

**O PAPEL EXTRACELULAR DA PROTEÍNA STI1 NA
BIOLOGIA DE GLIOBLASTOMAS: ÊNFASE NOS
MECANISMOS DE SECREÇÃO DO MODELO GL261**

PAULA DO AMARAL COSTA RIBEIRO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Tiago Góss dos Santos

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Ribeiro, Paula do Amaral Costa

O papel extracelular da proteína STI1 na biologia de glioblastomas: ênfase nos mecanismos de secreção do modelo GL261 / Paula do Amaral Costa Ribeiro - São Paulo, 2019.

65p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Tiago Góss dos Santos

Descritores: 1. Glioblastoma/Glioblastoma. 2. Vesículas Extracelulares/ Extracellular Vesicles. 3. Muridae/Muridae.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, irmã e avó.
Eles que me acompanharam por toda vida participando
da minha formação pessoal e profissional,
o que me possibilitou minha chegada até aqui e completar
essa realização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Carlos Alberto da Costa Ribeiro e Debora do Amaral Costa Ribeiro pela minha criação e por todas as oportunidades que me deram permitindo que eu iniciasse e concluísse meu mestrado.

Agradeço a minha irmã Fernanda do Amaral Costa Ribeiro, não só por ajudar na minha formação pessoal como ajudar a me manter com estabilidade emocional para concluir minhas conquistas.

Agradeço ao meu Orientador Tiago Góss dos Santos pela oportunidade e por todos os ensinamentos não só profissionais como de postura de um pesquisador.

Agradeço Fundação Antônio Prudente pela oportunidade e infraestrutura oferecida.

Agradeço ao Rodrigo Cartaxo pelos ensinamentos de conteúdos e práticas no laboratório.

Agradeço ao João Pedro Lopes pela participação em diversas partes do projeto e pela ajuda na execução de experimentos.

Agradeço a Dayane Schmidt que me ajudou a concluir os experimentos para tornar possível a conclusão desse trabalho.

Agradeço à todos os meus amigos que me deram suporte emocional durante esse período, sempre me ajudando a me manter otimista e encontrar forças para continuar nos momentos mais difíceis.

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através de auxílio à Pesquisa - (processo número 2015/02098-3)

RESUMO

Ribeiro PAC. **O papel extracelular da proteína STI1 na biologia de glioblastomas: ênfase nos mecanismos de secreção do modelo GL261.** São Paulo; 2019. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Glioblastoma é tumor primário mais frequente do sistema nervoso central e está associado a uma alta mortalidade. A formação de novos vasos (angiogênese) é um processo essencial para a manutenção desses tumores, o que torna importante a busca por terapias que interfiram neste processo, visando um melhor resultado no tratamento. A proteína *stress inducible phosphoprotein one* (STI1) é uma co-chaperona que auxilia o dobramento de proteínas e também pode ser secretada em vesículas extracelulares (VE) e formar um complexo com a proteína príon celular (PrP^C) na membrana plasmática, desencadeando diversas funções celulares, como proliferação, diferenciação e migração. O complexo STI1-PrP^C também já foi associado à regulação da angiogênese em modelos de isquemia experimental, mas nada se conhece sobre o papel deste complexo na angiogênese tumoral. Um importante regulador da angiogênese é a hipóxia, que ocorre quando há diminuição dos níveis de oxigênio no tecido. Considerando a função das VEs em células tumorais e seu papel na secreção de STI1, sugere-se que a expressão e secreção de STI1 possa ser modulada pela hipóxia e contribuir na estimulação da angiogênese tumoral. Portanto esse projeto tem como objetivo investigar os mecanismos e a relevância da secreção de STI1 utilizando o modelo de glioblastoma murino GL-261. Animais transgênicos que expressam diferentes quantidades de STI1 foram inoculados com GL261 e aqueles que superexpressam a proteína (denominados TGA) apresentaram maior sobrevida e microvasculatura tumoral comprometida, com menor número de vasos totais e de menor calibre (> 20 µm). A inoculação intratumoral do peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅ não alterou o crescimento tumoral de GL261 em animais tipo-selvagem e haploinsuficientes para STI1.

Não houve alteração na quantidade de VE e de STI1 secretadas por células GL261 submetidas à hipóxia. Meio condicionado e vesículas extracelulares de GL261 foram capazes de estimular a migração e formação de tubos de células endoteliais, porém ainda não foi possível determinar se a STI1 extracelular apresenta contribuição nesse fenótipo. Observamos uma tendência de pacientes com glioblastoma produzirem menor número de VE do que pacientes com astrocitomas de grau II e III, porém a diferença não foi significativa.

Descritores: Glioblastoma. Vesículas Extracelulares. Muridae

SUMMARY

Ribeiro PAC. **[STI1 protein extracellular role on glioblastoma biology: emphasis on secretion mechanisms on GL-261 model]**. São Paulo; 2019. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Glioblastoma is the most frequent type of central nervous system primary tumors and are associated with a high mortality. The formation of new vessels (angiogenesis) is an essential process for the maintenance of these tumors, which makes important the search for therapies that interfere in this process, aiming at a better result in the treatment. The stress inducible phosphoprotein one (STI1) is a co-chaperone that assists the folding of proteins and can also be secreted in extracellular vesicles (EV) and form a complex with the cellular prion protein (PrPC) in the plasma membrane, triggering several cellular functions such as proliferation, differentiation and migration. The STI1-PrPC complex has also been associated with the angiogenesis regulation in experimental ischemia models, but nothing is known about the role of this complex in tumor angiogenesis. An important angiogenesis regulator is the hypoxia, which occurs when tissue oxygen levels decrease. Considering the EVs role in tumor cells and their role in STI1 secretion, it is suggested that STI1 expression and secretion can be modulated by hypoxia and contribute to the stimulation of tumor angiogenesis. Therefore, this project aims to investigate the mechanisms and relevance of STI1 secretion using the GL-261 murine glioblastoma model. Transgenic animals expressing different amounts of STI1 were inoculated with GL261 and those that overexpress the protein (called TGA) presented higher survival and tumoral microvasculature with a lower number of total vessels and vessels with smaller caliber ($> 20 \mu\text{m}$). The STI1₂₃₀₋₂₄₅ peptide intratumoral inoculation did not alter GL261 tumor growth in wild-type and haploinsufficient STI1 animals. There was no change in the amount of extracellular vesicles and STI1 secreted into GL261 cells submitted to

hypoxia. Conditioned medium and extracellular vesicles of GL261 were able to stimulate the migration and formation of endothelial cell tubes, but it was not possible to determine yet if extracellular STI1 has a contribution to this phenotype. We observed a tendency for patients with glioblastoma to express less extracellular vesicles than patients with grade II and III astrocytomas, but the difference was not significant.

Key-words: Glioblastoma, Extracellular vesicles, Muridae.

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1	Mini-bomba osmótica Alzet.....	22
Figura 2	Tumores GL261 em animais transgênicos com diferentes níveis de expressão de STI1	31
Figura 3	Imunofluorescência do tumor retirado dos animais haploinsuficiente (Haplo), supressor de STI1 (TGA), e tipo-selvagem (WT).....	33
Figura 4	Curva de sobrevivência de animais tratados com peptídeo STI1 ₂₃₀₋₂₄₅ ou STI1 _{scrambled}	37
Figura 5	Imunofluorescência com marcação de CD31 do tumor retirado dos animais haploinsuficiente (Haplo), e tipo-selvagem (WT) tratados com peptídeo STI1 ₂₃₀₋₂₄₅ ou peptídeo scrambled	39
Figura 6	Imunofluorescência com marcação de SMA do tumor retirado dos animais haploinsuficiente (Haplo), e tipo-selvagem (WT) tratados com peptídeo STI1 ₂₃₀₋₂₄₅ ou peptídeo scrambled	41
Figura 7	Imagens representativas das zonas de hipóxia no tecido tumoral animais Haplo e WT tratados com o peptídeo STI1 ₂₃₀₋₂₄₅ ou peptídeo scrambled.....	43
Figura 8	Western Blotting para detecção de STI1 em exossomos nas condições de hipóxia (Hip) e normóxia (Nor) nos experimentos 1 2 e 3	47
Figura 9	Western blotting com marcação para a proteína STI1	49

Figura 10	Migração de células HUVEC	50
Figura 11	Imagens representativas do ensaio de formação de tubos adquiridas no microscópio de fluorescência dos controles com EBM-2 + 1% SFB, DMEM low + 1% SFB e DMEM low e suas análises feitas com o plugin angiogenesis analyzer.....	52
Figura 12	Gráficos das médias das análises dos ensaios de formação de tubos	53
Figura 13	Quantificação de VEs no plasma sanguíneo de pacientes com gliomas de diferentes graus.....	55
Tabela 1	Relação do número de VEs por célula nas condições de normóxia e hipóxia nos três experimentos realizados.....	46

LISTA DE SIGLAS E ABERVIAÇÕES

Ang1	Angiopoetina 1
Ang2	Angiopoetina 2
BSA	Bovine Serum Albumin
CD31	Cluster de Diferenciação 31
DMEM Low	Dulbecco's Modified Eagle Medium Low
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
EBM-2	Endothelial Cell Growth Medium
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases
GL261	Glioma 261
Haplo	Camundongo haploinsuficiente para STI1
HIF	Hypoxia Inducible Factor
Hip	Hipóxia
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
miRNA	micro RNA
mRNA	RNA mensageiro
Nor	Normóxia
NT	Non-Target
NTA	Nanosight tracking analysis
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PrP^C	Cellular Prion Protein
SFB	Soro Fetal Bovino
ShSTI1	Short Harpin STI1
SMA	alpha Smooth Muscle Actin
STI1	stress inducible phosphoproteinone
TGA	Camundongo superexpressor de STI1
VE	Vesícula Extracelular
VEG	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
VEGFR	Receptor de Fator de Crescimento Vascular Endotelial
VWF	Von Willebrand Factor
WT	Camundongo tipo-selvagem

INDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Glioblastomas.....	1
1.2	Angiogênese.....	3
1.3	Angiogênese em glioblastomas.....	5
1.4	Modelo de glioblastoma murino - GL261	7
1.5	O papel da proteína prion celular e seu ligante STI1 na angiogênese - exossomos como mecanismo de secreção e sinalização	8
1.6	As vesículas extracelulares como moduladores da biologia tumoral...	9
1.7	Expressão e secreção de STI1 como fator prognóstico em tumores	11
1.8	A hipóxia na secreção de vesículas extracelulares	12
2	JUSTIFICATIVA	14
3	OBJETIVO	15
3.1	Objetivo Geral	15
3.2	Objetivos Específicos	15
4	MATERIAIS E MÉTODOS	17
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	300
6	CONCLUSÕES	566
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	577

1 INTRODUÇÃO

1.1 GLIOBLASTOMAS

Gliomas são o tipo mais comum de tumores do sistema nervoso central, derivados de células da glia (OSTROM et al. 2016), a Organização Mundial de Saúde-OMS classificou os gliomas em grau I ao grau IV de acordo com a malignidade. Os gliomas de grau I, como astrocitoma pilocítico, são benignos e com proliferação lenta. Os gliomas de grau II ou difusos, que incluem astrocitomas e oligodendrogliomas, também possuem crescimento lento, mas, diferente dos gliomas de grau I, possuem alta taxa de diferenciação celular, crescem de forma difusa no parênquima cerebral e tem propensão de se tornarem malignos. Já gliomas de grau III ou anaplásicos, são caracterizados por uma alta densidade celular, crescimento rápido, atipia nuclear e alta atividade mitótica. Os gliomas mais agressivos são os de grau IV, também denominados de glioblastomas (GBM), além das características apresentadas pelos gliomas de grau III eles apresentam proliferação microvascular e necrose em pseudopaliçada (LOUIS et al. 2007). Atualmente os Glioblastomas são classificados em glioblastomas IDH selvagem (sem mutação no gene de IDH), que inclui glioblastomas de células gigantes, gliossarcomas e glioblastomas epitelioides; glioblastomas mutates para IDH; e glioblastomas NOS, que não podem ter a avaliação de IDH completa(LOUIS et al. 2016).

Os glioblastomas representam 55,4% dos gliomas e pacientes diagnosticados com glioblastoma tem prognóstico ruim, apenas 5,5% vivem mais de cinco anos (OSTROM et al. 2016) e a média de sobrevida é de 12,4 meses (LOUIS et al. 2007). O glioblastoma é mais frequente em adultos e tem prevalência em homens e caucasianos, dentre esses a prevalência é em indivíduos não hispânicos (TAMIMI e JUWEID 2017). O tratamento desses tumores é feito com a ressecção cirúrgica somada a radioterapia e quimioterapia (STUPP et al. 2005). No tratamento cirúrgico é realizada a ressecção máxima possível, podendo variar por conta das características do tumor como tamanho, forma e localização de veias, artérias e acometimento de regiões eloquentes do cérebro (STUPP et al. 2005). Pacientes com mais de 90% do tumor removido tem sobrevida maior do que aqueles que tiveram menos de 90% (CARLSSON et al. 2014). O tratamento pós-cirúrgico consiste de radioterapia em conjunto com a quimioterapia adjuvante com temozolomida (STUPP et al. 2005). Os glioblastomas são caracterizados por um elevado processo angiogênico (FURNARI et al. 2007) sendo características morfológicas importantes a presença de necrose em pseudopaliçada e microvascularização (BRAT et al. 2004). A necrose em pseudopaliçada é uma região em necrose envolta por uma zona com alta densidade celular formada pela migração de células para fora do foco de hipóxia formado na região de necrose. Essa formação também está associada a microvascularização, essa por sua vez ocorre devido a expressão do fator de crescimento endotelial pelas células da pseudopaliçada (BRAT et al. 2004).

