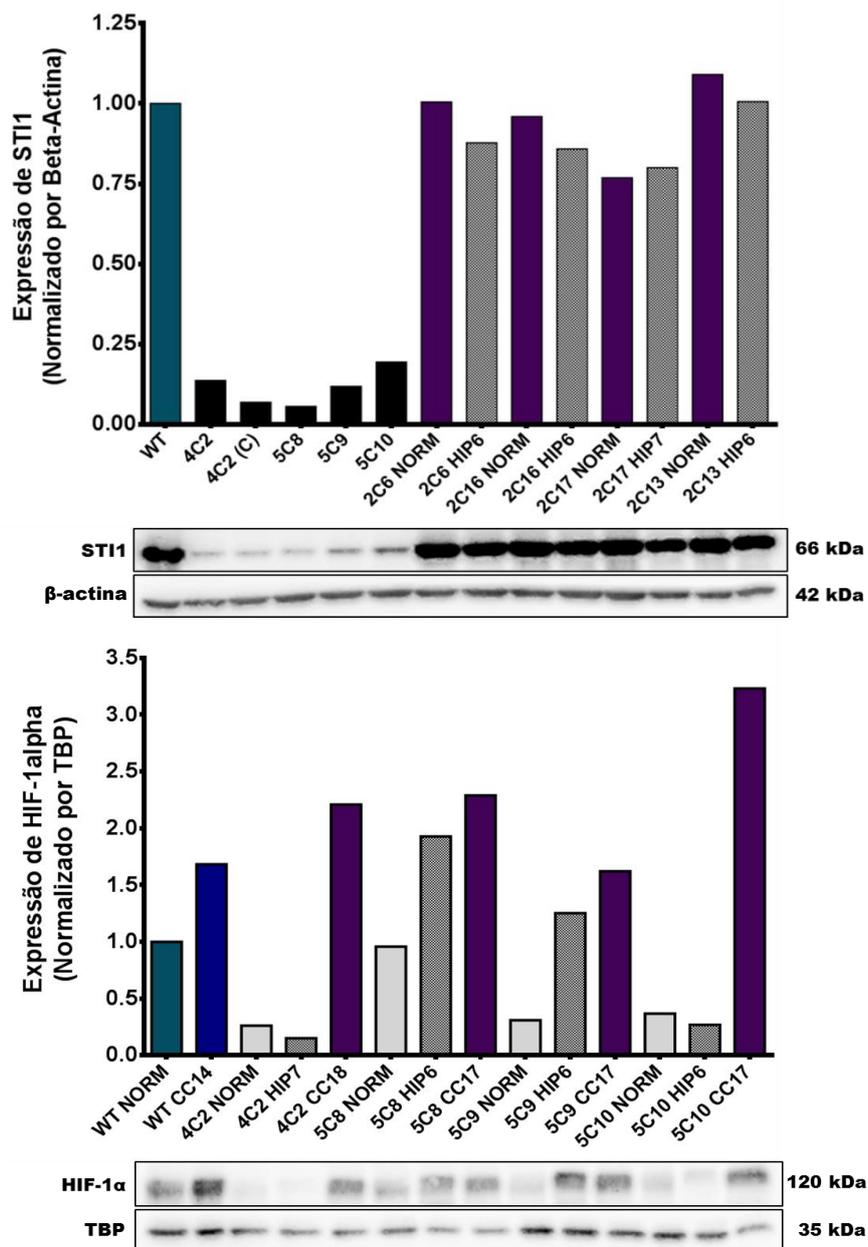


Figura 40 – Níveis de expressão de STI1 nos clones com *knockdown* de STI1 e HIF-1α selecionados para reavaliação, e níveis de ativação de HIF-1α pelos clones deficientes em STI1 selecionados. Os clones com menores níveis de HIF-1α foram avaliados para expressão de STI1 em condições de normóxia (NORM) ou após exposição de 6-7h à hipóxia/anóxia (HIP). As células WT foram utilizadas como controle para relativização dos valores de expressão. β-actina foi utilizada como controle de carregamento. Os clones com menores níveis de STI1 foram avaliados para expressão de HIF-1α em condições de normóxia (NORM), após exposição de 6-7h à hipóxia/anóxia (HIP) ou tratamento com CoCl₂ 400 μM (CC) por intervalos de 17-18h. Controles negativos utilizando células WT submetidas à condição de normóxia foram utilizados para a relativização dos valores de expressão. Para o controle positivo, as células WT foram tratadas com CoCl₂ 400 μM por 14h. A normalização dos níveis de HIF-1α foi realizada pelo controle de carregamento TBP (proteína ligante de TATA-box).

Infelizmente, não pudemos detectar, mais uma vez, qualquer diferença no crescimento dos tumores ou na sobrevivência em função do silenciamento de STI1 e HIF-1 α , provavelmente devido ao comportamento aparentemente anômalo que a linhagem GL261 vinha apresentando, o que ajuda a explicar também a total ausência de efeito sobre as células *in vitro*, com reflexos sobre a vascularização invariável, intra- ou peritumoral, pela marcação de vasos com CD31 dos tumores ortotópicos (Figura 41). Comparativamente, a linhagem correlata GL26 apresentou uma propriedade exuberante de invasão perivascular segundo o trabalho de Yadav et al. (2016), pelo mesmo método de implantação das células, atingindo distâncias consideráveis da massa tumoral. Possivelmente, as células GL261 expressem seu fenótipo infiltrativo em condições experimentais muito específicas, as quais os artigos não esclarecem, ou talvez se trate mesmo de alguma alteração na assinatura genética dos gliomas malignos, induzida pela pressão seletiva decorrente da manutenção das células em cultura, conforme já relatado para a linhagem U-251 de glioblastoma humano (TORSVIK et al. 2014). Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que as células GL261 sustentam a formação de tumores simplesmente pela sua alta capacidade de sobrevivência e proliferação derivada de mutações no oncogene K-ras e no supressor tumoral p53, além de alterações da via PI3K/Akt levando à expressão aumentada de EGFR (JACOBS et al. 2011; OH et al. 2014). Razão pela qual os tumores conseguiriam evoluir e escapar dos efeitos deletérios da hipóxia, formando constantemente novas zonas de pseudopaliçada, essas constituídas por super-populações de células viáveis mantidas pela difusão de nutrientes e oxigênio provenientes da abundante microvasculatura cerebral, deixando para trás, ao mesmo tempo, extensas áreas necróticas em seu núcleo (BRAT et al. 2004), como se observa na Figura 42. Seguindo este raciocínio, podemos supor que os mecanismos de sobrevivência/proliferação estariam sendo excessivamente ativados na linhagem que testamos, fazendo, portanto, com que as células pudessem sobreviver independente de proteínas não relacionadas, diretamente, a estes processos, mesmo daquelas como STI1 e HIF-1 α , supostamente

centrais para garantir a manutenção da viabilidade celular, tanto em condições favoráveis ao crescimento tumoral, quanto durante o estresse por hipóxia, respectivamente.

Em suma os resultados parecem apontar para uma baixa relevância da STI1 em relação à homeostase das GL261 (também pelo fato de que as células deficientes cresciam em cultura da mesma forma que as células originais), ou para a sinalização extracelular de seus tumores, invalidando nossa hipótese original.

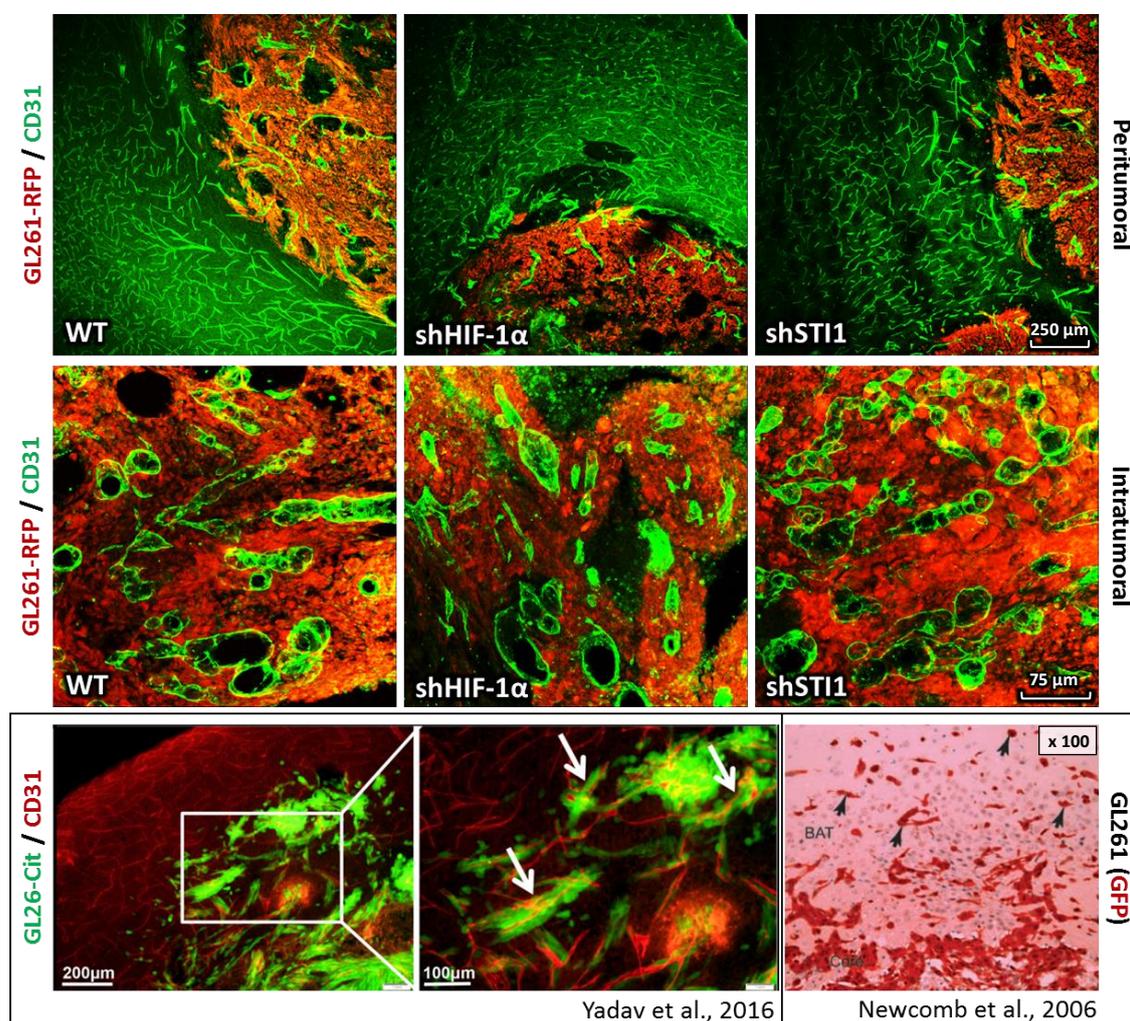


Figura 41 – Estágio final de formação dos tumores ortotópicos de GL261-RFP WT, shSTI1 ou shHIF-1 α em camundongos C57BL/6J e sua vascularização, comparados com tumores das linhagens GL26 e GL261 retratados na literatura. Após se desenvolverem inicialmente com um suposto potencial infiltrativo, os tumores de GL261-RFP parecem regredir em relação a essa característica, mesmo com a utilização do Protocolo 2 de implantação, voltando a formar tumores encapsulados na fase terminal da doença, como aqueles obtidos com o Protocolo 1. Nas imagens relativas à tese, observa-se a imunofluorescência de cortes congelados (50 μ m) evidenciando as regiões peritumorais e as densidades vasculares intratumorais, que permaneceram inalteradas independente do silenciamento das células, pela marcação com CD31 (Alexa Fluor[®] 488). Dentro do retângulo, amostras de imagens extraídas de trabalhos utilizados como referência nesta tese sobre o comportamento *in vivo* das células GL261, assim como da linhagem correlata GL26, em relação aos estágios avançados do desenvolvimento tumoral.

