

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
**LUCAS CUNHA BARBOSA**

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA MATRIZ EXTRACELULAR DE  
GLIOBLASTOMA NO PERFIL ANGIOGÊNICO DE CÉLULAS  
ENDOTELIAIS DA MICROVASCULATURA CEREBRAL E NA  
SOBREVIDA GLOBAL DE PACIENTES

RIO DE JANEIRO  
2024

Lucas Cunha Barbosa

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA MATRIZ EXTRACELULAR DE GLIOBLASTOMA NO  
PERFIL ANGIOGÊNICO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DA MICROVASCULATURA  
CEREBRAL E NA SOBREVIDA GLOBAL DE PACIENTES

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Anatomia Patológica, Faculdade de  
Medicina, Universidade Federal do Rio  
de Janeiro, como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
(Anatomia Patológica).

Orientadora: Dra. Valéria Pereira Ferrer

Co-orientador: Dra. Manoela Heringer

Rio de Janeiro

2024

**Barbosa, Lucas Cunha**

**Estudo da influência da matriz extracelular de glioblastoma no perfil angiogênico de células endoteliais da microvasculatura cerebral e na sobrevida global de pacientes. / Lucas Cunha Barbosa. Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2024.**

104 f. ; 31 cm

Orientadores: Valéria Pereira Ferrer e Manoela Heringer

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica, 2024.

1. Glioblastoma. 2. Angiogênese. 3. Células Endoteliais. 4. Fatores Angiogênicos. 5. Metaloprotease 9. Anatomia Patológica – Dissertação I. Ferrer, Valéria Pereira. II. Heringer, Manoela. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Pós-Graduação em Anatomia Patológica. IV. Estudo da influência da matriz extracelular de glioblastoma no perfil angiogênico de células endoteliais da microvasculatura cerebral e na sobrevida global de pacientes.

**ASSINATURA DA BANCA**

## Agradecimentos

Nesse espaço desejo agradecer imensamente, e primeiramente, a Deus e a todos os espíritos de luz e da natureza, que me acompanharam e que me permitiram viver um dia de cada vez. Agradeço por fazerem parte de mim e por sempre estarem ao meu lado, me compondo e me guiando.

Agradeço a Lúcia Cunha Barbosa e Bartolomeu Barreto Barbosa, meus pais. Aqueles que lutaram para que eu chegasse aonde muitos duvidaram, e aonde até eu mesmo duvidei. Agradeço imensamente os conselhos, os auxílios, os dias mal dormidos por não me ter perto, mas que ainda assim me ajudavam a ficar mais forte por saber que isso iria valer a pena em algum momento. Amo vocês! A vocês devo todos esses anos de luta, e os próximos que virão. Agradeço a minha irmã Liliane, que sempre me apoiou e sei que sempre vai ser meu norte quando eu me sentir perdido. Te amo!

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Valéria Ferrer por tanta paciência, cuidado e carinho durante todo o meu caminho dentro da pós-graduação. Nos momentos difíceis ela me estendeu a mão e sempre esteve disponível para me ouvir e me aconselhar da melhor maneira!

Agradeço ao professor Vivaldo Moura-Neto por todo apoio e por cada conselho e puxão de orelha. Com certeza o seu suporte foi fundamental para o meu crescimento e para o meu desenvolvimento dentro da ciência (e na vida). Além disso agradeço ao pessoal do IECPN e LBMC (Geralda, Vitória, Manoela, Luciana, Verônica, Flávia, Nicolas e Luanna) por compartilharem comigo os seus conhecimentos e por serem um suporte muito importante para mim.

Agradeço aos meus melhores amigos Samuel e Thaynan, que foram e continuam sendo a minha base. Hoje, depois desses anos, sei que carrego em mim um pedaço de cada um de vocês. Vocês me emprestaram o que vocês são nas horas em que eu mais precisei, e sei que o tempo pode passar, mas nossas histórias vão ficar e novas histórias não de chegar. E esperarei de braços abertos. Amo vocês!

Agradeço também a Wang Dzak e Juliana Heitor, meus melhores amigos, da minha amada Bahia, e meu porto seguro. Nas horas mais difíceis vocês estavam comigo, mesmo que distante. Os nossos caminhos nos separaram fisicamente, mas nada vai distanciar a nossa história e a nossa amizade.

Agradeço também aos órgãos de fomento, que financiaram o meu projeto: CAPES, CNPQ, FAPERJ E PPGAP.

Por fim, agradeço a vida. A vida que, apesar de ser uma doce ilusão, me deu a oportunidade de ser feliz. A vida que ninguém sabe se é maravilha, sofrimento, alegria ou lamento. Que pode ser considerada um grande mistério profundo, ou apenas o sopro do criador numa atitude repleta de amor. A vida é luta e prazer? A vida é viver? A vida é sofrer? Deixemos a pergunta seguir rodando, até que alguém explique o que é a vida, além de bonita, bonita e bonita. Pra mim a vida é sentir, e isso foi o que eu mais fiz nesses últimos anos. Então posso afirmar que vivi, e como vivi.

E sei que estou só começando!

“Moi je t’offrirai des perles des pluie venues de pays où il ne pluet pàs.”

Jaques Brel

## Resumo

Glioblastomas (GBM) são conhecidos como os tumores mais comuns e letais que se desenvolvem no sistema nervoso central. Eles são considerados os gliomas difusos mais agressivos e que possuem alta resistência a tratamentos de radioterapia e quimioterapia, além de serem um dos tumores mais vascularizados. O processo angiogênico é definido como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, atuando na distribuição e fornecimento de nutrientes, oxigênio e fatores que favorecem o desenvolvimento tumoral. O GBM é considerado o tumor sólido com maior capacidade angiogênica e que apresenta alto grau de proliferação vascular e de células endoteliais (CEs), o que contribui com as principais características de agressividade desse tumor. Além disso, ainda é necessário um entendimento molecular aprofundado de como fatores secretados pelo GBM, tanto solúveis ou na matriz extracelular (MEC) influenciam células do microambiente tumoral (MAT), como as CEs. Nosso objetivo foi analisar a influência da MEC secretada por células de GBM humano em processos angiogênicos, como proliferação e ramificação; e na sobrevida global de pacientes GBM *in silico*. Para tal, analisamos o comportamento proliferativo de células endoteliais da microvasculatura cerebral humana (HBMECs) quando cultivadas sobre MEC pré-formada de HBMECs e células de GBM (linhagem GBM02). Foi desenvolvido um protocolo de preparo MEC pré-formada livre de células à base de cobertura de colágeno e lise celular com tampão TRITON X-100. Esse protocolo manteve melhor a quantidade de MEC e atividade biológica desta quando comparado com plástico. Verificamos quais moléculas da MEC poderiam estar afetando a sobrevida global dos pacientes. Através de gráficos Kaplan-Meier verificamos que diversas moléculas de MEC influenciavam negativamente a sobrevida de pacientes GBM, dentre elas a MMP-9. Foi verificado então o comportamento de HBMECs quando tratadas e não tratadas (controle) com meio condicionado (MC) de células de GBM, na ausência e presença de inibidor de MMP9 (Anticorpo Monoclonal anti-MMP9). Preliminarmente podemos observar que o meio condicionado aumenta o tamanho dos agregados celulares de HBMEC e que o inibidor foi hábil em diminuir o tamanho dos agregados. Nossos resultados demonstram a importância da análise de MEC de GBM secretada, e como ela consegue modular o comportamento de HBMECs e influenciar na sobrevida de pacientes GBM.

**Palavras-chave:** Glioblastoma, Matriz extracelular, Angiogênese, Células Endoteliais, Metaloprotease 9, Sobrevida Global.



## Abstract

Glioblastomas (GBM) are the most common and lethal tumors that develop in the central nervous system (SNC). The average survival of patients undergoing treatment for GBM is 12 to 15 months. GBM are considered the most aggressive diffuse glioma and are highly resistant to radiotherapy and chemotherapy treatments, in addition to being one of the most vascularized tumors. The angiogenic process is defined as the formation of new blood vessels from pre-existing vessels, acting in the distribution and supply of nutrients, oxygen and factors that favor tumor development. GBM is considered the solid tumor with the greatest angiogenic capacity and which presents a high degree of vascular and endothelial cell (ECs) proliferation, which contributes to the main aggressive characteristics of this tumor. Furthermore, an in-depth molecular understanding of how factors secreted by GBM, whether soluble or in the extracellular matrix (ECM), influence cells in the tumor microenvironment (TME), such as ECs, is still needed. Our objective was to analyze the influence of ECM secreted by human GBM cells on angiogenic processes, such as proliferation and branching, and on the overall survival of GBM patients *in silico*. To this end, we analyzed the proliferative behavior of human cerebral microvasculature endothelial cells (HBMECs) when cultured on preformed ECM from HBMECs and GBM cells (GBM02 cell line). Preformed cell-free ECM was prepared based on collagen coating and cell lysis with TRITON X-100 buffer. This method better maintained the amount of ECM and biological activity when compared to plastic. We checked which ECM molecules could be affecting patients overall survival. Using Kaplan-Meier graphs, we found that several ECM molecules negatively influenced the survival of GBM patients, including MMP-9. The behavior of HBMECs was then verified when treated and not treated with conditioned medium (MC) from GBM cells, in the absence and presence of MMP9 inhibitor (anti-MMP9 Monoclonal Antibody). Preliminarily, we can observe that the conditioned medium increases the size of HBMEC cellular aggregates and that the inhibitor was able to reduce the size of the aggregates. Our results suggest the importance of analyzing GBM ECM secretions, and how it can modulate the behavior of HBMECs and influence the survival of GBM patients.

**Keywords:** Glioblastoma, Extracellular matrix, Angiogenesis, Endothelial Cells, Metalloprotease 9, Overall Survival.

## Lista de ilustrações

Figura 1 - Nova classificação de gliomas difusos pela Organização Mundial de Saúde (OMS)	3
Figura 2 - Influência da MMP-9 na progressão tumoral	7
Figura 3 - Angiogênese intussusceptiva	13
Figura 4 - Microambiente tumoral e seus componentes	16
Figura 5 - Participação da MMP-9 na angiogênese	19
Figura 6.1 - Cultivo celular de GBM sobre gelatina garantiu maior aderência da MEC	27
Figura 6.2 - Cultivo celular de HBMEC sobre gelatina garantiu maior aderência da MEC	28
Figura 7.1 – MEC de GBM diminui a quantidade de células HBMECs	30
Figura 7.2 - Representação gráfica demonstrando que MEC de GBM inibe a quantidade de HBMECs	31
Figura 8 – Aumento no número de células HBMEC e no tamanho dos agregados celulares em contato com o MC de GBM	32
Figura 9 - O aumento de aglomerados celulares de HBMEC quando em contato com o MC de GBM foi revertido pelo inibidor de MMP9	33
Figura 10 - O inibidor de MMP9 diminui os aglomerados induzidos pelo MC de GBM	34
Figura 11 - Curva de sobrevida de pacientes com GBM de acordo com maior ou menor expressão de componentes de MEC	36

**Lista de tabelas**

Tabela 1 - Estimativa de novos casos de câncer de SNC para o ano de 2023	8
--	---

## Lista de abreviaturas e siglas

ATCC: *American Type Cell Collection*

BHE: Barreira hematoencefálica

BSA: Soro Albumina bovina

BVZ: Bevacizumabe

CTT: Célula tronco tumoral

CE: Célula endotelial

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF: Fator de crescimento epidérmico

FGF: Fator de crescimento derivado de fibroblasto

FDA: *Food and Drug Administration*

GBM: Glioblastoma

GBM02: Linhagem celular de glioblastoma

GBM11: Linhagem celular de glioblastoma

HBMEC: Células endoteliais da microvasculatura cerebral humana

HIF1 $\alpha$ : Fator induzido por hipóxia 1 $\alpha$

IDH: Isocitrato desidrogenase

IP: Inibidor de protéase

INCA: Instituto Nacional do Câncer

MC: Meio condicionado

MEC: Matriz extracelular

MGMT: Metilguanina-DNA-Metil-transferase

MMP: metaloprotease de matriz

MMP9: Metaloprotease de matriz tipo membrana 9

MMRN2: Multimerina 2

MRI: *Magnetic resonance imaging*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: Tampão fosfato-salino

PDGF-B: Fator de crescimento derivado de plaquetas B

PFA: Paraformolaldeído

SFB: Soro fetal bovino

SNC: Sistema nervoso central

TMZ: Temozolomida

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1. Gliomas	1
1.1.1. Glioblastomas	1
1.1.2. Características histológicas, moleculares e incidência	1
1.1.3. Heterogeneidade tumoral e resistência às terapias	4
1.1.4. Tratamentos	7
1.2. Angiogênese	9
1.2.1. Angiogênese por brotamento	10
1.2.2. Angiogênese Intussusceptiva	11
1.2.3. Cooptação e mimetismo vascular	13
1.3. O Microambiente Tumoral	15
1.4. A MEC e a angiogênese	17
1.4.1 Fatores Angiogênicos e MMP-9	17
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	20
<b>3. OBJETIVOS</b>	21
3.1. Objetivo Geral	21
3.2. Objetivos Específicos	21
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	22
4.1. Cultivo Celular	22
4.2. MEC imobilizada livre de células	22
4.3. Cobertura de gelatina	23
4.4. Confecção do meio condicionado (MC)	23
4.5. Ensaio de Fluorescência	23
4.6. Ensaio de quantificação de HBMEC	24
4.7. Curva de sobrevida global	24
4.8. Tratamento de HBMEC com meio condicionado e inibidor de MMP-9	25
4.9. Análise Estatística	25

<b>5. RESULTADOS</b>	26
5.1. A cobertura de gelatina permitiu uma maior aderência da MEC de GBM02 e HBMECs	26
5.2. A MEC de GBM inibe a quantidade de HBMECs	29
5.3. Aumento no número de células HBMEC e no tamanho dos agregados celulares quando em contato com o MC de GBMs	32
5.4. O aumento dos aglomerados celulares de HBMEC induzidos pelo MC de GBM foi revertido com o inibidor de MMP9	33
5.5. Os níveis de expressão de componentes da MEC influenciaram na sobrevida de pacientes com GBM	35
<b>5. DISCUSSÃO</b>	37
<b>6. CONCLUSÃO</b>	43
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	44
<b>8. ANEXOS</b>	60

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Gliomas

Os gliomas difusos são considerados tumores intracranianos primários que derivam das células da glia (NICHOLSON *et al.*, 2021; AHIR *et al.*, 2020). Eles são os mais prevalentes no cérebro (CHEN *et al.*, 2017), caracterizando 81% das malignidades que ocorrem no sistema nervoso central (SNC) (XU *et al.*, 2020) e representam cerca de 70-80% de todos os tumores cerebrais, levando à morte (OSTROM *et al.*, 2015; AHIR *et al.*, 2020). As células tumorais dos gliomas podem migrar através da substância branca e vasos sanguíneos, levando a infiltração e invasão de outras áreas do parênquima cerebral (HATTERMANN e MENTLEIN, 2014; FERRER *et al.*, 2018; LU *et al.*, 2019).

#### 1.1.1 Glioblastomas

O GBM é considerado um dos tipos mais malignos de tumores que afetam o cérebro (ROCK *et al.*, 2012; HANIF *et al.*, 2017). Apesar do progresso nas terapias para o tratamento de tumores sólidos, ele permanece sendo incurável e garantindo um mal prognóstico. (OSTROM *et al.*, 2014). Os processos de tratamento do GBM ainda são considerados complexos e altamente custosos. Já foi visto que o custo médio da terapia de GBM seja equivalente a US\$95.000 por paciente (JANJUA *et al.*, 2021).

#### 1.1.2 Características histológicas, moleculares e incidência

Historicamente, a classificação desse grupo de tumores era baseada na histologia, já que os gliomas compartilham características de células gliais normais, fazendo com que eles sejam nomeados de acordo com essas semelhanças (CHEN *et al.*, 2017). No ano de 2007 a Organização Mundial da Saúde (OMS) passou a classificar os gliomas de acordo com a sua histopatologia, onde os principais grupos de tumores gliais incluíam tumores astrocíticos, tumores oligodendrogliais, tumores oligoastrocíticos, tumores ependimários e tumores neuronais (LOUIS *et al.*, 2007). Esses tumores eram, então, classificados em diferentes graus de malignidade (I-IV), de acordo com as suas características histológicas. Os tumores eram classificados de acordo com suas características de malignidade (grau de atipia e atividade mitótica) e características específicas como proliferação microvascular com alças



capilares do tipo glomerular (FERRER *et al.*, 2018) e/ou necrose (CAHILL *et al.*, 2015). Dentre eles, o glioblastoma (GBM) é classificado como um tumor altamente agressivo e heterogêneo que afeta o SNC (WANG *et al.*, 2021) e também é considerado um glioma difuso do tipo adulto, de grau 4, necessariamente IDH-selvagem e que apresenta, ao menos, um dos parâmetros genéticos citados na **Fig. 1** – (LOUIS *et al.*, 2021). Sendo assim, o GBM vai sempre apresentar IDH-selvagem e será classificado como um tumor de alto grau (4) (BRAT *et al.*, 2018; LOUIS *et al.*, 2021).

Além disso, existia a carência na precisão do prognóstico para os pacientes, mesmo os com o mesmo diagnóstico, onde a sobrevida poderia variar entre semanas, meses e vários anos. Isso indicou que diferenças significativas na biologia tumoral não foram validadas para o desenvolvimento dessas classificações (CHEN *et al.*, 2017).

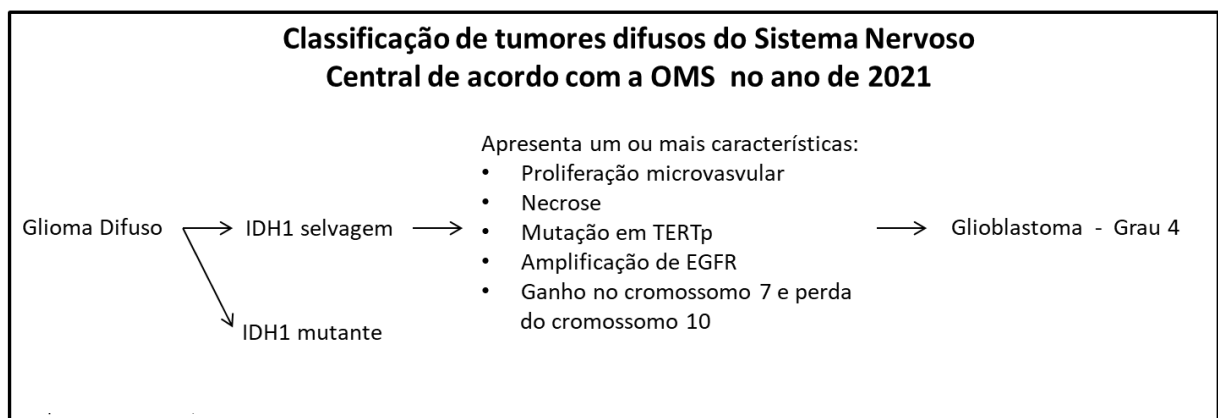
Com o passar do tempo, com base em diversas pesquisas aplicadas à biologia dos gliomas, foi possível entender ainda mais como funcionavam os processos genéticos e moleculares desse grupo de tumores. Tais observações levaram a um melhor entendimento acerca da biologia dos gliomas, o que levou a alterações na classificação desses tumores e garantiu um entendimento amplo das possíveis alterações moleculares, assegurando o aperfeiçoamento dos critérios diagnósticos. Além disso, foi possível entender melhor acerca do desenvolvimento e ontogenia tumoral, auxiliando assim nos processos diagnósticos e auxiliando na investigação de novos alvos terapêuticos para os diferentes tipos de gliomas.

Atualmente, com base em dados moleculares, genéticos e epigenéticos, os critérios diagnósticos foram redefinidos, auxiliando assim o diagnóstico e tratamento. Algumas informações acerca da reclassificação dos gliomas de baixo grau se baseiam na perda do cromossomo 1p/19q (CAIRNCROSS *et al.*, 1998). Foi visto que a co-deleção desses dois braços cromossômicos ocorre a partir de uma translocação entre os cromossomos 1 e 19, havendo perda de outros braços cromossômicos (JENKINS *et al.*, 2006). Por conta disso os gliomas com deleção 1p ou 19q (isoladamente) não possuem alta taxa de sobrevivência (VOGAZIANOU *et al.*, 2010). De acordo com dados observados a partir da co-deleção do cromossomo 1p/19q foi possível validar essa deleção como um marcador prognóstico em gliomas de baixo grau (II e III) (CHEN *et al.*, 2017). Foi visto também que a utilização de quimioterapia com PVC (procarbazona, lomustina, vincristina) levou a duplicação da

sobrevida para tumores 1p/19q intactos (CAIRNCROSS *et al.*, 2013).

De acordo com alguns estudos moleculares, foi visto que o tumor vai alcançar um grau mais elevado com base na mutação enzima isocitrato desidrogenase (IDH) (CAIRNCROSS *et al.*, 1998; YAN *et al.*, 2009; The Cancer Genome Atlas Research Network., 2015), que também possui um subtipo selvagem. Tal enzima vai atuar na proteção contra o estresse oxidativo (LOUIS *et al.*, 2016; ICHIMURA *et al.*, 2009; BALSS *et al.*, 2008).

