



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
FACULDADE DE MEDICINA  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO FRAGA FILHO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANATOMIA PATOLÓGICA

**ROSENILDE CARVALHO DE HOLANDA AFONSO**

**CARACTERIZAÇÃO DE  
CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS EM  
GLIOBLASTOMA HUMANO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA À UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PRÉ-REQUISITO  
PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
MESTRE EM CIÊNCIAS (ANATOMIA PATOLÓGICA)

Rio de Janeiro  
2011

**ROSENILDE CARVALHO DE HOLANDA AFONSO**

E-mail: rose@icb.ufrj.br

**CARACTERIZAÇÃO DE  
CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS EM  
GLIOBLASTOMA HUMANO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina - Secretaria Adjunta de Pós-Graduação - Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências (Anatomia Patológica).

**Orientador: Prof. Vivaldo Moura Neto**

E-mail: vivaldo@icb.ufrj.br

Dezembro  
2011

Holanda-Afonso, Rosenilde Carvalho de  
Caracterização de células-tronco tumorais em glioblastoma humano /  
Rosenilde Carvalho de Holanda Afonso. -- Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade  
de Medicina, 2011.  
*xi, 113 f. : il. ; 31 cm.*

Orientador: Vivaldo Moura Neto  
Dissertação (Mestrado) – UFRJ / Faculdade de Medicina - Programa de  
Pós-Graduação em Anatomia Patológica, 2011.

Referências bibliográficas: f. 76-88

1. Neoplasias Encefálicas. 2. Glioblastoma. 3. Células-tronco. 4.  
Células-tronco tumorais. 5. Auto-renovação. 6. Diferenciação. Tese I.  
Moura Neto, Vivaldo. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade  
de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica. III.  
Caracterização de células-tronco tumorais em glioblastoma humano.

**ROSENILDE CARVALHO DE HOLANDA AFONSO**

**CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO  
TUMORAIS EM GLIOBLASTOMA HUMANO**

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro  
visando obtenção do título de Mestre em Ciências (Anatomia Patológica).

Aprovada por:

---

Dr. Vivaldo Moura Neto  
Orientador

Prof. Titular, Programa de Biologia Celular e do Desenvolvimento, ICB,UFRJ

---

Dr. José Garcia Ribeiro Abreu Junior

Prof. Associado II, Programa de Biologia Celular e do Desenvolvimento, UFRJ

---

Dra. Nathalie Henriques Silva Canedo

Profa. Adjunto do Departamento de Patologia,UFRJ

---

Dr. José Carlos Morais

Prof. Titular do Departamento de Patologia,UFRJ

---

Suplente

Dr. Fabio de Almeida Mendes

Prof. Adjunto Programa de Biologia Celular e do Desenvolvimento, UFRJ

---

Suplente

Dra. Tullia Cuzzi Teichner

Profa. Adjunto do Departamento de Patologia,UFRJ

---

Revisora

Dra. Leila Maria Cardão Chimelli

Professora Titular do Departamento de Patologia,UFRJ

---

Revisora

Dra. Nathalie Henriques Silva Canedo

Professora Adjunto do Departamento de Patologia,UFRJ

RIO DE JANEIRO

Dezembro

2011

Este trabalho foi realizado sob a orientação do Professor Vivaldo Moura Neto, no Laboratório de Morfogênese Celular - Instituto de Ciências Biomédicas – UFRJ em atendimento ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - Faculdade de Medicina – Centro de Ciências da Saúde-UFRJ. Contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Neurociência Translacional (INNT), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), e Programa dos Núcleos de Excelência (PRONEX), CAPES, Fundação Ary Frauzino-Brazil.

Ao meu filho, amor da minha vida.

"O essencial faz a vida valer à pena.  
E para mim, basta o essencial!"

MÁRIO DE ANDRADE

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meu caminho...

Ao Professor Vivaldo Moura Neto, pela orientação e incentivo na execução desta Dissertação. Para mim, você sempre representou um grande Mestre na arte da ciência.

À Professora Jane Cristina de Oliveira Faria, pela colaboração, amizade, apoio e incentivo para este estudo. Por ser um exemplo de **ser humano** e profissional, baseado nela ainda podemos ter fé no mundo! Povo ainda existe gente boa, acreditem!.

Aos coordenadores da Pós-graduação em Anatomia Patológica, Prof. José Carlos Morais, Profa. Vera Lucia Pannain, Profa. Adriana Bottino, obrigada pelo apoio e orientações.

À Profa. Conceição Zacharias pelos ensinamentos nas aulas de Anatomia Patológica e dicas profissionais. Valeu pelo incentivo!!

À Profa. Nathalie Canedo, pelas contribuições nas aulas de Anatomia Patológica.

À toda equipe do Laboratório de Morfogênese Celular: Jane Faria, Luciana Romão, Sheila Martins, Anna Fonseca, Bruno Pontes, Suzana Kahn, Gustavo Dubois, Tércia Rodrigues, Camila Carballo, Thiago Coelho, Loraine Campanati, Milena Furtado, Ana Carina, Flavia Lima, Celina Garcia, Rackele Amaral, Morgana Sobrinho, Marcus Aguiar, Marcelo César, Denise Lobo, Juliana Moreira, Helena Borges, Rossana Solletti, Deborah Biasoli, Nathassya Accyioly, Dyana Galaxe, Nathan Viana, Flavia Tatiana, Roberto Fraga(Beto), Fábio Silva a Dona Luiza (amigona) e aos agregados que vão e vêm neste Laboratório, deixando sempre sua contribuição técnica e/ou científica. Obrigada pela agradável convivência, pela diversão, pelo aprendizado, ensinamentos e correções sempre oportunas, aprendi e continuarei aprendendo muito com todos. Este trabalho representa um pouco de cada um de vocês!

À Diana Matias, portuguesinha vinda diretamente da terra de Camões e, despertou a inspiração do chefe para o tema desta Dissertação.

À Tônia (Antônia), pela amizade, carinho e companheirismo. Durante alguns anos, trilhamos caminhos semelhantes, compartilhamo os mesmos sonhos e ideais agora cada uma, buscando a realização de novos sonhos. Obrigada amiga!

Às amigas Beth e Mair, pela amizade que fomos construindo no decorrer desses anos e por compartilharem comigo momentos importantes da realização deste estudo.

À amiga Alexandra (Alê), pela amizade e ajuda incondicional. Obrigada pela força!

Ao João Batista, pela força, carinho e amizade.

Ao Laboratório de Neuroanatomia Celular (LNC), em especial à Carla Furtado Luciana Nogaroli e Ana Lenice, sempre dispostas a contribuir com informações valiosas. Muito obrigada!

Ao Laboratório de Embriologia dos Vertebrados (LEV).

Ao Laboratório de Neuroplasticidade Celular (NC).

Ao Laboratório Nacional de Células-tronco Embrionárias (LANCE).

À todos do Departamento de Anatomia, por estarem sempre de portas abertas e dispostos a ajudar.

Ao Sr. Severino, que na sua humildade é um exemplo de vida.

Ao Adiel (Didi) e Alan, pela ajuda com os animais. Obrigada!

À Graziella pela amizade, ajuda e assistência consideráveis na obtenção de imagens.

À Tania (Secretária da Pós-Graduação do PCM) obrigada por todo o suporte sempre, pelo sorriso no rosto ao resolver as situações mais inusitadas.

À Nair, que com atenção e presteza me ajudou no início desta jornada. Obrigada Nair! Que Deus te dê muita saúde!

À Lucia Maria, que na falta da Nair estava sempre disposta a nos ajudar.

Ao pessoal da Secretaria Adjunta de Pós-graduação na pessoa de Sonia Catarina e Luis Fernando obrigada pelas informações e ajuda sempre oportuna.

À minha família,

Aos meus pais, Euripedes Antonio de Holanda, (**in memorian**), exemplo de trabalho, de honestidade e sinceridade; e Francisca Carvalho de Holanda, modelo de luta e dedicação. Desde cedo nos fizeram acreditar que é possível realizar nossos sonhos, basta querer.



Aos meus irmãos João, (**in memorian**), tenho certeza que ficarias orgulhoso; Valdo, obrigada pela força; Niris, minha irmã querida, obrigada pelo incentivo, por sua incansável dedicação à família, pelo amor incondicional a todos. Neto, obrigada pelo incentivo e Cris, obrigada pelo carinho, pelas conversas e apoio dispensados em todos os momentos. Obrigada a todos, pela força, é muito gratificante saber que posso contar com vocês.