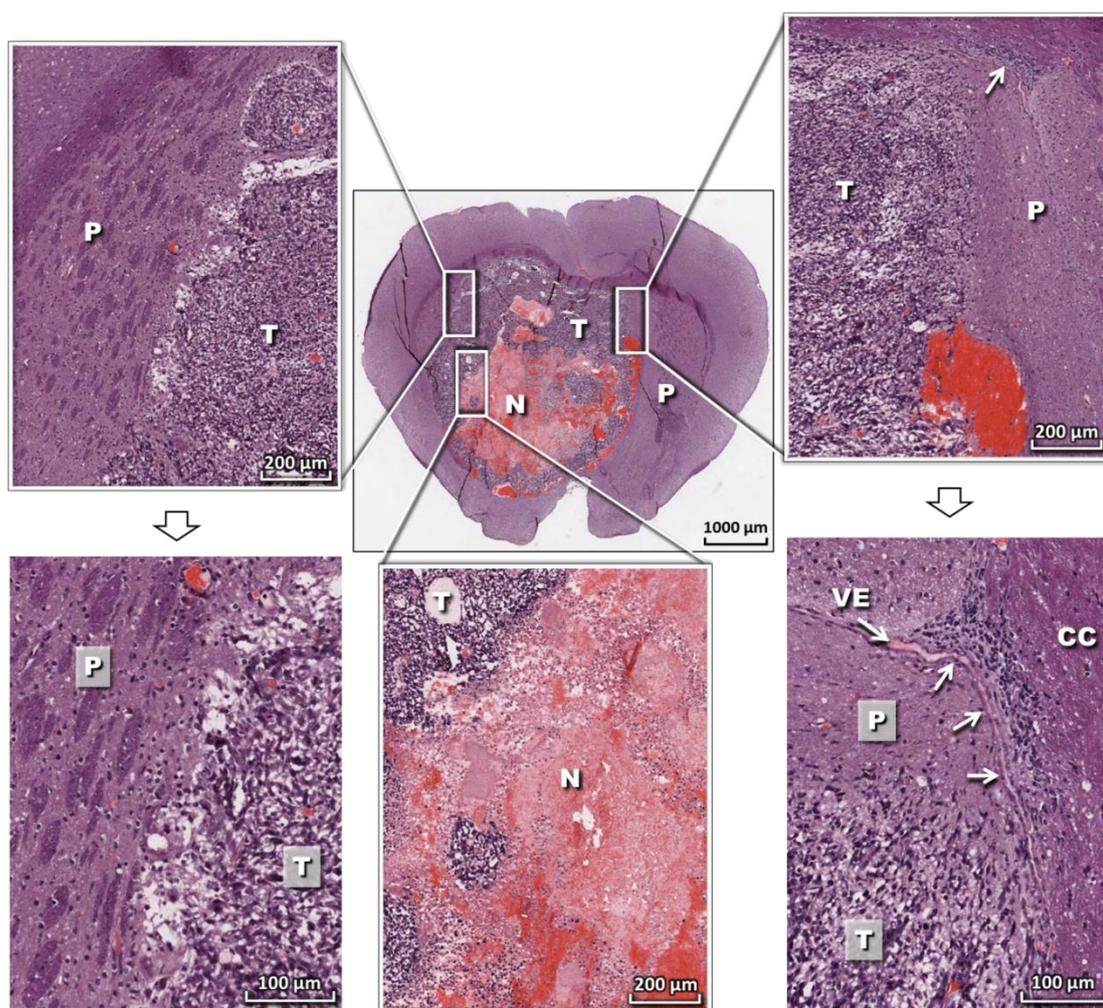


Figura 42 - Análise histológica de tumores ortotópicos de GL261-RFP em camundongos C57BL/6J pela coloração de cortes de cérebro (5 µm) com hematoxilina-eosina (H&E). Todos os procedimentos, inclusive o escaneamento das lâminas coradas, pelo equipamento Aperio ScanScope, e a captura e o processamento das imagens, pelo software Aperio ImageScope, foram realizados em parceria com o departamento de patologia do A.C. Camargo Cancer Center. Equivalente ao que encontramos nas imunofluorescências, os tumores (T) aparecem com bordas bem delimitadas, formadas, possivelmente, pela pressão que uma massa compacta de células viáveis e anaplásicas exerceria ao se expandir contra o parênquima cerebral (P), tendo como consequência a formação de um núcleo necrótico tumoral (N), decorrente da morte dessas células pela perda da difusão de nutrientes e oxigênio a partir da microvasculatura cerebral, o que pode ser melhor observado por esse tipo de coloração. Curiosamente, a limitada tendência da nossa linhagem GL261 para invasão do parênquima pode ser ilustrada pelo pequeno grupo de células (setas) próximo ao tumor, que conseguiu migrar por uma região entre o ventrículo esquerdo (VE), comprimido pelo crescimento do tumor, e o corpo caloso (CC), este sendo uma das rotas comuns de infiltração inter-hemisfério usada apenas por células malignas com alto nível de agressividade, principalmente células-tronco tumorais (CLAES, IDEMA, WESSELING 2007; ZAGZAG et al. 2008; KROONEN et al. 2011; HUSZTHY et al. 2012), visto que se trata de um compartimento formado por fibras mielinizadas altamente compactadas, que impõem uma alta restrição mecânica à invasão tumoral (GIESE et al., 2003; DORSEY et al., 2014).

Para nossa surpresa, no entanto, esse não seria um resultado incomum, que poderia ser atribuído a uma pré-disposição específica da nossa linhagem GL261 à pressão seletiva imposta pelas condições de cultura *in vitro*, e muito menos teria relação com a procedência dessas células, mas seria, na verdade, a consequência indevida de um problema conceitual bem maior, ainda em voga na comunidade científica, que resiste em apostar na representatividade, potencialmente falsa, das linhagens celulares tumorais para reproduzir *in vitro* a biologia dos tumores primários das quais são originadas. Com uma premissa bem simples, mas bastante coerente, Lee et al. (2006) conseguiram demonstrar os efeitos irreversíveis dos meios de cultura contendo soro bovino, o qual se convencionou utilizar por ser uma fonte essencial de um conjunto de fatores de crescimento e de adesão, hormônios, lipídeos e minerais que possibilitam o crescimento de uma grande variedade de células humanas e animais, sobre a perda progressiva do fenótipo tumoral primário após não mais do que 10 passagens *in vitro* de suas culturas primárias. De uma mesma amostra de

GBM humano ressecado de cada paciente, os autores obtiveram uma suspensão de células que foi dividida entre o cultivo ou com meio Neurobasal (suplementado com bFGF e EGF), originalmente utilizado para a propagação de células-tronco neurais (NSCs) – sem a adição de soro, que estimula a sua diferenciação – ou com o meio de cultura convencional, contendo soro. Assim, eles puderam avaliar, partindo do mesmo material, como as células tumorais se comportariam nas mesmas condições de cultura em monocamada, o padrão definido para linhagens celulares, alterando-se apenas os meios de cultura. O meio Neurobasal foi utilizado para selecionar células-tronco tumorais (TSCs), histologicamente semelhantes às NSCs e potencialmente responsáveis pela origem dos tumores gliais, as quais foram capazes de proliferar ativamente, tanto em condições não-aderentes, na forma de neuroesferas, quanto aderentes, pelo revestimento das placas de cultura com poli-L-lisina/laminina. Ao contrário das TSCs, as culturas primárias mantidas em soro se caracterizavam por um conjunto homogêneo de células morfológicamente mais próximas de células epiteliais ou fibroblastos, decorrente de uma provável pressão seletiva das condições de cultura, que seriam favoráveis a uma população clonal com alta capacidade proliferativa, a qual adquiriu um perfil de expressão gênica bastante similar ao das linhagens de glioblastoma humano mais utilizadas em estudos funcionais. Segundo outro estudo do mesmo grupo (Li et al. 2008), essas linhagens possuem em comum um grande número de alterações genéticas não encontradas em nenhum dos 74 gliomas primários que foram analisados, convergindo, na sua maioria, para garantir um alto nível de renovação celular (*turnover*), principalmente pela ativação de vias de degradação, como a proteassômica, além do metabolismo de nucleotídeos e fosforilação oxidativa, o que explica o fenótipo intensamente replicativo dessas células e sua permanência em fases ativas do ciclo celular durante a cultura *in vitro*. Em relação às culturas primárias em soro, o crescimento exponencial também pode ser atribuído a uma alta atividade de telomerase (LEE et al. 2006), enzima que sintetiza DNA como prolongamentos das cadeias cromossômicas, formando sequências

repetitivas denominadas de telômeros, os quais tem a função de impedir que as “pontas soltas” da sequência original sejam reconhecidas como quebras de DNA, ativando erroneamente mecanismos de reparo. Células normais adultas e diferenciadas sofrem um encurtamento progressivo dos telômeros durante a vida do indivíduo, em função de uma falha constitutiva da maquinaria de replicação de DNA, impedindo que as extremidades dos cromossomos sejam copiadas para as novas células em divisão. Associado à supressão progressiva da expressão de telomerase, as células com telômeros curtos entram em estado de senescência (interrupção irreversível da divisão celular levando à morte), porém algumas delas podem escapar a esse controle e readquirir parte da sua capacidade proliferativa, sofrendo, por consequência, ciclos sucessivos de fusão entre cromossomos, o que leva a uma grande instabilidade genética, resultando em apoptose. Como a instabilidade genética também pode representar uma via de escape para a transformação maligna, um evento raro em uma das células do tecido, previamente selecionada por ter sofrido mutações que inativam as vias de regulação do ciclo celular, pode desbloquear a expressão da telomerase, a qual é capaz de manter ou até mesmo reconstituir telômeros, permitindo que tais células continuem a crescer indefinidamente (tornando-se imortais), resistindo ao mecanismo duplo (senescência-apoptose) de supressão tumoral. Por sua vez, a instabilidade cromossômica pode ser controlada e mantida em um nível compatível com a viabilidade celular, garantindo assim que um número aleatório de mutações adicionais acumuladas contribua para a progressão tumoral (SHAY e WRIGHT 2012).