Com o grande progresso dos estudos genéticos, acerca do desenvolvimento de gliomas e tumores neuronais, a classificação de tumores do SNC (OMS, 2021) foi modificada e uma nova classificação tumoral foi estabelecida (TORP *et al.*, 2022). De acordo com as classificações anteriores a 2021, as características histológicas eram utilizadas unicamente como determinantes para a classificação tumoral (Louis *et al.*, 2021). Com o avanço nos estudos genéticos foi possível selecionar e analisar alguns biomarcadores moleculares para promover mais informações acerca do grau de evolução tumoral (LOUIS *et al.*, 2014).



**FIGURA 1 : Classificação de tumores difusos do sistema nervoso central.** Glioblastoma é considerado um tumor IDH selvagem de grau 4, segundo a OMS no ano de 2021. Adaptado de Louis *et al.*, 2021.

Outro exemplo de biomarcador molecular com aplicação prognóstica e clínica é a metilação do promotor 06-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT). A metilação desse promotor foi identificada como um forte marcador prognóstico no diagnóstico de GBM em pacientes tratados com temozolomida (TMZ), que é um fármaco alquilante de DNA que possui atividade no SNC, sendo capaz de transpor a BHE (HEGI *et al.*, 2005; THOMAS *et al.*, 2017 e AGARWALA e KIRKWOOD, 2000).

O reparo do DNA e a metilação do promotor MGMT leva a diminuição da expressão da proteína MGMT (reposta pelas células). Com isso foi visto que níveis mais altos de MGMT levam à resistência à TMZ. Sendo assim, altos níveis de metilação levam a uma sobrevida mais longa de GBM (CHEN *et al.*, 2017). Apesar de ser usado como biomarcador, a metilação de MGMT não é capaz de definir subtipos distintos de gliomas, ocorrendo em todos os subtipos genéticos em taxas variadas (CHEN *et al.*, 2017).

### 1.1.3 Heterogeneidade tumoral e resistência às terapias

Uma característica importante vista nesse tumor é a sua alta heterogeneidade celular, a nível intertumoral e intratumoral. A heterogeneidade é considerada uma das grandes barreiras para o tratamento do GB. Isso se dá por conta das diferentes características tumorais encontradas a níveis celulares e moleculares, enquanto o modelo de tratamento permanece o mesmo para os diferentes casos. Isso indica que essas diferentes características moleculares não são levadas em consideração (HONORATO *et al.*, 2019; SKAGA *et al.*, 2019).

Já a heterogeneidade intratumoral se dá com base em teorias como a das (CTTs) e plasticidade celular, que descrevem a presença de uma subpopulação celular na massa tumoral (HONORATO *et al.*, 2019; VAN NEERVEN *et al.*, 2016) com alta capacidade migratória, quando comparadas com outras subpopulações da massa tumoral (HONORATO *et al.*, 2019; PARKER *et al.*, 2018). Além disso, a natureza heterogênea e proliferativa de GBM induz o desenvolvimento de resistência, infiltração em tecidos saudáveis e eventual recidiva (KARIM *et al.*, 2016; SOEDA *et al.*, 2015). Outras características são a alta taxa de proliferação, angiogênese, resistência aos tratamentos, ativação de múltiplas vias de transdução de sinal e mutações genéticas específicas dentro do tumor (ROSARIO *et al.*, 2020; LOUIS *et al.*, 2016; DELGADO- LÓPEZ e CORRALES-GARCÍA, 2016, HASKELL *et al.*, 2003; HARMELIK, 2014; LU *et al.*, 2019).

Os gliomas são considerados os tumores mais difíceis de tratar, com a utilização de terapias limitadas (oferecendo apenas um tratamento paliativo para os GBs) a combinação de ressecção cirúrgica, radioterapia ou quimioterapia tradicional e com baixa eficácia nas raras terapias direcionadas (WELLER *et al.*, 2015). Outro

motivo para tal dificuldade no tratamento é a pouca quantidade de medicamentos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) no tratamento do glioma. Isso se dá por conta da barreira hematoencefálica (BHE), que é composta por células endoteliais (CEs), capilares e membranas basais e a barreira tumoral cerebral (BTC). Isso impede que a maioria dos agentes antitumorais acessem o cérebro, se tornando um grande desafio na produção de drogas anti glioma (BALLABH et al., 2004, OBEROI et al., 2016).

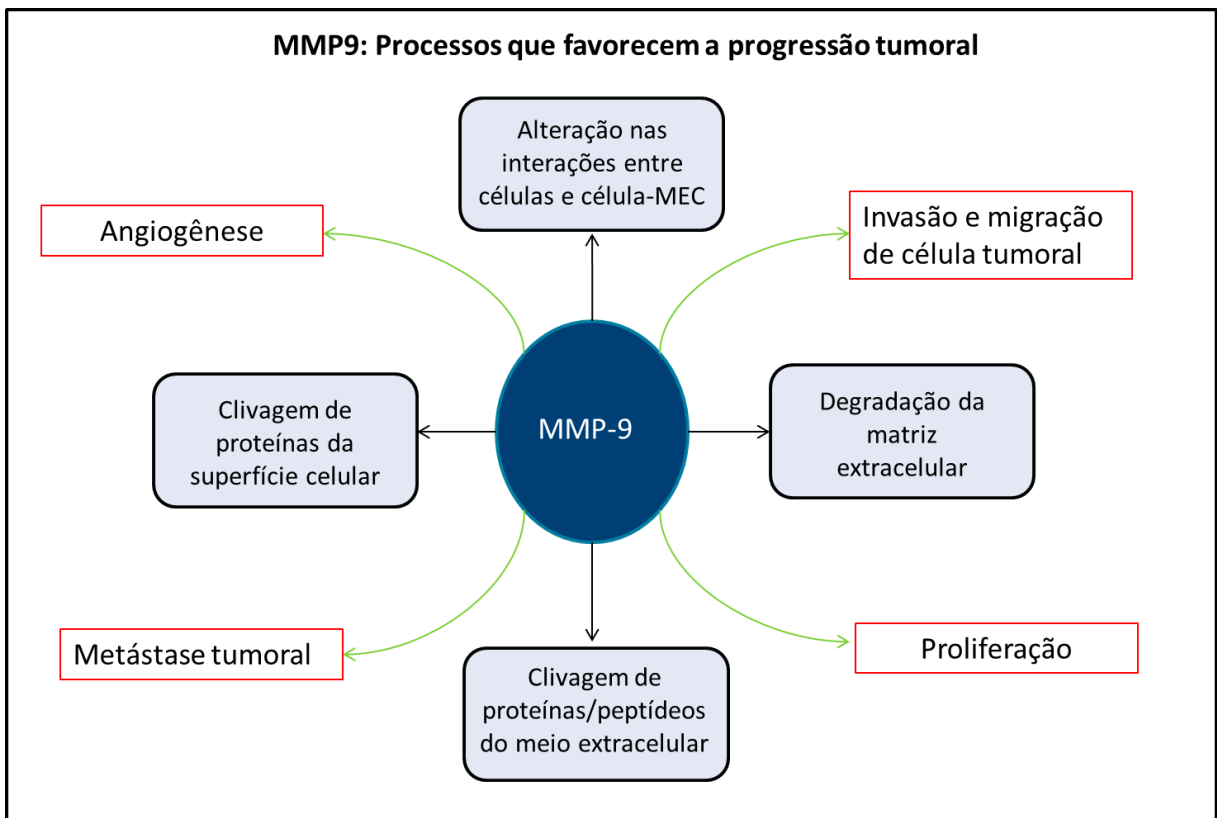
A BHE é uma estrutura única que possui junções fundamentais que levam a impermeabilidade (SARAIVA et al., 2016; LIU et al., 2012), sendo seletiva apenas com moléculas pequenas (menos de 500 Da) e lipofílicas. A BHE se mantém intacta em regiões substanciais do cérebro, em pacientes com GBM. Entretanto, essa barreira muitas vezes se quebra e a BTC resultante possui uma estrutura diferente da BHE. Foi visto que o GBM induz a quebra da BHE, resultando na formação da BTC, que é tipicamente caracterizada por estrutura irregular e permeabilidade heterogênea (ARYANITIS et al., 2020).

A heterogeneidade do GBM leva a uma seleção de subpopulações celulares resistentes (JANJUA et al., 2021). Com isso, a média de tempo de sobrevivência de 14-15 meses para pacientes recém diagnosticados e 6-9 meses para pacientes com recidiva (CHENG et al., 2017). Ele também é caracterizado por sua resistência a tratamentos de radioterapia e quimioterapia, além de possuir grande produção de vasculatura aberrante (LOUIS et al., 2016; HARDEE e ZAGZAG, 2012). Para auxiliar na compreensão acerca do desenvolvimento do GBM, os avanços das técnicas de diagnóstico por imagem (ressonância magnética e tomografia computadorizada) são combinados às características fenotípicas e genotípicas, obtendo assim uma melhor observação do aumento na ocorrência desse tipo de tumor (INCA, 2018). A localização e o tamanho do GBM no cérebro são determinados por essas técnicas de imagem (KESARI et al., 2011). Os aspectos clínicos observados se dão pela presença de massa tumoral com capacidade de desviar a linha média do cérebro. Além disso, ele possui uma grande capacidade infiltrativa, causando edemas e hemorragias (HONORATO et al., 2019), e alta taxa de heterogeneidade causada por subpopulações de células-tronco tumorais que dão início a progressão tumoral e resistência a múltiplos tratamentos (CRUZ et al., 2022). Essas características vão afetar diretamente os tipos de tratamentos paliativos para o GBM (HARMELIS, et al., 2014; COHEN et al., 2005), limitando a completa remoção cirúrgica.

Além disso, a ressonância magnética é importante para identificar achados associados ao tumor, principalmente por conta da sua capacidade infiltrativa, sendo utilizada em casos de pacientes com suspeita ou confirmação de GBM (LEE *et al.*, 2013; YAO *et al.*, 2015; YAMASHITA *et al.*, 2015; JAMJOOM *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2015). A tomografia computadorizada auxilia na identificação de dados sobre calcificação ou hemorragia, sendo útil, principalmente, para pacientes que não conseguem realizar ressonância magnética (LUNDY *et al.*, 2020).

O GBM pode ser categorizado em subtipos, de acordo com suas características moleculares. Esses subtipos são: pró-neurais, neurais, mesenquimais e clássicos (VERHAAK *et al.*, 2010; PATEL *et al.*, 2014). O subtipo mesenquimal é considerado o mais agressivo, enquanto o pró-neural está relacionado a uma melhor sobrevida, quando comparado com os outros subtipos (WANG *et al.*, 2021)). O GBM vai sofrer mudanças de subtipo no decorrer do desenvolvimento tumoral, e isso ocorre devido a uma transição adaptativa que é associada a mecanismos de resistência tumoral a tratamentos, como radioterapia e quimioterapia (PHILLIPS *et al.*, 2006; HALLIDAY *et al.*, 2014; FEDELE *et al.*, 2019). A expressão genética alterada nesses tipos de célula vai contribuir também para o desenvolvimento de microambientes tumorais específicos, que vão determinar a capacidade de uma região tumoral específica de invadir tecidos circundantes e/ou resistir a rádios e quimioterapias convencionais (LIMA *et al.*, 2012).

Outra característica molecular encontrada no GBM é a modulação de fatores de crescimento, como o aumento nos níveis de metaloprotease-9 (MMP9) (ROSARIO *et al.*, 2020). As MMPs são endopeptidases que estão ligadas diretamente a processos de degradação e dissociação da matriz extracelular, levando a processos angiogênicos (**Fig.2** - HUANG *et al.*, 2018). Isso ocorre pela regulação ativa de outros fatores de crescimento, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2), VEGF e algumas quimiocinas. Essa regulação leva a processos relacionados à invasão e infiltração (KAMINO *et al.*, 2011; NAG, 2011;). A MMP9 é uma metaloprotease dependente de zinco que está envolvida em muitos processos que favorecem o tumor, como alterações nas interações entre células e células-MEC, degradação de MEC, proteínas e peptídeos da superfície celular, levando à metastase tumoral (HUANG *et al.*, 2018).



**FIGURA 2: Influência da MMP-9 na progressão tumoral.** A MMP-9 é envolvida em muitos processos que favorecem o tumor, devido à suas funções biológicas. Dentre os processos que estão relacionados ao câncer estão a Angiogênese, metástase tumoral, invasão e migração da célula tumoral e proliferação. Adaptado de Huang *et al.*, 2018.

#### 1.1.4 Tratamentos

No Brasil, em estudo desenvolvido pelo Instituto Nacional do Cancer (INCA, 2023), foi estimado que cerca de 11.490 novos casos de câncer de SNC foram descobertos no ano de 2023, sendo 6.110 casos em homens e 5.380 casos em mulheres. Esses novos casos correspondem a um risco de 5,80 casos a cada 100 mil homens e 4,85 a cada 100 mil mulheres, de acordo com a análise feita pelo INCA em 2023 (Tabela abaixo).

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos								
	Homens			Mulheres			Total		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Sistema Nervoso Central	6.110	5,80	4,56	5.380	4,85	3,80	11.490	5,31	4,33

**TABELA 1: Estimativa de novos casos de câncer de SNC para o ano de 2023.**

Taxas brutas e ajustadas de novas incidências de câncer de SNC, entre homens e mulheres, de acordo com o INCA em 2023.

Justamente por conta da alta taxa de mortalidade (onde a maioria dos pacientes morre dentro de 2 anos e menos de 5% sobrevive 5 anos – CORREIA; ALEXANDRE; DIAS *et al.*,2009), estudos precisam ser feitos visando novas abordagens terapêuticas no tratamento de GBM, como a utilização de TMZ no tratamento de GBM (HONORATO *et al.*, 2019, LI *et al.*, 2016; METHA *et al.*, 2011), ou o uso de terapias já aplicadas, como a terapia anti angiogênica. No entanto, o uso de fármacos como o bevacizumabe (BVZ), anticorpo monoclonal que neutraliza o VEGF, reduz o crescimento tumoral e edema cerebral, e promove a regressão do GB, não demonstrou eficácia. Foi visto que a combinação de BVZ com TMZ e radioterapia não conseguiu levar ao aumento da sobrevida (NARITA, 2015; CHINOT *et al.*, 2014; GILBERT *et al.*,2014). Possivelmente, isso se dá por conta dos diferentes mecanismos angiogênicos desenvolvidos pelo tumor. Além disso, é visto um aumento na pressão do líquido intersticial, resultado da impermeabilidade do tumor, fazendo com que o uso de fármacos anti-tumorais não consiga acessar o microambiente tumoral. Essa característica faz com que ocorra o acúmulo de drogas na área do tumor, levando à resistência terapêutica (MAJIDPOOR e MORTEZAEI, 2021).

Apesar de ser bem tolerado, o BVZ é conhecido por causar hipertensão, trombose venosa, retardo na cicatrização e infecções (NARITA, 2015). Além disso, o padrão de recidiva de GBM tratado com BVZ é caracterizado por infiltração local e distante do cérebro, o que indica uma maior capacidade invasiva desses tumores (HARDEE e ZAGZAG, 2012; XU *et al.*, 2018; THOMPSON, FRENKEL e NEUWELT, 2010; WONG *et al.*, 2009; HILLEN e GRIFFIOEN, 2007).

Outras pesquisas mostraram que a maioria dos pacientes que usam BVZ e TMZ obtiveram uma redução na captação de TMZ pelas células de GB,

provavelmente reduzindo a permeabilidade vascular (GERSTNER et al., 2019). Esse fármaco é um anticorpo monoclonal que se liga a VEGF-A e inibe a angiogênese, isso faz com que as CEs e as células tumorais se sensibilizem à terapia (AHIR et al., 2020; DING et al., 2018; OKAMOTO et al., 2016; QIN et al., 2021). O uso de BVZ melhora os sintomas do GBM em um curto período, mas não induz efeito antitumoral ou prolongamento da sobrevivência. Esse fármaco não é usado rotineiramente para tratar GBM recém-diagnosticado, mas é bastante utilizado em casos de GBM recorrente, por sua capacidade de reduzir o edema cerebral e também de aliviar os sintomas associados, melhorando a qualidade de vida e reduzindo o uso de corticosteroides (REARDON et al., 2011; WINOGRAD et al., 2022; JANJUA et al., 2021 e GILBERT et al., 2014).

Esses dados demonstram que é necessário focar em novos estudos acerca das estratégias para reduzir/eliminar o desenvolvimento tumoral. Como a capacidade angiogênica do GBM é uma característica importante para processos de proliferação, sobrevivência, migração celular, invasão e metástase (LU et al., 2019; HONORATO et al., 2019; PEARSON e REGAD, 2017) é necessário manter a linha de pesquisa voltada para essa característica. Para isso, o estudo da microvasculatura tumoral e a forma como esta modifica os vasos normais são de grande importância para o desenvolvimento de novas terapias. Junto ao estudo do desenvolvimento de uma microvasculatura tumoral aberrante, é importante analisar quais fatores estão relacionados a tal comportamento vascular. Fatores esses que estão diretamente ligados aos processos angiogênicos.

## **1.2 Angiogênese**

A angiogênese é um processo em que ocorre a formação de novos vasos sanguíneos, a partir de vasos pré-existentes (ROSARIO et al., 2020), onde, no contexto tumoral, as células tumorais junto às CEs vão mobilizar e secretar fatores angiogênicos (GUPTA e QIN, 2013; KENIG et al., 2010), como o VEGF e MMP9. Esses fatores vão estar diretamente ligados com a proliferação e a migração de CEs, levando a formação de novos vasos sanguíneos (MUSTAFA et al., 2013; MUNN, 2003 e Rosário et al., 2020). Além disso, a angiogênese é considerada um passo fundamental para a tumorigênese, onde é considerada uma marca registrada



em tumores sólidos, e é vista como um promotor fundamental de recorrência tumoral (MAJIDPOOR e MORTEZAEI, 2021), onde as interações entre células tumorais e vasos sanguíneos normais parecem facilitar o crescimento do tumor (DAS *et al.*, 2017).

O processo angiogênico fisiológico é considerado altamente regulado, ativado por breves períodos e fundamental para a distribuição adequada de oxigênio e nutrientes, que são enviados para os respectivos tecidos em desenvolvimento ou cicatrização (CHUNG *et al.*, 2010; AHIR *et al.*, 2020; LU *et al.*, 2019). O lúmen do sistema circulatório, em contato com o sangue, é revestido por uma única camada de CEs (derivadas do mesoderma).

No período inicial de formação dos vasos (embriogênese) existem dois mecanismos que auxiliam nesse desenvolvimento: o mecanismo de vasculogênese, onde ocorre a formação de novos vasos sanguíneos a partir de angioblastos e a angiogênese, onde as CEs proliferam e migram para diferentes tecidos. Durante o desenvolvimento embrionário, as células tronco mesodérmicas são a fonte de células-tronco hematopoiéticas e angioblastos, que vão se diferenciar em células endoteliais. Já as células hematopoiéticas possuem a capacidade de se diferenciar em todos os tipos celulares encontrados no sangue circulante.

O processo angiogênico pode ocorrer de formas distintas, por meio de brotamento intussuscepção ou cooptação (ROSARIO *et al.*, 2020), e será explicado abaixo. De acordo com GUPTA e QIN 2003, esses processos ocorrem em praticamente todos os órgãos e tecidos, e envolvem dois principais tipos celulares, CEs e células murais (TAHERGORABI e KHAZAEI, 2012).

### 1.2.1. Angiogênese por brotamento

Caracterizada pela formação de brotos que são compostos por CEs, que migram em direção a estímulos, como a presença de fatores angiogênicos (MMP9, VEGF, FGF-2). Esse tipo de angiogênese leva a adição de vasos sanguíneos em porções de tecidos que, anteriormente, não possuíam vasos. Esse processo induz uma desestabilização vascular por conta da degradação da membrana basal e pela redução na adesão das CEs (ROSARIO *et al.*, 2020). Nesse caso as CEs possuem uma alta taxa de proliferação, migração direcionada, tubulogênese, fusão de vasos e

estabilização de pericitos. Esse processo vai ocorrer, principalmente, a partir da detecção de baixos níveis de oxigênio (hipóxia), o que demanda do organismo alguma ação que auxilie na formação de vasos sanguíneos que carregam oxigênio para suprir as necessidades metabólicas das células parenquimatosas. A partir de uma região do organismo, com baixos níveis de oxigênio, as células parenquimatosas secretam fatores angiogênicos, permitindo o início do processo angiogênico por brotamento.

As células *tip*, encontradas na extremidade endotelial, tem função de guiar o broto capilar em direção aos estímulos causados pelos fatores angiogênicos liberados (GERHARDT, 2008; RUHRBERGET *et al.*, 2002; CARMELIET *et al.*, 2009; HOROWITZ *et al.*, 2009).

