



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DA ABLAÇÃO DE CD90 EM CÉLULAS  
PRIMÁRIAS DE GLIOBLASTOMAS HUMANOS *IN*  
*VITRO***

**VANESSA HENRIQUES NOGUEIRA BUZOGANY**

Brasília  
2018

VANESSA HENRIQUES NOGUEIRA BUZOGANY

**AVALIAÇÃO DA ABLAÇÃO DE CD90 EM CÉLULAS PRIMÁRIAS DE  
GLIOBLASTOMAS HUMANOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal,  
pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal  
da Universidade de Brasília.

**Orientadora:** Profa. Dra. Daniela Mara de Oliveira

Brasília  
2018

VANESSA HENRIQUES NOGUEIRA BUZOGANY

**AVALIAÇÃO DA ABLAÇÃO DE CD90 EM CÉLULAS PRIMÁRIAS DE  
GLIOBLASTOMAS HUMANOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Biologia Animal.

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Daniela Mara de Oliveira  
(Orientadora)

---

Profa. Dra. Sônia Nair Bão  
(Membro Titular)

---

Prof. Dra. Patrícia Silva Moretti  
(Membro Titular)

---

Prof. Dra. Mônica Pereira Garcia  
(Suplente)

Dedico este trabalho aos meus  
pais pelo apoio incondicional  
em realizar meus sonhos.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, por me proporcionarem uma educação de qualidade, por sempre incentivarem a seguir com amor os meus sonhos e pelo apoio incondicional em cada etapa desses dois anos. Obrigada pelos conselhos e lições de vida.

Ao Luiz Felipe Blumm, por me acompanhar em mais uma conquista acadêmica e pelo amor, carinho e paciência nessa caminhada. Obrigada pela parceria de vida em todos os momentos.

Aos meus familiares, que, de longe, apoiaram essa jornada, mesmo sem entender completamente o meu trabalho. Obrigada por vibrarem por mim em cada passo até agora. Em especial aos meus avós, por terem em suas orações mensagens de amor e carinho e torcerem sempre pelo meu sucesso.

Aos meus amigos, por proporcionarem muitos momentos de descontração em períodos difíceis e pelo reconhecimento que sempre tiveram por mim. Um obrigada especial para André Nunes e Fernando, irmãos que a vida me deu de presente.

Aos meus amigos do curso de Biotecnologia, Leonardo e Lucas, por entenderem os passos do mestrado e sempre serem um porto seguro, mesmo de longe.

Às minhas amigas Bianca, Carolina, Carolyne, Rebeca, Ana Laura, Thuanny, Beatriz, Brenda e Luciana, por estarem torcendo por mim de perto e acompanharem cada etapa. Obrigada pelo amor de vocês.

À família Blumm pelo apoio incondicional e por torcerem por mim como se eu fosse parte da família.

Agradeço à Amanda Alencar, minha colega de mestrado, que passou por todos os momentos comigo e torço sempre pelo seu sucesso. Obrigada pelos desabafos e comemorações.

Agradeço à minha orientadora, Daniela Mara, pelo apoio na pesquisa e por guiar sempre com positividade o mestrado. Obrigada pela orientação e por fazer parte da minha primeira etapa como cientista.

Agradeço à Jaqueline pelo apoio em cada citometria de fluxo e por sempre tentar solucionar comigo os mistérios dos meus experimentos. Obrigada pela dedicação e apoio.

Agradeço à Maria Brito, por me fazer rir e descontraír o ambiente sempre com seu humor.

Agradeço ao Professor Dr. Ricardo Bentes de Azevedo pela receptividade positiva e calorosa ao departamento.

Agradeço à Dona Zélia, presente em todo o meu início do mestrado, sempre com um caloroso “bom dia” em dias não muito bons e sempre disposta a me ajudar.

Agradeço aos professores do departamento de Genética e Morfologia por ministrarem aulas fundamentais para o meu aprendizado.

Agradeço aos técnicos Karen, Fred e Diogo, pela paciência em resolver os problemas do laboratório de maneira sempre solícita.

Agradeço a todos os colegas da Biologia Animal e da Nanotecnologia, por descontraírem o ambiente de laboratório e proporcionarem uma atmosfera leve para trabalhar.

Agradeço à Universidade de Brasília por ser uma instituição que trilhou meu caminho acadêmico e me faz querer seguir essa trajetória.

Agradeço aos neurocirurgiões do Hospital de Base do Distrito Federal, do Hospital da Criança de Goiânia e do Hospital São Paulo por serem prestativos ao recolher as amostras.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e à FAP-DF pelo auxílio que proporcionou o andamento da pesquisa.

*“In solving a problem of this sort, the grand thing is to be able to reason backwards. That is a very useful accomplishment, and a very easy one, but people do not practice it much.”*

- Sherlock Holmes, em “A Study in Scarlet” de Sir Arthur Conan Doyle’s

## RESUMO

Os gliomas representam os tumores do sistema nervoso central (SNC) mais comuns e com alta taxa de incidência. Entre eles, o glioblastoma multiforme (GBM) é extremamente agressivo e com grande heterogeneidade intratumoral, sendo classificado como grau IV de acordo com a OMS. O paciente é submetido ao tratamento oncoquimioterápico, a Temozolomida, associado à radioterapia. Pouco se avançou em relação a evolução dos fármacos utilizados para o tratamento de GBM e os testes clínicos atuais revelam pouca melhora nas taxas de sobrevivência, a qual é em média de 18 meses. Com a alta taxa de recidiva alinhada à falta de novos tratamentos, a busca por biomarcadores e a investigação biológica do GBM avançam de maneira promissora. Acredita-se que a resistência tumoral se deve à presença de células-tronco tumorais (CTC). Elas apresentam aspectos similares aos das células-tronco neuronais saudáveis, assim como a presença de certos marcadores moleculares indicadores um estado não diferenciado. A glicoproteína CD90 tem função de adesão celular no SNC e está presente em diversas células desse sistema. Porém, há estudos indicando uma superexpressão dessa proteína em CTCs de GBM, o que leva à investigação desse possível biomarcador em células primárias de GBM. A possibilidade de se utilizar de células de linhagens para o estabelecimento de metodologias e investigação de comportamentos *in vitro*, levou à análise da expressão de CD90 em U87MG, linhagem recorrente em estudos de GBM. Após a transdução com luciferase para futuros experimentos *in vivo* e ablação de CD90 para devida comparação com o controle e análise por citometria de fluxo, foi aferido que a linhagem U87MG é negativa para CD90, impossibilitando seu uso nos demais estudos. Dessa forma, amostras cirúrgicas humanas de GBM de dois pacientes foram processadas e, então, foi estabelecido o cultivo primário de GLIO1 e GLIO2. Após a ablação de CD90 nas duas amostras, obteve-se a confirmação, por citometria de fluxo, de que o grupo GLIO1 shCD90 e GLIO2 shCD90, teriam a expressão de CD90 reduzida em 42,78% e 68,6%, respectivamente. Assim, o ensaio de formação de oncoesferas foi realizado a fim de descobrir a influência de CD90 na formação de estruturas esféricas, as quais acredita-se serem compostas por CTCs. A ablação de CD90 influenciou na morfologia das oncoesferas, com menor densidade e com menor tamanho, e no número dessas estruturas entre 3 a 7 dias de cultivo, quando comparada com o grupo controle, tanto em GLIO1 quanto em GLIO2. Foi avaliada, também, a migração celular pelo teste *in vitro* de *wound healing* e CD90 demonstrou influência no tempo de fechamento da área do *scratch*, com o grupo GLIO2 shCD90 não tendo a mesma capacidade de migração celular quanto o grupo controle, GLIO2 WT. Ao mesmo tempo, realizou-se o teste de adesão por análise celular em tempo real (RTCA), o qual comprovou a influência da glicoproteína na adesão e espalhamento das células em baixa ( $5 \times 10^3$ ), média ( $10 \times 10^3$ ) e alta ( $20 \times 10^3$ ) confluências. Portanto, esse trabalho permite inferir a influência do nível de expressão de CD90 em células primárias de GBM, sendo importante na migração, invasão e formação de nichos com CTCs, os quais irão propagar o tumor e conferir maior resistência oncoquimioterápica. Além disso, é evidenciada a importância de se realizarem mais estudos com o cultivo primário devido às diferenças biológicas encontradas nas duas amostras de tumor. A maior investigação de CD90 permitirá tanto a busca para tratamentos mais eficazes quanto para a predição do prognóstico mais assertivo quanto à característica tumoral.

Palavras-chave: glioblastoma multiforme, GBM, CD90, câncer, célula-tronco de câncer



## ABSTRACT

Gliomas are the most common among the central nervous system (CNS) tumors and with high incidence rate. Among them, the glioblastoma multiforme (GBM) is extremely aggressive and with high intratumoral heterogeneity, classified as grade IV, accordingly to WHO. The patient is subjected to an oncochemotherapy, Temozolomida, associated with radiotherapy. Little progress has been made in the evolution of drugs used to treat GBM and current clinical trials show little improvement in survival rates, which is on average 18 months. With a high rate of relapse and with the lack of new treatments, the search for biomarkers and the biological investigation of the GBM are advancing in a promising way. Tumor resistance is believed to be due to the presence of tumor stem cells (CSCs). They present similar aspects to those of healthy neural stem cells, as well as the presence of certain molecular markers indicating an undifferentiated state. The glycoprotein CD90 is a cellular adhesion molecule in the CNS and is present in several cells of this system. However, there are studies indicating an overexpression of this protein in GBM CTCs, which leads to the investigation of this possible biomarker in primary GBM cells. The possibility of using cell lines to establish methodologies and investigation of *in vitro* behaviors led to the analysis of CD90 expression in U87MG, a recurrent cell line in GBM studies. After transfection with luciferase, for further *in vivo* experiments, and knockdown of CD90 for comparison with control and analysis by flow cytometry, it was verified that the U87MG is negative for CD90, making it impossible to use it in the other studies. Thus, GBM human surgical specimens from two patients were processed and then the primary culture of GLIO1 and GLIO2 was established. After the knockdown of CD90 in the two samples, it was confirmed by flow cytometry that the CD90 knockdown group, GLIO1 shCD90 and GLIO2 shCD90, would have CD90 expression reduced by 42.78% and 68.6 %, respectively. Therefore, the tumorsphere formation assay was performed in order to discover the influence of CD90 on the formation of spheroid structures, which are believed to be composed of CTCs. The knockdown of CD90 influenced the morphology of the tumorspheres, with lower density and with smaller size, and in the number of these structures between 3 and 7 days of culture, when compared with the control group, in GLIO1 and GLIO2. Cell migration was evaluated by the *in vitro* wound healing assay and CD90 showed influence on the scratch area closure time, with the GLIO2 shCD90 group not having the same cell migration capacity as the control group, GLIO2 WT. At the same time, the cell adhesion was performed in the real-time cell analysis (RTCA), which proved the influence of the glycoprotein on cell adhesion and spreading at low ( $5 \times 10^3$ ), medium ( $10 \times 10^3$ ) and high ( $20 \times 10^3$ ) confluences. Therefore, this work allows to infer the influence of CD90 expression level on primary GBM cells, being important in the migration, invasion and formation of niches with CSCs, which will propagate the tumor and confer greater oncochemotherapy resistance. In addition, the importance of conducting further studies with primary culture is evident, as there were biological differences found between the two tumor samples. Further investigation of CD90 will allow both the search for more effective treatments and the prediction of the more assertive prognosis regarding the tumor characteristic.

Key words: glioblastoma multiforme, GBM, CD90, cancer, cancer stem cell

# ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 ESQUEMA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) .....	18
FIGURA 2 CARACTERÍSTICAS DETERMINANTES PARA O SURGIMENTO DO CÂNCER .....	21
FIGURA 3 MODELO DE ORIGEM TUMORAL A PARTIR DE CÉLULA-TRONCO DE CÂNCER (CTC) ...	27
FIGURA 4 MODELO 3D DA GLIOPROTEÍNA CD90 ANCORADA NA MEMBRANA PLASMÁTICA..	32
FIGURA 5 CD90 E O CÂNCER. ....	33
FIGURA 6 FORMAÇÃO DE ONCOESFERAS A PARTIR DE AMOSTRAS CIRÚRGICAS. ....	35
FIGURA 7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLOS A PARTIR DO CULTIVO DE U87MG.....	39
FIGURA 8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL A PARTIR DO CULTIVO DE CÉLULAS PRIMÁRIAS DE GBM .....	39
FIGURA 9 GARRAFAS DE CULTIVO APÓS PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS CIRÚRGICAS.....	41
FIGURA 10 MODELO PARA PLAQUEAMENTO DAS CÉLULAS GLIO2 PARA A ANÁLISE DE RTCA49	
FIGURA 11. EXPRESSÃO DE LUCIFERASE EM U87MG NO IVIS LUMINA.....	51
FIGURA 12 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DA EXPRESSÃO DE CD90 EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS .....	52
FIGURA 13 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DA EXPRESSÃO DE CD90 EM U87MG WT E U87MG-LUC-CD90-.....	53
FIGURA 14 CÉLULAS PRIMÁRIAS DE GLIO1 .....	54
FIGURA 15 CÉLULAS PRIMÁRIAS DE GLIO2.....	54
FIGURA 16 HISTOGRAMA DA EXPRESSÃO DE CD90 EM GLIO2.....	56
FIGURA 17 ONCOESFERAS DOS GRUPOS GLIO1 WT E GLIO2 WT.....	58
FIGURA 18 ONCOESFERAS DOS GRUPOS GLIO1 WT E GLIO2 WT .....	59
FIGURA 19 AGLOMERAÇÃO DE ONCOESFERAS DE GLIO2 WT.....	61

FIGURA 20 QUANTIFICAÇÃO DE ONCOESFERAS EM GLIO1 E GLIO2.....	62
FIGURA 21 QUANTIFICAÇÃO DE ONCOESFERAS EM GLIO1 E GLIO2 AGRUPADOS.....	63
FIGURA 22 FORMAÇÃO DE SUBESFERAS DE GLIO2.....	64
FIGURA 23 HISTOGRAMA DA EXPRESSÃO DE CD90 EM ONCOESFERAS DERIVADAS DE GLIO2.	65
FIGURA 24 IMAGENS DO ENSAIO DE MIGRAÇÃO DE GLIO2.....	67
FIGURA 25 QUANTIFICAÇÃO DA ÁREA COBERTA APÓS 24 HORAS DO ENSAIO DE MIGRAÇÃO.....	67
FIGURA 26 ADESÃO CELULAR DAS CÉLULAS GLIO2 WT E GLIO2 SHCD90.....	69

# ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL, SUAS RESPECTIVAS CARACTERÍSTICAS CELULARES E A CLASSIFICAÇÃO DE INVASIVIDADE DE ACORDO COM A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (WHO), A QUAL VARIA DE I A IV DE MANEIRA CRESCENTE. ....	22
TABELA 2 ESTIMATIVAS PARA 2018 DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS COMUNS NO BRASIL DIVIDIDO POR SEXO.....	23
TABELA 3 VALORES DE INTENSIDADE MEDIANA DE FLUORESCÊNCIA DE GLIO1 E GLIO2. ....	56
TABELA 4 VALORES DE INTENSIDADE MEDIANA DE FLUORESCÊNCIA DAS ONCOESFERAS DERIVADAS DE GLIO2.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CI	Índice celular
CT	Célula-tronco
CTC	Célula-tronco de câncer
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMEM-LG	Meio Eagle modificado por Dulbecco-Baixa Glicose
GBM	Glioblastoma Multiforme
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GFP	Proteína verde fluorescente
GLIO1	Célula primária de glioblastoma multiforme do paciente 1
GLIO2	Célula primária de glioblastoma multiforme do paciente 2
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LUC	Luciferase
MFI	Intensidade mediana de fluorescência
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
RTCA	Análise celular em tempo real
SFB	Soro fetal bovino
SGZ	Zona Subgranular
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
U87MG	Linhagem celular humana de glioblastoma

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 SISTEMA NERVOSO CENTRAL .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2 CÉLULAS DA GLIA.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3 TUMORES NO SNC .....</b>	<b>20</b>
<b>1.4 EPIDEMIOLOGIA .....</b>	<b>23</b>
<b>1.5 GLIOBLASTOMA MULTIFORME.....</b>	<b>24</b>
<b>1.6 CÉLULAS-TRONCO.....</b>	<b>26</b>
<b>1.7 CÉLULAS-TRONCO DE CÂNCER.....</b>	<b>26</b>
<b>1.8 BIOMARCADORES PARA CTCS.....</b>	<b>29</b>
<b>1.9 CD90 COMO UM BIOMARCADOR PARA CT DE GBM .....</b>	<b>31</b>
<b>1.10 ONCOESFERAS NO ESTUDO <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>34</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>37</b>
<b>3. OBJETIVO .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>38</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>39</b>
<b>4.2 CULTIVO DE CÉLULAS DE LINHAGEM U87MG .....</b>	<b>40</b>
<b>4.3 ESTABELECIMENTO DA LINHAGEM CELULAR PRIMÁRIA DE GLIOBLASTOMAS (GLIO) .....</b>	<b>40</b>
<b>4.4 PASSAGEM CELULAR .....</b>	<b>41</b>
<b>4.5 CONTAGEM DE CÉLULAS E PASSAGEM CELULAR.....</b>	<b>42</b>

4.6	MARCAÇÃO DAS CÉLULAS DE LINHAGEM U87MG COM LUCIFERASE E GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP) POR LENTIVÍRUS .....	42
4.7	ABLAÇÃO DE CD90 COM PARTÍCULAS LENTIVIRAIS DAS CÉLULAS U87MG-LUC E DAS CÉLULAS PRIMÁRIAS DE GLIOBLASTOMAS HUMANOS .....	43
4.8	PURIFICAÇÃO DAS CÉLULAS U87MG-LUC COM <i>MICROBEADS</i> DE CD90.....	44
4.9	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CD90 POR CITOMETRIA DE FLUXO NAS CÉLULAS DE U87MG E DE GLIO E MSC.....	44
4.10	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CD90 POR CITOMETRIA DE FLUXO NAS CÉLULAS DE GLIO1 E GLIO2 .....	45
4.12	CULTURA DE ONCOESFERAS DERIVADAS DE GLIO .....	46
4.13	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CD90 POR CITOMETRIA DE FLUXO NAS ONCOESFERAS DE GLIO2.....	47
4.14	CULTIVO DE SUBESFERAS DE CÉLULAS GLIO.....	47
4.15	ENSAIO DE MIGRAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	48
4.16	ANÁLISE DE ADESÃO CELULAR A PARTIR DO MÉTODO DE ANÁLISE CELULAR EM TEMPO REAL (RTCA).....	48
4.17	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	49
5.	RESULTADOS .....	50
5.1	EXPRESSÃO DE LUCIFERASE EM CÉLULAS U87MG.....	50
5.2	ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DA EXPRESSÃO DE CD90 EM CÉLULAS U87MG .....	50
5.3	ESTABELECIMENTO DA CULTURA PRIMÁRIA DE GLIOBLASTOMAS (GLIO) ..	53
5.4	ANÁLISE EM CITOMETRIA DE FLUXO DA EXPRESSÃO DE CD90 EM CÉLULAS PRIMÁRIAS DE GLIOBLASTOMA.....	55
5.5	FORMAÇÃO DE ONCOESFERAS A PARTIR DO CULTIVO DE GLIO1 E GLIO2....	57

5.6	ANÁLISE DO NÚMERO DE ONCOESFERAS ENTRE OS GRUPOS CELULARES....	60
5.7	FORMAÇÃO DE SUBESFERAS DE GLIO2 .....	63
5.8	EXPRESSÃO DE CD90 EM ONCOESFERAS DE GLIO1 E GLIO2 .....	64
5.9	ENSAIO DE <i>WOUND HEALING</i> PARA AVALIAÇÃO DE MIGRAÇÃO CELULAR ...	66
5.10	ANÁLISE CELULAR EM TEMPO REAL (RTCA).....	68
6.	DISCUSSÃO .....	70
7.	CONCLUSÃO.....	77
8.	PERSPECTIVAS .....	78
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
	ANEXO 1 .....	86



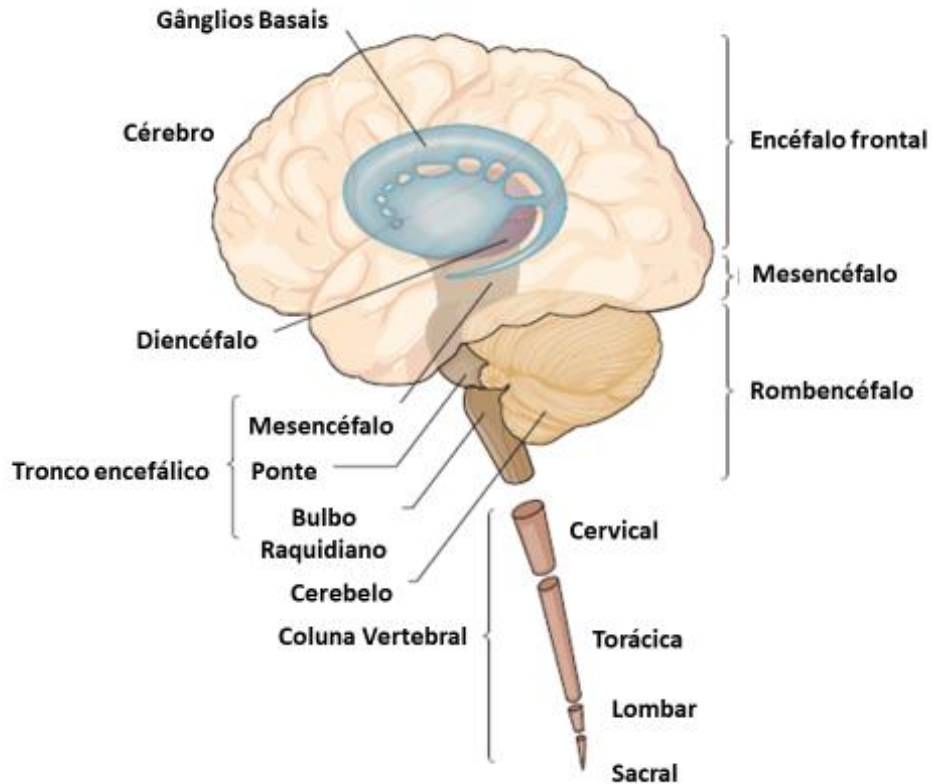
# 1. Introdução

## 1.1 Sistema Nervoso Central

O estudo do sistema nervoso central (SNC) é marcado pela constante dificuldade em saber o seu exato funcionamento. Com o passar dos anos, houve muitos avanços em relação ao entendimento de seus mecanismos e a sua organização morfológica<sup>1</sup>.

