



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

**ESTUDO IN VITRO DA FUNÇÃO DE CD90 EM CÉLULAS-TRONCO
TUMORAIS DE GLIOBLASTOMA**

LISSETH YAMILE BUESAQUILLO FIGUEROA

BRASÍLIA - DF, 2021

LISSETH YAMILE BUESAQUILLO FIGUEROA

**ESTUDO IN VITRO DA FUNÇÃO DE CD90 EM CÉLULAS-TRONCO
TUMORAIS DE GLIOBLASTOMA**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia Animal como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Mara de Oliveira

BRASÍLIA, 2021

LISSETH YAMILE BUESAQUILLO FIGUEROA

**ESTUDO IN VITRO DA FUNÇÃO DE CD90 EM CÉLULAS-
TRONCO TUMORAIS DE GLIOBLASTOMA**

Dissertação de mestrado 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. Fernanda Paulini (Membro Titular)

Dra. Tatiana Sibov (Membro Titular)

Prof. Dra. Aline Pic Taylor (Suplente)

Dedico este trabalho à minha mãe, que mesmo quando eu me encontrava distante da minha terra, família, cultura e amigos, foi minha força e motivação incondicional para realizar meus sonhos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida.

À minha mãe, Maria Figueroa, uma mulher guerreira que me ensinou que temos que lutar sempre por nossos sonhos e que vale a pena fazer sacrifícios para alcançar aqueles sonhos que aparentemente são os mais difíceis, contudo, não impossíveis, sendo satisfeitos durante o caminho.

À minha querida orientadora Prof. Dra. Daniela Mara de Oliveira pela maravilhosa oportunidade de aprendizado, pela confiança em acreditar em mim, me fazendo aprender que somos capazes de superar nossos limites e ser melhores a cada dia.

Ao Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo pela disponibilização do laboratório e da sala de cultivo celular, imprescindível para a realização dos experimentos.

Aos estimados colegas Graziela Alves, Monique Azevedo, Eduardo Senna e Professor Dr. Cesar Sousa, pela grande colaboração nos experimentos e viradas de noites para cumprir com nossos objetivos dos experimentos.

Meus agradecimentos a todos os colegas do Laboratório de Genética e Morfologia da UNB.

Ao Doutor Carpaneda por nos conceder as amostras e aos pacientes que deram o consentimento.

Aos estimados professores e grandes profissionais do laboratório de Genética e Morfologia.

À Universidade de Brasília e aos mestres dessa Instituição.

Ao Centro Universitário do Distrito Federal-UDF pelo grande apoio à pesquisa científica.

À CAPES pelo apoio financeiro.

En medio de la dificultad reside la oportunidad.

Albert Einstein.

RESUMO

Gliomas são tumores que se originam das células da glia, os quais incluem um grupo heterogêneo de tumores, sendo o glioblastoma multiforme (GBM) aquele de maior agressividade e pior prognóstico. O GBM grau IV caracteriza-se por ser policlonal e de grande heterogeneidade clínica e morfológica, tendo grande recorrência tumoral e resistência aos tratamentos. Ainda hoje, o entendimento da gênese dos tumores do Sistema Nervoso é um desafio que dificulta a obtenção de terapias mais seguras e tratamentos mais eficazes, dessa forma, inúmeras pesquisas dentro dessa temática buscam a caracterização da célula-tronco tumoral com o intuito de esclarecer questões sobre a biologia do tumor e o seu tratamento. A glicoproteína CD90 (Thy-1) é um marcador celular presente em células tronco de glioblastomas e também em outros tipos de câncer e células não-tumorigênicas. Sabe-se que essa molécula está envolvida em processos de adesão, proliferação e migração, bem como está relacionada com a oncogênese de alguns tumores, sendo apontada como um promissor marcador, além de ser marcador de células de câncer e não cancerígenas ser um marcador de células-tronco para estes tumores, contudo, pouco se sabe, sobre a relação entre CD90 e a morfologia e a função dentro da morfogênese de glioblastomas. Assim, esta pesquisa teve como objetivo estabelecer a relação entre o marcador CD90 com a morfologia e capacidade tumorigênica e de diferenciação *in vitro*. **Assim, o objetivo deste trabalho foi de obter** linhagens primárias de células de glioblastoma humano com expressão reduzida de CD90 para investigar a função de CD90 no potencial de diferenciação de células de glioblastoma. Foi avaliada a função de CD90 por meio da caracterização morfológica e de potenciais de diferenciação osteogênica, adipogênica e neuronal, utilizando meios indutores específicos, em células primárias de glioblastoma multiforme. Foi estabelecida uma população de células para estudo por meio da redução da expressão de CD90, usando vetores lentivirais que expressam shRNACD90, e outra subpopulação desta, pela separação de células com uma coluna magnética e anticorpos anti-CD90, além de grupos controles para cada análise. O presente trabalho mostrou que a progressiva redução da expressão de CD90 resultou em menor eficiência nas capacidades de formação de neurosfera e de diferenciação osteogênica e adipogênica dessas células. Surpreendentemente, observou-se que a ablação de CD90 parece favorecer um pouco a diferenciação neuronal das células de glioblastoma. Dessa maneira, o estudo sugere que a CD90 afeta negativamente a capacidade das célula-tronco de glioblastoma de gerar tumor e sua capacidade de diferenciação.

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

ABSTRACT

Gliomas are tumors originated from glial cells and included in a heterogeneous group of tumors, with glioblastoma multiforme (GBM) being the most aggressive and having the worst prognosis. GBM grade IV is characterized by being polyclonal and of great clinical and morphological heterogeneity, with great tumor recurrence and resistance to treatments. Even today, understanding the genesis of tumors in the Nervous System is a challenge that makes it more difficult to obtain safer therapies and more effective treatments, therefore, numerous researches within this theme seek to characterize the tumor stem cell in order to clarify questions about the biology of the tumor and its treatment. The glycoprotein CD90 (Thy-1) is a cellular marker present in stem cells of glioblastomas and also in other types of cancer and non-tumorigenic cells. It is known that this molecule is involved with adhesion, proliferation and migration processes and is related to the oncogenesis of some tumors, being pointed out as a promising stem cell marker for these tumors, however, little is known about the relationship between CD90 and the function morphology of glioblastomas. Thus, this research aimed to establish the relationship between the CD90 marker and the tumorigenic and differentiating morphology and capacity *invitro*. **Objective:** To obtain primary human glioblastoma cells with reduced CD90 expression to investigate the role of CD90 in the differentiation potential of glioblastoma cells. **Methodology:** The function of CD90 was evaluated through the morphological and potential characterization of osteogenic, adipogenic and neuronal differentiations, using specific inducing means, in primary cells of glioblastoma multiforme. A population of cells was collected for study by reducing the expression of CD90, using lentiviral vectors that express shRNACD90, and another subpopulation of this, through the separation of cells using a magnetic and anti-CD90 column, in addition to control groups for each analysis. **Results:** Our work showed that the progressive reduction of CD90 expression resulted in less efficiency in the capacities of neurosphere formation and osteogenic and adipogenic differentiation of these cells. Surprisingly, we found that CD90 ablation favors neuron differentiation from glioblastoma cells. **Conclusion:** The study suggests that CD90 negatively affects the ability of glioblastoma stem cells to generate a tumor and also affects their ability to differentiate.

Keywords: glioblastoma multiforme, GBM, CD90, cancer, cancer stem cell.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cenários que envolvem células-tronco cancerígenas.....	17
Figura 2. Representação de tumores no SNC em adultos.....	20
Figura 3. Delineamento experimental.....	31
Figura 4. Morfologia das células primárias.....	38
Figura 5. Morfologia das células Glio 3.....	40
Figura 6. Oncoesferas do grupo GLIO 2.....	41
Figura 7. Oncoesferas dos grupos GLIO 3.....	41
Figura 8. Quantificação de oncoesferas.	43
Figura 9 - Ensaio de diferenciação adipogênica em amostras 2 e 3.....	44
Figura 10 - Ensaio de diferenciação osteogênica em amostras 2 e 3.....	45
Figura 11. Diferenciação neuronal.....	46
Figura 12. Imunofluorescência usando o anticorpo anti beta-Tubulina III com Poli-L-Ornitina/Laminina.....	48
Figura 13: Imunofluorescência usando o anticorpo anti beta-Tubulina III com Geltrex.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AdMSCs Células-Tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo

Bad Gene pro-apoptótico

Bax Gene pro-apoptótico

Bcl-2 Protooncogene de linfoma de células B2

CD105 Glicoproteína CD105

CD133 Glicoproteína CD133

CD73 Glicoproteína CD73

CD90 Glicoproteína CD90

CSC Células-tronco cancerosas

CT Célula tronco

CTC Célula tronco de câncer

CTG Célula tronco da glia

CTN Célula tronco neuronal

DV Dorso ventral

DMEM Meio Eagle modificado por Dulbecco

DMEM-LG Meio Eagle modificado por Dulbecco-Baixa Glicose

EGFR Receptor do fator de crescimento epidermal

EMT Transição epitelial - mesenquimal

FAK Focal adesão quinasse

Fas Gene ligante de apoptose

GBM Glioblastoma multiforme

GEM Departamento de Genética e Morfologia

GFAP Proteína ácida fibrilar glial

GLIO Glioblastoma

GLIO2 Célula primária de glioblastoma multiforme do paciente 2

GLIO3 Célula primária de glioblastoma multiforme do paciente 3

GLIO4 Célula primária de glioblastoma multiforme do paciente 4

IB Instituto de Ciências Biológicas

IDH Isocitrato desidrogenase

LITT Terapia a laser térmica intersticial

LOH Perda de heterogocidade

LMA Leucemia mieloide aguda

MACS Células ativadas magneticamente

MET Metformina

MGMT O6 -metilguanina-DNA-metiltransferase

MHC Complexo de histocompatibilidade maior

mRNA RNA mensageiro

MSC Células mesenquimais

NEE Núcleo estriado esquerdo

OMS Organização Mundial de Saúde

PBS Tampão fosfato salino

PCR Reação em Cadeia da Polimerase

PDGFRB Fator do crescimento derivado de plaquetas beta

PI3K Fosfoinositol 3-quinase

PTEN Homólogo tensina fosfato

SFB Soro fetal bovino

Sh-RNA “Short harpin scramble” controle

SNC Sistema Nervoso Central

SoX2 Proteína SRY-box 2

SRC Proto-oncogene tyrosine-protein kinase

THY-1 Glicoproteína CD90

TMZ Temozolomida

TTF Tratamento de tumores

UnB Universidade de Brasília

WT Células de controle

N2 Suplemento que é usado para o crescimento e expressão dos neurônios em culturas primárias.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Câncer.....	15
1.2 Células-tronco do câncer (CTC)	15
1.3 Câncer no sistema nervoso central.....	19
1.3.1 Glioblastoma multiforme (GBM)	21
1.3.2 Marcadores de GBM	25
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVO	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Estabelecimento das Linhagens Primárias de Glioblastoma	30
4.2 Estabelecimento de Linhagens Primárias de MSCs (células controle)	30
4.3 Redução da expressão de CD90.....	32
4.4 Obtenção de populações de GBM com menor expressão de CD90.....	33
4.5 Avaliação da ablação de CD90 na formação de oncosferas.....	33
4.6 Avaliação do efeito da ablação de CD90 na propriedade de diferenciação osteogênica e adipogênica de células de glioblastomas.....	34
4.7 Cultivo de subesferas para diferenciação neuronal.....	34
5. RESULTADOS	36

5.1 Estabelecimento da cultura primária de glioblastomas.....	36
5.2 Transdução lentiviral.....	36
5.3 Formação de neurosféricas.....	38
5.4 Diferenciação adipogênica e osteogênica	41
5.5 Diferenciação neuronal.....	43
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÃO.....	52
8. BIBLIOGRAFIA	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é uma das doenças mais mortal e desafiadora do mundo, sendo definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS)¹ como um processo descontrolado de disseminação e crescimento de células anormais. Essa doença se caracteriza por invadir tecidos adjacentes e/ou remotos e causar tumores, em um processo denominado metástase. Desde 1971, a importância da angiogênese (criação de novos vasos sanguíneos) para a progressão da metástase de alguns tumores sólidos foi estabelecida². A vascularização é importante para o crescimento dos tumores, já que muitas células cancerígenas dependem do aporte de oxigênio e nutrientes fornecidos pelo sistema circulatório. Assim, a formação de novos vasos é necessária para o crescimento do tumor quando os limites da difusão de oxigênio forem excedidos.

Estudos recentes revelaram que existe um processo não angiogênico pelo qual os tumores também sequestram vasos sanguíneos pré-existentes e células cancerígenas se infiltram entre os tecidos desses vasos para se incorporar e, por consequência, formar um tumor secundário³. A capacidade metastática está relacionada diretamente às células tronco de câncer (CTC), que, ao se difundirem pelo organismo, podem se autorreplicar, gerando cópias de si e, ao se diferenciarem, formarão os outros tipos de células especializadas encontradas no tumor⁴.

1.2 Células-tronco do câncer (CTC)

As células-tronco (CT), conceitualmente, apresentam uma capacidade potencial de autorreplicação e diferenciação. São células necessárias no processo de desenvolvimento dos órgãos no embrião e, depois do nascimento, elas participam nos processos de crescimento e reparação. Geralmente, essa capacidade de divisão ocorre de uma maneira assimétrica, pela qual é gerada uma célula-filha idêntica com o objetivo de manter a homeostase de CT, e outra célula que é uma célula especializada. Já na

divisão simétrica, são geradas duas célula-filhas idênticas para manutenção de população das CT⁵.

As CT podem ser classificadas de acordo a sua plasticidade e potencial regenerativo sendo: totipotentes (com a habilidade de se diferenciar em células das três linhagens germinativas: ectoderma, mesoderma e endoderma, incluindo placenta), pluripotentes (com habilidade similar das anteriores, excluindo placenta), multipotentes (com capacidade de se diferenciar em um tipo de linha germinativa), oligopotentes (com habilidade de se diferenciar em alguns tipos de células) e unipotentes (que podem produzir células de um único tipo de especialização)^{6,7,8}.

As células progenitoras, também conhecidas por células-tronco adultas, de alguns tecidos mantêm a capacidade de autorrenovação, expressando marcadores de CT e sofrendo a divisão celular simétrica e assimétrica. Na fase adulta, estas células que já se encontram comprometidas com uma ou mais linhagens celulares, podem se autorrenovar e se diferenciar em pelo menos um tipo de célula dentro do tecido que está presente. Assim, desempenham papéis importantes na homeostase geral do tecido e no reparo em resposta a lesões⁹.

As CT podem ser encontradas, por exemplo, na medula óssea e no sangue do cordão umbilical, mas como dogma atual, cada órgão do corpo possui um reservatório de CT para poder renovar as células daquele tecido ao longo da vida¹⁰. A formação de um nicho para manutenção de CT/progenitoras que se dividem lentamente, mantendo um reservatório, parece ser comum a todos os tecidos que requerem geração contínua de progênie terminalmente diferenciada, seja para crescimento, regeneração e homeostase¹⁰.

Na biologia do câncer, as CT também são encontradas e estão relacionadas com a gênese e manutenção tumoral¹¹. Acredita-se que por meio de auto renovação e de diferenciação, uma CT não cancerígena pode sofrer mutações causando a formação de tumores primários que são favorecidos por esta mesma propriedade de autorrenovação celular. Este mecanismo de autorrenovação parece contribuir para a resistência aos tratamentos, tais como quimioterapia, radioterapia e para o processo metástase, conforme ilustrado na Figura 1. Além disso, as CT sobrevivem por muito mais tempo que as células comuns, pois formam uma reserva, o que aumenta a chance de acumularem

mutações genéticas que podem levar a perda do controle sobre sua autorrenovação e crescimento.

De maneira importante, as CTC também são responsáveis pela heterogeneidade das células tumorais, que além de conferirem melhor desenvolvimento da massa tumoral, também estão relacionadas com tumores residuais posterior às terapias aparentemente bem-sucedidas. Isso porque, geralmente, os tratamentos atacam apenas um ou alguns tipos de células-alvo tumorais em atividade proliferativa alta, podendo não afetar as que estão em estado quiescente, como no caso de muitas CT¹².

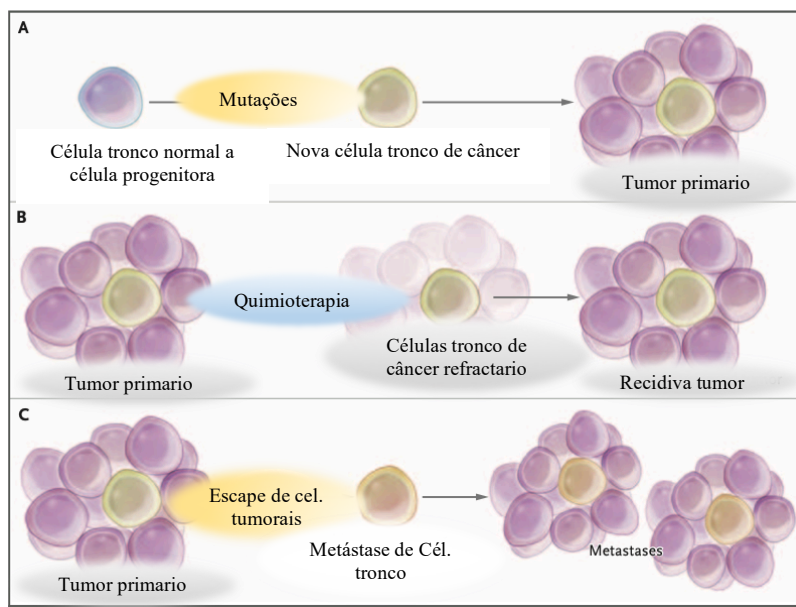


Figura 1. Cenários que envolvem células-tronco cancerígenas. Primeiro, a mutação de uma CT não tumoral dá origem a uma CTC, que gerará um tumor primário (A). Em um segundo cenário, durante o tratamento com quimioterapia, a maioria das células em um tumor primário pode ser destruída, mas se as CTC não forem erradicadas, o tumor pode inicialmente regredir e, posteriormente causar uma recidiva (B). Em um terceiro cenário, as CTC decorrentes de um tumor primário podem migrar para locais distantes, estabelecerem-se e gerar novos tumores com as mesmas propriedades e características do original (C)⁴. Figura modificada⁴.

A teoria de que o câncer poderia ser causado por um tipo de CTC surgiu no século XIX, quando os primeiros patologistas, como Julius Cohnheim, em 1875, descreveram tumores de tecido adulto que tinham propriedades de tecidos fetais. Eles acreditavam que, por alguma mudança no ambiente celular, esse tecido retornava ao estado de

divisão celular e diferenciação aumentados e produzem massas celulares que parecem “órgãos monstruosos”, formando os tumores no tecido adulto. Esta teoria foi denominada “descanso embrionário”^{12,13}.

No ano 1937, Furth e Kahn inocularam em camundongos consanguíneos populações de células isoladas a partir de um modelo experimental de leucemia, e observaram que somente algumas células (5% das inoculações realizadas) tinham a capacidade de gerar tumores causando a morte deles. Esta pequena subpopulação de células leucêmicas que poderiam iniciar e manter o câncer, em contraste ao restante das células leucêmicas que não tinham a capacidade de formar tumores, foram identificadas como CTC¹⁴.

Em 1997, Bonnet demonstrou a presença das CTC na Leucemia Mieloide Aguda (LMA), especificamente uma população de células CD34+ CD38- que foram marcadoras de células progenitoras para Leucemia Mieloide Aguda apresentava propriedades de autodiferenciação e autorrenovação. Quando inoculado em camundongos diabéticos/imunodeficientes esta população atuou como CT com a capacidade de gerar a LMA nesses animais¹⁵. Mais tarde, CTC foram descritas também em tumores sólidos, como tumores de mama, pulmão, fígado, cabeça e pescoço, pâncreas, estômago, glioma e câncer de bexiga^{16,17,18,19,20}.

A instabilidade genética em CT somáticas normais que favorecem a autorrenovação normal e a aquisição do potencial de diferenciação pode gerar CTC. As principais vias envolvidas na autorrenovação e diferenciação das CTs parecem estar alteradas em vários tipos de CTCs e algumas já foram identificadas. Dentre as vias mais comuns estão: a via Hedgehog²¹, a via Notch^{22,23,24}, a via WNT/ β -catenina²⁵, a desregulação das proteínas HMGA2²⁶, Bcl-2^{27,28}, as proteínas Bmi-1 e P13K/ e a via AKT/mTOR. Assim, especula-se que estas vias participem da gênese e/ou manutenção de algumas CTC, estando relacionadas com a manutenção celular e a progressão tumoral, além de poderem também aumentar a expressão da telomerase e a capacidade de evadir ou impedir a apoptose²⁹.