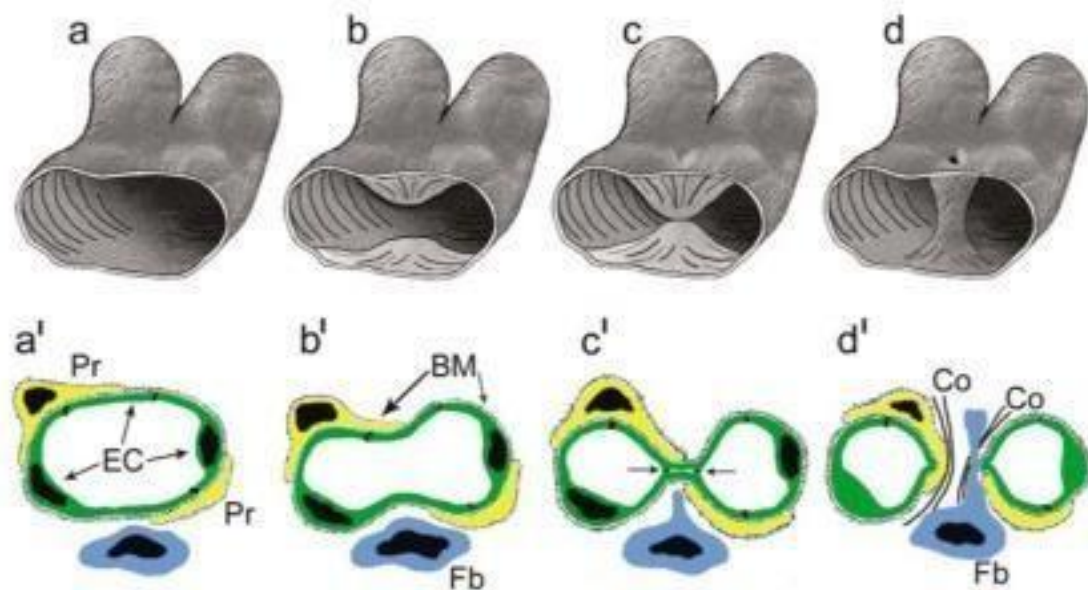
As projeções celulares (filopódios) possuem receptores de fatores angiogênicos (como o VEGF), e isso permite que as células respondam às concentrações de fatores liberados e, assim, se alinhem ao gradiente encontrado. Quando ocorre o ancoramento dos filopódios ao substrato, os filamentos de actina das CEs se contraem fazendo com que as células sejam direcionadas à região de estímulo. Durante esse processo, as CEs proliferam e seguem o mesmo caminho das células da extremidade, levando ao alongamento do broto formado. Além disso, os vacúolos se desenvolvem e formam o lúmen, que vai dar suporte ao alongamento dos brotos capilares (ROSARIO *et al.*, 2020). Seguidamente, as células das extremidades (*tip*) se encontram na fonte de secreção do fator angiogênico e isso leva a junção dessas células, formando um lúmen contínuo capaz de carrear sangue oxigenado. Ao receberem uma carga de sangue oxigenado os tecidos voltam a produzir níveis normais de fator angiogênico. A fase de maturação se dá com a estabilização do capilar a partir do recrutamento de pericitos e deposição de MEC (CHIEN *et al.*, 2007; ADAIR, 2010), além da dependência das junções ocludentes e da membrana basal (ROSARIO *et al.*, 2020; KATOH, 2013; HASKELL *et al.*, 2003; ADAIR e MONTANI, 2010; POTENTE, GERHARDT e CARMELIET, 2011; TAHERGORABI e KHAZAEI, 2011).

### 1.2.2. Angiogênese Intussusceptiva

Também chamada de angiogênese de divisão ou angiogênese por formação de septo (**Fig. 3** - ROSARIO *et al.*, 2020; burri *et al.*, 2004)). Isso ocorre pois, a

parede dos vasos adentra o lúmen, levando a divisão do vaso em duas partes. Esse processo é considerado rápido, já que requer somente a reorganização das CEs, sem depender de processos de proliferação e migração endotelial instantânea. Este tipo de angiogênese possui um papel importante no desenvolvimento vascular embrionário, com crescimento rápido em regiões com recursos limitados (GUPTA e QIN, 2013) e como uma forma de aumentar o plexo capilar sem a necessidade de altos processos metabólicos (ROSARIO *et al.*, 2020). Entretanto, a angiogênese intussusceptiva leva a formação de novos capilares em regiões que já existem capilares (ROSARIO *et al.*, 2020; GUPTA e QIN, 2013).

A partir da região de contato entre as CEs das paredes opostas, ocorre o início do crescimento microvascular, dando origem ao septo. Para isso, é formada uma bicamada endotelial a partir de junções célula-célula, formando o pilar intersticial (ROSARIO *et al.*, 2020). Os dois novos vasos vão ser formados com base na presença de pericitos e outras células murais, que tem função de cobrir a parede intersticial. Após esse processo a parede intersticial é alargada, o que permite a retração das CEs e a criação de vasos independentes (ROSARIO *et al.*, 2020; ADAIR e MONTANI, 2010; ZUAZO-GAZTELU e CASANOVAS, 2018; POTENTE, GERHARDT e CARMELIET, 2011). Além da formação de novas estruturas capilares, esse processo angiogênico é importante na formação de bifurcações de artérias e veias, assim como na poda de microvasos maiores.



**FIGURA 3: Angiogênese Intussusceptiva.** Demonstração do processo angiogênico em três dimensões. (A,B,A',B') Início do processo com a protrusão de CEs opostas ao lúmen capilar. (C,C') Contato entre as CEs e reorganização das junções endoteliais. (D,D') Formação da bicamada endotelial, onde as membranas basais são perfuradas, permitindo a entrada de fatores angiogênicos. Adaptado de Burri *et al.*, 2004.

### 1.2.3 Cooptação e mimetismo vascular

Este é um mecanismo importante para o desenvolvimento de vasculatura aberrante em gliomas (ROSARIO *et al.*, 2020). É considerado um processo que envolve a disposição de células tumorais ao redor de microvasos normais, onde as células tumorais sequestram vasos pré-existentes (VIENA, 2014). Em estudos feitos em modelo murino foi visto que, em tumores precoces, houve formação de vasculatura por cooptação dos vasos. Nas semanas seguintes foi vista uma forte resposta angiogênica na periferia do tumor. Sendo assim, a maior parte da vasculatura tumoral foi cooptada da vasculatura cerebral normal (ROSARIO *et al.*, 2020, HARDEE e ZAGZAG, 2012).

De acordo com Judah e Folkman, o crescimento tumoral é dependente da angiogênese (GOTO *et al.*, 1993), e por isso é necessário o desenvolvimento de terapias que envolvam o controle do processo angiogênico tumoral.

Alguns estudos revelam que as células-tronco tumorais podem contribuir para a formação de vasos sanguíneos em tumores. Essas células vão se diferenciar em células endoteliais ou pericitos, evento conhecido como mimetismo vascular (DAS *et*

*al.*, 2013). Os pericitos vão ter um papel fundamental na permeabilidade da BHE, além de controlar o fluxo sanguíneo local e estabelecerem uma comunicação direta com as CEs, por meio de junções comunicantes e sinais parácrinos solúveis (DAS *et al.*, 2013). Foi visto então, que a interrupção do processo de mimetismo vascular, seja por conta da ação sobre as CEs ou pericitos, retardou o crescimento tumoral (WANG *et al.*, 2010; RICCI-VITIANI *et al.*, 2010; CHENG *et al.*, 2013).

De acordo com WANG *et al.*, 2021 e RICCI-VITIANI *et al.*, 2010, existe outro subconjunto de células endoteliais que atuam no revestimento de vasos tumorais, e carregam as mesmas anormalidades genéticas. Esse mesmo grupo identificou a presença de células progenitoras endoteliais neoplásicas, e mostraram que uma subpopulação de células-tronco de glioma deu origem a células endoteliais *in vitro*.

O GBM é considerado um tumor que produz uma vasculatura aberrante, e geralmente se encontra sob condições de hipóxia ou “pseudo-hipóxia”, quando os níveis de fator induzido por hipóxia 1 alfa (HIF1) são considerados altos e equivalentes à hipóxia, mesmo com a tensão de oxigênio sendo considerada normal (HATTERMANN E MENTLEIN, 2014; COHEN e COLMAN, 2015). Os níveis aumentados de HIF1 leva, ao aumento da expressão de genes relacionados com a família de fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs). Já a limitação de oxigênio leva à migração de células tumorais para vasos normais, dependendo dos níveis de HIF1 e também do fator de transcrição EMT ZEB1 (FERRER *et al.*, 2018; ELSTNER *et al.*, 2007; JOSEPH *et al.*, 2015). Com isso, ocorre o aumento da migração de CEs, levando ao surgimento de novos capilares em direção ao tumor (LU *et al.*, 2019; KENIG *et al.*, 2010)

Devido a sua alta capacidade angiogênica, os gliomas possuem pelo menos dois fenótipos. Um deles é considerado dependente da angiogênese, com a presença de aglomerados de células tumorais ao redor dos vasos recém-desenvolvidos no parênquima normal, e no outro fenótipo a invasão celular ocorre independente do processo angiogênico. Isso ocorre por conta de células que se infiltram no parênquima cerebral normal, independente da vasculatura (FERRER *et al.*, 2018, INOUE *et al.*, 2012; SAKARIASSEN *et al.*, 2006).

A imunossupressão induzida por GBM contribui ainda mais para o desenvolvimento do tumor, como o recrutamento de macrófagos (adquirindo um perfil pró-tumoral) associadas ao tumor, promovendo a evasão imune, crescimento tumoral, invasão e angiogênese (YE *et al.*, 2012). Sendo assim, a alta imunossupressão encontrada no local promovem a evasão imune e dificulta a eficácia das imunoterapias já utilizadas (JANJUA *et al.*, 2021).

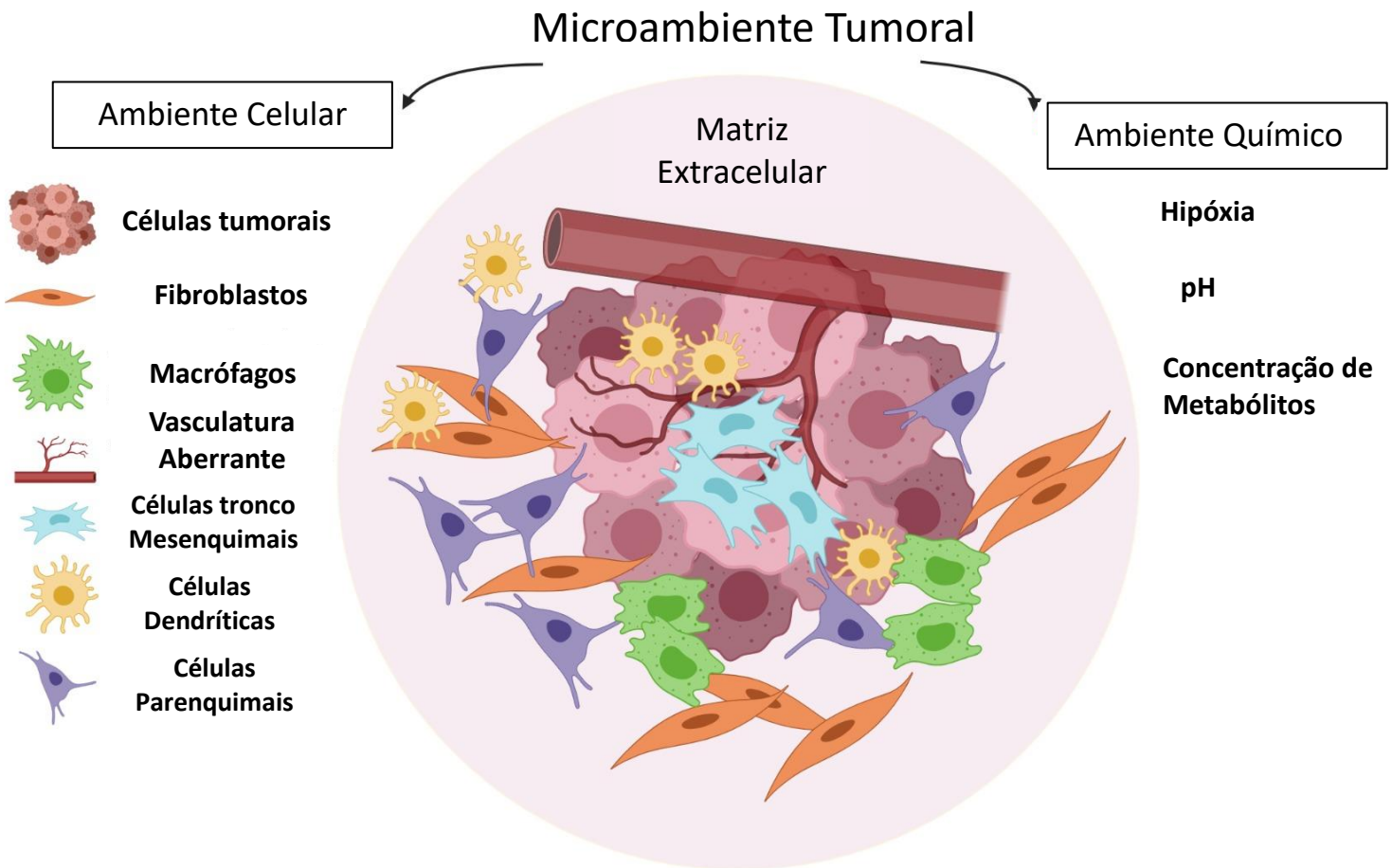
### 1.3 O Microambiente Tumoral

A arquitetura vascular tumoral, num geral, é considerada anormal e permeável, onde as células perivasculares são destacadas ou ausentes, o que leva a redução na integridade vascular, acentuada imaturidade dos vasos, perfusão incoerente, funcionalidade defeituosa, levando ao aumento na taxa de metástase tumoral (MAJIDPOOR e MORTEZAEE, 2021). Todas essas características vão levar a uma alta taxa de hipóxia e acidez no microambiente tumoral, aumentando ainda mais a capacidade agressiva do tumor. A partir do processo de hipóxia ocorre a estimulação das células tumorais, que vai levar a produção de plasmina. Essa plasmina degrada grande parte das proteínas da MEC e ativa diversas MMPs, auxiliando assim na invasão dos tecidos circundantes pelas células do GBM (FERRER *et al.*, 2018; AWAD *et al.*, 2014; ECKERICH *et al.*, 2007; MARTENS *et al.*, 2006).

Além disso, as enzimas degradantes de MEC vindas das CEs, no contexto de GBM, são responsáveis por grande parte da atividade proteolítica de degradação da MEC no microambiente tumoral (FERRER *et al.*, 2018; PEROUTKA e BUZZA, 2016; LAKKA, GONDI e RAO, 2005).

Resumidamente, o enfraquecimento da MEC, junto aos processos angiogênicos encontrados na progressão tumoral, auxiliam na invasão celular (FERRER *et al.*, 2018).

O processo angiogênico é considerado complexo, onde é composto por diversas etapas (ROSARIO *et al.*, 2020). Essas etapas vão constituir numa interação ampla entre células, fatores solúveis e componentes da matriz extracelular (MEC), que compõem o microambiente tumoral (CHARALAMBOUS *et al.*, 2006; MATHIVET *et al.*, 2017; HASKELL *et al.*, 2003; GUPTA e QIN, 2013). Nesse microambiente (**FIGURA 4**) é possível encontrar a presença de células tumorais, fibroblastos, macrófagos, vasculatura aberrante, células tronco mesenquimais, células dendríticas e células parenquimais. Essa desregulação no microambiente tumoral leva a hipóxia, alteração no pH e diferentes concentrações de metabólitos (ZUAZO-GAZTELU e CASANOVAS, 2018).



**FIGURA 4: Microambiente tumoral e seus componentes.** A nível celular encontramos a presença de fibroblastos, células tumorais, macrófagos com perfil tumoral, vasculatura aberrante, células tronco mesenquimais, células dendríticas e células parenquimais. A nível químico encontramos a presença de hipóxia, alteração no pH, diferentes concentrações de metabólitos. Adaptado de Zuazg-Gaztelu e Casanova, 2018.

Todos esses achados acarretam na desregulação dos componentes celulares e moleculares, levando a formação de um microambiente imunossuprimido (ROSARIO *et al.*, 2020). Uma característica importante do GBM, que o difere dos tumores gliais de baixo grau, é a alta capacidade de proliferação microvascular, por meio da proliferação endotelial (DAS *et al.*, 2013). Isso ocorre devido ao aumento de HIF1, fazendo com que ocorra o aumento na transcrição de fatores angiogênicos (como o VEGF). Por conta da desregulação desses fatores, a partir de níveis altos de hipóxia, outros fatores angiogênicos são liberados a partir das células tumorais e

normais. O papel desses fatores é atuar no recrutamento de células (e outros fatores angiogênicos) que vão participar ativamente do processo angiogênico.

#### **1.4 A MEC e a angiogênese**

As moléculas de MEC têm um papel fundamental no suporte estrutural, e atuam como uma barreira de orientação no processo migratório das células de GBM (VOLLMANN- ZWERENZ *et al.*, 2020). No parênquima cerebral a MEC consiste principalmente em proteoglicanos, ácido hialurônico e glicoproteínas (tenascina-C) (ZIMMERMANN *et al.*, 2008). A MEC também vai sofrer alterações, devido aos fatores proteolíticos derivados de células de GBM, como as MMPs (por exemplo, MMP-9). Além disso, os fatores de crescimento estocados na MEC vão desempenhar um papel importante nesse contexto, modulando também a atividade das células de GBM e do microambiente tumoral (PING *et al.*, 2011).

As células tumorais, assim como as CEs, são responsáveis pela expressão de altos níveis de reguladores positivos da angiogênese, que podem agir de forma autócrina e/ou parácrina (GUPTA e QIN, 2013; KENIG *et al.*, 2010; TAHERGORABI e KHAZAEI, 2012 e ADAIR e MONTANI, 2010), ocorre então a mobilização de proteínas angiogênicas da MEC, recrutamento de células hospedeiras (como CEs e macrófagos) ou a junção desses processos (ROSARIO *et al.*, 2020).

##### **1.4.1 Fatores Angiogênicos e MMP-9**

Os fatores angiogênicos são considerados moléculas secretadas e mobilizadas pelas células normais e células tumorais, auxiliando no processo angiogênico. No processo de progressão tumoral as CEs e as células tumorais vão fazer a mobilização e a secreção desses fatores (VEGF, PDGF, MMP9, etc). (GUPTA e QIN, 2013; KENIG *et al.*, 2010). Isso leva a proliferação e migração das CEs, levando a formação de novos vasos (ROSARIO *et al.*, 2020).

A angiogênese é uma das principais características que se encontram no desenvolvimento do GBM (BALANDEH *et al.*, 2021), e na sua capacidade de desenvolver uma vasculatura aberrante. Por isso a importância de estudos relacionados ao tratamento de GBM a partir de drogas anti-angiogênicas. O



desenvolvimento de fármacos que atuem na regulação de fatores angiogênicos é um importante alvo terapêutico, no contexto do GBM, já que a progressão tumoral vai depender do desenvolvimento de novas redes capilares. Essas redes auxiliam o tumor no fornecimento de nutrientes e oxigênio, bem como na remoção de resíduos metabólicos (BALANDEH *et al.*, 2021; HERNÁNDEZ- ROMERO *et al.*, 2019; CARMELIET e JAIN, 2011; SONG *et al.*, 2014).

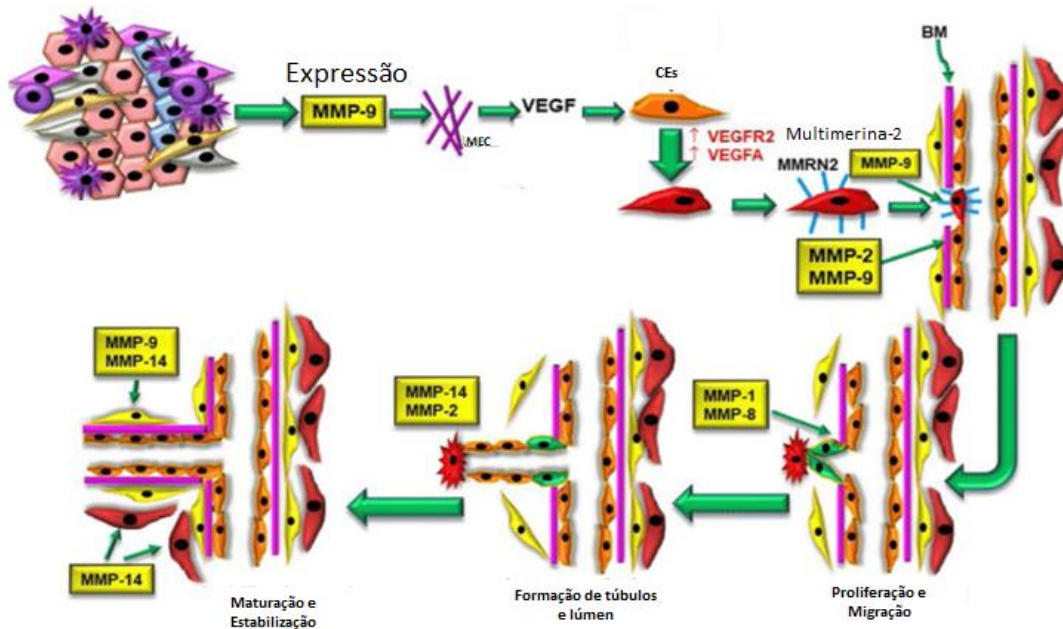
Estudos já indicam que RNAs não codificantes (ncRNAs) servem como reguladores importantes de moléculas que induzem a angiogênese, como moléculas como as MMPs, citocinas e diversos fatores de crescimento (como o VEGF). Além disso, sob estado de hipóxia, ocorre um desequilíbrio nos níveis de fatores pró-angiogênicos. Com isso, ocorre a ativação de CEs nos vasos adjacentes e a MEC é degradada por diversas enzimas proteolíticas (como as MMPs), permitindo que as CEs ativadas migrem ao longo do gradiente quimiotático que leva ao tumor, iniciando a formação de novos vasos (BALANDEH *et al.*, 2021; CARMELIET e JAIN, 2011).