O SNC é bilateral e simétrico, compreendido pelo encéfalo e pela medula espinhal, conforme mostrado na Figura 1. Cada parte do SNC atua com suas respectivas funções e de maneira interdependente. Todas as conexões e funcionalidades cerebrais são realizadas pelos diferentes componentes celulares desse sistema: os neurônios e as células da glia<sup>1</sup>.

Os neurônios transmitem os potenciais de ação que serão interpretados e analisados em padrões de sinais elétricos, transformando-os em memória, sentidos, sentimentos e locomoção<sup>1</sup>. São variados os tipos de neurônios encontrados no SNC, com cada vez mais classificações e morfologias diferentes sendo descobertas<sup>2</sup>. O tipo neuronal está relacionado com a sua localização no SNC e seu papel nesse ambiente. Apesar das diferenças morfológicas, oriundas das formas de organização do citoesqueleto, os neurônios apresentam divisões estruturais bem definidas (axônio, corpo celular e dendritos), as quais tornam possível a comunicação entre as células através das fendas sinápticas e de impulsos elétricos. Essa comunicação, além de outras funções, é proporcionada de maneira rápida e eficiente pela presença de células da glia<sup>3</sup>.



**Figura 1** Esquema do sistema nervoso central (SNC). Adaptado de Kendel, 2013<sup>1</sup>.

## 1.2 Células da Glia

Originadas do mesmo precursor embrionário, as células da glia apresentam funções e aspectos morfológicos diferentes dos neurônios. Elas não conduzem sinais elétricos, mas garantem a funcionalidade e a homeostase das células neuronais, como excitabilidade e transmissão sináptica, tanto do SNC quanto do periférico<sup>1</sup>. Além disso, elas estabelecem contato com células endoteliais de capilares e facilitam a comunicação de outros tipos celulares com os neurônios<sup>1,4</sup>. Essas células podem ser divididas em diversos subtipos celulares que, de forma geral, são compreendidos em: oligodendrócitos, células de Schwann, astrócitos, endimócitos e micróglia.

Oligodendrócitos e células de Schwann são responsáveis pela produção de mielina, facilitando a condução do impulso nervoso, através dos saltos do potencial

elétrico<sup>1</sup>. Os oligodendrócitos permitem uma plasticidade neuronal através da modulação da formação de mielina nos axônios de neurônios do SNC, podendo ter seus padrões alterados durante o desenvolvimento embrionário e de acordo com estímulos ambientais, sendo este último ainda não muito bem elucidado<sup>5</sup>. Ao mesmo tempo, as células de Schwann participam do processo de mielinização no sistema nervoso periférico (SNP) e da homeostase neuronal desse sistema<sup>6</sup>. Essas células também possuem uma plasticidade notável, a qual garante o reparo neuronal do SNP, podendo se desdiferenciar em uma célula de Schwann imatura e garantir esse reparo efetivo após danos locais<sup>6,7</sup>.

Astrócitos são células da glia que apresentam formato similar ao de uma estrela, como a origem grega do nome sugere (astro= estrela, cito= célula). Eles regulam as concentrações de íons, como os íons de potássio liberados no disparo do potencial de ação neuronal, e de neurotransmissores extracelulares<sup>1</sup>. Além disso, essas células possuem uma comunicação direta com os neurônios na regulação, na formação de sinapses e servem de progenitores para neurônios e outras células neurais<sup>8,9</sup>. Eles ainda possuem um sistema de resposta dependente de cálcio à concentração extracelular de glutamato, podendo participar do processamento de informação em conjunto com os neurônios<sup>8,10</sup>.

Os ependimócitos são responsáveis por auxiliar na produção do líquido cefalorraquidiano (LCR). Originadas do neuroepitélio, os ependimócitos são células epiteliais multiciliadas que direcionam o fluxo do líquido cefalorraquidiano no ventrículo do SNC, formam um gradiente no LCR para a devida movimentação de moléculas e direcionam a migração de neuroblastos originados na região subventricular<sup>1,11,12</sup>.

Todos esses componentes celulares do SNC atuam em conjunto com a micróglia, o sistema imune cerebral. Originada na medula óssea e da linhagem mieloide, a micróglia migra para o SNC no início da embriogênese<sup>13</sup>. Essas células conseguem recrutar parte do sistema imune para o cérebro em processos de inflamação, sendo eficientes em apresentar o antígeno para os linfócitos<sup>1</sup>. Além disso, elas apresentam uma relação direta de comunicação com neurônios, astrócitos e vasos sanguíneos, sendo extremamente plásticas e de resposta imune rápida<sup>14</sup>.

Dessa forma, conclui-se que o SNC possui uma fina regulação e garantia de homeostase com o funcionamento saudável das células da glia<sup>15</sup>. Ao mesmo tempo, percebe-se o aparecimento de inúmeras patologias, como a doença de Alzheimer, Esclerose Múltipla e o aparecimento de tumores, as quais suas alterações biológicas estão relacionadas, também, às células da glia<sup>16-19</sup>.

### **1.3 Tumores no SNC**

Os tumores do SNC apresentam as características gerais comuns aos tumores de outros sistemas. As células tumorais derivam de células saudáveis que possuem alguma falta ou ganho de função e passam por diversos estágios de anormalidade, como os estágios de hiperplasia (proliferação aumentada de células com morfologia similar à do tecido de origem), metaplasia (proliferação de um tipo tecidual sobre outro tecido) e displasia (proliferação anormal de células com morfologia diferente do tecido de origem)<sup>20</sup>. Alterações na transcrição de genes, na modulação epigenética e, até mesmo, fatores ambientais podem levar essas células a mudarem seu perfil de expressão e apresentarem uma morfologia e uma bioquímica aberrante, até que haja o estabelecimento o câncer *in situ*<sup>20</sup>. Ao mesmo tempo, as células tumorais precisam

adquirir certas características morfológicas para que haja, então, a promoção do crescimento do tumor.

A Figura 2 remete aos diversos estudos realizados sobre o câncer e a origem dos tumores. Diversas alterações na homeostase celular devem ocorrer para que haja o aparecimento de um tumor, como escape da morte celular e da atividade do sistema imunológico; alta taxa de proliferação com imortalidade replicativa; reprogramação do metabolismo celular e promoção da inflamação e angiogênese. Dessa forma, a formação dos tumores é um sistema complexo e com diferentes variáveis a serem analisadas<sup>20</sup>.

Existem diversos tipos de classificações para tumores do SNC. Estes podem ser classificados de acordo com a sua célula de origem e acometer tanto o SNC quanto o periférico<sup>20</sup>.



**Figura 2 Características determinantes para o surgimento do câncer.** Algumas modificações celulares são essenciais para que a célula atinja o estágio de câncer, como: promoção da angiogênese, instabilidade genômica, capacidade de invasão e geração de metástase, escape de supressores de crescimento, escape do sistema imunológico, reprogramação metabólica, resistência à morte celular, capacidade proliferativa permanente e imortalidade replicativa. Adaptado de Weinberg e Hanahan (2011)<sup>21</sup>.

Além disso, esses tipos tumorais estão distribuídos, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), de acordo com o grau de invasividade, podendo ser de grau I, com pouco potencial proliferativo e removível através de cirurgia, até o grau IV, com comportamento maligno, ativo mitoticamente com sinais de necrose e associado a uma evolução rápida da doença com péssimo prognóstico<sup>22</sup>. Na Tabela 1, são evidenciados alguns tipos de tumores do SNC com sua respectiva classificação da OMS.

De forma geral, os tumores no SNC apresentam dificuldade no diagnóstico, o qual tem sido facilitado com os avanços das técnicas de tomografia computadorizada e ressonância magnética. Apesar dos avanços na área de pesquisa sobre o assunto, ainda há dificuldades em relacionar os sinais e sintomas com a real presença de tumores no SNC, já que muitos desses sintomas incluem enxaquecas, distúrbios visuais e distúrbios comportamentais, presentes também em outras patologias<sup>23</sup>.

**Tabela 1.** Tumores do Sistema Nervoso Central, suas respectivas características celulares e a classificação de invasividade de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a qual varia de I a IV de maneira crescente.

<b>Nome do Tumor</b>	<b>Células Predominantes</b>	<b>Classificação OMS</b>
<b>Glioblastoma multiforme</b>	Astrocitomas de grau avançado	IV
<b>Astrocitomas</b>	Astrócitos	I a III
<b>Oligodendriomas</b>	Oligodendrócitos	II e III
<b>Schwannoma</b>	Células de Schwann	I
<b>Meningioma</b>	Células da meninge	I a III
<b>Ependimoma</b>	Ependimócitos	I a III
<b>Medulloblastoma</b>	Células granulares do cerebelo	IV

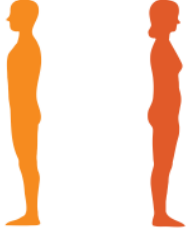
Após o diagnóstico, o paciente segue, muitas vezes, para um tratamento oncoquimioterápico. Existem diversos desafios para desenvolver tratamentos efetivos para a eliminação do câncer do SNC. A barreira hematoencefálica dificulta o acesso dos

medicamentos às regiões afetadas e a vascularização desorganizada promovida pelo tumor ocasiona um alto grau de invasividade tumoral, além da dificuldade em compreender toda a região comprometida pelo do tumor<sup>22</sup>.

## 1.4 Epidemiologia

Os tumores do SNC são considerados relativamente raros, com incidência aproximada de 2% dos casos de câncer no mundo. Todavia, são causas de grande parte da mortalidade mundial e acometem, principalmente, crianças menores de 15 anos e jovens adultos, indicando 28% a 30% das mortes causadas por câncer nesses grupos<sup>24,25</sup>. Já no Brasil, eles corresponderam a 5,8% dos tumores pediátricos entre os anos de 1983 a 2005<sup>26</sup>. Além disso, estima-se que no ano de 2018 constarão 5,81 casos novos para os homens e 5,51, para as mulheres a cada 100 mil indivíduos dos respectivos grupos, conforme os dados apresentados na Tabela 2<sup>25</sup>.

**Tabela 2 Estimativas para 2018 dos dez tipos de câncer mais comuns no Brasil dividido por sexo.** Distribuição proporcional para os dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil em relação ao total de casos de câncer no país. Adaptado de INCA (2017)<sup>25</sup>.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		<b>Homens</b> <b>Mulheres</b>	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Dentre os tipos de tumores do SNC, os gliomas, tumores das células da glia, são os mais frequentes, podendo chegar a 60% dos casos desses tipos tumorais e, em geral, aparecem mais em adultos<sup>25</sup>. Nos Estados Unidos da América, eles correspondem a 26% dos casos de câncer pediátrico, apresentando uma sobrevida geral de 78%<sup>27</sup>. Na Europa,

estudos demonstram que os astrocitomas e ependimomas obtiveram sobrevida alta e glioblastoma teve a menor, com somente 2,7%<sup>28</sup>.

## **1.5 Glioblastoma multiforme**

Glioblastoma multiforme (GBM) é um tipo de astrocitoma de grau IV, de acordo com a classificação de tumores do SNC da OMS. Para a diferenciação do termo “glioma”, esse seria todo tipo tumoral de células da glia abrangendo também o GBM.

O astrocitoma do tipo GBM é caracterizado por polimorfismos celulares, atividade proliferativa aumentada, hiperplasia microvascular e necrose central, a qual compreende até 80% do volume tumoral. De rápida manifestação, o GBM cresce rapidamente, não podendo ter remoção total por meio de intervenção cirúrgica e havendo, então, diversas recidivas<sup>29</sup>. Dessa forma, menos da metade dos pacientes sobrevivem mais que um ano, mesmo com o devido tratamento. Infelizmente, além de ser um câncer de prognóstico ruim, ele é o mais comum entre os tumores cerebrais, variando entre 12-15% de todas as neoplasias intracraniais<sup>22</sup>.

O GBM possui uma maior incidência em adultos, com pico entre 45 e 75 anos e em pessoas do sexo masculino. Ocorre na região subcortical do cérebro, podendo localizar em diferentes regiões, como nos lobos temporais, parietais e frontais. Em crianças, é comum haver o câncer na região dos núcleos basais e no tálamo, além de ter ocorrências no tronco encefálico<sup>22</sup>.

Concomitantemente, o GBM é resistente às terapias quimioterápicas em geral, além de 60% da sua origem já ser na forma de grau IV. Esse tipo tumoral é muito heterogêneo entre os pacientes e de maneira intratumoral, com diversos tipos celulares e de alterações genéticas na sua composição oscilando entre os casos<sup>30</sup>. Essa variedade



genética dentro de um mesmo tumor é conferida pela instabilidade genômica, o que favorece as mutações e as possíveis resistências aos tratamentos. Todas essas características dificultam a criação de uma única e específica forma de linha de ação contra o tumor<sup>31</sup>.

Desde a descoberta da associação de uma quimioterapia alquilante, a Temozolomida, com a radioterapia entre os anos de 2000 e 2005, não houve grandes avanços no tratamento da neoplasia de GBM. A Temozolomida é um pró-fármaco com afinidade à O6 metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), uma enzima de reparo do DNA, e ela inibe o recrutamento da DNA ligase, evitando, assim, a replicação do DNA e garantindo a morte das células em alta atividade mitótica. A associação da droga com a radioterapia prolonga a vida do paciente para uma média de somente 18 meses, o que ainda é consideravelmente baixo<sup>31,32</sup>.

Existem outras terapias ainda em fase clínica, como o Bevacizumab, um anticorpo monoclonal inibidor da formação de vasos sanguíneos pela ação do fator endotelial de crescimento vascular (VEGF), e também os fitoterápicos, como por exemplo o uso de canabinóides<sup>31</sup>. Ainda assim, nenhum desses resultados aumentou a sobrevida de maneira extremamente significativa.

Com a alta taxa de recidiva e ineficiência dos tratamentos, há uma maior busca para entendimento das bases moleculares do GBM. Existe a divisão clássica do GBM em dois tipos clínicos: primário, originado *de novo*, e secundário, originado por glioblastomas de graus menores. Apesar de diferenças na expressão gênica no seu início da formação do tumor, ambos geram resultados similares na tumorigênese<sup>33</sup>.

A fim de se estabelecer alvos eficazes para o tratamento desse câncer, a grande promessa está nos avanços da imunoterapia e na ciência básica da biologia do câncer, como as células-tronco de GBM<sup>34,35</sup>.

## **1.6 Células-tronco**

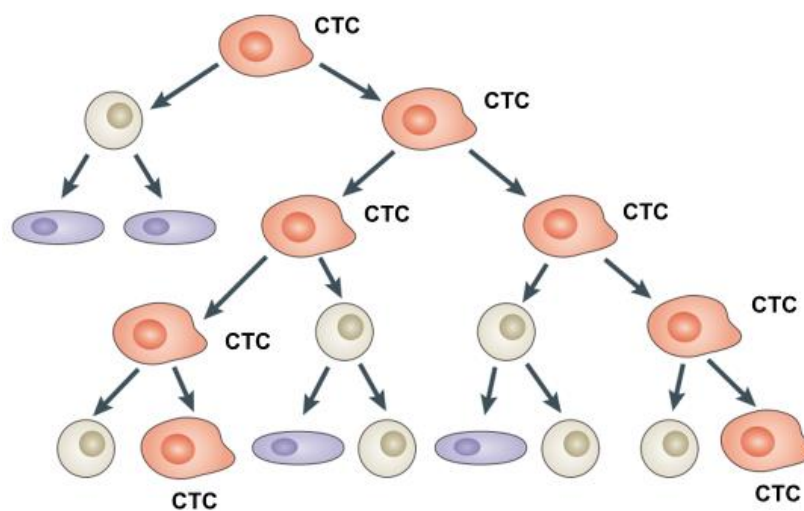
Células-tronco (CT) são unidades celulares capazes de se autorrenovarem e de se dividir assimétrica e simetricamente dando origem a uma célula igual a ela e a uma já em um grau mais diferenciado, as células progenitoras<sup>36</sup>. Elas possuem um sistema hierárquico em relação ao seu potencial de diferenciação e podem ser: totipotentes (podendo dar origem a todos os tecidos embrionários e extraembrionários), pluripotentes (originando todos os tecidos embrionários) e multipotentes (dando origem a uma linhagem específica de células)<sup>20</sup>.

As CTs neuronais dão origem aos neurônios e às células da glia. Elas estão localizadas em diferentes regiões do SNC, mas principalmente na zona subventricular (SVZ) e na zona subgranular (SGZ). A neurogênese é determinada pela migração, diferenciação e integração dos circuitos neuronais promovidos por essas CTs e as suas diferenciações em células progenitoras<sup>37</sup>. A cada estágio de diferenciação e comprometimento celular, células progenitoras são formadas com função de autorrenovação característica de CTs. Alguns marcadores de CTs neuronais são GFAP, marcador de maturação de astrócitos; SOX2, marcador recorrente em CTs para manutenção da pluripotência e nestina, marcador de células progenitoras neuronais<sup>37,38</sup>.

## **1.7 Células-tronco de câncer**

O conceito de células-tronco de câncer (CTC) se refere a uma célula que dará origem ao nicho principal do tumor e irá gerar diversas células progenitoras formadoras

de unidades celulares tumorais diferenciadas, assim como esquematizado na Figura 3. Essas CTCs tem características de células-tronco de autorrenovação e divisão assimétrica e simétrica, garantindo a heterogeneidade tumoral, mas não necessariamente tendo uma alta atividade mitótica<sup>39</sup>. Concomitantemente, essas CTCs podem ser originadas de células-tronco primárias dos tecidos ou a partir de células progenitoras oriundas dessas primárias e que possuem um comprometimento celular um pouco mais bem definido, ainda que mantenham certas plasticidades<sup>20,40</sup>.



**Figura 3 Modelo de origem tumoral a partir de célula-tronco de câncer (CTC).** São representadas no esquema: células-tronco de câncer (vermelho); células progenitoras (cinza) e células diferenciadas (lilás). Adaptado de Beck e Blanpain (2013)<sup>39</sup>.

Existe, ainda, a possibilidade de uma célula com um grau elevado de comprometimento no tecido conseguir se desdiferenciar e se tornar uma CTC. Esse mecanismo já foi evidenciado por diversos estudos e é uma das explicações para a resistência aos tratamentos e para a recidiva das neoplasias<sup>20,41</sup>.

O conceito de células-tronco tumorais como iniciadoras de tumor é antigo, mas foi em 1997, que o laboratório de John Dick publicou no periódico *Nature* um trabalho

em que conseguiu isolar células iniciadoras de tumor de leucemia mieloide aguda<sup>42</sup>. Dessa forma, o estudo demonstrou que existe uma hierarquia celular no câncer assim como nos tecidos normais, com células desempenhando funções variadas. Esse trabalho inaugurou uma série de publicações condizentes com a teoria de CTCs em outros tipos tumorais<sup>40</sup>.

As CTCs começam a evidenciar uma possível origem para o câncer e para a resistência e recidiva dessa doença. Para tumores de glioblastoma, por exemplo, que já possuem extrema dificuldade de novas linhas de tratamento, é importante o estudo de sua origem e possíveis tratamentos focados na biologia do tumor de maneira mais específica<sup>43-45</sup>.

Em células diferenciadas no SNC, não há grandes possibilidades de encontrar mutações ocasionais que darão origem ao câncer, uma vez que elas apresentam grande estabilidade genômica. Dessa forma, a busca por CTs desse sistema possibilita a primeira evidência da origem dos tumores no SNC<sup>46</sup>.

Os gliomas são geralmente originados na zona subventricular (SVZ), um nicho já conhecido de células-tronco neurais, e possuem marcadores de células-tronco como o gene *nestin*<sup>47</sup>. Esses nichos germinais formam tumores com vias de sinalização ativa típicas de CTs, não tão presentes em células diferenciadas, como a expressão de *Gli1*, da ativação da via de sinalização de Hedgehog, presente em gliomas de alto e baixo grau; a superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), importante para a proliferação de células-tronco neurais e a inibição da via PTEN, um regulador do crescimento dessas células. Todas essas expressões evidenciam, mais uma vez, a relação de células-tronco com o câncer do SNC<sup>46</sup>.

Recentemente, vários estudos analisaram as possíveis regiões germinais de início do tumor de GBM e sua relação com a recidiva e a resistência ao tratamento. GBMs originados em regiões com alta concentração de células-tronco neurais são os que possuem maiores dificuldades no tratamento e, conseqüentemente, pior prognóstico<sup>48,49</sup>. Além disso, a hipótese da origem de glioblastomas por células-tronco neurais explica a heterogeneidade celular presente na neoplasia, com a criação de um microambiente tumoral diverso, o qual também dificulta a terapia<sup>50,51</sup>.

Novas estratégias são pensadas para que os alvos do tratamento da neoplasia de GBM sejam cada vez mais específicos. Duas correntes básicas têm dividido o alvo dos pesquisadores: o microambiente tumoral ou as células iniciadoras do tumor. O microambiente oferece certas dificuldades de especificidades no tratamento, uma vez que engloba células imunes e de origem mesenquimal, as quais estão presentes em diversas outras regiões do organismo. Já as células iniciadoras de tumor apresentam o entrave de possuírem características específicas de células-tronco do sistema relacionado, mas ainda assim possuem menos barreiras para a busca de um alvo mais certo do que as células do microambiente<sup>52</sup>. Talvez uma terapia conjunta seja a resposta para o futuro, mas a busca para marcadores que diferenciam as neoplasias das outras células normais é a primeira fase para que haja uma eficácia na melhoria de diagnósticos precoces, de tratamentos ou até mesmo da previsão do prognóstico dos pacientes.

## **1.8 Biomarcadores para CTCs**

O conceito de biomarcadores para o tratamento de neoplasias traz consigo uma esperança de uma linha de ação mais eficaz e com menos efeitos colaterais no combate aos tumores<sup>53</sup>. Essa marcação molecular pretende ser específica e pode, ainda, ajudar na

previsão da escolha do manejo da doença, assim como definir melhor o seu estágio de progressão<sup>54</sup>. Na teoria de CTC como as iniciadoras do tumor, os padrões de expressão de marcadores moleculares são procurados e definidos, e idealmente só depois dessa evidência é que se podem começar as devidas produções de fármacos específicos ou métodos mais robustos de diagnósticos e prognósticos<sup>29,55,56</sup>.