Os avanços na identificação de vias moleculares alteradas que regulam as propriedades relacionadas às CTs contribuem para a compreensão dos mecanismos que regulam a manutenção e a sobrevivência destas, bem como suas propriedades de

evasão imunológica e as interações delas com o microambiente tumoral³⁰. Além de serem alvos de possíveis estratégias terapêuticas.

Entretanto, o reconhecimento das CTC de um tumor ainda é um desafio atual. Inúmeras pesquisas têm como alvo estudar os marcadores biológicos dessas células, como o objetivo de identificá-los e elucidar suas possíveis correlações na biologia do tumor e, esperançosamente, encontrar uma pista para uma terapia efetiva. Os biomarcadores parecem ter diferentes funções na biologia celular dependendo do tecido ou órgão no qual as células estão. Por exemplo, nos tumores sólidos de mama, os biomarcadores CD44 e CD24 se relacionam com um pior prognóstico³¹. Mas, dezenas de milhares de células saudáveis com fenótipos que não são tumorigênicos também podem expressar os mesmos biomarcadores no corpo humano³².

Portanto, os biomarcadores são utilizados também como uma ferramenta que podem levar à identificação do local em que as CTCs se encontram, bem como possibilitar a avaliação de como estas estão sendo anormalmente ativadas. Em estudos envolvendo sistema nervoso, os marcadores para células-tronco neuronais mais usados são: CD133, SOX1, SOX2, Nestin³³.

1.3 Câncer no sistema nervoso central

O Sistema Nervoso Central (SNC) é composto por encéfalo e medula espinhal. O parênquima cerebral humano contém tipos de células chamadas gliais, sendo essas subdivididas em: astrócitos (20%), células precursoras de oligodendrocitos (OPCs, 3 a 10%), oligodendrócitos (25%) e micróglia (5 a 15%)³⁴. Em condições normais, a neurogênese é mediada pelas células tronco neurais (CTN). Em humanos, nichos de CTN foram identificados na região subgranular do giro dentado localizado no hipocampo e são estas as encarregadas de manter a homeostase gerando novos neurônios³⁵. As CTNs têm a capacidade de formar neuroesferas *in vitro* quando estimuladas. As CTNs podem ser caracterizadas por genes ou proteínas, dentre elas: nestina, GFAP, vimentina, Gli1, Sox2, Tuj1, MAP2, CD184, CD56, Notch 1, CD133, Sox2, Hes5 ou Lfng³⁶.

Mundialmente, o câncer no SNC representa aproximadamente 2% de todos os tumores malignos, e 90% desses tumores são no cérebro. A OMS classifica os tumores em quatro níveis dependendo da agressividade, em escala crescente³⁷, mais também

atualmente esta sendo classificados dependendo as alterações genéticas e moleculares que se encontram no microambiente tumoral dando importância nas proteínas e genes específicos alterados³⁸. Na figura 2, o tipo de tumores no SNC são apresentados de acordo com a morfologia³⁷.

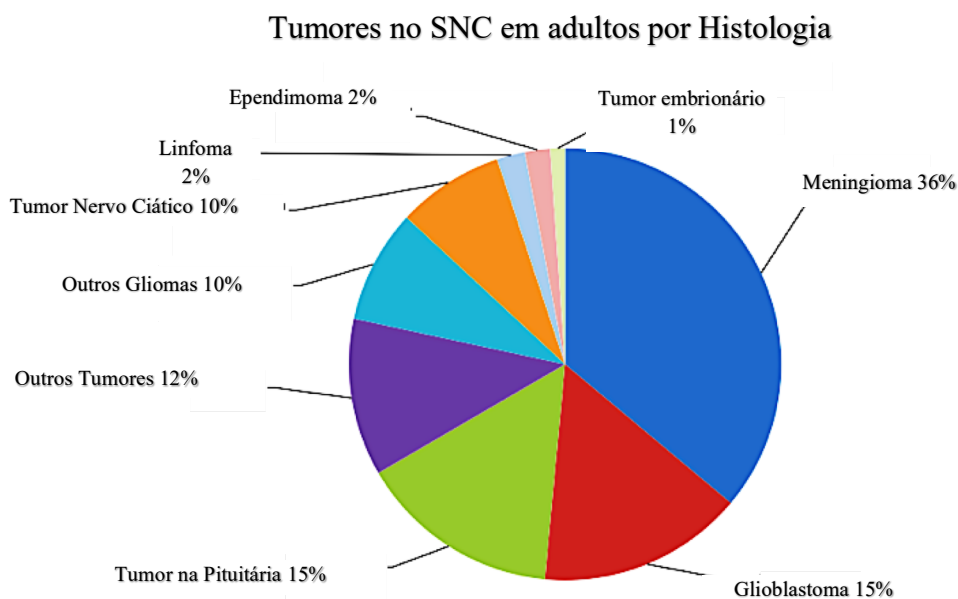


Figura 2. Representação de tumores no SNC em adultos³⁷.

O cérebro conta com a barreira hematoencefalica que pode prevenir a interação de células cancerígenas e até a sua evasão para outros sítios, dificultando a formação de metástases fora da região cerebral³⁹. Entretanto, estima-se que entre 25 - 30% dos pacientes com câncer desenvolvem metástase no cérebro durante o curso da doença⁴⁰, causando tumores secundários intracranianos e extracranianos^{41, 42}. Portanto, a barreira hematoencefalica não funciona como uma barreira de proteção natural muito eficiente.

Estima-se que a taxa de incidência média anual ajustada por idade de todos os tumores cerebrais primários malignos e não malignos e outros tumores do SNC para os anos de 2013-2017 foi de 23,79 por 100.000, sendo que foi maior em mulheres em comparação com homens (26,31 contra 21,09 por 100.000), negros ligeiramente mais altos em comparação com brancos (23,88 contra 23,83 por 100.000) e maior em não hispânicos (de qualquer raça) em comparação com hispânicos (24,23 contra 21,48 por

100.000). A taxa de incidência média anual ajustada à idade de tumores malignos primários do cérebro e outros tumores do SNC foi de 7,08 por 100.000, aproximadamente 29,7% de todos os tumores cerebrais primários e outros tumores do SNC eram malignos e 70,3% eram não malignos, o que torna os tumores não malignos duas vezes mais comuns que os tumores malignos.

O tumor maligno primário de ocorrência mais comum no cérebro e outro tumor do SNC foi o glioblastoma (14,5% de todos os tumores e 48,6% dos tumores malignos), e o tumor primário não maligno mais comum foi o meningioma (38,3% de todos os tumores e 54,5% dos não tumores malignos). O glioblastoma era mais comum em homens e o meningioma era mais comum em mulheres, houve 81.246 mortes atribuídas a tumores cerebrais malignos primários e outros tumores do SNC para o período de cinco anos entre 2013 e 2017 representando uma taxa de mortalidade anual média de 4,42 por 100.000, e uma média de 16.249 mortes por ano causadas por cérebro maligno primário e outros tumores do SNC⁴³.

Os gliomas pertencem ao grupo dos tumores neuroepiteliais e correspondem a 80% dos tumores malignos do sistema nervoso central, além do 30% dos tumores primários, infelizmente, também apresentam o prognóstico mais desfavorável e que, apesar de avanços nas áreas de neurocirurgia, técnicas de neuroimagem e terapias pós-operatórias adjuvantes ainda seguem sendo de mais difícil diagnóstico e tratamento, com consequente pior prognóstico^{44,45}.

A classificação dos gliomas é realizada de acordo com as anormalidades citogenéticas moleculares e patológicas que apresentam os tumores. Quando essas alterações oncogênicas ocorrem em células astrocíticas, geram o astrocitoma, um dos tumores mais agressivos, de acordo a última classificação da OMS^{44,46,47,48}. Uma variante dos astrocitomas são os glioblastomas, que são o tipo de neoplasia mais agressiva da linhagem astrocítica e o tumor cerebral primário mais comum em adultos. O glioblastoma apresenta células pleomórficas, heterogêneas, com acentuada atipia nuclear e atividade mitótica rápida ^{44,46,47,48}.

Recentemente foi publicado que a classificação dos cânceres cerebrais podem ser classificados incluindo necessariamente os aspectos moleculares, relatando a importância das mutações, deleções, LOH, metilações do DNA, co-deleções e outras

alterações genéticas que podem se apresentar no microambiente tumoral dos cânceres cerebrais sendo que genes e proteínas estão sendo alteradas fazendo que a biogênese e morfologia do câncer seja mais agressivo e difícil de diagnosticar, e interessante que possamos conhecer quais vias da sinalização celular e quais proteínas ajudam neste processo e estão sendo afetadas para poder assim achar marcadores promissórios que podem ajudar a identificar o tipo de câncer para ter um melhor prognóstico para o paciente^{49,50,51}.

Os oligodendrogliomas são tumores que afetam os oligodendrócitos e são caracterizados por células redondas de tamanho constante, cercados por um anel de citoplasma muito debilmente manchado, uma rede de capilares finos e calcificações. Os oligoastrocitomas são designados como glioma difusamente infiltrante, composto por uma combinação de dois tipos de células, que se assemelham morfológicamente aos oligodendrogliomas e astrocitomas^{44,46,47,48}.

Os ependimomas atingem as células ependimárias e são geralmente detectados como gliomas de crescimento lento em crianças e adultos jovens, originários das paredes dos ventrículos cerebrais. Os tumores tem características morfológicas e ultraestruturais de diferenciação predominantemente ependimária, como microvilos e estruturas alongadas semelhantes ao canal ependimário embriológico^{44,46,47,48}.

O meduloblastoma é o câncer cerebelar e um dos tumores malignos mais comuns do sistema nervoso central, comumente encontrado em crianças menores de 16 anos. Ele tem quatro classificações de acordo com a OMS que vão do, menos agressivo grau I, até o grau IV como mais agressivo. Apresenta heterogeneidade grande no nível molecular e genético⁵².

A OMS ressalta a importância da classificação molecular no glioblastoma multiforme porque se apresentam alterações moleculares envolvidas na gliomagenese por exemplo as proteínas IDH (isotrato desidrogenase) 1 e 2 que atuam na descarboxilação oxidativa, desempenhando um papel importante no metabolismo dos ácidos tricarboxílicos e na neutralização dos radicais livres de oxigênio na célula, podem sofrer mutações assim a célula reduz a quantidade de alfa-cetoglutarato e começa a acumular radicais livres produzido pelas formas mutantes das enzimas 2-hidroxioglutarato^{53,54}.

1.3.1 Glioblastoma multiforme (GBM)

Os gliomas foram descobertos há aproximadamente 150 anos por Virchow, Percival Bailey e Harvey Cushing⁵⁵. Eles deram a base da classificação dos tumores no SNC segundo a OMS. Inicialmente, foi designado como espongioblastoma multiforme devido à sua aparência heterogênea dada pelas células presentes nas mesmas amostras de tecido tumoral⁵⁵. Acreditava-se firmemente que esse tipo de tumor tinha uma origem celular diferente de outros gliomas, devido às suas células atípicas e polimórficas, sem nenhuma semelhança com as células gliais saudáveis⁵⁶. Com o tempo, ele passou a ser denominado glioblastoma multiforme⁵⁷.

O glioblastoma multiforme (GBM) é o câncer cerebral mais agressivo, de acordo com a OMS, que se caracteriza por ser policlonal e de grande heterogeneidade clínica e morfológica, também apresenta grande recorrência tumoral e resistência aos tratamentos^{58,59}. Também se dá a importância na classificação de incorporar biomarcadores moleculares junto com as características histológicas clássicas com fim de ter um diagnóstico integrado revelando que nos perfis genéticos podem se apresentar alterações genéticas como no caso específico neste tipo de câncer por exemplo a presença ou ausência da mutação do gene IDH 1/2 que já separa os tumores de comportamento agressivo dos tumores mais indolentes; e um segundo marcador que configura é a presença ou ausência da co-deleção (translocação não balanceada dos braços cromossômicos, quebra/troca) do 1p19q neste mesmo gene, presença ou ausência da metilação na região promotora do gene MGMT, mutação do gene ATRX, mutação da TP53, EFGR, e LOH, porém a importância de avaliar ainda mais aqueles processos moleculares que estão sendo característicos do GBM^{51,38}.

Estudos mostram análises importantes confirmando que o GBM é um tumor heterogêneo também em nível molecular que pode ser subdividido em diferentes subtipos (proneural, neural, clássico e mesenquimal) de acordo com a patogênese molecular e entidades biológicas de lesões de "fator condutor". Esta heterogeneidade intratumoral do GBM ainda precisa ser classificada por sequenciamento de célula única para obtenção de uma classificação mais completa e precisa, por tanto os avanços na

classificação molecular do GBM têm permitido a identificação de vias desreguladas que podem representar alvos potenciais para novas estratégias de tratamento⁶⁰.

Um estudo recente com 11 pacientes com GBM demonstrou que estes apresentavam vários tipos celulares: células precursoras de oligodendrócitos, micróglias, neurônios, macrófagos e células com alta atividade proliferativa⁶¹. Estas células foram identificadas com marcadores comumente usados para classificação das células tronco da glia (CTG), sugerindo que as células de glioblastoma tipo glia radial podem estar entre as células progenitoras que propagam os tumores. As células gliais radiais são as que geram a maioria das células neuronais, e existe a hipótese de que algumas destas células fiquem em estado quiescente e que, após o nascimento, devido uma desregulação dão origem as CTC que são as células iniciadoras e mantenedoras do GBM .

Na maioria dos estudos de identificação celular, *in vitro*, a morfologia das células de glioblastoma é caracterizada como alongada⁶². Contudo, elas também já foram descritas microscopicamente como células gigantes, células pequenas, células granulares, epitelioides e células primitivas que contêm componentes neuronais, reforçando a ideia de que é uma cultura heterogênea, o que dificulta sua identificação⁶³. Em 2018, Koh e colaboradores, após analisarem o modo de invasividade das células GBM em um modelo de tumor 3D baseado em uma matriz extracelular descelularizada, identificaram diferentes morfologias celulares acompanhadas por diversas trajetórias e comportamentos migratórios⁶³.

O GBM requer um alto consumo de energia para sustentar sua sinalização proliferativa, escapar aos possíveis supressores de crescimento do tumor, resistir à morte celular, possibilitar a imortalidade replicativa, e induzir a angiogênese, gerando instabilidade do genoma e diversidade genética que acelera seu crescimento, poder inflamatório e metástases. Portanto, a demanda de metabolismo aeróbico alto é uma de suas características⁶⁴ e demonstra uma grande contribuição na gliomagênese. Nesse contexto, já foi relatado que a síntese de ácidos graxos fornece o gradiente de elétrons adequado para a produção de ATP necessário no desenvolvimento do GBM e sua plasticidade metabólica, permitindo que essas células se adaptem ao seu microambiente dinâmico⁶⁵.

O aspecto de heterogeneidade dá ao tumor a capacidade de ser agressivo

porque contém vários fatores genéticos e epigenéticos distintos, além de uma grande variedade de mutações interligadas e independentes. Em um estudo, analisando 37 tumores individuais, por meio de RNA-seq, foi observado que tumores que tinham mais de 2 regiões iguais quase sempre abrigavam vários subtipos moleculares resultando em uma grande heterogeneidade genética, o que dificulta o prognóstico de GBMs⁶⁶. Além disso, a falta de acesso a alguns tumores cerebrais dificulta a obtenção de amostras de tecido⁶⁷.

Vários processos moleculares já foram descritos na tumorigênese do glioblastoma, entre eles estão: a mutação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) associada à inibição da apoptose⁶⁸, a mutação no receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas- α (PDGFRA), que pode contribuir para a formação ou progressão mediante à vascularização e angiogênese⁶⁹, a mutação do gene Neurofibromin 1 que normalmente regula a atividade da via Ras/MAPK (proteínas envolvidas no processo de transdução de sinal de estímulos celulares para mobilidade, motilidade, síntese proteica, proliferação celular) e que no GBM estaria relacionada à proliferação das células cancerígenas, metástase e bloqueio da apoptose⁷⁰.

Outros mecanismos também estão descritos na gênese e classificação do GBM. A mutação da proteína RB, que se encarrega de controlar o ciclo celular, está relacionada à proliferação aberrante das células tumorigênicas no GBM⁷⁰. Da mesma maneira, a sinalização errônea das enzimas citoplasmáticas fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) promove o crescimento e sobrevivência celular. Esta enzima é frequentemente ativada em gliomas infiltrativos e observada em 6 a 15% dos glioblastomas⁷¹. O gene supressor de tumor para PI3K é um homólogo da fosfatase e tensina (PTEN) e parece ajudar na proliferação celular, adesão e invasão, apoptose e reparo de danos ao DNA⁷² e, geralmente, em 40% dos casos se encontram com mutações ou deleções resultando em um pior diagnóstico, com resistência e menor sobrevida para os pacientes^{73,74,75}.

A proteína supressora de tumores P53 é envolvida na regulação do ciclo celular, proliferação e morte através de uma complexa rede de interações que regulam a replicação do DNA. Em caso de dano celular, a P53 ativa várias proteínas para entrarem em apoptose ou senescência celular⁷⁶. Portanto, as alterações da P53 têm papel direto na sobrevivência, progressão, regulação do metabolismo celular e microambiente

tumoral. Já foi descrito que aproximadamente 85-90% dos casos de GBM tem mutações ou inativação desta proteína^{77,78}.

Outra característica do GBM é a perda da heterogenicidade (LOH) que se apresenta em 70% - 80% dos casos. Na LOH existem disjunção mitóticas, perda de um segmento ou um lado do cromossomo, recombinação mitótica entre dois cromossomos homólogos, replicação induzida por quebra do DNA, recombinação entre dois cromossomos não-homólogos (translocação), conversão de genes entre outros. A LOH leva à alteração de certos genes que são supressores de tumores como PTEN e TP53, à exclusão no loci 10q25 (a mais comum no GBM)^{59, 79}, também à perda do *loci* dos cromossomas 6, 9, 13, 19, 22^{80,81,82,83}.

Uma característica achada em várias pesquisa é que o Glioblastoma multiforme quase sempre tem o IDH metilado e a codeleção do 1p/19q, por exemplo um estudo com 118 pacientes de Tailândia com gliomas difusos previamente diagnosticados acharam que 50% dos casos tinham GBM sendo que o diagnostico foi dado pela presença do IDH alterado além de ter relação desses casos com a perda difusa do ATRX nuclear, porém, poderiam ser também diagnosticados como astrocitomas difuso de alto grau ou oligoastrocitoma anaplasico acordo a classificação da OMS mas, só se tomara em conta o exame da histologia, o estudo da importância e ênfase em olhar os aspectos moleculares em cada tipo de câncer que poderia estar envolvidas assim proteínas nos processos da biogênese tumoral como nos casos de GBM e ajudar a esclarecer o diagnostico diferencial evitando falsos negativos⁸⁴.

O melhor entendimento da biologia do GBM pode elucidar o desenvolvimento de novas drogas e tratamentos eficazes. A terapia padrão atual para o GBM é baseada na associação da radioterapia e o fármaco temozolomida (TMZ), mas a resposta não é positiva para a maioria dos pacientes e a expectativa de vida permanece muito limitada (18 meses). Portanto, o uso combinado de quimioterápicos com medicamentos direcionados ao metabolismo celular poderia se tornar uma opção terapêutica para o tratamento desse tipo de câncer⁸⁵.

As diretrizes atuais para o tratamento de GBM recorrente recomendam ações multidisciplinares com terapias adaptadas à situação única de cada paciente, incluindo uma combinação de ressecção, irradiação, terapia a laser térmica intersticial (LITT),

mudança de quimioterapia para monoterapia com bevacizumabe ou combinação com outros medicamentos associado à terapia de campo para tratamento de tumores (TTF). No entanto, a maioria dos tratamentos combinados falhou em prolongar a taxa de sobrevida, geralmente baixa em pacientes com doença progressiva⁸⁶.

Os tratamentos como cirurgia, imunoterapia, quimioterapia, terapia direcionada, terapia hormonal e radioterapia desempenham um papel importante no tratamento do câncer, mas acarretam resistência, sequelas e toxicidade para pacientes com câncer incluído o GBM. Existe, na atualidade, a necessidade de uma terapia com resposta eficaz já que até o momento, os tratamentos não atingem o sucesso esperado e tampouco a cura. Dessa maneira, é possível ressaltar a importância do estabelecimento de um marcador mais específico do GBM e sua patogenicidade.

1.3.2 Marcadores de GBM

Atualmente, o foco das pesquisas na área de GBM tem sido direcionado para a caracterização da primeira célula modificada capaz de gerar o tumor do GBM: a célula-tronco tumoral. Lang e colaboradores, isolaram 32 amostras cirúrgicas de CTC frescas de glioma de alto grau, estabelecendo linhagens primárias a partir dessas amostras e verificaram que porcentagens mais altas de células cancerígenas de GBM se correlacionam com alta coexpressão de genes marcadores de CTC de glioblastoma, como exemplo, o oncogênese EGFR e com a baixa sobrevida geral do paciente⁸⁷.