As MMPs são consideradas endopeptidases que estão relacionadas diretamente com a degradação e dissociação da MEC, auxiliando nos processos de infiltração no parênquima e angiogênicos. Isso ocorre por conta da regulação ativa de fatores angiogênicos, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2), VEGF e as próprias MMPs (KAMINO *et al.*, 2011; NAG, 2011; ROSARIO *et al.*, 2020; QU *et al.*, 2014). As MMPs vão remodelar os componentes da MEC, gerando uma nova matriz com função de suporte de células estromais, auxiliando no aumento dos processos migratórios e aumentando a proliferação das CEs, levando a formação de uma nova rede de capilares (LAKKA e RAO, 2008; BALANDEH *et al.*, 2021).

A MMP-9 é uma metaloprotease dependente de zinco que está envolvida em muitos processos que favorecem a progressão tumoral (ROSARIO *et al.*, 2020). Esses processos envolvem a alteração nas interações entre células e célula-MEC, degradação da MEC, clivagem de proteínas e peptídeos do meio extracelular e clivagem de proteínas da superfície celular. Isso leva a processos que favorecem a progressão tumoral, como a invasão e migração de células tumorais, proliferação celular, metástase tumoral e processos angiogênicos (HUANG *et al.*, 2018).

O aumento na atividade de MMP-9 leva a danos na barreira endotelial, por conta da degradação de proteínas de oclusão celular. Esse processo leva ao aumento da permeabilidade microvascular (SPAMPINATO *et al.*, 2017; CAUWE *et*

*al.*, 2020). Além disso, a alta expressão de MMP-9 leva a alterações na MEC, promovendo o aumento nos níveis de VEGF. Esse fator ativa as CEs, garantindo que essas células adquiram um perfil pró-tumoral (aumentando ainda mais a liberação de fatores angiogênicos) **Fig. 5**.



**FIGURA 5: Participação da MMP-9 na angiogênese.** Alterações no microambiente tumoral induzem a expressão de MMPs que, por si, leva a liberação de VEGF. Esse fator ativa CEs, deixando-as com um perfil tumoral. Isso leva ao aumento nos níveis de fatores angiogênicos, como VEGFRs e EGFRs. A MMP-9 libera VEGF da MEC e cliva Multimerina-2 (MMRN2) presente nos pontos principais da neoangiogênese. Outras MMPs, como a MMP-1 e 8 participam na proliferação das CEs alteradas e na aquisição de sua capacidade de migração permitindo a formação de brotos. A MMP-14 e a MMP-2 participam da formação do tubo e do lúmen. MMP-14 e MMP-9 favorecem o recrutamento de pericitos para estabilizar os novos vasos. Além disso, ela vai estar envolvida com a desdiferenciação de Células musculares lisas vasculares para maturação dos vasos. Adaptado de Gonzalez-Avila *et al.*, 2019.

A MMP-9 libera VEGF da MEC e cliva Multimerina-2 (MMRN2) presente nos pontos principais da neoangiogênese. MMP-9 favorece também o recrutamento de pericitos para estabilizar os novos vasos. Além disso, ela vai estar envolvida com a desdiferenciação de células musculares lisas vasculares para maturação dos vasos sanguíneos (Adaptado de Gonzalez-Avila *et al.*, 2019). Somado a uma maior taxa de angiogênese e infiltração e migração das células de GBM, o aumento da atividade de MMP-9 leva a um pior prognóstico desses pacientes (DOBRA *et al.*, 2023).

## 2. JUSTIFICATIVA

Os gliomas difusos têm como característica abundante e aberrante vasculatura (HARDEE e ZAGZAG, 2012), formando uma massa tumoral altamente heterogênea, composta por vários tipos celulares. Além das células tumorais, encontra-se no microambiente tumoral células não tumorais como astrócitos, microglia e CE (GARCIA *et al*, 2014), as quais estabelecem uma conexão metabólica com as células tumorais (HATTERMANN e MENTLEIN, 2014). A angiogênese tumoral está associada ao crescimento e ao metabolismo das células cancerosas, fornecendo oxigênio, nutrientes e fatores necessários para alta taxa de proliferação e invasão da mesma. Por possuírem uma acentuada taxa de angiogênese, apesar da arquitetura aberrante e sub-funcional desses vasos, o estudo da microvasculatura que compõe o tumor e a maneira pela qual esse tumor modifica os vasos já existentes é de grande interesse, inclusive para novos focos terapêuticos (HATTERMANN e MENTLEIN, 2014). Dentre diversos fatores secretados pelas CEs de vasos sanguíneos relacionados à angiogênese, destacam-se fatores de crescimento como VEGF e FGF-2 e metaloproteases de matriz (MMP-9) (KENIG *et al*, 2010; XU *et al*, 2018; KORN *et al*, 2014; RAO *et al*, 2012; HATTERMANN *et al*, 2010; KARGIOTIS *et al*, 2006). Além disso, as células tumorais também vão secretar fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, como Fator de Crescimento Transformador 2 (TGF-2) e Prostaglandina E2 (PGE2), o que garante a composição bioquímica e imunossuprimida do microambiente tumoral (ANJUM *et al.*, 2017; AGARWALA & KIRKWOOD, 200; YANG *et al.*, 2010; GUSTAFSON *et al.*, 20010). Poucos trabalhos têm estudado a comunicação entre as células de GBM e do endotélio vascular cerebral tendo como foco as CEs em si.

Portanto, este trabalho se propôs a estudar a influência da MEC secretada por GBM em linhagem de células da microvasculatura do cérebro em processos essenciais na angiogênese como proliferação e ramificação. Além disso, nos propusemos a estudar *in silico* o efeito de moléculas de MEC (em geral) na sobrevida global de pacientes de GBM, verificando a influência da MEC na agressividade deste tumor.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Analisar a influência da MEC e fatores solúveis secretados por células de GBM humano em processos angiogênicos como proliferação e ramificação.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Verificar o comportamento de células HBMEC (proliferação e ramificação) quando cultivadas sobre MEC pré-formada de HBMECs e GBMs;
- Verificar *in silico* a influência de moléculas de MEC na sobrevida global de pacientes GBM.
- Verificar o comportamento de HBMECs tratadas e não tratadas (controles) com MC de GBMs na presença e na ausência de inibidor de MMP-9 (anticorpo monoclonal anti-MMP-9).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Cultivo Celular**

As linhagens de GBM (GBM02 e GBM11) foram estabelecidas pelo grupo do Prof. Vivaldo Moura-Neto a partir de ressecções cirúrgicas de tumores humanos, nos respectivos anos, 2002 e 2011 e gentilmente cedidas para o trabalho. A linhagem de célula endotelial da microvasculatura cerebral humana (HBMEC) foi adquirida da American Type Culture Collection (ATCC) pelo grupo da Profa. Catarina Freitas, e previamente descrita por (PIASECZNY *et al.*, 2016).

As células foram descongeladas do N2 líquido e plaqueadas em garrafas de cultivo celular 75/ 25 cm<sup>2</sup> contendo o meio de cultura DMEM/F-12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em estufa úmida com 5% CO<sub>2</sub>, 37°C.

### **4.2 MEC immobilizada livre de células**

Células de HBMECs (controles), ou GBM02 foram cultivadas em confluência por 72 h, em condições normais de cultura e lavadas em DMEM-F12 e lisadas com tampão Triton X-100 0,1%, em PBS1x-livre de Ca<sup>2+</sup> a 4 °C. Os restos celulares foram eliminados por lavagens delicadas com PBS1x. A rede proteica restante, invisível ao microscópio óptico, foi chamada de MEC pré-formada (FARIA *et al.*, 2006). As células das quais isolou-se MEC immobilizada foram cultivadas em placas de 6 poços ou de 24 poços e, em ensaios nos quais foram necessários efetuar marcações com imunofluorescência, a MEC foi feita sobre lamínulas de vidro estéreis.

### **4.3 Cobertura de Gelatina**

Alternativamente ao plástico, para tentar aderir melhor as diferentes MEC, as células foram plaqueadas sobre poços com uma camada de gelatina 0,1%. Foi utilizado gelatina de pele bovina (Sigma-Aldrich) filtrada em filtro 0.22um e mantida

em temperatura entre 60°C e 70°C até o momento de posicionar sobre a lamínula de vidro. A gelatina foi diluída em água MilliQ, mantida em temperatura ideal e preservada até a sua utilização. A solução foi adicionada em placas de 6 ou 24 poços e mantida na estufa a 37 °C por 2 horas. Após esse período a placa foi retirada da estufa e mantida por 15 minutos (dentro do fluxo laminar) com a tampa semiaberta para secagem. As placas foram fechadas, com parafilme, e mantidas na geladeira até o momento do plaqueamento. A placa foi retirada da geladeira momentos antes do plaqueamento celular e deixadas em temperatura ambiente.

#### **4.4 Confeção do meio condicionado (MC)**

Quando as células GBM02 e GBM11 atingiram confluência de 80%, foi retirado o meio de cultura e as células foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato-salino (PBS 1x) e foi adicionado DMEM/F12 sem SFB. As células foram incubadas em estufa úmida por 72 h (tempo necessário para a confecção do MC). Após esse período, os MCs foram coletados e centrifugados a 650 xg durante 3 min e filtrados em filtro 0,22 µm. Os MCs foram aliquotados e armazenados à temperatura de -80 °C até o uso (NIGRIS *et al.*, 2010).

#### **4.5. Ensaio de Fluorescência**

Para o ensaio de fluorescência, as células HBMEC foram plaqueadas sobre a MEC nas quantidades de  $5 \times 10^4$  céls/mm<sup>3</sup> (para os tempos de 24 h, 48 e 72h) as quais foram mantidas em cultura com DMEM/F12 (ou MC de GBM) pelos respectivos tempos. As células foram contadas em contador automático (BIO-RAD TC 10). Após os tempos de tratamento, foi adicionado PFA 4% durante 20 minutos. Em seguida foi retirado o PFA e os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1x.

Para a marcação de fibronectina foi utilizado o anticorpo FN SIGMA – F3648, logo após a retirada do BSA. Foi mantido over night, 4°C e após esse tempo os poços foram lavados com PBS 1x. Logo após as lavagens foi adicionado o anticorpo secundário, durante 1 hora e 30 minutos.

Para a marcação de actina foi utilizada a faloidina (Alexa Fluor 568 Phalloidin - A12380), onde a marcação foi feita logo após a retirada do BSA 5%. As lamínulas foram incubadas por 30 minutos, RT, em câmara escura e lavadas com PBS 1x. As lamínulas foram montadas em lâminas utilizando gel de montagem Fluormount™

(Sigma-aldrich®). As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência DMi8 (Leica®).

#### **4.6 Quantificação de HBMECs**

Primeiramente os poços da placa de 24 poços foram preparados (com ou sem gelatina). Em seguida as células (GBM02 e HBMECs) foram contadas em contador automático (BIO-RAD TC 10), plaqueadas numa quantidade de  $5 \times 10^4$  por poço e deixadas em cultivo por 24h, 48h e 72h. Posteriormente foi separado as substâncias para a confecção do tampão de lise e as HBMECs foram cultivadas sobre as respectivas MECs (de GBM02 ou HBMECs). Após a marcação com faloidina, e observação em microscópio de fluorescência, as imagens obtidas foram visualizadas no software IMAGE J, onde foi possível contabilizar os núcleos celulares que ainda estavam presentes (com base na marcação com DAPI).

#### **4.7 Curva de sobrevida global**

Os pacientes utilizados no estudo foram selecionados através do Atlas Humano Proteico (<https://www.proteinatlas.org/>) e cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>), onde os dados foram retirados e organizados a partir da plataforma The Cancer Genoma Atlas (TCGA). Os dados de sobrevivência revelaram o último dia conhecido até o qual o paciente sobreviveu. As comparações de sobrevivência entre os genes selecionados foram realizadas usando o método de Kaplan-Meier e o teste estatístico de log-rank (Mantel-Cox) utilizando o GraphPad Prism (versão 9). Os grupos de pacientes GBM foram divididos entre alta e baixa expressão de determinada molécula de MEC. O tempo médio de sobrevivência foi calculado como o menor tempo de sobrevivência para o qual a função de sobrevivência foi igual ou menor que 50% (Machado and Ferrer, 2023).

#### **4.8 Tratamento de HBMEC com meio condicionado e inibidor de MMP9**

HBMECs foram cultivadas em MEC pré-formada (de GBM e HBMECs) em placas de 24 poços, nas quantidades de  $5 \times 10^4$  céls/mm<sup>3</sup> (para os tempos de 24 h,

48 h e 72 h), em DMEM/F12 com adição de SFB 10%. Após esse período, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1x. Em seguida, as HBMECs foram expostas aos MC de GBMs (GBMs MC) em uma proporção 1:1 de MC e meio DMEM-F12 sem SFB, sendo que o MC consiste de uma mistura de MC de GBM11 e GBM02 (50% de cada) (ALVES *et al.*) As HBMECs foram plaqueadas em poços com e sem gelatina 0,1%, na presença ou ausência do MC de GBM e na presença ou ausência do inibidor de MMP9 (ab142180 1  $\mu$ M) (GOODWIN *et al.*, 2007). Para o controle sem inibidor nós utilizamos o meio DEMEM/F12 + DMSO (que foi utilizado para diluir o inibidor de MMP-9, como indicado pelo fabricante). O cultivo celular foi mantido pelos tempos de 24 h, 48 h e 72 h.

#### **4.9 Análise Estatística**

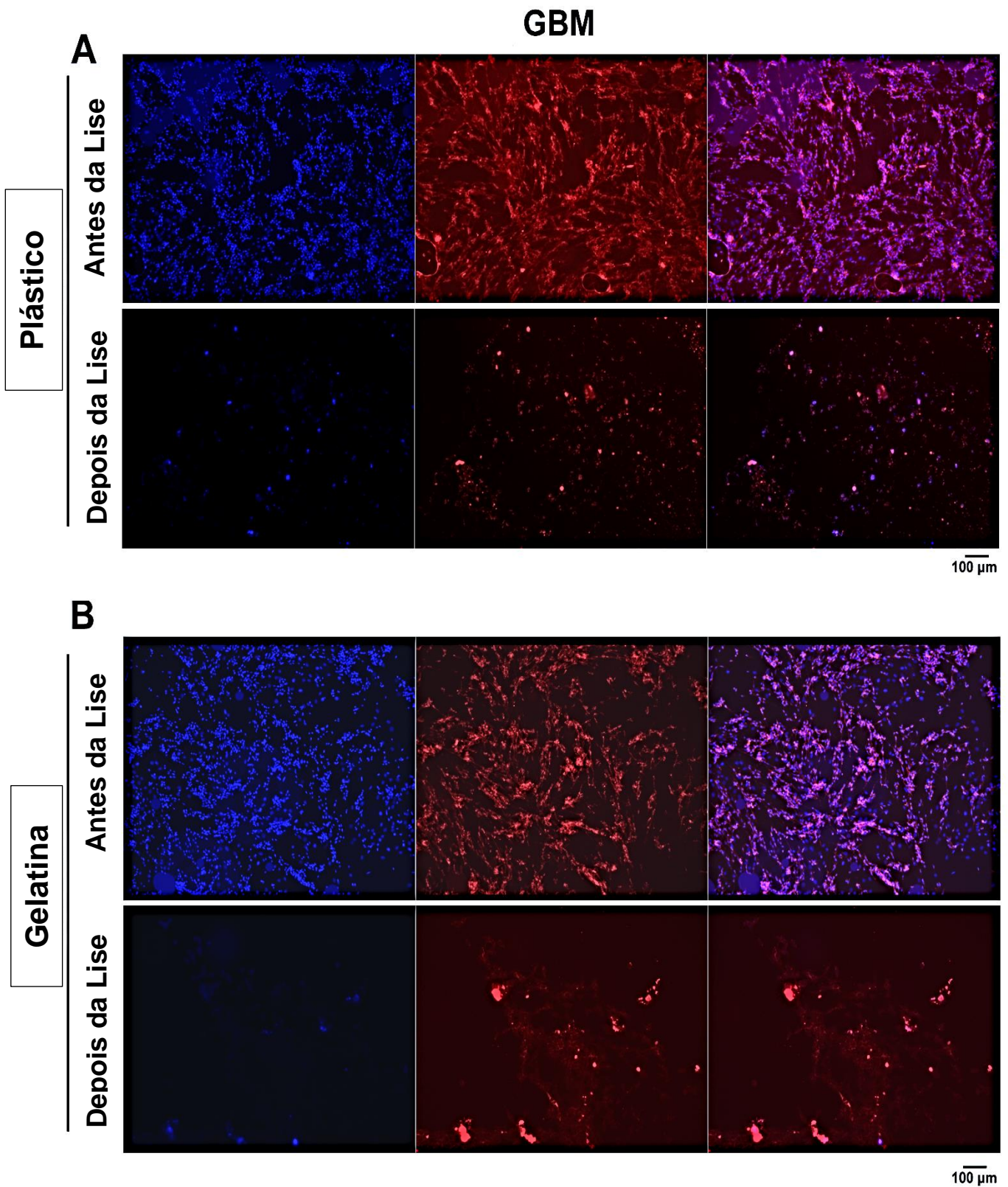
Os gráficos foram obtidos no programa Graphpad Prism®. Para análise estatística, foi aplicado o teste t de amostras pareadas, comparando os pares tratados e não tratados dos mesmos tempos.



## 5. RESULTADOS

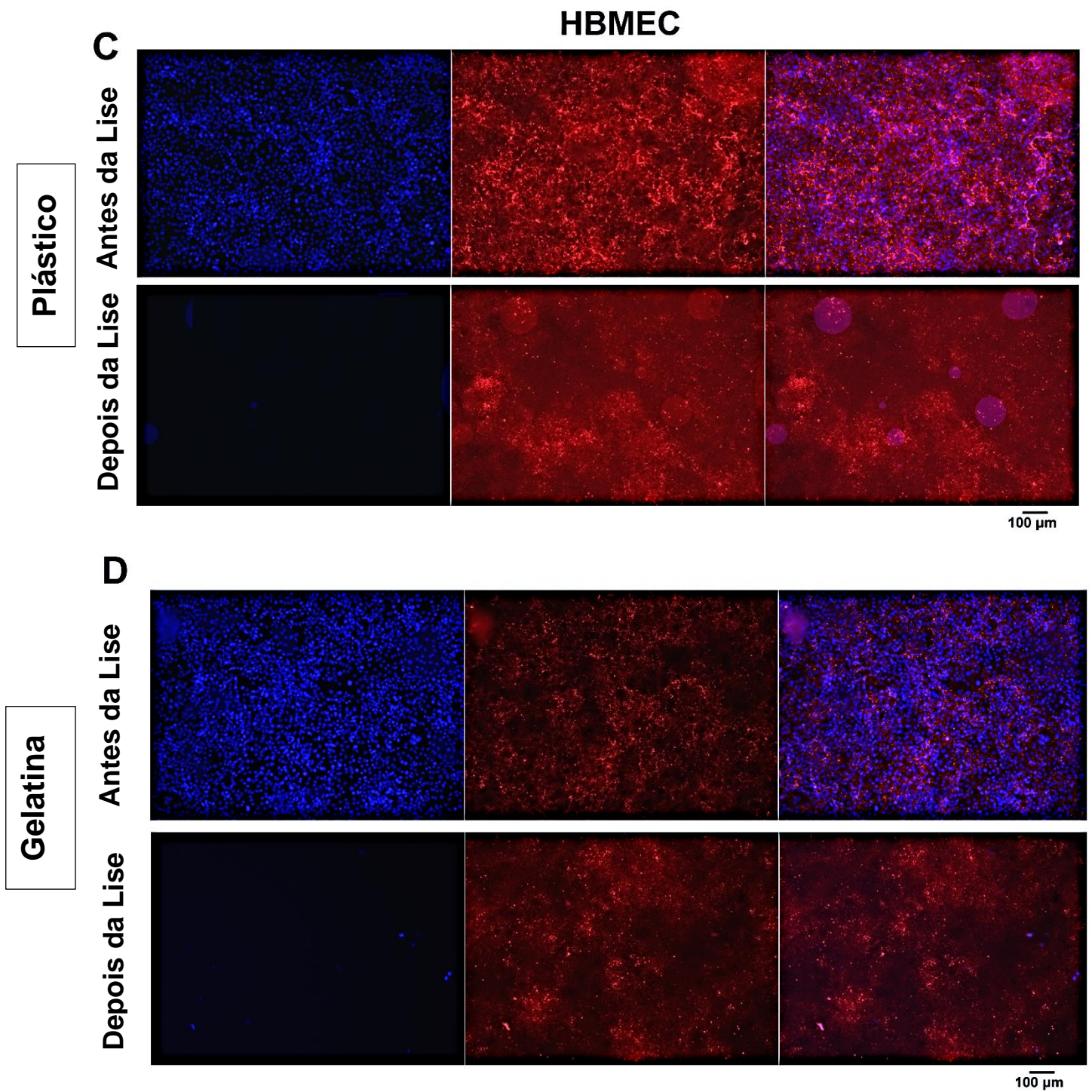
### 5.1. A cobertura de gelatina permitiu uma maior aderência da MEC de GBM02 e HBMECs.