À família Abrão que abriu a porta de sua casa, me recebendo tão afetuosamente. Família de coração que adotei carinhosamente. Obrigada pela amizade e momentos únicos de alegria vividos em família.

À Carmen Chagas e Nelson Freitas, mais uma família que adotei, aliás, nós nos adotamos, né?... Obrigada por serem pessoas maravilhosas e amigas, nos acolherem sempre com carinho e amor. Vocês são o máximo!!

Ao meu marido Marco Antônio, que sempre me apoiou nos *bons e maus momentos*. Obrigada pela compreensão, incentivo e por me ajudar nos momentos de *stress*, inclusive nos perrengues com a informática.

Ao Bernardo, pela maravilhosa oportunidade de ser mãe. Obrigada por ser meu filho!! Você é D<sup>+</sup>!

Aos sobrinhos, e sobrinhas daqui (RJ), de lá (MA) e de Orlando-FL, obrigada pelos momentos de alegria.

Aos meus antigos amigos e amigas que permanecem comigo mesmo com toda a distância, provocada pela vida. O contato é pouco mas, o carinho é imenso. *A distância não é suficiente para separar amigos.*

Agradeço a todas as pessoas, todos amigos queridos, de perto e de longe, que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho. *Tenho* certeza de que cada pessoa que passa em nossa vida é única. E se nos encontramos... não foi por acaso.

A todos só posso dizer: Muito Obrigada!

"A Água  
Sem cheiro, sem cor e sem gosto é a água; coitada dessa água!  
Gasoso um dos seus estados mais silencioso.  
Mas a sede a água mata e o fogo apaga. Líquido o estado úmido.  
Imagine um córrego no estado sólido!" RJ,06.07.2010  
Bernardo de Holanda Afonso



"Se não houver frutos,  
valeu a beleza das flores;  
se não houver flores,  
valeu a sombra das folhas;  
se não houver folhas,  
valeu a intenção da semente."  
Henfil

# SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	xiii
Lista de Figuras	xv
Lista de Tabelas	xvii
Resumo	xviii
Abstract	xix
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>1.1. Gliomas</b>	<b>06</b>
<b>1.2. Células-tronco</b>	<b>17</b>
<b>1.2.1. Células-tronco tumorais</b>	<b>20</b>
<b>1.2.2. Marcadores de Células-tronco</b>	<b>22</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>2.1. Objetivo geral</b>	<b>28</b>
<b>2.2. Objetivos específicos</b>	<b>28</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
<b>3.1. Cultura de células da linhagem de Glioblastoma Humano</b>	<b>30</b>
<b>3.2. Crescimento de Oncoesferas</b>	<b>31</b>
<b>3.3. Ensaio de Indução da Diferenciação</b>	<b>32</b>
<b>3.4. Ensaio de Auto-Renovação-Clonalidade</b>	<b>32</b>
<b>3.5. Xenotransplantes</b>	<b>32</b>
<b>3.5.1. Condições dos Animais de Laboratório</b>	<b>32</b>
<b>3.5.2. Realização dos Xenotransplantes</b>	<b>33</b>
<b>3.6. Imunocitoquímica</b>	<b>34</b>
<b>3.7. Ensaio Eletroforético e Western blot</b>	<b>36</b>
<b>3.7.1. Extração de Proteínas</b>	<b>36</b>
<b>3.7.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida</b>	<b>36</b>
<b>3.7.3. Transferência de Proteínas</b>	<b>37</b>
<b>3.7.4. Imunodeteção e Visualização de Proteínas</b>	<b>38</b>
<b>3.8. Microscopia Eletrônica</b>	<b>40</b>

<b>3.8.1.</b> Preparo do Material para Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura	40
<b>3.8.1.1.</b> Fixação	40
<b>3.8.1.2.</b> Pós Fixação	40
<b>3.8.1.3.</b> Desidratação	41
<b>3.8.2.</b> Microscopia de Transmissão	41
<b>3.8.2.1.</b> Infiltração de Resina	41
<b>3.8.2.2.</b> Desbaste e Ultramicrotomia	41
<b>3.8.2.3.</b> Cortes Ultra-finos	43
<b>3.8.2.4.</b> Contrastação	44
<b>3.8.3.</b> Microscopia de Varredura	44
<b>3.8.3.1.</b> Secagem	44
<b>3.8.3.2.</b> Evaporação do Ouro	45
<b>4.</b> RESULTADOS	46
<b>5.</b> DISCUSSÃO	64
<b>6.</b> CONCLUSÕES	72
<b>7.</b> PERSPECTIVAS	74
<b>8.</b> BIBLIOGRAFIA	76
<b>9.</b> ANEXOS	89

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BSA</b>	Albumina bovina de soro
<b>CEUAP</b>	Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa
<b>CSC</b>	Célula-tronco do câncer
<b>CT</b>	Células-tronco
<b>CTN</b>	Células-tronco neurais
<b>CTT</b>	Células-tronco tumorais
<b>DAB</b>	Cromógeno diaminobenzidina
<b>DAPI</b>	4,6-diamidino-2-phenylindole
<b>DMEM-F12</b>	Dubelcco's Modified Eagle Medium com suplemento F12
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNT</b>	Tumor neuroepitelial disembrionário
<b>FGF-2</b>	Fator de crescimento de fibroblasto 2
<b>FITC</b>	Fluoresceína
<b>GBM</b>	Glioblastoma
<b>GBM95</b>	Linhagem de glioblastoma humano
<b>GBM95-O</b>	Oncoesfera de GBM95
<b>GBM95-X</b>	GBM95 xenotransplantada
<b>GFAP</b>	Proteína ácida fibrilar glial
<b>HUCFF</b>	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
<b>IgG (H+L)</b>	Imunoglobulina, cadeias pesada e leve
<b>LMA</b>	Leucemia mielóide aguda
<b>LMC</b>	Laboratório de Morfogênese Celular
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sódio

<b>NF</b>	Neurofilamento
<b>NIH</b>	National Institute of Health
<b>O.D.</b>	Densidade óptica
<b>Oct-3/4</b>	Conhecido como <b>POU5F1 POU class 5 homeobox 1</b>
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>ON</b>	Overnight
<b>PBS</b>	Salina tamponada por fosfato
<b>PDGF</b>	Fator de crescimento derivado das plaquetas
<b>PVDF</b>	Fluoreto de polivinilideno
<b>SDS-PAGE</b>	Gel de poli(acrilamida-dodecil sulfato de sódio)
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SNP</b>	Sistema nervoso periférico
<b>SOX</b>	Sulfito oxidase
<b>SSEA4</b>	Antígeno embrionário estágio 4 (thiosulfato sulfurtransferase)
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TGNMs</b>	Tumores Glio-Neuronais Malignos
<b>TR</b>	Molécula base de rodamina
<b>TRA</b>	Keratan Sulfato
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento do epitélio vascular
<b>VEGF-R</b>	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
<b>ZSG</b>	Zona subgranular
<b>ZSV</b>	Zona subventricular

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Células neurais.

**Figura 2:** Classificação dos gliomas baseadas na OMS e em Sainte-Anne.

**Figura 3:** Características dos diferentes tipos de Astrocitomas.

**Figura 4:** Esquema da teoria de dediferenciação celular de Astrocitomas.

**Figura 5:** Divisão Assimétrica de células-tronco

**Figura 6:** Diferenciação e especialização das células-tronco.

**Figura 7:** Modelos para a natureza do crescimento do tumor.

**Figura 8:** Diagrama de Venn mostrando o número de genes regulados por Sox2, Oct4 e Nanog, individualmente e em interação, em células indiferenciadas.