Em relação aos gliomas, já foram evidenciados alguns biomarcadores moleculares, mas ainda há muito debate sobre a real certeza que eles trazem<sup>43,53,54</sup>.

O gene *nestin* (gene de CT neuroepitelial) foi descrito em 1990 e expressa uma proteína filamentar intermediária, sendo diminuída quando as células progenitoras neuronais dão origem a neurônios e à células da glia<sup>57,58</sup>. Essa marcação é encontrada em gliomas e sua superexpressão está relacionada com um prognóstico ruim de estagiamento do câncer, sendo superexpressa em gliomas de grau IV, o GBM<sup>59</sup>.

A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é um marcador de maturação de astrócitos e sua expressão foi identificada na zona subventricular em cérebros adultos, mas não em estágios embriogênicos. Dessa forma, esse marcador é evidência não das CTs embrionárias neurais, mas sim de progenitores com algum grau de diferenciação. Além disso, GFAP é detectada em excesso no sangue de pacientes com a neoplasia<sup>41,60,61</sup>.

A glicoproteína CD133, ou prominina-1, está relacionada com a diferenciação celular em células-tronco neuronais e com diversos outros tipos de neoplasias<sup>55,62,63</sup>. Suas funções não foram completamente elucidadas, mas sabe-se que ela torna possível a polarização celular, a diferenciação, a migração e a comunicação intercelular<sup>34</sup>. Em 2003, um estudo mostrou que as células positivas para CD133 em GBM tem a capacidade de formar oncoesferas e iniciar a formação de tumores<sup>64</sup>. Esse marcador também é visto em GBMs recorrentes e agressivos<sup>65-69</sup>. Apesar disso, ainda há um

debate acerca da hierarquia de células-tronco e progenitores que a marcação CD133 é presente, uma vez que foram encontrados casos de que populações CD133 negativas obtiveram sucesso na formação tumoral *in vitro* e *in vivo*<sup>68,70</sup>.

Como não existem marcadores específicos e definitivos de CTCs de GBMs, o tumor de GBM ainda continua a ser muito estudado em busca de novos marcadores moleculares.

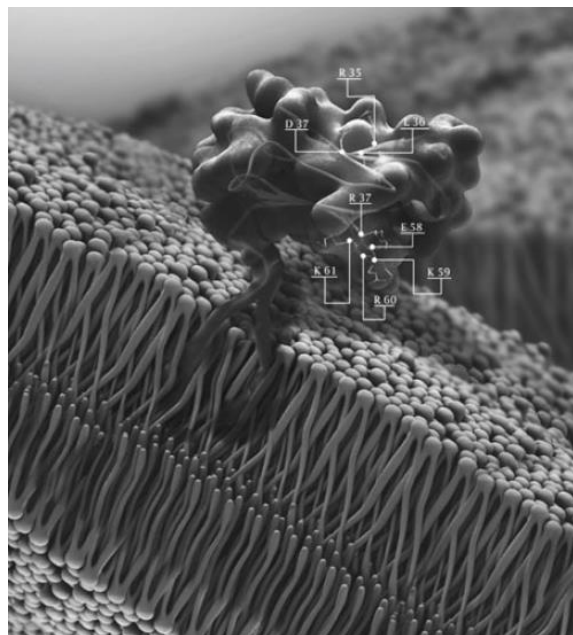
### **1.9 CD90 como um biomarcador para CT de GBM**

A glicoproteína de superfície CD90 (22-37 kDa), ou Thy-1, é uma molécula altamente conservada localizada na parte externa da membrana celular, como demonstrada na Figura 4 . Sua expressão e regulação é específica para alguns tipos celulares, dentre eles células-tronco e células neuronais. Suas funções são variadas: sinalização, adesão, proliferação e modificações morfológicas celulares<sup>71,72</sup>.

Em relação ao SNC, a expressão CD90 está relacionada com reparo de lesões cerebrais e com a extensão de dendritos e axônios em neurônios<sup>73,74</sup>. CD90 está presente majoritariamente em neurônios, mas em alguns estágios precursores de células da glia, como astrócitos. Nos astrócitos, CD90 interage com integrinas e entre ela própria, levando astrócitos maduros a mudarem a estrutura de seu citoesqueleto e garantir mobilidade celular. Dessa forma, a proteína participa do desenvolvimento e da plasticidade neuronal, inibindo a formação de neuritos no desenvolvimento cerebral e garantindo a funcionalidade homeostática dos astrócitos<sup>71</sup>.

Concomitantemente, CD90 é um biomarcador conhecido para diversos tipos de CTCs<sup>40,75,76</sup>. Há diversos estudos relacionando a proteína de membrana com câncer de mama, carcinoma hepatocelular e câncer de ovário<sup>77-79</sup>. Apesar disso, sua expressão

pode indicar um bom prognóstico para pacientes com câncer de ovário, por exemplo, ou um prognóstico ruim para pacientes com neuroblastoma, evidenciando, mais um vez, as características heterogênicas dos diferentes tipos tumorais, como demonstrado na Figura 5<sup>80</sup>. Nessa figura, discutem-se os diferentes papéis que a glicoproteína CD90 poderia desempenhar na progressão tumoral. Ela poderia atuar como supressor de crescimento por interromper o ciclo celular, mas ao mesmo tempo, pode atuar em outros tipos tumorais na promoção tumoral e na formação de metástases.

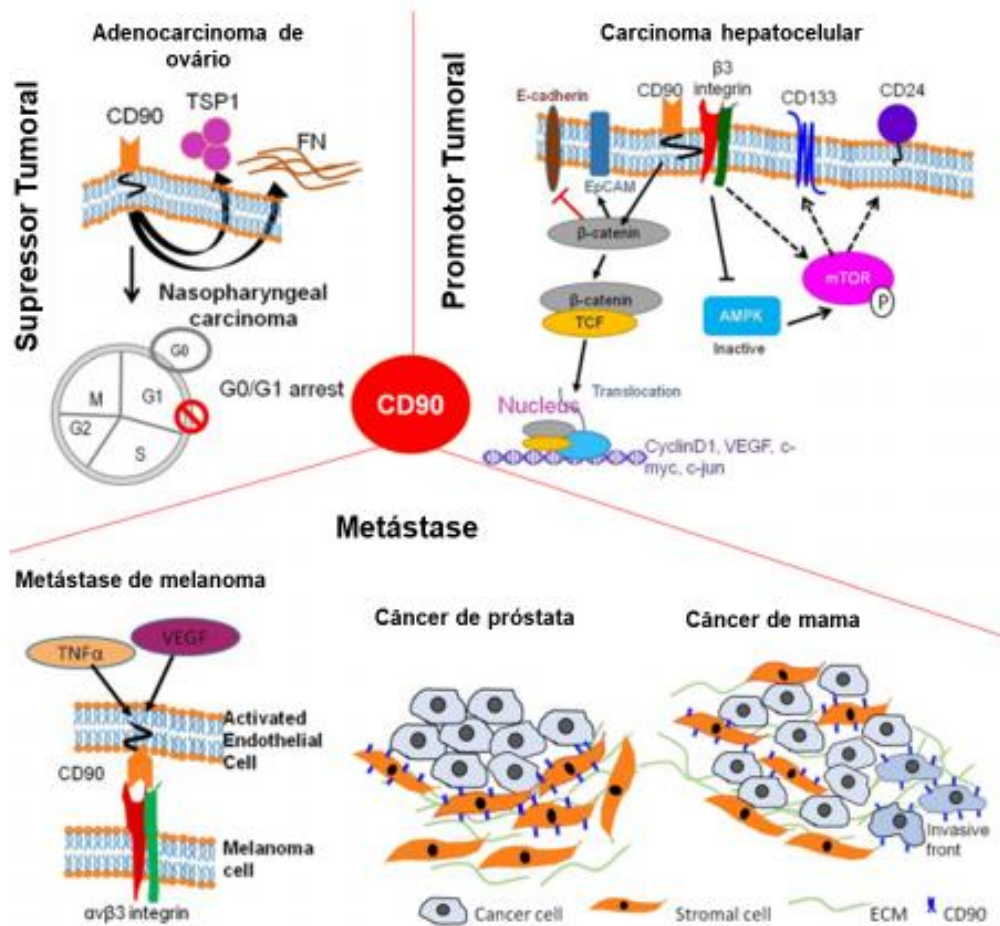


**Figura 4 Modelo 3D da glicoproteína CD90 ancorada na membrana plasmática.** Adaptado de Leyton e Hagood (2014)<sup>71</sup>.

A expressão de CD90 tem sido analisada em GBM e já foi evidenciado que as células CD133 positivas são um subgrupo de células CD90 positivas. Isso demonstra que, pelo caráter dúbio ainda do marcador de CD133, pode ser que CD90 seja um candidato a um marcador mais abrangente e eficiente<sup>72,81</sup>. Alguns estudos já foram feitos relacionando CD90 e GBM, porém a maioria foi realizada em células de linhagem e, enquanto alguns já apontam CD90 como um biomarcador promissor para GBM, outros



ainda discutem essa possibilidade ao avaliar diferentes variáveis<sup>72,81-84</sup>. Apesar disso, já foi percebida a relação entre o aumento de CD90 em casos de gliomas de grau IV<sup>85</sup>.



**Figura 5 CD90 e o câncer.** Os diferentes papéis da glicoproteína CD90 na progressão tumoral. Em adenocarcinoma de ovário e em carcinoma nasofaríngeo, CD90 pode atuar como supressor tumoral, ativando uma cascata de reações para que haja a interrupção do ciclo celular. Ao mesmo tempo, CD90 pode atuar como promotor tumoral em carcinoma hepatocelular através da ativação de vias de sinalização que favorecem a proliferação celular. Por último, CD90 está relacionada também nos casos de metástase de melanoma e de câncer de próstata e de mama, uma vez que permite a interação com integrinas de células epiteliais. Adaptado de Kumar, et al. (2016)

Poucas pesquisas possuem o foco em cultivo primário de GBM. Recentemente, Avril, et al. (2017) analisou a influência da expressão de CD90 *in vivo* e constatou que a expressão de CD90 pode não ser restrita a CTCs no ambiente tumoral, mas sim a

células com algum grau diferenciado nessa massa tumoral. Apesar disso, demonstrou que CD90 influencia na migração e na invasão de GBM. Porém, os modelos *in vitro* do estudo foram realizados com células de linhagem transformadas, também não estabelecendo um modelo *in vitro* com as linhagens primárias<sup>83</sup>. Dessa forma, mais estudos *in vitro* devem ser realizados para o estabelecimento dos protocolos e consistência dos resultados, assim como novos estudos *in vivo* mais abrangentes.

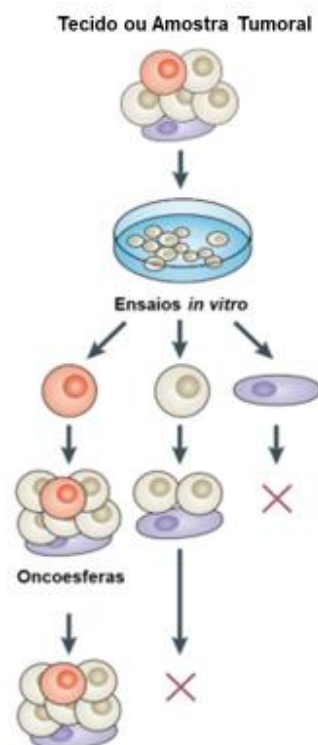
### **1.10 Oncoesferas no estudo *in vitro***

Existem diversos modelos de estudo *in vitro* para estabelecimento do cultivo primário de CTCs. O modelo escolhido por esse trabalho é o da formação de esferas tumorais ou oncoesferas. A formação dessas estruturas esferoide em modelos *in vitro* a partir de amostras cirúrgicas de tumores ou até mesmo de linhagens celulares é uma metodologia já muito utilizada<sup>78,86</sup>. Há também a formação de esferas oriundas de células saudáveis para o isolamento de células-tronco específicas de cada órgão ou tecido, chamadas de esferoides ou especificadamente para seu local de origem, como as formadas por células neuronais, as neuroesferas<sup>87</sup>.

Como já explicitado, as CTCs são as chamadas células iniciadoras tumorais e explicam parte da resistência às terapias apresentada por alguns tumores, como o GBM. A fim de estudar essas células *in vitro*, os modelos esferoides são utilizados para isolamento dessas células ao crescerem em um meio sem soro. Nessas condições as células em cultivo tendem a se aglomerar em esferoides, uma conformação 3D estável<sup>86,88</sup>.

Parte desse processo é demonstrado na Figura 6, na qual apresenta de maneira esquemática a população de uma oncoesfera. Essa população contém CTs, células progenitoras e células diferenciadas. Somente as CTs irão conseguir, nas condições de

cultivo em suspensão, formar e reter estruturas esferoides por um tempo maior em cultivo. Células progenitoras podem até formar esferas, mas não conseguem manter essa estrutura ao longo dos dias em cultivo e nem se multiplicar. Já as células diferenciadas não são capazes da formação dessas estruturas e acabam não se aglomerando no cultivo *in vitro* em suspensão.



**Figura 6 Formação de oncoesferas a partir de amostras cirúrgicas.** São representadas no esquema: células-tronco de câncer (vermelho); células progenitoras (cinza) e células diferenciadas (lilás). Adaptado de Beck e Blanpain (2013)<sup>39</sup>.

No caso do GBM, esse modelo é muito utilizado para a descoberta de alvos terapêuticos em CTCs, citotoxicidade e avaliação de migração e invasão<sup>89</sup>. A organização espacial dessas estruturas é favorecida pelas interações entre as células promovidas por proteínas de adesão celular, como caderinas e integrinas, diferindo do

estudo em células aderidas em uma monocamada<sup>89</sup>. Além disso há a retenção de características do tumor de origem quando utilizadas em estudos de cultivo primário<sup>90</sup>

Ao mesmo tempo, apesar as oncoesferas parecem promissoras para ensaios *in vitro*, elas apresentam algumas limitações. O local do tumor onde a amostra humana cirúrgica foi retirada pode influenciar no número de CTCs, principalmente de tumores heterogêneos como o GBM. Esse fator é limitante, também, uma vez que a amostra é representação de apenas uma parte tumoral, mas os resultados são abrangentes para toda essa massa<sup>86</sup>. Além disso, há uma dificuldade de padronização nos protocolos para a formação dessas estruturas, já que transformações celulares e número de passagens pode influenciar na formação de oncoesferas<sup>91</sup>.

## 2. Justificativa

A descoberta de marcadores de CTCs mostra grande potencial para o desenvolvimento de tratamentos cada vez mais seletivos contra diferentes tipos de câncer. Ao mesmo tempo, existem diversas formas tumorais que ainda não possuem tratamento específico e apresentam grande resistência às terapias existentes. O GBM é agressivo e possui grande resistência e reincidência, além de ser um câncer do SNC comum. Diversos estudos sobre possíveis marcadores celulares de glioblastoma estão sendo realizados, mas pouco se sabe ainda sobre a relação entre CD90 e a morfologia funcional do GBM, principalmente com análises *in vitro* em cultivo primário. Enquanto há evidências da participação da glicoproteína CD90 na migração e formação de GBM, não se sabe a relação da expressão de CD90 com o grau de diferenciação das células componentes do tumor<sup>83,84</sup>. Ao mesmo tempo, não foram encontrados na literatura resultados *in vitro* em quantidade significativa com o uso de células primárias de GBM. O amplo uso de células de linhagem torna difícil a investigação biomolecular de tumores heterogêneos, como o GBM<sup>92,93</sup>.

Assim, a pesquisa oferece uma oportunidade no entendimento da relação entre o marcador CD90 e aspectos morfológicos e biológicos do glioblastoma *in vitro*. Além da investigação em células de linhagem celular, como a U87MG, é importante ressaltar o foco no uso de células primárias para o melhor entendimento do funcionamento tumoral de GBM. Essa linha de pesquisa visa oferecer uma complementariedade às publicações passadas.

## 3. Objetivo

### 3.1 Objetivo Geral

A pesquisa tem como objetivo geral avaliar a ação da glicoproteína CD90 em células primárias de glioblastomas humanos *in vitro* e em células de linhagem U87MG.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer modelo de protocolos com o uso da linhagem celular U87MG.
- Estabelecer cultura primária a partir de amostras cirúrgicas de GBMs humanos.
- Analisar a expressão de CD90 nas células primárias.
- Analisar, *in vitro*, o efeito da ablação de CD90 em células primárias oriundas de GBMs:
  - na formação de oncoesferas
  - na proliferação celular
  - na capacidade de migração celular

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Delineamento experimental

O estabelecimento dos delineamentos experimentais a seguir proporcionaram a realização da pesquisa e o cumprimento dos objetivos específicos do trabalho.

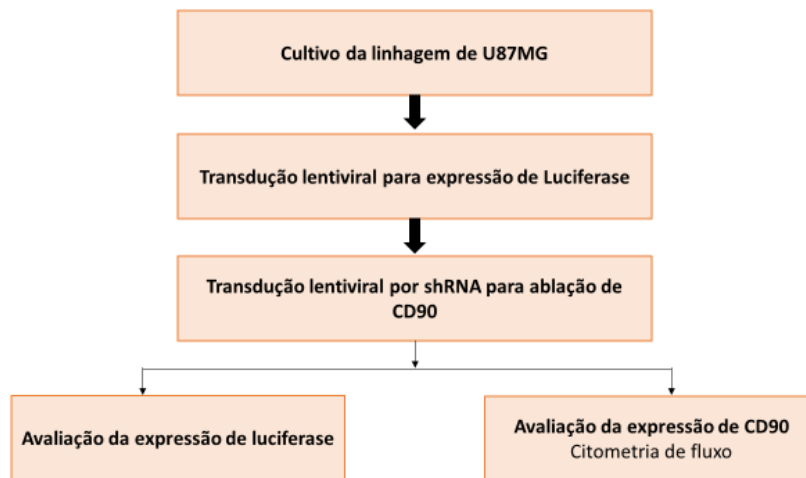


Figura 7 Delineamento experimental do estabelecimento de protocolos a partir do cultivo de U87MG.

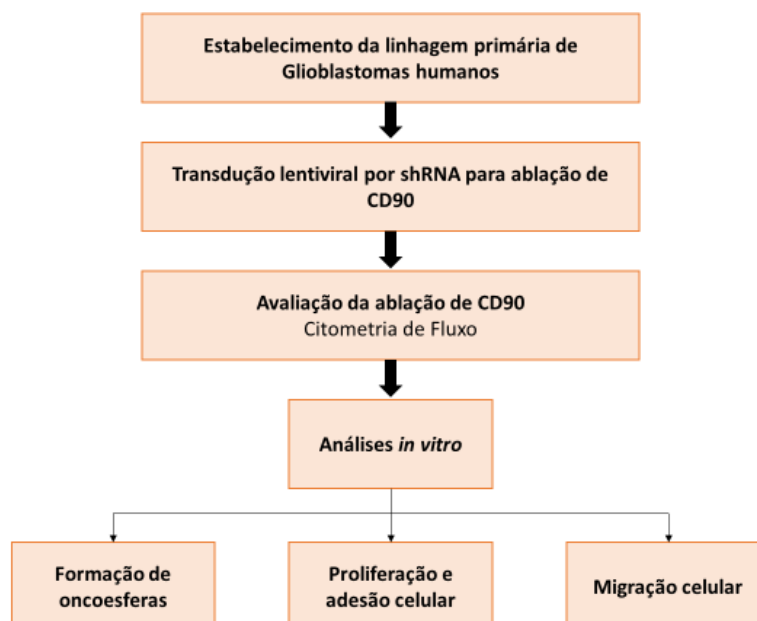


Figura 8 Delineamento experimental a partir do cultivo de células primárias de GBM

## **4.2 Cultivo de células de linhagem U87MG**

A linhagem de células U87MG foi doada pelo laboratório do Prof. Dr. Ricardo Titze da Universidade de Brasília. A linhagem celular é de origem de um astrocitoma humano (glioblastoma) amplamente utilizado no meio acadêmico para pesquisas sobre GBM. O cultivo das células da linhagem U87MG foi feito com meio de cultivo 50% Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose (DMEM) (*Gibco*, EUA) e 50% F12 (*Gibco*, EUA), suplementado com 1% de antibiótico (v/v) (Penicilina – Streptomicina, *Gibco*, EUA) e 10% de soro fetal bovino (v/v) (*Gibco*, EUA). As células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> e 25 cm<sup>2</sup> e mantidas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> em uma estufa umidificada (*Thermo Scientific*, EUA) com trocas periódicas do meio.

## **4.3 Estabelecimento da linhagem celular primária de glioblastomas (GLIO)**

O estabelecimento da cultura celular primária foi feito por meio de amostras tumorais de neurocirurgias realizadas no Hospital São Paulo e Hospital de Base de Brasília de acordo com a assinatura do consentimento livre e esclarecido dos métodos por parte dos pacientes. As amostras foram colocadas em um tubo de coleta de 50mL contendo PBS-1X (Tampão fosfato salino, *Life*, EUA) e transportadas no gelo para a Universidade de Brasília. Para a extração das células, os tumores foram colocados em uma placa de Petri estéril no fluxo laminar próprio para o cultivo de células. Após três lavagens com PBS (1X) para a retirada do sangue, houve uma quarta lavagem com meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low Glucose (DMEM-LG) (*Life*, EUA) sem soro e com 1% de antibiótico (v/v) (Penicilina – Streptomicina, *Life*, EUA). Em seguida, as amostras foram dissecadas em pedaços de aproximadamente 1mm de diâmetro e transferidas para um tubo de centrifugação de 15mL com adição de tripsina



(Tripsina 0,25%, *Gibco*, EUA), enzima que hidrolisa as ligações peptídicas, com meio de cultivo DMEM-LG em uma razão de 3:1 por 30 minutos e gentilmente agitada em intervalos de 5 minutos. Em sequência, houve a realização de três centrifugações por 5 minutos a 1341 g com o descarte do sobrenadante e ressuspensão da amostra em 4mL de DMEM-LG suplementado com 1% de antibiótico e 10% de soro fetal bovino. As células dissociadas e as frações tumorais foram colocadas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> e mantidas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> com mudanças periódicas do meio.