Com base na constatação da eficiência do tampão de lise, houve uma menor marcação de fibronectina na linhagem de GBM02, quando comparada com HBMECs (**FIGURA 6.1 e FIGURA 6.2**). A partir desse resultado foi feito um teste com a confecção de uma cobertura de gelatina antes do plaqueamento das células, a fim de testar uma maior aderência da MEC secretada pelas células. A marcação nuclear é praticamente ausente quando as células foram lisadas com tampão - tanto na presença e ausência de gelatina. A marcação de fibronectina foi observada em grande quantidade no controle sem lise. Na condição de lise com cobertura de gelatina há maior marcação de MEC quando comparado com o modelo de lise sem gelatina. Em ambas condições de lise houve uma menor marcação quando comparado ao controle sem lise.



**FIGURA 6.1: Cultivo celular de GBM sobre gelatina garantiu maior aderência da MEC.** Imunofluorescência do cultivo de GBM02, antes e depois da lise celular, sobre plástico ou gelatina. Marcação nuclear com DAPI (azul) e marcação de fibronectina (vermelho). (A) Cultivo de GBM sobre plástico, antes e depois da lise celular. (B) Cultivo de GBM sobre gelatina, antes e depois da lise celular.





**FIGURA 6.2: Cultivo celular de HBMEC sobre gelatina garantiu maior aderência da MEC.** Imunofluorescência do cultivo HBMEC, antes e depois da lise celular, sobre plástico ou gelatina. Marcação nuclear com DAPI (azul) e marcação de fibronectina (vermelho). (C) Cultivo de HBMEC sobre plástico, antes e depois da lise celular. (D) Cultivo de HBMEC sobre gelatina, antes e depois da lise celular.

Apesar da cobertura de gelatina ter garantido uma maior aderência e preservação da morfologia da MEC de GBM02 quando comparado à condição sem gelatina, pode-se observar uma perda na quantidade de MEC de GBM02 (**FIGURA 6.1**). Apesar de ocorrer a perda de fibronectina após a lise, é possível sugerir que outros componentes relacionados à matriz não foram perdidos.

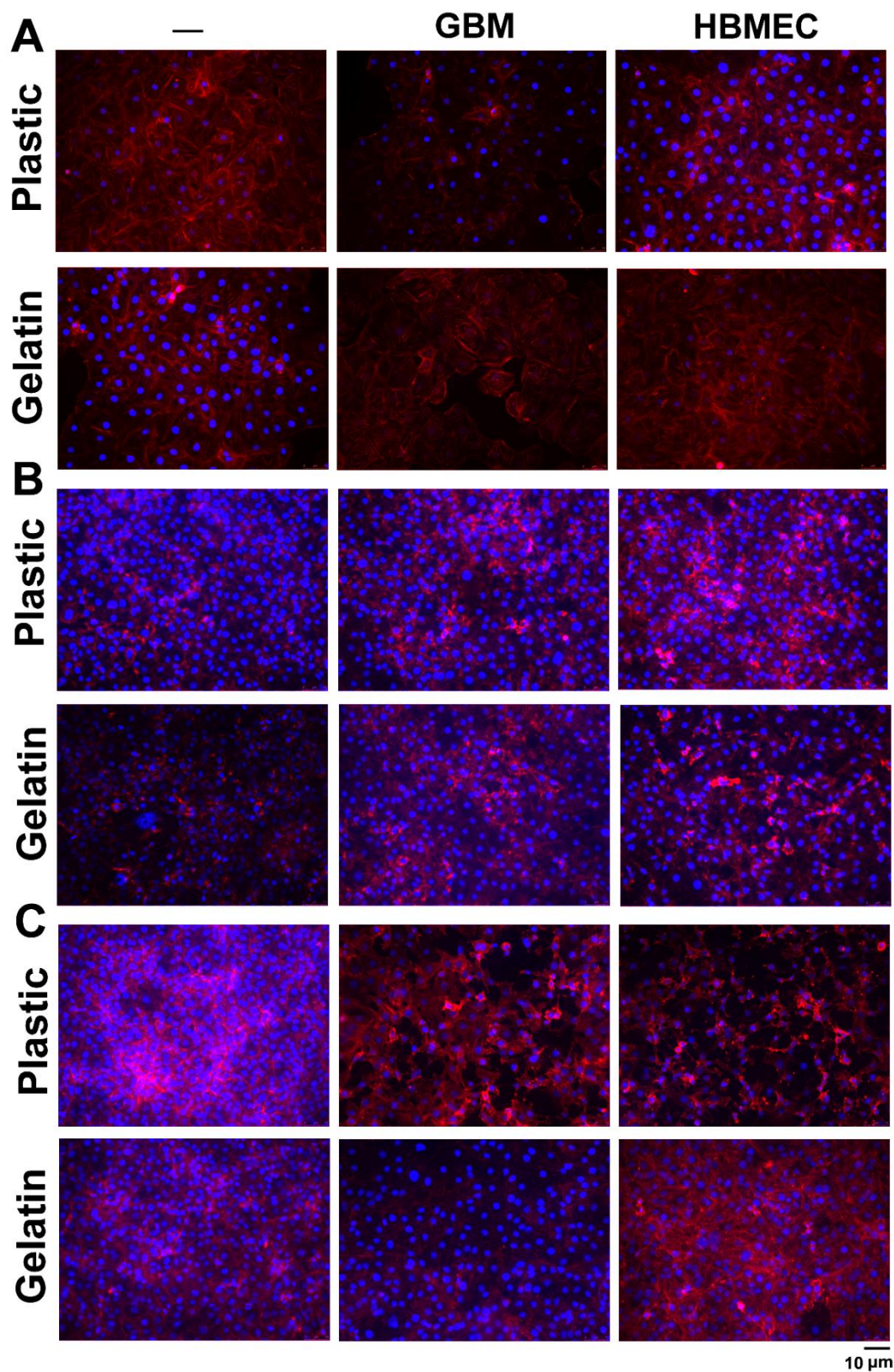
A diferença na quantidade de MEC entre o controle e lise foi mais sutil na MEC de HBMEC (**FIGURA 6.2**). Apesar do receio de que essa diferença de quantidade de MEC pudesse camuflar os resultados da MEC de GBM, quisemos testar se essa MEC livre de células mantinha a atividade biológica das MEC. Fizemos um ensaio de quantificação das HBMECs sobre as MECs.

## **5.2. A MEC de GBM diminui o número de HBMEC**

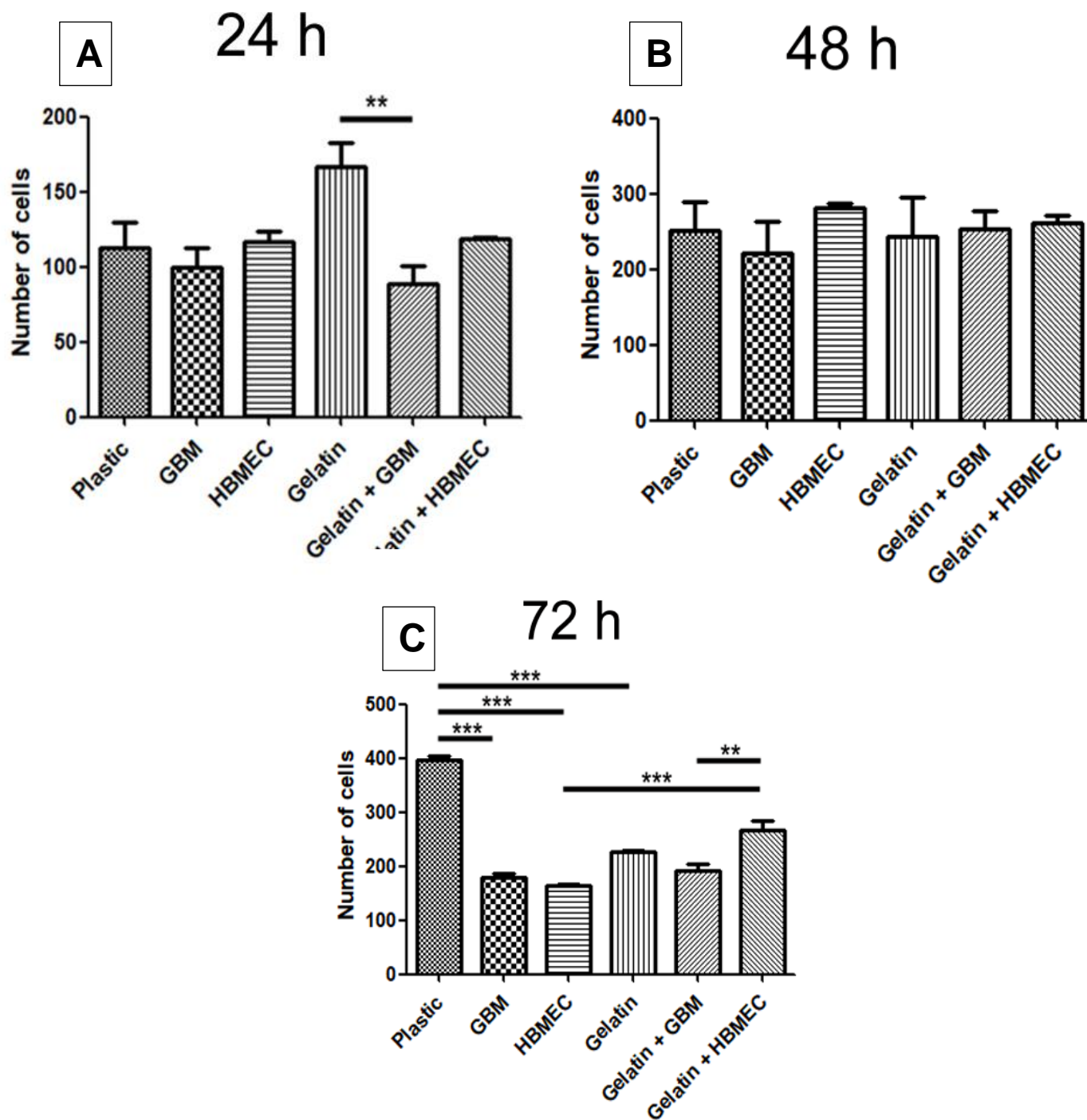
Foi possível investigar se existe diferença entre o número de células HBMECs cultivadas sobre MEC pré-formada de HBMEC (controle) e GBM02. Com a avaliação da quantidade de HBMECs e análise estatística observamos que a MEC de GBM diminuiu a quantidade ( $*p < 0,05$ ) de HBMECs em 24h quando as MECs foram aderidas sobre gelatina.

Observamos que em 72 h tanto a MEC de GBM quanto HBMEC inibiram a quantidade de HBMEC ( $***p < 0,001$ ) quando as MEC foram cultivadas no plástico. Ao passo que nas MECs aderidas sobre gelatina observamos diferença na quantidade de HBMECs cultivadas sobre MEC de GBM versus MEC de HBMEC ( $**p < 0,01$ ), onde a quantidade de células é novamente inibida na MEC tumoral (**FIGURA 7.1 e 7.2**). Com isso é possível sugerir que a MEC de GBM realmente induz uma redução da quantidade de HBMECs cultivadas, tanto sobre plástico como sobre gelatina, e a preservação dessa MEC secretada foi importante para esse resultado.





**FIGURA 7.1: MEC de GBM inibe quantidade de HBMECs.** Linhagem de HBMEC cultivada sobre diferentes condições e observada nos tempos de 24h (A), 48h (B) e 72h (C), indicando que o cultivo sobre MEC de GBM reduz a quantidade de HBMECs. Imunofluorescência com marcação para actina (vermelho) e núcleo celular, com DAPI (azul).

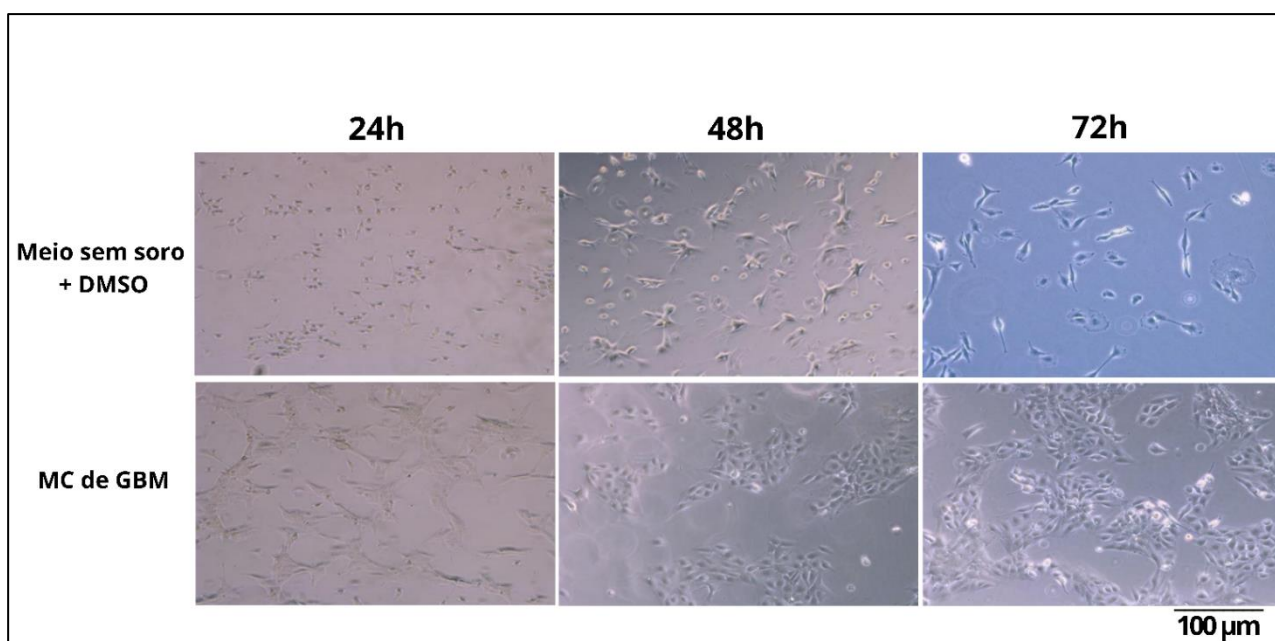


**FIGURA 7.2:** Representação gráfica demonstrando que MEC de GBM inibe a quantidade de HBMECs. Linhagem de HBMEC cultivada sobre diferentes condições e observada nos tempos de 24h (A), 48h (B) e 72h (C), indicando que o cultivo sobre MEC de GBM reduz a quantidade de HBMECs. Imunofluorescência com marcação para actina (vermelho) e DAPI (azul).

### 5.3. Aumento no número de células HBMEC e no tamanho dos agregados celulares quando em contato com o MC de GBM

Tendo estudado a influência da MEC tumoral sobre as células endoteliais, fomos investigar o efeito de fatores secretados. Observamos o comportamento das HBMECs sobre a influência de MC de GBM comparado ao controle meio de cultivo+DMSO (DMSO foi usado pois o inibidor de MMP9 foi diluído em DMSO, como indica o fabricante). As observações foram feitas nos tempos de 24h, 48h e 72h.

Inicialmente foi possível observar que as HBMECs se comportaram de formas diferentes sob as diferentes condições de tratamento. A exceção foram as células cultivadas somente com meio sem soro e meio sem soro + DMSO que tiveram quantidade e morfologia equivalentes e, portanto, as células da condição controle (meio sem soro) foram omitidas das imagens. Foi possível visualizar que as HBMECs em contato com MC de GBM apresentaram um possível aumento no número de células e no tamanho dos agregados celulares induzidos pelo MC de GBM (**FIGURA 8**).



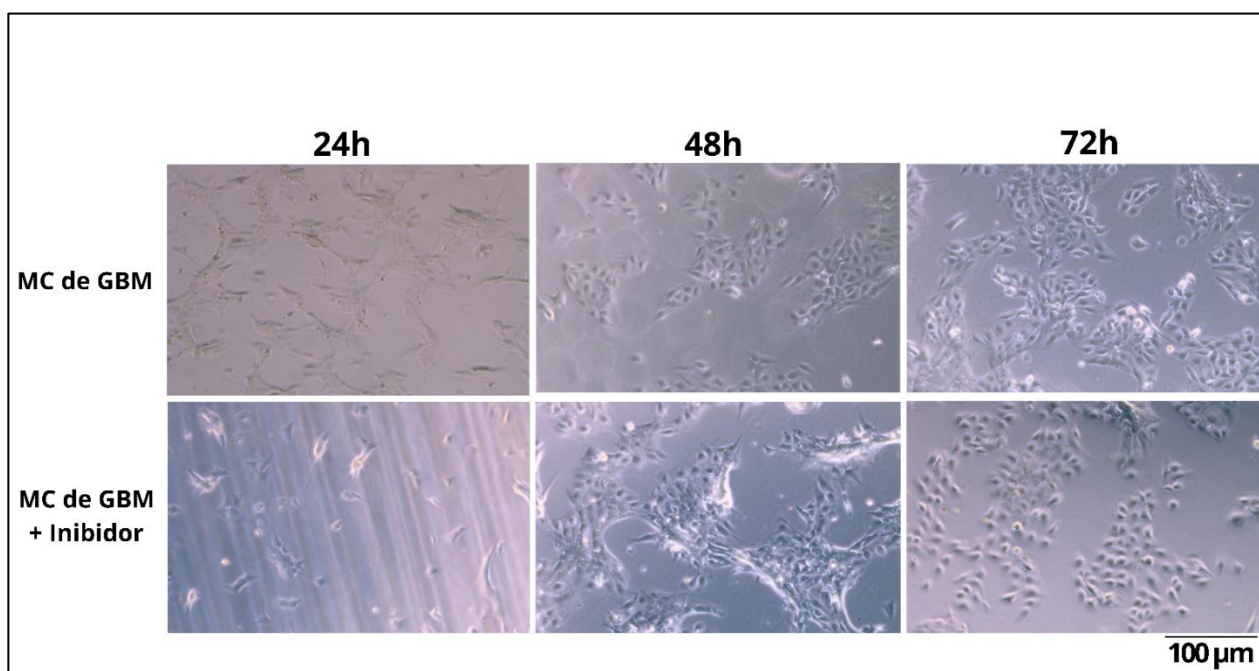
**FIGURA 8:** Aumento no número de células HBMEC e no tamanho dos agregados celulares em contato com o MC de GBM. HBMECs cultivadas com o tratamento MC



de GBM demonstraram um aumento no número celular e no tamanho dos agregados celulares comparado ao controle. Imagem obtida por microscopia invertida de campo claro (N=1).

#### 5.4. O aumento dos aglomerados celulares de HBMEC induzidos pelo MC de GBM foi revertido com o inibidor de MMP9

As HBMECs cultivadas sobre plástico, quando tratadas com MC de GBM + inibidor, tiveram o tamanho dos aglomerados diminuído quando comparado ao tratamento de MC de GBM, em especial no tempo de 72 h (FIGURA 8, FIGURA 9).