**Figura 9:** Ressonância magnética. Descrição de GBM95.

**Figura 9A:** Hematoxilina eosina. Descrição de GBM95.

**Figura 10:** Aspecto morfológico de células de GBM95.

**Figura 11:** Caracterização de células de GBM95.

**Figura 12:** Células indiferenciadas de GBM95. SOX2, Nestina, CD133 e Oct-3/4

**Figura 13:** Células indiferenciadas de GBM95. Expressão de SSEA4

**Figura 14:** Células indiferenciadas de GBM95. Expressão de TRA 1-60

**Figura 15:** Aspectos morfológicos de células GBM95 após xenotransplante.

**Figura 16:** Oncoesferas GBM95 expressando marcadores de células tronco.

**Figura 17:** Linhagem GBM95 apresenta células com propriedades tronco e potencial de auto-renovação.

**Figura 18:** Caracterização por imunocitoquímica de células derivadas de oncoesferas de GBM95.

**Figura 19.** Células de GBM95 xenotransplantadas em cérebro de camundongos induzem a formação de tumor.

**Figura 19A.** Ambiente Vivo induz um estado indiferenciado de células GBM95.

**Figura 20:** Análise por *Western blot* da expressão da proteína SOX2 em células de GBM95.

**Figura 21:** Análise por *Western blot* da expressão da proteína Oct-3/4 em células de GBM95.

**Figura 22:** Imunocitoquímica de marcadores de células pluripotentes, após xenotransplante destas células.

**Figura 23:** Microscopia eletrônica de oncoesferas de Glioblastoma humano (GBM95).



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Lista de anticorpos primários utilizados para realização de **imunocitoquímica** neste trabalho.

**Tabela 2.** Lista de anticorpos secundários utilizados para revelação, por **imunocitoquímica**, de anticorpos primários.

**Tabela 3.** Lista de anticorpos primários utilizados em **Western blot**.

**Tabela 4.** Lista de anticorpos secundários conjugados à peroxidase utilizados em **Western blot**.

## RESUMO

**HOLANDA-AFONSO**, Rosenilde Carvalho de. **CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS EM GLIOBLASTOMA HUMANO**. Dissertação (Mestrado em Ciências – Anatomia Patológica) – Instituto de Ciências Biomédicas - Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - Faculdade de Medicina - Secretaria Adjunta de Pós-Graduação - Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Em diversos tumores humanos têm sido identificadas subpopulações celulares que por divisão assimétrica dão origem a células com capacidade de auto-renovação e que dão início a tumores. Estas subpopulações são denominadas células-tronco tumorais. Os glioblastomas apresentam subpopulações celulares com estas propriedades. Neste trabalho, utilizamos uma linhagem tumoral estabelecida em nosso laboratório a partir de um glioblastoma humano histologicamente caracterizado, a linhagem GBM95. Estas células exibem um padrão de marcação antigênica indicando a presença de subpopulações de células de origem astrocitária, reconhecidas pelo anticorpo para a proteína citoesquelética específica GFAP, e subpopulações marcadas com o anticorpo para a proteína citoesquelética Nestina, típica de células precursoras. Estas observações nos levaram a crer que a presença de células tipo tronco, localizadas no interior da massa celular total, pudessem ser responsáveis pela manutenção de característica tumoral de uma subpopulação celular que mantém o tumor. Nossos resultados foram obtidos a partir de cultura de células de GBM e delas isolamos uma subpopulação celular capaz de se apresentar como oncosfera e reproduzir a formação de tumor se xenotransplantada em encéfalos de camundongos por estereotaxia. Tais células, foram caracterizadas por imunocitoquímica *in locu* e após transplante, por marcadores de células tronco, como nestina, CD 133, SSEA4, TRA1-60, SOX1, SOX2 e Oct-3/4. Os achados de células-tronco foram caracterizados também por eletroforese seguida de western blotting. Assim, parece possível sugerir a presença de células no interior do glioblastoma humano com propriedades tronco tumorais. Entretanto, ainda não podemos dizer que a propriedade tronco é uma prerrogativa de uma dada subpopulação celular tumoral ou um estado de derivação tumoral das células do tumor sob interferência do parênquima cerebral. Este trabalho abre o interesse para tal investigação.

## ABSTRACT

**HOLANDA-AFONSO**, Rosenilde Carvalho de. **CHARACTERIZATION OF TUMOR STEM CELLS IN HUMAN GLIOBLASTOMA**. Dissertação (Mestrado em Ciências - Anatomia Patológica) – Instituto de Ciências Biomédicas - Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - Faculdade de Medicina - Secretaria Adjunta de Pós-Graduação - Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

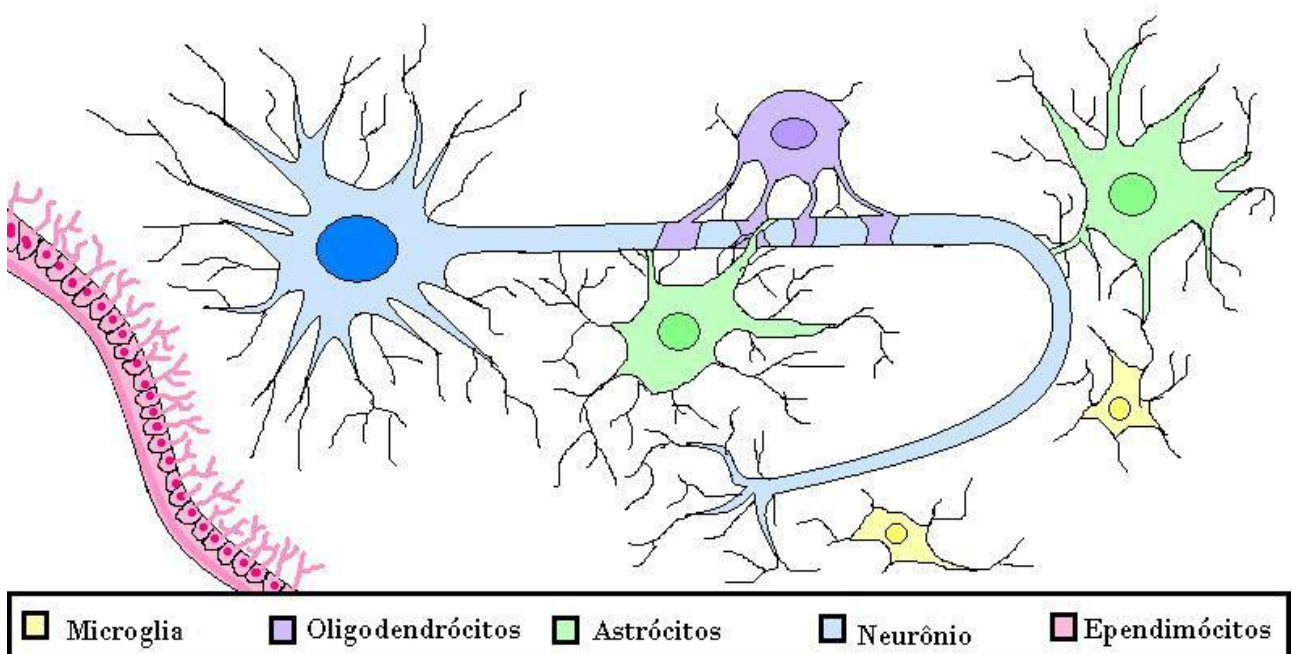
Human tumors have been characterized to have subpopulations of cells that perform asymmetric division that give rise to a cohort that is self-renewable and another that initiate tumors. These subpopulations are tumor stem cells (CTT) and have been identified in glioblastomas. In the present work we studied a tumoral cell line established in our laboratory (GBM95) from a histologically characterized human glioblastoma. When labeled by immunocytochemical markers, a subpopulation of this lineage show astrocytic origin (labeled for GFAP) whereas other subpopulation is labeled with Nestin, typical of precursors cell. This pattern of labeling led us to hypothesize the presence of stem-like cells located within the total cell mass, that could be responsible for maintaining the tumoral characteristics for a tumor cells subpopulation that keeps the tumor. Our results were obtained from culture of GBM cells, of which we isolate a cell subpopulation able to present self-renew as oncosfera and reproduce the formation of tumor xenografts in the brains of mice by stereotaxy. These cells were characterized by immunocytochemistry in locus after transplant, stem cell markers such as nestin, CD 133, SSEA4, TRA1-60, SOX1, SOX2 and Oct-3 / 4. The findings stem cells were also characterized by electrophoresis followed by western blotting. This data suggests the presence of precursor cells inside the human glioblastoma. However we cannot yet conclude if this stem-cell property is an intrinsic characteristic of a certain subpopulation or a temporary status driven by brain parenchyma.