Recentemente, evidenciou-se subpopulações de células GBM marcadas com marcadores específicos do CTC do GBM (CD90, CD133 e CD29) que foram fortemente positivos na maioria dos 11 tecidos analisados. Também foi observado que células tumorais alteram a expressão do marcador genético após a seleção clonal, provavelmente refletindo uma adaptação ao novo microambiente, tornando o diagnóstico mais difícil. Adicionalmente a população CD133+ não só foi capaz de recapitular a hierarquia tumoral original, mas também de produzir tumores fenocópias que podiam ser transplantados em série para destinatários secundários, fornecendo provas da capacidade de auto-renovação *in vivo*⁸⁸.

Em um estudo *in vivo* e *in vitro*, Valtorta e colegas trabalharam com células de

linhagem U251 e T98G tratadas por 24, 48 e 72h com metformina (MET) combinada com TMZ, e observaram que o tratamento combinado melhora o efeito da TMZ na linhagem celular sensível à TMZ (U251) e excedeu a resistência à TMZ na linha celular T98G GBM. Esse tratamento parece ter modulado a apoptose, aumentando a proporção Bax/Bcl-2 e Bad/Bcl-2, em ambas as linhagens celulares em comparação com tratamentos individuais e reduzido a produção de espécies reativas de oxigênio. Por meio de PCR em tempo real, foi observado o aumento na transcrição do mRNA de CD133 e CD90.

As células mesenquimais (MSC) parecem estar envolvidas no crescimento e propagação do tumor por meio da sua atividade angiogênica. Em testes *in vivo*, recentemente, foi observado que as MSC da medula óssea participam na tumorigenicidade do glioma sendo recrutadas por algumas moléculas expostas ao microambiente tumoral por parte das CTC. Assim, essas células MSC são atraídas e formam uma fusão com as CTC, formando um nicho heterogêneo com crescimento polimórfico e desordenado com a capacidade de ajudar a progressão do GBM. As células marcadas com CD133 se apresentaram em maiores quantidades que as que não tinham a fusão das células, além disso, as células tumorais apresentaram-se com alta atipia, aumento da razão nuclear-citoplasmática e estruturas vasculares mais proliferativas⁸⁹.

Embora o CD133 seja classicamente considerado o pan-marcador de CTC cerebrais, é importante ressaltar que CD133 não é exclusivamente expresso por CTC, sendo expresso também por células não-tumorigênicas, incluindo progenitores neuronais e células epiteliais⁹⁰. Adicionalmente, existe um estudo que demonstra que células CD133- isoladas de tumores cerebrais também apresentam propriedades de células-tronco, mas com mecanismos e morfologias distintas das positivas para o marcador⁹¹. Sendo assim, o CD133 não pode ser considerado um biomarcador ideal ou um alvo adequado para terapias antitumorais neuronais, embora deva exercer um papel importante nas propriedades de auto renovação e diferenciação de tumores cerebrais raros de alto grau.

Alguns grupos observaram que CD90 (Thy-1) também é um marcador celular presente em células tronco de glioblastomas^{92,85,86,87}. Esta glicoproteína é superexpressa em diversos tipos de câncer e células não-tumorigênicas, como por exemplo, células mesenquimais (MSC)⁸. A CD90 está envolvida com processos de adesão, proliferação e

migração em alguns estudos que relacionam CD90 com oncogênese e o apontam como candidato a marcador de CTC em várias malignidades. O aumento da expressão de CD90 foi observado em CTC de tumores de fígado, câncer gástrico, cervical, de próstata, pancreático e glioma^{88,89,90,91,92}. O nível de expressão de CD90, observado em estudos da expressão de transcritos em tumores de glioblastomas, tem sido diretamente correlacionado com o potencial de invasão e migração tumoral⁹³.

A CD90 é uma molécula altamente conservada localizada na parte externa da membrana celular, sendo que sua expressão e regulação são específicas para alguns tipos celulares, dentre eles células-tronco e células neuronais. Essa glicoproteína tem variadas funções: sinalização, adesão, proliferação e modificações morfológicas celulares⁹³.

Svensson e equipe¹⁰¹ observaram dois tipos de células mesenquimais (MSC) presentes no estroma do glioma, mediante o perfil genético delas. Observaram que a população CD90⁻ participa mais agressivamente na vascularização e imunossupressão que a população com CD90⁺. Interessados nesse achado, Zhang e sua equipe analisaram tecidos frescos de gliomas e astrocitomas de diferentes graus e mostraram que as MSC do glioblastoma (gbMSC) expressavam marcadores de MSC, incluindo CD73, CD105, CD44 e CD90; mas não CD31, CD34, CD14, NG2 e PDGFβ-R. Estas células também possuíam potencial para se diferenciar em adipócitos, osteoblastos e condrócitos *in vitro*, tendo uma forte migração em comparação das MSC com o marcador CD90 em meio condicionado.

A expressão CD90 também está relacionada com reparo de lesões cerebrais e com a extensão de dendritos e axônios em neurônios no SNC¹⁰². Essa proteína participa do desenvolvimento e da plasticidade neuronal, já que também é responsável pela inibição da extensão de neuritos em astrócitos maduros¹⁰³. O CD90 já é um biomarcador conhecido para diversos tipos de CTC^{98,104}. Deve-se mencionar que Woo et al. observaram em células 464T e 532T (linhagens de glioblastoma) que os níveis de proteína CD90 aumentaram 10 vezes nas células GBM do que nas CTN¹⁰⁵. Também é importante relatar que muitos estudos apoiam a ideia de que a glicoproteína CD90 está relacionada à invasividade do GBM, demonstrando que a alta expressão de CD90 nas células de glioblastoma piora o prognóstico.

Avril e colaboradores, revelaram que tumores com alto conteúdo de CD90 exibiam maior expressão de genes de adesão/migração celular como colágeno e PDGFRB em xenoinxertos obtidos após a injeção com linhas celulares primárias de GBM. Além disso, tumores com alto conteúdo de CD90 exibiam características de transição epitelial - mesenquimal (EMT). Outros marcadores mesenquimais, como as caderinas, também foram superexpressos em tumores com CD90 alto; portanto, a expressão do CD90 está ligada a uma adesão/migração celular. Esse estudo também demonstrou que a CD90 limita a adesão célula - célula e aumenta a capacidade de adesão celular - matriz das células GBM, observando um aumento na fosforilação de SRC e FAK que são proteínas de sinalização intracelular e relacionadas à adesão focal pela via PI3K em células com alta expressão de CD90 em GBM primário em comparação com as células com baixa expressão de CD90 em GBM primário¹⁰⁶.

A descoberta de marcadores é cada vez mais seletiva de CTC e tem mostrado grande potencial para o desenvolvimento de novos tratamentos contra neoplasias e novas formas de diagnóstico, em especial, o GBM que é extremamente agressivo, possuindo grande resistência e reincidência, além de ser um câncer do sistema nervoso central de ocorrência comum¹⁰⁷; Ademais, atualmente a classificação do glioblastoma multiforme inclui a presença de alterações moleculares nas quais podem estar também afetadas pela participação da superexpressão da glicoproteína CD90 pois em vários estudos se encontraram em altas taxas¹⁰⁶.

Nos anos 2016 e 2018, os pesquisadores identificaram marcadores moleculares que ajudam a classificar o GBM em subgrupos com diferentes perfis de resposta ao tratamento e prognóstico, por exemplo, gliomas que abrigam uma mutação no gene da isocitrato desidrogenase 1 ou 2 (IDH 1/2) tendem a ter melhor tendem a ter melhor sobrevivência e, portanto, um prognóstico favorável¹⁰⁸. Já os tumores metilados do promotor do gene O 6 -metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT) são mais sensíveis às terapias de temozolomida / radiação que produzem melhores taxas de sobrevivência, e importante ter em conta esse marcadores porque a partir de ali se pode dar um prognóstico mais claro para o paciente¹⁰⁷.

É crucial conhecer em profundidade os biomarcadores para GBM, a fim de esclarecer o desenvolvimento da biologia da patogenicidade desses gliomas; portanto,

diversos estudos sobre possíveis marcadores para glioblastoma estão sendo feitos^{109,110,111}, mas pouco se sabe sobre a relação entre CD90 e a morfologia funcional do glioblastoma. Assim, este estudo tem como objetivo entender a relação entre o marcador CD90 com a biogênese tumoral, morfologia e propriedades biológicas do glioblastoma *in vitro*.

2.JUSTIFICATIVA

É importante considerar que o comportamento celular relacionando às interações de proteínas, tais como a glicoproteína CD90, que se encontram involucradas ou envolvidas nos processos do câncer pode propiciar uma grande referência sobre a descoberta de marcadores de CTC e assim demonstrar o grande potencial para o desenvolvimento de tratamentos, e que sejam cada vez mais específicos contra cânceres de diferentes graus de agressividade. Ao mesmo tempo, é imprescindível considerar que existem diversos tipos de formas tumorais que ainda não possuem tratamento específico e apresentam grande resistência às terapias existentes, como é o caso do GBM, sendo um câncer agressivo com grande resistência e reincidência, além de ser um câncer cerebral comum.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

A pesquisa teve como objetivo geral elucidar *in vitro* a ação da glicoproteína CD90 em células originadas de glioblastoma.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a capacidade tumorigênica das células de glioblastomas deficientes na expressão de CD90 *in vitro* em ensaios de formação de oncosferas.

- Avaliar a capacidade de diferenciação (neuronal, osteogênica e adipogênica) das células de glioblastomas deficientes na expressão de CD90 *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estabelecimento das Linhagens Primárias de Glioblastoma

O delineamento experimental está descrito na Figura 3. O estabelecimento da cultura celular primária foi feito a partir de quatro amostras tumorais oriundas de quatro pacientes submetidos a neurocirurgias. Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa de acordo com as Resoluções nº 466/12 e nº 510/16 e os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

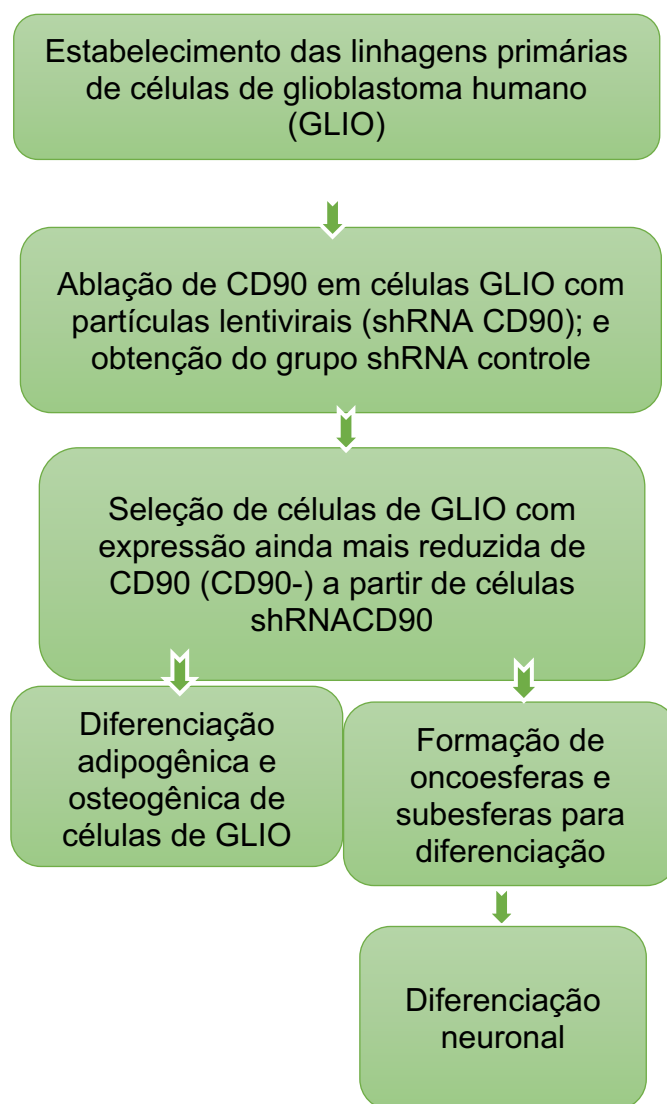


Figura 3. Delineamento experimental.

As amostras foram obtidas na primeira ressecção do tecido tumoral, sendo que os pacientes não haviam recebido nenhum tratamento prévio. Foram acondicionadas em um tubo de coleta de 50 mL contendo solução salina e transportadas sob refrigeração em caixa térmica até o Departamento de Genética e Morfologia (GEM) da Universidade de Brasília (UnB), com um intervalo máximo de 24 horas.

Para a separação das células do tecido, cada tumor foi colocado em uma placa de Petri estéril e lavado com PBS (tampão fosfato salino) por três vezes. Em seguida, foi realizada uma quarta lavagem com meio de cultivo *Low Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM-LG) (GIBCO®, EUA) com adição de 1% de antibiótico (v/v) (Penicilina – Estreptomicina, Life, EUA). Logo após, cada tumor foi dissecado com auxílio de uma lâmina de bisturi em frações de aproximadamente 1 mm de diâmetro e transferidos para um tubo de fundo cônico de 15 mL, no qual foram adicionados tripsina (Tripsina 0,25%, Gibco, EUA) durante 30 minutos com agitação manual a cada intervalo de 5 minutos. A seguir, foram realizadas mais três centrifugações de 5 minutos cada, os sobrenadantes foram desprezados e as amostras ressuspensas em 4 mL de meio DMEM-LG suplementado com antibiótico e soro fetal bovino (10%). As amostras de células dissociadas e frações tumorais foram colocadas em frascos de cultura de 75 cm² e mantidas em incubadores à 37°C e 5% de gás carbônico (CO₂). Foram feitas trocas periódicas do meio de cultivo contido nos frascos a cada 3 ou 4 dias.

As linhagens celulares obtidas neste estudo foram identificadas como células GLIO (glioblastoma multiforme) e receberam uma numeração (de 1 a 4) de acordo com a ordem de obtenção das amostras. As células de cultivo primário tiveram seu crescimento acompanhado com o uso de um microscópio óptico até atingir uma confluência de cerca de 70% nas garrafas de cultivo. A passagem celular foi realizada por meio da tripsinização (Tryple, GIBCO), e foram mantidas em DMEM-LG (GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO).

4.2 Estabelecimento de Linhagens Primárias de MSCs (células controle)

As MSCs isoladas do tecido adiposo de pacientes que fizeram cirurgias estéticas e foram utilizadas como controle para a transdução. Essas células foram obtidas e isoladas de uma amostra de lipoaspirado com a colaboração do médico cirurgião Dr.

Carlos Augusto Carpaneda. A amostra de gordura foi coletada, de forma estéril, pelo cirurgião supracitado na Clínica Carpaneda de Cirurgia Plástica, após assinatura do TLCE pelos pacientes. O lipoaspirado foi encaminhado para a sala de cultivo de células do GEM da UnB.

Para o isolamento das células, foi utilizado um protocolo previamente estabelecido e adaptado³¹ no qual, em fluxo laminar, o lipoaspirado foi incubado com uma solução de tripsina-EDTA (GIBCO®), contendo 2,5 g/L de tripsina (1:250) e 0,38 g/L de EDTA em solução salina balanceada de Hank, sendo 10 mL de tripsina a cada 20 mL de lipoaspirado, por 30 minutos a 37°C, no qual foi realizada uma agitação vigorosa manual a cada 5 minutos.

Em sequência, a amostra foi centrifugada por 10 minutos à 220 xg, e, posteriormente, o sobrenadante contendo a fração adiposa foi descartado, e o *pellet* foi ressuspenso em 10 mL de PBS para lavagem e retirada dos resíduos de tripsina. A suspensão obtida foi transferida para outro tubo e centrifugada novamente por 10 minutos. Ao final, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo a fração celular foi ressuspenso em 5 mL de meio de cultivo DMEM- LG, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (GIBCO®), antibiótico/antimicótico (GIBCO® – contendo 10000UI/mL de penicilina, 10000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de Anfotericina B), e 1 mL da suspensão foi transferido para 15 garrafas de 75cm², completando-as com 10 mL de meio de cultura.

Após 48 horas do isolamento, foi realizada a troca parcial do meio de cultura e após mais 48 horas foram realizadas duas lavagens com PBS para remoção de debris e células não aderidas. As culturas de MSCs foram acondicionadas em estufa à 37°C, atmosfera de 5% de CO₂ e 70% de umidade, sendo subcultivadas sempre que atingiam 80% de confluência.

4.3 Redução da expressão de CD90

A ablação ou redução da expressão de CD90 nas células primárias de GLIO foi realizada a partir da transdução com partículas lentivirais que codificavam um shRNA interferência, cujo alvo era o RNA mensageiro responsável pela expressão de CD90, e o ShRNA *scramble*. A transdução foi realizada em células GLIO com 80% de confluência,

inicialmente, com a adição de 8 µg/mL de Polibreno (Sigma) no meio de cultivo presente no frasco (Santa Cruz Biotechnology), e 5 µL com uma concentração de 1×10^6 unidades de partículas lentivirais ShRNA-CD90 e shRNA controle (Santa Cruz Biotechnology, INC), respectivamente, nos frascos de cultura. A troca do meio ocorreu 48 h após a adição dos lentivírus.

Posteriormente, deu-se início a seleção das células transduzidas com adição ao meio de Puromicina para evidenciar a eficácia da transdução (concentrada à 5 µg/mL) por 10 dias, com trocas periódicas do meio (cada 4 dias). Ao final do processo, foram obtidas populações/clones de células que superexpressavam shRNACD90 (células com ablação ou redução de CD90) e shRNA *scramble* (população shRNAcontrole).

A puromicina foi usada como teste de morte, já que no RNA de interferência carregava um gene resistente à puromicina e, quando elas foram transduzidas, as células eram resistentes ao anibiotico, porém foi possível fazer a seleção das células que efetivamente foram reduzidas a expressão da glicoproteína CD90 sendo o grupo ShRNACD90.

4.4 Obtenção de populações de GBM com menor expressão de CD90

As células do GLIO cultivadas em garrafas de cultura de 75cm², 90% de confluência, foram dissociadas por 5mL de tripsina durante 4 minutos à 37°C. Em seguida foi adicionado 5mL de SFB (GIBCO) para inibição da tripsina, e a solução foi transferida para um tubo de centrifugação de 15 mL e centrifugada a 300 g por 10 minutos. As células foram marcadas com anticorpos CD90 conjugados com partículas magnéticas (MACS MicroBeads Technology) e selecionadas por afinidade magnética à coluna de purificação de acordo com o protocolo do fabricante da coluna selecionada (Miltenyl Biotec). As células não marcadas, com menor expressão de CD90, foram eluídas da coluna e cultivadas em garrafas T-75 a 37°C com trocas de meio e com passagens periódicas. A população celular obtida foi denominada CD90-, que foram aquelas células com a expressão de CD90 ainda mais reduzida que com a técnica de redução com partículas lentivirais.

4.5 Avaliação da redução da expressão de CD90 na formação de oncosferas.

As células shRNACD90, CD90- e controles (Células GLIO sem a redução da expressão da CD90), foram suspensas em meio de cultura definido como “meio para formação de oncoesferas” contendo DMEM LOW-F12 (Dulbecco modificado Eagle medium/F12, Gibco), suplementado com N-2 (1X), (Gibco), EGF (20ng/mL, Invitrogen), bFGF (20ng/mL, Gibco), e B27 (1:50; Life Technologies) e plaqueadas numa densidade de 2×10^4 células/poço em placas de 24 poços de baixa adesão (ultra low attachment surface, Corning). As células ficaram mantidas em estufa (Thermo Fisher Scientific Inc. 3110, Waltham, MA) com 5% de CO₂ à 37°C, onde receberam trocas meios para formação de oncoesferas a cada 3 dias. As oncoesferas foram fotografadas no terceiro e sétimo dia. O diâmetro de cada oncoesfera formada foi mensurado utilizando o microscópio EVOS (FL Cell Imaging System).

4.6 Ensaios de avaliação do efeito da ablação de CD90 na propriedade de diferenciação osteogênica e adipogênica de células de glioblastomas

Para avaliar o potencial de transformação das células de GBM, as células GBM foram submetidas à diferenciação osteogênica e adipogênica *in vitro*, de acordo com os protocolos estabelecidos previamente¹¹². As células de GBM transduzidas e não transduzidas na passagem 4 (passagem 2 após a transdução) foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de 5×10^4 células/poço. Quando uma confluência de 80% foi alcançada, o meio regular foi substituído por um meio de indução (STEMPRO, GIBCO), que foi trocado a cada 72 h por 21 dias para diferenciação osteogênica e 7 dias para diferenciação adipogênica. As células cultivadas em meio regular foram usadas como controle da diferenciação (controle negativo). As células MSC com meio de diferenciação para adipogênese e osteogênese foram utilizadas como para controle positivo dos processos de diferenciação.