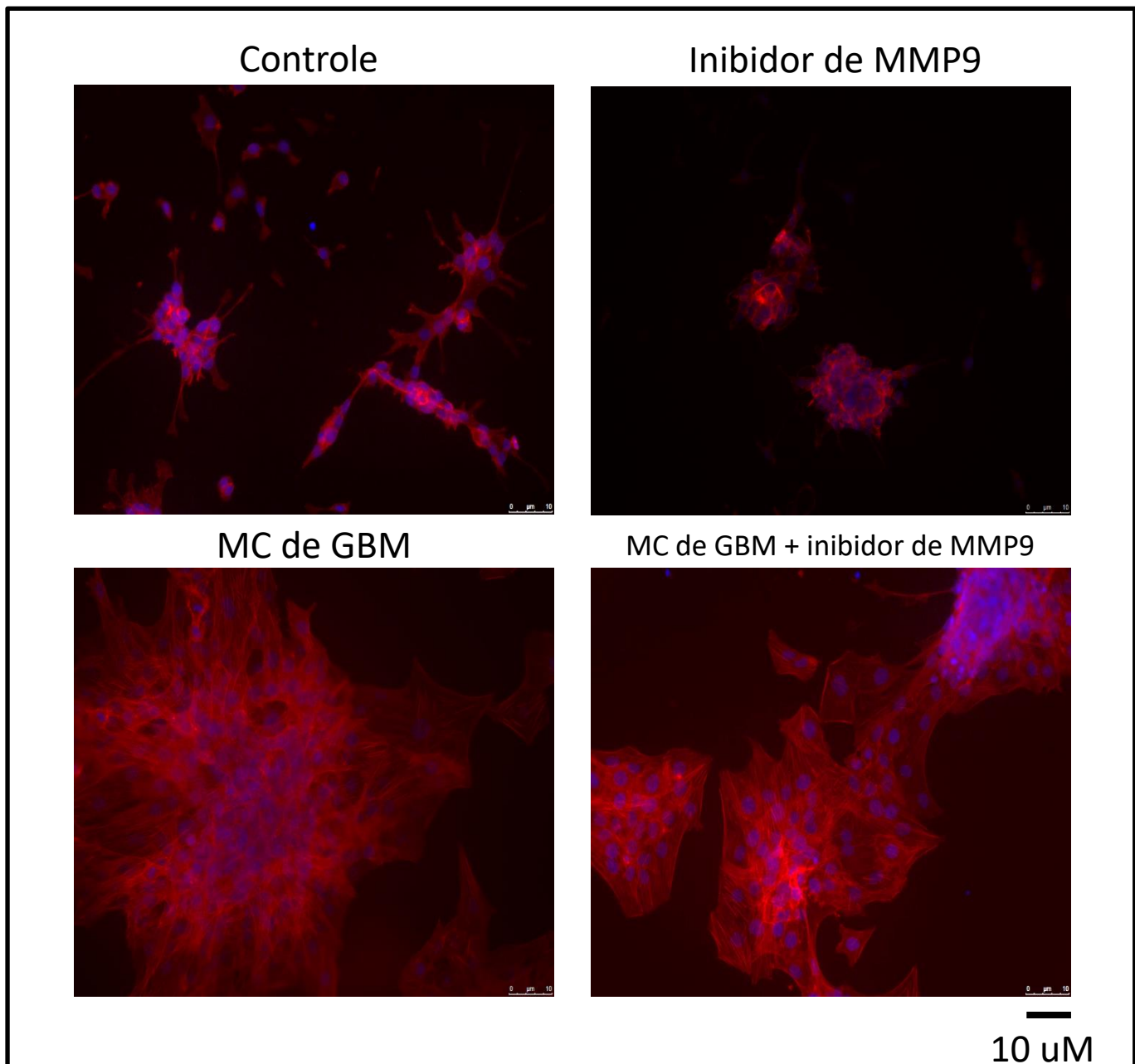


**FIGURA 9: O aumento de aglomerados celulares de HBMEC quando em contato com o MC de GBM foi revertido pelo inibidor de MMP9.** HBMECs tratadas com MC de GBM + inibidor mostraram uma possível redução no tamanho dos aglomerados celulares, nos tempos de 48h e 72h. Imagem obtida por microscopia invertida de campo claro (N=1).

A partir desses resultados foi possível avaliar por imunofluorescência as características proliferativas e morfológicas das HBMECs cultivadas sob as diferentes condições mencionadas. As células foram marcadas com intercalante de DNA (DAPI), para avaliar a capacidade proliferativa, e marcador de actina (vermelho) para avaliar a morfologia celular. É possível visualizar que os resultados



são semelhantes aos vistos em microscopia óptica (**FIGURA 10**).

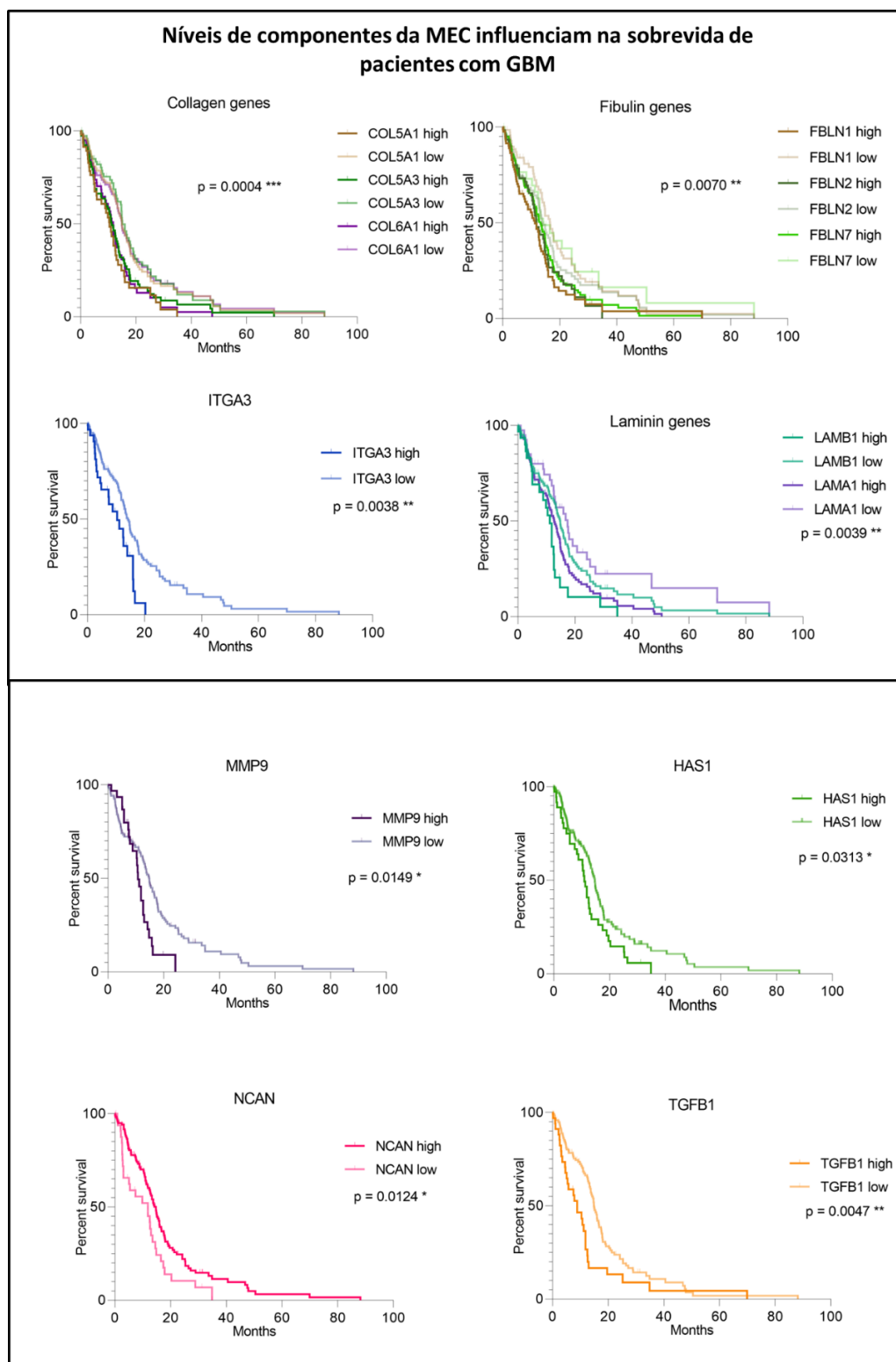


**FIGURA 10: O inibidor de MMP9 diminui os aglomerados induzidos pelo MC de GBM. Ensaio de imunofluorescência com marcação para actina (vermelho) e núcleo (azul). É possível sugerir que as HBMECs reduzem a quantidade de aglomerados celulares com o tratamento utilizando inibidor de MMP-9, nos controles observados.**

### **5.5. Os níveis de expressão de componentes da MEC influenciaram na sobrevida de pacientes com GBM**

Os dados obtidos acerca da análise de sobrevivência dos pacientes mostraram que a expressão de determinadas moléculas de MEC vai influenciar diretamente na sobrevida destes.

Foi visto que os pacientes com menor sobrevida possuíam, no geral, níveis elevados de expressão gênica de moléculas da MEC, como colágeno alpha (COLA), laminina alpha (LAMA) ou beta (LAMB), integrina alfa 3 (ITGA3), fibulina (FBLN), MMP9, hyaluronam sintase 1 (HAS1), neurocam (NCAM) e fator de crescimento transformador beta 1 (TGFB1) (**FIGURA 11**). Exceto por neurocam, onde os pacientes apresentaram maior sobrevida quanto a maior expressão dessa glicoproteína.



**FIGURA 11: Curva de sobrevida de pacientes com GBM de acordo com maior ou menor expressão de componentes de MEC.** Demonstração gráfica da diferença de tempo de sobrevida em pacientes com GBM, de acordo com os níveis transcritos de ITGA3, laminina, fibulina, colágeno, MMP9, HAS1, NCAN e TGFB1. É possível ver que pacientes que expressam maiores níveis desses componentes da MEC, em maior parte, apresentaram uma menor taxa de sobrevida. Exceto por NCAN, onde os pacientes apresentaram maior sobrevida.

## 6. DISCUSSÃO

Os GBMs são considerados tumores altamente angiogênicos, e a angiogênese nesses tumores está associada a níveis de malignidade e está negativamente correlacionada com a sobrevida do paciente (ZHANG *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2011). Durante o desenvolvimento do GBM, as células tumorais desempenham um papel instrutivo precoce no parênquima cerebral. As células estromais instruídas pelo tumor, através do contato célula-célula e/ou fatores solúveis secretados, têm efeitos diferenciais na proliferação e migração de células tumorais *in vitro*, indicando crosstalk recíproco entre células neoplásicas e não neoplásicas, como CE (BOUGNAUD *et al.*, 2016; TESTA *et al.*, 2022). A composição da MEC e seus fatores de sinalização armazenados também influenciam o comportamento das células GBM e das células estromais do GBM, afetando a angiogênese, infiltração e agressividade do GBM (ALVES *et al.*, 2011; DINEVSKA *et al.*, 2023; MARINO *et al.*, 2023). Compreender a complexa interação entre a MEC, as células GBM e a CE na angiogênese tumoral e na agressividade tumoral é crucial para identificar novos biomarcadores para melhorar o prognóstico dos pacientes e para o desenvolvimento de terapias direcionadas.

A MEC é considerada um componente importante no desenvolvimento de gliomas (FERRER *et al.*, 2018), onde a sua composição vai influenciar, por exemplo, na capacidade migratória das células tumorais (PARRI & CHIARUGI, 2010; TAPON & HALL, 1997; BEADLE *et al.*, 2008; CANOLL & GOLDMAN, 2008; FARIN *et al.*, 2006). A MEC pré-formada é produzida e utilizada como alternativa para uma base de cultivo celular, que mimetiza a MEC produzida e liberada por células, no SNC (HELLEWELL *et al.*, 2017). Com base nisso, desenvolvemos um protocolo para avaliar a melhor maneira de obter uma MEC imobilizada livre de células.

Foi possível observar que o tampão de lise à base de TRITON X-100 se mostrou eficiente na lise celular. A lise celular ocorre por conta da exposição prolongada ou altas concentrações do detergente. Esse detergente neutro é amplamente utilizado para lisar células, por sua ação polar (KOLEY *et al.*, 2010), vai agir sobre as ligações de hidrogênio encontradas na bicamada lipídica da célula, o que leva a degradação da membrana celular (KOLEY and BARD, 2010).

A partir dessas observações, vimos que a MEC secretada foi perdida durante o processo de lise celular. Perguntamos então se a utilização de uma superfície de

cultivo revestida seria útil para garantir uma maior aderência da MEC secretada, após o processo de lise celular.

De acordo com o estudo de BELLO et al., 2020 o uso da gelatina (colágeno tipo I) é relevante em estudos de desenvolvimento celular *in vitro*, auxiliando na fixação celular, por conter importantes porções de ligação para que isso ocorra. A sua estrutura é caracterizada por sua rigidez, por conta da sua forma de bastonete de tripla hélice entrelaçada, formando assim uma estrutura quaternária (GORGIEVA e KOKOL, 2011; BRODSKY et al., 2005). Além disso, o seu uso é considerado biocompatível, e não induz antigenicidade e toxicidade nas células. Os resultados vistos no estudo de Paguirigan, 2006, afirmam que o uso de um revestimento de gelatina, como superfície de cultivo celular, auxilia no estudo dos efeitos da MEC e de fatores solúveis. Dessa forma é possível mimetizar melhor o microambiente *in vivo* (PAGUIRIGAN et al., 2006). Sendo assim, o cultivo celular feito sobre uma camada revestida de gelatina garante uma observação mais próxima da realidade acerca do desenvolvimento estrutural, fatores solúveis e desenvolvimento celular *in vitro* (LI et al., 2005; TU et al., 2003; WANG et al., 2003; STREULI et al., 1991; WOZNIAK et al., 2004; HERSEL et al., 2003). A partir dessas informações foi possível sugerir o uso da gelatina para garantir uma maior aderência da MEC secretada, após o processo de lise celular. Vimos então que a utilização de gelatina, em baixa concentração (0.1%), foi útil para a preservação e maior integridade da MEC secretada pelas células em cultivo. Neste trabalho foi visto que a concentração de 0.1% de gelatina se mostrou eficiente para preservar a MEC secretada pelas células, após o processo de lise celular com tampão a base de TRITON X-100.

Foi visto que as HBMECs não formaram túbulos quando cultivadas sobre a MEC pré-formada livre de células. De acordo com os estudos de ALVES et al., 2011; DECICCO-SKINNER KL et al., 2014; GOODWIN et al., 2007, com a utilização de MEC comercial, eles observaram a formação de túbulos com base na presença de uma matriz enriquecida em TN-C (Tenacina-C) (ALVES et al., 2011), sugerindo que a presença dessa molécula no microambiente tumoral leva a formação de ramificações endoteliais. Inicialmente esperávamos encontrar processos de tubulogênese nas células cultivadas sobre a MEC de GBM, porém não foi possível visualizar esse resultado.

Como a proliferação é um processo essencial para a angiogênese, decidimos avaliar a quantidade das HBMECs—quando cultivadas sobre uma MEC

pré-formada de HBMECs e GBM02. Segundo os estudos de ALVES, 2011 acerca da proliferação de células endoteliais sobre diferentes matrizes celulares, foi visto que no cultivo de HUVECs sobre a MEC de U373 MG, algumas dessas células estavam sofrendo desadesão endotelial e anoikis. Esse resultado observado indica que a MEC secretada por linhagens celulares e células primárias de glioma, induzem essas características que levam à morte celular. Outra característica importante, também visto no trabalho de ALVES, 2011, foi a observação de que fragmentos de GBM colocados em contato direto com monocamadas endoteliais confluentes levam ao descolamento endotelial. É sugerido então que a indução da morte celular está ligada a composição da MEC ou a fatores presentes na MEC secretada pelas células tumorais. Essas informações corroboram com os resultados do presente trabalho, onde mostramos que a MEC de GBM inibiu a quantidade de HBMECs em 24 h (quando as MECs foram aderidas sobre gelatina) e em 72h.

No estudo de ROSARIO et al 2020, acerca de fatores solúveis de GBM (meio condicionado) aumentarem a capacidade migratória de HBMECs via expressão e quantidade proteica de MMP-9 observadas, decidimos desenvolver um ensaio de inibição de MMP-9 para avaliar se esse fator possui alguma influência na capacidade proliferativa das HBMECs. É possível sugerir que o inibidor de MMP-9 parece agir reduzindo o número de células e agregados celulares induzidos pelo MC de GBM. Esses resultados corroboram o estudo de DECICCO-SKINNER, 2014, indicando que o uso do MC de GBM leva ao surgimento de agregados celulares, por conta de fatores solúveis encontrados nesse MC, liberados por células de GBM. Esses dados corroboram com o estudo de Goodwin et al., 2007, que indica que o uso do inibidor de MMP levaria a diminuição da capacidade proliferativa das CEs em cultivo, nesse caso, as HBMECs. Quando as HBMECs são cultivadas apenas sobre plástico e MC de GBM elas formam agregados celulares que são rompidos pelo inibidor de MMP-9.

Adicionalmente nós encontramos uma correlação geral da alta expressão de moléculas de MEC em GBM (colágeno alpha (COLA), laminina alpha (LAMA) ou beta (LAMB), integrina alfa 3 (ITGA3), fibulina (FBLN), MMP9, hyaluronam sintase 1 (HAS1), neurocam (NCAM) e fator de crescimento transformador beta 1 (TGFB1) com baixa sobrevida, prognóstico nesses pacientes.

No conjunto de genes de angiogênese não respondedores, o COL4A2 foi associado a resultados clínicos ruins em pacientes tratados com bevacizumabe. Este estudo demonstrou que os conjuntos de genes associados à angiogênese são

compostos de subconjuntos distintos com diversos papéis biológicos e que representam diferentes respostas clínicas à terapia antiangiogênica (CHOI *et al.*, 2018). COL4A1 e COL4A2 também foram incluídos em uma lista de 15 genes que compunham uma assinatura genética relacionada ao sistema imunológico em gliomas. Com base nesta assinatura genética, a sobrevida dos pacientes do grupo de alto risco foi pior do que a dos pacientes do grupo de baixo risco (GONG *et al.*, 2021). Além disso, ensaios imuno-histoquímicos demonstraram que o COL6A1 foi significativamente regulado positivamente nos tecidos tumorais de pacientes com GBM de alto risco. O sequenciamento de RNA unicelular também validou que essas células malignas expressavam altos níveis de COL6A1 (WAN *et al.*, 2023). O aumento da expressão de COL6A1 e do agrupamento de marcadores moleculares endoteliais vasculares de diferenciação (CD31) induziu a angiogênese do glioma (HAN *et al.*, 2022). Por sua vez, o COL5A1 já foi associado a padrões de sobrevivência em pacientes com GBM ( $p < 0,0001$ ). Os seus resultados indicaram que o COL5A1 teve a classificação mais elevada, com níveis de expressão significativamente mais elevados nos tecidos GBM do que nos tecidos cerebrais normais. Além disso, o COL5A1 foi superexpresso em amostras exibindo características agressivas, incluindo os grupos não-G-CIMP ( $p < 0,0001$ ), IDH1 de tipo selvagem ( $p < 0,0001$ ) e O6-metilguanina-DNA metiltransferase não metilada (MGMT) ( $p = 0,008$ ). Em relação à classificação do subtipo molecular do GBM, o nível de expressão de COL5A1 no subtipo mesenquimal (Mes) foi maior do que nos subtipos pronural e clássico ( $p < 0,001$ ) (TSAI *et al.*, 2021). A expressão de COL5A3 também foi correlacionada com baixa sobrevida em pacientes com GBM (BASSOT *et al.*, 2023). As lamininas são os principais componentes da membrana basal dos vasos sanguíneos (YOUSIF *et al.*, 2013). A regulação positiva da expressão de LAMB1 correlacionou-se fortemente com a regulação negativa do miR-124-5p. O crescimento do glioma através do aumento da angiogênese foi revertido após o knockdown do LAMB1 (CHEN *et al.*, 2014). LAMB1 foi descrito como um candidato a biomarcador promissor no GBM (ZOLOTOVSKAIA *et al.*, 2022). Níveis baixos de LAMB1 também foram associados a um fenótipo tumoral menos invasivo e a um melhor prognóstico (VIRGA *et al.*, 2017). Os fenótipos angiogênicos endoteliais foram mapeados para a angiogênese tumoral e incluíram, por exemplo, uma assinatura genética associada à remodelação da BM vascular, como LAMB1, LAMA4, COL4A1 e COL4A2 (ZHANG *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2021). Por sua vez, a

cadeia LAMA1 é um componente de várias isoformas de laminina (laminina-1, -2, -6, -8, -10 e -12) (PATARROYO *et al.*, 2002). Descobriu-se anteriormente que essas cadeias de laminina são secretadas por células de glioma e desempenham papéis na infiltração peritumoral através da adesão de células cancerígenas aos componentes da MEC e migração celular (KAWATAKI *et al.*, 2007). A expressão mais baixa de LAMA1 tem sido associada à melhora da sobrevida em conjuntos de dados de pacientes com GBM, enquanto a superexpressão de LAMA1 tem sido correlacionada com o aumento do crescimento tumoral no GBM primário (SCRIDELI *et al.*, 2008; FISCON *et al.*, 2018). As fibulinas são proteínas associadas a fibras elásticas. A análise bioinformática demonstrou que as vias relacionadas à angiogênese, que envolvem fibulina expressa diferencialmente, estão aumentadas em astrocitomas de baixo a alto grau (REN *et al.*, 2016). Foi demonstrado que a superexpressão de FBLN1, também conhecida como EFEMP1, elimina o desenvolvimento de tumores e suprime a angiogênese, a proliferação celular e a expressão de VEGFA. Em células GBM tratadas com proteína FBLN1 exógena ou FBLN1 endógeno superexpresso, o nível de EGFR foi reduzido (HU *et al.*, 2011). Além disso, um estudo envolvendo 95 pacientes com GBM analisados por qPCR demonstrou que o FBLN1 era um marcador prognóstico favorável para pacientes com GBM, de acordo com a análise de regressão de Cox (HU *et al.*, 2011). Por outro lado, a regulação negativa do FBLN2 também foi associada ao estágio clínico avançado em tecidos de astrocitoma (REN *et al.*, 2016). A análise bioinformática integrativa confirmou o papel fundamental do TGFB1 como um importante módulo de interação que molda a progressão do GBM (BOUGNAUD *et al.*, 2016). Descobriu-se que o TGFB1 aumenta a angiogênese induzida por GBM, um processo que foi prejudicado por um inibidor da quinase N-terminal c-Jun (JNK) (SP600125), mas não pela quinase regulada por sinal extracelular (ERK), fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), ou inibidores da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Essas descobertas ressaltam o papel crítico das vias TGFB1 e JNK na mediação da angiogênese do GBM ( YANG *et al.*, 2013; HAN *et al.*, 2015). A expressão de TGFB1 também foi positivamente associada ao prognóstico agressivo, pois foi maior no subtipo Mes de glioma de alto grau (HGG) do que no subtipo pronural. Além disso, o TGFB1 emergiu como uma potencial molécula prognóstica e um potencial gene de assinatura para o subtipo Mes HGG (PAN *et al.*, 2018)