# 1. INTRODUÇÃO

---

## Considerações Gerais

O sistema nervoso central (SNC) é constituído por neurônios e células gliais ou neuróglia (Fig. 1) as quais desempenham importante papel no suporte e atividade neural, nutrição, defesa do tecido nervoso, bem como na formação de circuitos neurais. Ao recobrirem o neurônio, as células gliais (oligodendrócitos) impedem que haja propagação desordenada de impulsos nervosos, induzindo circuitos neurais independentes. As células gliais, como os astrócitos, intervêm no crescimento dos dendritos e axônios e facilitam a formação de sinapses funcionais. Estas células, em mamíferos, por exemplo, são denominadas macroglia e diferem em forma e função. Já a microglia corresponde à população glial e, como descrita por Pío Del Río Ortega (Espanha, 1882-1945), apresenta como uma de suas funções a macrofagia, que significa eliminar detritos celulares, movendo-se, por exemplo, para as regiões do cérebro onde haja lesão celular.



**Figura 1.** Células neurais. Desenho de Vitória Basile Carballo.

**Astrócitos** são células de formato estrelado que apresentam feixes de filamentos intermediários constituídos pela proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Existem astrócitos fibrosos (encontrados na substância branca) associados aos axônios e astrócitos protoplasmáticos (encontrados na substância cinzenta) associados aos corpos celulares de neurônios (Miller and Raff, 1984). Enquanto células do SNC, os astrócitos desempenham várias funções tais como: 1) interação via matriz-extracelular, ou por troca de fatores tróficos, como os fatores de crescimento, com outras células do cérebro; 2) suporte metabólico no cérebro, disponibilizando nutrientes, metabolizando glicose para produção de energia, convertendo neurotransmissor glutamato em aminoácido glutamina e o disponibilizando para neurônios o converterem outra vez no neurotransmissor glutamina e; 3) participando da barreira hemato-encefálica que protege o cérebro (Privat, 2003; Slezak and Pfrieder, 2003; Schousboe *et al.*, 2004; Ullian *et al.*, 2004), embora não seja de fato seu constituinte.

Estas células contribuem para a homeostase cerebral participando também da regulação de diversas atividades neuronais, devido a sua capacidade de influenciar na sua sobrevivência, controlando constituintes do meio extracelular, absorvendo excessos de neurotransmissores, sintetizando moléculas neuroativas que são fundamentais para transmissão sináptica, uma vez que envolvem a fenda e nela depositam seus fatores tróficos e derivados metabólicos. Assim ele é o elemento tripartite da sinapse entre dois neurônios (Allen and Barres, 2009; Stipursky *et al.*, 2011).

**Ependimócitos** ou células ependimárias revestem os ventrículos cerebrais e também o canal central da medula espinhal. Algumas destas

células endoteliais, modificadas são responsáveis pela construção dos plexos coróides, que produzem o líquido cefalorraquidiano (Moura Neto, V., 2008) e selecionar moléculas que permeando a barreira hemato-encefálica entrarão no cérebro, disponíveis às outras células do sistema nervoso. Ependimócitos e mesmo células do plexo coróide podem ser neurogênicas, representando um depósito importante de células tronco no cérebro. (Johansson *et al.*, 1999).

**Oligodendrócitos** são células constituintes da produção da bainha de mielina, membranas ricas em lipídeos, que envolvem os axônios. Estas são essenciais para a comunicação entre neurônios e seus alvos pois servem como um isolante elétrico no SNC. No sistema nervoso periférico (SNP) as células que têm esta função são as células de Schwann (Bradl and Lassmann, 2010), as quais podem numa fase muito precoce da diferenciação mostrar marcação para GFAP como os astrócitos, mas que perdem a expressão desta proteína quando completamente diferenciadas. As células de Schwann também estão presentes nos plexos neurais do pâncreas e aí parecem ter um papel importante na diabetes.

**Microglia**, as menores células da neurógliia, como o nome já indica, são células progenitoras derivadas do sangue. Elas representam o sistema mononuclear fagocitário que atua na defesa do SNC, participando também da inflamação e reparação. Além disso, estas células secretam diversas citocinas reguladoras do processo imunológico, e também estão implicadas no remodelamento sináptico durante o desenvolvimento do SNC, quando são responsáveis pela eliminação de conexões sinápticas inapropriadas através da

fagocitose (Mallat and Chamak, 1994; Lima *et al.*, 2001; Kim and de Vellis, 2005; Soulet and Rivest, 2008).

Durante vários anos, grande parte dos neuroanatomistas acreditou que o SNC fosse estático, incapaz de se regenerar. Apenas uns poucos defendiam a possibilidade da neurogênese na fase adulta. Recentemente, com o avanço tecnológico tornou-se evidente que neurônios nascem continuamente na fase adulta, principalmente, em duas regiões do cérebro: a zona subventricular (ZSV), presente na periferia do terceiro ventrículo e a zona subgranular (ZSG), presente no hipocampo. Em sucessivas pesquisas, nos últimos anos, vários artigos de diferentes equipes vêm evidenciando, cada vez mais, a capacidade de células da substância branca do encéfalo adulto abrigarem uma subpopulação de células progenitoras gliais além de um outro grupo de células, os progenitores multipotentes com capacidade de realizar neurogênese que é o processo de formação de novos neurônios e células da glia no cérebro (Nunes *et al.*, 2003; Dirks, 2010) .

Em mamíferos o córtex cerebral parece ser originado a partir de células-tronco neurais (CTN). Estas células dão origem a neurônios e células gliais durante o desenvolvimento e parecem estar diretamente envolvidas na regeneração do cérebro adulto. Mantêm-se em microambientes (nichos), onde se auto-renovam, ao mesmo tempo que regulam a divisão assimétrica envolvida com o comprometimento de diferenciação celular (Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Garcion *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2008). Suas características (auto-renovação e diferenciação), favorecem mutações, alvos ideais a danos potencialmente cancerígenos, que podem ser transferidos para a descendência



que se auto-renova e para os progenitores. Neste sentido, vale à pena indicar que células de origem glial, principalmente astrócitos, podem transformar-se em gliomas, numa tumorigênese com diferentes graus de malignidade (Hildebrand, 1997).

## 1.1 GLIOMAS

**G**liomas são tumores que se originam no cérebro decorrentes do crescimento anormal de células da glia. Estes tumores histologicamente são heterogêneos, apresentando variados graus de pleomorfismo celular e nuclear, atividade mitótica, proliferação vascular e necrose (Huang *et al.*, 2000). Entre os tumores sólidos do SNC, os gliomas são os que apresentam maiores taxas de invasividade e proliferação, resistência à quimio e radioterapias, e elevados índices de recorrência e morte. A incidência destes tumores varia entre 5-10/100.000 pessoas na população geral, por ano. Manifestam-se em qualquer idade, porém, afetam principalmente adultos entre 45 a 70 anos, sem preferência de sexo e dependendo da parte afetada do cérebro, podem causar aumento da pressão intracraniana o que resulta em dores de cabeça e distúrbios de nervos cranianos. Os gliomas de alto grau apresentam altas taxas de proliferação, crescimento infiltrativo e focos de necrose (VandenBerg, 1992; Legler *et al.*, 1999; Kleihues and Sobin, 2000; Sanai *et al.*, 2005; Louis *et al.*, 2007). Mesclam-se discretamente com o tecido nervoso em volta, com limites imprecisos, sendo difícil delimitá-lo, portanto, é praticamente impossível fazer a remoção completa do tumor o que poderia levar a lesão cerebral. Podem se apresentar como tumores multifocais ou tumores bilaterais que cruzam pelo corpo caloso, com o típico aspecto em

asa de borboleta (Pietsch and Wiestler, 1997) Originam-se da malignização de um astrocitoma difuso já existente ou iniciam-se como tumor de alto grau. Os principais sintomas estão relacionados à hipertensão intracraniana e são: vômitos em jato, edema, cefaléia, distúrbios visuais, podendo também apresentar crises convulsivas. Normalmente, a lesão é uma massa volumosa rodeada por edema e pode ser suficientemente grave para causar hérnia. O tumor tipicamente envolve a substância branca e pode se espalhar pelo corpo caloso, acometendo ambos os hemisférios (DeAngelis, 2001). (Ver Fig.9A e B, de GBM95).