A diferenciação osteogênica foi avaliada pela atividade da coloração colorimétrica do vermelho de alizarina. As amostras foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 15 minutos, lavadas em PBS e tingidas por 20 minutos com solução 40 mM de Alizarin Red (Sigma-Aldrich) ao pH 4,2 e à temperatura ambiente. As amostras resultantes foram analisadas e fotografadas sob um microscópio EVOS.

O processo de diferenciação adipogênica (formação de células com morfologia semelhante aos adipócitos) foi monitorado ao microscópio pelo aparecimento de gotículas lipídicas. Após o período de indução (7 dias), as células foram fixadas em paraformaldeído à 4% por 15 minutos, lavadas em PBS e tingidas por 30 minutos com 0,5% de óleo vermelho O (Sigma-Aldrich) em etanol. As células foram subsequentemente lavadas três vezes com água destilada para remover qualquer excesso de corante.

4.7 Cultivo de subesferas para diferenciação neuronal

Ao atingirem uma semana de cultivo, as oncoesferas foram coletadas da placa e colocadas em um tubo de 15 mL para centrifugação durante 5 minutos a 200 g. O meio foi descartado e as células gentilmente dissociadas em 2,5 mL de StemPro Accutase (ThermoFisher Scientific) em banho-Maria a 37°C por 20 minutos, misturando gentilmente a cada 5 minutos. Então, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos à 200 g e a ressuspensão foi feita em meio definido “meio de cultura para diferenciação neuronal” contendo DMEM LOW-F12 (Dulbecco modificado Eagle medium/F12, Gibco), B27 (1:50; Life Technologies), GlutaMAX-I (50X) (ThermoFisher Scientific), dibutilil cAMP 0,5 mM (Sigma), Antibiótico-Antimicótica e cyclofenil (Sigma).

As células foram plaqueadas de duas maneiras diferentes para ensaios de diferenciação neural. Os ensaios foram realizados semeando 2×10^4 células/poço células em placas de 24 poços previamente tratadas com matriz de membrana basal de fator de crescimento reduzido (Gibco, Geltrex). Paralelamente, 1×10^5 células foram semeadas em placas de 6 poços previamente tratadas com Poli-L-Ornitina e Laminina (Sigma). Em ambos tipos de ensaios, as placas ficaram mantidas em estufa (Thermo Fisher Scientific Inc. 3110, Waltham, MA), com 5% de CO₂ a 37°C, onde receberam trocas de meios de cultura para diferenciação neuronal a cada 3 dias. As células diferenciadas foram fotografadas 7 dias após o início da indução da diferenciação utilizando o equipamento EVOS FL *Cell Imaging System*. O experimento foi realizado em triplicatas para cada tipo celular e repetido ao menos duas vezes para cada amostra.

O anticorpo Beta tubulina III faz parte da formação de microtúbulos dos neurônios e serve como marcador de células neuronais progenitoras, apenas se diferenciando e para avaliar a diferenciação neuronal com a matriz de Geltrex e Poli L Ornitina + laminina

nas placas previamente utilizadas e mantidas em meio de diferenciação neuronal. Utilizou-se o anticorpo β tubulina (ThermoFisher Scientific), para ser marcado por imunofluorescência. As células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 15 minutos. A permeabilização da membrana celular foi feita com triton X 100 (Termofisher) a 0,25% por 10 minutos, e bloqueada com BSA a 5% por 1 hora em temperatura ambiente. O anticorpo Beta tubulina III (Ref. MA 1-118 Termofisher) foi adicionado nos poços numa concentração de 0,5 ug/ml em BSA a 1% e foi incubado a temperatura ambiente por 3 horas. A marcação com anticorpo secundário foi feita com IgG Alexa flúor (Termofisher) numa concentração 1mg/2ml, em solução salina tamponada e, posteriormente, os núcleos foram corados com Gold Antifade Mountant com Dapi (Ref. S36938 Termofisher) - 50 microlitros em cada poço antes do registro ao microscópio.

As análises estatísticas dos resultados apresentados foram obtidas com o uso do software Excel (Microsoft). Foi utilizado teste T Student e o intervalo de confiança estabelecido foi de $p < 0,5$ comparando a quantidade de oncosferas apresentadas em cada grupo de células.

5. RESULTADOS

5.1 Estabelecimento da cultura primária de glioblastomas

A partir das amostras de tumores processados foram obtidas quatro culturas primárias (GLIO 1, 2, 3, 4). Entretanto apenas as amostras 2 e 3 foram se expandiram (multiplicaram) o suficiente para serem utilizadas em nossos ensaios. A morfologia celular das culturas obtidas, embora, inicialmente, heterogêneas, mostrou-se típica das células oriundas do SNC, indicando a identidade tumoral de glioblastoma. Foi possível observar as diferenças morfológicas nas culturas celulares, pois são células de glioblastoma de diferentes pacientes (Figura 4). A confirmação citopatológica de glioblastoma de alto grau foi realizada pela Instituição que forneceu as amostras tumorais.

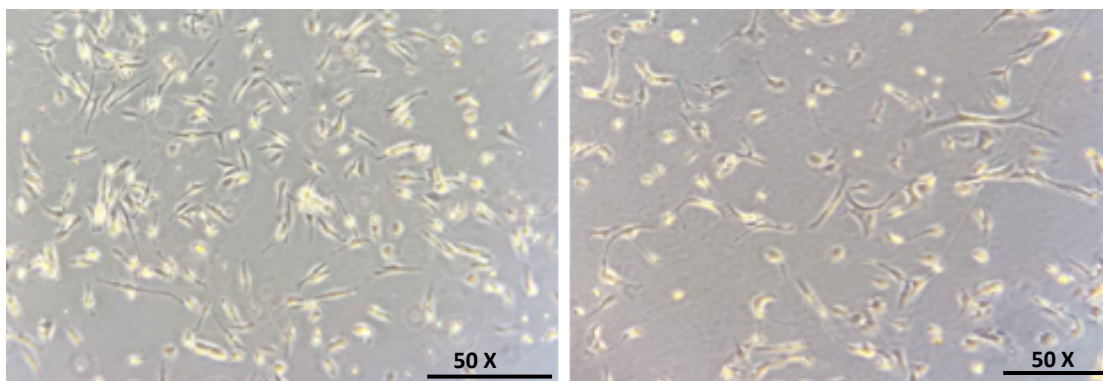


Figura 4 - Morfologia das células primárias obtidas das amostras tumorais 2 e 3 (GLIO 2 e 3) obtidas por microscópio óptico Leica, com aumento de 50x.

5.2 Transdução lentiviral

Após a transdução celular, foi realizada a seleção das células traduzidas com puromicina para evidenciar a efetividade da transdução durante 10 dias para selecionar as células GLIO que estavam expressando a sequência de RNA contendo o shRNA (contra CD90 ou *scramble*) e a resistência à puromicina como teste de morte.

Devido a pandemia da Covid-19, alguns laboratórios e equipamentos da UnB tiveram seu uso restringido, por isso não foi possível realizar ensaios de Q-RT-PCR e citometria de fluxo para confirmar a redução da expressão de CD90 conforme planejado inicialmente. Entretanto, estudos anteriores do nosso grupo, usando os mesmos reagentes com células mesenquimais¹¹² e células de glioblastoma¹¹³, mostraram que a transdução com as partículas lentivirais ShRNACD90 (SANTA CRUZ) reduz a expressão de CD90 (em torno de 50-60%), mas não totalmente.

Por isso, amostras de células GLIOshRNACD90 foram submetidas à separação magnética com células incubadas previamente com anticorpos anti-CD90 ligadas a esferas magnéticas (“beads”) coletando em seguida a fração mais negativa para CD90 que não se ligou à coluna (denominada daqui para frente de população celular CD90).

Amostras de todas as populações celulares usadas neste estudo foram congeladas, para que, posteriormente à pandemia e liberação dos laboratórios, a expressão de CD90 e CD133 fosse analisada e quantificada, tanto por citometria de fluxo quanto por Q-RT-PCR. Da mesma forma, nos achados anteriores, identificou-se que a separação magnética gera uma ablação em torno de 95%¹¹³, isso é importante porque

pretendia-se ter a certeza que a CD90 estava em redução portanto pretendeu-se reduzir ainda mais a glicoproteína.

Após a obtenção dos grupos de estudo (ShRNAcontrole, ShRNACD90 e CD90), foi possível observar a morfologia das células transduzidas por meio de microscopia de luz. Ao comparar esses grupos entre si e com células originais sem nenhuma modificação (denominado grupo nada), não foi observada nenhuma diferença morfológica significativa (Figura 5). Além disso, também foi observado que populações shRNACD90 e shRNAcontrole mantiveram capacidade de proliferação similar, sugerindo que a ablação da expressão de CD90 não afetou a manutenção da morfologia e proliferação de células de glioblastoma.

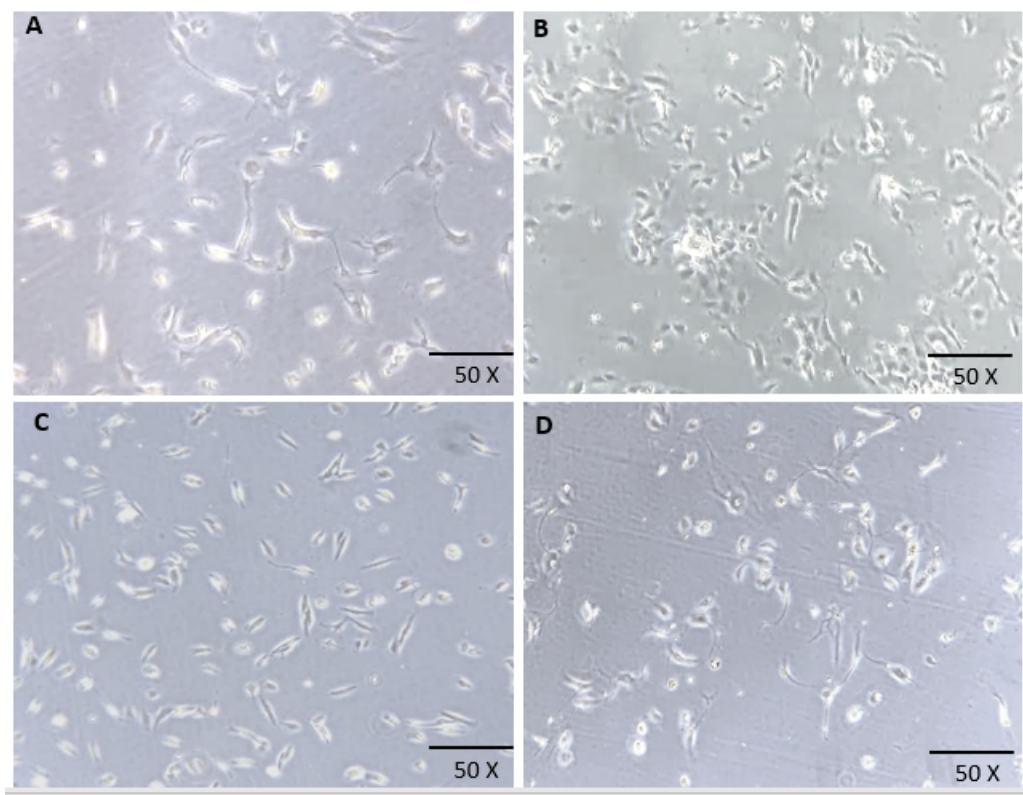


Figura 5: **A:** Morfologia das células Glioblastoma grupo Nada, **B:** Morfologia das células Glioblastoma grupo ShRNA Controle, **C:** Morfologia das células Glioblastoma grupo ShRNA CD90 e **D:** Morfologia das células Glioblastoma grupo CD90 - mantendo a sua morfologia, obtidas por do microscópio ótico Leica, com aumento de 50x.

5.3 Formação de neuroesferas

A capacidade de formação de oncoesferas de células provenientes das amostras tumorais foi analisada para determinar o papel de CD90 no potencial de tumorigênese de células primárias de glioblastoma (GLIO). Assim, o grupo Nada (sem nenhuma alteração), shRNAcontrole, shRNACD90 e CD90- correspondentes às mesmas passagens celulares foram submetidas ao protocolo de formação de oncoesferas. Os ensaios foram realizados em quadruplicatas experimentais em três ensaios independentes, como estão mostrados nas Figuras 6 e 7.

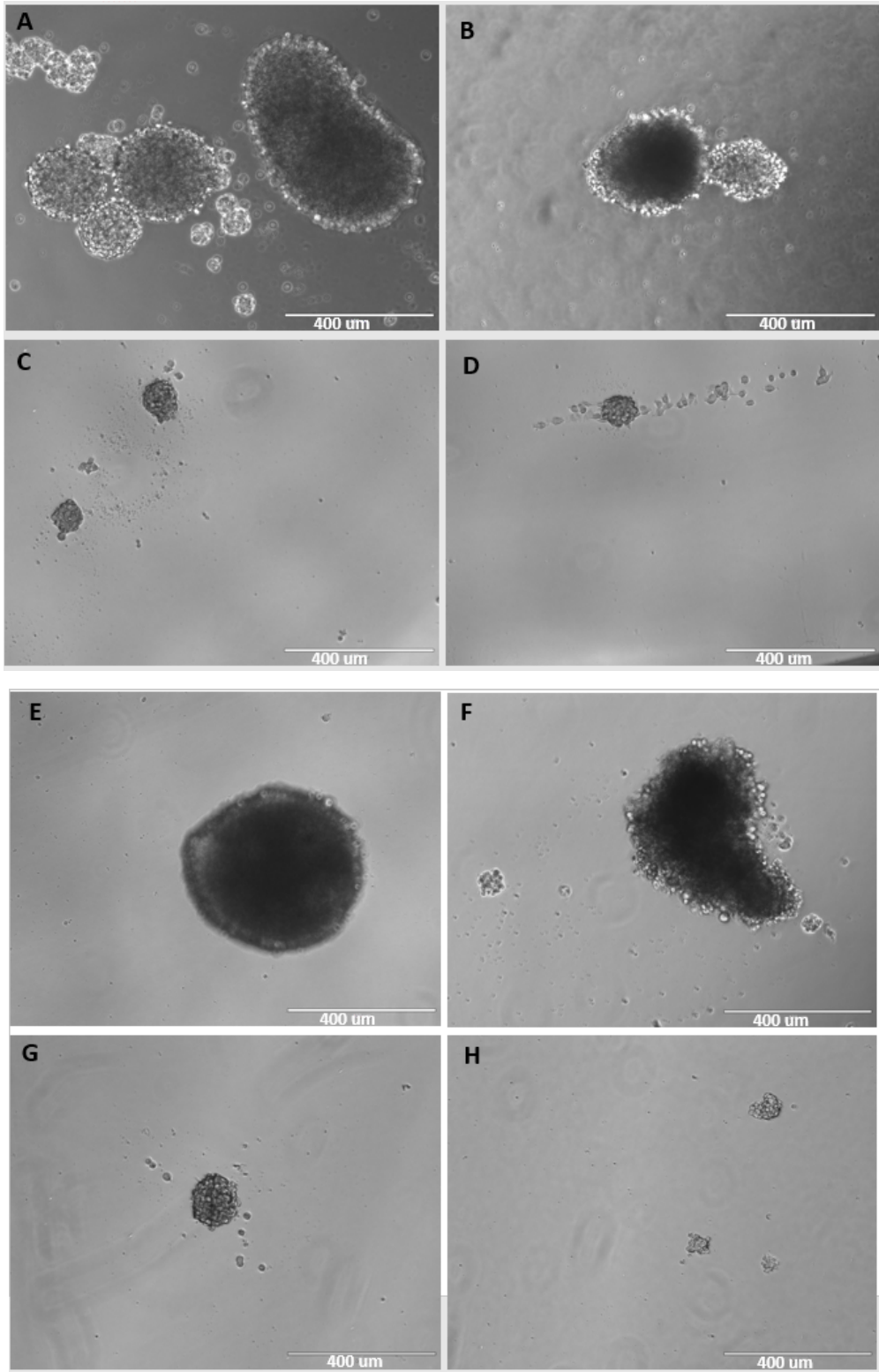


Figura 6. Oncoesferas do grupo GLIO 2. **A:** Amostra 2 Nada (3 dias), **B:** Amostra 2 ShRNA Controle (3 dias), **C:** Amostra 2 ShRNA CD90 (3 dias), **D:** Amostra 2 CD90 - (3 dias), **E:** Amostra 2 Nada (3 dias), **F:** Amostra 2 ShRNA Controle (7 dias), **G:** Amostra 2 ShRNA CD90 (7 dias), **H:** Amostra 2 CD90 - (7 dias), se evidencia as oncoesferas das células primárias GLIO2 após três e sete dias de cultivo. Barra de tamanho de 400µm.

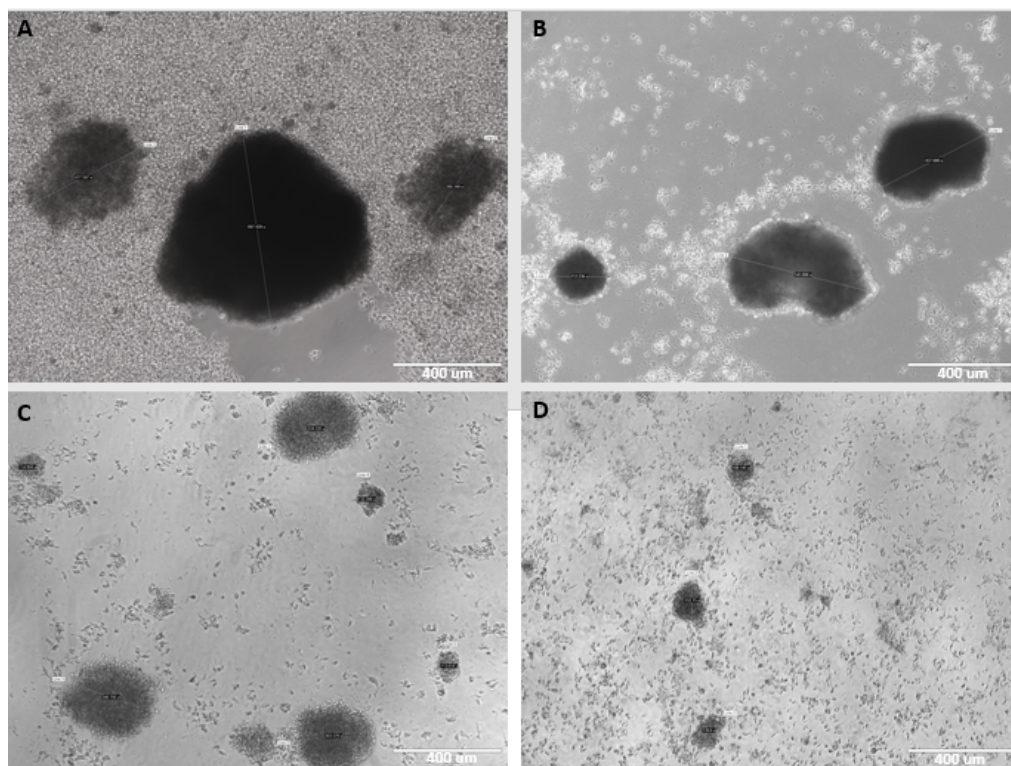


Figura 7. Oncoesferas dos grupo GLIO 3: **A:** Amostra 3 Nada (7 dias), **B:** Amostra 3 ShRNA Controle (7 dias), **C:** Amostra 2 ShRNA CD90 (7 dias), **D:** Amostra 2 CD90 - (7 dias), Oncoesferas das células primárias GLIO 3 sete dias de cultivo. Barra de tamanho de 400µm.

Como mostram as Figuras 6 e 7, observou-se a formação robusta de oncoesferas nos grupos controles: células não sofreram nenhuma modificação (GLIO Nada) e shRNAcontrole. A formação de oncosferas se tornaram nítidas a partir do terceiro dia (Figura 6). As oncosferas foram mensuradas e quantificadas no sétimo dia de cultivo celular após a indução delas. Foi possível observar várias oncosferas arredondadas e maiores que 100 µm e grande densidade celular nos grupos GLIO Nada. Também foram observadas oncosferas bem formadas nos grupos GLIO shRNAcontrole das linhagens provenientes de duas amostras de tumores (GLIO2 e GLIO3) (Figura 6 e 7,

respectivamente). Entretanto, conforme representado no gráfico que expressa a média do número de oncosferas observadas em cada grupo (Figura 8), o número médio de oncosferas no grupo ShRNAcontrole (média e D.P. = $14,0 \pm 6,9$) foi surpreendentemente menor que o número de oncosferas formadas no grupo GLIO Nada (média e D.P. = $14,0 \pm 1,5$, $p < 0,5$). Portanto, pode-se inferir que a glicoproteína afeta a formação de oncosferas, sendo que, quando é reduzida a sua expressão, também diminui a formação.