A hipótese da origem dos tumores a partir de células-tronco encontradas na maioria dos tecidos do organismo adulto, as quais são responsáveis por fazer a reposição natural de células mortas que são perdidas diariamente em função da sua própria função fisiológica, se fundamenta, entre outros aspectos, na atividade de telomerase observada desde o período de desenvolvimento: em células-tronco embrionárias, para manter a integridade do genoma do organismo em formação; e em células progenitoras, que são intermediários, no indivíduo adulto, dessa renovação

tecidual, originando-se, por divisão assimétrica, de células-tronco pluripotentes quiescentes. Ao contrário das células progenitoras, que se replicam várias vezes antes de finalmente se diferenciar em células funcionais, as células-tronco podem ser consideradas um reservatório que existe apenas para suprir a demanda dos tecidos, mas que, assim como estes, também acompanham o processo de envelhecimento celular pelo encurtamento de telômeros e baixa expressão de telomerase (SHAY e WRIGHT 2012). No caso dos GBMs, as TSCs, que também possuem expressão de telomerase (LEE et al. 2006), podem ser sugeridas então como progenitores neurais mutados, uma vez que a sua caracterização por marcadores histológicos se confunde com a de células-tronco normais, e apesar de ainda possuir telômeros menores que essas, algumas evidências na literatura indicam que as células tumorais apresentam propriedades fenotípicas adaptadas desses progenitores (SCHIFFER et al. 2010; CUDDAPAH et al. 2014).

O reflexo mais preocupante desses achados, para o nosso trabalho, seria o desenvolvimento de tumores ortotópicos encapsulados a partir das culturas primárias em soro, compatível com o que se observa nos tumores derivados de linhagens celulares humanas consideradas como padrão biológico dos GBMs (U251, U87, etc), ambos em animais imunodeficientes, exatamente o que encontramos para os tumores de GL261 em animais imunocompetentes, todos esses, portanto, modelos que se distanciam das características histopatológicas prototípicas dos GBMs humanos, ditadas pela heterogeneidade celular e extensa infiltração do parênquima cerebral (LEE et al. 2006). Além das perdas fenotípicas induzidas pela exposição *in vitro* das células ao soro bovino, descobriu-se também que linhagens de outros tipos tumorais apresentaram um perfil de expressão gênica muito similar ao das linhagens de GBM, salvo as respectivas assinaturas histológicas, indicando que a biologia de qualquer linhagem celular acaba sendo subvertida pelas mesmas alterações genéticas impostas pelas condições de cultura *in vitro*, tornando-as pouco relevantes como modelos tumorais representativos (LI et al. 2008).

Ao longo de praticamente três décadas, as linhagens celulares tumorais foram o referencial utilizado para transpor, inadvertidamente, mecanismos biológicos observados *in vitro* assumindo que o mesmo aconteceria nos tumores *in vivo*, muito embora a configuração estrutural, a bioquímica e a composição celular do microambiente tumoral não pudessem ser recriadas em cultura, o que, apenas recentemente, começou a se tornar realidade com a evolução do conceito de organoides (DROST e CLEVERS 2018) para o desenvolvimento de tecnologias microfluídicas (SUNG e BEEBE 2014). Em uma época em que o estabelecimento e manutenção de culturas primárias eram dificultados por uma série de variáveis que ainda persistem atualmente – principalmente pela necessidade de fatores de crescimento específicos suplementados ao meio de cultura, além do revestimento de superfícies com determinados constituintes da matriz extracelular (moléculas de ancoragem), na tentativa de favorecer o crescimento seletivo das células tumorais em detrimento das células estromais contaminantes, que competem pelos nutrientes do meio, frequentemente ocupando o lugar das células tumorais (MITRA et al. 2013) – as linhagens celulares imortalizadas (que proliferam indefinidamente em cultura) eram relativamente muito mais adaptadas às condições de cultura, podendo ser facilmente manipuláveis geneticamente, o que propiciava os estudos de perda e ganho de função para elucidar vias de sinalização implicadas no processo tumoral. No entanto, o que validava, em certa medida, as linhagens como legítimas representantes *in vitro* das células tumorais, era sua capacidade de gerar novos tumores quando reinseridas em animais imunodeficientes, condição aceita como suficiente para que essas células fossem, desde então, amplamente consideradas de origem tumoral (LI et al. 2008).

Uma das soluções encontradas como alternativa às linhagens celulares de GBM parece advir de uma nova percepção das culturas primárias. A visão predominante de que seria imprescindível conservar a heterogeneidade celular, característica dos GBMs, pelo uso de meios contendo soro ou diferentes combinações de fatores de crescimento, de

modo a acelerar o crescimento inicial e assim garantir a sobrevivência das células tumorais, passa a ser abandonada após evidências apontarem que as TSCs podem se originar das NSCs, e então servirem de precursores tumorais. Por isso, o isolamento e manutenção destas células em cultura com meio definido (bFGF e EGF) tem sido o foco mais recente de alguns laboratórios, levando até a criação de um biobanco de TSCs de GBMs humanos, com o objetivo de se adaptar os estudos biológicos a essa subpopulação de células (LEDUR et al. 2017). Assim como as NSCs, as TSCs são capazes de formar neuroesferas *in vitro* e apresentam potencial para auto-renovação e diferenciação tanto em linhagens neuronais quanto gliais, traços esses resultantes de seu perfil transcriptômico correlato e estabilidade genética mantida por várias passagens. O componente tumoral das TSCs se observa por um perfil de expressão gênica que remete aos tumores primários de onde se originaram, com as mesmas aberrações genéticas destes, mas principalmente pela sua capacidade tumorigênica, reproduzindo, de maneira consistente, o fenótipo invasivo dos GBMs, com amplas margens de infiltração em cérebros de animais imunodeficientes. A eficiência do cultivo das TSCs em meio Neurobasal também foi demonstrada pelo fato de culturas primárias dos tumores ortotópicos terem sido utilizadas para gerar novos tumores, os quais mantiveram o seu perfil de expressão e potencial infiltrativo. Curiosamente, outro método sistematicamente utilizado para a geração de neuroesferas (VILLALVA et al. 2010; ZHOU et al. 2011; VLASHI et al. 2011) contendo células-tronco tumorais, a partir de linhagens celulares, pela troca do meio com soro pelo Neurobasal, foi categoricamente invalidado pelo trabalho de Lee et al. (2006). Os autores observaram que as culturas primárias cultivadas primeiro em soro não sobrevivem quando transferidas para o Neurobasal, da mesma forma que as TSCs, quando transferidas para o meio com soro, perdem gradualmente suas propriedades de NSCs, o que se compara ao efeito do cultivo direto em soro, pelo qual as células nas passagens iniciais se assemelham às TSCs, mas acabam se aproximando mais do perfil de expressão das linhagens, na medida em que se acumulam passagens em cultura. Da mesma forma, aparecem novas

alterações genéticas e epigenéticas, que não estavam presentes nos tumores primários, entre ampliações e deleções de cromossomos, sendo que algumas dessas, comuns em tumores, também não aparecem nas culturas primárias. Estas passam também a se diferenciar do perfil predominantemente diploide das TSCs para desenvolver aneuploidia (alterações pontuais no número de cromossomos) ou até poliploidia (múltiplas cópias de todo o material genômico), reproduzindo o que acontece com as linhagens celulares.

Como consequência do uso disseminado dessas linhagens, a triagem de agentes terapêuticos, e os subsequentes estudos pré-clínicos, tem se concentrado apenas em selecionar candidatos com citotoxicidade em relação a células altamente proliferativas, o que não representa, por exemplo, os GBMs, cujo índice mitótico não ultrapassa 14% *in situ*. Isto explica o porquê de quimioterápicos eficazes contra linhagens de GBM causarem toxicidade em células de órgãos com altos níveis de renovação celular (como medula óssea e epitélio gastrointestinal), ao mesmo tempo em que apresentam efeitos clínicos pouco relevantes para a redução dos tumores. Embora as linhagens, assim como os GBMs primários, apresentem vias de sinalização oncogênicas ativadas, como aquelas relacionadas à p53, hipóxia, Wnt, PTEN e PI3K, os tumores superexpressam genes específicos, como, por exemplo, para potencializar a adesão celular ou as vias acopladas à proteína G, os quais não estão ativados nas linhagens. Por isso, as culturas primárias acabam se tornando ferramentas indispensáveis para o estudo de terapias contra alvos moleculares selecionados (como para estimular a diferenciação em TSCs, a fim de que essas eventualmente percam seu potencial tumorigênico), os quais devem levar em consideração o perfil mutagênico variável dos GBMs, expandindo, portanto, os horizontes em que se vislumbram as terapias personalizadas (LEE et al. 2006; LI et al. 2008; POLLARD et al. 2009; HASSELBACH et al. 2014; SEIDEL et al. 2015; BEHNAN et al. 2017).

A alternativa óbvia ao nosso modelo de GL261, diante do exposto, teriam sido os tumores ortotópicos gerados a partir de células-tronco

tumorais murinas ou, mais representativamente, aqueles derivados do GBM humano (WAKIMOTO et al. 2009; ZHANG et al. 2011; SULLIVAN et al. 2014; KLOEPPER et al. 2016; GRITSENKO, LEENDERS, FRIEDL 2017), com o objetivo de resgatar o fenótipo de invasividade, ou, em último caso, a engenharia genética de camundongos (HUSE e HOLLAND 2009; EL MESKINI et al. 2015; SINGH et al. 2017).