1.2 ANGIOGÊNESE

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes e está relacionado a diversos processos fisiológicos, desde a reorganização vascular que ocorre durante o desenvolvimento embrionário até processos que necessitam de formação de novos vasos, como regeneração de tecidos, ciclo menstrual e gestação (CHUNG et al. 2010). O processo de angiogênese é controlado por um balanço entre sinais anti-e pró-angiogênicos, provenientes de células adjacentes às células endoteliais, células murais e da presença de determinadas proteínas na matriz extracelular (NAKATSU e HUGHES 2008). O fator de crescimento endotelial (VEGF) e Angiopoetina 1 e 2 (Ang1 e Ang2) são exemplos de sinalizadores de angiogênese. O VEGF é uma molécula de sinalização que atua tanto em estágios iniciais da vasculogênese (formação de vasos na fase embrionária) quanto na angiogênese, é essencial no processo de diferenciação, proliferação e migração, nesse atua como agente quimiotático, de células endoteliais. A Ang1 atua, na presença de VEGF, na remodelação vascular e estabilização dos vasos, já a Ang 2, antagonista natural de Ang1, desestabiliza os vasos e resulta na regressão desses, possibilitando a remodelação vascular (GALE e YANCOPOULOS 1999; ROSSANT e HOWARD 2002). Esse equilíbrio pode ser alterado no caso de carência de suprimento sanguíneo no tecido ou, em condições patológicas, como doenças inflamatórias e crescimento de tumores sólidos, nestes casos, o balanço é alterado levando a uma

angiogênese descontrolada e prolongada (NAKATSU e HUGHES 2008). A angiogênese ocorre em diversas etapas, inicialmente as células endoteliais são estimuladas por fatores pró-angiogênicos (VEGF, bFGF, entre outras) (NAKATSU e HUGHES 2008), a expressão desses fatores pró-angiogênicos pode ser regulada pela condição de hipóxia, tanto em situações normais quanto patológicas. A hipóxia leva a estabilização do fator de transcrição HIF (*hypoxia inducible factor*), que em condições normais de pressão de oxigênio (normóxia) é constitutivamente degradado por mecanismos de ubiquitinação (ROSSANT e HOWARD 2002). Em condições de hipóxia, a degradação deixa de ocorrer, permitindo que HIF seja translocado para o núcleo onde atua como fator de transcrição e modula a expressão de genes relacionados à angiogênese (ROSSANT e HOWARD 2002).

A formação de novos vasos sanguíneos necessita uma reorganização de matriz extracelular para que as células endoteliais possam migrar em direção às zonas de hipóxia. Isso ocorre através da secreção de proteases (G e RS 2013; NAKATSU e HUGHES 2008). A migração das células endoteliais ocorre em função de um gradiente de fatores angiogênicos, durante a formação dos novos vasos ocorre proliferação, alinhamento e organização em tubos capilares que podem continuar se ramificando e formar anastomoses com vasos adjacentes (NAKATSU e HUGHES 2008). Pericitos, células musculares lisas e fibroblastos, são recrutadas para envolverem vasos recém formados para assim estabiliza-los (G e RS 2013; NAKATSU e HUGHES 2008). Nesse processo, ocorre uma mudança no perfil de expressão gênica que promove uma transição endotélio-

mesênquima, que permite que os eventos de remodelagem da matriz extracelular e invasão das células endoteliais no parênquima ocorram (NAKATSU e HUGHES 2008; G e RS 2013).

1.3 ANGIOGÊNESE EM GLIOBLASTOMAS

No início do crescimento tumoral, as células do glioblastoma utilizam o suprimento sanguíneo de vasos já existentes no cérebro para proliferar e também como suporte para migrar, locomovendo-se pela extensão do vaso (JAIN et al. 2007; DONNEM et al. 2013). Como consequência, ocorre compressão e desestabilização dos vasos sanguíneos que regredem até perder a capacidade de perfusão (JAIN et al. 2007). Com isso algumas células tumorais soltam-se da massa tumoral e invadem o parênquima cerebral, se distanciando das áreas de hipóxia, deixando as zonas caracterizadas pela presença de células mortas por necrose. Essas condições associadas ao perfil mutagênico levam a um desbalanço entre fatores pró- e anti-angiogênicos que, frequentemente, favorece as condições pró-angiogênicas e o consequente recrutamento de novos vasos para a região afetada (JAIN et al. 2007). Os novos vasos formados são anormais e com grande calibre, tortuosos e com permeabilidade heterogênea devido à má formação das paredes endoteliais e pela cobertura insuficiente de pericitos e membrana basal (JAIN et al. 2007). Isso contribui para um fluxo sanguíneo irregular que acarreta em uma distribuição irregular de oxigênio e nutrientes. Esse tipo de desorganização vascular também propicia um

prejuízo na perfusão de fármacos, no caso de tratamento antineoplásicos (JAIN et al. 2007).

Terapias anti-angiogênicas vem sido utilizadas para melhorar a sobrevida dos pacientes. A hipótese clássica de terapias anti-angiogênicas é a de inanição do tumor, ou seja, utilizar substancias anti-angiogênicas para inibir a formação do novos vasos e assim cessar a chegada de oxigênio e nutrientes no tumor impedindo assim seu crescimento (FOLKMAN 1972). No entanto essa estratégia se mostrou ineficiente, pois em decorrência da heterogeneidade tumoral, retirar o oxigênio e nutrientes do tumor leva à seleção de clones que superexpressam a proteína HIF1 α , e não só são resistentes a hipóxia como possuem maior invasibilidade e potencial metastático (SEMENZA 2000; GILLIES e GATENBY 2007). Outra estratégia anti-angiogênica é a normalização vascular, nessa as substâncias anti-angiogênicas atuam nos vasos mal formados reduzindo seu diâmetro, aumentando a quantidade de capilares e homogeneizando a permeabilidade desses vasos (FUKUMURA e JAIN 2007; HARDEE e ZAGZAG 2012; BATCHELOR et al. 2013; JAIN 2014). Por regularizar o fluxo sanguíneo e a distribuição de nutrientes e oxigênio no tumor há uma redução das características de agressividade tumoral geradas pela hipóxia (FUKUMURA e JAIN 2007; BATCHELOR et al. 2013), além disso, os medicamentos são melhor difundidos pelo tumor aumentando a eficácia no tratamento de glioblastomas (BATCHELOR et al. 2007, 2010, 2013; WINKLER et al. 2004; FUKUMURA e JAIN 2007; VAN DER POL et al. 2012) e tumores colorretais (WILLETT et al. 2004, 2007). Já foi demonstrado que a terapia anti-

angiogênica com inibidores do receptor de VEGF aumentam a sobrevida de pacientes com glioblastoma (BATCHELOR et al. 2007, 2010, 2013; FUKUMURA e JAIN 2007; WINKLER et al. 2004; VAN DER POL et al. 2012). Atualmente utiliza-se na terapia anti-angiogênica o bevacizumabe, um anticorpo monoclonal humanizado que se liga no VEGF circulante impedindo sua ligação com seus receptores (FERRARA et al. 2004).

1.4 MODELO DE GLIOBLASTOMA MURINO - GL261

Modelos de glioblastoma murino possibilitam o estudo da relação do tumor com o sistema nervoso central e sistema imune, uma vez que podem ser estudados em animais imunocompetentes, enquanto que os modelos mais utilizados envolvem o uso de células tumorais humanas implantadas em animais imunodeficientes (JACOBS et al. 2011). A linhagem de glioblastoma murino GL261 apresenta grande semelhança com o glioblastoma humano, a começar pelo processo de formação tumoral que segue as mesmas quatro etapas de organização perivascular, proliferação na proximidade de vasos, hipóxia por degeneração vascular e vascularização de regiões necróticas (OH et al. 2014). Além disso, possui diversas características semelhantes ao glioblastoma humano, como infiltração difusa, invasividade, espessamento endotelial, presença de necrose em pseudopaliçada (JACOBS et al. 2011) e angiogênese (OH et al. 2014). Também há uma semelhança significativa na presença de mutações gênicas e marcadores tumorais (JACOBS et al. 2011; OH et al. 2014), como

mutações pontuais no gene *KRAS* e *TP53* (JACOBS et al. 2011; OH et al. 2014) e aumento na ativação da via PI3K e na fosforilação de Akt (JACOBS et al. 2011).

1.5 O PAPEL DA PROTEÍNA PRÍON CELULAR E SEU LIGANTE STI1 NA ANGIOGÊNESE – VESÍCULAS EXTRACELULARES COMO MECANISMO DE SECREÇÃO E SINALIZAÇÃO

A proteína príon celular (PrP^C) é expressa em diversos tecidos, mas principalmente no sistema nervoso e é conhecida pelo seu papel nas encefalopatias espongiformes transmissíveis. PrP^C encontra-se ancorada na membrana celular e ativa cascatas de sinalização pela interação com moléculas extracelulares e receptores de membrana (MARTINS et al. 2010). PrP^C tem função importante no sistema imune e nervoso regulando processos como proliferação, diferenciação e morte celular. Diversos estudos mostram uma relação da proteína PrP^C com vários tipos de câncer, regulando processos como proliferação, apoptose, migração, metástase e resistência a tratamentos (SANTOS et al. 2015). PrP^C possui diversos ligantes e desencadeia cascatas de sinalização distintas. A laminina, a vitronectina, NCAM e STI1 são exemplos de ligantes da proteína PrP^C que, em conjunto, regulam a diferenciação de neurônios motores (HAJJ et al. 2007), hipocampus (ZANATA et al. 2002; LOPES et al. 2005) e astrócitos (LIMA et al. 2007; ARANTES et al. 2009); e crescimento neurítico em gânglios da raiz dorsal (SANTOS et al. 2013) e neurônios hipocampus

(BERALDO et al. 2011), funções sinápticas e proteção contra morte neuronal e formação de neuritos (MARTINS et al. 2010).

A proteína STI1, também conhecida como Hop (*Hsp70/Hsp90 organizing protein*), é uma co-chaperona citoplasmática que, quando associada às proteínas de choque térmico Hsp70 e Hsp90 auxilia no dobramento de proteínas clientes (LEE et al. 2012). A STI1 esta localizada principalmente no citoplasma, mas também pode ser translocada para o núcleo (DANIEL et al. 2008). Nosso grupo demonstrou que STI1 também pode ser secretada de maneira não-convencional por meio da associação a vesícula extracelulares (HAJJ et al. 2013). Uma vez presente no espaço extracelular, a STI1 se liga a PrP^C, na superfície celular e desencadeia as vias de sinalização associadas (HAJJ et al. 2013).

1.6 AS VESÍCULAS EXTRACELULARES COMO MODULADORES DA BIOLOGIA TUMORAL

As vesículas extracelulares (VEs) são classificadas como microvesículas, exossomos, micropartículas, corpos apoptóticas, entre outros, 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 (SIMONS e RAPOSO 2009; VAN DER POL et al. 2012). Devido a sua origem endosomal 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 (VAN NIEL 2006). A formação de exossomos é uma das vias utilizadas para eliminação de proteínas, no entanto, hoje considera-se como principal função dos exossomos a comunicação intracelular (SCHOREY e BHATNAGAR 2008; SIMONS e RAPOSO 2009). Os exossomos, por se ligarem em células receptoras, tem uma função importante no sistema imune atuando como apresentador de antígenos as células T (VAN NIEL 2006; SCHOREY e BHATNAGAR 2008; SIMONS e RAPOSO 2009), Além disso, podem carregar, além de proteínas e lipídios, RNA mensageiro e miRNA, dessa forma alterando a expressão gênica da célula receptora (VAN NIEL 2006; SCHOREY e BHATNAGAR 2008; SIMONS e RAPOSO 2009; VAN DER POL et al. 2012). Interessantemente, exossomos podem ser detectados em diversos fluidos corporais, entre eles no plasma sanguíneo de pacientes e podem fornecer informações diagnósticas e auxiliar em decisões terapêuticas em pacientes com câncer (YANG e ROBBINS 2011).

Em tumores, exossomos tem função em diferentes etapas da tumorigenese, como escape do sistema imune, apoptose, angiogênese e aumento do potencial metastático (BELTING e CHRISTIANSON 2015). Não só a concentração de exossomos é alterada no câncer como seu conteúdo também, foi observado que pacientes portadores de melanoma de alto grau apresentam um aumento na quantidade proteica em exossomos circulantes, sugerindo que marcadores expressos nas vesículas podem ser importantes para o diagnóstico e marcadores de progressão tumoral (TAYLOR e GERCEL-TAYLOR 2011). Em glioblastoma, foi demonstrado que as células

tumorais secretam exossomos contendo mRNAs, miRNAs e proteínas angiogênicas que, quando captados por células endoteliais normais, estimulam a formação de vasos capilares e também podem apresentar efeito autócrino promovendo a proliferação celular (YANG e ROBBINS 2011).

1.7 EXPRESSÃO E SECREÇÃO DE STI1 COMO FATOR PROGNÓSTICO EM TUMORES

Foi demonstrado um aumento na expressão de STI1 em tumores, em sua maioria o aumento da expressão está associado à maior agressividade, menor sobrevida e resistência a tratamentos. Dependendo do tipo de tumor, a STI1 pode modular a migração e invasão ou promover a proliferação celular (DE LACERDA et al. 2016; LOPES et al. 2014). Já foi demonstrado que a STI1 e PrP^C funcionam como importantes reguladores da angiogênese por serem capazes de estimular a polarização e migração de células endoteliais em modelos de isquemia experimental (LI et al. 2012). Estes dados sugerem que ambas moléculas podem apresentar um papel na angiogênese tumoral. Tanto PrP^C quanto a STI1 estão superexpressas em glioblastoma e associados com alta proliferação e baixa sobrevivência (LOPES et al. 2014). O complexo formado pela PrP^C e STI1 está envolvido, entre outros processos, na neuroproteção, neurogênese e proliferação de astrócitos (SANTOS et al. 2011). Nosso grupo mostrou que a utilização do peptídeo sintético HOP₂₃₀₋₂₄₅, que se liga especificamente no domínio de

ligação de STI1 a PrP^C, compete com STI1 e bloqueia a proliferação celular e crescimento tumoral induzido pela associação PrP-STI1 em linhagens de glioblastoma, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (LOPES et al. 2014).

1.8 A HIPÓXIA NA SECREÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

Como dito anteriormente, o glioblastoma apresenta áreas com pouco fluxo sanguíneo que levam a hipóxia (JAIN et al. 2007). A hipóxia promove respostas que envolvem a regulação de um grande número de citocinas, fatores de crescimento e proteases que resultam na angiogênese e remodelamento da matriz extracelular (KUCCHARZEWSKA et al. 2013). Portanto, a hipóxia tem um papel importante na progressão tumoral e a presença de marcadores relacionados com a hipóxia está associada a menor sobrevida de pacientes (KUCCHARZEWSKA et al. 2013). Uma das principais moléculas envolvidas com a resposta à hipóxia é a proteína HIF (ROSSANT e HOWARD 2002; KUCCHARZEWSKA et al. 2013). HIF é um dímero constituído por HIF1 α e HIF β , em condições normais HIF1 α , que está localizado no citoplasma, é rapidamente degradado por moléculas sensíveis a oxigênio, na condição de hipóxia HIF1 α não é degradado e é translocado para o núcleo se ligando a HIF β formando um heterodímero que regula a expressão gênica (ROSSANT e HOWARD 2002; KUCCHARZEWSKA et al. 2013; BELTING e CHRISTIANSON 2015). A hipóxia aumenta a quantidade de VEs secretadas pelas células tumorais (KUCCHARZEWSKA et al. 2013;

BELTING e CHRISTIANSON 2015), esses exossomos atuam na tumorigenese a favor da angiogênese (KUCCHARZEWSKA et al. 2013; BELTING e CHRISTIANSON 2015) e tem sua composição de proteínas e mRNA alterada (KUCCHARZEWSKA et al. 2013). Vesículas isoladas de células de glioblastoma em hipóxia promovem angiogênese mais acentuada e maior desenvolvimento tumoral *in vitro* e *in vivo* do que vesículas de células em normóxia (BELTING e CHRISTIANSON 2015). Foi demonstrado que, durante a isquemia, HIF1 α modula o aumento da expressão de STI1 e esta, por sua vez, é capaz de modular a angiogênese e contribui na recuperação tecidual no modelo de isquemia cerebral (LEE et al. 2013). Portanto, sugere-se que a expressão e secreção de STI1 possa ser modulada pela hipóxia e contribua na estimulação da angiogênese tumoral.