Embora os ensaios tenham sido realizados pareando as células em mesma passagem celular, esse fato pode ser atribuído ao stress adicional causado pelo processo de transdução e pelo período de seleção de 10 dias com puromicina. Pode-se observar, na Figura 6, que houve formação de algumas oncosferas nos poços dos grupos shRNACD90 no terceiro dia. Entretanto, ficou mais evidente no sétimo dia que estas oncosferas, além de estarem presentes em número estatisticamente significante menor que as observadas no shRNAcontrole (Figura 8) também eram mais irregulares, densas e arredondadas que as oncosferas observadas no grupo shRNAcontrole.

Verificou-se que as oncosferas formadas nos primeiros dias no grupo controle tiveram uma tendência de não progredir e se desfazer com o passar dos dias (dados não apresentados). O número médio de oncosferas observados no grupo shRNACD90 no sétimo dia foi de $8,5 \pm 3,7$ (média, D.P.) A influência de CD90 no número, forma e densidade das oncosferas ficou mais evidente quando foram analisadas as oncosferas formadas nos ensaios com grupo CD90-. Neste grupo, foi observado ainda menos oncosferas (média, D.P. = $4,1 \pm 3,0$) que no grupo shRNACD90 (Figura 7). As poucas oncosferas formadas tendiam a se dissociar e terem menor densidade celular (Figuras 6 e 7).

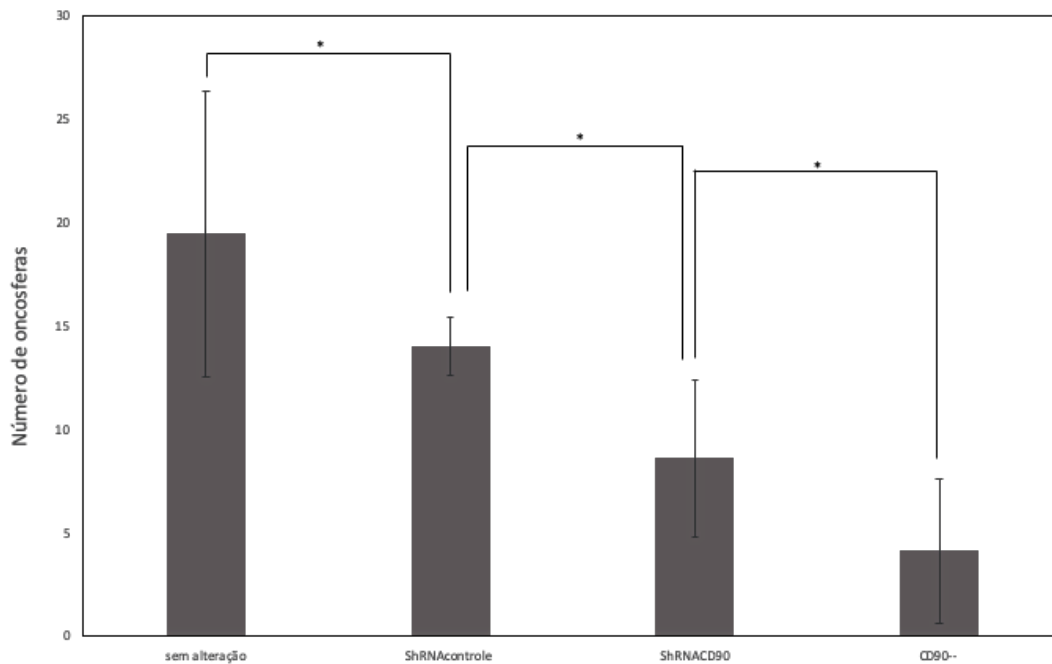


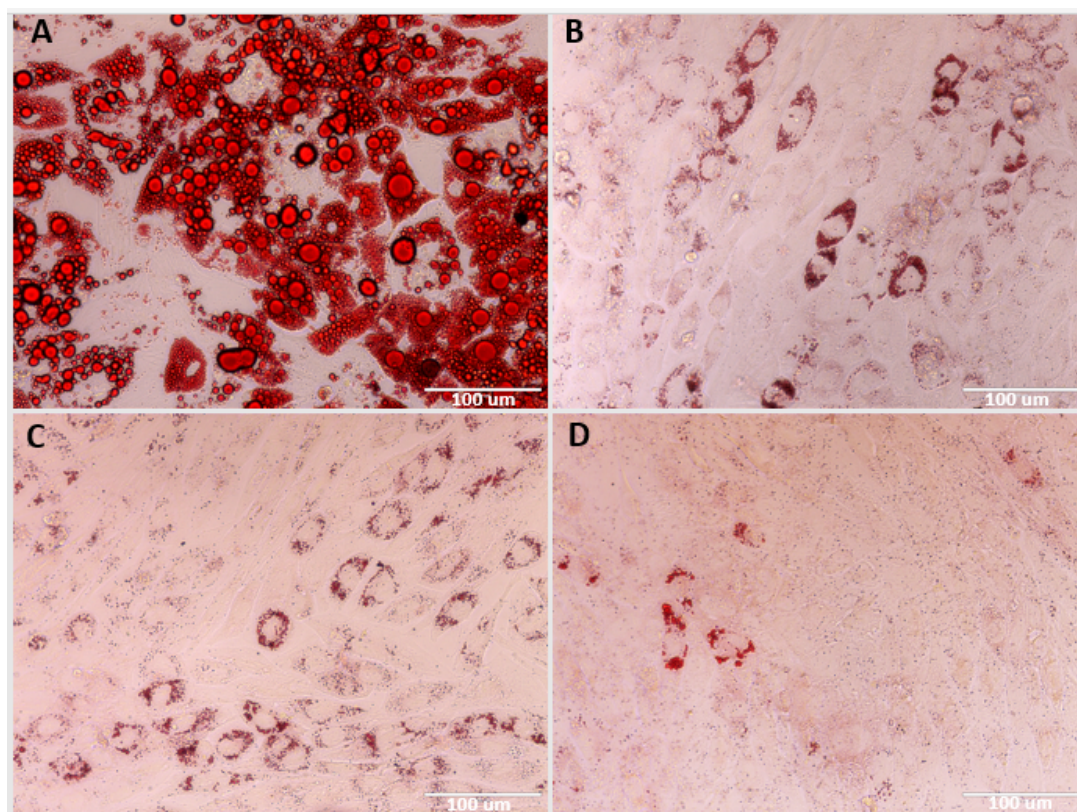
Figura 8. Quantificação de oncosferas. O número de oncosferas maiores que 100 μm por poço foi determinado 7 dias após a indução de formação de oncosferas. Os resultados mostrados são de 3 ensaios independentes feitos em quadruplicatas experimentais para cada grupo. A relevância estatística entre grupos foi determinada por teste T Student ($p < 0,5$).

5.4 Diferenciação adipogênica e osteogênica

O potencial de diferenciação das células do grupo nada, shRNAControle, shRNACD90, CD90- foi analisado em ensaio de indução de diferenciação osteogênica e adipogênica. A formação da matriz ossificada resultante da incubação com meio indutor específico foi analisada 21 dias após o início da indução. Enquanto para a diferenciação adipogênica, a formação de gotículas de lipídeos intracelular foi observada 7 dias após a indução com o seu meio indutor específico.

Essas diferenciações foram avaliadas pela coloração histoquímica positiva para o corante vermelho de Alizarina para osteogênese e para o corante oil red para detecção de adipogênese, bem como a utilização da microscopia de luz para observação da formação de vesículas lipídicas na diferenciação adipogênica. A concentração de vermelho de Alizarina e oil red foi qualitativamente avaliada nos diferentes grupos deste estudo. Ressalta-se que as células mesenquimais (MSC) foram utilizadas como controle positivo, pois se diferenciam robustamente quando induzidas.

Quando se compara o nível de diferenciação entre as células GLIO2 e GLIO3 sem modificação e as MSC, observamos uma diferenciação marcadamente maior nas MSC (Figura 9 e 10). Nos ensaios adipogênicos (Figura 9) e osteogênicos (Figura 10) foi observado o mesmo padrão de diferenciação, tanto nas células do grupo Nada, como nas células shRNAcontrole. no grupo shRNACD90 se notou uma marcada diminuição na diferenciação comparados com os grupos Nada e shRNA controle. Um decréscimo ainda maior na proporção de células diferenciadas do grupo CD90-.



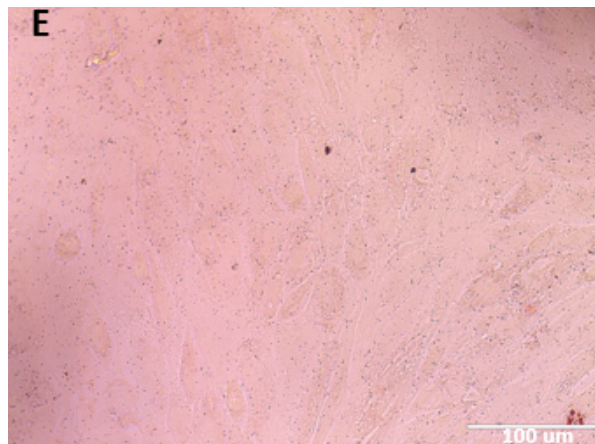
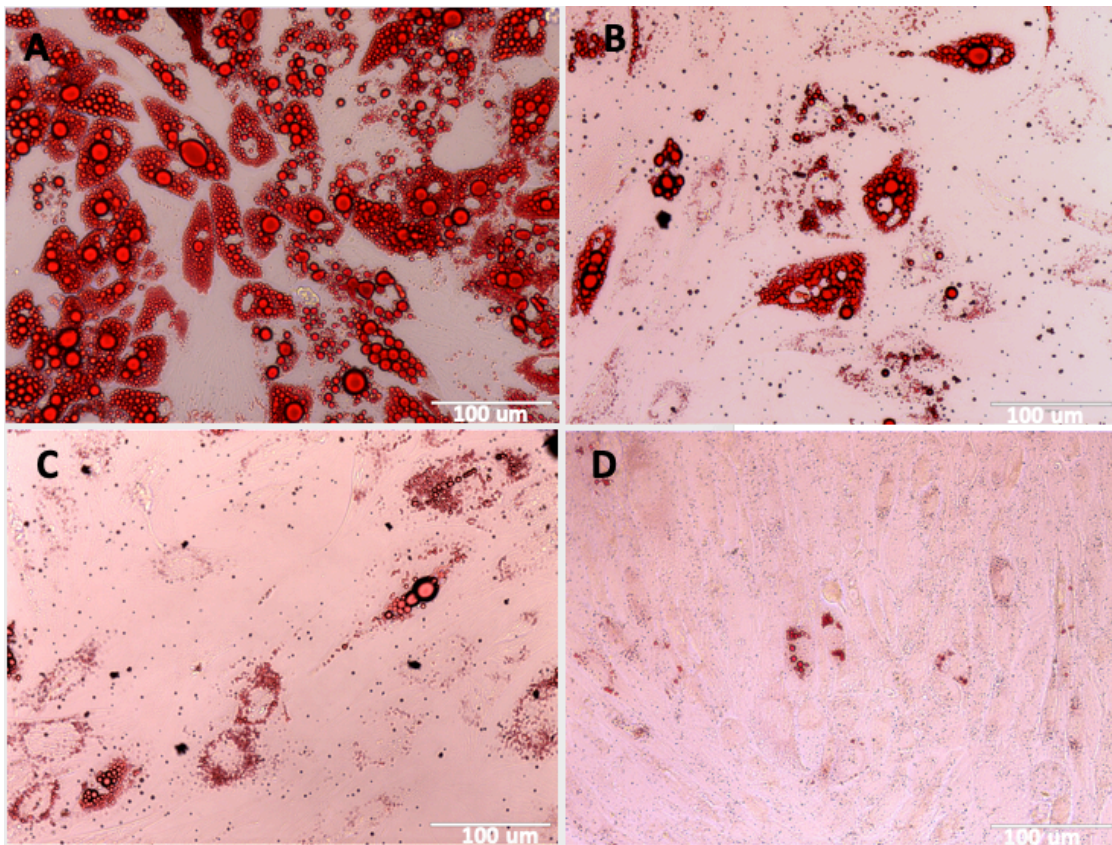


Figura 9 - Ensaio de diferenciação adipogênica em amostras de GLIO2. (A: Celulas MSCs, B: Celulas Nada, C: Celulas shRNAcontrole, D: shRNACD90 e E: Celulas CD90-) observe-se a habilidade de diferenciação *in vitro* em linhagem adipogênica, evidencia -se depósitos lipídicos identificados pelos corante oil red em células 7 dias após incubação em meio de indução adipogênico mais que como foi reduzendo a CD90 também foi reduzendo a sua diferenciação.



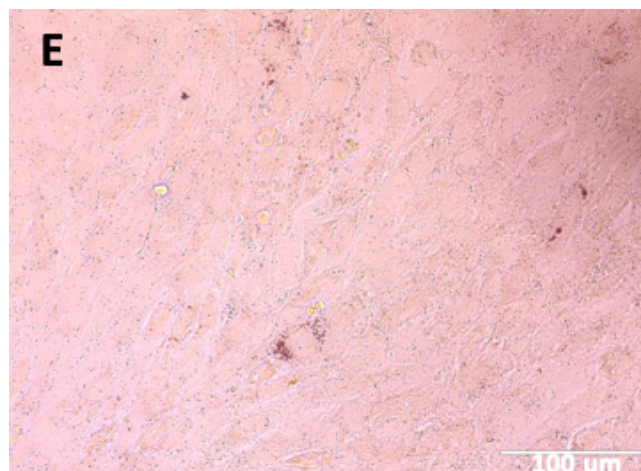
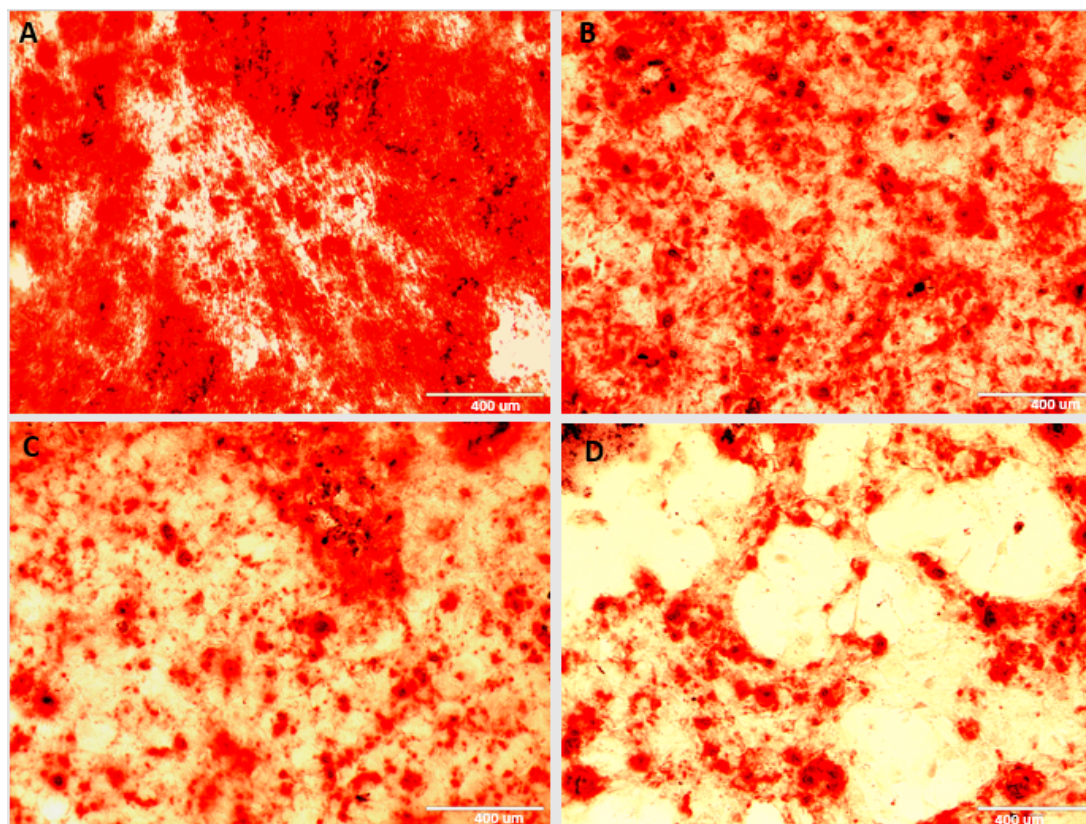


Figura 9.1. Ensaio de diferenciação adipogênica em amostras de GLIO3. (A: Celulas MSCs, B: Celulas Nada, C: Celulas shRNAcontrole, D: shRNACD90 e E: Celulas CD90-) observe-se a habilidade de diferenciação *in vitro* em linhagem adipogênica, evidencia -se depósitos lipídicos identificados pelos corante oil red em células 7 dias após incubação em meio de indução adipogênico, mais que como foi reduzendo a CD90 também foi reduzendo a sua diferenciação.



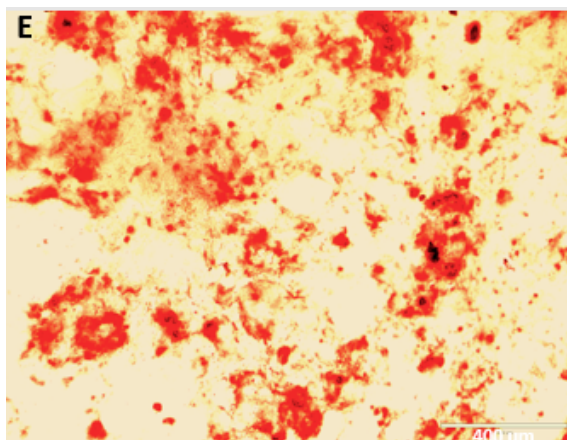
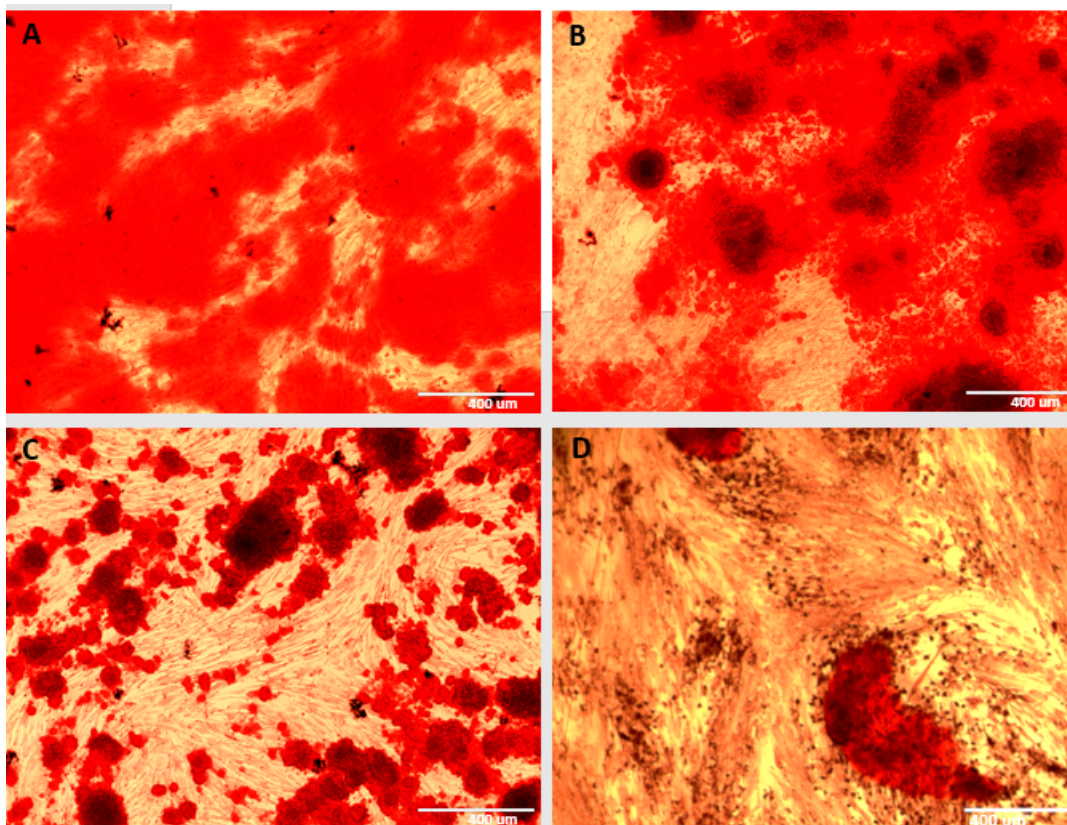


Figura 10 - Ensaio de diferenciação osteogênica em amostras de GLIO2. (A: Celulas MSCs, B: Celulas Nada, C: Celulas shRNAcontrole, D: shRNACD90 e E: Celulas CD90-) Foram testadas quanto à habilidade de diferenciação *in vitro* em linhagem osteogênica. Depósitos de matriz calcificada foram identificados pelo corante vermelho de Alzarin 21 dias após indução em meio osteogênico, mais que como foi reduzindo a CD90 também foi reduzindo a sua diferenciação.