O HA impacta fortemente o desenvolvimento e progressão do tumor,



promovendo a proliferação celular, angiogênese, resistência à quimioterapia e invasão dos tecidos circundantes (FERRER et al., 2018; YANG et al., 2013). Dados de microarranjos de tecidos mostraram alta expressão de HA e HAS1-3 em tecido maligno de astrocitomas com infiltração difusa de grau II-IV ( VALKONEN *et al.*, 2018). Além disso, o HA aumenta os níveis de ceruloplasmina, uma proteína relacionada à hipóxia, inflamação e angiogênese em gliomas ( PIBUEL *et al.*, 2021). Até o momento, não houve estudos relacionando diretamente a expressão de HAS1 e CE no GBM. O crescimento altamente invasivo do GBM é influenciado por um perfil anormal de subtipos de MMP e seu inibidor TIMP envolvido na remodelação do BM e da vasculatura normal (SAXENA et al., 1995; ZERROUQI et al., 2012; PULLEN et al 2012). Descobrimos que a MMP9 foi correlacionada com menor sobrevida em pacientes com GBM. O papel da MMP9 na angiogênese do GBM tem sido estudado há muito tempo (THORNS et al., 2003; JIGUET-JIGLAIRE et al., 2022). O aumento da expressão de MMP9 foi correlacionado com o aumento da angiogênese (ANNABI et al., 2009) e sua expressão é significativamente induzida pela hipóxia no GBM (EMARA et al., 2014). A expressão de MMP9 também foi significativamente associada a um mau prognóstico em pacientes com GBM (SUN et al., 2019). Curiosamente, o valor preditivo da MMP9 num ensaio randomizado de fase III em pacientes com GBM recentemente diagnosticado foi correlacionado com a eficácia do bevacizumab, um medicamento antiangiogénico. Pacientes com níveis baixos de MMP9 tiveram um benefício significativo de OS em 5,2 meses com bevacizumabe ( $p = 0,0009$ ). A análise multivariada revelou uma interação significativa entre o tratamento e MMP9 ( $p = 0,03$ ) para OS (JIGUET-JIGLAIRE et al., 2022). Conroy e colaboradores (2017) (CONROY *et al.*, 2017) mostraram que MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 foram mais altamente expressos em GBM do subtipo clássico. Recentemente, o TIMP1 foi identificado como um dos oito genes diferencialmente expressos relacionados ao prognóstico no GBM (DANG et al., 2023). O HA impacta fortemente o desenvolvimento e progressão do tumor, promovendo a proliferação celular, angiogênese, resistência à quimioterapia e invasão dos tecidos circundantes (FERRER et al., 2018; JONG et al., 2008). Dados de microarranjos de tecidos mostraram alta expressão de HA e HAS1-3 em tecido maligno de astrocitomas com infiltração difusa de grau II-IV (VALKONEN et al., 2018). Além disso, o HA aumenta os níveis de ceruloplasmina, uma proteína relacionada à hipóxia, inflamação e angiogênese em gliomas (PIBUUEL et al., 2021).

Até o momento, não houve estudos relacionando diretamente a expressão de HAS1 e CE no GBM.

## 7. CONCLUSÃO

Neste trabalho utilizamos a técnica de lise celular, onde estabelecemos o uso de uma solução tampão a base de um detergente neutro (TRITON X-100) como forma padrão, pois se mostrou eficiente no processo de lise. Além disso, foi possível observar maior presença de MEC (pela marcação com fibronectina), após a lise, quando GBM02 e HBMECs foram cultivadas sobre gelatina sugerindo que a presença de gelatina garantiu maior aderência da MEC.

Foi possível observar que as HBMECs não formam túbulos quando cultivadas sobre MEC tumoral livre de células, demonstrando diferenças na quantidade de HBMECs quando em presença de MEC pré-formada quando comparado aos controles nos tempos de 24 e 72h. Concluímos com o ensaio de quantificação de HBMEC, que a MEC de GBM inibiu o aumento de HBMECs nesses tempos.

O ensaio preliminar de inibição de MMP-9 mostrou que sob influência do MC de GBM, as HBMECs estão em maior número e formaram agregados celulares. Observamos que esse tipo de MMP influencia nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h.

Além disso, observamos que as moléculas de MEC [colágeno alpha (COLA), laminina alpha (LAMA) ou beta (LAMB), integrina alfa 3 (ITGA3), fibulina (FBLN), MMP9, hyaluronam sintase 1 (HAS1), neurocam (NCAM) e fator de crescimento transformador beta 1 (TGFB1)] contribuíram com uma pior sobrevida global em pacientes GBM *in silico*. Portanto, sugerimos essas moléculas como possíveis contribuintes para o aumento no processo de angiogênese desses tumores.

No geral, nosso trabalho indica que a MEC de GBM influencia no número de células HBMEC e no seu processo de ramificação, e que algumas moléculas de MEC diretamente contribuem para um pior prognóstico em tumores GBM. Abrimos possibilidades de estudo acerca de como a MEC pode ser alvo no estudo da angiogênese de GBM, com destaque para a inibição de MMP-9.

## 8. REFERÊNCIAS

ADAIR, Thomas H.; MONTANI, Jean-Pierre. **Angiogenesis**. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2010. (Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease).

AGARWALA, S. S.; KIRKWOOD, J. M. Temozolomide, ael alkylating agent with activity in the central nervous system, improve the treatment of advanced metastatic melanoma. **Oncologist**, v. 5, n. 2, p. 144-151. 2001.

AHIR, B. K.; ENGELHARD, H. H.; LAKKA, S. S. Tumor development and angiogenesis in adult brain tumor: Glioblastoma. **Molecular neurobiology**, v. 57, n. 5, p. 2461–2478, 2020.

AHIR, B. K.; ENGELHARD, H. H.; LAKKA, S. S. Tumor development and angiogenesis in adult brain tumor: Glioblastoma. **Molecular neurobiology**, v. 57, n. 5, p. 2461–2478, 2020.

AHIR, Bhavesh K.; ENGELHARD, Herbert H.; LAKKA, Sajani S. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 5, p. 2461–2478, 2020.

ALVES, T. R. et al. Glioblastoma cells: A heterogeneous and fatal tumor interacting with the parenchyma. **Life sciences**, v. 89, n. 15–16, p. 532–539, 2011b.

ALVES, T. R. et al. Tenascin-C in the extracellular matrix promotes the selection of highly proliferative and tubulogenesis-defective endothelial cells. **Experimental cell research**, v. 317, n. 15, p. 2073–2085, 2011a.

ALVES, Tercia Rodrigues; DA FONSECA, Anna Carolina Carvalho; NUNES, Sara Santana; *et al.* Tenascin-C in the extracellular matrix promotes the selection of highly proliferative and tubulogenesis-defective endothelial cells. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 15, p. 2073–2085, 2011.

ANJUM, K. et al. Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, n. 92, p. 681-689, 2017.

ANNABI, B. et al. Propranolol adrenergic blockade inhibits human brain endothelial cells tubulogenesis and matrix metalloproteinase-9 secretion. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 60, n. 5, p. 438–445, 2009.

BALÇA-SILVA, Joana; MATIAS, Diana; DO CARMO, Anália; *et al.* Glioblastoma entities express subtle differences in molecular composition and response to treatment. **Oncology Reports**, v. 38, n. 3, p. 1341–1352, 2017.

BAO, Xunxia; RAN, Juan; KONG, Chuifang; *et al.* Pan-cancer analysis reveals the potential of hyaluronate synthase as therapeutic targets in human tumors. **Heliyon**, v. 9, n. 8, p. e19112, 2023.

BASSOT, A. et al. Identification of a miRNA multi-targeting therapeutic strategy in glioblastoma. **Cell death & disease**, v. 14, n. 9, 2023.

BEADLE, Christopher; ASSANAH, Marcela C.; MONZO, Pascale; *et al.* The Role of Myosin II in Glioma Invasion of the Brain. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, n. 8, p. 3357–3368, 2008.

BELLO, Alvin Bacero; KIM, Deogil; KIM, Dohyun; *et al.* Engineering and Functionalization of Gelatin Biomaterials: From Cell Culture to Medical Applications. **Tissue Engineering. Part B, Reviews**, v. 26, n. 2, p. 164–180, 2020.

BOUGNAUD, S. et al. Molecular crosstalk between tumour and brain parenchyma instructs histopathological features in glioblastoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 22, p. 31955–31971, 2016.

BUI, Anh V.; MANASSEH, Richard; LIFFMAN, Kurt; *et al.* Development of optimized vascular fractal tree models using level set distance function. **Medical Engineering & Physics**, v. 32, n. 7, p. 790–794, 2010.

CALDERWOOD, David A.; SHATTIL, Sanford J.; GINSBERG, Mark H. Integrins and Actin Filaments: Reciprocal Regulation of Cell Adhesion and Signaling \*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 30, p. 22607–22610, 2000.

CANOLL, Peter; GOLDMAN, James E. The interface between glial progenitors and gliomas. **Acta neuropathologica**, v. 116, n. 5, p. 465–477, 2008.

CARMELIET, Peter; DE SMET, Frederik; LOGES, Sonja; *et al.* Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 6, n. 6, p. 315–326, 2009.

CAUWE, Bénédicte; VAN DEN STEEN, Philippe E.; OPDENAKKER, Ghislain. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 3, p. 113–185, 2007.

CHARALAMBOUS, Christiana; CHEN, Thomas C.; HOFMAN, Florence M. Characteristics of tumor-associated endothelial cells derived from glioblastoma multiforme. **Neurosurgical Focus**, v. 20, n. 4, p. E22, 2006.

CHEN, Q. *et al.* MiR-124-5p inhibits the growth of high-grade gliomas through posttranscriptional regulation of LAMB1. **Neuro-oncology**, v. 16, n. 5, p. 637–651, 2014.

CHEN, Ricky; SMITH-COHN, Matthew; COHEN, Adam L.; *et al.* Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 14, n. 2, p. 284–297, 2017.

CHIEN, Shu. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 3, p. H1209-1224, 2007.

CHOI, S. W. *et al.* Identification of transcriptome signature for predicting clinical response to bevacizumab in recurrent glioblastoma. **Cancer medicine**, v. 7, n. 5, p. 1774–1783, 2018.

COHEN, Martin H.; JOHNSON, John R.; PAZDUR, Richard. Food and Drug

Administration Drug approval summary: temozolomide plus radiation therapy for the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 19 Pt 1, p. 6767–6771, 2005.

CONROY, S. et al. Novel insights into vascularization patterns and angiogenic factors in glioblastoma subclasses. **Journal of neuro-oncology**, v. 131, n. 1, p. 11–20, 2017.

CORREIA, J. et al. Glioblastoma multiforme – A propósito de um caso clínico. **Medicina interna**, v. 16, n. 1, p. 27–32, 2009.

CRUZ, João Victor Roza; BATISTA, Carolina; AFONSO, Bernardo de Holanda; *et al.* Obstacles to Glioblastoma Treatment Two Decades after Temozolomide. **Cancers**, v. 14, n. 13, p. 3203, 2022.

DANG, H.-H. et al. Identification of a novel eight-gene risk model for predicting survival in glioblastoma: A comprehensive bioinformatic analysis. **Cancers**, v. 15, n. 15, p. 3899, 2023.

DAS, Sunit; MARSDEN, Philip A. Angiogenesis in Glioblastoma. **The New England journal of medicine**, v. 369, n. 16, p. 1561, 2013.

DE OLIVEIRA ROSARIO, Luciane Vieira; DA ROSA, Barbara Gomes; GONCALVES, Thaynan Lopes; *et al.* Glioblastoma Factors Increase the Migration of Human Brain Endothelial Cells In Vitro by Increasing MMP-9/CXCR4 Levels. **Anticancer Research**, v. 40, n. 5, p. 2725–2737, 2020.

DECICCO-SKINNER, Katie L.; HENRY, Gervaise H.; CATAISSON, Christophe; *et al.* Endothelial Cell Tube Formation Assay for the In Vitro Study of Angiogenesis. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 91, p. 51312, 2014.

DINEVSKA, M. et al. Cell signaling activation and extracellular matrix remodeling underpin glioma tumor microenvironment heterogeneity and organization. **Cellular oncology**, v. 46, n. 3, p. 589–602, 2023.

DING, X. et al. A case report of targeted therapy with apatinib in a patient with recurrent high grade glioma. **Medicine**, v. 97, n. 22, p. e10859, 2018.

DOBRA, Gabriella; GYUKITY-SEBESTYÉN, Edina; BUKVA, Mátyás; *et al.* MMP-9 as Prognostic Marker for Brain Tumours: A Comparative Study on Serum-Derived Small Extracellular Vesicles. **Cancers**, v. 15, n. 3, p. 712, 2023.

EMARA, M.; ALLALUNIS-TURNER, J. Effect of hypoxia on angiogenesis related factors in glioblastoma cells. **Oncology reports**, v. 31, n. 4, p. 1947–1953, 2014.

FARIA, Jane; ROMÃO, Luciana; MARTINS, Sheila; *et al.* Interactive properties of human glioblastoma cells with brain neurons in culture and neuronal modulation of glial laminin organization. **Differentiation; Research in Biological Diversity**, v. 74, n. 9–10, p. 562–572, 2006.

FARIN, Azadeh; SUZUKI, Satoshi O.; WEIKER, Michael; *et al.* Transplanted glioma cells migrate and proliferate on host brain vasculature: a dynamic analysis. **Glia**, v. 53, n. 8, p. 799–808, 2006.

FERRER, Valéria Pereira; MOURA NETO, Vivaldo; MENTLEIN, Rolf. Glioma infiltration and extracellular matrix: key players and modulators. **Glia**, v. 66, n. 8, p. 1542–1565, 2018.

FISCON, G. et al. Computational identification of specific genes for glioblastoma stem-like cells identity. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, 2018.

GERHARDT, Holger. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. **Organogenesis**, v. 4, n. 4, p. 241–246, 2008.

GONG, X. et al. Construction of a prognostic gene signature associated with immune infiltration in glioma: A comprehensive analysis based on the CGGA. **Journal of oncology**, v. 2021, p. 1–19, 2021.

GOODWIN, Anne M. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. **Microvascular Research**, v. 74, n. 2–3, p. 172–183, 2007.

GORGIEVA, Selestina; KOKOL, Vanja. Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives. *In: [s.l.: s.n.]*, 2011.

GRAB, D. J.; NYARKO, E.; NIKOLSKAIA, O. V.; *et al.* Human brain microvascular endothelial cell traversal by *Borrelia burgdorferi* requires calcium signaling. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. 422–426, 2009.

GUPTA, Manoj Kumar; QIN, Ren-Yi. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 9, n. 6, p. 1144–1155, 2003.

GUSTAFSON, M. P. *et al.* Systemic immune suppression in glioblastoma: the interplay between CD14 HLA-DR10/neg monocytes, tumor factors and dexamethasone. **Neuro Oncology**, v. 12, n. 7, p. 631-644, 2010

HAN, X. *et al.* P4HA1 regulates CD31 via COL6A1 in the transition of glioblastoma stem-like cells to tumor endothelioid cells. **Frontiers in oncology**, v. 12, 2022.

HATTERMANN, Kirsten; HELD-FEINDT, Janka; LUCIUS, Ralph; *et al.* The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. **Cancer Research**, v. 70, n. 8, p. 3299–3308, 2010.

HELLEWELL, Andrew L.; ROSINI, Silvia; ADAMS, Josephine C. A Rapid, Scalable Method for the Isolation, Functional Study, and Analysis of Cell-derived Extracellular Matrix. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 119, p. 55051, 2017.

HERSEL, Ulrich; DAHMEN, Claudia; KESSLER, Horst. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4385–4415, 2003.

HOROWITZ, Arie; SIMONS, Michael. Branching Morphogenesis. **Circulation Research**, v. 104, n. 2, p. e21–e21, 2009.



HORTOBÁGYI, T. et al. Prognostic role of the expression of invasion-related molecules in glioblastoma. **Journal of neurological surgery. Part A, Central European neurosurgery**, v. 78, n. 01, p. 12–19, 2016.

HU, Y. et al. EFEMP1 suppresses malignant glioma growth and exerts its action within the tumor extracellular compartment. **Molecular cancer**, v. 10, n. 1, 2011.

JAMJOOM, A. A. B. et al. Magnetic resonance diffusion metrics indexing high focal cellularity and sharp transition at the tumour boundary predict poor outcome in glioblastoma multiforme. **Clinical radiology**, v. 70, n. 12, p. 1400–1407, 2015.

JANJUA, Taskeen Iqbal; REWATKAR, Prarthana; AHMED-COX, Aria; *et al.* Frontiers in the treatment of glioblastoma: Past, present and emerging. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 171, p. 108–138, 2021.

JIGUET-JIGLAIRE, C. et al. Plasmatic MMP9 released from tumor-infiltrating neutrophils is predictive for bevacizumab efficacy in glioblastoma patients: an AVAglio ancillary study. **Acta neuropathologica communications**, v. 10, n. 1, 2022.

JONG, A. et al. Involvement of human CD44 during *Cryptococcus neoformans* infection of brain microvascular endothelial cells. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1313–1326, 2008.

JOSEPH, Justin V.; BALASUBRAMANIYAN, Veerakumar; WALENKAMP, Annemiek; *et al.* TGF- $\beta$  as a therapeutic target in high grade gliomas - promises and challenges. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 4, p. 478–485, 2013.

KAMINO, Masayuki; KISHIDA, Michiko; KIBE, Toshiro; *et al.* Wnt-5a signaling is correlated with infiltrative activity in human glioma by inducing cellular migration and MMP-2. **Cancer Science**, v. 102, n. 3, p. 540–548, 2011.

KARGIOTIS, O.; RAO, J.S.; KYRITSIS, A.P. Mechanisms of angiogenesis in gliomas. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 78, n. 3, p. 281–293, 2006.

KAWATAKI, T. et al. Laminin isoforms and their integrin receptors in glioma cell

migration and invasiveness: Evidence for a role of  $\alpha 5$ -laminin(s) and  $\alpha 3\beta 1$  integrin. **Experimental cell research**, v. 313, n. 18, p. 3819–3831, 2007.

KENIG, Sasa; ALONSO, María Beatriz Durán; MUELLER, Margareta M.; *et al.* Glioblastoma and endothelial cells cross-talk, mediated by SDF-1, enhances tumour invasion and endothelial proliferation by increasing expression of cathepsins B, S, and MMP-9. **Cancer Letters**, v. 289, n. 1, p. 53–61, 2010.

KOLEY, Dipankar; BARD, Allen J. Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 39, p. 16783–16787, 2010.

KORN, Claudia; SCHOLZ, Beate; HU, Junhao; *et al.* Endothelial cell-derived non-canonical Wnt ligands control vascular pruning in angiogenesis. **Development (Cambridge, England)**, v. 141, n. 8, p. 1757–1766, 2014.

LEE, Dennis; RIESTENBERG, Robert A.; HASKELL-MENDOZA, Aden; *et al.* Diffuse astrocytic glioma, IDH-Wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV: A single-institution case series and review. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 152, n. 1, p. 89–98, 2021.

LEE, E. J. *et al.* Potential role of advanced MRI techniques for the peritumoural region in differentiating glioblastoma multiforme and solitary metastatic lesions. **Clinical radiology**, v. 68, n. 12, p. e689–e697, 2013.

LEE, J. *et al.* Spatial habitat features derived from multiparametric magnetic resonance imaging data are associated with molecular subtype and 12-month survival status in glioblastoma multiforme. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0136557, 2015.

LEE, S.-Y. *et al.* Isolinderalactone inhibits glioblastoma cell supernatant-induced angiogenesis. **Oncology letters**, v. 24, n. 4, 2022.

LI, W.-J. Wan-Ju; TULI, Richard; OKAFOR, Chukwuka; *et al.* A three-dimensional

nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 26, n. 6, p. 599–609, 2005.

LOUIS, David N.; OHGAKI, Hiroko; WIESTLER, Otmar D.; *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, 2007.

LOUIS, David N.; PERRY, Arie; BURGER, Peter; *et al.* International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. **Brain Pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 24, n. 5, p. 429–435, 2014.

LOUIS, David N.; PERRY, Arie; REIFENBERGER, Guido; *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, 2016.

LOUIS, David N.; PERRY, Arie; WESSELING, Pieter; *et al.* The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Neuro-Oncology**, v. 23, n. 8, p. 1231–1251, 2021.

LU, Q. Richard; QIAN, Lily; ZHOU, Xianyao. Developmental origins and oncogenic pathways in malignant brain tumors. **WIREs Developmental Biology**, v. 8, n. 4, p. e342, 2019.

LUNDY, P. *et al.* The role of imaging for the management of newly diagnosed glioblastoma in adults: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline update. **Journal of neuro-oncology**, v. 150, n. 2, p. 95–120, 2020.

MACHADO, G. C.; FERRER, V. P. MUC17 mutations and methylation are associated with poor prognosis in adult-type diffuse glioma patients. **Journal of the neurological sciences**, v. 452, n. 120762, p. 120762, 2023.