A classificação de tumores do SNC, mais aceita e difundida mundialmente foi elaborada e atualizada recentemente, em sua 4ª. edição, pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Louis *et al.*, 2007; Pytel and Lukas, 2009). A classificação dos gliomas baseia-se na origem histológica e grau de malignidade, caracterizando-os em: astrocitomas, oligodendrogliomas e tumores com características ambíguas, os oligoastrocitomas. Os gliomas são subdivididos em pilocíticos (grau I), astrocitomas difuso (grau II), anaplásicos (grau III) e glioblastomas (grau IV). O glioblastoma (GBM) é o mais comum e agressivo tumor cerebral maligno de linhagem astrocítica. Corresponde a 50% dos tumores gliais e 15% dos tumores intracranianos, e em adultos é caracterizado por alta mortalidade (VandenBerg, 1992; Kleihues *et al.*, 1993; Kanu *et al.*, 2009). Em sua forma primária, este tumor, invade o parênquima cerebral normal, ocorrendo em pacientes mais idosos e sem histórico anterior de glioma. A forma secundária do GBM é observada em pacientes mais jovens, que inicialmente apresentaram um astrocitoma de grau II ou III, de desenvolvimento mais lento (Liberski and Kordek, 1997; Kleihues and Ohgaki,

1999) ou, pode ser diagnosticado como GBM primário ou “de novo” quando não se identifica nenhuma lesão precursora da qual o GBM tenha se desenvolvido (Kleihues and Sobin, 2000; Maher *et al.*, 2001). Existem evidências de que GBM primário e GBM secundário constituem entidades diferentes, as quais evoluem através de vias distintas, afetam pacientes em idades diferentes e, provavelmente diferem na resposta terapêutica (Kleihues and Ohgaki, 1999).

Embora a classificação da OMS para estes tumores seja bem aceita pela comunidade científica, existem algumas discordâncias entre patologistas, principalmente em relação à subjetividade de seus critérios, à predominância do tipo celular e à densidade celular. Em vista disto, a Dra. Catherine Daumas-Duport e seus colaboradores do Hôpital Sainte-Anne, Paris, sugerem outra classificação para os gliomas, denominada inicialmente classificação Sainte-Anne (Daumas-Duport *et al.*, 2000a, b) (**Figura 2**). Ela é baseada principalmente na análise de biópsias associada às técnicas de imagem que evidenciam o tumor, sua localização encefálica, propriedade de contraste (ressonância magnética ou *tomografia computadorizada*) e ainda ao histórico do paciente. Um dos gliomas de classificação mais contraditória, entre aquela da OMS e a do Sainte-Anne, é o oligodendroglioma. Para a Dra. Daumas-Duport, os oligodendrogliomas podem ser classificados de acordo com 2 parâmetros: 1) em função da migração e, 2) em função de boa análise do parênquima. Foi também a equipe Daumas-Duport, que classificou em 1988, o tumor neuroepitelial disemбриoplásico (DNT), tumor que aparece, sobretudo em cérebro de jovens. Mais recentemente, em 2004, uma nova entidade, ainda um glioma, é descrita por ela, baseada na análise da imagem do tumor,

dados do paciente e exame histológico. De acordo com esta classificação, o glioblastoma apresenta células expressando neurofilamento (NF), uma proteína de citoesqueleto típica de neurônios que pode colocalizar com GFAP, sinalizando um possível potencial de células pluripotentes nestes tumores. Eles foram então denominados Tumores Glio-Neuronais Malignos (TGNMs) (Varlet *et al.*, 2004). Os TGNMs abrangem alguns tumores classificados como astrocitoma grau III e grau IV (GBM) na classificação proposta pela OMS e são letais após, aproximadamente, 3 (três) anos.

### **Classificações de gliomas difusos baseadas na OMS/Sainte-Anne.**

<b>OMS</b>	<b>Sainte-Anne</b>
<b>Gliomas</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Tumores astrocitários</b> <b>Astrocitomas graus(I - IV)</b></li> <li>• <b>Tumores Oligodendrogliais</b></li> <li>• <b>Gliomas mistos:</b> <b>Oligoastrocitomas</b></li> </ul>	<b>Gliomas</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Oligodendroglioma A ou B</b></li> <li>• <b>Oligoastrocitoma A ou B</b></li> <li>• <b>Glioblastomas</b></li> </ul>

**Figura 2.** Adaptado de Louis, *et al.*, (2007).

Os tumores sólidos dependem de angiogênese, mecanismo de crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes. Este processo acontece durante o desenvolvimento e na fase adulta, em processos normais de cicatrização de feridas, no ciclo reprodutivo feminino, assim como em processos patológicos no desenvolvimento e progressão de tumores

sólidos (Folkman and Shing, 1992; Wen, 2009; Iwamoto and Fine, 2010; Stupp and Weller, 2010; Alves *et al.*, 2011).

Dentre os tumores sólidos, o GBM é um dos mais vascularizados, porém, os mecanismos de progressão destes tumores ainda permanecem não elucidados. A compreensão dos complexos mecanismos moleculares envolvidos na formação de novos vasos sanguíneos tem sido importante para o desenvolvimento de novas formas de tratamento dessas neoplasias (Kirsch *et al.*, 2000). O tratamento dos tumores cerebrais, especialmente dos gliomas, ainda é um desafio, pois, apesar de todos os tratamentos disponíveis, e do grande avanço tecnológico na área da neurooncologia, os resultados não são satisfatórios (Dominguez-Bendala and Ricordi, 2003).

A receptividade do ambiente parenquimatoso à formação do tumor, vem sendo estudada desde 1889 (Stephen Paget). Células neoplásicas, proliferam gerando o volume tumoral e algumas delas ganham uma via de disseminação, percorrendo caminhos traçados por vasos sanguíneos e que vão formar, em um local distante, uma nova lesão tumoral, sem continuidade entre as duas. Isto implica que estas células encontraram um novo ambiente, propício para a formação de uma nova colônia neoplásica (Clarke and Becker, 2006). A formação tumoral por metástase, é sinal de malignidade. No SNC ainda é possível encontrar tumores não gliais, ou seja, aqueles formados fora deste tecido que ao chegarem ao SNC, constituem focos metastáticos que crescem como massas arredondadas com bordas bem delimitadas (Kleihues and Sobin, 2000). Em geral, tumores que são capazes de fazer metástases são os mais agressivos, mais invasivos e com maiores taxas mitóticas. Tumores que frequentemente fazem metástases para o cérebro são: os tumores de mama,

de pulmão, os melanomas malignos e neoplasias hematopoiéticas (leucemias e linfomas). Os gliomas, diferentemente de outros tumores sólidos, raramente fazem metástases fora do SNC, portanto o grau histopatológico é o determinante do prognóstico (Maher *et al.*, 2001). Baseados na hipótese de Paget 1889, nós acreditamos que, também para o glioma, o microambiente cerebral, definido pelo parênquima facilita a instalação do tumor e sua progressão.

J. Folkman em um artigo fundamental propõe que o crescimento de um tumor depende da angiogênese (1971). Seus estudos sobre a angiogênese contribuíram para o conhecimento do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), molécula chave na formação dos vasos sanguíneos normais e tumorais. VEGF é responsável pelo recrutamento de células endoteliais na formação de novos vasos sanguíneos. Ele e seu receptor, VEGFR, são alvos de ensaios terapêuticos (Wen, 2009; Iwamoto and Fine, 2010; Stupp and Weller, 2010).

Até o momento, o tratamento mais indicado ainda é a ressecção, da maior parte da massa tumoral, seguido de quimioterapia (temozolomida) e radioterapia (Minniti *et al.*, 2010). Entretanto, a natureza infiltrativa difusa das células neoplásicas no cérebro limita a eficácia das terapias focais e, o tratamento por ressecção cirúrgica ou radioterapia torna-se extremamente difícil. Desse modo, a maioria dos pacientes desenvolve recidiva tumoral ou progressão após esta combinação de tratamentos, levando a um **mau prognóstico** para o paciente. A sobrevida média para um paciente com GBM a partir do diagnóstico é de menos de um ano, e apenas cerca de 5% dos

pacientes sobrevivem cinco anos (Kumar *et al.*, 2008; Yang and Aghi, 2009). Enquanto os sintomas neurológicos resultantes do desenvolvimento dos gliomas dependem basicamente do sítio do tumor no SNC e seu tamanho, a duração da história do paciente e a chance de uma sobrevida mais longa e sem recorrências, estão associadas à biologia intrínseca da neoplasia. Indicadores significativos desta neoplasia estão relacionados à características histopatológicas tais como celularidade, atipia nuclear, atividade mitótica, proliferação microvascular e necrose (Kleihues *et al.*, 1995; Kleihues *et al.*, 2002), fazendo com que a doença progrida rapidamente, mesmo com a utilização de terapêutica intensiva como: extensão da ressecção do tumor, uso de radioterapia e quimioterapia (Ammirati *et al.*, 1987; Burger and Green, 1987; Leibel *et al.*, 1994; Lesser and Grossman, 1994; Salmon *et al.*, 1994; Sneed *et al.*, 1995). Apesar dos avanços diagnósticos, terapêuticos e técnicas modernas para decifrar a biologia tumoral, a taxa de sobrevida de pacientes acometidos por gliomas não mudou nas últimas três décadas. Como os GBMs apresentam muitas variações genéticas que afetam a resposta aos diferentes tratamentos, mais pesquisas ainda serão necessárias para desenvolvimento de novos fármacos anticâncer, com novos mecanismos de ação, que possam inibir o rápido crescimento do tumor, pois até então nenhum deles é, em última análise, eficiente (Barnholtz-Sloan *et al.*, 2003; Laws *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2008; Yang and Aghi, 2009). (**Figura 3**).