2 JUSTIFICATIVA

Os efeitos de STI1 sobre a angiogênese tumoral indicam que sua atividade pode ser dependente de uma ação extracelular, atuando como uma molécula estimulatória do processo de formação de novos vasos. Até o momento, os mecanismos que regulam a secreção de STI1 em células tumorais foram pouco explorados. Entretanto, achados independentes sugerem que a hipóxia é capaz de estimular a secreção de STI1, bem como estimular a liberação de vesículas extracelulares. Portanto, o estudo da relação entre ocorrência de hipóxia e indução de secreção de STI1 por vesículas extracelulares em glioblastomas é essencial para entender seu papel na angiogênese e na progressão tumoral.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Esse trabalho tem como objetivo investigar o papel da STI1 no crescimento tumoral e angiogênese no modelo de glioblastoma murino GL261, com ênfase no estudo dos mecanismos de secreção da proteína e de sua interação com o receptor PrP^C. A relevância da hipóxia sobre a secreção de STI1 também será investigada através de ensaio *in vitro* e *in vivo*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Avaliar angiogênese em tumores de Células GL261 implantadas em animais tipo-selvagem (STI1^{+/+}), haploinsuficientes (STI1^{+/-}), que superexpressam STI1 (TGA)
- b. Avaliar angiogênese e presença de hipóxia em tumores de células GL261 com o tratamento intratumoral de peptídeos inibitórios sintéticos que inibem a interação entre a proteína STI1 e seu receptor PrP^C.
- c. Investigar os mecanismos de secreção de STI1 na linhagem GL261 em condições de normóxia e hipóxia e sua associação com vesículas extracelulares.

- d. Determinar a relevância da secreção de STI1 na angiogênese *in vitro* em ensaios de formação de tubos e migração de células endoteliais.
- e. Verificar a correlação entre o número de vesículas extracelulares circulantes no plasma de pacientes com astrocitomas e o grau histológico dos tumores.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

- ***Animais***

Foram utilizados animais C57BL/6J e linhagens transgênicas derivadas com idade entre 2 e 5 meses. Os animais C57BL/6J foram considerados tipo-selvagem, as linhagens transgênicas são: Haploinsuficientes (STI1^{-/+}) e animais que superexpressam a proteína STI1 (TGA). A geração de animais haploinsuficientes realizada através do acasalamento entre camundongos haploinsuficientes (STI1^{-/+}) com camundongos tipo-selvagem. Os animais TGA foram gerados a partir do cruzamento de machos tipo-selvagem e fêmeas TGA. Os filhotes foram genotipados para a identificação dos indivíduos conforme o protocolo estabelecido por Beraldo et al (BERALDO et al. 2013). Os animais foram mantidos em biotério SPF (*Specific Pathogen Free*), ou seja, livre de patógenos específicos para os quais os animais foram periodicamente testados. Os animais foram mantidos em microisoladores com temperatura de 22 a 25°C e sob ciclo de luz de 12 horas, tratados com água autoclavada e ração irradiada *ad libitum*. O projeto encontra-se aprovado no Comitê de Ética de Uso de Animais da Fundação Antônio Prudente (processo n° 074/16).

- **Células**

Foram utilizadas células GL261, linhagem de glioblastoma murino, adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células GL261 deficientes de STI1 (shSTI1) e GL261 Non Targeted (NT, controle) foram geradas por transdução lentiviral (CARTAXO 2019), bem como as GL261 que expressam a enzima luciferase (GL261-luc), utilizadas para os ensaios de monitoramento de crescimento tumoral *in vivo* por bioluminescência. As células HUVECs foram cedidas pelo Professor Francisco Laurindo, da Faculdade de Medicina da USP. Todas as células foram cultivadas em *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM low, *Thermo Fische rScientific* n° de catalogo 12800-017) suplementado com 10% de SFB e mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C.

- ***Preparo de células gl261-luc para inoculação ortotópica cerebral***

As células foram lavadas 2x com PBS (Phosphate-buffered saline, NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 1,8mM e H₂O MiliQ), ressuspendidas com tripsina 0,2% (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil) e quantificadas em câmara de Neubauer. O volume correspondente à 5×10^4 células foi transferido para eppendorfs e foi adicionado 500µL de PBS 1X estéril e os eppendorfs centrifugados a 2000 rpm por 2 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi cuidadosamente retirado com o auxílio de uma pipeta e o pellet ressuspendido em 500µL de PBS1X para lavagem. Os tubos foram novamente centrifugados a 2000rpm por 2 minutos e o sobrenadante cuidadosamente retirado com auxílio de uma pipeta. Em

seguida os peletts foram ressuspensos em 5µL de PBS 1X e mantidos em gelo até o seu uso.

Ensaio de crescimento tumoral e imageamento in vivo:

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de ketamina (Ketamin-S cristália)/xilazina (Rompun, Bayer) (4,25ml água miliQ + 0,5ml cloridrato de ketamina + 0,25ml cloridrato de xilazina) 10µl/g. Após a indução do plano anestésico, os animais foram submetidos a tricotomia da região cefálica e a assepsia feita com iodo. O procedimento cirúrgico consiste na exposição da caixa craniana através de um pequeno corte feito com um bisturi e um orifício feito no crânio com uma agulha 26G 1mm a frente e 1mm a direita da sutura cerebral bregma. As agulhas Hamilton (nº de catálogo 80075) foram preenchidas com as células GL261-Luc previamente preparadas, cuidadosamente para evitar a formação de bolhas e inseridas na profundidade de 5mm no orifício feito no crânio do animal. As células foram injetadas diretamente no cérebro (corpo estriado) com auxílio de uma bomba de infusão (Harvard apparatus PHD 22/200) na velocidade de 1µl/min. A sutura foi feita com grampos cirúrgicos, esses foram retirados 5 dias após a cirurgia. Após, o procedimento os animais foram transferidos para a manta térmica onde foram observados até a total recuperação dos movimentos. Os animais foram monitorados periodicamente e o crescimento foi determinado pela detecção da bioluminescência no equipamento IN VIVO FX PRO (Bruker Corporation), disponível no biotério do CIPE. Para a captura das imagens, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de uma

solução de luciferina (PerkinElmer, Massachusetts, USA, nº de catalogo 122799) (10 mg/kg. Os animais receberam uma anestesia inalatória de isofluorano utilizando o sistema EZ-6100 *Imaging anesthesia system* (EZ Anesthesia) adaptado ao equipamento de bioimagem. Os animais foram mantidos anestesiados com o auxílio de vaporizador de isofluorano com fluxo de oxigênio 1,5 litros/min e concentração de 2%. Os animais foram submetidos à eutanásia oito semanas após a inoculação ou quando os apresentaram sintomas clínicos e os cérebros retirados para fixação, processamento e análise do tumor.

Os sintomas clínicos da doença segundo WEISSERT et al. (1998) são: grau 1: fraqueza ou paralisia da cauda; grau 2: paraparesia ou hemiparesia das patas traseiras; grau 3: paralisia ou hemiparalisia das patas traseiras; grau 4: paralisia, estado moribundo e morte. Além da paralisia das patas traseiras também foi considerada a postura curvada dos animais uma vez que é um indicativo de dor e a perda de peso (VAN LOO et al. 1997). Para isso os animais foram pesados uma vez a cada dois dias (ou quando necessário) e eutanasiados no caso da perda de 20% da massa inicial do animal.

- ***Implantação de mini-bombas osmóticas***

Uma semana após a inoculação das células GL261 foram implantadas mini-bombas osmóticas Alzet 1004® para tratamento intratumoral com peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅ por 28 dias.

As mini-bombas foram preparadas conforme as instruções do fabricante. A montagem foi feita dois dias antes do implante da bomba nos animais, dentro do fluxo laminar e o manuseio das peças foi feito com pinças. O Cateter de plástico foi cortado no tamanho de 2,3cm com auxílio de um bisturi e encaixado 5mm no moderador de fluxo, na outra extremidade do cateter foi encaixado o infusor (Figura 1A). A bomba foi preenchida com a solução de tratamento desejada até o extravasamento (aproximadamente 100 µl) e reservada em um eppendorf. O sistema de infusão foi preenchido lentamente com PBS 1X estéril utilizando uma seringa de 1ml e a agulha fornecida no kit até que o sistema ficasse totalmente preenchido com PBS e sem bolhas e encaixado na bomba previamente preenchida (Figura 1A). As bombas montadas permaneceram imersas em salina 0,9% estéril com o infusor para fora em um tubo falcon por 48 horas na estufa a 37°C.

As soluções de tratamento foram feitas com o peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅ (ELGNAYKKKDFDKAL ID: 69881-3 Gen Script) ou com o peptídeo controle Scrambled Complementar (SP00097, Neosystem) na concentração 4,54µg/ml diluídos em água miliQ e filtrados com filtro 45µm (Corning, COR-431225) (ZANATA et al. 2002).

Para o implante da bomba os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de ketamina/xilazina 10µl/g e a assepsia da pele foi feita com iodo. Foi feita uma incisão na parte superior do crânio com um bisturi, em seguida foi localizado o local onde foi feita a inoculação e o furo no crânio refeito com agulha 26G. Com auxílio de uma espátula foi feito um bolso subcutâneo na região dorsal do animal e a bomba foi introduzida no

bolso subcutâneo e o infusor fixado com cola cirúrgica no crânio do animal (Figura 1B). A porção superior do infusor foi cortada (Figura 1A) e o cateter fixado com cola no infusor. Após a cola secar o excesso de cola foi retirado da pele do animal e a sutura feita com grampos cirúrgicos, esses foram retirados 5 dias após a cirurgia. Após o procedimento os animais foram transferidos para a manta térmica onde foram observados até a total recuperação dos movimentos. Os animais foram eutanasiados 8 semanas após a inoculação das células GL261 ou quando apresentaram sintomas clínicos. Uma hora antes da eutanásia foi aplicado o kit HypoxyprobeTM-1 na concentração de 60 mg/kg, e, após a eutanásia, os cérebros retirados para fixação, processamento e análise do tumor.

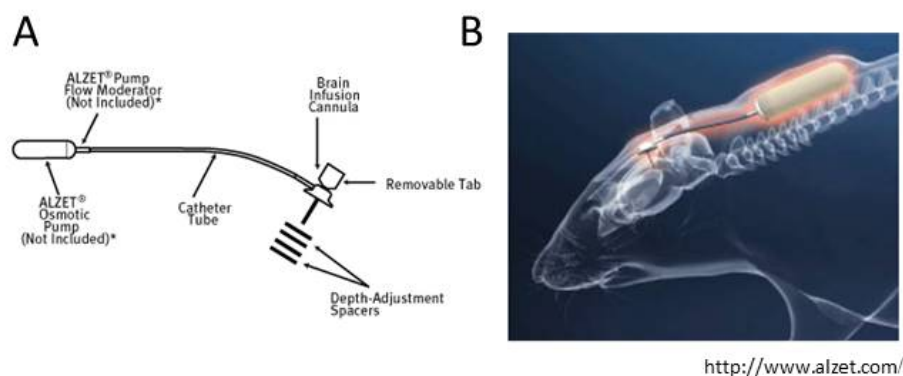


Figura 1 - Mini-bomba osmótica Alzet. **A** Esquema da mini-bomba osmótica **B** esquema da mini bomba osmótica implantada no animal. Imagens retiradas do site oficial da Alzet (<http://www.alzet.com/>)

- ***Preparo dos cérebros e montagem de laminas histológicas***

Os cérebros retirados dos animais foram lavados uma vez em PBS 1X e fixados em paraformaldeído 4% overnight. Em seguida, foram lavados 3

vezes com PBS 1X e crioprotégidos utilizando as diluições 15% e 30% de sacarose overnight. Uma vez crioprotégidos foram congelados em Tissue-Tek O.C.T. (SakuraFineTek nº de catálogo 4583) imerso em isopentano a -78°C (temperatura do gelo seco). Os cortes foram feitos no criostato com 10µm de espessura e as lâminas foram armazenadas a temperatura -20°C até sua utilização.

- ***Imunofluorescência***

Os cortes foram reidratados com PBS 1X + 0,3% de Triton X-100 (Sigma, Missouri, EUA) e bloqueados com Albumina do Soro Bovino (BSA) (Interlab, São Paulo, Brasil, nº catálogo 1870) 5% em PBS 1X + 0,3% de Triton X-100. Em seguida foram incubados com anticorpo primário anti-alpha smooth muscle actin (SMA) (Abcam, Cambridge, Reino Unido, nº de catálogo: ab5694) 1:200, anti-Von Willebrand Factor (VWF) (Abcam, Cambridge, Reino Unido, nº de catálogo: ab6994) 1:200 e anti-CD31 (CD31) (R&D systems, Minnesota, USA, nº de catálogo: AF3628) 1:200 ou rabbit antisera (hpi, Massachusetts, USA, HP3-200 kit, nº de catálogo: PAb2627P) 1:100 em BSA 1% PBS 1X + 0,3% de Triton X-100 por 20h. Após a incubação com anticorpo primário os cortes foram lavados 5 vezes com PBS 1X + 0,3% de Triton X-100 e incubados por 1 hora com anticorpo secundário anti-rabbit Alexa-488 (Invitrogen - Life Technologies, Califórnia, EUA, nº de catálogo: A11008) ou anti-goat Alexa-488 (Invitrogen - Life Technologies, Califórnia, EUA, nº de catálogo: A21467) com DRAQ5 (CellSignaling, Massachusetts, EUA, nº de catálogo: 4084s-50) na diluição 1: em BSA 1% PBS 1X + 0,3% de Triton X-100. Posteriormente os cortes foram lavados 5

vezes com PBS 1X + 0,3% de Triton X-100 e as lamínulas fixadas com FluorSave Reagente (Calbiochem, California, USA, 345789). Após 24 horas as lamíνας foram analisadas no microscópio confocal (Leica TCS SP5II, Wetzlar, Germany) com a lente objetiva de 20X, foram adquiridas 3 imagens representativas de cada corte e as imagens analisadas no ImageJ.