MAJIDPOOR, Jamal; MORTEZAEE, Keywan. Angiogenesis as a hallmark of solid tumors - clinical perspectives. **Cellular Oncology (Dordrecht)**, v. 44, n. 4, p. 715–

737, 2021.

MARINO, S. et al. The Extracellular matrix in glioblastomas: A glance at its structural modifications in shaping the tumoral microenvironment—A systematic review. **Cancers**, v. 15, n. 6, p. 1879, 2023.

MARTENS, Tobias; SCHMIDT, Nils-Ole; ECKERICH, Carmen; *et al.* A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 12, n. 20 Pt 1, p. 6144–6152, 2006.

MUNN, Lance L. Aberrant vascular architecture in tumors and its importance in drug-based therapies. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 9, p. 396–403, 2003.

NAG, S.; KAPADIA, A.; STEWART, D. J. Review: molecular pathogenesis of blood-brain barrier breakdown in acute brain injury. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 37, n. 1, p. 3–23, 2011.

NICHOLSON, James G.; FINE, Howard A. Diffuse Glioma Heterogeneity and Its Therapeutic Implications. **Cancer Discovery**, v. 11, n. 3, p. 575–590, 2021.

NOVAK, Ulrike; KAYE, Andrew H. Extracellular matrix and the brain: components and function. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 280–290, 2000.

OKAMOTO, S. et al. Bevacizumab changes vascular structure and modulates the expression of angiogenic factors in recurrent malignant gliomas. **Brain tumor pathology**, v. 33, n. 2, p. 129–136, 2016. **OncoTargets and therapy**. [s.l.] Informa UK Limited, 2020.

PAGUIRIGAN, Amy; BEEBE, D.J. Gelatin Based Microfluidic Devices for Cell Culture. **Lab on a chip**, v. 6, p. 407–13, 2006.

PAN, Y.-B. et al. Transforming growth factor beta induced (TGFBI) is a potential signature gene for mesenchymal subtype high-grade glioma. **Journal of neuro-oncology**, v. 137, n. 2, p. 395–407, 2018.

PARRI, Matteo; CHIARUGI, Paola. Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. **Cell communication and signaling: CCS**, v. 8, p. 23, 2010.

PATARROYO, M.; TRYGGVASON, K.; VIRTANEN, I. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. **Seminars in cancer biology**, v. 12, n. 3, p. 197–207, 2002.

PIASECZNY, Matthew M.; PIO, Graciella M.; CHU, Jenny E.; *et al.* Generation of Organ-conditioned Media and Applications for Studying Organ-specific Influences on Breast Cancer Metastatic Behavior. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 112, p. 54037, 2016.

PIBUEL, M. A. *et al.* The scrambled story between hyaluronan and glioblastoma. **The journal of biological chemistry**, v. 296, n. 100549, p. 100549, 2021.

PULLEN, N. A. *et al.* Matrix metalloproteinase-1 expression enhances tumorigenicity as well as tumor-related angiogenesis and is inversely associated with TIMP-4 expression in a model of glioblastoma. **Journal of neuro-oncology**, v. 106, n. 3, p. 461–471, 2012.

QIN, A. *et al.* Receptor tyrosine kinases as druggable targets in glioblastoma: Do signaling pathways matter? **Neuro-oncology advances**, v. 3, n. 1, 2021.

RAO, Shyam; SENGUPTA, Rajarshi; CHOE, Eun Joo; *et al.* CXCL12 mediates trophic interactions between endothelial and tumor cells in glioblastoma. **PloS One**, v. 7, n. 3, p. e33005, 2012.

REARDON, D. A. *et al.* A review of VEGF/VEGFR-targeted therapeutics for recurrent glioblastoma. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN**, v. 9, n. 4, p. 414–427, 2011.

RUHRBERG, Christiana; GERHARDT, Holger; GOLDING, Matthew; *et al.* Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. **Genes & Development**, v. 16, n. 20, p. 2684–2698, 2002.

SAXENA, A. et al. Increased expression of gelatinase-a and timp-2 in primary human glioblastomas. **International journal of oncology**, 1995.

SCRIDELI, C. A. et al. Gene expression profile analysis of primary glioblastomas and non-neoplastic brain tissue: identification of potential target genes by oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. **Journal of neuro-oncology**, v. 88, n. 3, p. 281–291, 2008.

SEKER-POLAT, Fidan; PINARBASI DEGIRMENCI, Nareg; SOLAROGLU, Ihsan; *et al.* Tumor Cell Infiltration into the Brain in Glioblastoma: From Mechanisms to Clinical Perspectives. **Cancers**, v. 14, n. 2, p. 443, 2022.

SHAO, Rong; TAYLOR, Sherry L.; OH, Dennis S.; *et al.* Vascular heterogeneity and targeting: the role of YKL-40 in glioblastoma vascularization. **Oncotarget**, v. 6, n. 38, p. 40507–40518, 2015.

SHOULDERS, Matthew D.; RAINES, Ronald T. Collagen structure and stability. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 929–958, 2009.

SPAMPINATO, Simona Federica; MERLO, Sara; SANO, Yasuteru; *et al.* Astrocytes contribute to A $\beta$ -induced blood-brain barrier damage through activation of endothelial MMP9. **Journal of Neurochemistry**, v. 142, n. 3, p. 464–477, 2017.

STRUELI, Charles H; BAILEY, Nina; BISSEL, Mina J. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. **The Journal of Cell Biology**, v. 115, n. 5, p. 1383–1395, 1991.

SUN, J. et al. TRAF6 correlated to invasion and poor prognosis of glioblastoma via elevating MMP9 expression. **Neuroreport**, v. 30, n. 2, p. 127–133, 2019.

TAHERGORABI, Zoya; KHAZAEI, Majid. A Review on Angiogenesis and Its Assays. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 15, n. 6, p. 1110–1126, 2012.

TANAKA, Tomohito; TERAJ, Yoshito; OHMICH, Masahide. Association of matrix

metalloproteinase-9 and decorin expression with the infiltration of cervical cancer. **Oncology Letters**, v. 17, n. 1, p. 1306–1312, 2019.

TAPON, N.; HALL, A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 1, p. 86–92, 1997.

TESILEANU, C. Mircea S.; DIRVEN, Linda; WIJNENGA, Maarten M. J.; *et al.* Survival of diffuse astrocytic glioma, IDH1/2 wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV: a confirmation of the cIMPACT-NOW criteria. **Neuro-Oncology**, v. 22, n. 4, p. 515–523, 2020.

TESTA, E. *et al.* Dynamic interactions between tumor cells and brain microvascular endothelial cells in glioblastoma. **Cancers**, v. 14, n. 13, p. 3128, 2022.

THORNS, V.; WALTER, G. F.; THORNS, C. Expression of MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10 and MMP-11 in human astrocytic and oligodendroglial gliomas. **Anticancer research**, v. 23, n. 5A, 2003.

TORP, Sverre Helge; SOLHEIM, Ole; SKJULSVIK, Anne Jarstein. The WHO 2021 Classification of Central Nervous System tumours: a practical update on what neurosurgeons need to know—a minireview. **Acta Neurochirurgica**, v. 164, n. 9, p. 2453–2464, 2022.

TRAN, Mai Quynh Thanh; NYGREN, Yvonne; LUNDIN, Christina; *et al.* Evaluation of cell lysis methods for platinum metallomic studies of human malignant cells. **Analytical Biochemistry**, v. 396, n. 1, p. 76–82, 2010.

TSAI, H.-F. *et al.* Type V collagen alpha 1 chain promotes the malignancy of glioblastoma through PPRC1-ESM1 axis activation and extracellular matrix remodeling. **Cell death discovery**, v. 7, n. 1, 2021.

TU, Chifeng; CAI, Qing; YANG, Jian; *et al.* The fabrication and characterization of poly(lactic acid) scaffolds for tissue engineering by improved solid–liquid phase separation. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 14, n. 8, p. 565–573, 2003.

VALKONEN, M. *et al.* Elevated expression of hyaluronan synthase 2 associates with

decreased survival in diffusely infiltrating astrocytomas. **BMC cancer**, v. 18, n. 1, 2018.

VOLLMANN-ZWERENZ, Arabel; LEIDGENS, Verena; FELICIELLO, Giancarlo; *et al.* Tumor Cell Invasion in Glioblastoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, p. 1932, 2020.

WAN, Z. *et al.* Identification of angiogenesis-related genes signature for predicting survival and its regulatory network in glioblastoma. **Cancer medicine**, v. 12, n. 16, p. 17445–17467, 2023.

WANG, Hongxiang; XU, Tao; HUANG, Qilin; *et al.* Immunotherapy for Malignant Glioma: Current Status and Future Directions. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 41, n. 2, p. 123–138, 2020.

WANG, Zeyu; ZHANG, Hao; XU, Shengchao; *et al.* The adaptive transition of glioblastoma stem cells and its implications on treatments. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 124, 2021.

WINOGRAD, E. *et al.* Congress of Neurological Surgeons systematic review and evidence-based guidelines update on the role of targeted therapies and immunotherapies in the management of progressive glioblastoma. **Journal of neuro-oncology**, v. 158, n. 2, p. 265–321, 2022.

WOZNIAK, Michele A.; MODZELEWSKA, Katarzyna; KWONG, Lina; *et al.* Focal adhesion regulation of cell behavior. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1692, n. 2–3, p. 103–119, 2004.

XIE, Y. *et al.* Key molecular alterations in endothelial cells in human glioblastoma uncovered through single-cell RNA sequencing. **JCI insight**, 2021.

XU, Shengchao; TANG, Lu; LI, Xizhe; *et al.* Immunotherapy for glioma: Current management and future application. **Cancer Letters**, v. 476, p. 1–12, 2020.

XU, Yang; YUAN, Fan-En; CHEN, Qian-Xue; *et al.* Molecular mechanisms involved



in angiogenesis and potential target of antiangiogenesis in human glioblastomas. **Glioma**, v. 1, n. 2, p. 35, 2018.

YAMASHITA, K. et al. MR imaging–based analysis of glioblastoma multiforme: Estimation of *IDH1* mutation status. **AJNR. American journal of neuroradiology**, v. 37, n. 1, p. 58–65, 2016.

YANAGISAWA, Hiromi; SCHLUTERMAN, Marie K.; BREKKEN, Rolf A. Fibulin-5, an integrin-binding matricellular protein: its function in development and disease. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 3, n. 3–4, p. 337–347, 2009.

YANG, I. et al. The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *Journal of Clinical Neuroscience*, v. 17, n. 1, p. 6-10, 2010.

YANG, Lihua; JACKSON, Erin; WOERNER, B. Mark; *et al.* Blocking CXCR4-mediated cyclic AMP suppression inhibits brain tumor growth in vivo. **Cancer Research**, v. 67, n. 2, p. 651–658, 2007.

YANG, W.; YEE, A. J. Versican V2 isoform enhances angiogenesis by regulating endothelial cell activities and fibronectin expression. **FEBS letters**, v. 587, n. 2, p. 185–192, 2013.

YANG, X.-J. et al. TGF- $\beta$ 1 enhances tumor-induced angiogenesis via JNK pathway and macrophage infiltration in an improved zebrafish embryo/xenograft glioma model. **International immunopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 191–198, 2013.

YAO, J. et al. Magnetic resonance nano-theranostics for glioblastoma multiforme. **Current pharmaceutical design**, v. 21, n. 36, p. 5256–5266, 2015.

YOUSIF, L. F.; DI RUSSO, J.; SOROKIN, L. Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. **Cell adhesion & migration**, v. 7, n. 1, p. 101–110, 2013.

ZERROUQI, A. et al. P14ARF inhibits human glioblastoma–induced angiogenesis by upregulating the expression of TIMP3. **The journal of clinical investigation**, v. 122,

n. 4, p. 1283–1295, 2012.

ZHANG, L. et al. IDH mutation status is associated with distinct vascular gene expression signatures in lower-grade gliomas. **Neuro-oncology**, v. 20, n. 11, p. 1505–1516, 2018.

ZHANG, Y. et al. FoxM1B transcriptionally regulates vascular endothelial growth factor expression and promotes the angiogenesis and growth of glioma cells. **Cancer research**, v. 68, n. 21, p. 8733–8742, 2008.

ZOLOTOVSKAIA, M. A. et al. Next-generation grade and survival expression biomarkers of human gliomas based on algorithmically reconstructed molecular pathways. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 13, p. 7330, 2022.

ZUDAIRE, Enrique; GAMBARDELLA, Laure; KURCZ, Christopher; *et al.* A computational tool for quantitative analysis of vascular networks. **PloS One**, v. 6, n. 11, p. e27385, 2011.

## Anexos

Vascular Pharmacology 137 (2021) 106829



Contents lists available at ScienceDirect

## Vascular Pharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vph](http://www.elsevier.com/locate/vph)

## Endothelial cells and SARS-CoV-2: An intimate relationship

Lucas Cunha Barbosa <sup>a,b</sup>, Thaynan Lopes Gonçalves <sup>b</sup>, Luanna Prudencio de Araujo <sup>b</sup>,  
Luciane Vieira de Oliveira Rosario <sup>b</sup>, Valéria Pereira Ferrer <sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Graduate Program in Medicine - Pathological Anatomy, Clementino Frago Filho Hospital, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup> Brain's Biomedicine Lab, Paulo Niemeyer State Brain Institute, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>c</sup> Department of Cellular and Molecular Biology, Institute of Biology, Fluminense Federal University, Niterói, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Endothelial cells

SARS-CoV-2

ACE2

Inflammation

Coagulation

## ABSTRACT

Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) is an important player of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) in regulating the conversion of angiotensin II into angiotensin (1-7). While expressed on the surface of human cells, such as lung, heart, kidney, neurons, and endothelial cells (EC), ACE2 is the entry receptor for SARS-CoV-2. Here, we would like to highlight that ACE2 is predominant on the EC membrane. Many of coronavirus disease 2019 (COVID-19) symptoms have been associated with the large recruitment of immune cells, directly affecting EC. Additionally, cytokines, hypoxia, and complement activation can trigger the activation of EC leading to the coagulation cascade. The EC dysfunction plus the inflammation due to SARS-CoV-2 infection may lead to abnormal coagulation, actively participating in thrombo-inflammatory processes resulting in vasculopathy and indicating poor prognosis in patients with COVID-19. Considering the intrinsic relationship between EC and the pathophysiology of SARS-CoV-2, EC-associated therapies such as anticoagulants, fibrinolytic drugs, immunomodulators, and molecular therapies have been proposed. In this review, we will discuss the role of EC in the lung inflammation and edema, in the disseminate coagulation process, ACE2 positive cancer patients, and current and future EC-associated therapies to treat COVID-19.

## 1. Introduction

In December 2019, in the city of Wuhan, China, the first cases of a new respiratory infection were reported [1]. Experts determined that the disease, later termed COVID-19, was caused by a novel coronavirus. Since COVID-19 can cause severe acute respiratory distress syndrome (SARS), the new coronavirus was named severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) [1]. COVID-19 has since led to the deaths of thousands of people and had caused a serious global impact on both health and economies. Further investigation into the evolution of symptoms in patients with COVID-19 is necessary, since patients may be asymptomatic or have mild, moderate or severe symptoms. Patients with mild and moderate symptoms have fever, fatigue, and cough. Patients with viral pneumonia or systemic inflammation are considered to be severe symptoms [2]. Patients with dysfunctional coagulation are considered to be in the critical phase [3]. The SARS-CoV-2 virus can penetrate the host cell by binding to cell surface receptors [4]. As described by Yuki et al (2020) [3], the virus enters the host cell through endocytosis or membrane fusion (penetration), and the viral RNA is then

released into the cells and initiates synthesis of viral proteins.

Proteins, glycoproteins and proteoglycans on the surface of host cells, such as the serine transmembrane protein 2 (TMPRSS2) and Heparan Sulfate Proteoglycans (HSPG), are important for the initial interaction between viruses and cells [5–11]. Other proteins that can act as viral receptors, such as sialic acid receptors [12,13], the matrix metalloproteinase inducer CD147 [14] and ACE2, then mediate viral entry into the host cell [15]. ACE2, which is part of the RAAS [16,17] is currently the most studied receptor in the context of SARS-CoV-2 [17] and is considered to be important for viral infection [18]. There is evidence that the virus interacts with ACE2 through its spike protein, a trimeric transmembrane glycoprotein that is important for determining viral diversity and host tropism [3,15,16,19]. Experimentally, the spike protein of SARS-CoV-2 has been shown to have high affinity for human ACE2 [7,20]. Thus, it is possible to use this affinity to estimate the density of ACE2 in different types of tissue [15] and it has been suggested that the density of ACE2 in each tissue may correlate with the severity of disease in that tissue [21–25]. Additionally, it has been demonstrated that binding of heparin or heparan sulfate can induce

\* Corresponding author at: Department of Cellular and Molecular Biology, Institute of Biology, Fluminense Federal University, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil.  
E-mail address: [valeriaferrer@id.uff.br](mailto:valeriaferrer@id.uff.br) (V.P. Ferrer).

<https://doi.org/10.1016/j.vph.2021.106829>

Received 25 September 2020; Received in revised form 24 November 2020; Accepted 4 January 2021

Available online 8 January 2021

1537-1891/© 2021 Elsevier Inc. This article is made available under the Elsevier license (<http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>).



# Identification of established and novel extracellular matrix components in glioblastoma as targets for angiogenesis and prognosis

Lucas Cunha Barbosa<sup>1,3</sup> · Gabriel Cardoso Machado<sup>1,3</sup> · Manoela Heringer<sup>2</sup> · Valéria Pereira Ferrer<sup>1,3</sup>

Received: 6 March 2024 / Accepted: 10 May 2024

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2024

## Abstract

Glioblastomas (GBM) are aggressive tumors known for their heterogeneity, rapid proliferation, treatment resistance, and extensive vasculature. Angiogenesis, the formation of new vessels, involves endothelial cell (EC) migration and proliferation. Various extracellular matrix (ECM) molecules regulate EC survival, migration, and proliferation. Culturing human brain EC (HBMEC) on GBM-derived ECM revealed a decrease in EC numbers compared to controls. Through *in silico* analysis, we explored ECM gene expression differences between GBM and brain normal glia cells and the impact of GBM microenvironment on EC ECM transcripts. ECM molecules such as collagen alpha chains (*COL4A1*, *COL4A2*,  $p < 0.0001$ ); laminin alpha (*LAMA4*), beta (*LAMB2*), and gamma (*LAMC1*) chains ( $p < 0.0005$ ); neurocan (*NCAN*), brevican (*BCAN*) and versican (*VCAN*) ( $p < 0.0005$ ); hyaluronan synthase (*HAS*) 2 and metalloprotease (*MMP*) 2 ( $p < 0.005$ ); MMP inhibitors (*TIMP*1-4,  $p < 0.0005$ ), transforming growth factor beta-1 (*TGFB1*) and integrin alpha (*ITGA3/5*) ( $p < 0.05$ ) and beta (*ITGB1*,  $p < 0.0005$ ) chains showed increased expression in GBM. Additionally, GBM-influenced EC exhibited elevated expression of *COL5A3*, *COL6A1*, *COL22A1* and *COL27A1* ( $p < 0.01$ ); *LAMA1*, *LAMB1* ( $p < 0.001$ ); fibulins (*FBLN1/2*,  $p < 0.01$ ); *MMP9*, *HAS1*, *ITGA3*, *TGFB1*, and wntless-related integration site 9B (*WNT9B*) ( $p < 0.01$ ) compared to normal EC. Some of these molecules: *COL5A1/3*, *COL6A1*, *COL22/27A1*, *FBLN1/2*, *ITGA3/5*, *ITGB1* and *LAMA1/B1* ( $p < 0.01$ ); *NCAN*, *HAS1*, *MMP2/9*, *TIMP1/2* and *TGFB1* ( $p < 0.05$ ) correlated with GBM patient survival. In conclusion, this study identified both established and novel ECM molecules regulating GBM angiogenesis, suggesting *NCAN* and *COL27A1* are new potential prognostic biomarkers for GBM.

**Keywords** Extracellular matrix · Glioblastoma · Endothelial cells · Biomarkers · Prognosis

## Introduction

Adult diffuse gliomas are brain tumors that originate from glial cells. These tumors are currently categorized into three subtypes: (1) astrocytoma with mutations in the isocitrate dehydrogenase (IDH) gene; (2) oligodendroglioma with IDH mutations and chromosome 1p/19q-codeletion; (3) GBM, which is the most aggressive type of glioma, IDH wild-type followed by at least one of these characteristics: amplification of the *EGFR* gene, mutation in the *TERT* promoter, and/or the concurrent gain of chromosome 7 and loss of chromosome 10 (+7/-10), necrosis and microvascular proliferation [1, 2]. The median survival time after GBM diagnosis is still approximately 15 months, and the 5-year overall survival (OS) rate is only 6.8% [3].

✉ Valéria Pereira Ferrer  
valeriaferrer@id.uff.br

<sup>1</sup> Graduation Program of Pathological Anatomy, Faculty of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup> Brain's Biomedicine Lab, Paulo Niemeyer State Brain Institute, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>3</sup> Laboratory of Cellular and Molecular Biology of Tumors, Department of Cellular and Molecular Biology, Institute of Biology, Fluminense Federal University, Niterói, Brazil