	Astrocitomas de baixo grau	Astrocitoma anaplásico	Glioblastoma
<b>Sobrevida</b>	5-10 anos	2-3 anos	9-12 meses
<b>Proliferação</b>	+/-	++	+++
<b>Invasividade</b>	++	++	+++
<b>Angiogênese</b>	-	-	+++
<b>Necrose</b>	-	-	+++
<b>Sensibilidade à radioterapia</b>	-	++	-

**Figura 3.** Características dos diferentes tipos de Astrocitomas. Adaptado de Maher *et al.*, (2001)

Além de características histológicas, os GBMs também podem ser caracterizados e classificados de acordo com marcadores moleculares que os diferem quanto a seu grau de malignidade e invasividade (Pilkington, 1994). Por serem tumores muito heterogêneos, existe uma controvérsia nessa classificação mostrando que algumas propriedades tumorais como a angiogênese e a capacidade proliferativa e invasiva podem ser extremamente distintas entre células presentes no interior da massa tumoral e da periferia (Daumas-Duport *et al.*, 2000a). A expressão de algumas proteínas de filamento intermediário como a Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP), a Nestina e a Vimentina, marcadores clássicos de indiferenciação celular, estão relacionadas com o poder de invasividade e malignidade dos glioblastomas, podendo ser utilizadas no futuro como marcadores para identificar e graduar estes tipos tumorais, aplicando um método clínico distinto para cada paciente (Rutka *et al.*, 1999).

Outras proteínas, que não as do citoesqueleto, também estão claramente envolvidas no processo de malignização dos glioblastomas. Dentre elas, destacam-se alguns fatores solúveis que podem ser liberados no meio



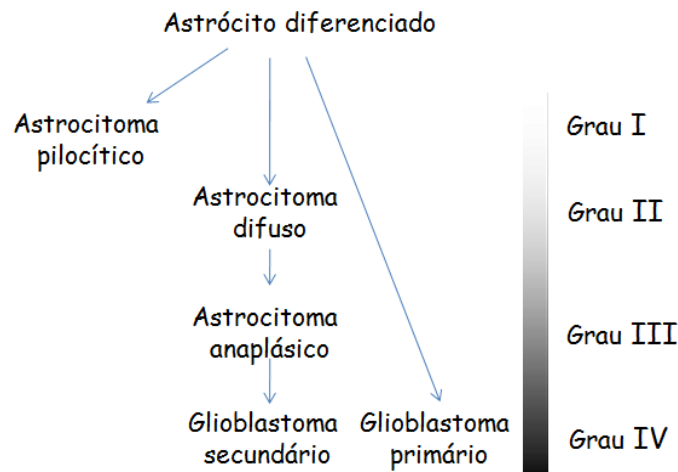
extracelular atuando de forma autócrina/parácrina no processo de malignização, levando à uma ativação exacerbada de algumas vias de transdução de sinal intracelular. Os fatores que são encontrados super-expressos com mais frequência são o Fator de Crescimento de Fibroblasto 2 (FGF2), o Fator Neurotrófico Ciliar (CNTF), o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), o Fator de Crescimento Transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), o Fator Inibitório de Leucemia (LIF) e o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) (di Tomaso *et al.*, 2009; Loilome *et al.*, 2009; Penuelas *et al.*, 2009). As vias intracelulares que estão muito ativadas devido à liberação massiva destes fatores correspondem àquelas responsáveis pela sobrevivência, progressão, e propriedades tumorais: habilidade de se aderir à matriz extracelular (MEC) (Liota *et al.*, 1986; Tysnes *et al.*, 1999).

A ineficácia dos tratamentos, as frequentes progressões ou recidivas tumorais e o mau prognóstico dos pacientes com gliomas malignos continuam preocupando os que estão tentando identificar os fatores que mais afetam a doença (Kumar *et al.*, 2008). Fatores estes que possam melhorar as taxas de resposta e dar maior qualidade de vida. Estes estudos estão sendo estendidos a pacientes recentemente diagnosticados (Stupp and Weller, 2010). O alvo mais utilizado no momento, que em 2009 ocasionou o renascimento da neuro-oncologia (Weller *et al.*, 2010) é a inibição da angiogênese, com uso do medicamento Avastin (Bevacizumab), um anticorpo contra o fator de crescimento endotelial vascular, que demonstrou atividade significativa em glioblastomas recorrentes, produzindo taxas de resposta de 26-40% e prolongando a sobrevida de 6 meses sem progressão para 36-50% (Norden *et al.*, 2008; Wen, 2009; Iwamoto and Fine, 2010)).

A combinação de dois ou mais medicamentos, com propriedades diferentes, e/ou procedimentos usados em associação, atuam melhor sobre diferentes partes do processo da doença, estimulando o organismo a lutar contra o câncer. Por exemplo, a combinação de Temozolomida um agente alquilante, cuja ação básica é intoxicar no organismo qualquer tecido de proliferação rápida, que tenha como características um elevado índice mitótico e ciclo celular curto incluindo as células tumorais, quando administrado durante a radioterapia seguida de temozolomida adjuvante sistêmica, recentemente, demonstrou uma modesta melhora que pode vir a ser significativa na sobrevida global de pacientes recentemente diagnosticados com GBM (Reardon *et al.*, 2006; Dresemann, 2010). E ainda Cilengitide, o inibidor de integrina mais avançado e específico em oncologia, com baixa toxicidade. Este, em ensaios clínicos, vem mostrando que sua adição concomitante e adjuvante à quimioterapia é uma promissora atividade antitumoral em paciente com glioblastoma (Maurer *et al.*, 2009; Stupp and Weller, 2010; Weller *et al.*, 2010).

A origem celular dos glioblastomas tem sido bastante estudada. Ainda não foi possível demonstrar diretamente que tipo de célula dá origem aos diferentes tipos de gliomas humanos. Tanto podem derivar de uma população de células progenitoras do SNC, como de células adultas que sofrem mutações e conseqüentes anormalidades nas vias de sinalização, levando as células a apresentarem um fenótipo indiferenciado (Holland, 2001a). No modelo da dediferenciação, os gliomas parecem originar-se de astrócitos saudáveis, que sob condições críticas, dediferenciam-se em gliomas de baixo grau de malignidade, e vão progredindo até gliomas altamente malignos (Kleihues *et*

*al.*, 1995; Kleihues *et al.*, 2002) (**Figura 4**). A presença de nestina vem sendo utilizada como fator prognóstico de malignidade destes tumores: quanto maior o número de células expressando nestina, maior a agressividade deste tumor (Strojnuk *et al.*, 2007). Porém, a origem celular exata para tumores cerebrais ainda não foi definida (Visvader, 2011).



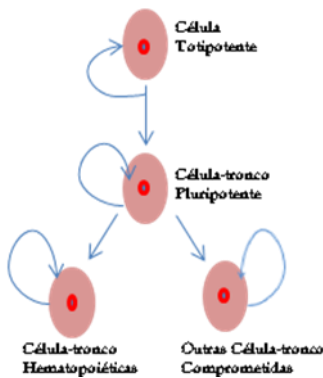
#### **Figura 4. Esquema da teoria de dediferenciação de Astrocitomas**

Progressão maligna de astrocitoma humano (do grau I ao grau IV) segundo classificação da OMS (Kleihues *et al.*, 1995). A gradação dos tons de cinza no retângulo à direita representa a progressão da malignidade dos tumores.

Embora a origem celular dos tumores continue indefinida, desde o século XIX cientistas vêm sinalizando a existência de um pequeno grupo de células com propriedades tronco, que podem ser a origem destes tumores (Cohnheim, 1867; Durante, 1874; Cohnheim, 1875 *apud* (Sell, 2004)).