- ***Avaliação de angiogênese in situ***

A avaliação foi realizada através do software ImageJ onde as imagens foram submetidas a decomposição de cores para detecção da fluorescência específica para os marcadores angiogênicos. As estruturas vasculares foram identificadas e mensuradas, a quantificação automatizada foi realizada com o plugin Cell counter.

- ***Hipóxia***

As células GL261, GL261 shSTI1 ou GL261 NT foram cultivadas até atingirem aproximadamente 80% de confluência, então foram carenciadas por 24 horas antes de serem cultivadas por 24 horas em câmara de hipóxia (Billups-Rothenberg) de acordo com as instruções do fabricante, com 1% de oxigênio, 5% de gás carbônico e 94% de nitrogênio, para isso a câmara foi conectada ao cilindro de nitrogênio na pressão 19L/min e no cilindro de gás carbônico na pressão 10cc/min X100 por 5 minutos (IKEMORI et al. 2014). Após esse período o meio condicionado foi coletado e processado conforme o protocolo a seguir.

- ***Meio condicionando e isolamento de vesículas extracelulares***

As células foram cultivadas até atingirem aproximadamente 80% de confluência, então foram carenciadas por 24 horas e colocadas em hipóxia ou normóxia por mais 24 horas. Após esse período o meio foi coletado e as células contadas em câmara de Neubauer. O meio condicionado submetido a três centrifugações iniciais para retirar debris celulares, a primeira centrifugação foi realizada a 300g por 10 min, a segunda a 2.000g por 10 min e a terceira a 10.000g por 30 min, a temperatura de 4°C na Centrifuge 5804R (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante obtido foi centrifugado na ultracentrífuga (Beckman-Coulter, Califórnia, EUA) a 100.000g por duas horas a 4°C. Após esse período o sobrenadante foi vertido e o pellet ressuspensionado em DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) (Gibco, nº de catalogo 14190-144) e centrifugado a 100.000g por duas horas a 4°C. O pellet formado foi ressuspensionado em 20µL de DPBS e 1µL diluído (1:500) para análise com auxílio do LM10 *nanoparticle characterization system* (NanoSight Ltd., Amesbury, United Kingdom). Foram definidas as quantidades de vesículas por células e as vesículas armazenadas no freezer -80 até serem utilizadas para western blotting.

- ***Western blotting***

O volume correspondente a 10^9 vesículas purificadas foram preparadas para o western blotting adicionando-se a elas tampão redutor concentrado (4x: 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 5% SDS (Merck); 1 mM EDTA pH 8,5; 5% β-mercaptoetanol (Merck); 20% glicerol; traços de azul de bromofenol), seguido de aquecimento por 5 minutos a 95°C. Em seguida, as

amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE 10% e a corrida foi realizada em tampão de corrida (25 mM Tris; 191 mM Glicina (Sigma Aldrich); 0,1% SDS) com voltagem constante de 65 V nos 20 minutos iniciais 20 minutos e 120 V até finalizar. Após essa etapa, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham), etapa realizada a 100 V durante 1 hora em tampão de transferência (25 mM Tris; 191mM Glicina; 0,1% SDS; 20% Metanol). A seguir, a membrana foi bloqueada em solução de 5% leite preparado com leite em pó (non-fatmilk) diluído em 0,1% TBS-T (150 mMNaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,1% Tween® - Sigma Aldrich) durante uma hora. Depois disso, foi feita a incubação com o anticorpo primário anti-STI1 overnight e, em seguida, adicionado o anticorpo secundário acoplado a peroxidase (anti-rabbit 1:2500), por 1 hora. A membrana foi revelada com kit de quimioluminescência (Pierce™ ECL Western BlottingSubstrate ou Immobilon® Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore) no equipamento UVITEC (Imaging System: Alliance Mini 4 16.08a -Cambridge - UK)

- ***Ensaio de migração em placa transwell***

As Células HUVEC foram carenciadas 24horas antes da execução do ensaio. Para realização do ensaio as células foram soltas da garrafa de cultivo utilizando-se tripsina 0,2%diluída em PBS 1x 1:4 e contadas na câmara de newbauer. Foram plaqueadas 1×10^5 células em 100µl de DMEM low na placa transwell de 24 poços (Costar, n° de catalogo 3422). Na parte de baixo foi colocado 600µl do tratamento desejado. Os tratamentos foram:

DMEM low; DMEM low + 1% SFB, meio condicionado fresco de células GL261 NT em normóxia e em hipóxia, meio condicionado fresco de células GL261 ShSTI1 em normóxia e em hipóxia, DMEM low com 3×10^7 VEs previamente coletadas e armazenadas no freezer - 80°C de células GL261 NT em normóxia e em hipóxia e 3×10^7 VEs previamente coletadas e armazenadas no freezer -80°C de células GL261 ShSTI1 em normóxia e em hipóxia. Após 16h as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20min, lavadas 3 vezes com PBS 1X e coradas com DAPI (Biochemika, n° de catalogo: CAS 28718-90-3), 1:1000 em PBS 1X + 0,3% de Triton X-100 por 30 minutos. Em seguida foram lavadas 3 vezes com PBS 1X e levadas para análise. Foram retiradas as células da parte de cima do poço transwell e foi feita a análise no microscópio de fluorescência Nikon eclipse TE2000-U.b Foram adquiridas 5 imagens aleatórias de cada poço com a lente objetiva de 20X e as células foram contadas com o auxílio do plugin *Cell counter* do programa ImageJ.

- ***Ensaio de formação de tubos***

As células HUVEC foram cultivadas no meio Endothelial Cell Growth Medium (EBM-2) (Lonza, n° de catalogo 00190860) suplementado com 10% SFB por dois dias antes do ensaio. O Matrigel Matrix Basement Membrane Grow Factor Reduced (Corning, n° de catalogo 354230) foi retirado do freezer -20°C e deixado na geladeira a 4°C 24 horas antes do ensaio. Na hora do ensaio o Matrigel foi mantido em gelo e plaqueado em placa 96 wells (Costar, n° de catalogo 3599, também mantida sobre gelo, 50µL por poço, e centrifugada a 300g por 10min em centrifuga pré resfriada a 4°C

para remoção de bolhas. Em seguida a placa foi deixada 30min na estufa a 37°C para solidificação do matrigel. As células HUVEC foram soltas da garrafa de cultivo utilizando-se tripsina 0,2% diluída 1:4 em PBS 1X e contadas na câmara de Neubauer, foram plaqueadas $1,5 \times 10^4$ células por poço em um volume de 100µL de DMEM low, DMEM low + 1% SFB, meio condicionado fresco de células GL261 NT em normóxia e em hipóxia, meio condicionado fresco de células GL261 ShSTI1 em normóxia e em hipóxia. O tratamento com 3×10^7 VEs previamente coletadas e armazenadas no freezer - 80°C de células GL261 ShSTI1 em normóxia e em hipóxia e 3×10^7 VEs previamente coletadas e armazenadas no freezer - 80°C de células GL261 NT em normóxia e em hipóxia foi adicionado em poços contendo DMEM low. Foi feita uma duplicata por experimento para cada condição. Após 16 horas, foram adquiridas imagens dos campos no microscópio Nikon eclipse TE2000-U com a lente objetiva de 4x e as imagens analisadas com auxílio do plugin *Angiogenesis Analyzer* do programa ImageJ.

- **Pacientes**

Foram utilizados plasma de 20 pacientes com gliomas de baixo e alto grau. A coleta foi realizada em concordância após a assinatura do paciente no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Todos os procedimentos estão aprovados no Comitê de Ética da Fundação Antônio Prudente sob o número 1692/12.

- ***Isolamento de vesículas extracelulares a partir de sangue periférico***

A coleta de sangue dos pacientes foi realizada no centro cirúrgico após a indução anestésica. Foram coletados aproximadamente 15mL de sangue em tubos BD contendo ácido cítrico, citrato, dextrose (solução ACD) (364606). Imediatamente após a coleta, o plasma foi separado por duas centrifugações a 2500g por 15 minutos à temperatura ambiente e congelado a -80° C até a sua utilização. Para separação das VEs, o plasma foi centrifugado a 12.000g por 45 minutos a 4°C para remoção de debris celulares, o sobrenadante foi centrifugado em ultracentrífuga Optima L-90K (BeckmanCoulter, California, EUA), rotor swinging SW-41Ti a 110.000g por 2 horas a 4° C. O pellet de VEs foi lavado em PBS e centrifugado a 110.000g por 2 horas a 4°C. O pellet final de vesículas foi ressuspendido em 30µl de DPBS e de 10 a 20µl foram diluídos em 15:500 em DPBS para a análise com auxílio do LM10 *nanoparticle characterization system* (NanoSightLtd., Amesbury, United Kingdom).

- ***Análise estatística***

As análises de sobrevida foram realizadas com log-rank test, a avaliação de angiogênese foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Os ensaios de avaliação de angiogênese *in vitro* foram realizados em duplicadas e estão representados como média $\pm$ desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas com uso do programa SPSS Version 20 e GraphPad Prism 5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

- ***Análise do crescimento tumoral de GL261 e angiogênese em animais com diferentes níveis de expressão de STI1***

Inicialmente foi realizada a avaliação de crescimento tumoral da célula GL261 em animais tipo-selvagem (WT), haploinsuficientes (haplo) e superexpressores de STI1 (TGA). A análise de sobrevida dos animais mostra que os animais TGA apresentam maior sobrevida do que animais tipo-selvagem ($p=0,0022$), no entanto não foi observada diferença significativa entre as curvas de sobrevivência entre os animais TGA vs. haplo ($p=0,49$) e WTvs. haplo ($p=0,11$) (Figura 2B). Nesse gráfico foram excluídos os animais que não desenvolveram tumores após a inoculação. Isso ocorreu nos três genótipos, sendo 1 animal haplo, 3 animais TGA e 2 animais WT, não havendo evidências que exista um efeito específico dos genótipos na eficiência do crescimento tumoral.

O monitoramento do crescimento tumoral pela detecção de bioluminescência emitida pelas células GL261-Luc (Figura 2A) se mostrou ineficiente para avaliar a cinética de progressão da doença, com discrepâncias entre os valores de emissão durante o experimento, portanto foi usado somente o acompanhamento dos sintomas clínicos para determinar o momento da eutanásia.

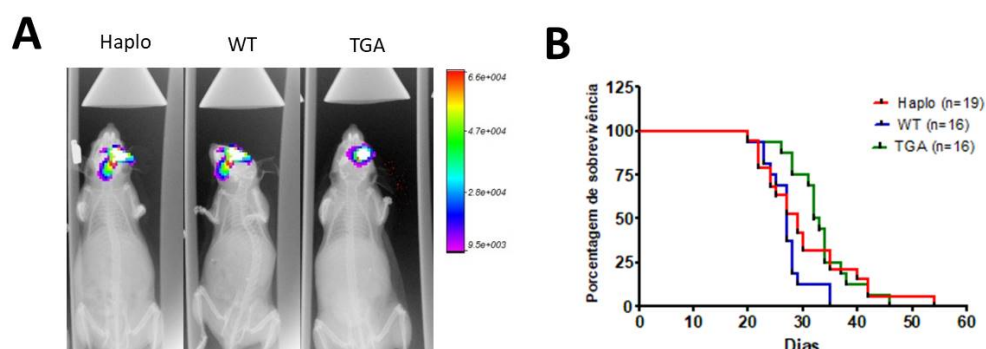


Figura 2 - Tumores GL261 em animais transgênicos com diferentes níveis de expressão de STI1. **A** imagens representativas de bioluminescência de animais WT, haplo e TGA. **B** curva de sobrevivência de animais WT, haplo e TGA inoculados com a célula GL261. Log-rank test, WT vs. Haplo $p = 0,11$; WT vs. TGA $p = 0,0022$; TGA vs. Haplo $p = 0,49$.

A avaliação da angiogênese foi realizada por imunofluorescência utilizando os marcadores de células endoteliais Von Willebrand Factor (VWF) e CD31. As imagens obtidas com o uso destes marcadores indicam que existe uma diferença no padrão dos vasos sanguíneos intratumorais formados nos diferentes genótipos (Figura 3E). Quando comparados com os vasos de animais WT, é possível perceber que os vasos tumorais dos animais TGA apresentam-se em menor número, semelhante ao WT. Em contrapartida, os vasos tumorais de animais haplo encontram-se em maior número e com estruturas menores.

A quantificação de estruturas vasculares indica que os animais TGA possuem menor número de vasos quando comparados aos animais WT ($p=0,026$), mas não quando comparados aos animais haplo ($p=0,145$) (Figura 3A). Também não há diferença significativa no número de vasos entre os animais WT e haplo ($p=1$). Também foi realizada a quantificação de vasos com diferentes calibres, consideramos vasos de pequeno calibre

aqueles com lúmen menor que 20µm (Figura 3B), vasos de médio calibre aqueles com lúmen maior ou igual a 20µm e menores que 40µm (Figura 3C) e vasos de grande calibre aqueles com lúmen maior ou igual a 40µm (Figura 3D). Podemos concluir que o que difere a quantidade total de vasos entre os genótipos são os vasos de pequeno e médio calibre. Os animais TGA apresentam menor quantidade de vasos de pequeno calibre em relação aos animais WT ($p=0,043$), mas não em relação aos animais haplo ($p=0,287$) assim como animais WT e haplo não apresentam diferença significativa nessa quantificação ($p=0,925$) (Figura 3B). Assim como vasos de pequeno calibre, também podemos observar diferença significativa na quantidade de vasos de médio calibre entre os animais TGA e animais haplo ($p=0,018$), mas não entre animais TGA e WT ($p=0,092$) ou animais haplo e WT ($p=1$) (Figura 3C). Não existe diferença no número de vasos grandes entre nenhum dos genótipos ($p=0,742$) (Figura 3D). A sobreposição dos marcadores CD31 e VWF nas imagens (Figura 3E) indicam que as células endoteliais nesse modelo expressam as duas proteínas, esse padrão de expressão por células endoteliais já havia sido observado anteriormente por Ricci Vitiani et al (RICCI-VITIANI et al. 2010).