A edição do genoma desses animais destina-se a inserir mutações que irão alterar vias de sinalização fundamentais no desenvolvimento dos GBMs: para ativação constitutiva de KRAS^{G12D} e deleção dos alelos de PTEN, que são seguidos pelas mutações somáticas de p53 espontâneas. Os animais induzidos quimicamente para ativação dessas mutações desenvolvem tumores difusos de baixo grau que evoluem para astrocitomas de alto grau, se assemelhando histologicamente aos GBMs humanos, com regiões de necrose circundadas por uma faixa de células tumorais em pseudopaliçada, e uma densa vascularização. Essa estratégia, porém, seria menos viável na prática, como mencionado anteriormente, pelo tempo de latência (4 a 6 meses após a indução) e o período variável em que ocorrem a transformação maligna e a tumorigênese.

6 CONCLUSÕES

A polivalência fisiológica da proteína STI1, assim como seu papel regulatório em condições patológicas, nos conduziu a um caminho de investigar seu papel em um processo extremamente relevante em tumores, como a angiogênese. Essa linha de raciocínio foi amparada pela literatura recente à época da elaboração do projeto, e por observações experimentais em ensaios prévios do grupo. Porém, a escolha dos métodos para responder a essa hipótese se tornou um ponto bastante desafiador. Ao contrário das abordagens que já estavam estabelecidas no laboratório, a padronização dos ensaios de angiogênese custou um tempo considerável desde o acerto de condições, percepção de diferenças entre lotes de reagentes (em especial, o matrigel), linhagens celulares (transitamos entre pelo menos três tipos de células endoteliais) até condições experimentais para os ensaios de formação de tubos e microvasos, partindo do ensaio convencional até a padronização dos beads revestidos de HUVECs. Ou seja, a curva de aprendizagem observada no desenrolar desta tese foi extremamente extenuante e, neste aspecto, esse trabalho tem um caráter excepcional referente à padronização de ensaios relativamente complexos para a avaliação da angiogênese *in vitro* e *ex vivo*, e a sua implementação no laboratório onde a mesma foi desenvolvida. Além disso, a repadronização dos implantes ortotópicos nos permitiu detectar as incongruências que podem se originar de alterações inesperadas das células tumorais, ou de falhas em modelos experimentais pouco exploradas na literatura.

Um aspecto extremamente frustrante foi o tempo dedicado para estabelecer as técnicas com base no teste de atividade da STI1 recombinante. A negligência quanto a sua contaminação por LPS foi um fator preponderante para que esta tese não tivesse resultados significativos. Eventualmente, novos projetos poderão ser desenvolvidos com a mesma abordagem (proteína recombinante), porém serão tomados os cuidados para eliminar os problemas de contaminação por LPS.

E finalmente, a escolha do modelo tumoral da célula GL261 também se mostrou equivocada. A priori, o uso de um modelo tumoral de animal imunocompetente foi escolhido por permitir o estudo da interação PrP^C-STI1 (ao qual o grupo tem se dedicado há muitos anos) em uma situação mais próxima da doença humana. Porém, no decorrer da tese, o sistema se mostrou muito “insensível” à perturbações, fossem elas a utilização de diferentes animais transgênicos (deficientes para PrP^C, haploinsuficientes ou superexpressores de STI1) ou o silenciamento de proteínas na célula tumoral. Surpreendentemente, mesmo o silenciamento de um agente primordial no crescimento tumoral, como o HIF1 α , foi incapaz de alterar o crescimento tumoral e a vascularização.

Portanto, apesar de equívocos serem recorrentes em qualquer área de pesquisa, esses acontecem, na maioria das vezes, por esperarmos resultados que nem sempre correspondem à natureza complexa e quase sempre imprevisível dos fenômenos biológicos. O planejamento se mostrou não muito eficiente, pois deveríamos ter avaliado, inicialmente, os efeitos do silenciamento de STI1 nas células GL261, uma vez que tínhamos evidências suficientes da sua provável relevância na progressão dos glioblastomas. Deste modo, poderíamos verificar, antecipadamente, que essas células sobreviveriam e, potencialmente, manteriam o mesmo fenótipo de migração/invasão inalterados das células tipo-selvagem, o que seria compatível com a formação dos tumores indiferente aos níveis de sua expressão. Mas não podíamos imaginar também que o modelo ortotópico escolhido seria falho ao satisfazer as características morfológicas esperadas dos glioblastomas. Infelizmente, descobrimos esta deficiência muito tardiamente, quando já não havia mais tempo hábil para se testar outros modelos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science** 2000; 287:2185-95.

Adickes ED, Folkerth RD, Sims KL. Use of perfusion fixation for improved neuropathologic examination. **Arch Pathol Lab Med** 1997; 121:1199-206.

Aghi M, Cohen KS, Klein RJ, Scadden DT, Chiocca EA. Tumor stromal-derived factor-1 recruits vascular progenitors to mitotic neovasculature, where microenvironment influences their differentiated phenotypes. **Cancer Res** 2006; 66:9054-64.

Agnihotri S, Zadeh G. Metabolic reprogramming in glioblastoma: the influence of cancer metabolism on epigenetics and unanswered questions. **Neuro Oncol** 2016; 18:160-72.

An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, Neckers LM. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 α . **Nature** 1998; 392:405-8.

Aplin AC, Ligresti G, Fogel E, Zorzi P, Smith K, Nicosia RF. Regulation of angiogenesis, mural cell recruitment and adventitial macrophage behavior by Toll-like receptors. **Angiogenesis** 2014; 17:147-61.

Arantes C, Nomizo R, Lopes MH, Hajj GN, Lima FR, Martins VR. Prion protein and its ligand stress inducible protein 1 regulate astrocyte development. **Glia** 2009; 57:1439-49.

Arjumand W, Sultana S. Role of VHL gene mutation in human renal cell carcinoma. **Tumour Biol** 2012; 33:9-16.

Arnautova I, Kleinman HK. In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. **Nat Protoc** 2010; 5:628-35.

Assenberg R, Wan PT, Geisse S, Mayr LM. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. **Curr Opin Struct Biol** 2013; 23:393-402.

Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis assays: a critical overview. **Clin Chem** 2003; 49:32-40.

Aune G, Stunes AK, Tingulstad S, Salvesen O, Syversen U, Torp SH. The proliferation markers Ki-67/MIB-1, phosphohistone H3, and survivin may contribute in the identification of aggressive ovarian carcinomas. **Int J Clin Exp Pathol** 2011; 4:444-53.

Bacallao R, Kiai K, Jesaitis L. Guiding principles of specimen preservation for confocal fluorescence microscopy. In: Pawley JB, editor. **Handbook of biological confocal microscopy**. Boston: Springer; 1995. p.311-25.

Baker GJ, Yadav VN, Motsch S, et al. Mechanisms of glioma formation: iterative perivascular glioma growth and invasion leads to tumor progression, VEGF-independent vascularization, and resistance to antiangiogenic therapy. **Neoplasia** 2014; 16:543-61.

Baker M, Robinson SD, Lechertier T, et al. Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. **Nat Protoc** 2011; 7:89-104.

Baumann BC, Dorsey JF, Benci JL, Joh DY, Kao GD. Stereotactic intracranial implantation and in vivo bioluminescent imaging of tumor xenografts in a mouse model system of glioblastoma multiforme. **J Vis Exp** 2012; 67:4089.

Beach TG, Tago H, Nagai T, Kimura H, McGeer PL, McGeer EG. Perfusion-fixation of the human brain for immunohistochemistry: comparison with immersion-fixation. **J Neurosci Methods** 1987; 19:183-92.

Becker A, Thakur BK, Weiss JM, Kim HS, Peinado H, Lyden D. Extracellular vesicles in cancer: cell-to-cell mediators of metastasis. **Cancer Cell** 2016; 30:836-48.

Behnan J, Isakson P, Joel M, et al. Recruited brain tumor-derived mesenchymal stem cells contribute to brain tumor progression. **Stem Cells** 2014; 32:1110-23.

Behnan J, Stangeland B, Hosainey SA, et al. Differential propagation of stroma and cancer stem cells dictates tumorigenesis and multipotency. **Oncogene** 2017; 36:570-84.

Beraldo FH, Arantes CP, Santos TG, et al. Role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in calcium signaling induced by prion protein interaction with stress-inducible protein 1. **J Biol Chem** 2010; 285:36542-550.

Beraldo FH, Soares IN, Gonçalves DF, et al. Stress-inducible phosphoprotein 1 has unique cochaperone activity during development and regulates cellular response to ischemia via the prion protein. **FASEB J** 2013; 27:3594-607.

Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the Angiogenic Switch. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:401-10.

Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O_2 availability on human cancer. **Nat Rev Cancer** 2008; 8:967-75.

Blanco R, Gerhardt H. VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. **Cold Spring Harb Perspect Med** 2013; 3:a006569.

Blatch GL, Lässle M, Zetter BR, Kundra V. Isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif. **Gene** 1997; 194:277-82.

Boüard S, Christov C, Guillamo JS, et al. Invasion of human glioma biopsy specimens in cultures of rodent brain slices: a quantitative analysis. **J Neurosurg** 2002; 97:169-76.

Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, et al. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. **Cancer Res** 2004; 64:920-27.

Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. **Cell** 2013; 155:462-77.

Broadley KW, Hunn MK, Farrand KJ, et al. Side population is not necessary or sufficient for a cancer stem cell phenotype in glioblastoma multiforme. **Stem Cells** 2011; 29:452-61.

Büeler H, Fischer M, Lang Y, et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature** 1992; 356:577-82.

Burgoyne AM, Palomo JM, Phillips-Mason PJ, et al. PTP μ suppresses glioma cell migration and dispersal. **Neuro Oncol** 2009; 11:767-78.

Cancer Genome Atlas Research Network, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature** 2008; 455:1061-68.

Candolfi M, Curtin JF, Nichols WS, et al. Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. **J Neurooncol** 2007; 85:133-48.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. **Nature** 1996; 380:435-39.

Carpentier G. **Angiogenesis Analyzer for ImageJ**. 2012. Available from: <URL:<http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Angiogenesis-Analyzer-for-ImageJ>>.

Cha S, Johnson G, Wadghiri YZ, et al. Dynamic, contrast-enhanced perfusion MRI in mouse gliomas: correlation with histopathology. **Magn Reson Med** 2003; 49:848-55.

Chen X, Zhang L, Zhang IY, et al. RAGE expression in tumor-associated macrophages promotes angiogenesis in glioma. **Cancer Res** 2014; 74:7285-97.

- Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **EMBO J** 2002; 21: 3317-26.
- Chinot OL, Wick W, Mason W, et al. Bevacizumab plus radiotherapy–temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. **N Engl J Med** 2014; 370:709-22.
- Chuang HN, Lohaus R, Hanisch UK, Binder C, Dehghani F, Pukrop T. Coculture system with an organotypic brain slice and 3D spheroid of carcinoma cells. **J Vis Exp** 2013; 80: 50881.
- Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. **Nat Rev Cancer** 2010; 10:505-14.
- Claes A, Idema AJ, Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. **Acta Neuropathol** 2007; 114:443-58.
- Clark AJ, Safaee M, Oh T, et al. Stable luciferase expression does not alter immunologic or in vivo growth properties of GL261 murine glioma cells. **J Transl Med** 2014; 12:345.
- Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS. Glioblastoma: from molecular pathology to targeted treatment. **Annu Rev Pathol** 2014; 9:1-25.
- Cohen AL, Holmen SL, Colman H. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **Curr Neurol Neurosci Rep** 2013; 13:345.
- Coitinho AS, Lopes MH, Hajj GN, et al. Short-term memory formation and long-term memory consolidation are enhanced by cellular prion association to stress-inducible protein 1. **Neurobiol Dis** 2007; 26:282-90.
- Colvin M. Alkylating Agents. In: Holland JF, Frei E, editores. **Cancer Medicine**. 6th ed. Hamilton: BC Decker; 2003. Disponível em: <URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12772>>. [2018 jun 27].
- Coniglio SJ, Eugenin E, Dobrenis K, et al. Microglial stimulation of glioblastoma invasion involves epidermal growth factor receptor (EGFR) and

colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1R) signaling. **Mol Med** 2012; 18:519-27.

Cortes-Santiago N, Hossain MB, Gabrusiewicz K, et al. Soluble Tie2 overrides the heightened invasion induced by anti-angiogenesis therapies in gliomas. **Oncotarget** 2016; 7:16146-157.

Crespo I, Vital AL, Nieto AB, et al. Detailed characterization of alterations of chromosomes 7, 9, and 10 in glioblastomas as assessed by single-nucleotide polymorphism arrays. **J Mol Diagn** 2011; 13:634-47.

Cuddapah VA, Robel S, Watkins S, Sontheimer H. A neurocentric perspective on glioma invasion. **Nat Rev Neurosci** 2014; 15:455-65.

Daniel S, Bradley G, Longshaw VM, Söti C, Csermely P, Blatch GL. Nuclear translocation of the phosphoprotein Hop (Hsp70/Hsp90 organizing protein) occurs under heat shock, and its proposed nuclear localization signal is involved in Hsp90 binding. **Biochim Biophys Acta** 2008; 1783:1003-14.

Davis ME. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. **Clin J Oncol Nurs** 2016; 20:S2-S8.

De Marco A. Recombinant polypeptide production in *E. coli*: towards a rational approach to improve the yields of functional proteins. **Microb Cell Fact** 2013; 12:101.

De Rossi G, Scotland R, Whiteford J. Critical factors in measuring angiogenesis using the aortic ring model. **J Genet Syndr Gene Ther** 2013; 4:1000147.

Deichmann U. Epigenetics: The origins and evolution of a fashionable topic. **Dev Biol** 2016; 416:249-54.

Demand J, Lüders J, Höhfeld J. The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. **Mol Cell Biol** 1998; 18:2023-28.

Dexter D. Pharmacology of Anticancer Drugs. In: Kruh GD, Tew KD, editores. **Basic Science of Cancer**. Philadelphia: Current Medicine; 2000. p. 168-86.

Dienstmann R, Rodon J, Serra V, Tabernero J. Picking the point of inhibition: A comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. **Mol Cancer Ther** 2014; 13:1021-31.

Domingues HS, Portugal CC, Socodato R, Relvas JB. Oligodendrocyte, astrocyte, and microglia crosstalk in myelin development, damage, and repair. **Front Cell Dev Biol** 2016; 4:71.

Dong Z, Wang J. Hypoxia Selection of Death-Resistant Cells: A Role for Bcl-X_L. **J Biol Chem** 2004; 279:9215-21.

Dorsey JF, Hollander AB, Alonso-Basanta M, et al. Cancer of the Central Nervous System. In: Niederhuber J, Armitage J, Doroshow J, Kastan M, Tepper J, editores. **Abeloff's Clinical Oncology E-Book**. 5 ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2013. p. 938-1001.

Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. **Nat Rev Cancer** 2018; 18:407-18.

Dudley AC. Likely potential for false positives using bacterially-expressed recombinant proteins in anti-angiogenesis reports. **Cancer Biol Ther** 2006; 5:406.

Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, et al. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. **Science** 1998; 282:946-49.

Eales KL, Hollinshead KE, Tennant DA. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. **Oncogenesis** 2016; 5:e190.

Ehsan SM, Welch-Reardon KM, Waterman ML, Hughes CC, George SC. A three-dimensional in vitro model of tumor cell intravasation. **Integr Biol (Camb)** 2014; 6:603-10.

Eisemann T, Costa B, Strelau J, Mittelbronn M, Angel P, Peterziel H. An advanced glioma cell invasion assay based on organotypic brain slice cultures. **BMC Cancer** 2018; 18:103.

Eklund L, Bry M, Alitalo K. Mouse models for studying angiogenesis and lymphangiogenesis in cancer. **Mol Oncol** 2013; 7:259-82.

El Meskini R, Iacovelli AJ, Kulaga A, et al. A preclinical orthotopic model for glioblastoma recapitulates key features of human tumors and demonstrates sensitivity to a combination of MEK and PI3K pathway inhibitors. **Dis Model Mech** 2015; 8:45-56.

Erlich RB, Kahn SA, Lima FR, et al. STI1 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways. **Glia** 2007; 55:1690-98.

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. **N Engl J Med** 2000; 343:1350-354.

Eustace BK, Jay DG. Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. **Cell Cycle** 2004; 3:1098-100.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer** 2015; 136:E359-86.

Fontana S, Giallombardo M, Alessandro R. Technical Aspects for the Evaluation of Exosomes and Their Content. In: Russo A, Giordano A, Rolfo C, editores. **Liquid Biopsy in Cancer Patients: The Hand Lens for Tumor Evolution**. Cham: Humana Press; 2017. p. 61-70.

Forsheew T, Lewis P, Waldman A, et al. Three different brain tumours evolving from a common origin. **Oncogenesis** 2013; 2:e41.

Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. **Lab Invest** 2000; 80:65-72.

Fujiwara S, Nakagawa K, Harada H, et al. Silencing hypoxia-inducible factor-1 α inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas. **Int J Oncol** 2007; 30:793-802.

Fünfschilling U, Supplie LM, Mahad D, et al. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. **Nature** 2012; 485:517-21.

Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole animal perfusion fixation for rodents. **J Vis Exp** 2012; 65:3564.

Gao B, Tsan MF. Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor α release by murine macrophages. **J Biol Chem** 2003; 278:174-79.

Gardiner C, Ferreira YJ, Dragovic RA, Redman CW, Sargent IL. Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. **J Extracell Vesicles** 2013; 2:19671.

Garofalo S, D'Alessandro G, Chece G, et al. Enriched environment reduces glioma growth through immune and non-immune mechanisms in mice. **Nat Commun** 2015; 6:6623.

Garofalo S, Grimaldi A, Chece G, et al. The glycoside oleandrin reduces glioma growth with direct and indirect effects on tumor cells. **J Neurosci** 2017; 37:3926-39.

Gate L, Tew KD. Alkylating agents. In: Minev B, editor. **Cancer management in man: chemotherapy, biological therapy, hyperthermia and supporting measures**. New York: Springer; 2011. p.61-85.

Genzen JR, Platel JC, Rubio ME, Bordey A. Ependymal cells along the lateral ventricle express functional P2X7 receptors. **Purinergic Signal** 2009; 5:299-307.

Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:296-307.

Ghoochani A, Yakubov E, Sehm T, et al. A versatile ex vivo technique for assaying tumor angiogenesis and microglia in the brain. **Oncotarget** 2016; 7:1838-53.

Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. **J Clin Oncol** 2003; 21:1624-36.

Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. **N Engl J Med** 2014; 370:699-708.

Gnarra JR, Ward JM, Porter FD, et al. Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94:9102-107.

Goldman M. CpG Islands. In: Brenner S, Miller JH. **Encyclopedia of Genetics**. Cambridge: Academic Press; 2001. p. 477.

Goodwin AM. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. **Microvasc Res** 2007; 74:172-83.

Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. **Nature** 1996; 379:88-91.

Gritsenko P, Leenders W, Friedl P. Recapitulating in vivo-like plasticity of glioma cell invasion along blood vessels and in astrocyte-rich stroma. **Histochem Cell Biol** 2017; 148:395-406.

Hajj GNM, Arantes CP, Dias MV, et al. The unconventional secretion of stress-inducible protein 1 by a heterogeneous population of extracellular vesicles. **Cell Mol Life Sci** 2013; 70:3211-27.

Hajj GNM, Santos TG, Cook ZS, Martins VR. Developmental expression of prion protein and its ligands stress-inducible protein 1 and vitronectin. **J Comp Neurol** 2009; 517:371-84.

Hajj GNM, Santos TG, Landemberger MC, Lopes MH. Transmissible spongiform encephalopathies. In: Gonzalez-Quevedo A, editor. **Brain**

damage: bridging between basic research and clinics. London: IntechOpen; 2012. p.187-220.

Hambardzumyan D, Bergers G. Glioblastoma: Defining Tumor Niches. **Trends Cancer** 2015; 1:252-65.

Hansen LJ, Diplas BH, Becher O, et al. Genetics of glioma. In: Sampson JH, editor. **The Duke Glioma Handbook: Pathology, Diagnosis, and Management.** Cambridge: Cambridge University Press; 2016. p. 1-23.

Harris AL. Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:38-47.

Hasselbach LA, Irtenkauf SM, Lemke NW, et al. Optimization of high grade glioma cell culture from surgical specimens for use in clinically relevant animal models and 3D immunochemistry. **J Vis Exp** 2014; 83: e51088.

Heddleston JM, Li Z, Lathia JD, Bao S, Hjelmeland AB, Rich JN. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. **Br J Cancer** 2010; 102:789-95.

Heiss M, Hellström M, Kalén M, et al. Endothelial cell spheroids as a versatile tool to study angiogenesis in vitro. **FASEB J** 2015; 29:3076-84.