## 1.2. CÉLULAS-TRONCO

**S**ão células indiferenciadas que possuem capacidade de se dividir dando origem a outras células semelhantes às progenitoras. Estas células apresentam duas propriedades que as diferenciam das demais. Primeiro, não estão comprometidas com nenhuma função especializada, e podem se renovar através da divisão celular. Além disso, sob determinadas condições fisiológicas ou experimentais são capazes de se diferenciar em qualquer tipo celular, com funções específicas. Outra particularidade das células-tronco é a auto-renovação, ou seja, podem gerar cópias idênticas delas mesmas por divisão simétrica. A biologia celular vem divulgando, nos últimos tempos uma nova definição para um tipo de mitose chamada **assimétrica**, o que significa que uma célula com características especiais, tronco, ao se dividir, origina uma célula-tronco semelhante à original e outra progenitora com capacidade limitada de se diferenciar (Guia de células-tronco, 2008) (**Figura 5**). E, é por esta razão que na fase adulta, o organismo reserva nichos de células com características pluripotentes, ou seja, de células-tronco. Estas células-tronco se originam durante o desenvolvimento do organismo com potencial para gerar qualquer outra célula. Além disso, participam da manutenção dos tecidos e da regeneração após injúria (Sowaimel & Parry, 2008(Berger et al., 2004).

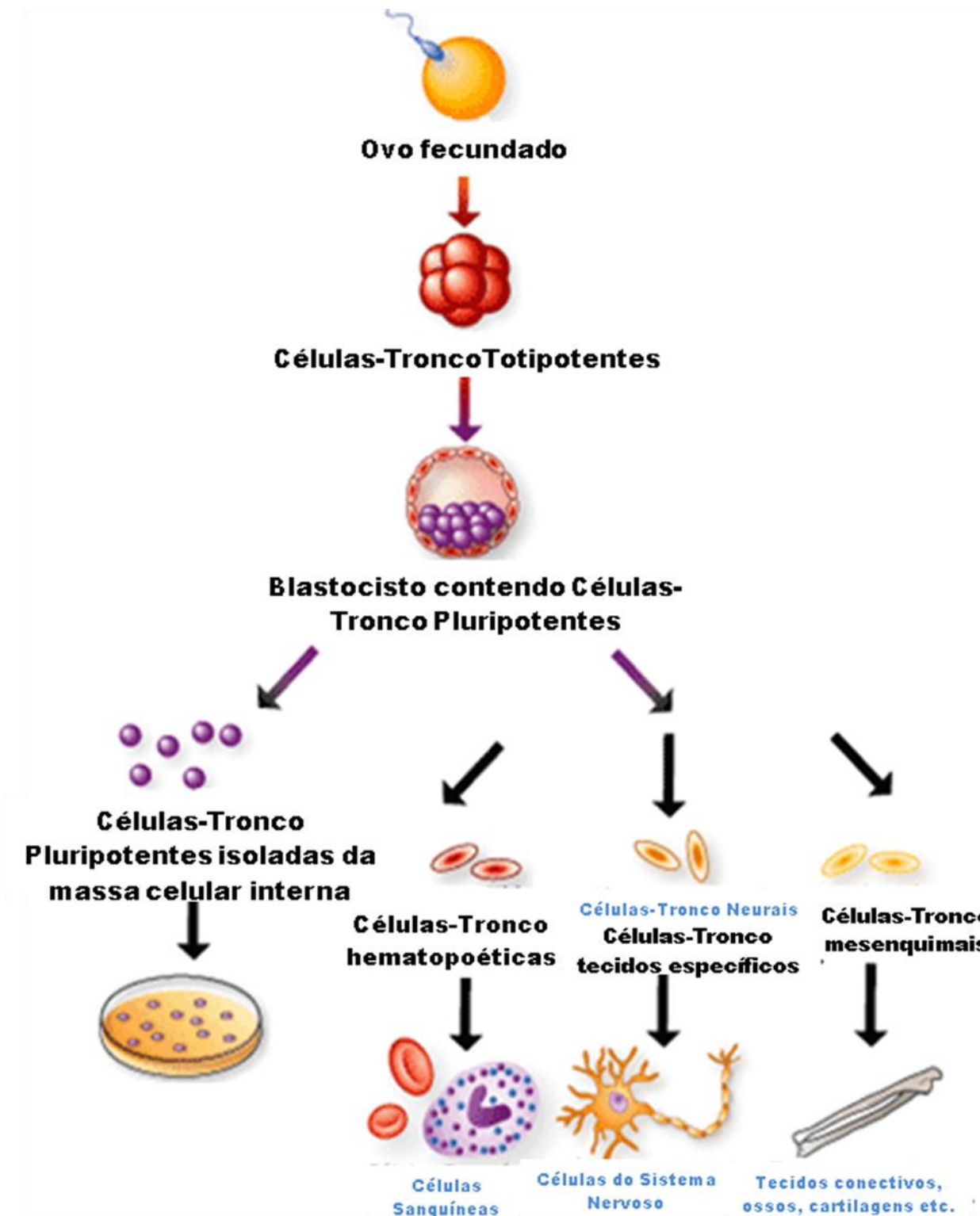


**Figura 5. Divisão Assimétrica de células-tronco.**

Células **totipotentes** (centro superior) como um ovo recém-fecundado, têm o maior potencial biológico. Células-tronco **pluripotentes** (Centro), tais como células-tronco embrionárias, têm excelente potencial, mas um pouco menor. Células-tronco **multipotentes** (inferior esquerdo), como as células-tronco hematopoiéticas, são capazes de se diferenciar em vários tipos de células relacionadas. Células-tronco **Unipotentes** (inferior direito) normalmente só podem se diferenciar em um tipo de tecido. Reproduzido do Guia de células-tronco, 2008.

São vários os tipos de células-tronco: **Totipotentes** ou embrionárias (**Figura 6**) - capazes de formar o indivíduo por inteiro; **Pluripotentes** - podem produzir todos os tipos celulares do organismo; **Multipotentes** - podem originar células de várias linhagens; **Oligopotentes** - produzem células de uma única linhagem; **Unipotentes** - só podem dar origem a um único tipo celular maduro, do tecido ao qual pertence (Sowaimel & Parry, 2008; (Fernandes *et al.*, 2010).

Tanto as células totipotentes quanto as pluripotentes são células-tronco, capazes de produzir o maior número de tipos celulares de um organismo. Na fase embrionária, serão células-tronco embrionárias (pluripotentes), uma célula pode contribuir para formação de todas as células e tecidos do organismo. Aquelas que permanecem pluripotentes até a fase adulta são as células-tronco adultas (multipotentes), que podem vir a originar qualquer tipo do celular organismo. O principal papel das células-tronco adultas dentro de um organismo vivo é manter e reparar o tecido no qual elas se encontram.