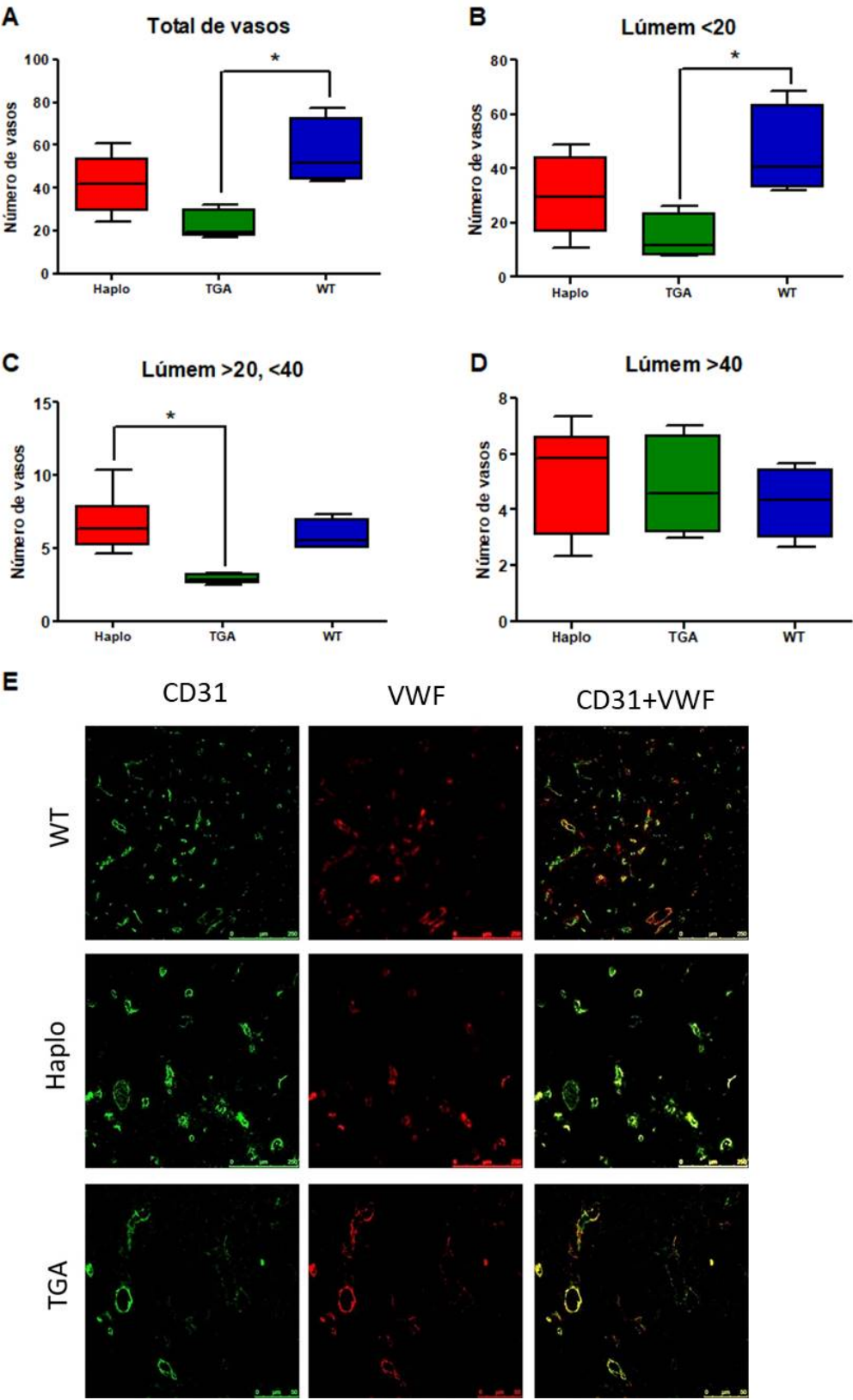


Figura 3 - Imunofluorescência do tumor retirado dos animais haplo, TGA, e WT. **A** Quantificação manual do número total de vasos usando a marcação de CD31 nos animais de cada genótipo (valores de p calculados por teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes TGA vs. haplo, $p=0,145$, TGA vs. WT, $p=0,026$, WT vs. haplo, $p=1$) **B** Quantificação manual do número de vasos com lúmen de até $20\mu\text{m}$ usando a marcação de CD31 nos animais de cada genótipo (valores de p calculados por teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes TGA vs. haplo, $p=0,287$, TGA vs. WT, $p=0,043$, WT vs. haplo, $p=0,925$) **C** Quantificação manual do número de vasos com lúmen entre $20\mu\text{m}$ e $40\mu\text{m}$ usando a marcação de CD31 nos animais de cada genótipo (valores de p calculados por teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes TGA vs. haplo, $p=0,018$, TGA vs. WT, $p=0,092$, WT vs. haplo, $p=1$) **D** Quantificação manual do número de vasos com lúmen maior que $40\mu\text{m}$ usando a marcação de CD31 nos animais de cada genótipo (valores de p calculados por teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes, $p=0,742$) **E** Imagens representativas do padrão de marcação de VWF e CD31 em animais de cada genótipo.

Considerando o papel angiogênico da STI1 quando ligada em PrP^C em modelo de isquemia cerebral (LEE et al. 2012), acreditamos que a expressão reduzida de STI1 pode estar levando a uma normalização da vasculatura intratumoral, caracterizada pela redução do calibre dos vasos e aumento na densidade de capilares, levando a um aumento da oxigenação e redução de zonas de hipóxia. Essa eventual diminuição da zona de hipóxia pode ser verificada através do uso de sondas como a hypoxyprome que foi utilizada para investigar essa hipótese nos animais que foram implantados com mini-bombas osmóticas.

Sabe-se que a morfologia dos vasos intratumorais tem uma correlação com a sobrevida de pacientes com gliomas (BIRNER et al. 2003; KORKOLOPOULOU et al. 2002 2004; LEON et al. 1996). A densidade de capilares e calibre dos vasos podem ser usados como indicador do prognóstico de pacientes (LEON e FOLKERTH e BLACK 1996; BIRNER et

al. 2003; KORKOLOPOULOU et al. 2002, 2004) e há evidências de que o calibre dos vasos é um melhor indicador (KORKOLOPOULOU et al. 2004). No entanto, diferente do observado nesse trabalho, estudos mostram que pacientes com maior densidade de vasos intratumorais e de menor calibre tem melhor prognóstico do que aqueles com vasos de maior calibre e com menor densidade (LEON et al. 1996; BIRNER et al. 2003; KORKOLOPOULOU et al. 2002, 2004). Uma hipótese para tal resultado é a maior perfusão do tratamento no tumor, pois a vasculatura se aproxima da vasculatura normal. Como esses estudos foram feitos em pacientes que recebiam tratamento quimioterápico os resultados mostram o melhor resultado da combinação da morfologia dos vasos e o tratamento (KORKOLOPOULOU et al. 2002), mas não há estudos que mostrem a diferença da morfologia dos vasos independente de tratamentos quimioterápicos.

- ***Análise do crescimento tumoral de GL261 e angiogênese em animais com diferentes níveis de expressão de STI1 com tratamento intratumoral com peptídeos inibitórios sintéticos STI1₂₃₀₋₂₄₅ e STI1_{scrambled}***

Com o intuito de investigar se o efeito inibitório de crescimento tumoral do peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅ realizado no modelo U87MG por LOPES et al. (2014) também seria observado no modelo GL261, animais tipo-selvagem e haploinsuficientes para STI1 foram inoculados com GL-261 e tratados intratumoralmente com auxílio de mini-bombas osmóticas contendo o peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅ e STI1_{scrambled} (que apresenta a mesma constituição de aminoácidos, porém numa sequência embaralhada). O crescimento tumoral e histologia dos tumores foram avaliados. Não foi possível realizar os ensaios com o animal que superexpressam STI1 (TGA) devido a uma inesperada diminuição da colônia desses animais no biotério. O reestabelecimento da mesma impediu que os ensaios fossem realizados a tempo de finalizar este trabalho.

As bombas osmóticas foram implantadas uma semana após a inoculação do tumor nos animais e, uma hora antes da eutanásia, foi aplicado o Hypoxyprobe que possibilita marcar zonas de hipóxia. Não houve alteração na sobrevivência de animais tratados com o peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅ em comparação ao controle, esse resultado foi observado tanto nos animais haploinsuficiente (Figura 4A) quanto nos animais tipo-selvagem (Figura 4B).

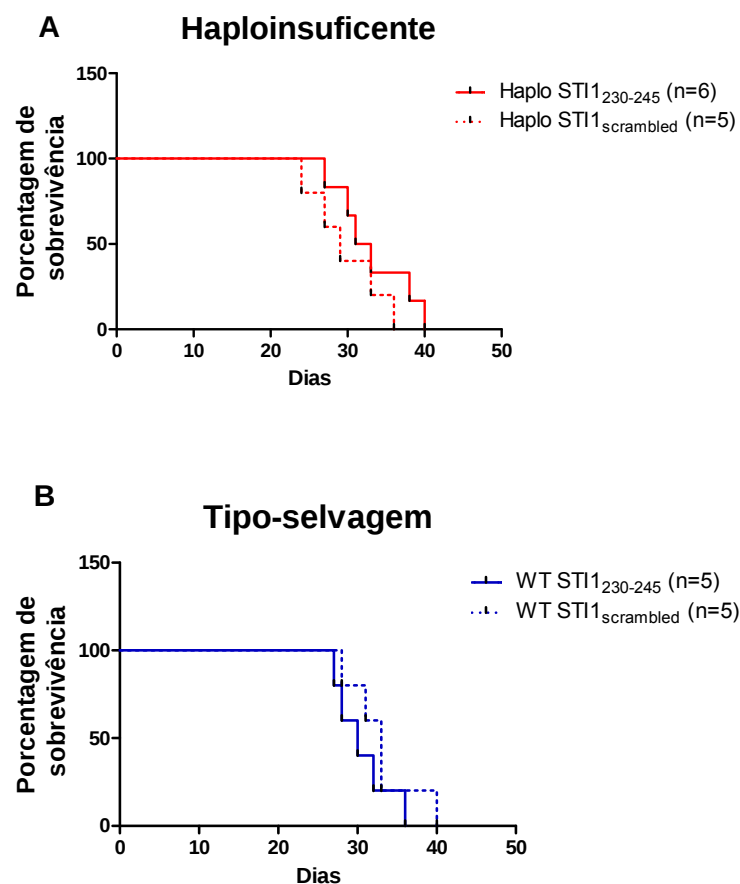


Figura 4 - Curva de sobrevivência de animais tratados com peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅ ou STI1_{scrambled} **A** animais haploinsuficientes (p=0,242) **B** animais tipo-selvagens (p=0,291).

Os cérebros dos animais foram processados e foi feita a imunofluorescência para os marcadores endoteliais CD31 (Figura 5) e actina de músculo liso (SMA) (Figura 6). Foi feita a contagem manual do total de vasos, vasos com lúmen menor que 20µm, vasos entre 20µm e 40µm e vasos maiores que 40µm usando a marcação CD31 (Figura 5 A-D) e SMA (Figura 6 A-D). Não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos com tratamento com peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅ vs. tratamento com peptídeo controle em ambos genótipos ou entre os genótipos para nenhum

dos marcadores utilizados em nenhuma das condições analisadas. Também não há diferença quando comparados os números totais de vasos, vasos pequenos, vasos médios e vasos grandes marcados pelos diferentes marcadores, mostrando que não há diferença na permeabilidade dos vasos na presença do tratamento nem entre os genótipos. Em um primeiro momento não foi possível identificar diferenças nas zonas de hipóxia dos tumores entre os animais haploinsuficientes e animais tipo-selvagem ou entre animais tratados com peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅ vs. tratamento com peptídeo controle (Figura 7). Ainda é necessário estabelecer um método eficiente de análise das imagens adquiridas e para quantificar as zonas de hipóxia em cada animal.