**Figura 9** Garrafas de cultivo após processamento de amostras cirúrgicas.

#### **4.4 Passagem celular**

Tanto a linhagem U87MG quanto as células GLIO de cultivo primário tiveram seu crescimento analisado por meio de microscopia ótica. Quando atingiram cerca de 70% de confluência nas garrafas de cultivo, a passagem celular era realizada através da tripsinização celular. Descartou-se, primeiramente, o meio de cultivo da garrafa e foram adicionados 4mL na garrafa de 25 cm<sup>2</sup> ou 6mL na garrafa de 75 cm<sup>2</sup> de tripsina (Tripsina 0,25%, *Life*, EUA). Então, a garrafa foi incubada na estufa de cultivo celular por um período de 5 a 10 minutos à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Assim que acabava o tempo, as células eram observadas em microscopia de luz a fim de observar o desprendimento celular da

superfície da garrafa, uma vez que a tripsina irá agir no rompimento de ligações peptídicas de adesão celular. A seguir, foram adicionados de 4mL a 6mL de meio cultivo completo próprio para cada tipo celular e o volume completo era colocado em um tubo tipo Falcon de 15mL para centrifugação por 5 minutos a 1341 g em temperatura ambiente. O sobrenadante era descartado e o *pellet* presente era ressuspendido em 1mL de meio de cultivo. 10 µL eram recolhidos da suspensão e colocados em um microtubo de 1mL. Assim, era realizada a diluição desse volume com 10 µL de Azul de Tripán (0,4 %), para contagem celular.

#### **4.5 Contagem de células e passagem celular**

A contagem de células foi realizada em uma câmara de Neubauer. Foi coletado 10 µL da diluição estabelecida na metodologia descrita acima e depositado na câmara para análise em um microscópio de luz invertido. O cálculo a seguir foi realizado para a obtenção do número de células presente na suspensão de 1mL descrita anteriormente.

$$\text{Número de células/mL} = \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Número de quadrantes contados}} \times \text{Fator de diluição} \times 10^4$$

Após o estabelecimento do número de células presente, a quantidade desejada era passada para uma outra garrafa de cultivo ou era semeada em placas de cultivo de 12 ou 24 poços conforme o número de células desejado.

#### **4.6 Marcação das células de linhagem U87MG com luciferase e Green Fluorescent Protein (GFP) por lentivírus**

Houve a troca periódica do meio de cultivo das células U87MG em cultivo (garrafas de 75 cm<sup>2</sup>). Após a troca do meio, foram adicionados 100 µL de lentivírus Lp-hLUC-Lv201-020-GFP com Polibreno concentrado 1000X (*Sigma-Aldrich*, Santa Cruz

Biotechnology), na concentração de 1 $\mu$ L/mL de meio. Após 48 horas, houve a troca do meio com Puromicina (concentrada a 5 $\mu$ g/mL; *Sigma-Aldrich*, Santa Cruz Biotechnology) em concentração de 1,0  $\mu$ g/mL para as células de U87MG. O meio com puromicina foi mantido por uma semana com trocas periódicas e substituído, então, pelo meio de cultivo sem a adição de puromicina.

#### **4.7 Ablação de CD90 com partículas lentivirais das células U87MG-LUC e das células primárias de glioblastomas humanos**

Para a transdução lentiviral, as células de linhagem U87MG-LUC (marcadas com luciferase e GFP) foram cultivadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> em meio completo a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Quando as células atingiram 70% de confluência, a transdução foi realizada em presença de 1 $\mu$ L/mL de meio de Polibreno 1000X, de acordo com as instruções do fabricante (Santa Cruz Biotechnology) com 5 $\mu$ L de partículas lentivirais ShRNA-CD90 ou 1 $\mu$ L/mL de Polibreno com 10 $\mu$ L de lentivírus shRNA controle (sequência aleatória de shRNA, scrambled shRNA). As partículas lentivirais expressando shRNA CD90 ou expressando sequências aleatórias de shRNA controle foram adicionadas nos frascos de cultura com a multiplicidade de infecção (MOI) de 10. Todos os lentivírus foram obtidos pelo laboratório Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, INC) e o meio foi trocado após 48h. Dois dias após a transdução, clones estáveis de U87MG expressando shRNA CD90 e shRNA controle foram selecionados utilizando Puromicina (concentrada a 5 $\mu$ g/mL) em concentração de 1,0  $\mu$ g/mL para as células de U87MG por 10 dias com troca periódica do meio. Após esse tempo, o meio foi trocado por DMEM/F12 sem a adição de puromicina.

O mesmo processo foi repetido com cada amostra de células de glioblastoma humanos (GLIO) havendo, então, duas populações de células GLIO WT (controle) e

GLIO shCD90 (ablação de CD90). A seleção com a Puromicina (concentrada a 5µg/mL) foi feita na concentração de 0,4 µg/mL por 10 dias, com trocas periódicas do meio.

#### **4.8 Purificação das células U87MG-LUC com *microbeads* de CD90**

As células U87MG-LUC cultivadas em garrafas de cultura T-75 foram dissociadas por 5mL de tripsina durante 5 minutos à 37°C. Em seguida foi adicionado meio de cultivo celular DMEM/F12 completo para inibição da tripsina e a solução transferida para um tubo de centrifugação de 15mL. As células foram marcadas com anticorpos CD90 conjugados com partículas magnéticas e selecionadas por afinidade magnética à coluna de purificação de acordo com o protocolo do fabricante da coluna selecionada (*Miltenyl Biotec*). Em seguida, as células foram divididas em duas populações: U87MG-LUC-CD90+ (positivas para CD90) e U87MG-LUC-CD90- (negativas para CD90) de acordo com a afinidade da coluna. As duas populações foram cultivadas separadamente em garrafas T-75 a 37°C com trocas de meio e com passagens periódicas.

#### **4.9 Análise da expressão de CD90 por citometria de fluxo nas células de U87MG e de GLIO e MSC**

Os anticorpos monoclonais para a citometria de fluxo foram usados de acordo com as instruções do fabricante. Foi feito o subcultivo das células de U87MG-LUC com ablação de CD90 (U87MG-LUC-CD90-), das células U87MG-LUC controle com expressão normal da glicoproteína (U87MG-LUC-CD90+) e das células-tronco mesenquimais descongeladas e cultivadas por 4 semanas em meio DMEM. As células foram desaderidas com tripsina e centrifugadas por 5 min a 1000 rpm. O sobrenadante foi

descartado e cada grupo de célula foi ressuspensão em 400µL de meio DMEM/F12 e distribuído em quatro tubos de 1mL, totalizando oito tubos com 100µL de células. Foram utilizados nos respectivos grupos celulares dois tipos de anticorpos: 5µL do anticorpo CD90-FITC (*Biosciences*) e 5µL do controle Mouse IgG1-FITC (*Biosciences*). Após a incubação por 30 minutos no escuro a 37°C e adicionados 500µL de meio em cada tubo. Duas lavagens foram feitas com PBS e as células foram então ressuspensas em 300µL de PBS por tubo e analisadas em um citômetro de fluxo (*CyFlowSpace-Partec*, Germany; FACSVERSEBD ou FACSARIA-BD, os dois da BD Biosciences) e a análise dos dados foi feita pelo software FlowJo (*TreeStar*). Para estabelecer um controle positivo da expressão de CD90, assim como a eficácia do protocolo, células mesenquimais foram submetidas ao mesmo protocolo. Essa análise foi realizada em duplicatas.

#### **4.10 Análise da expressão de CD90 por citometria de fluxo nas células de GLIO1 e GLIO2**

As células dos grupos GLIO1 WT, GLIO1 shCD90, GLIO2 WT e GLIO2 shCD90 foram desaderidas com tripsina e centrifugadas por 5 min a 200g. O sobrenadante foi descartado e cada grupo de célula foi ressuspensão em 400µL de meio DMEM-LG e distribuído em quatro tubos de 1mL. Foram utilizados nos respectivos grupos celulares dois tipos de anticorpos: 5µL do anticorpo CD90-PE-Cy7-A (*BD Pharmingen*, San Diego, CA, USA) e 5µL do controle Mouse IgG1-PE-Cy7-A (*BD Pharmingen*, San Diego, CA, USA) Após a incubação por 30 minutos no escuro a 37°C e adicionados 500µL de meio em cada tubo. Duas lavagens foram feitas com PBS e as células foram então ressuspensas em 300µL de PBS por tubo e analisadas em um citômetro de fluxo (FACSARIA-BD, *BD Biosciences*) e a análise dos dados foi feita pelo software FlowJo (*TreeStar*).

#### **4.11 Análise da fluorescência das células U87MG**

A fim de comprovar a eficiência do protocolo de transdução por lentivírus contendo o gene da luciferase (Lp-hLUC-Lv201-020-GFP),  $3 \times 10^5$  células de U87MG-LUC e de U87MG (controle) foram semeadas em uma placa de 12 poços com meio DMEM/F12, mantidas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> e acompanhadas diariamente até atingirem 80% de confluência. Nesse momento foi adicionado 10µL de luciferina para que houvesse a reação de transformação de luciferina em oxiluciferina e luz. A análise da fluorescência foi realizada no IVIS® Lumina XR, durante 6 minutos.

#### **4.12 Cultura de oncoesferas derivadas de GLIO**

As amostras celulares GLIO WT e GLIO shCD90 para CD90 obtidos pela cultura primária de glioblastomas humanos de cada amostra foram desaderidos de garrafas de cultivo celular T-25 com 5mL de Tripsina por 5 minutos a 37°C e centrifugados em tubos de 15mL por 5 minutos a 200g. As células foram ressuspensas em meio para oncoesferas (DMEM/F12, sem soro fetal bovino, com suplementação de N-2 (1X), (*Gibco*, EUA) fator de crescimento epidermal (20ng/mL) (*Gibco*, EUA), fator de crescimento de fibroblasto (20ng/mL) (*Gibco*, EUA) e B-27 (1:50) (*Gibco*, EUA)). A contagem celular foi feita utilizando o azul de Trypan e câmara de Neubauer. Placas de 24 poços de baixa aderência foram utilizadas para o plaqueamento de  $2 \times 10^4$  células por poço. O experimento foi feito em quadruplicata para cada tipo celular e repetido em três experimentos independentes. As células foram mantidas com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e se obteve a análise do diâmetro e contagem das oncoesferas maiores que 100µm no terceiro e sétimo dia de cultivo através do microscópio invertido de fase EVOS FL Cell Imaging System.

#### **4.13 Análise da expressão de CD90 por citometria de fluxo nas oncoesferas de GLIO2**

As oncoesferas derivadas dos grupos GLIO2 WT e GLIO2 shCD90 foram centrifugadas por 6 minutos a 200g. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1,5mL de Accutase por 30 minutos a 37°C em tubos de 15mL tipo Falcon. Então, elas foram centrifugadas por 10 minutos a 200g, o sobrenadante foi descartado e cada grupo de célula foi ressuspensado em 400µL de PBS e distribuído em quatro tubos de 1mL. Foram utilizados nos respectivos grupos celulares dois tipos de anticorpos: 5µL do anticorpo CD90-FITC (*Biosciences*) e 5µL do controle Mouse IgG1-FITC (*Biosciences*). Após a incubação por 30 minutos no escuro a 37°C e adicionados 500µL de meio em cada tubo. Duas lavagens foram feitas com PBS e as células foram então ressuspensas em 300µL de PBS por tubo e analisadas em um citômetro de fluxo (FACSARIA-BD, *BD Biosciences*) e a análise dos dados foi feita pelo software FlowJo (*TreeStar*).

#### **4.14 Cultivo de subesferas de células GLIO**

Ao atingirem uma semana de cultivo, as oncoesferas foram coletadas da placa e colocadas em um tubo de 15mL para centrifugação durante 5 minutos a 200g. O meio foi descartado e as células ressuspensas em 2,5mL de StemPro Accutase (*Thermo-Fisher Scientific*) e colocadas no banho-maria 37°C por 20 minutos. Então, houve a centrifugação das amostras por 5 minutos a 200g e a ressuspensão em meio para oncoesferas especificado na metodologia anterior. A contagem das células foi realizada e  $3 \times 10^3$  células foram plaqueadas em placas de 24 poços com baixa aderência celular. O experimento foi realizado em triplicatas para cada tipo celular e repetido ao menos duas vezes para cada amostra. As células foram mantidas com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e se

obteve a análise no número de oncoesferas maiores que 100µm no terceiro e sétimo dia de cultivo.

#### **4.15 Ensaio de migração *in vitro***

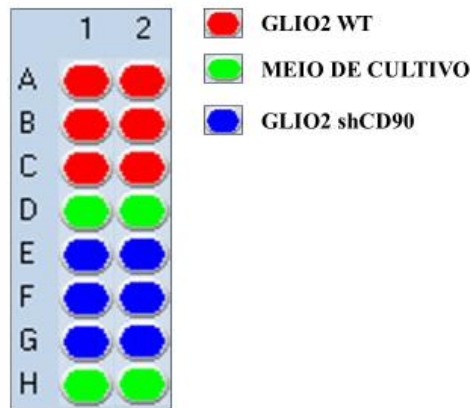
Células de GLIO2 WT e GLIO2 shCD90 foram tripsinizadas, semeadas em placas de 12 poços e mantidas em uma estufa para cultivo celular a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem a confluência. Assim que foi constatada a confluência, o meio de cultivo foi retirado e o *scratch*, risco em linha reta na região mediada do poço, foi realizado com a ponta de uma ponteira para pipeta de 200µL, ocasionando uma ruptura na adesão celular nesse espaço. Houve a lavagem com PBS para retirar possíveis debridis e houve a adição do meio de cultivo DMEM suplementado com 1% de antibiótico (v/v) e 10% de FBS (v/v). Fotos da 0h e da 24h foram obtidas através da microscopia invertida de fase pelo EVOS FL Cell Imaging System através da criação de pontos de referência nas placas para que as imagens fossem da mesma área correspondente<sup>94</sup>. A área livre das células foi analisada pelo software ImageJ (*National Institute of Health*) com a utilização do macro *Wound Healing Tool*.

#### **4.16 Análise de adesão celular a partir do método de análise celular em tempo real (RTCA)**

Medição da impedância celular detectada pelo sistema xCELLigence (*Roche*, San Diego, CA, USA) de acordo com as informações do fabricante. Houve a obtenção dos dados de impedância elétrica através de eletrodos de ouro no fundo de placas de 16 poços (E-Plate). As células GLIO2 WT e GLIO2 shCD90 foram plaqueadas em três concentrações diferentes:  $2 \times 10^4$  (20K),  $1 \times 10^4$  (10K) e  $5 \times 10^3$  (5K) em três experimentos independentes e sempre em triplicatas, conforme a demonstração da Figura 10. A



detecção do valor do índice celular (CI) foi obtido através do xCELLigence software (versão 1.2.1). Dessa forma, foi possível a análise da proliferação das células primárias GLIO2. A medição da impedância foi realizada a cada 30 minutos durante 94 horas ou 243 horas.



**Figura 10 Modelo para plaqueamento das células GLIO2 para a análise de RTCA.** As células GLIO2 WT (vermelho) e GLIO2 shCD90 (azul) foram plaqueadas em triplicata em diferentes concentrações (20K, 10K ou 5K) em experimentos independentes. Meio de cultivo (verde) foi adicionado em quatro poços após um grupo celular para estabelecimento do controle experimental.

#### 4.17 Análises Estatísticas

As análises estatísticas dos resultados apresentados foram obtidas com o uso do software GraphPad Prism® 6.0. O intervalo de confiança estabelecido foi de no padrão de 95% ( $p < 0,05$ ). Foi utilizado teste T Student com correção de Welch. No caso da estatística para análise dos dados da citometria de fluxo, foi utilizado o sistema próprio do FlowJo 10, com análise estatística pelo teste T Student.

## **5. Resultados**

### **5.1 Expressão de luciferase em células U87MG**

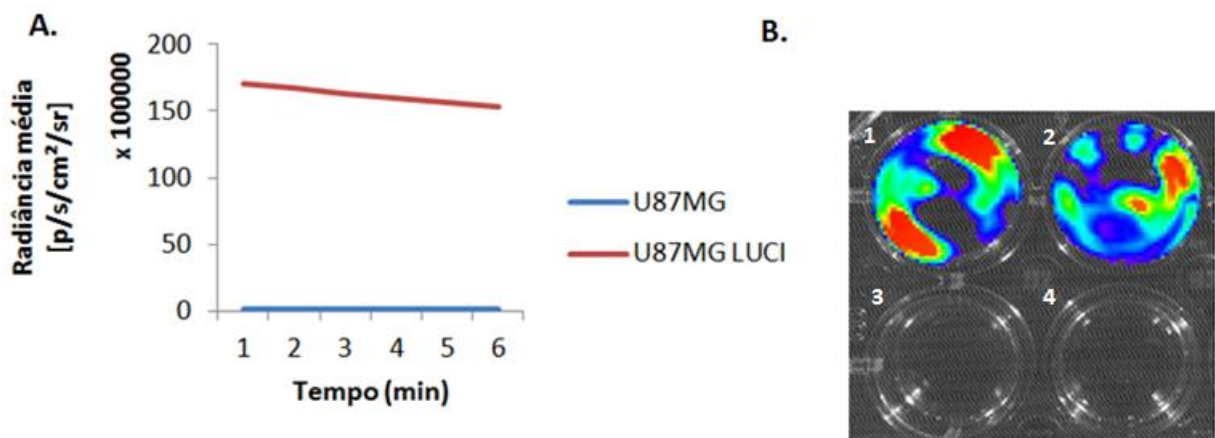
As células de linhagem U87MG são utilizadas para diversos estudos de glioblastomas humanos e foram escolhidas para teste metodológico e padronização de protocolos<sup>95,96</sup>. Após a transdução por lentivírus para a expressão de luciferase em U87MG (U87MG-LUC), foi realizado o teste de luminescência e a quantificação da radiância média com o plaqueamento em duplicatas de  $3 \times 10^5$  células U87MG controle (U87MG WT) e U87MG-LUC observado no equipamento IVIS-LUMINA, como demonstra a Figura 11. Dessa forma, pode-se perceber que a transdução foi realizada com sucesso, pois a expressão de luciferase foi detectada somente nos poços com células transduzidas, além da radiância média ter sido significativamente maior nas células transduzidas em relação ao controle.

### **5.2 Análise por citometria de fluxo da expressão de CD90 em células U87MG**

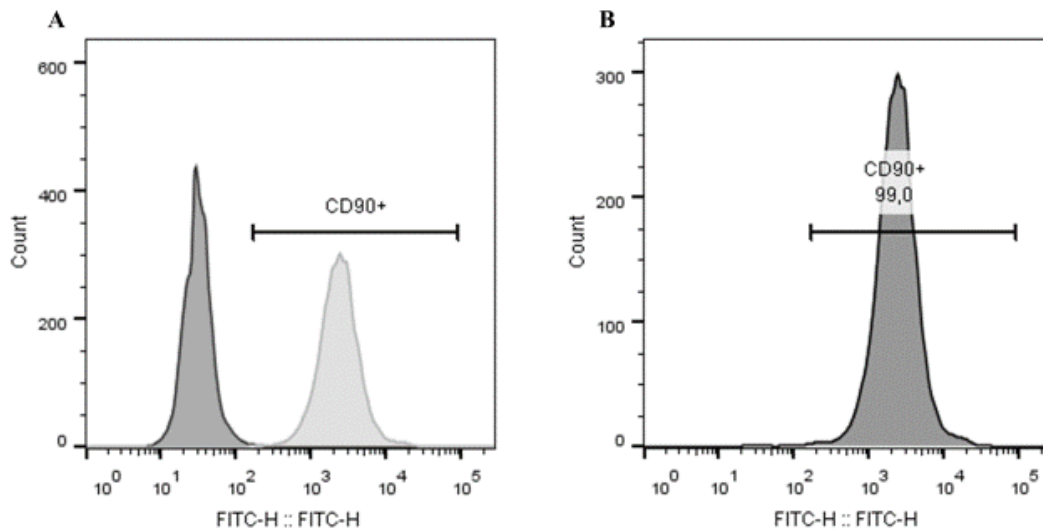
Foi realizado o procedimento de citometria de fluxo para a análise da expressão de CD90 nas células U87MG com a finalidade de prever a possibilidade do uso dessas como um modelo para pesquisa<sup>81,97</sup>. Após a transdução por lentivírus para a expressão de luciferase, foi realizada a ablação de CD90 nessas células transformadas. Ao atingirem 70% de confluência nas garrafas de cultura, as células de U87MG transduzidas e do grupo controle passaram por uma seleção magnética a fim de separar as duas populações de U87MG: U87MG-LUC-CD90+ (positivas para CD90) e U87MG-LUC-CD90- (com ablação de CD90). Dessa forma, foi realizada a análise da expressão de CD90 em células mesenquimais a fim de comprovar a eficácia do

protocolo, uma vez que elas possuem elevada expressão de CD90 já confirmada na literatura (Figura 12)<sup>98,99</sup>. Em conjunto, houve, então, a realização da citometria de fluxo para a expressão de CD90 no grupo de células U87MG WT (controle selvagem), e no grupo de células com ablação de CD90, U87MG-LUC-CD90-, representada na Figura 13.

A Figura 12 permite comprovar a eficácia do protocolo de citometria de fluxo e as marcações corretas e esperadas por células-tronco mesenquimais em relação ao padrão de expressão de CD90. Dessa forma, ao seguir os experimentos com as células de linhagem U87MG, percebe-se que a expressão de CD90 nas células controle (U87MG-WT) é aproximadamente 6% em relação à população analisada. Células U87MG-LUC-CD90- apresentam certa fluorescência em relação à leitura do FITC percebida no segundo pico, uma vez que o vetor de transdução para luciferase possuía GFP, o qual é detectado em um comprimento de onda parecido com a do FITC, aproximadamente 500nm. Então, o terceiro pico apresentado na Figura 13 apresenta a positividade de 5,06% para células CD90.