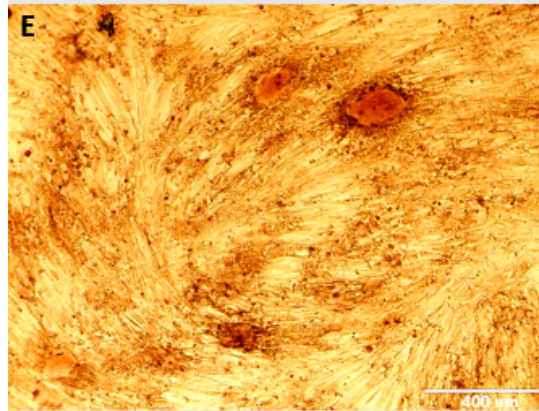


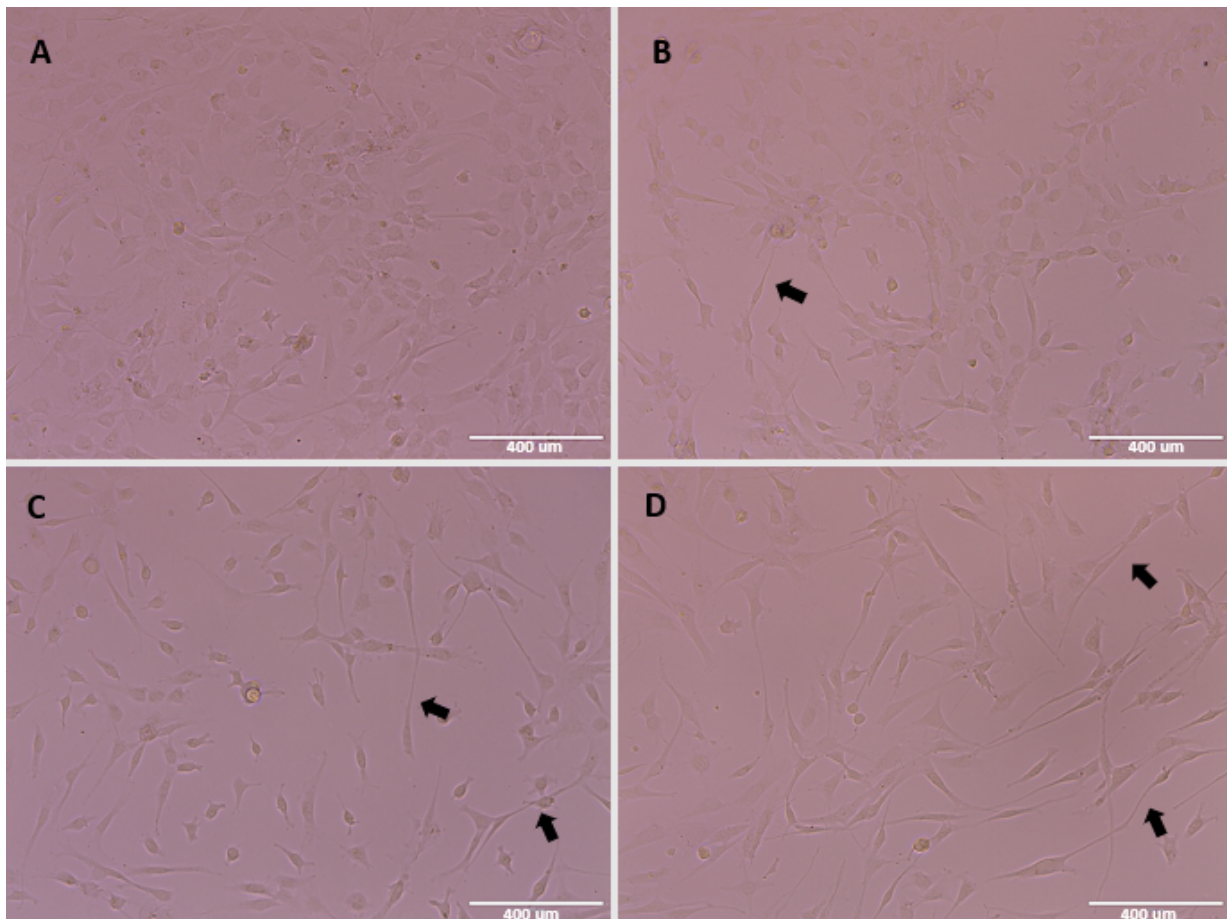
Figura 10.1 - Ensaio de diferenciação osteogênica em amostras de GLIO3. (A: Celulas MSCs, B: Celulas Nada, C: Celulas shRNAcontrole, D: shRNACD90 e E: Celulas CD90-) Foram testadas quanto à habilidade de diferenciação *in vitro* em linhagem osteogênica. Depósitos de matriz calcificada foram identificados pelo corante vermelho de Alzarin 21 dias após indução em meio osteogênico, mais que como foi reduzindo a CD90 também foi reduzindo a sua diferenciação.

5.5 Diferenciação neuronal

As oncosferas dos grupos analisados neste estudo foram dissociadas e as células resultantes foram cultivadas em garrafas de cultura celular por 5 dias. Após esse período, as células foram contadas e plaqueadas em meio de diferenciação neuronal em dois tipos de placas: a) placas de cultivo tratadas com Geltrex (GIBCO) e b) placas tratadas com laminina e poli-L-ornitina. Foram utilizados estes dois protocolos distintos para ter confirmação dos resultados. Em ambos os protocolos, as células começaram a mudar sua morfologia a partir do sétimo dia, adquirindo prolongamentos mais alongados, como mostra a Figura 11 com fotomicrografias tiradas 20 dias após início da diferenciação neuronal. O mesmo não ocorreu em células que não foram incubadas com meio de diferenciação neuronal e mantidas apenas com meio DMEM (controle negativo da diferenciação).

Embora o mesmo número de células tenha sido plaqueado em todas as condições, foi notável o maior número de morte celular nos grupos shRNACD90 e CD90-. Infelizmente, não foi possível caracterizar esta morte, mas foi observado um grande número de células mortas suspensas em ambos os grupos quando realizadas as trocas de meio, refletindo em um menor número de células nos dias 21 dias após o início da diferenciação neuronal.

As células do grupo nada (controle da transdução) apresentaram diferentes morfologias: arredondadas e pequenas, e a maioria com prolongamentos mais alongados que as células que foram plaqueadas, mas não tratadas com meio de indução de diferenciação neuronal. As células da linhagem shRNAcontrole apresentaram uma morfologia similar a das células do grupo nada, embora, em menor número devido ao grande número de morte celular. As células dos grupos shRNACD90 e CD90- também apresentaram morfologia similar, com células possuindo filamentos alongados que, em alguns casos pareciam se conectar, indicando que houve uma diferenciação nestes grupos. Além do maior número de morte em células expressando menos CD90, não foi possível mensurar nenhuma diferença no potencial de diferenciação neuronal entre os grupos (Figuras11).



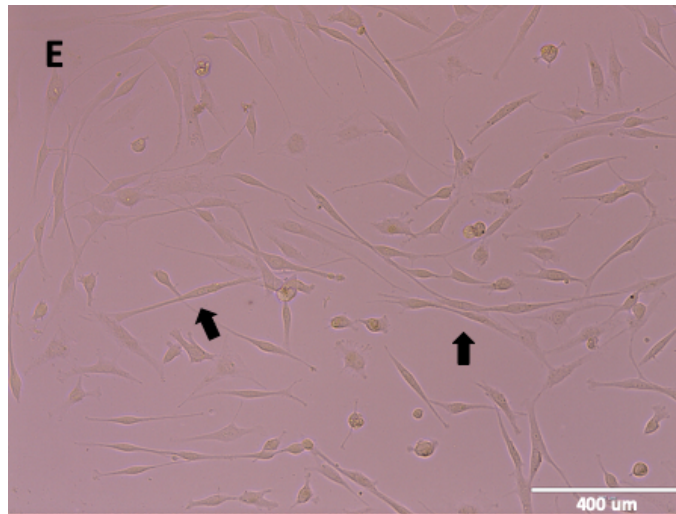
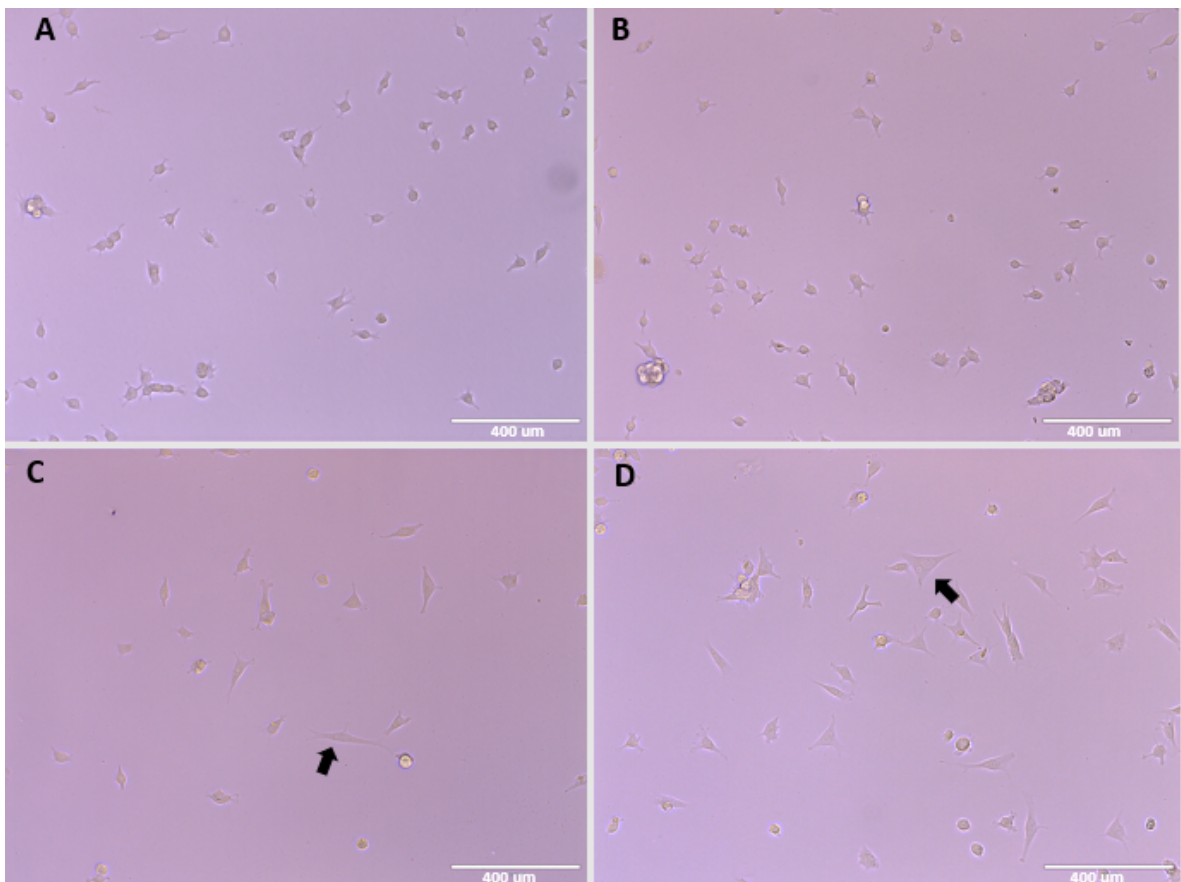


Figura 11. Diferenciação neuronal. (A: Células com meio DMEM, B: Células Nada, C: Células shRNAcontrole, D: shRNACD90 e E: Células CD90-) Células da amostra GLIO2 após de 7 dias do início da indução da diferenciação neuronal em placas tratadas com GELTREX, as setas indicam as projeções neuronais que neste caso conforme foi reduzindo a CD90 a diferenciação neuronal foi aumentando nos grupos de células com CD90 reduzida a sua expressão.



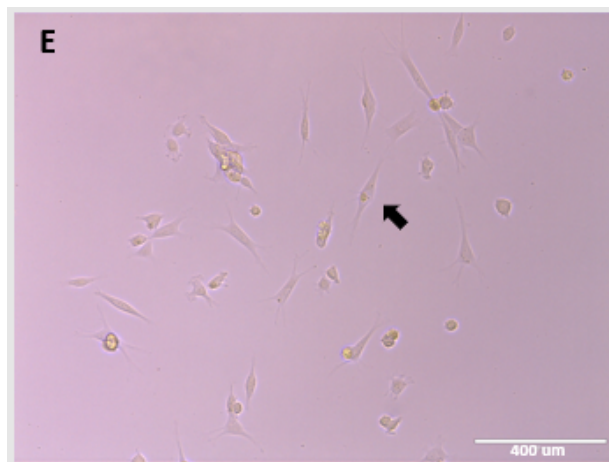


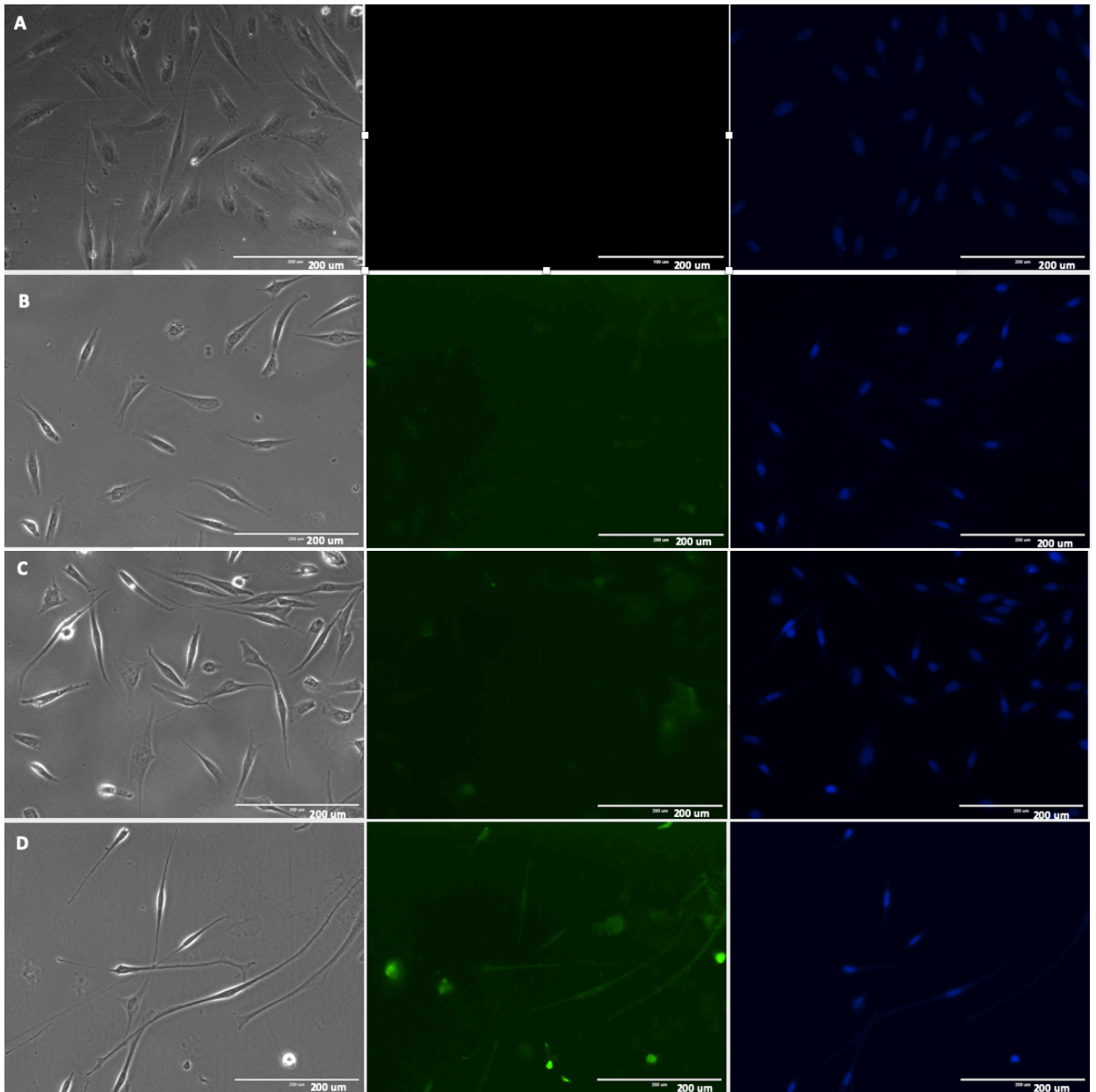
Figura 11.1 Diferenciação neuronal. (A: Células com meio DMEM, B: Células Nada, C: Células shRNAcontrole, D: shRNACD90 e E: Células CD90-) Células da amostra GLIO3 após de 7 dias do início da indução da diferenciação neuronal em placas tratadas com Poli-L-Ornitina/Laminina. (controle da diferenciação), as setas indicam as projeções neuronais, igualmente aqui olha-se que conforme foi reduzindo a CD90 a diferenciação neuronal foi aumentando nos grupos de células com CD90 reduzida a sua expressão.

Para caracterizar a diferenciação neuronal, foram realizados protocolos de imunofluorescência usando o marcador β -tubulina III para as células diferenciadas, uma vez que essa proteína é expressa nas fases iniciais do processo de neurogênese. Nos ensaios de imunofluorescência usando o anticorpo β -tubulina III (anticorpo primário) e o anticorpo IgG (H+L)/IgM (L) (anticorpo secundário), foi observada a marcação positiva apenas para as células que foram incubadas com meio de diferenciação neuronal. Também foi possível visualizar a mesma intensidade de marcação para β -tubulina III quando comparados os grupos nada e shRNAcontrole, ambos em placas tratadas. Entretanto, qualitativamente, notou-se uma marcação um pouco mais intensa quando comparados os grupos shRNAcontrole ou nada com as marcações observadas nos grupos onde as células tinham a expressão de CD90 diminuída (Figuras 12 e 13). Não foram observadas diferença na intensidade de marcação quando comparados os grupos shRNACD90 com CD90-.