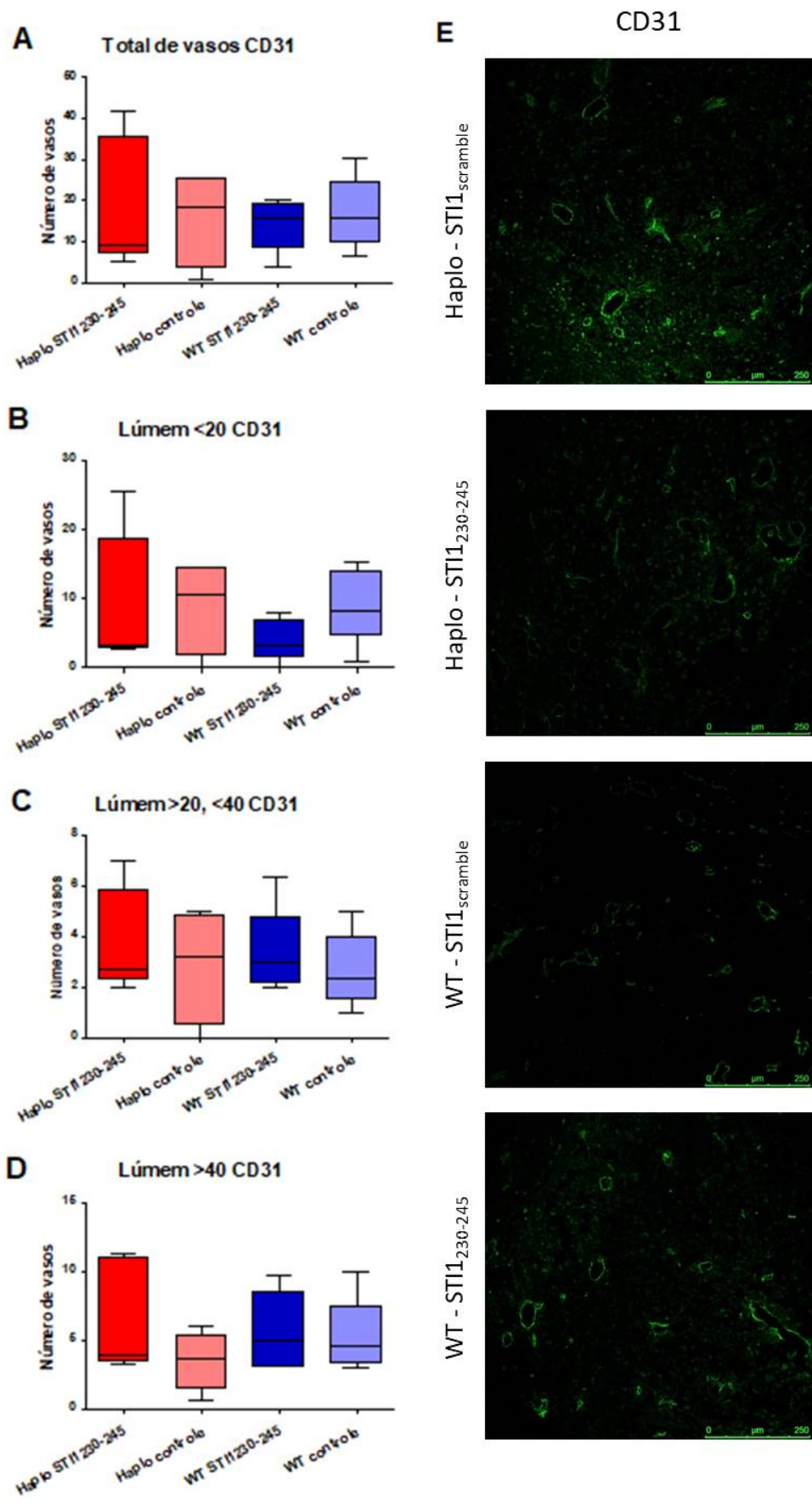
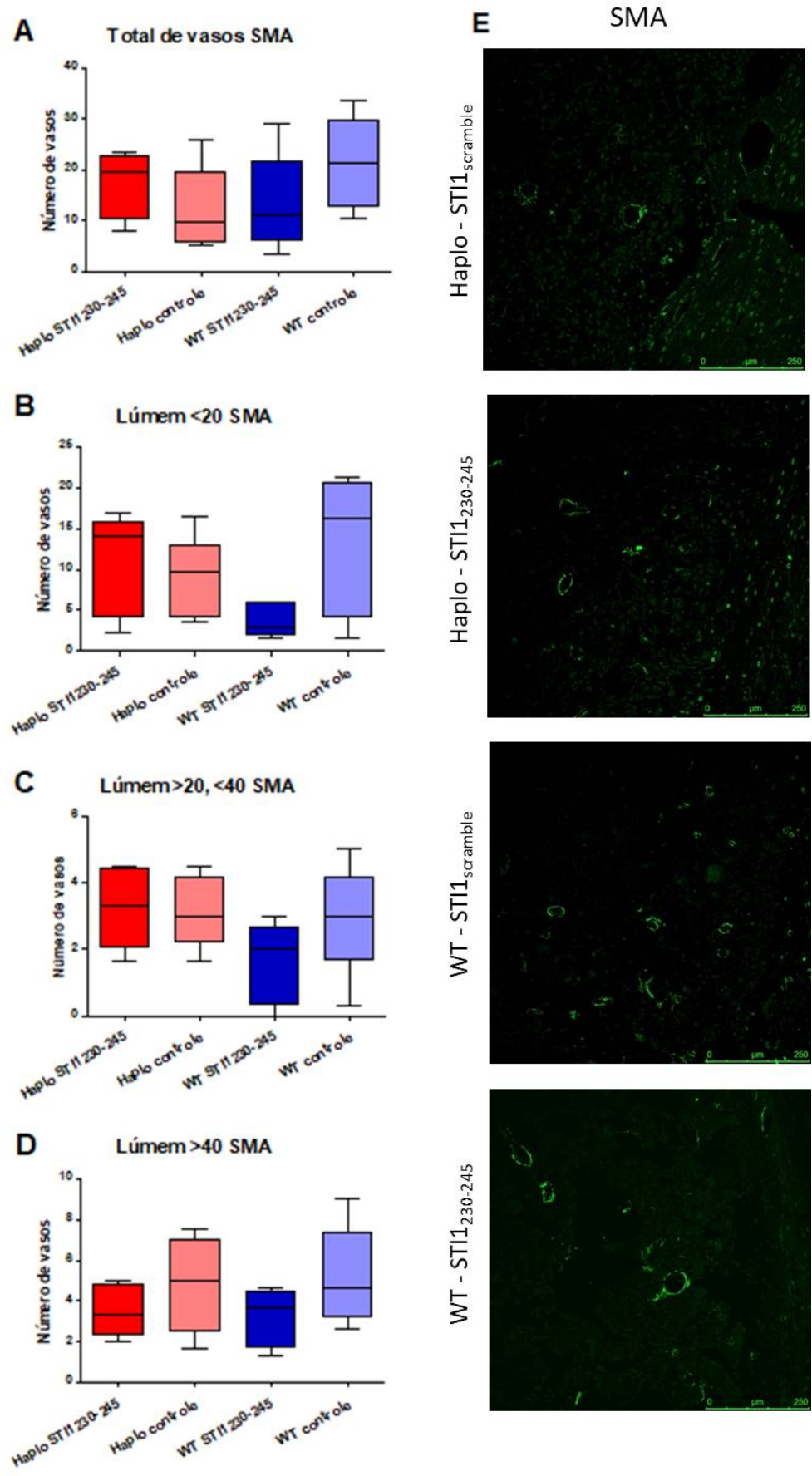


Figura 5 - Imunofluorescência com marcação de CD31 do tumor retirado dos animais haploinsuficiente (Haplo), e tipo-selvagem (WT) tratados com peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅ ou peptídeo scrambled **A** número total de vasos (valores de p calculados por teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes, $p=0,34$) **B** número de vasos com lúmen menor que 20 μ m usando a marcação de SMA nos animais de cada genótipo (valores de p calculados por teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes, $p=0,18$) **C** número de vasos com lúmen maior que 20 μ m e menor que 40 μ m usando a marcação de SMA nos animais de cada genótipo (valores de p calculados por teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes, $p=0,23$) **D** número de vasos com lúmen maior que 40 μ m usando a marcação de SMA nos animais de cada genótipo (valores de p calculados por teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes, $p=0,38$) **E** Imagens representativas da imunofluorescência.



Figur

Figura 6 - Imunofluorescência com marcação de SMA do tumor retirado dos animais haploinsuficiente (Haplo), e tipo-selvagem (WT) tratados com peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅ ou peptídeo scrambled. **A** número total de vasos (valores de p calculados por teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes, $p=0,98$) **B** número de vasos com lúmen menor que 20 μ m (valores de p calculados por teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes, $p=0,47$) **C** número de vasos com lúmen maior que 20 μ m e menor que 40 μ m (valores de p calculados por teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes, $p=0,79$) **D** número de vasos com lúmen maior que 40 μ m (valores de p calculados por teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes, $p=0,78$) **E** Imagens representativas da imunofluorescência.

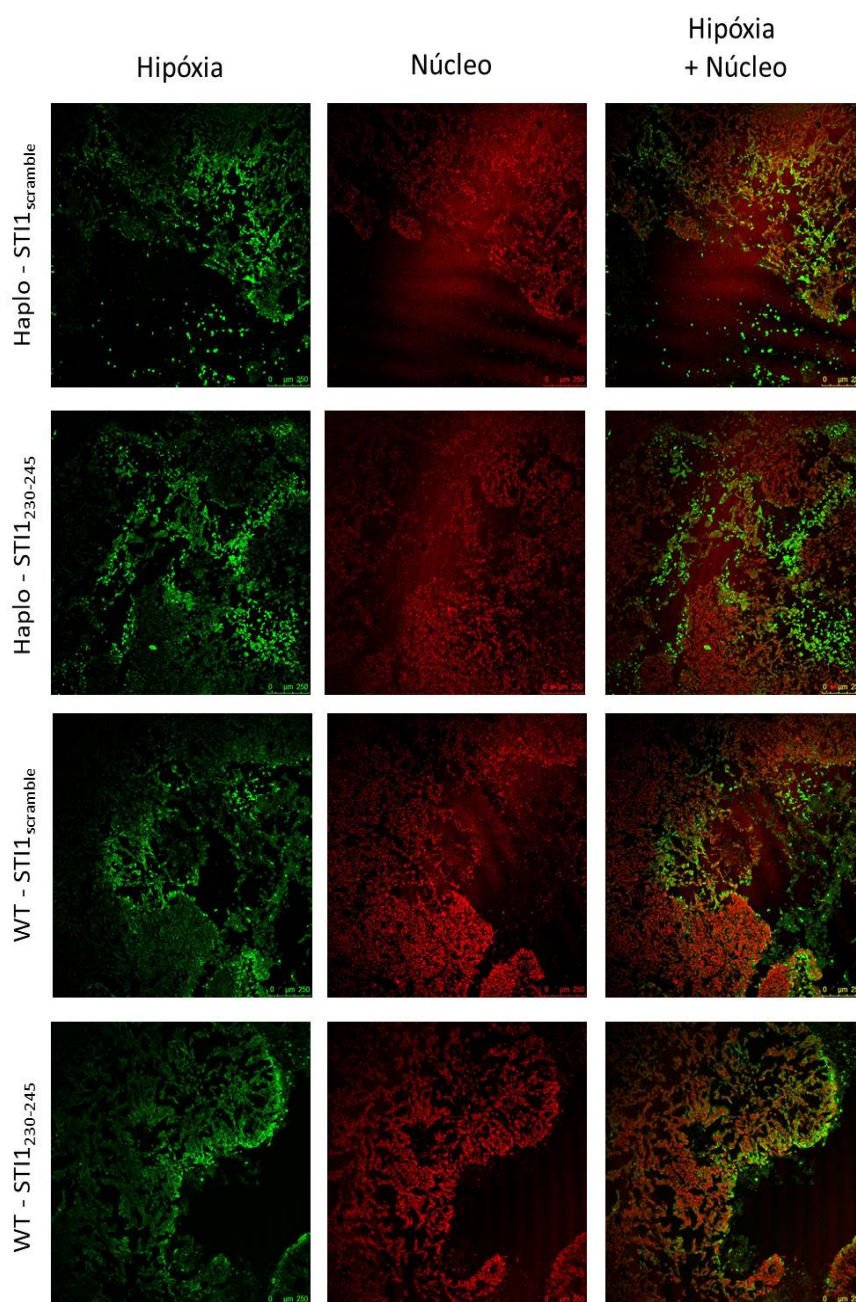


Figura 7 - Imagens representativas das zonas de hipóxia no tecido tumoral animais haplo e WT tratados com o peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅ ou peptídeo scrambled.

WINKLER et al. (2004) observou que o tratamento com a droga antiangiogênica DC101 (inibidor de receptor de Fator de Crescimento Vascular Endotelial-2, VEGFR2) quando administrado sem outros

tratamentos gera um aumento de dois dias na sobrevida dos animais, mas esse aumento não é significativo. O que foi observado foi uma janela de tratamento onde houve a normalização vascular, promovendo maior permeabilidade dos vasos por recrutamento de pericitos levando a redução das zonas de hipóxia no modelo *xenograft* com implante ortotópico de glioblastoma. Após essa janela de tratamento houve a redução do número de pericito e aumento das zonas de hipóxia. No entanto quando os animais recebem tratamento com radioterapia durante a janela de tratamento os animais tiveram maior sobrevida. Esse padrão da eficácia da radio terapia quando o tratamento o pe feito na janela de tratamento também foi demonstrado por (ELMGHIRBI et al. 2017). SEGERS et al. (2005) também demonstraram que os benefícios do tratamento com agente citotóxico (ciclofosfamida) só são obtidos quando o tratamento é administrado no período na janela de normalização vascular do agente anti-angiogenico (talidomida) em modelo de câncer de fígado. SEGERS et al. (2005) também enfatiza que é importante conhecer a janela de normalização vascular das drogas anti-angiogenicas utilizadas afim de obter os benefícios do tratamento.

Com isso, podemos levantar a hipótese de que nossos resultados de sobrevida de animais, de animais tratados com o peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅ em relação ao controle podem não ter apresentado diferenças significativas em relação ao grupo controle pois a janela de tratamento no modelo GL261 ortotópico não foi estabelecida. Para melhor entender a função da STI1 na angiogênese tumoral será necessário realizar o tratamento de animais TGA

com o peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅, a fim de verificar se há alteração na sobrevida e permeabilidade de vasos nesses animais. Também deve-se considerar a possibilidade de tratar de animais tipo-selvagem, haploinsuficientes e TGA em combinação com o quimioterápico temozolomida com o intuito de determinar se o tratamento em conjunto altera a permeabilidade do quimioterápico no tumor e assim aumenta a sobrevida dos animais.

- ***Secreção de STI1 em exossomos em hipóxia e normóxia***

Para verificar se a secreção de STI1 por exossomos pode ser alterada em condições de hipóxia, as células GL261 foram submetidas a esta condição, o meio condicionado foi coletado e processado para isolamento de vesículas extracelulares (VEs).

Inicialmente, foram estabelecidas as condições ideais de processamento das amostras contendo as VEs. As células foram carenciadas por 24 horas com DMEM low sem soro e, após esse período, cultivadas por 24 horas nas condições de hipóxia ou normóxia. O meio condicionado foi recolhido e as vesículas foram isoladas e quantificadas por NTA (*Nanosight tracking analysis*). Diferente do esperado, não foi possível observar o aumento da secreção de VEs em condições de hipóxia. A Tabela 1 mostra os resultados de três ensaios independentes indicando que a quantidade de vesículas ficou inalterada nas células submetidas à hipóxia.

Tabela 1 - Relação do número de VEs por célula nas condições de normóxia e hipóxia nos três experimentos realizados.

Experimento	Condição	Vesículas/ Célula
1	Hipóxia	1361,18
	Normóxia	1983,58
2	Hipóxia	1958,91
	Normóxia	3016
3	Hipóxia	2072,21
	Normóxia	1665,78

Adicionalmente, foram realizados western blots para determinar se a hipóxia poderia alterar a quantidade de STI1 associada à VEs. A Figura 8 indica que não houve alterações na quantidade de STI1 secretadas por células em hipóxia. A princípio, não se pode afirmar que haja diferenças entre a expressão de STI1 em VEs originados de células GL261 em hipóxia ou normóxia, no entanto ainda estamos identificando um marcador de exossomos para estabelecer o controle do experimento. Já foram testados os anticorpos anti-flotilina e anti-TGS100, porém não obtivemos sucesso na marcação. Será necessária a repetição do experimento com outros marcadores. Também é preciso fazer uma reavaliação do protocolo, sem o sensor de hipóxia foi adotado o protocolo de manter a câmara de hipóxia conectada aos cilindros de nitrogênio e gás carbônico por 5 minutos (IKEMORI et al. 2014), é necessário o conserto do sensor de hipóxia a fim

de determinar se a câmara de hipóxia esta funcionando corretamente e se o protocolo adotado mantém as células na condição de 1% de oxigênio.

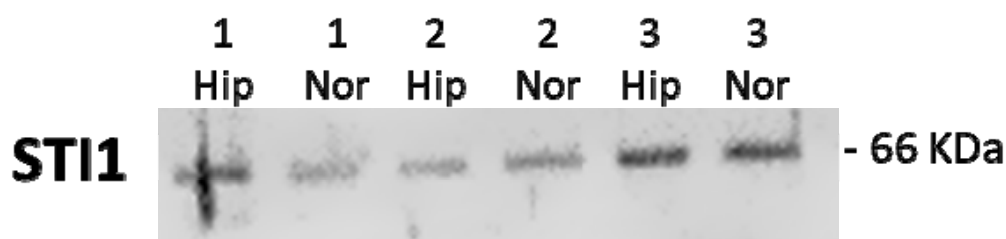


Figura 8 - Western Blotting para detecção de STI1 em exossomos nas condições de hipóxia (Hip) e normóxia (Nor) nos experimentos 1 2 e 3.