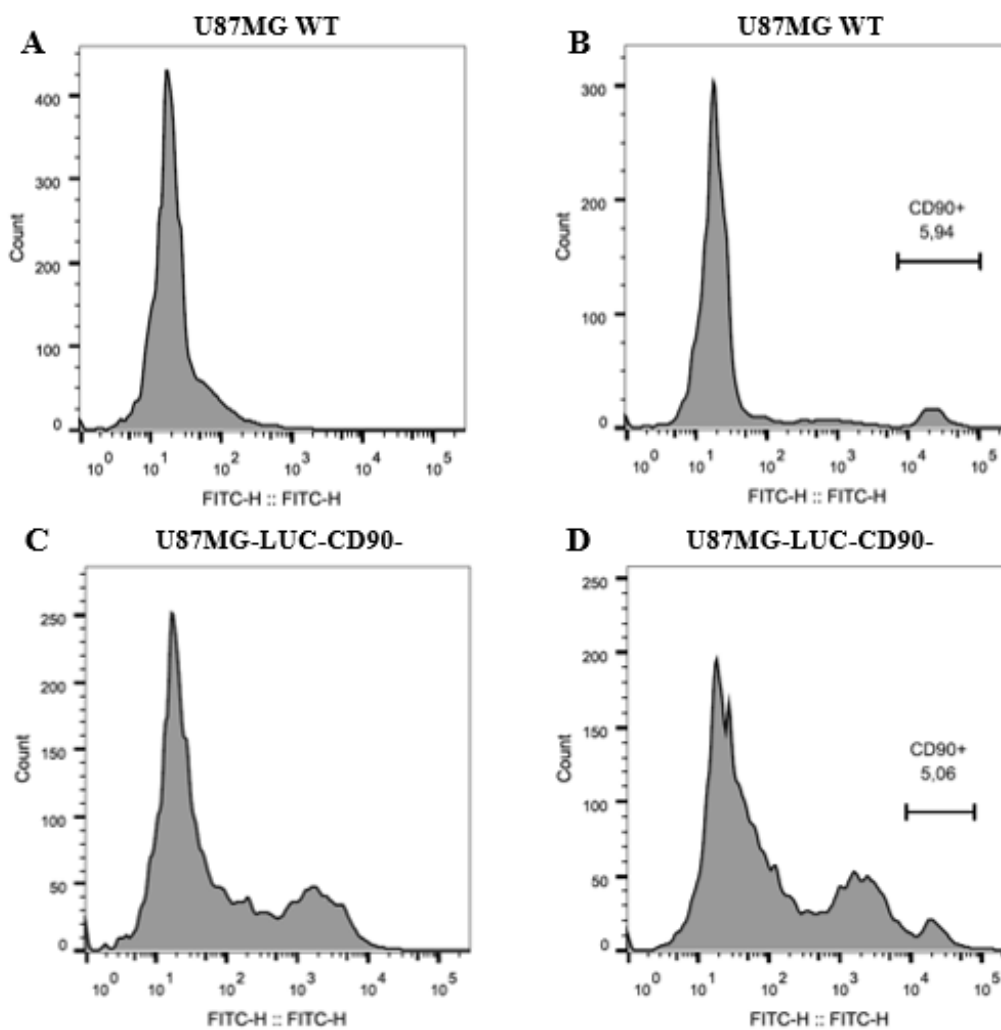
**Figura 11. Expressão de luciferase em U87MG no IVIS LUMINA.** A. Radiância média da expressão de luciferase calculada pelo equipamento IVIS LUMINA, após a administração de luciferina, durante o período de 6 minutos. B. Foto obtida da luminescência da luciferase nas células U87MG após administração de luciferina em duplicatas, sendo o poço 1 e 2,  $3 \times 10^5$  células U87MG transduzidas e o poço 3 e 4,  $3 \times 10^5$  células U87MG sem marcação (grupo controle).



**Figura 12 Análise por citometria de fluxo da expressão de CD90 em células-tronco mesenquimais.** Dados da citometria referentes à expressão de CD90 em células mesenquimais. Em (A) há a ilustração do grupo controle isotípico (cinza escuro) e o grupo para marcação anti-CD90 FITC (cinza claro). Em (B) a porcentagem de células positivas para CD90 (CD90+) com a marcação em FITC.

Assim, mesmo depois da ablação de CD90, não houve diferença notável na porcentagem da população positiva para CD90 nas células U87MG-LUC. Além disso, já na população U87MG WT não houve expressão significativa da proteína de interesse para que houvesse uma investigação e seguimento da pesquisa com o uso da célula de linhagem U87MG, estabelecendo a impossibilidade do uso das células de U87MG como modelo de padronização, corroborando com um dos estudos encontrados<sup>83</sup>. Importante perceber que o formato dos picos na Figura 13A e 13C garante uma estabilidade celular e morfológica mesmo após a transdução.

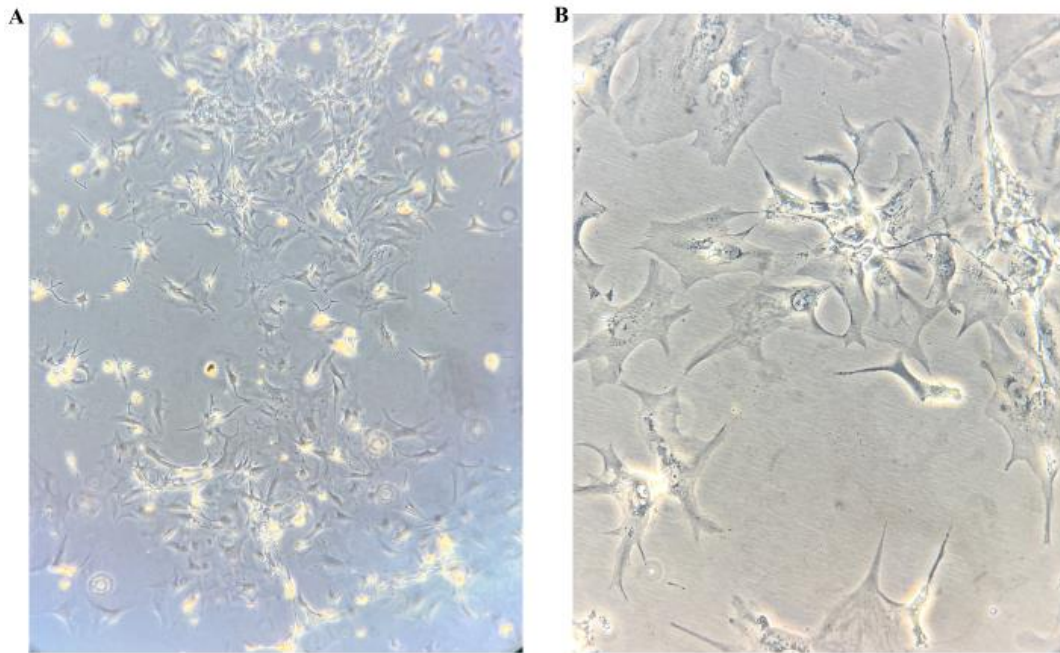
Com esses resultados, houve o seguimento da investigação na expressão de CD90 em células primárias de glioblastoma humano.



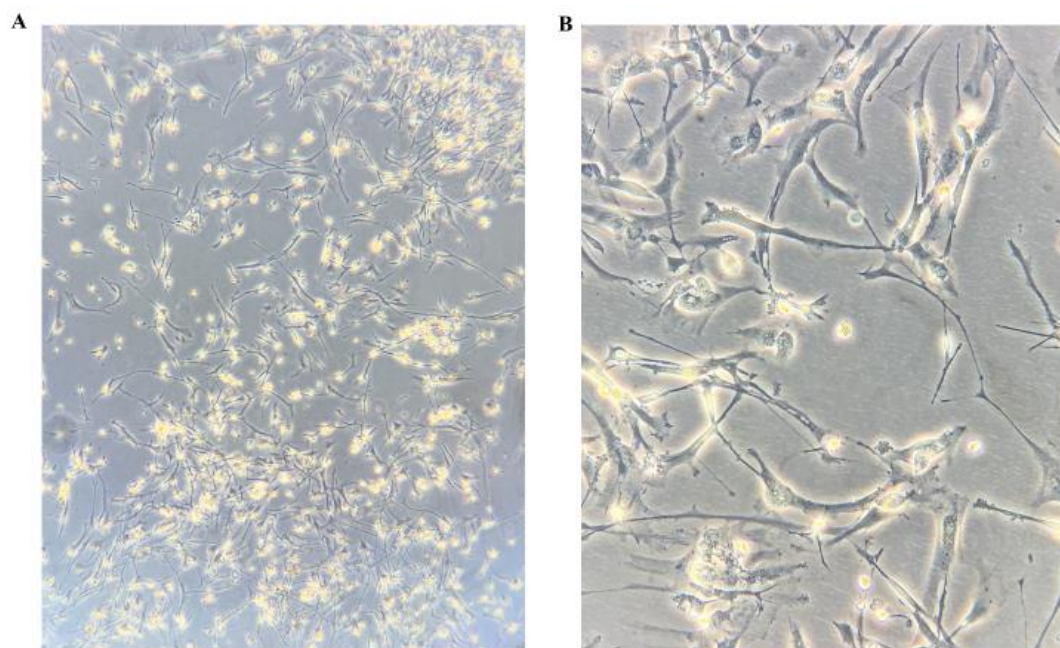
**Figura 13** Análise por citometria de fluxo da expressão de CD90 em U87MG WT e U87MG-LUC-CD90-. Histogramas da expressão do anticorpo controle isotópico nas células U87MG WT (A) e U87MG-LUC-CD90- (C) e da expressão do anticorpo anti-CD90-FITC nas células U87MG WT (B) e U87MG-LUC-CD90- (D).

### 5.3 Estabelecimento da cultura primária de glioblastomas (GLIO)

As amostras tumorais fornecidas pelo Hospital de Base do Distrito Federal e pelo Hospital São Paulo passaram pelo processamento para obtenção das células de cultivo aderentes. Após a realização desse protocolo, foram obtidas culturas primárias com 60% a 70% de confluência após 30 a 40 dias do processamento inicial.



**Figura 14 Células primárias de GLIO1.** Morfologia das células de GLIO1 obtidas através do microscópio óptico Leica, sendo em (A) com aumento de 100X e em (B) com aumento de 400X.



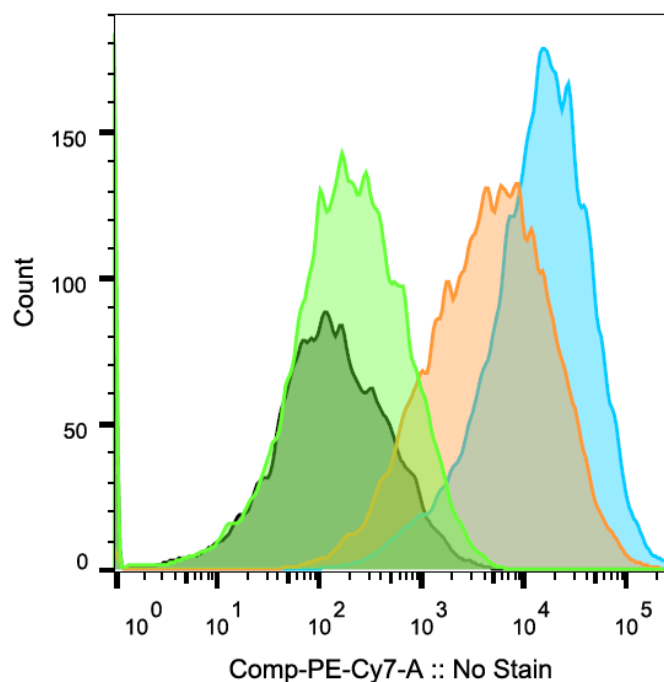
**Figura 15 Células primárias de GLIO2.** Morfologia das células de GLIO2 obtidas através do microscópio óptico Leica, sendo em (A) com aumento de 100X e em (B) com aumento de 400X.

Dessa forma, dois tumores tiveram suas células estabelecidas em cultivo primário: GLIO1 e GLIO2, conforme a Figura 14 e a Figura 15, respectivamente. A morfologia celular é típica de astrócitos, confirmando a origem tumoral de astrocitoma. A confirmação citopatológica foi feita pelas instituições as quais forneceram as amostras tumorais.

#### **5.4 Análise em citometria de fluxo da expressão de CD90 em células primárias de glioblastoma**

Células isoladas de glioblastomas humanos e que tiveram sua expressão de CD90 reduzida através da transdução lentiviral foram analisadas por citometria de fluxo. Como demonstrado na Figura 16, foi analisada a expressão de CD90 da segunda amostra tumoral isolada (GLIO2). O grupo controle GLIO2 WT, o grupo com a ablação de CD90 (GLIO2 shCD90) foram submetidos à marcação e à citometria. A expressão de CD90 na amostra tumoral é evidente no deslocamento dos picos de GLIO2 WT e GLIO2 shCD90 para a direita, quando analisada a fluorescência para a expressão de CD90. Da mesma forma, percebe-se menos intensidade na expressão de CD90 em células que sofreram a ablação (laranja), quando comparadas com o controle (azul).

A fim de quantificar a expressão de CD90 e comparar as intensidades medianas de fluorescência (MFI), houve a medição estatística da mediana de fluorescência em todos os grupos celulares analisados, utilizando o software FlowJo (LLC), com os dados apresentados na Tabela 3.



**Figura 16 Histograma da expressão de CD90 em GLIO2.** Controle isotópico em GLIO2 WT (preto) e GLIO2 shCD90 (verde). Expressão de CD90 por meio do anti-CD90-PE-Cy7-A nos grupos celulares GLIO2 WT (azul) e GLIO2 shCD90 (laranja).

**Tabela 3 Valores de intensidade mediana de fluorescência de GLIO1 e GLIO2.** Dados relativos à fluorescência mediana de CD90 nos tumores GLIO1 e GLIO2 nos grupos controle (WT) e com ablação de CD90. Os valores foram obtidos através do software FlowJo, do qual foram subtraídas as intensidades dos controles isotópicos das intensidades com anti-CD90-PE-Cy7-A (Anexo 1). Houve então a expressão da eficiência (%) da ablação (*knockdown* -KD) de CD90 nos tumores.

Amostra Tumoral	WT	shCD90	shCD90/WT	KD eficiência	KD eficiência (%)
GLIO1	568	325	0,572	0,428	42,78
GLIO2	14622	4591	0,314	0,686	68,60

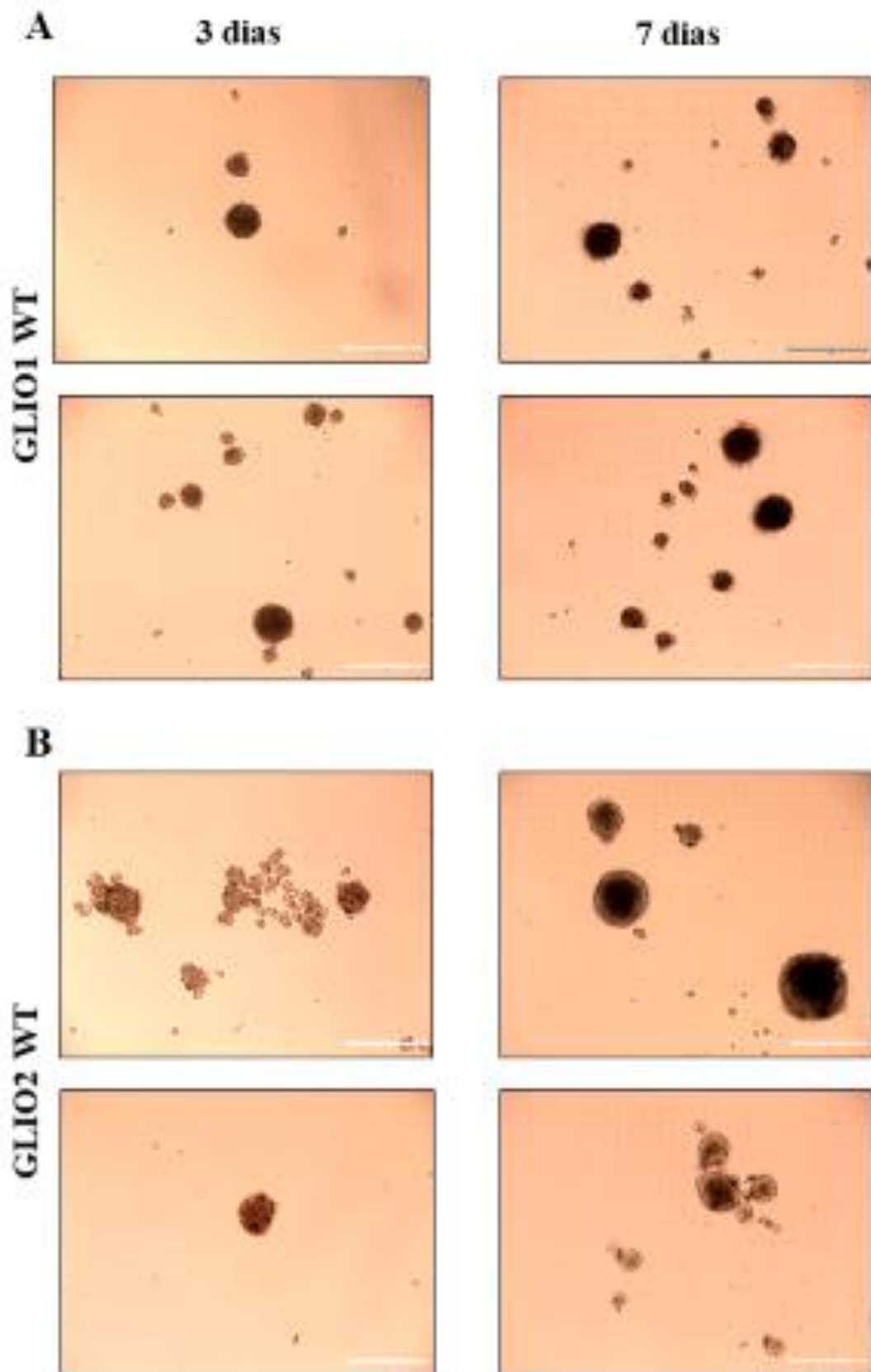


Ao analisar os dados quantitativos relativos à citometria de fluxo, conclui-se que houve a ablação significativa de CD90 nos grupos celulares GLIO1 shCD90 e GLIO2 shCD90 de acordo com seus respectivos controles. No caso de GLIO1 houve a depleção de 42,78% e em GLIO2 de 68,60%. A intensidade mediana do sinal de fluorescência pode ser traduzida em números de receptores de CD90 ativados pelo anticorpo. Dessa forma, houve de fato a diminuição do número de receptores de CD90 nos grupos GLIO shCD90 tanto do primeiro quanto do segundo tumor.

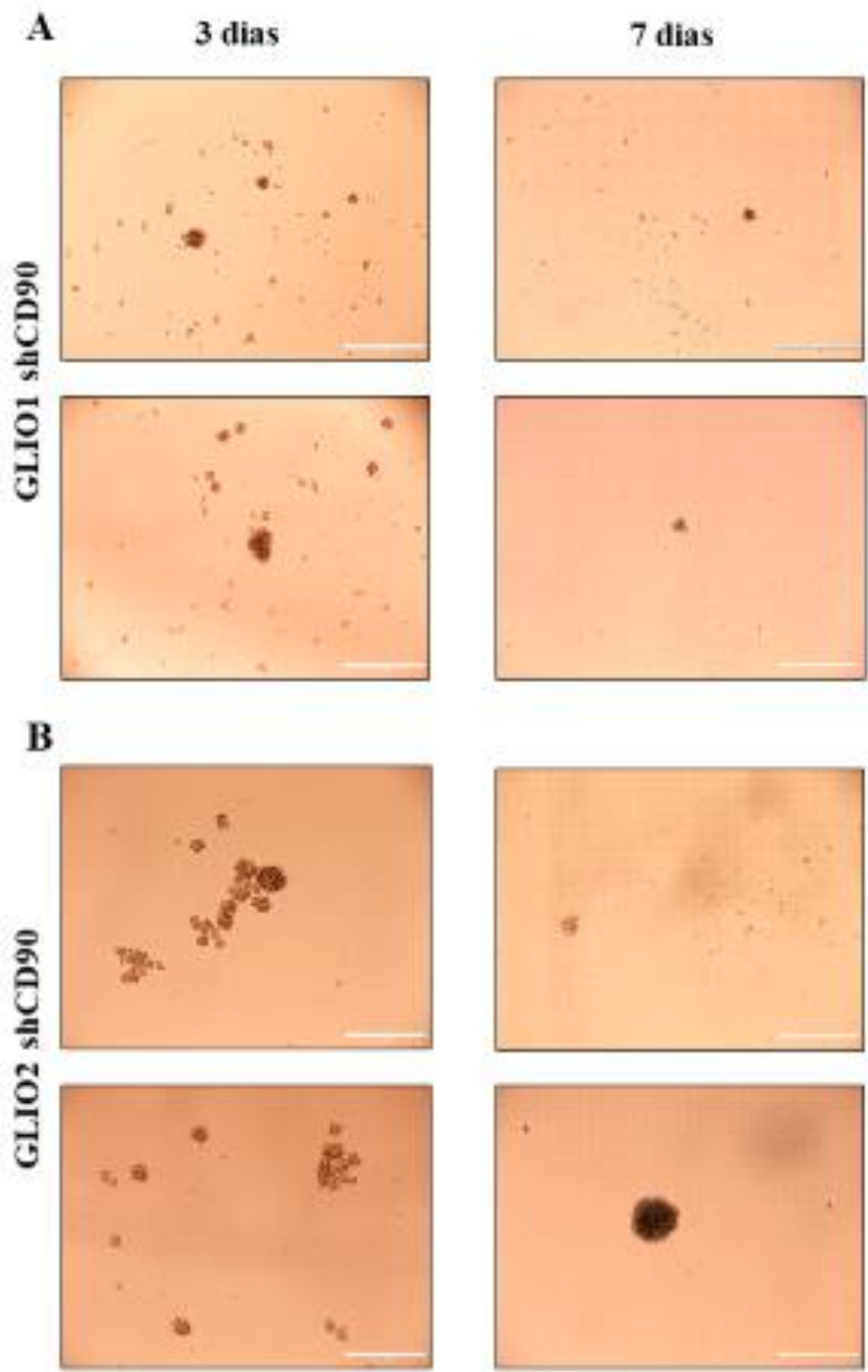
### **5.5 Formação de oncoesferas a partir do cultivo de GLIO1 e GLIO2**

A fim de determinar a influência da ablação de CD90 nas populações de células primárias de GBM, foi analisada a formação de oncoesferas em duas amostras celulares obtidas de pacientes diferentes. A capacidade de formar oncoesferas é uma característica de CTCs e é de interesse de investigação para o tema de biomarcadores de células iniciadoras tumorais<sup>89,100-104</sup>. Dessa forma, GLIO1 WT, GLIO1shCD90, GLIO2 WT e GLIO2shCD90 foram submetidas ao protocolo de formação de oncoesferas em quadruplicatas e imagens foram obtidas através do EVOS FL Cell Imaging System, demonstradas nas Figuras 17 e 18.