PHASE

Anticorpo anti beta-Tubulina III

DAPI



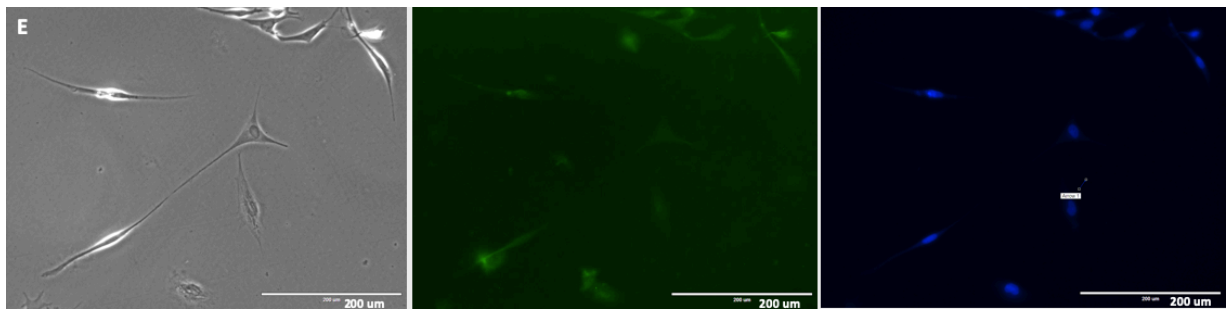
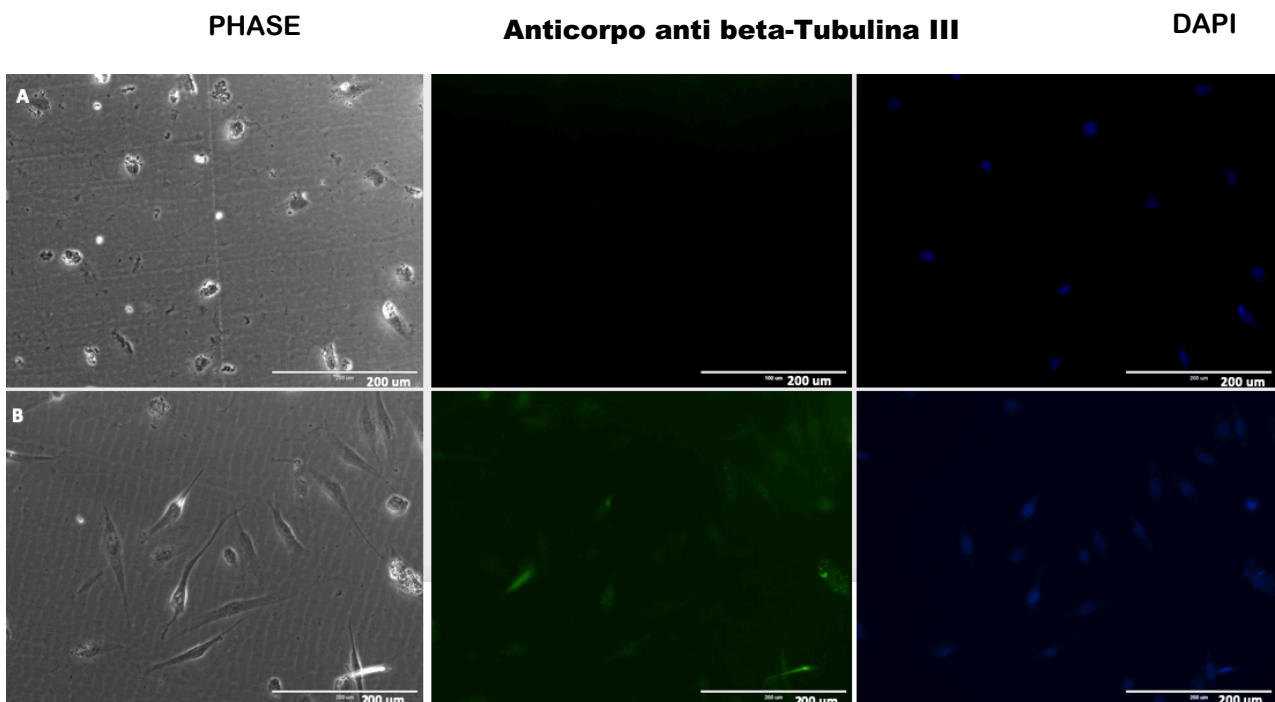


Figura 12. Células GLIO2 após de 21 dias de indução da diferenciação neuronal em placas tratadas com Poli-L-Ornitina/Laminina, (Fila **A**: Células com meio DMEM, Fila **B**: Células Nada, Fila **C**: Células shRNAcontrole, Fila **D**: Células shRNACD90 e Fila **E**: Células CD90-). Foi usado a técnica de imunofluorescência usando o anticorpo anti beta-Tubulina III após o tratamento com meio indutor indicando a diferenciação neuronal e DAPI os núcleos das células presentes.



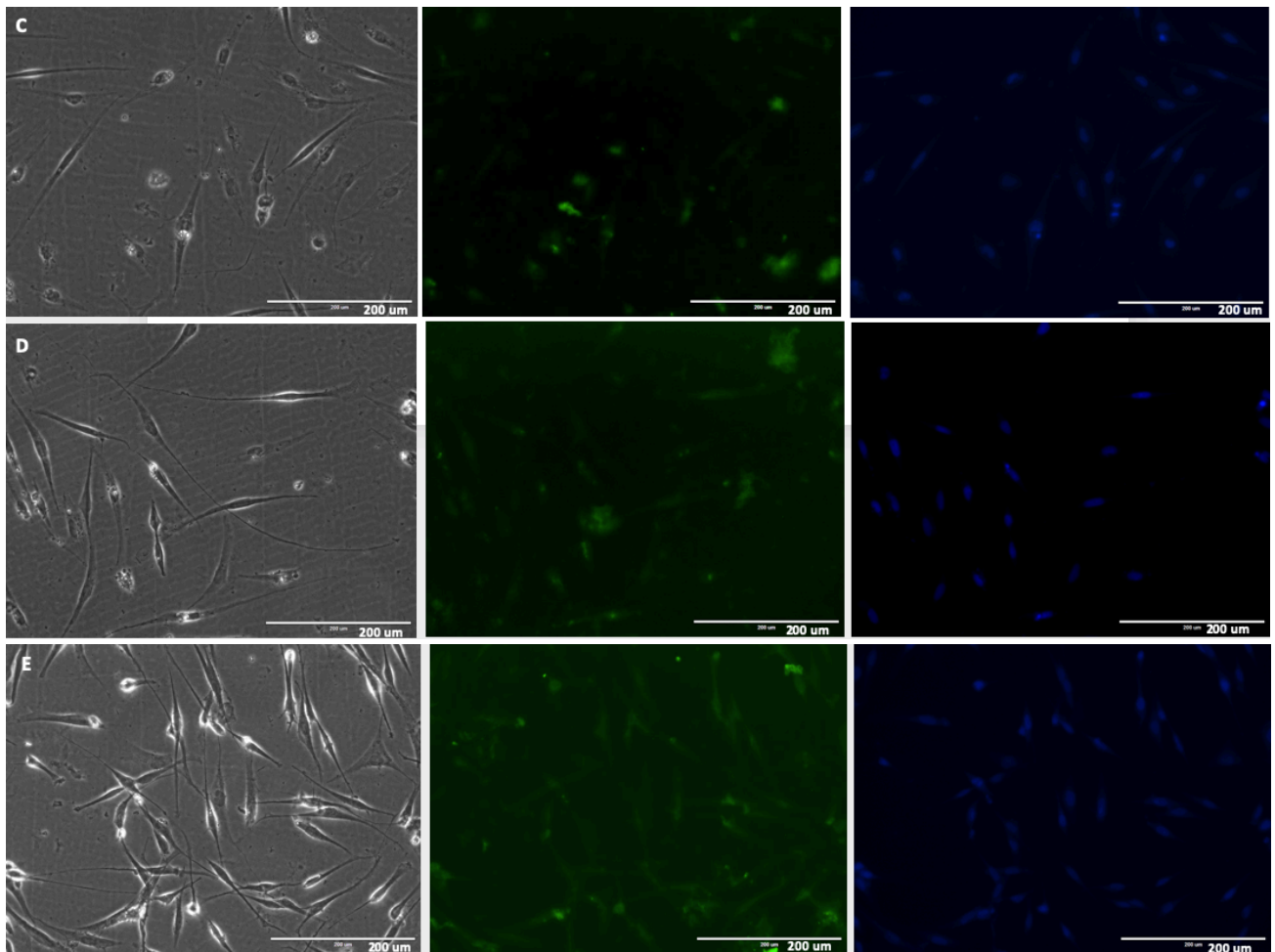


Figura 13. Células GLIO2 após de 21 dias de indução da diferenciação neuronal em placas tratadas com GELTREX, (Fila **A**: Células com meio DMEM, Fila **B**: Células Nada, Fila **C**: Células shRNAcontrole, Fila **D**: Células shRNACD90 e Fila **E**: Células CD90-). Foi usado a técnica de imunofluorescência usando o anticorpo anti beta-Tubulina III após o tratamento com meio indutor indicando a diferenciação neuronal e DAPI os núcleos das células presentes.

6. DISCUSSÃO

A busca por marcadores tumorais tem sido alavancada nos últimos anos como uma das possíveis ferramentas que pode auxiliar no diagnóstico, tratamento e até mesmo prognóstico de várias doenças oncológicas, contudo, o reconhecimento das CTC e suas respectivas associações com a progressão do câncer ainda é um desafio na biologia de inúmeros tipos de tumores.

E claro que a definição molecular dos diferentes tipos de GBM que se podem apresentar é importante e não pode ser só uma classificação histológica/morfológica pois deve se considerar que o microambiente tumoral apresenta grande heterogeneidade, tem limitações da representatividade, por exemplo qual parte podemos ter coletado para os análises, porque isso pode aparecer de forma diferente dependendo da região do tumor coletada para ser diagnosticada, por isso, é importante conhecer que interações das proteínas que pode estar relacionadas no microambiente tumoral e poder classificar estes tumores tendo informações moleculares importantes que pode nos auxiliar, ainda mais no que se diz respeito aos métodos de detecção e orientação a uma terapia mais direcionada (individualizada para cada paciente)⁴⁹.

Sabe-se que a formação das oncoesferas é um grande passo no processo da tumorigênese e, portanto, estudos nessa área visam avaliar a formação dessas estruturas para conseguir ponderar o crescimento e desenvolvimento tumoral. Neste sentido, nos estudos de GBM, tem-se destacado a importância de certos marcadores para a formação das CTC, bem como surgimento das oncosferas. Este trabalho trouxe o enfoque na avaliação da glicoproteína CD90 associada à produção de novas células do glioblastoma, e mostrou que populações celulares do tumor que expressam menos CD90, tem sua capacidade reduzida na formação de oncoesferas, ou seja, predizendo a expressão deste marcador como importante no prognóstico.

Nossos dados mostraram a formação de oncosferas nas subpopulações avaliadas, porém, também notamos que a forma tridimensional dessas estruturas não foi mantida por mais de 7 dias, pelo que concorda com estudos⁹² onde destacaram que a estrutura tridimensional das oncosferas não é mantida a mais de 7 dias principalmente no grupo de linhagem shRNAcontrole.

Ressalta-se que a manutenção das oncosferas pode estar ligada a vários mecanismos genéticos e epigenéticos pouco esclarecidos e que pesquisas nessa abordagem precisam ser potencializadas para CTC. Também é importante mencionar que as células dessa pesquisa passaram por um período de congelamento extraordinário em virtude da pandemia de Covid-19 sendo que naturalmente podem ser congeladas quando alcançarem o 80% de confluência¹¹⁴, no nosso caso tivemos que congelar em

confluências menores a 80% e o crioprotetor celular (DMSO) poderia ter causado mais danos nas células ou eu elas morreram mais do esperado.

Um grande achado do nosso trabalho indicou que as subpopulações shRNACD90 e CD90- mostraram oncosferas menores em tamanho, quantidade e menos consistentes, principalmente, no grupo celular CD90-, quando comparadas com os grupos controles. Esses dados estão de acordo com outro estudo que mostrou em células de linhagem primária para GBM com Nocaute também usando a transdução lentiviral e as células ativadas magneticamente para CD90 obteve resultados similares, sendo enfatizado que a expressão de CD90 gera a capacidade de formar esferoides fazendo parte da migração, invasão, e adesão, dos tumores de GBM¹⁰⁶.

Como observado nos resultados as oncoesferas das linhagens shRNACD90 e CD90- apresentaram uma menor densidade populacional, o que pode estar ligado à capacidade reduzida de adesão entre as células que tiveram ablação da molécula CD90. He-Ming Zhou¹¹⁵ descreveu a relevância da CD90 no processo de aderência celular, relatando que as CTC utilizam de vários mecanismos envolvendo as especializações celulares, como as junções de adesão, para promover o crescimento do esferoide tumoral.

Entre os grupos controles (shRNAcontrole e Nada) foi observado que a formação das oncoesferas foi proeminente, entretanto, maiores e mais consistes na linhagem nada. É possível inferir, que o grupo shRNAcontrole, apesar de usar para a transfecção um RNA de interferência aleatória para o domínio gênico CD90, ainda assim passou por uma etapa de estresse que pode ter sido causado pelas próprias partículas lentivirais e suas associações moleculares e não moleculares com a célula transduzida. Assim, a linhagem Nada, representa aquela que não passou por qualquer situação indutora de estresse, ficou 10 dias a menos em cultivo celular e, por isso, pode ter expressado um nível de CD90 superior às shRNAcontrole.

Na avaliação da capacidade de diferenciação usando além dos grupos já avaliados anteriormente, também as células mesenquimais, observamos que houve uma evidente redução de adipogênese e osteogênese nas linhagens shRNACD90 e CD90- em relação aos demais grupos, sendo que nos grupos controle observamos uma taxa de diferenciação tanto para adipócitos quanto para osteócitos.

Nossos dados foram similares aos achados de Clavreule e equipe¹¹⁶ em relação à diferenciação osteogênica. Nesse estudo, feito também com células de cultura primária isolada de GBM e grupo controle de células MSC, foi identificado nas amostras a diferenciação em células de osteogênicas, através dos achados de depósitos de cálcio, contudo, de forma contraditória aos nossos dados eles não tiveram diferenciação adipogênica.

Anteriormente, nossa equipe descobriu que a ablação de CD90 em MSC humanas aumentou a eficiência da diferenciação em células adipogênicas e osteogênicas¹¹². Mas o presente estudo identificou exatamente o contrário em relação às células CTC de GBM, possivelmente, porque, apesar dessas células terem a capacidade de se diferenciar em adipócitos e osteócitos bem como as MSC, utilizam mecanismos de vias de sinalização para essas diferenciações ainda pouco esclarecidos. Esse achado pode ser apoiado por uma pesquisa que sugeriu uma possibilidade de fusão de CTC a outros tipos de células do microambiente tumoral⁸⁹, mas esse processo ainda é confuso e incerto.

Em relação à capacidade de diferenciação em células neuronais, foi avaliado que os grupos shRNACD90 e CD90- apresentam células com características neuronais, observamos que nas células de glioblastoma sem diferenciar são células pleomórficas, arredondadas, apresenta núcleos visíveis e contornos irregulares, correlacionando ao estudo de Osorio Lopez e colegas que recentemente identificaram a capacidade das células de glioblastoma de se infiltrar amplamente no parênquima cerebral sem esforço, havendo maior concentração de células neoplásicas no centro do tumor⁴⁹, relacionada à sua características morfológica.

Existem várias vias pelas quais a glicoproteína CD90 está sendo regulada, recentes estudos encontraram que por meio da ativação da via PKC- δ / Syk / NF- κ B a CD90 tem sido regulada causando a inibição da migração em células endoteliais por meio da regulação positiva da expressão de Thy-1¹¹⁷, portanto segue em conhecimento das vias que podem ajudar as conexões no microambiente tumoral.

Este estudo esclareceu que a Glicoproteína CD90 pode ajudar a criar CTC progenitoras e aumentar a angiogênese, se comunicando com outras células do microambiente tumoral, sendo comparado ao estudo no qual células mesenquimais no

GBM induziram a junção celular por meio de mecanismos intrínsecos celulares e fatores do microambiente tumoral, ajudando a agressividade do GBM¹¹⁸.

Os microtúbulos neuronais são atores-chave na diferenciação, divisão celular, migração e sinalização¹¹⁹, em nosso estudo também foi identificado com a coloração do anticorpo BetaTubulina III, para a diferenciação neuronal, a formação de microtubulos nas células com redução da CD90, se desdiferenciado para células progenitoras, na figura 13 foi observado que as células do grupo shRNA CD90 e GLIOCD90 - com coloração verde intensa foi mais pronunciada em comparação às células do grupo ShRNAControle e Nada.

A morfologia observada na microscopia de fase amostrou que algumas células adotaram a aparência de neurônios com prolongamentos muito alongados, com prolongamentos que até se comunicam com outras células. A partir da diminuição na expressão de CD90, que resultou em uma capacidade de diferenciação neuronal levemente maior e, conseqüentemente, mudança na sua morfologia celular, por tanto se entende que a glicoproteína ajuda as junções celulares fazendo que o GBM seja mais agressivo.

As células tronco de câncer se encontram situadas em sua maioria de reserva no hipocampo cerebral e depende dos estímulos externos e internos para serem marcadas biologicamente, aquelas células podem ter divisões assimétricas e simétricas como também ser células de um só uso e podem voltar a estado inativo ao de célula tronco e permanecer em estados quiescentes ou em G0, e que em caso de mutações, deleções, o alguma outra alteração genética molecular essas mesmas células podem ser novamente ser ativadas para ajudar a que o câncer seja mais estável dentro da sua microambiente tumoral ³⁶.

Como já demonstrado neste estudo e em outros, é possível concluir que o CD90 deve afetar a progressão do câncer cerebral, e que futuramente se poderia pensar em um novo marcador molecular acrescido na classificação dos gliomas que o reduza e atue na sua expressão ou em vias em que ele participe nas células tronco tumorais do GBM, sabendo que a nova classificação dos canceres cerebrais incluem os aspectos moleculares e ainda mais sabendo que possivelmente poderia ser um biomarcador muito certo para identificar glioblastoma multiforme e poder assim dar um prognostico para o paciente.

7. CONCLUSÃO

Os resultados dos ensaios de formação de oncosferas sugerem que a ablação de CD90 afeta negativamente a capacidade das célula-tronco de glioblastoma de gerar tumor, portanto essa molécula parece ser importante para o crescimento da massa tumoral de glioblastoma.

A ablação de CD90 resultou na redução nos potenciais de diferenciação adipogênica e osteogênica das células originadas de glioblastoma. Ainda, nos ensaios de indução de diferenciação neuronal, a redução na expressão de CD90, parece facilitar a diferenciação neuronal. Portanto, é possível afirmar que a glicoproteína é um marcador muito eficiente para ser aqueles difíceis diagnósticos dos pacientes que sofrem de GBM.

A Glicoproteína CD90 promete ser um biomarcador certo, já que molecularmente afeta muitas vias envolvidas nos processos da biogênese do GBM junto com as mutações do IDH, MGMT, LOH, etc., como também nas diferenciações aqui analisadas e a ser achado superexpresso e participando na tumorigênese, portanto deveria ser incluído em novas classificações dos cânceres cerebrais.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Sistema Nacional de Salud. <https://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/>. *Guía Práctica Clínica GPC* (2009) doi:www.center.salud.gob.mx/interior/gpc.html.
2. Sherwood, L. M., Parris, E. E. & Folkman, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine* (1971) doi:10.1056/NEJM197111182852108.
3. Kuczynski, E. A., Vermeulen, P. B., Pezzella, F., Kerbel, R. S. & Reynolds, A. R. Vessel co-option in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* (2019) doi:10.1038/s41571-019-0181-9.
4. Jordan, C. T., Guzman, M. L. & Noble, M. Cancer stem cells. *New England Journal of Medicine* (2006) doi:10.1056/NEJMra061808.
5. Łos, M. J., Skubis, A. & Ghavami, S. Stem cells. in *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine* (2018). doi:10.1016/B978-0-12-812258-7.00002-2.
6. Nakanishi, M. *et al.* Human Pluripotency Is Initiated and Preserved by a Unique Subset of Founder Cells. *Cell* (2019) doi:10.1016/j.cell.2019.03.013.
7. Kmiecik, G. *et al.* Fetal membranes as a source of stem cells. *Advances in Medical Sciences* (2013) doi:10.2478/ams-2013-0007.
8. Maleki, M., Ghanbarvand, F., Behvarz, M. R., Ejtemaei, M. & Ghadirkhomi, E. Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *Int. J. Stem Cells* **7**, 118–126 (2014).
9. Ren, R., Ocampo, A., Liu, G. H. & Izpisua Belmonte, J. C. Regulation of Stem Cell Aging by Metabolism and Epigenetics. *Cell Metabolism* (2017) doi:10.1016/j.cmet.2017.07.019.
10. Morrison, S. J. & Spradling, A. C. Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. *Cell* (2008) doi:10.1016/j.cell.2008.01.038.
11. Nimmakayala, R. K., Batra, S. K. & Ponnusamy, M. P. Unraveling the journey of cancer stem cells from origin to metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (2019) doi:10.1016/j.bbcan.2018.10.006.
12. Sell, S. On the stem cell origin of cancer. *American Journal of Pathology* (2010) doi:10.2353/ajpath.2010.091064.
13. Cohnheim, J. Congenitales, quergestreiftes Muskelsarkom der Nieren. *Arch. für Pathol. Anat. und Physiol. und für Klin. Med.* (1875) doi:10.1007/BF01978936.
14. Furth, J. & Kahn, M. C. The transmission of leukemia of mice with a single cell. *Am. J. Cancer* (1937) doi:10.1158/ajc.1937.276.
15. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* (1997) doi:10.1038/nm0797-730.
16. Alamgeer, M., Peacock, C. D., Matsui, W., Ganju, V. & Watkins, D. N. Cancer stem cells in lung cancer: Evidence and controversies. *Respirology* (2013) doi:10.1111/resp.12094.
17. Sell, S. Cellular origin of hepatocellular carcinomas. *Seminars in Cell and Developmental Biology* (2002) doi:10.1016/S1084952102001295.
18. Persano, L., Della Puppa, A., Porcù, E., Maule, F. & Viola, G. Glioblastoma cancer stem cells. in *Cancer Stem Cells: Emerging Concepts and Future Perspectives in*

- Translational Oncology* 273–296 (Springer International Publishing, 2015). doi:10.1007/978-3-319-21030-8_11.
19. Takaishi, S. *et al.* Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* (2009) doi:10.1002/stem.30.
 20. Deye, N., Vincent, F., Michel, P., Ehrmann, S., Da Silva, D., Piagnerelli, M., ... Laterre, P.-F. (2016). Changes in cardiac arrest patients's temperature management after the 2013 "TTM" trial: Results from an international survey. *Annals of Intensive Care*, 6(1). <http://doi.org/10.1186/s13613-015-0104-6> *et al.* Novel CYP2B6 polymorphisms and their impact on efavirenz and bupropion metabolism. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (2013) doi:10.1007/s00210-013-0832-9.
 21. Briscoe, J. & Théron, P. P. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2013) doi:10.1038/nrm3598.
 22. Ziller, M. J. *et al.* Dissecting neural differentiation regulatory networks through epigenetic footprinting. *Nature* (2015) doi:10.1038/nature13990.
 23. Dontu, G. *et al.* Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res.* (2004) doi:10.1186/bcr920.
 24. Giachino, C. *et al.* A Tumor Suppressor Function for Notch Signaling in Forebrain Tumor Subtypes. *Cancer Cell* (2015) doi:10.1016/j.ccell.2015.10.008.
 25. Berenice, A. *et al.* La vía de señalización Wnt-B-catenina y su relación con el cáncer. *Redalyc* (2012).
 26. Li, W. *et al.* HMGA2 regulates epithelial-mesenchymal transition and the acquisition of tumor stem cell properties through TWIST1 in gastric cancer. *Oncol. Rep.* (2017) doi:10.3892/or.2016.5255.
 27. Opferman, J. T. & Kothari, A. Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Cell Death and Differentiation* (2018) doi:10.1038/cdd.2017.170.
 28. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* (2007) doi:10.1038/sj.onc.1210220.
 29. Yadav, A. K. & Desai, N. S. Cancer Stem Cells: Acquisition, Characteristics, Therapeutic Implications, Targeting Strategies and Future Prospects. *Stem Cell Reviews and Reports* (2019) doi:10.1007/s12015-019-09887-2.
 30. Rasool, S., Rutella, S., Ferrone, S. & Maccalli, C. Cancer Stem Cells: The Players of Immune Evasion from Immunotherapy. in (2019). doi:10.1007/978-3-030-16624-3_9.
 31. Rabinovich, I. *et al.* HER2-expressing breast tumors are associated with breast cancer stem-cell phenotype CD44+/CD24- TT - Tumores de mama que superexpressam HER2 estão associados ao fenótipo de células-tronco tumorais CD44+/CD24-. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* (2018) doi:10.5935/1676-2444.20180052.
 32. Li, C. *et al.* Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* (2007) doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2030.
 33. Kavyasudha, C., Joseph, J. P., Jayaraj, R., Pillai, A. A. & Devi, A. Conventional and Emerging Markers in Stem Cell Isolation and Characterization. in (2019). doi:10.1007/5584_2019_475.
 34. Allen, N. J. & Lyons, D. A. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science* (2018) doi:10.1126/science.aat0473.