- **Relevância da STI1 secretada na angiogênese**

A fim de determinar a relevância da STI1 secretada foram feitos os ensaios de formação de tubo e de migração em células *Human Umbilical Vein Endothelial cell* (HUVEC). Foram utilizadas as células GL261 deficientes de STI1 (shSTI1) e células GL261 Non Target (NT). As condições utilizadas foram DMEM low, DMEM low + 1% SFB, meio condicionado fresco de células GL261 NT em normóxia e em hipóxia, meio condicionado fresco de células GL261 ShSTI1 em normóxia e em hipóxia e 3×10^7 VEs de células GL261 ShSTI1 em normóxia e em hipóxia e 3×10^7 VEs de células GL261 NT em normóxia e em hipóxia. As VEs foram previamente coletadas e armazenadas no freezer -80°C até o dia do ensaio.

Foi feito extrato celular de células GL261 NT e GL261 shSTI1 submetidas à hipóxia e à normóxia e feito um western blotting com 60µg de proteína (Figura 9A), pudemos confirmar que a linhagem shSTI1 não

expressa níveis significantes de STI1 e que a condição de hipóxia não altera o conteúdo de STI1 nas células das duas linhagens. Além disso, o western blotting feito com 3×10^8 VEs coletadas de células GL261 NT e shSTI1 em normóxia e hipóxia (Figura 9B) mostra que não há diferença no padrão de secreção de STI1 pelas linhagens nas condições de hipóxia e normóxia.

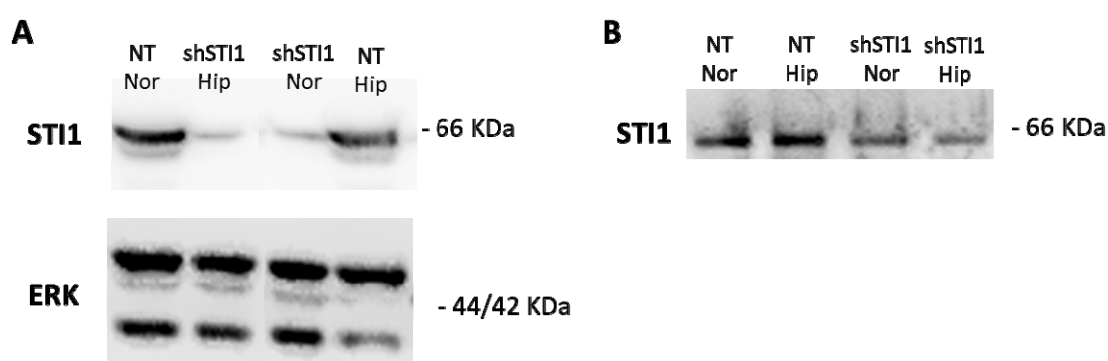


Figura 9 - Western blotting com marcação para a proteína STI1. **A** extrato celular de células GL261 NT e shSTI1 em hipóxia e normóxia. **B** 3×10^8 VEs coletadas de células GL261 NT e shSTI1 em hipóxia e normóxia.

A quantificação do ensaio de migração (Figura 10B) não indica diferença significativa na migração de células HUVEC entre o tratamento com meio condicionado originados do cultivo em hipóxia vs. normóxia tanto para a linhagem GL261 NT quanto para a linhagem GL261 shSTI1 (Figura 10A). Também não foi possível identificar diferença entre o tratamento com meio condicionados de células GL261 NT vs. GL261 shSTI1 nas condições de normóxia e hipóxia ou entre as condições de normóxia. Não foi possível observar nenhum efeito na migração no tratamento com 3×10^7 VEs originadas de células GL261 NT e GL261 shSTI1 nas condições de hipóxia e

normóxia. Para observar o efeito das VEs seria necessária a repetição do experimento utilizando um maior número de vesículas no tratamento. Para isso é necessário estabelecer o número ideal de vesículas para o tratamento através de uma curva de quantidade de vesículas. Esses resultados são originados de uma duplicata, para validação do resultado é necessário a repetição do experimento e validação do protocolo de hipóxia.

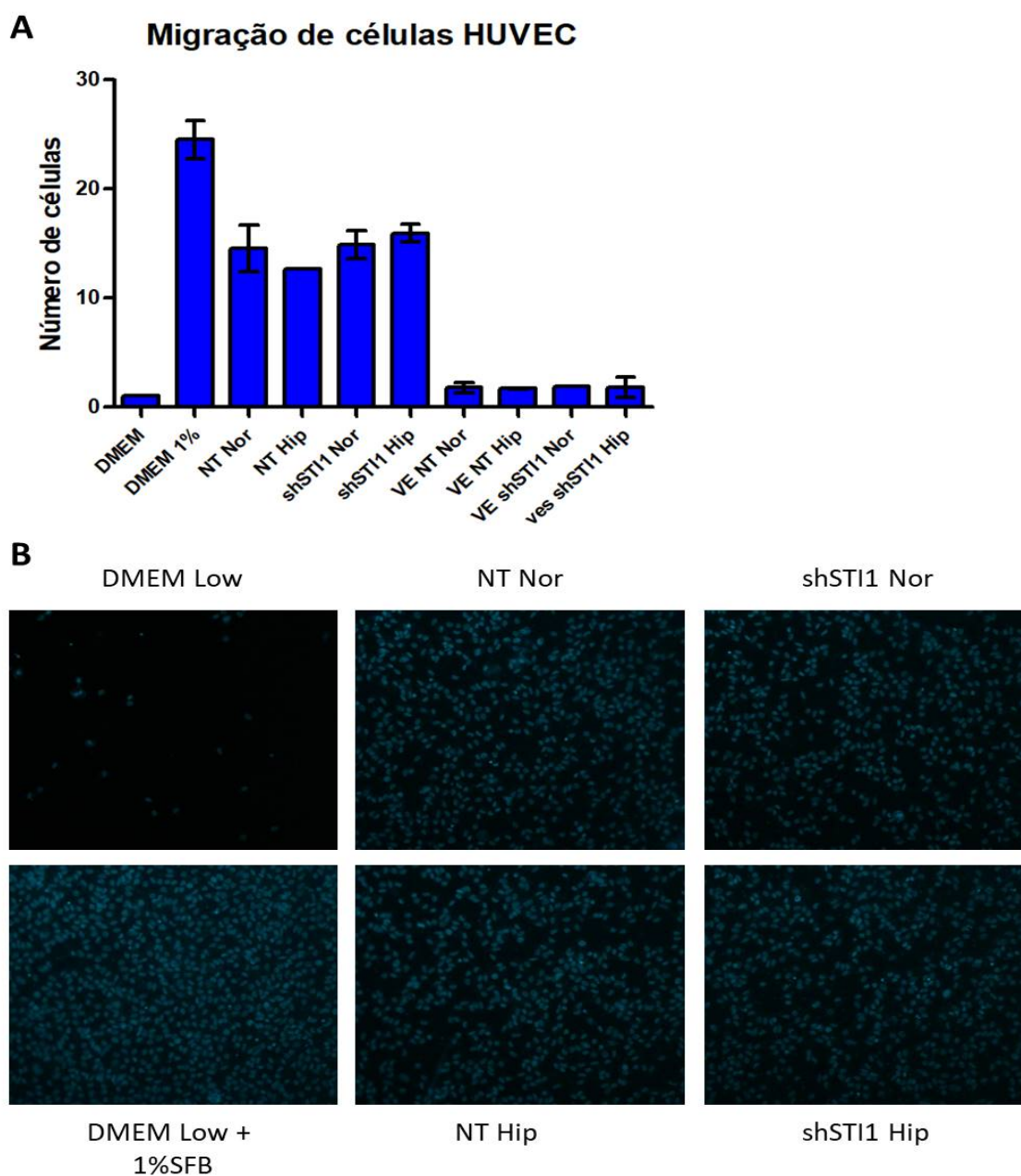


Figura 10 - Migração de células HUVEC. **A** Médias do ensaio de migração de células HUVEC nas condições DMEM low, DMEM low + 1% SFB, meio condicionado fresco de células GL261 NT em normóxia e em hipóxia, meio condicionado fresco de células GL261 ShSTI1 em normóxia e em hipóxia e 3×10^7 VEs de células GL261 ShSTI1 em normóxia e em hipóxia e 3×10^7 VEs de células GL261 NT em normóxia e em hipóxia (valores relativos pelo controle). **B** Imagens representativas do tratamento com DMEM low, DMEM low + 1% SFB, meio condicionado fresco de células GL261 NT em normóxia e em hipóxia, meio condicionado fresco de células GL261 ShSTI1 em normóxia e em hipóxia adquiridas no microscópio de fluorescência.

Para o ensaio de formação de tubos foram utilizadas as mesmas condições do ensaio de migração (DMEM low, DMEM low + 1% SFB, meio condicionado fresco de células GL261 NT em normóxia e em hipóxia, meio condicionado fresco de células GL261 ShSTI1 em normóxia e em hipóxia e 3×10^7 VEs de células GL261 ShSTI1 em normóxia e em hipóxia e 3×10^7 VEs de células GL261 NT em normóxia e em hipóxia). As imagens adquiridas foram analisadas utilizando o plugin *Angiogenesis Analyzer* do programa ImageJ, que analisa as imagens por contraste de fases mapeando e quantificando diversas estruturas (Figura 11). Foram escolhidas três variáveis que tiveram valores semelhantes nos três experimentos realizados: o número de peças, que se refere a soma do número de segmentos (elementos delimitados por duas junções), elementos isolados (linhas binárias sem ramificações) e ramos (elementos delineados por uma junção e uma extremidade); comprimento total de ramos (soma do comprimento dos ramos na área analisada); e junções mestres (junções que ligam pelo menos três segmentos). Quando analisados os efeitos do meio condicionado nas triplicatas, não foi possível identificar diferenças entre os efeitos da hipóxia e normóxia nas linhagens GL261 NT e GL261 shSTI1 nem entre as duas linhagens em normóxia e hipóxia tanto na análise do número de peças ($p=0,45$) quanto na análise do comprimento total de ramos ($p=0,64$) e junções mestres ($p=0,42$) (Figura 12). Também não foi possível identificar diferenças nos efeitos da hipóxia e normóxia nas linhagens GL261 NT e GL261 shSTI1 nem entre as duas linhagens em normóxia e hipóxia nos tratamentos com 3×10^7 VEs de cada condição. Novamente é necessário

estabelecer o número ideal de VEs para o tratamento através de uma curva de quantidade de VEs no tratamento e validar o protocolo de normóxia.

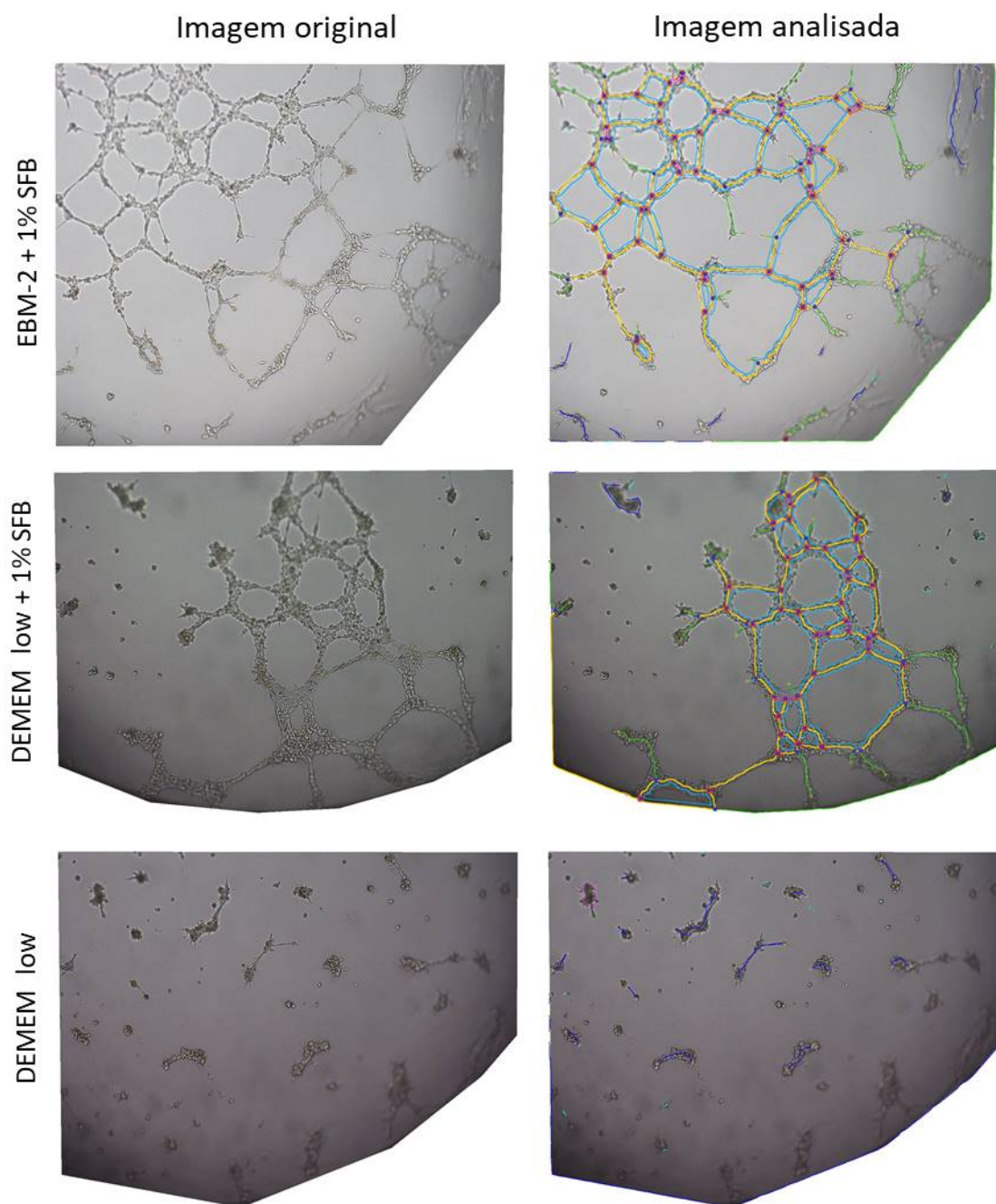


Figura 11 - Imagens representativas do ensaio de formação de tubos adquiridas no microscópio de fluorescência dos controles com EBM-2 + 1%SFB, DMEM low + 1% SFB e DMEM low e suas análises feitas com o plugin angiogenesis analyzer. Nas imagens analisadas as junções mestre estão representadas pelos círculos roxos, os segmentos representados pelas linhas amarelas, ramos representados pelas linhas verdes e elementos isolados representados pelas linhas azuis.