Herbert SP, Stainier DY. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2011; 12:551-64.

Herculano-Houzel S. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. **Glia** 2014; 62:1377-391.

Hernández MP, Sullivan WP, Toft DO. The assembly and intermolecular properties of the hsp70-Hop-hsp90 molecular chaperone complex. **J Biol Chem** 2002; 277:38294-304.

Hong SB, Furihata M, Baba M, Zbar B, Schmidt LS. Vascular defects and liver damage by the acute inactivation of the VHL gene during mouse embryogenesis. **Lab Invest** 2006; 86:664-75.

Honoré B, Leffers H, Madsen P, Rasmussen HH, Vandekerckhove J, Celis JE. Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human

protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein STI1. **J Biol Chem** 1992; 267:8485-91.

Humpel C. Organotypic brain slice cultures: A review. **Neuroscience** 2015; 305:86-98.

Huse JT, Aldape KD. The evolving role of molecular markers in the diagnosis and management of diffuse glioma. **Clin Cancer Res** 2014; 20:5601-611.

Huse JT, Holland EC. Genetically engineered mouse models of brain cancer and the promise of preclinical testing. **Brain Pathol** 2009; 19:132-43.

Huszthy PC, Daphu I, Niclou SP, et al. In vivo models of primary brain tumors: pitfalls and perspectives. **Neuro Oncol** 2012; 14:979-93.

Jacobs VL, Valdes PA, Hickey WF, De Leo JA. Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. **ASN Neuro** 2011; 3: e00063.

Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. **Nat Rev Neurosci** 2007; 8:610-22.

Jain RK. Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia. **Cancer Cell** 2014; 26:605-22.

Jäkel S, Dimou L. Glial cells and their function in the adult brain: a journey through the history of their ablation. **Front Cell Neurosci** 2017; 11:24.

Jensen SS, Meyer M, Petterson SA, et al. Establishment and characterization of a tumor stem cell-based glioblastoma invasion model. **PLoS One** 2016; 11:e0159746.

Jochmans-Lemoine A, Shahare M, Soliz J, Joseph V. HIF1 α and physiological responses to hypoxia are correlated in mice but not in rats. **J Exp Biol** 2016; 219:3952-61.

Joshi M, Dwyer DM, Nakhasi HL. Cloning and characterization of differentially expressed genes from in vitro-grown 'amastigotes' of *Leishmania donovani*. **Mol Biochem Parasitol** 1993; 58:345-54.

Jung S, Ackerley C, Ivanchuk S, Mondal S, Becker LE, Rutka JT. Tracking the invasiveness of human astrocytoma cells by using green fluorescent protein in an organotypical brain slice model. **J Neurosurg** 2001; 94:80-89.

Jung S, Kim HW, Lee JH, et al. Brain tumor invasion model system using organotypic brain-slice culture as an alternative to in vivo model. **J Cancer Res Clin Oncol** 2002; 128:469-76.

Jung S, Paek YW, Moon KS, et al. Expression of Nm23 in gliomas and its effect on migration and invasion in vitro. **Anticancer Res** 2006; 26:249-58.

Kang SH, Yu MO, Park KJ, Chi SG, Park DH, Chung YG. Activated STAT3 regulates hypoxia-induced angiogenesis and cell migration in human glioblastoma. **Neurosurgery** 2010; 67:1386-95.

Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ, Van Meir EG. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. **Neuro Oncol** 2005; 7:134-53.

Kaye AH, Laws ER. Historical Perspectives. In: Kaye AH, Laws ER, editors. **Brain Tumors: An Encyclopedic Approach** (3 ed.). Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 1-5.

Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). **Mol Pharmacol** 2006; 70:1469-480.

Killela PJ, Pirozzi CJ, Healy P, et al. Mutations in IDH1, IDH2, and in the TERT promoter define clinically distinct subgroups of adult malignant gliomas. **Oncotarget** 2014; 5:1515-525.

Kim DH, Mohapatra G, Bollen A, Waldman FM, Feuerstein BG. Chromosomal abnormalities in glioblastoma multiforme tumors and glioma cell lines detected by comparative genomic hybridization. **Int J Cancer** 1995; 60:812-19.

Kirkman MA. The role of imaging in the development of neurosurgery. **J Clin Neurosci** 2015; 22:55-61.

Kloepper J, Riedemann L, Amoozgar Z, et al. Ang-2/VEGF bispecific antibody reprograms macrophages and resident microglia to anti-tumor phenotype and prolongs glioblastoma survival. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2016; 113:4476-81.

Koh MY, Powis G. Passing the baton: the HIF switch. **Trends Biochem Sci** 2012; 37:364-72.

Koshiji M, To KK, Hammer S, et al. HIF-1 α induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutS α expression. **Mol Cell** 2005; 17:793-803.

Kroonen J, Nassen J, Boulanger YG, et al. Human glioblastoma-initiating cells invade specifically the subventricular zones and olfactory bulbs of mice after striatal injection. **Int J Cancer** 2011; 129:574-85.

Kundu S, Xiong A, Spyrou A, et al. Heparanase promotes glioma progression and is inversely correlated with patient survival. **Mol Cancer Res** 2016; 14:1243-53.

Larjavaara S, Mäntylä R, Salminen T, et al. Incidence of gliomas by anatomic location. **Neuro Oncol** 2007; 9:319-25.

Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. **Genes Dev** 2015; 29:1203-17.

Ledur PF, Onzi GR, Zong H, Lenz G. Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries?. **Oncotarget** 2017; 8:69185-197.

Lee CT, Graf C, Mayer FJ, Richter SM, Mayer MP. Dynamics of the regulation of Hsp90 by the co-chaperone Sti1. **EMBO J** 2012; 31:1518-28.

Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. **Cancer Cell** 2006; 9:391-403.

Lee K, Qian DZ, Rey S, Wei H, Liu JO, Semenza GL. Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009; 106:2353-358.

Lee SD, Lai TW, Lin SZ, et al. Role of stress-inducible protein-1 in recruitment of bone marrow derived cells into the ischemic brains. **EMBO Mol Med** 2013; 5:1227-46.

Li A, Walling J, Kotliarov Y, et al. Genomic changes and gene expression profiles reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas. **Mol Cancer Res** 2008; 6:21-30.

Li J, Sun X, Wang Z ,et al. Regulation of vascular endothelial cell polarization and migration by Hsp70/Hsp90-organizing protein. **PLoS One** 2012; 7:e36389.

Lima FR, Arantes CP, Muras AG, Nomizo R, Brentani RR, Martins VR. Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. **J Neurochem** 2007; 103:2164-76.

Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. Physiology of the prion protein. **Physiol Rev** 2008; 88:673-728.

Lipps C, Klein F, Wahlicht T, et al. Expansion of functional personalized cells with specific transgene combinations. **Nat Commun** 2018; 9:994.

Longshaw VM, Baxter M, Prewitz M, Blatch GL. Knockdown of the co-chaperone Hop promotes extranuclear accumulation of Stat3 in mouse embryonic stem cells. **Eur J Cell Biol** 2009; 88:153-66.

Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, et al. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **J Neurosci** 2005; 25:11330-339.

Lopes MH, Santos TG, Rodrigues BR, et al. Disruption of prion protein–HOP engagement impairs glioblastoma growth and cognitive decline and improves overall survival. **Oncogene** 2015; 34:3305-14.

Lopez-Gines C, Cerda-Nicolas M, Gil-Benso R, et al. Association of chromosome 7, chromosome 10 and EGFR gene amplification in glioblastoma multiforme. **Clin Neuropathol** 2005; 24:209-18.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol** 2007; 114:97-109.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Acta Neuropathol** 2016; 131:803-20.

Ludwig AK, Giebel B. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. **Int J Biochem Cell Biol** 2012; 44:11-15.

Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. Extracellular vesicles: unique intercellular delivery vehicles. **Trends Cell Biol** 2017; 27:172-88.

Machein MR, Renninger S, de Lima-Hahn E, Plate KH. Minor Contribution of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitors to the Vascularization of Murine Gliomas. **Brain Pathol** 2003; 13:582-97.

Mahase S, Rattenni RN, Wesseling P, et al. Hypoxia-mediated mechanisms associated with antiangiogenic treatment resistance in glioblastomas. **Am J Pathol** 2017; 187:940-53.

Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. **Genes Dev** 2001; 15:1311-333.

Margison GP, Santibáñez Koref MF, Povey AC. Mechanisms of carcinogenicity/chemotherapy by O⁶-methylguanine. **Mutagenesis** 2002; 17:483-87.

Mariño G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2014; 15:81-94.

Markovic DS, Glass R, Synowitz M, Rooijen Nv, Kettenmann H. Microglia stimulate the invasiveness of glioma cells by increasing the activity of metalloprotease-2. **J Neuropathol Exp Neurol** 2005; 64:754-62.

Markovic DS, Vinnakota K, Chirasani S, et al. Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009; 106:12530-535.

Marques-Torrejón MA, Gangoso E, Pollard SM. Modelling glioblastoma tumour-host cell interactions using adult brain organotypic slice co-culture. **Dis Model Mech** 2018; 11:dmm031435.

Martins VR, Beraldo FH, Hajj GNM, et al. Prion protein: orchestrating neurotrophic activities. **Curr Issues Mol Biol** 2010; 12:63-86.

Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. **Acta Pharm Sin B** 2015; 5:378-89.

Méndez O, Zavadil J, Esencay M, et al. Knock down of HIF-1 α in glioma cells reduces migration in vitro and invasion in vivo and impairs their ability to form tumor spheres. **Mol Cancer** 2010; 9:133.

Michiels C. Physiological and pathological responses to hypoxia. **Am J Pathol** 2004; 164:1875-82.

Miele G, Alejo Blanco AR, Baybutt H, Horvat S, Manson J, Clinton M. Embryonic activation and developmental expression of the murine prion protein gene. **Gene Expr** 2003; 11:1-12.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2018. 128 p.

Mitra A, Mishra L, Li S. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. **Trends Biotechnol** 2013; 31:347-54.

Mitra S. MGMT: A Personal Perspective. **DNA Repair (Amst)** 2007; 6:1064-70.

Morreale VM, Herman BH, Der-Minassian V, et al. A brain-tumor model utilizing stereotactic implantation of a permanent cannula. **J Neurosurg** 1993; 78:959-65.

Mur P, Rodríguez de Lope Á, Díaz-Crespo FJ, et al. Impact on prognosis of the regional distribution of MGMT methylation with respect to the CpG island

methylator phenotype and age in glioma patients. **J Neurooncol** 2015; 122:441-50.