Na Figura 17 foi observada a formação de oncoesferas nos grupos controles de GLIO1 WT e GLIO2 WT a partir das fotos obtidas no terceiro e sétimo dia de cultivo celular. Percebe-se que as oncoesferas são arredondadas e maiores que 100µm e, no sétimo dia de cultivo, elas aumentaram de tamanho, além de obterem um aspecto de densidade celular maior, representada pela cor mais escura nas imagens obtidas.



**Figura 17 Oncoesferas dos grupos GLIO1 WT e GLIO2 WT.** Oncoesferas das células primárias GLIO1 WT (A) e GLIO2 WT (B) após três e sete dias de cultivo. Barra de tamanho de 100 $\mu$ m.



**Figura 18 Oncoesferas dos grupos GLIO1 WT e GLIO2 WT.** Oncoesferas das células primárias GLIO1 shCD90 (A) e GLIO2 shCD90 (B) após três e sete dias de cultivo. Barra de tamanho de 100 $\mu$ m.

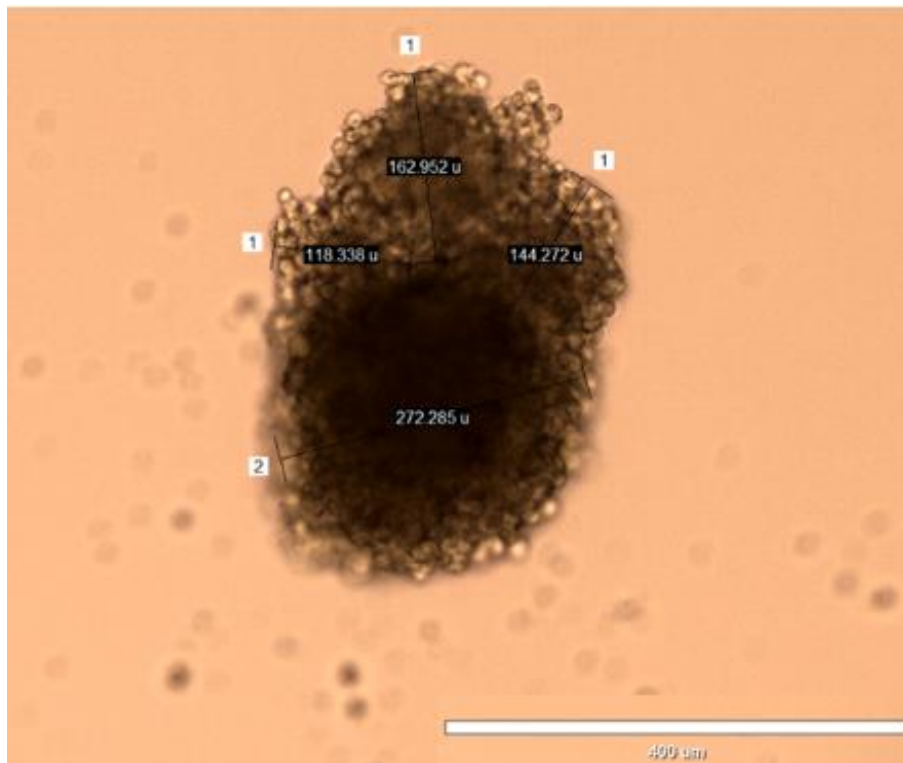
Já a Figura 18 demonstra as imagens referentes ao cultivo do terceiro e do sétimo dia das células GLIO1 shCD90 e GLIO2 shCD90, células com ablação de CD90. Percebe-se que houve uma formação discreta de oncoesferas, mas não bem delimitadas e arredondadas. Já no sétimo dia, as células de GLIO1 não conseguiram sustentar a formação das oncoesferas e, então, vieram, em sua maioria, a se dissociar e morrer. Em células GLIO2 shCD90 percebe-se a formação das oncoesferas, porém com uma densidade celular menor em relação ao grupo controle.

## **5.6 Análise do número de oncoesferas entre os grupos celulares**

Para a quantificação do número de oncoesferas formados por grupo, algumas considerações foram feitas de acordo com protocolos pré-estabelecidos. Somente oncoesferas acima de 100 $\mu$ m foram consideradas para contagem e quando havia claramente uma aglomeração, foi estimado o número de oncoesferas conforme o diâmetro do aglomerado obtido pela medição no EVOS. De 100 $\mu$ m a 200 $\mu$ m contou-se uma oncoesfera, de 200 $\mu$ m a 300 $\mu$ m duas e assim em diante seguindo esse padrão. Na Figura 19, pode-se perceber a aglomeração bem definida de oncoesferas e a aferição de seus diâmetros com a indicação em branco do número de oncoesferas contado.

Dessa forma, o número de oncoesferas foi aferido em quadruplicatas durante três experimentos independentes no terceiro e no sétimo dia de cultivo. Primeiramente, como demonstrado na Figura 20, foram quantificadas as oncoesferas dos grupos celulares separadamente. GLIO1, no cultivo por 3 dias e por 7 dias, apresenta resultados estatisticamente significantes em ambas as análises. A formação de oncoesferas no grupo com ablação de CD90 foi inferior à quantidade do grupo controle, podendo inferir a influência da glicoproteína na obtenção de oncoesferas e,

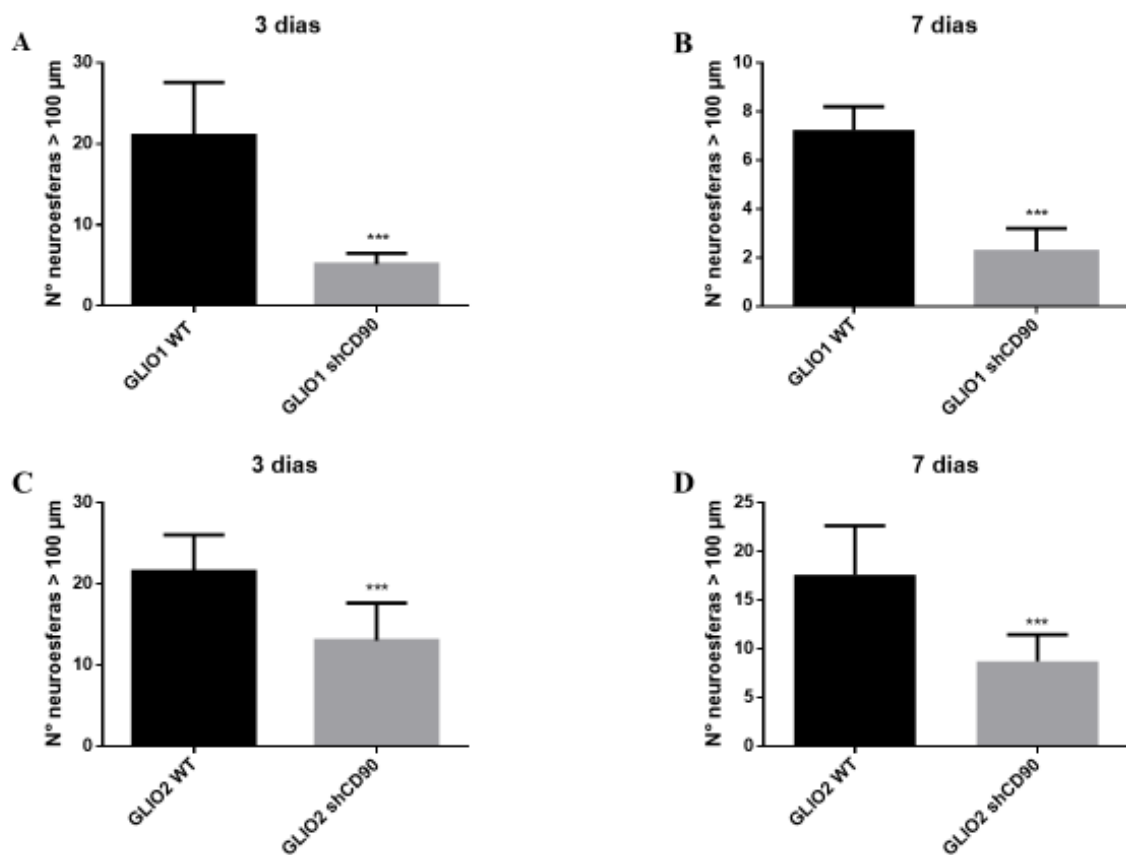
consequentemente, de CTCs. Assim como GLIO1, GLIO2 apresentou resultados semelhantes, embora tenha formado mais oncoesferas no grupo GLIO2 shCD90 do que em GLIO1 shCD90 em ambos os dias analisados. Ainda, em ambos os grupos houve uma diminuição do número de oncoesferas do grupo controle analisado do terceiro para o sétimo dia de cultivo.



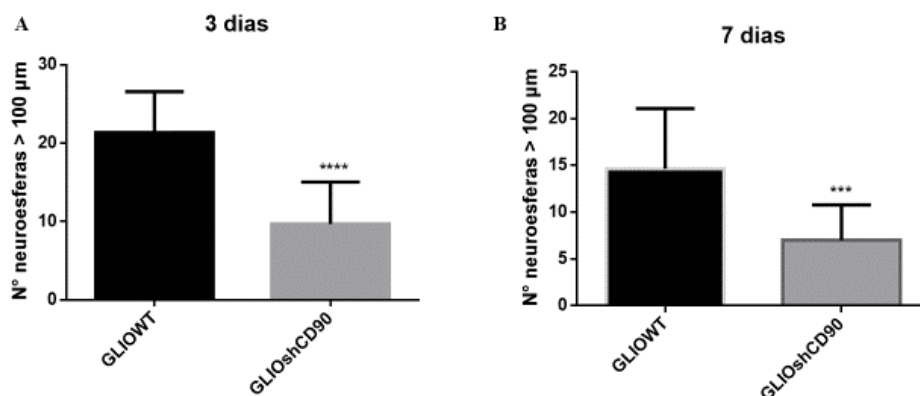
**Figura 19 Aglomeração de oncoesferas de GLIO2 WT.** Medições do diâmetro de cada oncoesfera aglomerada pelo equipamento do EVOS FL Cell Imaging System (Aumento 400X). Barra de tamanho de 400 $\mu$ m.

Então, a compilação dos resultados de GLIO1 e GLIO2 foi realizada, apesar de serem tumores de pacientes diferentes. Essa síntese, demonstrada na Figura 21, permite relacionar de maneira mais abrangente os resultados encontrados de uma maneira uniforme como já foi realizado anteriormente<sup>82,105</sup>.

Apesar dos glioblastomas analisados revelarem um desvio padrão significativo, característico de células de cultivo primário, é possível perceber a diferença relevante entre o grupo controle e o grupo com ablação de CD90, tendo esse último grupo um número de oncoesferas inferior que o grupo controle em todas as análises realizadas.



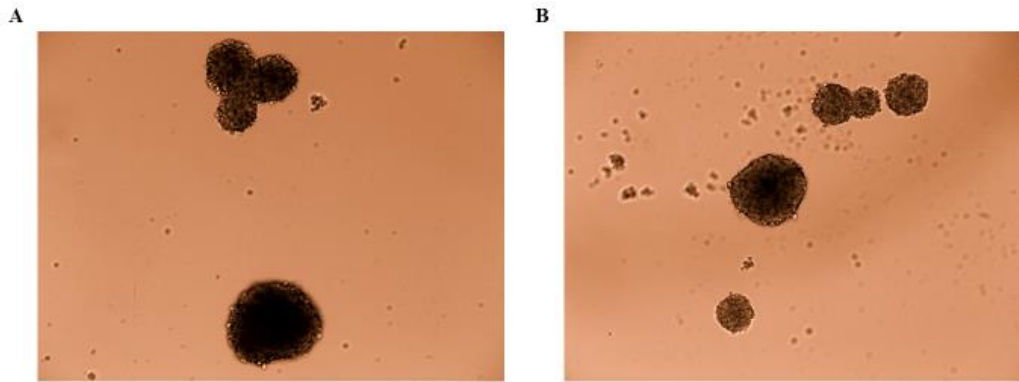
**Figura 20** Quantificação de oncoesferas em GLIO1 e GLIO2. Número de oncoesferas maior que 100μm aferidos em 3 e 7 dias de cultivo celular. Esses valores referentes às oncoesferas de GLIO1 em 3 dias (A) e em 7 dias (B) de cultivo e de GLIO2 em 3 dias (C) e em 7 dias (D) de cultivo foram analisados no GraphPad Prism 6. Estatística feita pelo teste T Student ( $p < 0,001$ )



**Figura 21** Quantificação de oncoesferas em GLIO1 e GLIO2 agrupados. Número de oncoesferas maior que 100μm aferidos em 3 dias (A) e em 7 dias (B) de cultivo celular dos resultados agrupados de GLIO1 e GLIO2. Estatística feita pelo teste T Student ( $p < 0,001$ )

## 5.7 Formação de subesferas de GLIO2

A análise da clonogenicidade das células tumorais isoladas é de interesse para a obtenção de uma linhagem celular e para garantir a continuidade dos experimentos ao longo das passagens celulares. Dessa forma, o mesmo foi analisado em relação às oncoesferas. Oncoesferas de GLIO2 WT e GLIO2 shCD90 foram plaqueadas, após a dissociação, no mesmo meio DMEM/F12 suplementado com N2, B27, bFGF e EGF para que houvesse a formação das subesferas. Subesferas são unidades derivadas de oncoesferas que garantem a clonogenicidade das células-tronco tumorais presente nas oncoesferas<sup>82,106</sup>. Dessa forma, foi possível obter subesferas tanto de GLIO2 WT quanto de GLIO2 shCD90, conforme a Figura 22.



**Figura 22 Formação de subesferas de GLIO2.** Subesferas obtidas após dissociação e plaqueamento de células de oncoesferas de GLIO2 WT (A) e GLIO2 shCD90 (B). Foto obtida pelo microscópio EVOS FL Cell Imaging System (Aumento 200X).

## 5.8 Expressão de CD90 em oncoesferas de GLIO1 e GLIO2

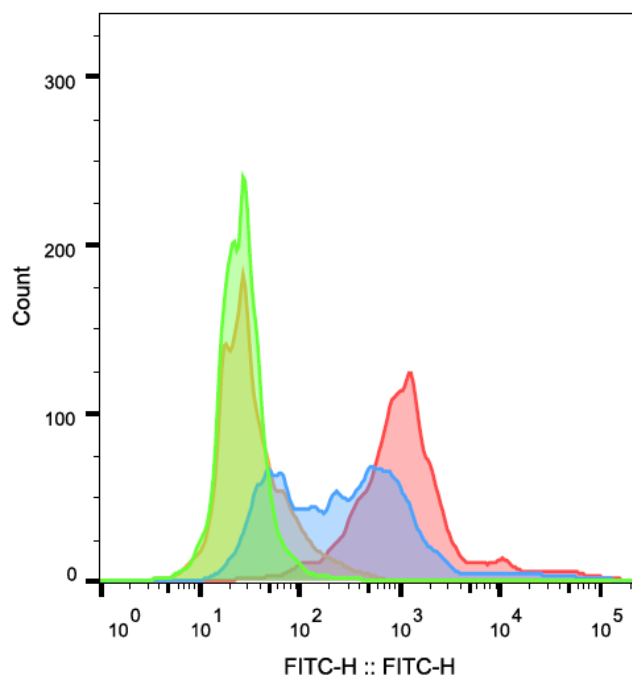
Uma vez formadas as oncoesferas, houve a investigação da expressão de CD90 nessas estruturas obtidas pelos dois tumores e seus respectivos grupos controle e modificado. Assim, a realização da citometria de fluxo após a dissociação dos esferoides permitiu a confirmação da menor quantidade de expressão de CD90 nas oncoesferas derivadas de grupos celulares com ablação de CD90 (shCD90) em termos de intensidade mediana de fluorescência, estabelecidos na Figura 23 e na Tabela 4.

Na figura 23, há uma diminuição na altura do pico e um menor deslocamento para a direita das células derivadas de oncoesferas de GLIO2 shCD90 quando confrontadas com o controle GLIO2 WT. O histograma das oncoesferas retém as características observadas no histograma das células aderidas.

Para uma melhor interpretação dessas diferenças, a quantificação da intensidade mediana de fluorescência presente na Tabela 4 demonstra que há, de fato, essa redução no sinal de fluorescência do grupo de células pertencentes às oncoesferas de GLIO1 shCD90 e GLIO2 shCD90 em comparação com os respectivos controles.



Em GLIO1, houve a diminuição de 56,3% da intensidade do grupo com ablação de CD90 em relação ao controle e em GLIO2 76,1%, mantendo, então, a menor porcentagem de receptores para CD90 nas células dissociadas de oncoesferas quando comparadas com as células aderentes.



**Figura 23** Histograma da expressão de CD90 em oncoesferas derivadas de GLIO2. Controle isotópico em GLIO2 WT (laranja) e GLIO2 shCD90 (verde). Expressão de CD90 por meio do anti-CD90-FITC nos grupos celulares GLIO2 WT (vermelho) e GLIO2 shCD90 (azul).

**Tabela 4** Valores de intensidade mediana de fluorescência das oncoesferas derivadas de GLIO2.

Dados relativos à fluorescência de CD90 das oncoesferas derivadas dos tumores GLIO1 e GLIO2 nos grupos controle (WT) e com ablação de CD90 (shCD90). Os valores foram obtidos através do software FlowJo, através do qual foram subtraídas as intensidades dos controles isotópicos das intensidades com anti-CD90-FITC (Anexo 1). Houve então a expressão de CD90 nos grupos celulares em porcentagem relativa.

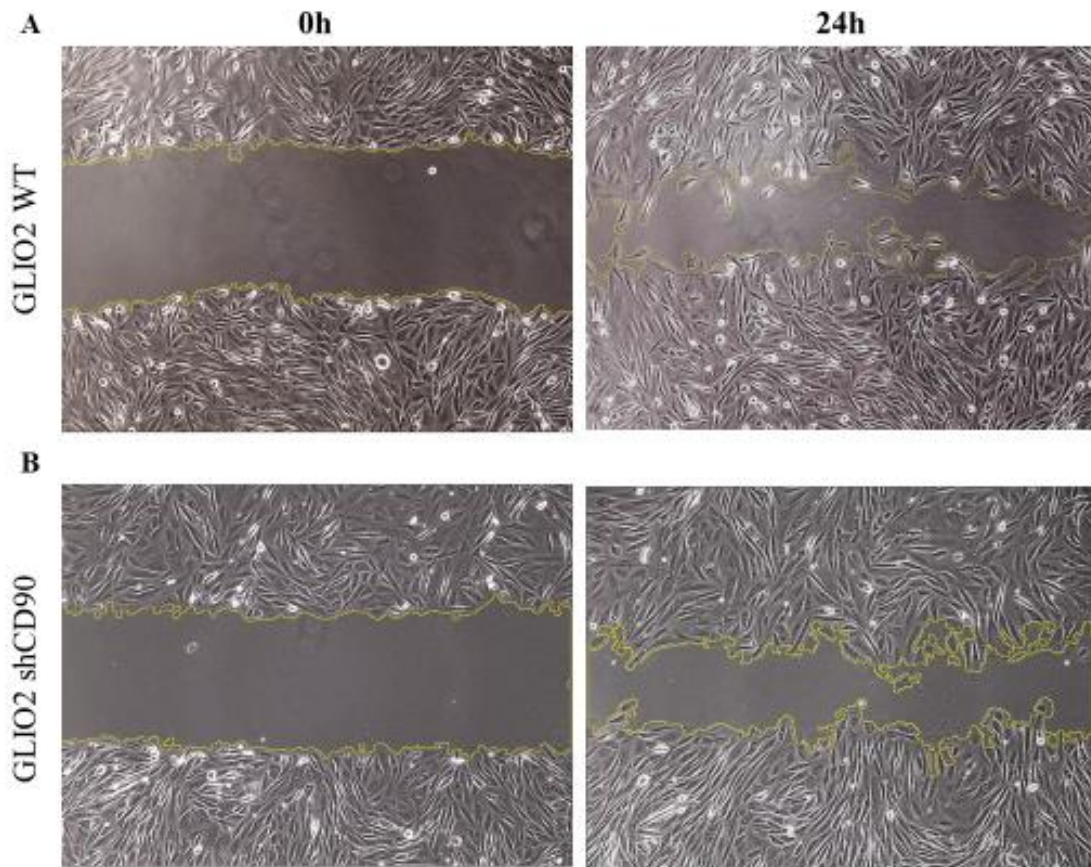
Amostra Tumoral	WT	shCD90	shCD90/WT	shCD90/WT (%)	100- shCD90/WT (%)
<b>GLIO1 (oncoesferas)</b>	38,9	17	0,437	43,70	56,3
<b>GLIO2 (oncoesferas)</b>	1035	247	0,239	23,90	76,1

## 5.9 Ensaio de *wound healing* para avaliação de migração celular

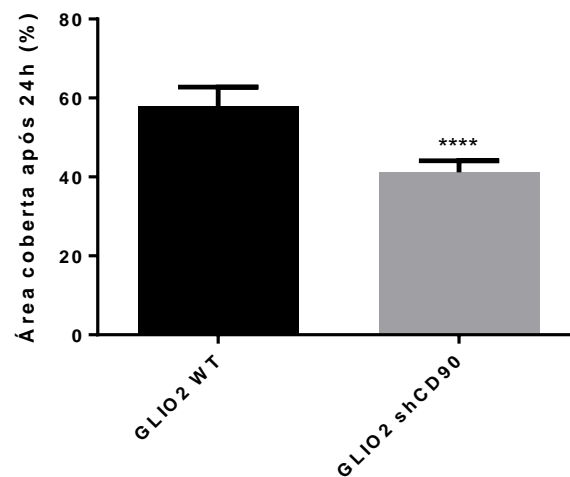
Com o intuito de determinar o efeito da ablação de CD90 na migração celular *in vitro*, foi escolhido o método de *wound healing* ou *scratch assay*. Esse método consiste na criação de uma ferida artificial em células plaqueadas com a intenção de mimetizar a migração celular *in vivo*, respeitando, obviamente as restrições impostas pela dimensão do experimento<sup>94</sup>. Essa técnica é recorrente na literatura em estudos de GBM em nível inicial para determinação de efeitos de tratamentos e de funções proteicas na tumorigênese desse tipo tumoral<sup>107-109</sup>.