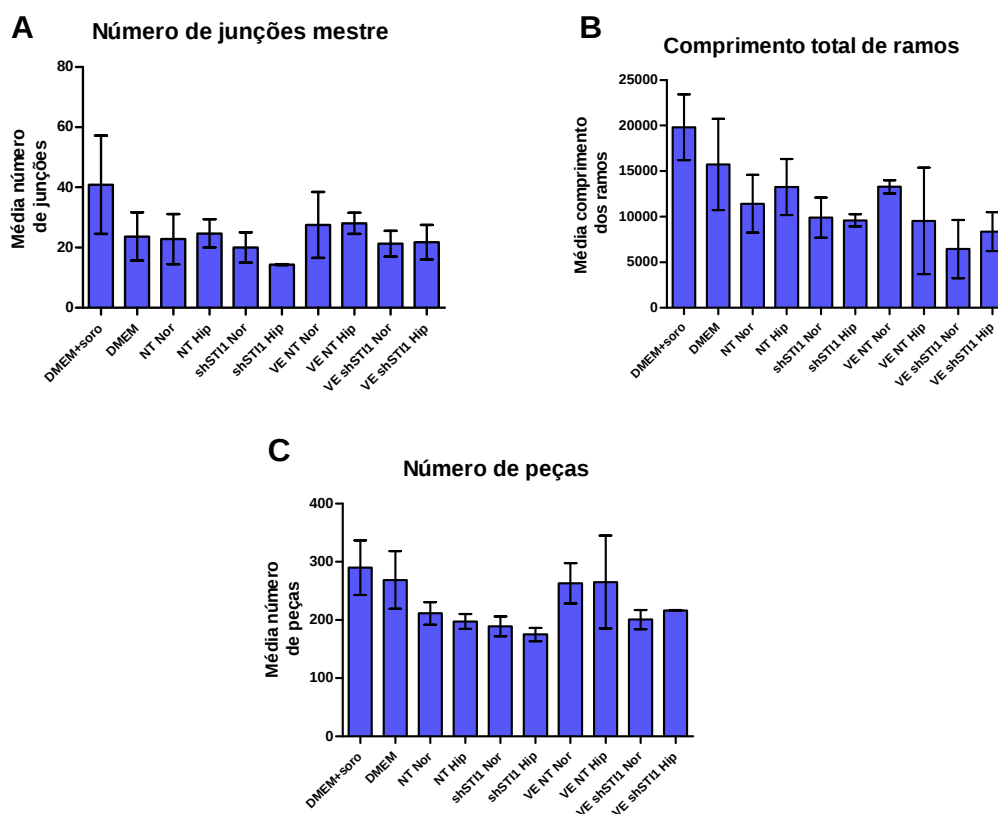


Figura 12 - Gráficos das médias das análises dos ensaios de formação de tubos. **A** médias do comprimento total de ramos **B** médias do número de junções mestre **C** médias do número de peças

- ***Secreção de vesículas extracelulares por gliomas de diferentes graus***

Foi avaliada a quantidade de VEs no plasma sanguíneo de pacientes com astrocitomas de diferentes graus. Já foi mostrado que pacientes com gliomas apresentam maior quantidade de VEs no plasma do que indivíduos saudáveis (FRASER et al. 2019; OSTI et al. 2019). Nosso objetivo foi verificar se há alteração na quantidade de VEs entre pacientes com astrocitomas grau II (n=6), III(n=6), IV(n=8) (glioblastomas) e grupo controle (n=3). Para isso foram isoladas VEs do plasma de 20 pacientes do banco de plasma e quantificadas com auxílio por NTA (Nanosight tracking analysis). Não pudemos observar diferença significativa na quantidade de VEs no plasma sanguíneo entre pacientes com astrocitomas de grau II, III, IV ou grupo controle ($p=0,06$) (Figura 13). OSTI et al. (2019) quantificaram o número de VEs no plasma sanguíneo de pacientes com glioblastomas de grau I, II e III e observaram que os pacientes de grau III possuem menos VEs por mL de plasma sanguíneo do que pacientes de grau I e II e que indivíduos saudáveis apresentam menor número de VEs no plasma do que pacientes de glioblastoma. Nosso resultado mostra um resultado semelhante, podemos ver uma tendência dos pacientes com tumor mais agressivo (grau IV) apresentarem menor número de VEs no plasma sanguíneo e uma tendência de indivíduos saudáveis apresentarem menor número de VEs no plasma sanguíneo do que pacientes com glioblastoma. No entanto essa diferença não foi estatisticamente significativa,

possivelmente devido ao número reduzido de amostras que havia disponível para nosso estudo.

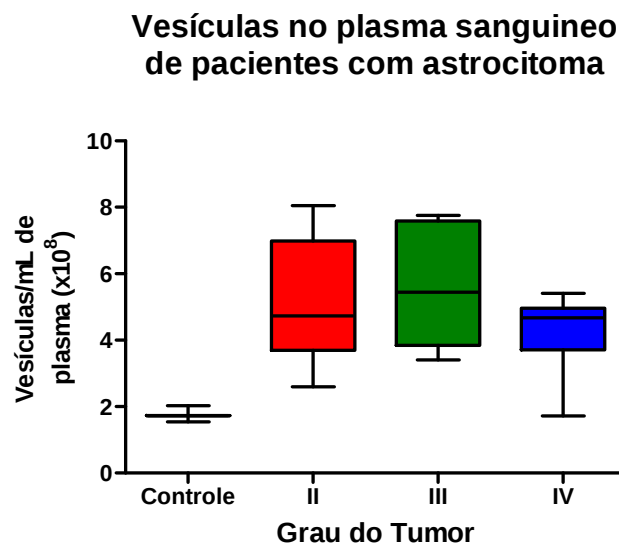


Figura 13 - Quantificação de VEs no plasma sanguíneo de pacientes com gliomas de diferentes graus. Grau II n=6, grau III n=6, grau IV n=8 e grupo controle n=3) (valor de p calculado por teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes, p=0,0065)

4 CONCLUSÕES

Com isso podemos concluir que animais que superexpressam a proteína STI1 tem maior sobrevida quando inoculados com glioma GL261. A vasculatura de tumores oriundos desses animais é reduzida, apresentando menos vasos de menor e médio calibre quando comparados à animais tipo-selvagem. O tratamento com peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅ não altera o crescimento tumoral e, conseqüentemente, não altera a sobrevida de animais haploinsuficientes para STI1 e animais tipo-selvagem.

A hipóxia não alterou a quantidade de VEs secretada por células GL261, bem como a secreção de STI1. Também não foi possível detectar efeito da hipóxia na formação de tubos e migração de células HUVEC.

A ausência de STI1 no meio condicionado de células GL261 não interferiu no processo de formação de tubos e migração de células HUVEC.

Pacientes com glioblastoma tem uma tendência à apresentar um menor número de vesículas extracelulares no plasma sanguíneo do que pacientes com gliomas de grau II e III.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Batchelor TT, Sorensen AG, Di Tomaso E, et al. AZD2171, a Pan-VEGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Normalizes Tumor Vasculature and Alleviates Edema in Glioblastoma Patients. **Cancer Cell** 2007; 11:83-95.

Batchelor TT, Duda DG, Di Tomaso E, et al. Phase II Study of Cediranib, an Oral Pan-Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Recurrent Glioblastoma. **J Clin Oncol** 2010; 28:2817-23.

Batchelor TT, Gerstner ER, Emblem KE, Duda DG, Kalpathy-cramer J. Improved tumor oxygenation and survival in glioblastoma patients who show increased blood perfusion after cediranib and chemoradiation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2013; 110:19059-64.

Belting M, Christianson HC. Role of exosomes and microvesicles in hypoxia-associated tumour development and cardiovascular disease. **J Intern Med** 2015; 278:251-63.

Beraldo FH, Arantes CP, Santos TG, et al. Metabotropic glutamate receptors transduce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin γ 1 chain. **FASEB J** 2011; 25:265-79.

Beraldo FH, Soares IN, Goncalves 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.

Birner P, Piribauer M, Fischer I, et al. Vascular patterns in glioblastoma influence clinical outcome and associate with variable expression of angiogenic proteins: evidence for distinct angiogenic subtypes. **Brain Pathol** 2003; 13:133-43.

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; 64:920-7.

Carlsson SK, Brothers SP, Wahlestedt C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. **EMBO Mol Med** 2014; 6:1359-70.

Cartaxo RT. **Papel da Stress Inducible Phosphoprotein One (STI1) e da proteína prion celular na angiogênese tumoral**. São Paulo; 2019. [Tese-doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. **Nat Rev Cancer** 2010; 10:505-14.

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 - Mol Cell Res** 2008; 1783:1003-14.

De Lacerda TCS, Costa-Silva B, Giudice FS, et al. Prion protein binding to HOP modulates the migration and invasion of colorectal cancer cells. **Clin Exp Metastasis** 2016; 33:441-51.

Donnem T, Hu J, Ferguson M, et al. Vessel co-option in primary human tumors and metastases: an obstacle to effective anti-angiogenic treatment? **Cancer Med** 2013; 2:427-36.

Elmghirbi R, Nagaraja TN, Brown SL, et al. Acute temporal changes of MRI-tracked tumor vascular parameters after combined anti-angiogenic and radiation treatments in a rat glioma model: identifying signatures of synergism. **Radiat Res** 2017; 187:79-88.

Ferrara N, Hillan KJ, Gerber H, Novotny W, Francisco SS. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. **Nat Rev Drug Discov** 2004; 3:391-400.

Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. **Ann Surg** 1972; 175:409-16.

Fraser K, Jo A, Giedt J, et al. Characterization of single microvesicles in plasma from glioblastoma patients. **Neuro Oncol** 2019; 21:606-15.

Fukumura D, Jain RK. Tumor microvasculature and microenvironment: Targets for anti-angiogenesis and normalization. **Microvasc Res** 2007; 74:72-84.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Dev** 2007; 21:2683-710.

G DR, RS S. Critical Factors in Measuring Angiogenesis Using the Aortic Ring Model. **J Genet Syndr Gene Ther** 2013; 4:1000147.

Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. **Genes Dev** 1999; 13:1055-66.

Gillies RJ, Gatenby RA. Hypoxia and adaptive landscapes in the evolution of carcinogenesis. **Cancer Metastasis Rev** 2007; 26:311-7.

Hajj GNM, Lopes MH, Mercadante AF, et al. Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. **J Cell Sci** 2007; 120:1915-26.

Hajj GNM, Arantes CP, Dias MVS, 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.

Hardee ME, Zagzag D. Mechanisms of glioma-associated neovascularization. **Am J Pathol** 2012; 181:1126-41.

Ikemori RY, Machado CML, Furuzawa KM, et al. Galectin-3 up-regulation in hypoxic and nutrient deprived microenvironments promotes cell Survival. **PLoS One** 2014; 9:e111592.

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.

Korkolopoulou P, Patsouris E, Kavantzias N, et al. Prognostic implications of microvessel morphometry in diffuse astrocytic neoplasms. **Neuropathol Appl Neurobiol** 2002; 28:57-66.

Korkolopoulou P, Patsouris E, Konstantinidou AE, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α /vascular endothelial growth factor axis in astrocytomas. Associations with microvessel morphometry, proliferation and prognosis. **Neuropathol Appl Neurobiol** 2004; 30:267-78.

Kucharzewska P, Christianson HC, Welch JE, et al. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. **Proc Natl Acad Sci** 2013; 110:7312-7.

Lee C-T, 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 S-D, Lai TW, Lin S-Z, 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.

Leon SP, Folkerth RD, Black PM. Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. **Cancer** 1996; 77:362-72.

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 FRS, 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.

Lopes MH, Hajj GNM, Muras AG, et al. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **J Neurosci** 2005; 25:11330-9.

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** 2014; 34:3305-14.

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.

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

Nakatsu MN, Hughes CCW. Chapter 4 an optimized three-dimensional in vitro model for the analysis of angiogenesis. **Methods Enzymol** 2008; 443:65-82.

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

Osti D, Del Bene M, Rappa G, et al. Clinical significance of extracellular vesicles in plasma from glioblastoma patients. **Clin Cancer Res** 2019; 25:266-76.

Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009-2013. **Neuro Oncol** 2016; 18:v1-v75.

Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. **Nature** 2010; 468:824-8.

Rossant J, Howard L. Signaling pathways in vascular development. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2002; 18:541-73.

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.

Santos TG, Beraldo FH, Hajj GNM, et al. Laminin- γ 1 chain and stress inducible protein 1 synergistically mediate PrPC-dependent axonal growth via Ca^{2+} mobilization in dorsal root ganglia neurons. **J Neurochem** 2013; 124:210-23.

Santos TG, Lopes MH, Martins VR. Targeting prion protein interactions in cancer. **Prion** 2015; 9:165-73.

Schorey JS, Bhatnagar S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. **Traffic** 2008; 9:871-81.

Segers J, Fazio V DI, Ansiaux R, et al. Potentiation of cyclophosphamide chemotherapy using the anti-angiogenic drug thalidomide: Importance of optimal scheduling to exploit the 'normalization' window of the tumor vasculature. **Cancer Lett** 2006; 244:129-35.

Semenza GL. Hypoxia, Clonal Selection, and the Role of HIF-1 in Tumor Progression. **Crit Rev Biochem Mol Biol** 2000; 35:71-103.

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

Stupp R, Mason WP, Van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med** 2005; 352:987-96.

Tamimi AF, Juweid M. Epidemiology and outcome of glioblastoma. In: De Vleeschouwer S, editor. **Glioblastoma**. Brisbane: Codon Pub; 2017. p.143-53.

Taylor DD, Gercel-Taylor C. Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. **Semin Immunopathol** 2011; 33:441-54.

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

Van Loo PLP, Everse LA, Bernsen MR, et al. Analgesics in mice used in cancer research: reduction of discomfort? **Lab Anim** 1997; 31:318-25.

Van Niel G. Exosomes: a common pathway for a specialized function. **J Biochem** 2006; 140:13-21.

Weissert R, Wallström E, Storch MK, et al. MHC haplotype-dependent regulation of MOG-induced EAE in rats. **J Clin Invest** 1998; 102:1265-73.

Willetts CG, Boucher Y, Di Tomaso E, et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. **Nat Med** 2004; 10:145-7.

Willett CG, Duda DG, Czito BG, Bendell JC, Clark JW, Jain RK. Targeted therapy in rectal cancer. **Oncology (Williston Park)** 2007; 21:1055-65; discussion 1065, 1070, 1075 passim.

Winkler F, Kozin S V., Tong RT, et al. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation. **Cancer Cell** 2004; 6:553-63.

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

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; 21:3307-16.