Nakatsu MN, Hughes CC. An optimized three-dimensional in vitro model for the analysis of angiogenesis. **Methods Enzymol** 2008; 443:65-82.

Nakatsu MN, Sainson RC, Aoto JN, et al. Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in fibrin gels: the role of fibroblasts and Angiopoietin-1. **Microvasc Res** 2003; 66:102-12.

Nassar D, Blanpain C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. **Annu Rev Pathol** 2016; 11:47-76.

Nawroth R, Stellwagen F, Schulz WA, et al. S6K1 and 4E-BP1 are independent regulated and control cellular growth in bladder cancer. **PLoS One** 2011; 6:e27509.

Nayak L, Lee EQ, Wen PY. Epidemiology of brain metastases. **Curr Oncol Rep** 2012; 14:48-54.

Neve A, Santhana Kumar K, Tripolitsioti D, Grotzer MA, Baumgartner M. Investigation of brain tissue infiltration by medulloblastoma cells in an ex vivo model. **Sci Rep** 2017; 7:5297.

Newcomb EW, Demaria S, Lukyanov Y, et al. The combination of ionizing radiation and peripheral vaccination produces long-term survival of mice bearing established invasive GL261 gliomas. **Clin Cancer Res** 2006; 12:4730-37.

Newcomb EW, Zagzag D. The Murine GL261 Glioma Experimental Model to Assess Novel Brain Tumor Treatments. In: Van Meir EG, editor. **CNS cancer: models, markers, prognostic factors, targets, and therapeutic approaches**. Cham: Humana Press; 2009. p.227-41.

Oh T, Fakurnejad S, Sayegh ET, et al. Immunocompetent murine models for the study of glioblastoma immunotherapy. **J Transl Med** 2014; 12:107.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. **Cancer Sci** 2009; 100:2235-241.

Opal SM, van der Poll T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. **J Intern Med** 2015; 277:277-293.

Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, et al. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. **Neuro Oncol** 2014; 16:896-913.

Osuka S, Van Meir EG. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. **J Clin Invest** 2017; 127:415-26.

Otani R, Uzuka T, Ueki K. Classification of adult diffuse gliomas by molecular markers – A short review with historical footnote. **Jpn J Clin Oncol** 2017; 47:2-6.

Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. **Science** 2008; 321:1807-812.

Pavlova NN, Thompson CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism. **Cell Metab** 2016; 23:27-47.

Pearson JRD, Regad T. Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme. **Signal Transduct Target Ther** 2017; 2:17040.

Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the *met* protooncogene. **Cancer Cell** 2003; 3:347-61.

Phan DT, Bender RHF, Andrejcsk JW, et al. Blood–brain barrier-on-a-chip: Microphysiological systems that capture the complexity of the blood–central nervous system interface. **Exp Biol Med (Maywood)** 2017b; 242:1669-78.

Phan DTT, Wang X, Craver BM, et al. A vascularized and perfused organ-on-a-chip platform for large-scale drug screening applications. **Lab Chip** 2017a; 17:511-20.

Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. **Cancer Cell** 2006; 9:157-73.

Ping YF, Bian XW. Concise review: contribution of cancer stem cells to neovascularization. **Stem Cells** 2011; 29:888-94.

Plunkett RJ, Weber RJ, Oldfield EH. Stereotaxic implantation of dispersed cell suspensions into brain: A systematic appraisal of cell placement and survival. **J Neurosurg** 1988; 69:228-33.

Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, et al. Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. **Cell Stem Cell** 2009; 4:568-80.

Prayson RA. The utility of MIB-1/Ki-67 immunostaining in the evaluation of central nervous system neoplasms. **Adv Anat Pathol** 2005; 12:144-48.

Puntel M, Kroeger KM, Sanderson NS, Thomas CE, Castro MG, Lowenstein PR. Gene transfer into rat brain using adenoviral vectors. **Curr Protoc Neurosci** 2010; 50:4.24.1-4.24.49.

Qiu Y, Li P, Ji C. Cell death conversion under hypoxic condition in tumor development and therapy. **Int J Mol Sci** 2015; 16:25536-551.

R&D Systems, Inc. **Protocol for the preparation and fluorescent IHC staining of frozen tissue sections.** Available from: <URL:<https://www.rndsystems.com/resources/protocols/protocol-preparation-and-fluorescent-ihc-staining-frozen-tissue-sections>>. [2018 mai 30].

Radisky DC, Stallings-Mann M, Hirai Y, Bissell MJ. Single proteins might have dual but related functions in intracellular and extracellular microenvironments. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2009; 10:228-34.

Ralhan R, Kaur J. Alkylating agents and cancer therapy. **Expert Opin Ther Pat** 2007; 17:1061-75.

Ramirez YP, Weatherbee JL, Wheelhouse RT, Ross AH. Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance. **Pharmaceuticals (Basel)** 2013; 6:1475-506.

Reis M, Czupalla CJ, Ziegler N, et al. Endothelial Wnt/ β -catenin signaling inhibits glioma angiogenesis and normalizes tumor blood vessels by inducing PDGF-B expression. **J Exp Med** 2012; 209:1611-27.

Ribatti D. Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis. **Angiogenesis** 2008; 11:3-10.

Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. **Nature** 2010; 468:824-28.

Roffé M, Beraldo FH, Bester R, et al. Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107:13147-152.

Röhl A, Toppel F, Bender E, et al. Hop/Sti1 phosphorylation inhibits its co-chaperone function. **EMBO Rep** 2015; 16:240-49.

Rong Y, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. **J Neuropathol Exp Neurol** 2006; 65:529-39.

Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Front Microbiol** 2014; 5:172.

Ruck T, Bittner S, Epping L, Herrmann AM, Meuth SG. Isolation of primary murine brain microvascular endothelial cells. **J Vis Exp** 2014; 93:e52204.

Ruggeri BA, Camp F, Miknyoczki S. Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. **Biochem Pharmacol** 2014; 87:150-61.

Sampetean O, Saga I, Nakanishi M, et al. Invasion precedes tumor mass formation in a malignant brain tumor model of genetically modified neural stem cells. **Neoplasia** 2011; 13:784-91.

Sanchez-Garcia L, Martín L, Mangués R, Ferrer-Miralles N, Vázquez E, Villaverde A. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. **Microb Cell Fact** 2016; 15:33.

Sanderson BJ, Shield AJ. Mutagenic damage to mammalian cells by therapeutic alkylating agents. **Mutat Res** 1996; 355:41-57.

Sant M, Minicozzi P, Lagorio S, et al. Survival of European patients with central nervous system tumors. **Int J Cancer** 2012; 131:173-85.

Santos TG, Beraldo FH, Hajj GN, et al. Laminin- γ 1 chain and stress inducible protein 1 synergistically mediate PrPC-dependent axonal growth via Ca²⁺ mobilization in dorsal root ganglia neurons. **J Neurochem** 2013; 124:210-23.

Santos TG, Silva IR, Costa-Silva B, Lepique AP, Martins VR, Lopes MH. Enhanced neural progenitor/stem cells self-renewal via the interaction of stress-inducible protein 1 with the prion protein. **Stem Cells** 2011; 29:1126-36.

Sarkaria JN, Kitange GJ, James CD, et al. Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma. **Clin Cancer Res** 2008; 14:2900-908.

Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, et al. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. **Science** 2006; 311:629-32.

Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, et al. Melanoma. **Nat Rev Dis Primers** 2015; 1:15003.

Scheithauer BW. Development of the WHO classification of tumors of the central nervous system: A historical perspective. **Brain Pathol** 2009; 19:551-64.

Schiffer D, Annovazzi L, Caldera V, Mellai M. On the origin and growth of gliomas. **Anticancer Res** 2010; 30:1977-98.

Schito L, Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: Master regulators of cancer progression. **Trends Cancer** 2016; 2:758-70.

Schwab M. **Encyclopedia of cancer**. 3rd ed. Berlin-Heidelberg: Springer; 2011. p. 136.

Seidel S, Garvalov BK, Acker T. Isolation and culture of primary glioblastoma cells from human tumor specimens. **Methods Mol Biol** 2015; 1235:263-75.

Seliger C, Meyer AL, Renner K, et al. Metformin inhibits proliferation and migration of glioblastoma cells independently of TGF- β 2. **Cell Cycle** 2016; 15:1755-66.

Semenza GL, Neufeldt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1991; 88:5680-684.

Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. **Oncogene** 2010; 29:625-34.

Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. **J Clin Invest** 2013; 123:3664-671.

Semenza GL. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. **Crit Rev Biochem Mol Biol** 2000; 35:71-103.

Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. **Trends Pharmacol Sci** 2012; 33:207-14.

Shay JW, Wright WE. Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. **FEBS Lett** 2010; 584:3819-825.

Shergalis A, Bankhead A 3rd, Luesakul U, Muangsin N, Neamati N. Current challenges and opportunities in treating glioblastoma. **Pharmacol Rev** 2018; 70:412-45.

Shimamura S, Sasaki K, Tanaka M. The Src substrate SKAP2 regulates actin assembly by interacting with WAVE2 and cortactin proteins. **J Biol Chem** 2013; 288:1171-183.

Silber JR, Bobola MS, Blank A, Chamberlain MC. O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: Promise and problems. **Biochim Biophys Acta** 2012; 1826:71-82.

Simons M, Raposo G. Exosomes: Vesicular carriers for intercellular communication. **Curr Opin Cell Biol** 2009; 21:575-81.

Singh DK, Kollipara RK, Vemireddy V, et al. Oncogenes activate an autonomous transcriptional regulatory circuit that drives glioblastoma. **Cell Rep** 2017; 18:961-76.

Sleutels F, Barlow DP. The origins of genomic imprinting in mammals. **Adv Genet** 2002; 46:119-63.

Smith EJ, Staton CA. Tubule formation assays. In: Staton CA, Lewis C, Bicknell R, editores. **Angiogenesis assays: a critical appraisal of current techniques**. Chichester: John Wiley e Sons; 2006. p.65-87.

Soares IN, Caetano FA, Pinder J, et al. Regulation of stress-inducible phosphoprotein 1 nuclear retention by protein inhibitor of activated STAT PIAS1. **Mol Cell Proteomics** 2013; 12:3253-270.

Sobrino A, Phan DT, Datta R, et al. 3D microtumors *in vitro* supported by perfused vascular networks. **Sci Rep** 2016; 6:31589.

Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. **Am J Pathol** 2002; 161:1961-971.

Staton CA, Reed MW, Brown NJ. A critical analysis of current *in vitro* and *in vivo* angiogenesis assays. **Int J Exp Pathol** 2009; 90:195-221.