O efeito da ablação de CD90 na migração celular é, então, perceptível na Figura 24. Houve uma diminuição mais acentuada da área do *scratch* da população GLIO2 WT (23A) do que da população GLIO2 shCD90 (23B). Apesar de ser visível a diferença, obteve-se a quantificação da área do *scratch* no momento em que ele foi realizado (início do experimento ou 0h) e após 24 horas. Essa quantificação foi possível através do tratamento das imagens no software ImageJ com a utilização do macro *Wound Healing Tool*. Dessa forma, o software contabiliza a área em pixels e a área relativa, em porcentagem, foi apresentada na Figura 25.

Nota-se, então, a influência da presença de CD90 na migração de glioblastomas primários. O grupo celular GLIO2 shCD90 apresentou uma capacidade de migração inferior ao grupo GLIO2 WT, com expressão normal de CD90.



**Figura 24** Imagens do ensaio de migração de GLIO2. Análise da migração em 0h e 24h de GLIO2 WT (A) e GLIO2 shCD90 (B). Imagens obtidas por microscopia invertida de fase (aumento 100X) no EVOS FL Cell Imaging System. Imagens tratadas e área delimitada no software ImageJ.



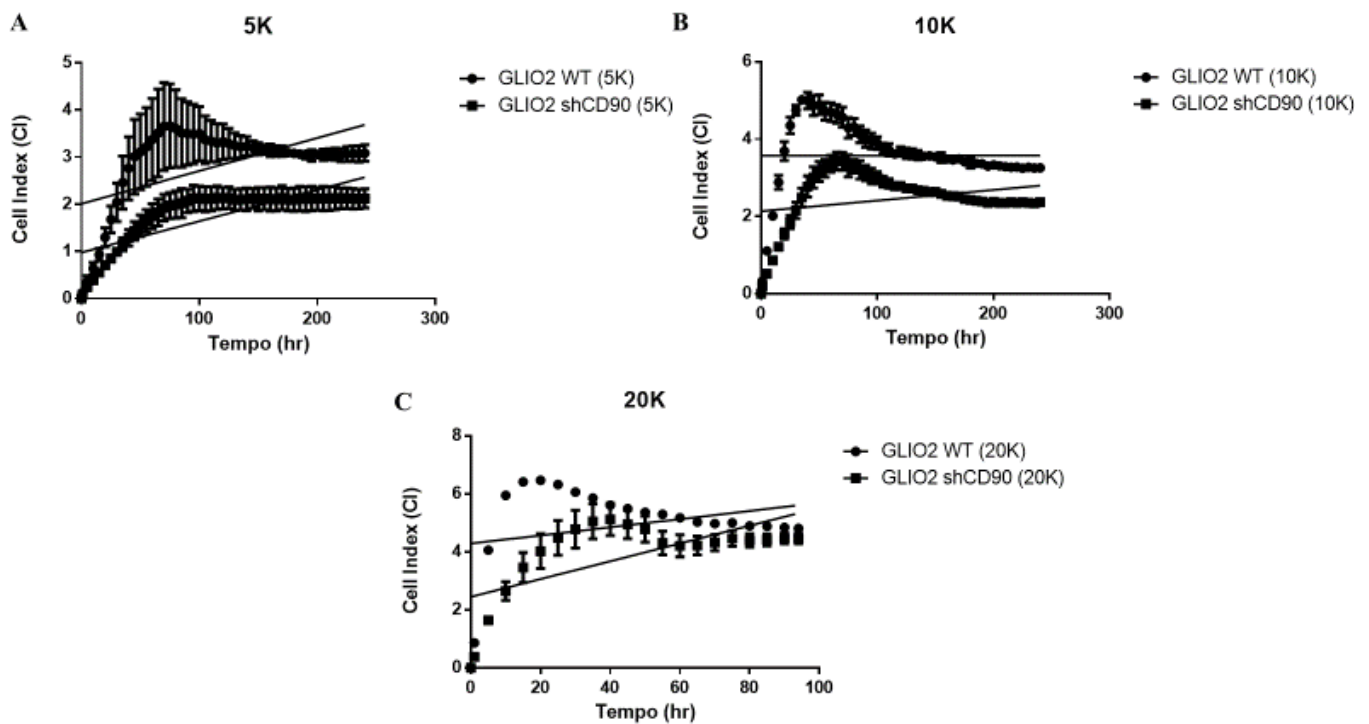
**Figura 25** Quantificação da área coberta após 24 horas do ensaio de migração. A área coberta foi determinada pelo software ImageJ que contabiliza em pixels o tamanho da área através do macro *Wound Healing Tool*. Estatística feita pelo teste T Student ( $p < 0,001$ ).

## 5.10 Análise celular em tempo real (RTCA)

A fim de determinar a adesão celular das células GLIO2 WT e GLIO2 shCD90, optou-se pelo método de análise celular em tempo real (RTCA). Existem outras metodologias para testes de viabilidade celular, como MTT ou por azul de Trypan, mas o RTCA se demonstrou interessante pela análise dinâmica das células, além de abranger toda a população celular em cultivo e por carecer na literatura a padronização do protocolo com o cultivo primário de glioblastomas humanos<sup>110</sup>. Nessa metodologia escolhida, o valor de índice celular (CI) é aferido a partir da adesão de células no fundo dos poços de uma placa especial (E-plate) de 16 poços. Os eletrodos de ouro conseguem aferir a quantidade de células aderidas e indicar proliferação celular<sup>111</sup>.

Foram escolhidas três concentrações celulares para aferir o comportamento das células em baixa, em média e em alta confluência, assim como estabelecido em protocolos anteriores<sup>112</sup>. Dessa forma, células de GLIO2 WT e GLIO2 shCD90 foram plaqueadas em baixa (5K), média (10K) e alta (20K) densidades. Percebe-se, a partir da análise da Figura 26, que as células que tiveram a ablação de CD90 (GLIO2 shCD90) apresentaram menor velocidade de adesão celular, indicada pela rapidez com a qual a curva atinge seu valor máximo, do que as células selvagens nas três concentrações<sup>113</sup>. Nas concentrações baixa (5K) e intermediária (10K), essa diferença entre os valores de CI dos grupos celulares analisados é mantida com o decorrer da estabilidade do crescimento celular. Já na alta concentração de células (20K), houve uma aproximação dos valores de CI do grupo com ablação de CD90 e do controle nas horas finais do experimento. Constata-se, então, que a alta concentração de células não proporciona uma visualização eficaz da diferença entre GLIO2 WT e GLIO2 shCD90.

Além disso, a inclinação da curva até o valor máximo, com a diminuição do coeficiente linear, representa a fase de espalhamento celular (*spreading*)<sup>113</sup>. Nota-se que as curvas do grupo GLIO2 WT são mais acentuadas chegando ao ponto máximo mais rapidamente do que as curvas do grupo com ablação de CD90. Esse resultado é perceptível nas três concentrações, sendo mais visível na concentração de 10K.



**Figura 26 Adesão celular das células GLIO2 WT e GLIO2 shCD90.** Células GLIO2 WT e células GLIO2 shCD90 em diferentes concentrações:  $5 \times 10^3$  ou 5K (A),  $1 \times 10^4$  ou 10K (B) e  $2 \times 10^4$  ou 20K (C). Dados expressos em média e  $\pm$  erro padrão da média compilados em intervalos de 5 em 5 horas durante 243 horas (A e B) e 94 horas (C). Linha de regressão em todos os gráficos obtidos através da estatística de regressão linear feita no GraphPad Prism. As devidas equações das regressões do grupo WT e do grupo shCD90 são, respectivamente, para cada concentração: 5K,  $Y = 0,006977 * X + 2,010$  e  $Y = 0,006646 * X + 0,9768$ ; 10K,  $Y = 3,221e-005 * X + 3,570$  e  $Y = 0,002753 * X + 2,136$  e 20K,  $Y = 0,01308 * X + 4,323$  e  $Y = 0,03030 * X + 2,441$ .

## 6. Discussão

O diagnóstico precoce e o tratamento eficaz do GBM são ainda um desafio para a ciência. Os sintomas são muito comuns aos de outras patologias e o tratamento ainda é muito agressivo e com necessidade cirúrgica<sup>114</sup>. Ao mesmo tempo em que mais estudos são feitos e novos testes clínicos aprovados, o GBM mostra-se de difícil controle por ser extremamente invasivo e com características celulares heterogênicas<sup>114,115</sup>. Assim, alguns pacientes apresentam resistência ao tratamento utilizado e um prognóstico ainda pior, tendo somente o manejo dos sintomas de forma paliativa<sup>29,100</sup>.

Nesse contexto, surge a busca por biomarcadores tumorais a fim de estabelecer alvos específicos para a supressão tumoral. Apesar de promissores, seus estudos, no contexto do GBM, são recentes<sup>53,54,114</sup>. Dessa forma, muito precisa ser estabelecido sobre a biologia do GBM, assim como testes minuciosos da investigação de cada biomarcador em potencial.

A glicoproteína CD90 mostra esse potencial em relação ao GBM e sua influência na progressão tumoral ainda não foi completamente elucidada e estabelecida<sup>38,105</sup>. Esse trabalho teve como objetivo a análise *in vitro* da expressão de CD90 na cultura primária de glioblastomas humanos.

Células de linhagem são amplamente utilizadas nos estudos tumorais, apesar de possuírem diferenças em relação ao tumor original. Esse fato faz com que haja dificuldade no avanço da descoberta de biomarcadores de câncer, especialmente do GBM, um tumor heterogêneo entre os pacientes<sup>116</sup>. Apesar disso, é necessário investigar a influência de CD90 em células de linhagem para depois prosseguir para o cultivo primário. Então, a célula U87MG foi escolhida para o teste dos protocolos e pouco se encontrou em relação à expressão de CD90 em U87MG na literatura, o que levou à investigação dessa informação. Houve então a transdução por lentivírus para a expressão de luciferase (U87MG-LUC) a

fim de prosseguir com testes *in vivo* na linha de pesquisa, seguida pela ablação de CD90 e seleção magnética das células em duas populações U87MG-LUC-CD90- e U87MG-LUC-CD90+. A eficiência dos protocolos de transdução foi comprovada pela Figura 12 e pela Figura 13. Ao seguir para a análise de citometria de fluxo, as células não apresentaram diferença entre os grupos controle (WT) e com ablação de CD90 indo ao encontro de pesquisas sucedidas à essa investigação<sup>105</sup>. Houve a elaboração de uma hipótese para que a linhagem U87MG não expressasse CD90 de forma significativa, como encontrado nas células primárias estudadas posteriormente. O processo de imortalização celular da U87MG pode ter levado à perda desse marcador.

A partir da impossibilidade da utilização de U87MG e com o objetivo de tornar o estudo mais próximo à realidade citogenética dos pacientes, houve o estabelecimento do cultivo primário de glioblastoma humano<sup>92,93</sup>.

Desse modo, para esse estudo, foram utilizadas células primárias derivadas de duas amostras de glioblastoma coletadas e confirmadas por instituições parceiras. As células aderentes obtidas em cultivo primário representadas por GLIO1 e GLIO2 foram demonstradas na Figura 14 e na Figura 15. Elas apresentam características morfológicas de astrócitos, confirmando a origem tumoral de astrocitoma.

Estabelecido o cultivo primário, as células passaram por um protocolo para ablação de CD90 por RNAi ao atingirem 70% de confluência após 30 a 40 dias de cultivo em garrafas de cultivo T75 e T25. A glicoproteína CD90 foi escolhida para avaliação por não ter sua função tumorigênica em GBM estabelecida e por ser um biomarcador em potencial para diversos outros tipos tumorais<sup>75,84,105</sup>. Esse processo foi confirmado por meio da citometria de fluxo (Figura 16 e Tabela 3). Foi possível, por meio desses resultados, determinar a intensidade mediana de fluorescência da expressão de CD90 nas amostras

GLIO1 e GLIO2, tanto no controle quanto no grupo que sofreu depleção na expressão da glicoproteína. Essa intensidade pode ser traduzida em número de receptores celulares de CD90 que foram ligados aos anticorpos anti-CD90. Assim, o protocolo de transdução se mostrou eficiente interpretado por meio da análise da Tabela 3, na qual demonstra ablação de aproximadamente 43% em GLIO1 e 69% em GLIO2. Essa porcentagem é correspondente ao que já se tem na literatura em relação à transdução de células primárias de glioblastoma, variando de 40% a 70%<sup>117</sup>.

Por conseguinte, foi avaliada a formação de oncoesferas nas duas populações celulares (GLIO WT e GLIO shCD90) de cada tumor. A primeira metodologia estabelecida com estudo de oncoesferas para estudos neuronais foi realizada em 1992 por Reynolds e Weiss<sup>58</sup>. Desde então é um modelo muito utilizado para geração de células-tronco tumorais, por se utilizar de um meio sem soro fetal, o qual induz diferenciação, e por suas células apresentarem a capacidade de renovação e clonogenicidade ou formação de subesferas<sup>118</sup>. Assim, houve a investigação sobre os efeitos que a ablação de CD90 causaria nas populações tumorais de GLIO1 e GLIO2 quando comparadas com o controle.

Percebe-se, a partir da análise da Figura 17 e Figura 18 que as oncoesferas formadas por células com depleção de CD90 são menores e ocorrem em menor densidade (menor número). Essa diminuição de densidade em relação ao controle pode demonstrar uma menor capacidade de adesão das células em formatos esferoides, já que CD90 possui função biológica regulatória das interações entre as células no ambiente neuronal<sup>71,119</sup>.

Ainda, houve a quantificação dos números de oncoesferas com 3 e 7 dias de cultivo, demonstrada na Figura 20, para GLIO1 e para GLIO2. Foi significativa, estatisticamente, a diminuição do número de oncoesferas nos grupos shCD90 de ambos os tumores, tanto no terceiro dia quanto no sétimo dia. Percebe-se uma diminuição também no grupo controle,



com o passar dos dias em cultivo, podendo ter relação com o fato das oncoesferas serem formadas por apenas um grupo seletivo de células e que se estabelecem de acordo com o tempo de cultivo<sup>56,82,120</sup>. Da mesma forma, percebe-se uma diferença do número de oncoesferas formadas por GLIO1 e GLIO2. GLIO2 apresenta um número superior de formação dessas estruturas e quando os dois tumores foram agrupados para gerar dados quantitativos, houve o aumento do desvio padrão, demonstrado na Figura 21. Essa diferença pode ser explicada pelo caráter heterogêneo do GBM, como já explicitado. Ainda, nem todas as células derivadas de amostras cirúrgicas de GBM apresentam a capacidade de formação de esferas tumorais, uma vez que células progenitoras e células diferenciadas não conseguem formar ou reter oncoesferas, reforçando a importância da realização de estudos tumorais com cultivo primário<sup>118,121,122</sup>. A partir desses ensaios, conclui-se que a capacidade de formação de CTCs, promovida por oncoesferas, é diminuída com a ablação de CD90.

Ainda sobre as estruturas esféricas, elas foram avaliadas por citometria de fluxo para a quantificação da expressão de CD90 a fim de confirmar a retenção das características em relação às células aderentes. De fato, há uma menor presença de receptores de CD90 (menor intensidade mediana de fluorescência) nas células de oncoesferas com ablação de CD90 tanto em GLIO1 quanto em GLIO2, sendo consistente com a população de células aderidas iniciais.

Por conseguinte, a análise da migração celular por meio do ensaio de *wound healing* demonstrou diferenças significativas entre o grupo com ablação de CD90 e o grupo controle. A correspondência da expressão de CD90 e a migração de glioblastomas já foi discutida em alguns trabalhos, porém o ensaio de *wound healing* não foi realizado com células primárias<sup>123-125</sup>. Há poucas informações sobre o papel de CD90 em gliomas, mas já foi possível perceber que populações positivas para CD90 em GBMs são capazes de formar estruturas parecidas com vasos sanguíneos, de promover a angiogênese tumoral e estão

relacionadas com uma maior invasão no parênquima cerebral<sup>72,105</sup>. Dessa forma, os resultados apresentados nesse trabalho, na Figura 24 e na Figura 25, relativos à migração de culturas primárias de glioblastomas demonstram um alinhamento com estudos anteriores em relação à influência da expressão de CD90 na migração das células, na qual a população com ablação de CD90 apresenta maiores dificuldades em promover o fechamento do *scratch* do ensaio realizado.

Além da migração, a adesão celular foi analisada a partir do experimento de análise celular em tempo real (RTCA), como demonstrada na Figura 26. O sistema mede através da impedância em eletrodos de ouro, a adesão celular, traduzida em CI (Índice Celular). Nas três concentrações diferentes (5K, 10K e 20K), as células com ablação de CD90 demoraram mais tempo para a completa adesão e o espalhamento celular. Além disso, as células com a modificação da expressão de CD90 obtiveram uma curva de crescimento celular com índices celulares menores nas três concentrações. A partir da função de adesão celular no CNS de CD90, infere-se da análise das curvas de crescimento de GLIO2, que a diminuição na expressão de CD90 resultou em uma capacidade de adesão menor e, conseqüentemente, uma diminuição do índice celular, o qual pode ser traduzido em uma redução na capacidade proliferativa no ambiente tumoral.

Na menor concentração celular, as células apresentaram um desvio padrão grande, presente também nas outras concentrações e característico de experimentos de cultivo primário, uma vez que as células aderidas da amostra cirúrgica não são uniformes como células de linhagem<sup>126,127</sup>. Existem diversos tipos celulares e quanto menor a concentração, maior a chance de conseguir uma população heterogênea proveniente do cultivo. Assim, o desvio padrão acentuado sinaliza, mais uma vez, a importância do estudo personalizado com a escolha do uso do cultivo de células primárias de GBM em relação às células de linhagem. Esse resultado corrobora com a função da proteína CD90 de adesão celular,

indicando que a perda da expressão da proteína leva à um resultado *in vitro* relevante para o estudo de glioblastomas.

Duas perspectivas podem ser analisadas a partir dos resultados apresentados por esse trabalho. A primeira de que a perda da glicoproteína CD90 confere uma menor adesão celular, redução quantitativa na formação de oncoesferas e menor taxa de migração. Essas características são já estabelecidas por proteínas de adesão, constante alvos na busca de um biomarcador para tumores por geralmente estarem superexpressa em tumores a fim de conferir maior invasão à tecidos adjacentes, maior mobilidade e estabilidade no ambiente tumoral. Ao mesmo tempo, a superexpressão dessas proteínas no tumor pode conferir um dos fatores de resistência oncoquimioterápica<sup>128</sup>. Dessa forma, CD90, de acordo com os resultados apresentados, assim como de outros trabalhos complementares, poderia ser um alvo em potencial para a redução tumoral e diminuição de sua capacidade proliferativa e invasiva<sup>72,76</sup>. Embora esse resultado seja promissor, é importante ressaltar a presença da expressão de CD90 em outros tipos celulares no SNC, conferindo dificuldades para a especificidade da proteína para glioblastomas, assim como para a descoberta de um possível tratamento sem efeitos colaterais<sup>71</sup>. Terapias com associação de fármacos alvo-específicos, sendo um deles anti-CD90, também seria uma possibilidade, uma vez que é difícil a utilização de somente uma oncoquimioterapia para o tratamento integral do câncer.

A segunda perspectiva demonstra o potencial de estabelecimento de um prognóstico com o panorama de expressão de CD90. Como apresentado, CD90 está relacionada à fatores que contribuem para a malignidade de glioblastomas. Ao mesmo tempo, outro estudo analisou a expressão de diferentes amostras de CD90 e o prognóstico dos pacientes respectivos de cada amostra. Nesse panorama, houve a relação de um pior prognóstico a pacientes com maior expressão de CD90<sup>83</sup>. Em consonância com o trabalho aqui descrito e relatos anteriores, biomarcadores tumorais podem não só ser um bom alvo terapêutico, mas

podem prever a progressão clínica de pacientes com câncer. Dessa forma, tanto como um possível alvo como um possível indicador de malignidade de GBM, o estudo da proteína CD90 confere boas perspectivas que poderão ser, eventualmente, traduzidas para a clínica.

## 7. Conclusão

A partir dos resultados obtidos por esse trabalho é possível inferir as seguintes conclusões:

- não foi possível a detecção da expressão de CD90 na linhagem U87MG, não sendo possível a continuidade para o estabelecimento dos demais protocolos;
- foi possível os efeitos da ablação de CD90 em células primárias
- após o estabelecimento de cultivo primário de amostras cirúrgicas de glioblastomas, as células apresentaram morfologia distinta em cada amostra;
- a transdução lentiviral para ablação de CD90 em células GLIO1 e GLIO2 foi eficaz a partir das análises de medianas de fluorescência e dos histogramas obtidos por citometria de fluxo;
- oncoesferas formadas a partir de tumores diferentes apresentam características de densidade e número diferentes;
- a proteína CD90 é importante para a formação de oncoesferas com maior densidade celular;
- células que sofreram ablação de CD90 apresentaram menor número de formação de oncoesferas;
- a capacidade de migração celular de glioblastomas é influenciada pela ablação de CD90, apresentando uma menor taxa em comparação com o grupo controle;
- a adesão celular e espalhamento de células de glioblastomas é comprometida após a ablação de CD90, obtendo um menor índice celular (CI) e necessitando de um maior tempo para ocorrer.

## 8. Perspectivas

A continuidade do trabalho pode apresentar as seguintes perspectivas:

1. testes *in vitro* de resistência à citotoxicidade de terapias convencionais para o tratamento de GBM em células primárias com ablação de CD90 comparadas ao grupo controle;
2. avaliação do potencial de diferenciação de células derivadas de oncoesferas em astrócitos, oligodendrócitos e neurônios e a influência de CD90 nesse processo;
3. avaliação de características de células-tronco tumorais nos grupos com diferentes expressões de CD90;
4. análise da influência da expressão de CD90 em células primárias de GBM em modelos *in vivo*.