35. Tuazon, J. P. *et al.* Neural stem cells. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* (2019). doi:10.1007/978-3-030-31206-0_4.
36. Lazutkin, A., Podgorny, O. & Enikolopov, G. Modes of division and differentiation of neural stem cells. *Behavioural Brain Research* (2019) doi:10.1016/j.bbr.2019.112118.
37. Barnholtz-Sloan, J. S., Ostrom, Q. T. & Cote, D. Epidemiology of Brain Tumors. *Neurologic Clinics* (2018) doi:10.1016/j.ncl.2018.04.001.
38. Báez, A., González Roffo, A., Gómez Escalante, J., Campero, Á. & Casas Parera, I. Principales biomarcadores moleculares en la caracterización de los tumores del sistema nervioso central. *Rev. argent. neurocir* 209–215 (2020).
39. Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R. & Begley, D. J. Neurobiology of Disease Structure and function of the blood – brain barrier. *Neurobiol. Dis.* (2010) doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030.
40. Grubb, C. S. *et al.* Breast cancer subtype as a predictor for outcomes and control in the setting of brain metastases treated with stereotactic radiosurgery. *J. Neurooncol.* (2016) doi:10.1007/s11060-015-2014-8.
41. Berghoff, A. S. *et al.* Density of tumor-infiltrating lymphocytes correlates with extent of brain edema and overall survival time in patients with brain metastases. *Oncimmunology* (2016) doi:10.1080/2162402X.2015.1057388.
42. Sevenich, L. *et al.* Analysis of tumour- and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for cathepsin S. *Nat. Cell Biol.* (2014) doi:10.1038/ncb3011.
43. Ostrom, Q. T. *et al.* Neuro-Oncology CBTRUS Statistical Report : Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the. **22**, 1–96 (2020).
44. Ostrom, Q. T. *et al.* The epidemiology of glioma in adults: A state of the science review. *Neuro-Oncology* vol. 16 896–913 (2014).
45. Ed, T. A. G., Lizabeth, P. D. X. X. A. R. Y. E., Avis, D. D. & Xt, A. G. E. E. N. X. Epidemiology and Overview of Gliomas. *Semin. Oncol. Nurs.* **00**, 1–10 (2018).
46. Komori, T., Muragaki, Y. & Chernov, M. F. Pathology and Genetics of Gliomas. *Prog. Neurol. Surg.* (2018) doi:10.1159/000466835.
47. Jones, D. T. W., Bandopadhyay, P. & Jabado, N. The Power of Human Cancer Genetics as Revealed by Low-Grade Gliomas. *Annu. Rev. Genet.* (2019) doi:10.1146/annurev-genet-120417-031642.
48. Colip, C., Oztek, M. A., Lo, S., Yuh, W. & Fink, J. Updates in the Neuroimaging and WHO Classification of Primary CNS Gliomas: A Review of Current Terminology, Diagnosis, and Clinical Relevance From a Radiologic Prospective. *Topics in Magnetic Resonance Imaging* (2019) doi:10.1097/RMR.000000000000195.
49. Lopes Abath Neto, O. & Aldape, K. Morphologic and Molecular Aspects of Glioblastomas. *Neurosurg. Clin. N. Am.* **32**, 149–158 (2021).
50. HHS Public Access. **555**, 469–474 (2018).
51. Louis, D. N. *et al.* cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. *Brain Pathol.* **30**, 844–856 (2020).
52. Hovestadt, V. *et al.* Medulloblastomics revisited: biological and clinical insights from thousands of patients. *Nature Reviews Cancer* (2020) doi:10.1038/s41568-019-0223-8.

53. Yang, P. *et al.* IDH mutation and MGMT promoter methylation in glioblastoma: Results of a prospective registry. *Oncotarget* (2015) doi:10.18632/oncotarget.5683.
54. Garrett, M. *et al.* Metabolic characterization of isocitrate dehydrogenase (IDH) mutant and IDH wildtype gliomaspheres uncovers cell type-specific vulnerabilities. *Cancer Metab.* (2018) doi:10.1186/s40170-018-0177-4.
55. Scherer, H. J. A CRITICAL REVIEW: THE PATHOLOGY OF CEREBRAL GLIOMAS. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* (1940) doi:10.1136/jnnp.3.2.147.
56. Ferguson, S. & Lesniak, M. S. Percival Bailey and the classification of brain tumors. *Neurosurgical focus* (2005) doi:10.3171/foc.2005.18.4.8.
57. Scherer, H. J. The Pathology of Cerebral Gliomas. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* (1940) doi:10.1136/jnnp.3.2.147.
58. Seystahl, K., Wick, W. & Weller, M. Therapeutic options in recurrent glioblastoma- An update. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* vol. 99 389–408 (2016).
59. Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* vol. 131 803–820 (2016).
60. The Molecular and Microenvironmental Landscape of Glioblastomas: Implications for the Novel Treatmen.
61. Bhaduri, A. *et al.* Outer Radial Glia-like Cancer Stem Cells Contribute to Heterogeneity of Glioblastoma. *Cell Stem Cell* (2020) doi:10.1016/j.stem.2019.11.015.
62. Ferris, S. P., Hofmann, J. W., Solomon, D. A. & Perry, A. Characterization of gliomas: from morphology to molecules. *Virchows Arch.* **471**, 257–269 (2017).
63. Koh, I. *et al.* The mode and dynamics of glioblastoma cell invasion into a decellularized tissue-derived extracellular matrix-based three-dimensional tumor model. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
64. Duman, C. *et al.* Acyl-CoA-Binding Protein Drives Glioblastoma Tumorigenesis by Sustaining Fatty Acid Oxidation. *Cell Metab.* (2019) doi:10.1016/j.cmet.2019.04.004.
65. Kant, S. *et al.* CBMT-28. FATTY ACID OXIDATION PROVIDES METABOLIC PLASTICITY TO MAINTAIN GROWTH IN THE DYNAMIC MICROENVIRONMENT OF GLIOBLASTOMA. *Neuro. Oncol.* (2019) doi:10.1093/neuonc/noz175.150.
66. Prabhu, A., Kesarwani, P., Kant, S., Graham, S. F. & Chinnaiyan, P. Histologically defined intratumoral sequencing uncovers evolutionary cues into conserved molecular events driving gliomagenesis. *Neuro. Oncol.* (2017) doi:10.1093/neuonc/nox100.
67. Szopa, W., Burley, T. A., Kramer-Marek, G. & Kaspera, W. Diagnostic and therapeutic biomarkers in glioblastoma: Current status and future perspectives. *BioMed Research International* vol. 2017 (2017).
68. Rutkowska, A., Stoczyńska-Fidelus, E., Janik, K., Włodarczyk, A. & Rieske, P. EGFRvIII: An Oncogene with Ambiguous Role. *Journal of Oncology* (2019) doi:10.1155/2019/1092587.
69. K., M. *et al.* PDGFRA gain in low-grade diffuse gliomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* (2013) doi:10.1097/NEN.0b013e31827c4b5b LK - <http://utah-primoprod.hosted.exlibrisgroup.com/openurl/UTAH/UTAH->

- S?sid=EMBASE&issn=00223069&id=doi:10.1097%2FNEN.0b013e31827c4b5b&a
title=PDGFRA+gain+in+low-
grade+diffuse+gliomas&stitle=J.+Neuropathol.+Exp.+Neurol.&title=Journal+of+Ne
uropathology+and+Experimental+Neurology&volume=72&issue=1&spage=61&ep
age=66&aualast=Motomura&aufirst=Kazuya&aunit=K.&aufull=Motomura+K.&code
n=JNENA&isbn=&pages=61-66&date=2013&aunit1=K&aunitm=.
70. Crespo, I. *et al.* Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *American Journal of Pathology* (2015) doi:10.1016/j.ajpath.2015.02.023.
 71. Tanaka, S. *et al.* PIK3CA activating mutations are associated with more disseminated disease at presentation and earlier recurrence in glioblastoma. *Acta Neuropathol. Commun.* (2019) doi:10.1186/s40478-019-0720-8.
 72. Ming, M. & He, Y. Y. PTEN in DNA damage repair. *Cancer Letters* (2012) doi:10.1016/j.canlet.2012.01.003.
 73. Xu, J., Li, Z., Wang, J., Chen, H. & Fang, J. Y. Combined PTEN mutation and protein expression associate with overall and disease-free survival of glioblastoma patients. *Transl. Oncol.* (2014) doi:10.1016/j.tranon.2014.02.004.
 74. Carico, C. *et al.* Loss of PTEN is not associated with poor survival in newly diagnosed glioblastoma patients of the temozolomide era. *PLoS ONE* (2012) doi:10.1371/journal.pone.0033684.
 75. Yang, Y. *et al.* Mutations of PTEN gene in gliomas correlate to tumor differentiation and short-term survival rate. *Anticancer Res.* (2010).
 76. Kasthuber, E. R. & Lowe, S. W. Putting p53 in Context. *Cell* (2017) doi:10.1016/j.cell.2017.08.028.
 77. Brennan, C. W. *et al.* The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* (2013) doi:10.1016/j.cell.2013.09.034.
 78. Leroy, B. *et al.* The TP53 website: An integrative resource centre for the TP53 mutation database and TP53 mutant analysis. *Nucleic Acids Res.* (2013) doi:10.1093/nar/gks1033.
 79. Kakkar, A. *et al.* Loss of heterozygosity on chromosome 10q in glioblastomas, and its association with other genetic alterations and survival in Indian patients. *Neurol. India* (2011) doi:10.4103/0028-3886.79139.
 80. C., H. *et al.* Fine mapping of chromosome 22q tumor suppressor gene candidate regions in astrocytomas. *Int. J. Cancer* (2004) doi:10.1002/ijc.11638 LK - [http://utah-primoprod.hosted.exlibrisgroup.com/openurl/UTAH/UTAH-S?sid=EMBASE&issn=00207136&id=doi:10.1002%2Fijc.11638&atitle=Fine+mapp+ing+of+chromosome+22q+tumor+suppressor+gene+candidate+regions+in+astrocytomas&stitle=Int.+J.+Cancer&title=International+Journal+of+Cancer&volume=108&issue=6&spage=839&epage=844&aualast=Hartmann&aufirst=Christian&aunit=C.&aufull=Hartmann+C.&coden=IJCNA&isbn=&pages=839-844&date=2004&aunit1=C&aunitm=.](http://utah-primoprod.hosted.exlibrisgroup.com/openurl/UTAH/UTAH-S?sid=EMBASE&issn=00207136&id=doi:10.1002%2Fijc.11638&atitle=Fine+mapp+ing+of+chromosome+22q+tumor+suppressor+gene+candidate+regions+in+astrocytomas&stitle=Int.+J.+Cancer&title=International+Journal+of+Cancer&volume=108&issue=6&spage=839&epage=844&aualast=Hartmann&aufirst=Christian&aunit=C.&aufull=Hartmann+C.&coden=IJCNA&isbn=&pages=839-844&date=2004&aunit1=C&aunitm=)
 81. Zainuddin, N., Jaafar, H., Isa, M. N. & Abdullah, J. M. Loss of heterozygosity on chromosomes 10q, 9p, 17p and 13q in Malays with malignant glioma. *Neurol. Res.* (2004) doi:10.1179/016164104773026598.
 82. Vogazianou, A. P. *et al.* Distinct patterns of 1p and 19q alterations identify subtypes of human gliomas that have different prognoses. *Neuro. Oncol.* (2010) doi:10.1093/neuonc/nop075.
 83. Zhao, J., Ma, W. & Zhao, H. Loss of heterozygosity 1p/19q and survival in glioma:

- A meta-analysis. *Neuro. Oncol.* (2014) doi:10.1093/neuonc/not145.
84. Santisukwongchote, S., Teerapakpinyo, C. & Chankate, P. Pathology - Research and Practice Simplified approach for pathological diagnosis of diffuse gliomas in adult patients. *Pathol. - Res. Pract.* **223**, 153483 (2021).
 85. Valtorta, S. *et al.* Metformin and temozolomide, a synergic option to overcome resistance in glioblastoma multiforme models. *Oncotarget* **8**, 113090–113104 (2017).
 86. Huang, B. *et al.* Advances in immunotherapy for glioblastoma multiforme. *Journal of Immunology Research* vol. 2017 (2017).
 87. Shahar, T. *et al.* Percentage of mesenchymal stem cells in high-grade glioma tumor samples correlates with patient survival. *Neuro. Oncol.* **19**, 660–668 (2017).
 88. Dirkse, A. *et al.* Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. *Nat. Commun.* (2019) doi:10.1038/s41467-019-09853-z.
 89. Sun, C. *et al.* Mesenchymal stem cells promote glioma neovascularization in vivo by fusing with cancer stem cells. *BMC Cancer* (2019) doi:10.1186/s12885-019-6460-0.
 90. 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).
 91. Li, Z. CD133: A stem cell biomarker and beyond. *Experimental Hematology and Oncology* vol. 2 (2013).
 92. Pavon, L. F. *et al.* Mesenchymal stem cell-like properties of CD133+ glioblastoma-initiating cells. *Oncotarget* **7**, 40546–40557 (2016).
 93. 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**, (2012).
 94. Pavon, L. F. *et al.* In vitro Analysis of Neurospheres Derived from Glioblastoma Primary Culture: A Novel Methodology Paradigm. *Front. Neurol.* **4**, (2014).
 95. Inoue, A. *et al.* Blood vessels expressing CD90 in human and rat brain tumors. *Neuropathology* **36**, 168–180 (2016).
 96. Lu, J. W. *et al.* Overexpression of Thy1/CD90 in human hepatocellular carcinoma is associated with HBV infection and poor prognosis. *Acta Histochem.* **113**, 833–838 (2011).
 97. Ishiura, Y. *et al.* Anomalous expression of Thy1 (CD90) in B-cell lymphoma cells and proliferation inhibition by anti-Thy1 antibody treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 329–334 (2010).
 98. Wang, Y. *et al.* CD90 positive cells exhibit aggressive radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma. *J. Thorac. Dis.* **9**, 610–620 (2017).
 99. Shaikh, M. V., Kala, M. & Nivsarkar, M. CD90 a potential cancer stem cell marker and a therapeutic target. *Cancer Biomarkers* vol. 16 301–307 (2016).
 100. Sukowati, C. H. C. *et al.* The Expression of CD90/Thy-1 in Hepatocellular Carcinoma: An In Vivo and In Vitro Study. *PLoS One* **8**, e76830 (2013).
 101. Svensson, A., Ramos-Moreno, T., Eberstål, S., Scheduling, S. & Bengzon, J. Identification of two distinct mesenchymal stromal cell populations in human malignant glioma. *J. Neurooncol.* (2017) doi:10.1007/s11060-016-2302-y.
 102. Kuroiwa, K. *et al.* Epitope determination of anti rat thy-1 monoclonal antibody that

- regulates neurite outgrowth. *Hybridoma* **31**, 225–232 (2012).
103. Leyton, L. & Hagood, J. S. Thy-1 modulates neurological cell-cell and cell-matrix interactions through multiple molecular interactions. *Advances in neurobiology* vol. 8 3–20 (2014).
 104. Kumar, A., Bhanja, A., Bhattacharyya, J. & Jaganathan, B. G. Multiple roles of CD90 in cancer. *Tumor Biology* vol. 37 11611–11622 (2016).
 105. Woo, S. R. *et al.* Glioblastoma specific antigens, GD and CD90, are not involved in cancer stemness. *Anat. Cell Biol.* **48**, 44–53 (2015).
 106. Avril, T. *et al.* CD90 expression controls migration and predicts dasatinib response in glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* **23**, 7360–7374 (2017).
 107. Pandith, A. A. *et al.* Concordant association validates MGMT methylation and protein expression as favorable prognostic factors in glioma patients on alkylating chemotherapy (Temozolomide). *Sci. Rep.* **8**, (2018).
 108. Mandel, J. J. *et al.* Impact of IDH1 mutation status on outcome in clinical trials for recurrent glioblastoma. *J. Neurooncol.* **129**, 147–154 (2016).
 109. Simon, T., Jackson, E. & Giamas, G. Breaking through the glioblastoma micro-environment via extracellular vesicles. *Oncogene* (2020) doi:10.1038/s41388-020-1308-2.
 110. 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.* (2018) doi:10.1038/s41598-018-21358-1.
 111. Vidotto, T. *et al.* Emerging role of PTEN loss in evasion of the immune response to tumours. *British Journal of Cancer* (2020) doi:10.1038/s41416-020-0834-6.
 112. Moraes, D. A. *et al.* A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res. Ther.* **7**, (2016).
 113. Buzogany, V. H. N. Avaliação da ablação de CD90 em células primárias de glioblastomas humanos in vitro. 1–86 (2018).
 114. Ávila Portillo, L. M., Franco Ruiz, D., Ávila García, J., Rivers Arocha, A. & Sabogal, M. Stem Medicina Regenerativa 2 Hospital Militar Central Resúmen. 27–38 (2016).
 115. Zhou, H. M., Zhang, J. G., Zhang, X. & Li, Q. Targeting cancer stem cells for reversing therapy resistance: mechanism, signaling, and prospective agents. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, (2021).
 116. Clavreul, A. *et al.* Isolation of a new cell population in the glioblastoma microenvironment. *J. Neurooncol.* **106**, 493–504 (2012).
 117. Wen, H. C., Huo, Y. N., Chou, C. M. & Lee, W. Sen. PMA inhibits endothelial cell migration through activating the PKC- δ /Syk/NF- κ B-mediated up-regulation of Thy-1. *Sci. Rep.* **8**, 1–13 (2018).
 118. Behnan, J., Finocchiaro, G. & Hanna, G. The landscape of the mesenchymal signature in brain tumours. *Brain* **142**, 847–866 (2019).
 119. Manka, S. W. & Moores, C. A. The role of tubulin–tubulin lattice contacts in the mechanism of microtubule dynamic instability. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, (2018).