Stoyanov GS, Dzhankov DL. On the Concepts and History of Glioblastoma Multiforme-Morphology, Genetics and Epigenetics. **Folia Med (Plovdiv)** 2018; 60:48-66.

Sturm D, Witt H, Hovestadt V, et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. **Cancer Cell** 2012; 22:425-37.

Sullivan JP, Nahed BV, Madden MW, et al. Brain tumor cells in circulation are enriched for mesenchymal gene expression. **Cancer Discov** 2014; 4:1299-1309.

Sullivan R, Graham CH. Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. **Cancer Metastasis Rev** 2007; 26:319-31.

Sung KE, Beebe DJ. Microfluidic 3D models of cancer. **Adv Drug Deliv Rev** 2014; 79-80:68-78.

Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. **Nat Rev Drug Discov** 2008; 7:168-81.

Szatmári T, Lumniczky K, Désaknai S, et al. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. **Cancer Sci** 2006; 97:546-53.

Taylor KE, Giddings JC, van den Berg CW. C-reactive protein–induced in vitro endothelial cell activation is an artefact caused by azide and lipopolysaccharide. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2005; 25:1225-230.

Theeuwes F, Yum SI. Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations. **Ann Biomed Eng** 1976; 4:343-53.

Thomas RP, Recht L, Nagpal S. Advances in the management of glioblastoma: the role of temozolomide and MGMT testing. **Clin Pharmacol** 2013; 5:1-9.

Torres JH, Chatellard P, Stutz E. Isolation and characterization of gmsti, a stress-inducible gene from soybean (*Glycine max*) coding for a protein belonging to the TPR (tetratricopeptide repeats) family. **Plant Mol Biol** 1995; 27:1221-26.

Torsvik A, Stieber D, Enger PØ, et al. U-251 revisited: genetic drift and phenotypic consequences of long-term cultures of glioblastoma cells. **Cancer Med** 2014; 3:812-24.

Tremblay P, Bouzamondo-Bernstein E, Heinrich C, Prusiner SB, DeArmond SJ. Developmental expression of PrP in the post-implantation embryo. **Brain Res** 2007; 1139:60-67.

Tsai CL, Tsai CN, Lin CY, et al. Secreted stress-induced phosphoprotein 1 activates the ALK2-SMAD signaling pathways and promotes cell proliferation of ovarian cancer cells. **Cell Rep** 2012; 2:283-93.

Van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. **Pharmacol Rev** 2012; 64:676-705.

Vaupel P, Harrison L. Tumor Hypoxia: Causative Factors, Compensatory Mechanisms, and Cellular Response. **Oncologist** 2004; 9 Suppl 5:4-9.

Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. **Oncologist** 2004; 9 Suppl 5:10-17.

Venneti S, Thompson CB. Metabolic reprogramming in brain tumors. **Annu Rev Pathol** 2017; 12:515-45.

Villalva C, Martin-Lannerée S, Cortes U, et al. STAT3 is essential for the maintenance of neurosphere-initiating tumor cells in patients with glioblastomas: A potential for targeted therapy?. **Int J Cancer** 2011; 128:826-38.

Vlashi E, Lagadec C, Vergnes L, et al. Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2011; 108:16062-067.

Wakelin SJ, Sabroe I, Gregory CD, et al. "Dirty little secrets" – Endotoxin contamination of recombinant proteins. **Immunol Lett** 2006; 106:1-7.

Wakimoto H, Kesari S, Farrell CJ, et al. Human glioblastoma-derived cancer stem cells: establishment of invasive glioma models and treatment with oncolytic herpes simplex virus vectors. **Cancer Res** 2009; 69:3472-481.

Walker TL, DeCruz EE, Dass CR, Burton MA. A method for intratumoral continuous infusion of antisense oligodeoxynucleotides. **J Pharm Sci** 1998; 87:387-89.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1995; 92:5510-514.

Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. **Nature** 2010; 468:829-33.

Wang S, Liang K, Hu Q, et al. JAK2-binding long noncoding RNA promotes breast cancer brain metastasis. **J Clin Invest** 2017; 127:4498-515.

Wang SC, Hong JH, Hsueh C, Chiang CS. Tumor-secreted SDF-1 promotes glioma invasiveness and TAM tropism toward hypoxia in a murine astrocytoma model. **Lab Invest** 2012; 92:151-62.

Wang W, Sivakumar W, Torres S, et al. Effects of convection-enhanced delivery of bevacizumab on survival of glioma-bearing animals. **Neurosurg Focus** 2015; 38:E8.

Webb JR, Campos-Neto A, Skeiky YA, Reed SG. Molecular characterization of the heat-inducible LmSTI1 protein of *Leishmania major*. **Mol Biochem Parasitol** 1997; 89:179-93.

Webster RM, Mentzer SE. The malignant melanoma landscape. **Nat Rev Drug Discov** 2014; 13:491-92.

Weinmann M, Jendrossek V, Güner D, Goecke B, Belka C. Cyclic exposure to hypoxia and reoxygenation selects for tumor cells with defects in mitochondrial apoptotic pathways. **FASEB J** 2004; 18:1906-908.

Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. **Nat Med** 2011; 17:1359-370.

Weller M, Stupp R, Reifenberger G, et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?. **Nat Rev Neurol** 2010; 6:39-51.

Weller M, Wick W, Aldape K, et al. Glioma. **Nat Rev Dis Primers** 2015; 1:15017.

Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. **Biochim Biophys Acta** 2011; 1813:521-31.

[WHO] World Health Organization. **WHO Classification of tumors**. Available from: <URL:<http://whobluebooks.iarc.fr>>. [2018a mai 30].

[WHO] World Health Organization. **WHO IARC Classification of Tumours: historical perspective.** Available from: <URL:<http://whobluebooks.iarc.fr/about/history.php>>. [2018b mai 30].

Wicki A, Christofori G. The angiogenic switch in tumorigenesis. In: Marmé D, Fusenig N, editores. **Tumor angiogenesis: basic mechanisms and cancer therapy.** Berlin-Heidelberg: Springer; 2008. p.67-88.

Wigerup C, Pålman S, Bexell D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. **Pharmacol Ther** 2016; 164:152-69.

Williams LR. Basal forebrain cholinergic lesions and complete transection of septal-hippocampal pathway. In: Perez-Polo JR, editor. **Paradigms of neural injury.** San Diego: Academic Press; 1996. p.106-14.

Winkler F, Kienast Y, Fuhrmann M, et al. Imaging glioma cell invasion in vivo reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis. **Glia** 2009; 57:1306-315.

Wippold FJ 2nd, Lämmle M, Anatelli F, Lennerz J, Perry A. Neuropathology for the neuroradiologist: palisades and pseudopalisades. **AJNR Am J Neuroradiol** 2006; 27:2037-41.

Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Mack AF, Reichenbach A. Ependymal Cells. In: Squire LR, editor. **Encyclopedia of Neuroscience.** Cambridge: Academic Press; 2009. p. 1133-140.

Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, et al. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. **Nature** 2002; 415:871-80.

Wu A, Oh S, Wiesner SM, et al. Persistence of CD133⁺ cells in human and mouse glioma cell lines: Detailed characterization of GL261 glioma cells with cancer stem cell-like properties. **Stem Cells Dev** 2008; 17:173-84.

Wu ZQ, Rowe RG, Lim KC, et al. A Snail1/Notch1 signaling axis controls embryonic vascular development. **Nat Commun** 2014; 5:3998.

Xue Y, Gao X, Lindsell CE, et al. Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. **Hum Mol Genet** 1999; 8:723-30.

Yadav VN, Zamler D, Baker GJ, et al. CXCR4 increases in-vivo glioma perivascular invasion, and reduces radiation induced apoptosis: A genetic knockdown study. **Oncotarget** 2016; 7:83701-719.

Yamada S, Khankaldyyan V, Bu X, et al. A method to accurately inject tumor cells into the caudate/putamen nuclei of the mouse brain. **Tokai J Exp Clin Med** 2004; 29:167-73.

Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **J Extracell Vesicles** 2015; 4:27066.

Yang C, Robbins PD. The roles of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis. **Clin Dev Immunol** 2011; 2011:842849.

Yi L, Zhou C, Wang B, et al. Implantation of GL261 neurospheres into C57/BL6 mice: a more reliable syngeneic graft model for research on glioma-initiating cells. **Int J Oncol** 2013; 43:477-84.

Yu MO, Park KJ, Park DH, Chung YG, Chi SG, Kang SH. Reactive oxygen species production has a critical role in hypoxia-induced Stat3 activation and angiogenesis in human glioblastoma. **J Neurooncol** 2015; 125:55-63.

Zagzag D, Amirnovin R, Greco MA, et al. Vascular apoptosis and involution in gliomas precede neovascularization: a novel concept for glioma growth and angiogenesis. **Lab Invest** 2000b; 80:837-49.

Zagzag D, Esencay M, Mendez O, et al. Hypoxia and vascular endothelial growth factor-induced stromal cell-derived factor-1 α /CXCR4 expression in glioblastomas: One plausible explanation of Scherer's structures. **Am J Pathol** 2008; 173:545-60.

Zagzag D, Miller DC, Chiriboga L, Yee H, Newcomb EW. Green fluorescent protein immunohistochemistry as a novel experimental tool for the detection of glioma cell invasion *in vivo*. **Brain Pathol** 2003; 13:34-37.

Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. **Cancer** 2000a; 88:2606-618.

Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, et al. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO J** 2002; 21:3307-316.

Zhai H, Acharya S, Gravanis I, et al. Annexin A2 promotes glioma cell invasion and tumor progression. **J Neurosci** 2011; 31:14346-360.

Zhang M, Kleber S, Röhrich M, et al. Blockade of TGF- β signaling by the TGF β R-I kinase inhibitor LY2109761 enhances radiation response and prolongs survival in glioblastoma. **Cancer Res** 2011; 71:7155-167.

Zhang Z, Quick MK, Kanelakis KC, Gijzen M, Krishna P. Characterization of a plant homolog of hop, a cochaperone of hsp90. **Plant Physiol** 2003; 131:525-35.

Zhou Y, Zhou Y, Shingu T, et al. Metabolic alterations in highly tumorigenic glioblastoma cells: preference for hypoxia and high dependency on glycolysis. **J Biol Chem** 2011; 286:32843-853.

Zuehlke A, Johnson JL. Hsp90 and co-chaperones twist the functions of diverse client proteins. **Biopolymers** 2010; 93:211-17.