## 9. Referências Bibliográficas

1. Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T., Siegelbaum, S. & Hudspeth, A. *Principles of Neural Science*. (McGraw Hill Companies, 2013).
2. Boldog, E. *et al.* Transcriptomic and morphophysiological evidence for a specialized human cortical GABAergic cell type. *Nat. Neurosci.* (2018). doi:10.1038/s41593-018-0205-2
3. Squire, L. R. *et al.* *Fundamental Neuroscience*. *Fundamental Neuroscience* (Academic Press, 2008). doi:10.1016/B978-0-12-385870-2.00032-9
4. Kimelberg, H. K. Functions of Mature Mammalian Astrocytes: A Current View. *Neurosci.* **16**, 79–106 (2010).
5. Murai, K., Wee Yong, V., Edward Kennedy, T., Kothary, R. & Michalski, J.-P. Oligodendrocytes in a nutshell. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, (2015).
6. Su-chun Ho, M. *et al.* Molecular Mechanisms Involved in Schwann Cell Plasticity. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 38 (2017).
7. Wong, K. M., Babetto, E. & Beirowski, B. Axon degeneration: make the Schwann cell great again. *Neural Regen. Res.* **12**, 518–524 (2017).
8. Ransom, B., Behar, T. & Nedergaard, M. New Roles for Astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci.* **26**, 520–522 (2003).
9. Adamsky, A. & Goshen, I. Astrocytes in memory function: Pioneering findings and future directions. *Neuroscience* (2017). doi:10.1016/j.neuroscience.2017.05.033
10. Nedergaard, M., Takano, T. & Hansen, A. J. Beyond the Role of Glutamate as a Neurotransmitter. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 748–755 (2002).
11. Del Bigio, M. R. Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **119**, 55–73 (2010).
12. Sawamoto, K. New Neurons Follow the Flow of Cerebrospinal Fluid in the Adult Brain. *Science* (80-. ). **311**, 629–632 (2006).
13. Ransohoff, R. M. & Khoury, J. El. Microglia in Health and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, a020560 (2016).
14. Nayak, D., Roth, T. L. & McGavern, D. B. Microglia Development and function\*. *Annu. Rev. Immunology* **32**, 367–402 (2014).
15. Jäkel, S. & Dimou, L. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, 24 (2017).
16. Laug, D., Glasgow, S. M. & Deneen, B. A glial blueprint for gliomagenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* **19**, 393–403 (2018).
17. Acosta, C., Anderson, H. D. & Anderson, C. M. Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease. *J. Neurosci. Res.* **95**, 2430–2447 (2017).
18. Singh, A. & Abraham, W. C. Astrocytes and synaptic plasticity in health and disease. *Exp. Brain Res.* **235**, 1645–1655 (2017).

19. Zetterberg, H. Fluid biomarkers for microglial activation and axonal injury in multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* **136**, 15–17 (2017).
20. Weinberg, R. A. *The Biology of Cancer*. (Garland Science, 2014). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
21. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
22. Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., C. W. K. (Eds. . *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. World Health Organization Classification of Tumours* (2007).
23. Scheinemann, K. & Eric, B. *Pediatric Neuro-oncology*. (Springer New York, 2015).
24. McNeill, K. A. Epidemiology of Brain Tumors. *Neurol. Clin.* **34**, 981–998 (2016).
25. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil*. (2017).
26. Ministério da Saúde. *Câncer na Criança e no Adolescente no Brasil: Dados dos Registros de Base Populacional e de Mortalidade*. (2008).
27. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2016*. (2016).
28. Sant, M. *et al.* Survival of European patients with central nervous system tumors. *Int. J. Cancer* **131**, 173–185 (2012).
29. Altaner, C. Glioblastoma and stem cells. *Neoplasma* **55**, 369–374 (2008).
30. Lee, E., Yong, R. L., Paddison, P. & Zhu, J. Comparison of glioblastoma (GBM) molecular classification methods. *Semin. Cancer Biol.* **S1044–579X**, 30041–30045 (2018).
31. Anjum, K. *et al.* Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. *Biomed. Pharmacother.* **92**, 681–689 (2017).
32. Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 987–996 (2005).
33. Alifieris, C. & Trafalis, D. T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol. Ther.* **152**, 63–82 (2015).
34. Dell'albani, P. Stem Cell Markers in Gliomas. *Neurochem. Res.* **33**, 2470–2415 (2008).
35. Stopschinski, B. E., Beier, C. P. & Beier, D. Glioblastoma cancer stem cells – From concept to clinical application. *Cancer Lett.* **338**, 32–40 (2013).
36. Daley, G. Q. Stem cells and the evolving notion of cellular identity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **370**, 20140376 (2015).
37. Vieira, M. S. *et al.* Neural stem cell differentiation into mature neurons: Mechanisms of regulation and biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* **36**, 1946–1970 (2018).
38. Oishi, K. & Ito-Dufros, Y. Angiogenic potential of CD44 + CD90 + multipotent CNS stem cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **349**, 1065–1072 (2006).
39. Beck, B. & Blanpain, C. Unravelling cancer stem cell potential. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 727–738 (2013).
40. Toh, T. B., Lim, J. J. & Chow, E. K.-H. Epigenetics in cancer stem cells. *Mol. Cancer* **16**, 29



- (2017).
41. Bradshaw, A. *et al.* Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. *Front. Surg.* **3**, (2016).
  42. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730–737 (1997).
  43. Touat, M., Idbaih, A., Sanson, M., Ligon, K. L. & Ligon, K. L. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. *Ann. Oncol.* **28**, 1457–1472 (2017).
  44. Zhu, Z. *et al.* Targeting Self-Renewal in High-Grade Brain Tumors Leads to Loss of Brain Tumor Stem Cells and Prolonged Survival. *Cell Stem Cell* **15**, 185–198 (2014).
  45. Hong, I.-S., Jang, G.-B., Lee, H.-Y. & Nam, J.-S. Targeting cancer stem cells by using the nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 251–260 (2015).
  46. Sanai, N., Alvarez-Buylla, A. & Berger, M. S. Neural Stem Cells and the Origin of Gliomas. *N. Engl. J. Med.* **353**, 811–822 (2005).
  47. Jin, X., Jin, X., Jung, J.-E., Beck, S. & Kim, H. Cell surface Nestin is a biomarker for glioma stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **433**, 496–501 (2013).
  48. Lim, D. A. *et al.* Relationship of glioblastoma multiforme to neural stem cell regions predicts invasive and multifocal tumor phenotype. *Neuro. Oncol.* **9**, 424–429 (2007).
  49. van Dijken, B. R. *et al.* Subventricular zone involvement characterised by DTI in glioblastoma. *World Neurosurg.* (2017). doi:10.1016/j.wneu.2017.06.075
  50. Ho, I. A. W. & Shim, W. S. N. Contribution of the Microenvironmental Niche to Glioblastoma Heterogeneity. *Biomed Res. Int.* **2017**, 9634172 (2017).
  51. Roos, A., Ding, Z., Loftus, J. C., Tran, N. L. & Forrendinis, C. J. Molecular and Microenvironmental Determinants of Glioma Stem-Like Cell Survival and invasion. *Front. Oncol.* **7**, (2017).
  52. Abou-Antoun, T. J., Hale, J. S., Lathia, J. D. & Dombrowski, S. M. Brain Cancer Stem Cells in Adults and Children: Cell Biology and Therapeutic Implications. *Neurotherapeutics* **14**, 372–384 (2017).
  53. Sasmita, A. O., Wong, Y. P. & Ling, A. P. K. Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. *Asia. Pac. J. Clin. Oncol.* **14**, 40–51 (2018).
  54. McNamara, M. G., Sahebjam, S. & Mason, W. P. Emerging biomarkers in glioblastoma. *Cancers (Basel)*. **5**, 1103–19 (2013).
  55. Kong, F.-F. *et al.* Preliminary identification of endometrial cancer stem cells in vitro and in vivo. (2017). doi:10.1016/j.bbrc.2017.06.070
  56. Galli, R. *et al.* Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma. *Cancer Res.* **64**, 7011–7021 (2004).
  57. Lendahl, U., Zimmerman, L. B. & McKay, R. D. G. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**, 585–595 (1990).
  58. Reynolds, B. & Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science (80- )*. **255**, 1707–1710 (1992).
  59. Ludwig, K. & Kornblum, H. I. Molecular markers in glioma. *J. Neurooncol.* (2017).

doi:10.1007/s11060-017-2379-y

60. Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D. A., García-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell* **97**, 703–716 (1999).
61. Hamilton, J. D. *et al.* Glioblastoma Multiforme Metastasis Outside the CNS: Three Case Reports and Possible Mechanisms of Escape. *J. Clin. Oncol.* **32**, e80–e84 (2014).
62. Medicine, G. & Therapeutics, R. A Novel Small-molecule WNT Inhibitor, IC-2, Has the Potential to Suppress Liver Cancer Stem Cells. *Anticancer Res.* **37**, 3569–3579 (2017).
63. Baillie, R., Tan, S. T. & Itinteang, T. Cancer Stem Cells in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: A Review. *Front. Oncol.* **7**, 112 (2017).
64. Singh, S. K. *et al.* Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Res.* **63**, 5821–5828 (2003).
65. Zeppernick, F. *et al.* Stem Cell Marker CD133 Affects Clinical Outcome in Glioma Patients. *Clin. Cancer Res.* **14**, 123–129 (2008).
66. Yan, X. *et al.* A CD133-related gene expression signature identifies an aggressive glioblastoma subtype with excessive mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 1591–6 (2011).
67. Sheila K. Singh, Ian D. Clarke, Mizuhiko Terasaki, Victoria E. Bonn, Cynthia Hawkins, Jeremy Squire, A. & Dirks, P. B. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**, 5821–5828 (2003).
68. Shmelkov, S. V *et al.* CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J. Clin. Invest.* **118**, 2111–20 (2008).
69. Brescia, P. *et al.* CD133 Is Essential for Glioblastoma Stem Cell Maintenance. *Stem Cells* **31**, 857–869 (2013).
70. Beier, D. *et al.* CD133 + and CD133- Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells Show Differential Growth Characteristics and Molecular Profiles. *Cancer Res.* **67**, 4010–4015 (2007).
71. Leyton, L. & Hagood, J. S. Thy-1 Modulates Neurological Cell–Cell and Cell–Matrix Interactions Through Multiple Molecular Interactions. in *Cell Adhesion Molecules: Implications in Neurological Diseases* (eds. Berezin, V. & Walmod, P. S.) 3–20 (Springer, 2014). doi:10.1007/978-1-4614-8090-7
72. He, J. *et al.* CD90 is identified as a candidate marker for cancer stem cells in primary high-grade gliomas using tissue microarrays. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, M111.010744 (2012).
73. Kuroiwa, K. *et al.* Epitope Determination of Anti Rat Thy-1 Monoclonal Antibody That Regulates Neurite Outgrowth. *Hybridoma* **31**, 225–232 (2012).
74. Mayeux-Portas, V., File, S. E., Stewart, C. L. & Morris, R. J. Mice lacking the cell adhesion molecule Thy-1 fail to use socially transmitted cues to direct their choice of food. *Curr. Biol. CB* **10**, 68–75 (2000).
75. Wang, Y. *et al.* CD90 positive cells exhibit aggressive radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma. *J. Thorac. Dis.* **9**, 610–620 (2017).
76. Kumar, A., Bhanja, A., Bhattacharyya, J. & Jaganathan, B. G. Multiple roles of CD90 in cancer. *Tumor Biol.* **37**, 11611–11622 (2016).
77. Donnenberg, V. S. *et al.* Localization of CD44 and CD90 positive cells to the invasive front of breast tumors. *Cytometry B. Clin. Cytom.* **78**, 287–301 (2010).

78. ZHANG, K. *et al.* CD90 promotes cell migration, viability and sphere-forming ability of hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Mol. Med.* **41**, 946–954 (2018).
79. Chen, W.-C. *et al.* Cancer stem cell marker CD90 inhibits ovarian cancer formation via  $\beta$ 3 integrin. *Int. J. Oncol.* **49**, 1881–1889 (2016).
80. Fiegel, H. C. *et al.* Lack of Thy1 (CD90) expression in neuroblastomas is correlated with impaired survival. *Pediatr. Surg. Int.* **24**, 101–105 (2008).
81. He, J. *et al.* Identification of cell surface glycoprotein markers for glioblastoma-derived stem-like cells using a lectin microarray and LC-MS/MS approach. *J. Proteome Res.* **9**, 2565–72 (2010).
82. Pavon, L. F. *et al.* In vitro Analysis of Neurospheres Derived from Glioblastoma Primary Culture: A Novel Methodology Paradigm. *Front. Neurol.* **4**, 214 (2014).
83. Avril, T. *et al.* CD90 Expression Controls Migration and Predicts Dasatinib Response in Glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* **23**, 7360–7374 (2017).
84. Seon Rang Woo, Young Taek Oh, Jae Yeol An, Bong Gu Kang, D.-H. N. & Kyeong Min Joo. Glioblastoma specific antigens, GD2 and CD90, are not involved in cancer stemness. *Anat. Cell Biol.* **48**, 44–53 (2015).
85. Valtorta, S. *et al.* Metformin and temozolomide, a synergic option to overcome resistance in glioblastoma multiforme models. *Oncotarget* **8**, 113090–113104 (2017).
86. Kang, S.-G. *et al.* Potential use of glioblastoma tumorsphere: clinical credentialing. *Arch. Pharm. Res.* **38**, 402–407 (2015).
87. Chen, J.-H., Lee, D.-C., Chen, M.-S., Ko, Y.-C. & Chiu, I.-M. Inhibition of Neurosphere Formation in Neural Stem/Progenitor Cells by Acrylamide. *Cell Transplant.* **24**, 779–796 (2015).
88. Ledur, P. F. *et al.* Extracellular ATP reduces tumor sphere growth and cancer stem cell population in glioblastoma cells. *Purinergic Signal.* **8**, 39–48 (2012).
89. Weiswald, L.-B., Bellet, D. & Dangles-Marie, V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* **17**, 1–15 (2015).
90. Iacopino, F. *et al.* Isolation of cancer stem cells from three human glioblastoma cell lines: Characterization of two selected clones. *PLoS One* **9**, (2014).
91. Rahman, M. *et al.* Neurosphere and adherent culture conditions are equivalent for malignant glioma stem cell lines. *Anat. Cell Biol.* **48**, 25–35 (2015).
92. Allen, M., Bjerke, M., Edlund, H., Nelander, S. & Westermark, B. Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. *Sci. Transl. Med.* **8**, 354re3-354re3 (2016).
93. Mullins, C. S. *et al.* Establishment and Characterization of Primary Glioblastoma Cell Lines from Fresh and Frozen Material: A Detailed Comparison. *PLoS One* **8**, e71070 (2013).
94. Liang, C.-C., Park, A. Y. & Guan, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* **2**, 329–333 (2007).
95. Brehar, F. M. *et al.* The development of xenograft glioblastoma implants in nude mice brain. *J. Med. Life* **1**, 275–286 (2008).
96. Chen, Q. *et al.* Autophagy suppression potentiates the anti-glioblastoma effect of asparaginase in vitro and in vivo. *Oncotarget* **5**, (2017).

97. Nakahata, A. M. *et al.* Human Glioblastoma Cells Display Mesenchymal Stem Cell Features and Form Intracranial Tumors in Immunocompetent Rats. *J. Stem Cells* **5**, 103–111 (2010).
98. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
99. L Ramos, T. *et al.* MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry. *Cell Commun. Signal.* **14**, 2 (2016).
100. Lin, C. *et al.* Reconstituting Glioma Perivascular Niches on a Chip for Insights into Chemoresistance of Glioma. *Anal. Chem.* [acs.analchem.8b02133](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02133) (2018). doi:10.1021/acs.analchem.8b02133
101. Gregory P. Marshall, Brent A. Reynolds & Eric D. Laywell. Using the Neurosphere Assay to Quantify Neural Stem Cells In Vivo. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **8**, 141–145 (2007).
102. Günther, H. S. *et al.* Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene* **27**, 2897–2909 (2008).
103. Chen, R. *et al.* A Hierarchy of Self-Renewing Tumor-Initiating Cell Types in Glioblastoma. *Cancer Cell* **17**, 362–375 (2010).
104. Gilder, A. S. *et al.* The Urokinase Receptor Induces a Mesenchymal Gene Expression Signature in Glioblastoma Cells and Promotes Tumor Cell Survival in Neurospheres. *Sci. Rep.* **8**, 2982 (2018).
105. Avril, T. *et al.* CD90 Expression Controls Migration and Predicts Dasatinib Response in Glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* **23**, 7360–7374 (2017).
106. Pavon, L. F. *et al.* Mesenchymal Stem Cell-like Properties of CD133+ Glioblastoma Initiating cells. *Oncotarget* (2014). doi:10.18632/oncotarget.9658
107. Feng, L., Ma, J., Ji, H., Liu, Y. & Hu, W. miR-330-5p suppresses glioblastoma cell proliferation and invasiveness through targeting ITGA5. *Biosci. Rep.* **37**, 20170019 (2017).
108. Kim, E. H., Song, H. S., Yoo, S. H. & Yoon, M. Tumor treating fields inhibit glioblastoma cell migration, invasion and angiogenesis. *Oncotarget* **7**, 65125–65136 (2016).
109. Lee, K. P., Kim, J.-E., Park, W.-H. & Hong, H. Regulation of C6 glioma cell migration by thymol. *Oncol. Lett.* **11**, 2619–2624 (2016).
110. Humphries, M. J. Cell adhesion assays. in *Extracellular Matrix Protocols* **522**, 203–210. (2009).
111. Ke, N., Wang, X., Xu, X. & Abassi, Y. A. The xCELLigence System for Real-Time and Label-Free Monitoring of Cell Viability. in *Methods in Molecular Biology* (ed. Stoddart, M. J.) **740**, 33–43 (Humana Press, 2011).
112. Yuan, L. *et al.* Growth factor receptor-Src-mediated suppression of GRK6 dysregulates CXCR4 signaling and promotes medulloblastoma migration. *Mol. Cancer* **12**, 18 (2013).
113. Kho, D. *et al.* Application of xCELLigence RTCA biosensor technology for revealing the profile and window of drug responsiveness in real time. *Biosensors* **5**, 199–222 (2015).
114. Wick, W. & Platten, M. Understanding and Treating Glioblastoma. *Neurol. Clin.* **36**, 485–499 (2018).
115. Osswald, M. *et al.* Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature* **528**, 93–98 (2015).

116. Oraiopoulou, M.-E. *et al.* In Vitro/In Silico Study on the Role of Doubling Time Heterogeneity among Primary Glioblastoma Cell Lines. *Biomed Res. Int.* **2017**, 8569328 (2017).
117. Frenster, J. D., Inocencio, J. & Placantonakis, D. G. Lentiviral Transduction of Primary Human Glioblastoma Cultures. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (ed. Placantonakis, D. G.) **1741**, 81–89 (Humana Press, 2018).
118. Wan, F. *et al.* The Utility and Limitations of Neurosphere Assay, CD133 Immunophenotyping and Side Population Assay in Glioma Stem Cell Research. *Brain Pathol.* **20**, 877–889 (2010).
119. Rege, T. A. & Hagood, J. S. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J.* **20**, 1045–1054 (2006).
120. Joseph, J. V *et al.* Serum-Induced Differentiation of Glioblastoma Neurospheres Leads to Enhanced Migration/Invasion Capacity That Is Associated with Increased MMP9. *PLoS One* **10**, e0145393 (2015).
121. Cai, X., Sughrue, M. E., Cai, X., Sughrue, M. E. & Sughrue, X. C. and M. E. Glioblastoma: new therapeutic strategies to address cellular and genomic complexity. *Oncotarget* **9**, 9540–9554 (2018).
122. Frenster, J. D. & Placantonakis, D. G. Establishing Primary Human Glioblastoma Tumorsphere Cultures from Operative Specimens. in *Glioblastoma: Methods and Protocols* (ed. Placantonakis, D. G.) **1741**, 63–69 (Humana Press, 2018).
123. Liu, Q. *et al.* Long noncoding RNA GAS5 regulates the proliferation, migration, and invasion of glioma cells by negatively regulating miR-18a-5p. *J. Cell. Physiol.* (2018). doi:10.1002/jcp.26889
124. Chang, H.-H., Cheng, Y.-C., Tsai, W.-C., Tsao, M.-J. & Chen, Y. Pyr3 Inhibits the Progression of Human Glioblastoma Cells Original Paper Pyr3 Induces Apoptosis and Inhibits Migration in Human Glioblastoma Cells. *Cell Physiol Biochem* **48**, 1694–1702 (2018).
125. Gao, Y.-F., Zhu, T., Chen, J., Liu, L. & Ouyang, R. Knockdown of collagen  $\alpha$ -1(III) inhibits glioma cell proliferation and migration and is regulated by miR128-3p. *Oncol. Lett.* **16**, 1917–1923 (2018).
126. Cruceru, M. L. *et al.* Signal transduction molecule patterns indicating potential glioblastoma therapy approaches. *Oncotargets Ther.* **6**, 1737–1749 (2013).
127. Bravo, D. D., Chernov-Rogan, T., Chen, J. & Wang, J. An impedance-based cell contraction assay using human primary smooth muscle cells and fibroblasts. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **89**, 47–53 (2018).
128. Cordes, N. & Meineke, V. Cell Adhesion-Mediated Radioresistance (CAM-RR) Extracellular Matrix-Dependent Improvement of Cell Survival in Human Tumor and Normal Cells in Vitro. *Strahlentherapie und Onkol.* **179**, 337–344 (2003).

# ANEXO 1

**Tabela 1 Valores de intensidade mediana de fluorescência de diferentes grupos celulares.** Para avaliar a intensidade da fluorescência na expressão de CD90, foram aferidos os seguintes valores pelo sistema FlowJo de análise estatística. Para a construção das tabelas 3 e 4 desse trabalho, os valores obtidos nos grupos celulares com o anticorpo anti-CD90 foram subtraídos dos valores do controle isotópico a fim de retirar ruídos na análise.

	<b>WT (controle isotópico)</b>	<b>WT (anti-CD90)</b>	<b>shCD90 (controle isotópico)</b>	<b>shCD90 (anti-CD90)</b>
<b>GLIO1</b>	337	905	224	549
<b>GLIO2</b>	115	14737	184	4775
<b>GLIO1 N</b>	70,1	109	110	127
<b>GLIO2 N</b>	29	1064	26	273