**Figura 6. Origem, isolamento e especialização das células-tronco**  
(Adaptado de Chaudry, 2004).

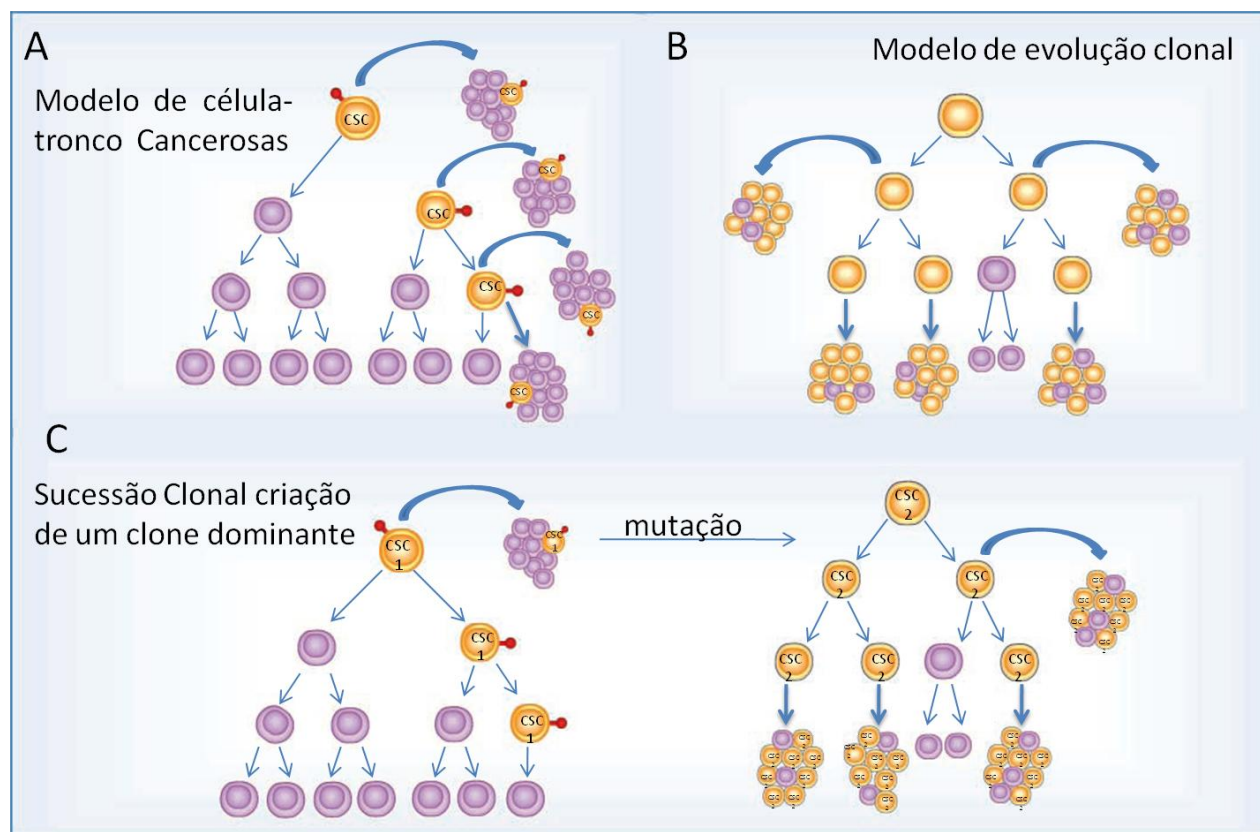
### 1.2.1. CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS

**R**ecentemente, as investigações giram em torno dos tumores cerebrais, que ao nível celular, normalmente são muito heterogêneos, parecendo ter subpopulações de células que funcionalmente se comportam como células-tronco (CT) (Dirks, 2010). A “teoria de células-tronco tumorais” (CTT) sugere que uma terapia eficaz contra a auto-renovação das células tumorais, que é o ápice de uma hierarquia de linhagem, poderia erradicar a capacidade de crescimento prolongado do tumor (Korkaya and Wicha, 2007). As recentes análises sobre as CTTs têm revolucionado os conceitos acerca da evolução tumoral, fornecendo uma nova visão biológica em relação ao tumor cerebral, sua origem celular e seus mecanismos de crescimento, também favorecendo novas abordagens para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes. Porém, o estudo das CTTs cerebrais ainda é muito recente e há muito a ser aprendido antes que essas novas idéias sejam traduzidas em novas terapias (Dirks, 2010).

A presença de células-tronco no encéfalo, associadas à existência de variantes de glioma, como oligoastrocitomas e gliosarcomas, que contêm tipos celulares distintos dentro do mesmo tumor, sugerem que as células-tronco neurais possam ser o alvo inicial da gliomagênese. Outra hipótese é a transformação de células maduras, induzidas a se diferenciar em resposta a mutações genéticas (Holland, 2001b; Merlo, 2003; Shih and Holland, 2004). Uma hipótese muito defendida recentemente é a de que tumores em geral e gliomas em especial podem originar novas células-tronco (auto-renovação) e células pré-cancerosas (Berger *et al.*, 2004).

No modelo de células-tronco tumorais (**Figura 7A**), tanto o crescimento do tumor como o desenvolvimento normal do tecido, dependem exclusivamente de raras células dentro do tumor (Wang and Dick, 2005; Clarke and Fuller, 2006). Nesse modelo, a heterogeneidade tumoral é atribuída inteiramente a pouca diferenciação de células-tronco cancerosas. Em alternativa, vendo a **Figura 7B**, que pode ser chamado "modelo de evolução clonal" (Campbell and Polyak, 2007), a maioria das células tumorais são capazes de se auto-renovar e podem contribuir substancialmente para a manutenção do tumor. A heterogeneidade do tumor neste modelo é atribuída não só a diferenciação, mas também a variação intraclonal genética e epigenética mais influências do microambiente. Nesta visão, diferenças no fenótipo dentro de um tumor podem refletir subclones em diferentes fases de transformação neoplásica, cada um tendo um crescimento e uma vantagem de sobrevivência sobre as células normais, embora em graus diferentes. Assim, enquanto o modelo de células-tronco cancerosas é altamente hierarquizado, com um tipo de célula única no ápice da auto-renovação, o modelo de evolução clonal atribui grande parte da variação subclonal e intratumoral a diferenças no perfil de mutação, e todos, exceto as células terminantemente diferenciadas, podem ter alguma capacidade de auto-renovação (Adams *et al.*, 2008).





**Figura 7. Modelos para a natureza do crescimento tumoral.**

**A** - No modelo de célula-tronco do câncer (CSC), apenas as CSC (ouro), que podem ser isoladas prospectivamente por meio de marcadores de superfície (vermelho), possuem atividade de auto-renovação e, portanto, representam o único alvo relevante para a terapia. **B** - No modelo de evolução clonal, uma proporção substancial de células tumorais (ouro) podem sustentar o seu crescimento e, portanto, a terapia deve tentar eliminar todas as células. **C** - Em um modelo misto, enquanto o tumor é originalmente impulsionado principalmente por células de um fenótipo raro (CSC1), uma mutação de reforço (auto-renovação) deriva um subclone de células diferenciadas dominante impulsionado por um fenótipo diferente (CSC2). Em alguns tumores humanos (por exemplo, leucemia mieloide aguda (LMA), não CSC1 mas CSC2 podem ser capazes de enxertar camundongos. (Reproduzido de (Adams and Strasser, 2008).

### 1.2.2. MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO

**C**élulas-tronco funcionam como um sistema biológico de manutenção do organismo, estando presentes desde o embrião até a morte do indivíduo, se diferenciando em vários tipos de células especializadas. A característica mais importante de células-tronco é a capacidade de auto-renovação, ou seja, a capacidade de viver e se dividir indefinidamente. Na fase adulta, o

organismo mantém tecidos com nichos de células-tronco saudáveis para manutenção da fisiologia normal do organismo. E como entender a regulação da pluripotência e a capacidade de auto-renovação de células-tronco?

Já foi descrito que este fenômeno é realizado por genes que geralmente são reguladores da transcrição que ativam ou reprimem padrões de expressão gênica, gerando a mudança fenotípica vista no processo de diferenciação das células-tronco (Pesce and Scholer, 2001). Nesta regulação estão envolvidas proteínas de filamento intermediário\*, proteínas de superfície celular e fatores de transcrição que vêm sendo identificados, dentre eles destacamos alguns considerados importantes para este trabalho, tais como: nestina, CD 133, SSEA4, TRA 1-60, SOX1, SOX2 e Oct-3/4.

**Nestina** é uma proteína de filamento intermediário, detectada em uma grande variedade de células que se dividem durante estágios precoces do desenvolvimento no SNC (neuroepitélio, progenitor neural) (Hockfield and McKay, 1985). **Nestina** também é expressa em muitos tipos celulares com características de células progenitoras, porém, sua expressão é geralmente transitória e não persiste na vida adulta. Contudo, pode vir a ser expressa novamente no SNC em situações patológicas ou de injúria (*Michalczyk and Ziman, 2005*). Já em astrócitos imaturos e glia radial, nestina e vimentina são as principais proteínas de FI, porém, com o desenvolvimento, elas vão sendo suprimidas na maioria dos astrócitos e substituídas pelo GFAP nas células maduras, que é considerado um marcador da diferenciação astrocitária (Landry *et al.*, 1990). Recentemente, nestina tem sido reconhecida como um marcador para células endoteliais angiogênicas (Teranishi *et al.*, 2007).

\***Filamentos intermediários (FI)** são constituídos por proteínas fibrosas extremamente resistentes que conferem estabilidade mecânica às células (Fuchs and Cleveland, 1998).

**AC133**, também conhecida como **CD133** ou **Prominin1 (PROM1)** é uma glicoproteína transmembranar presente em mamíferos (Yin *et al.*, 1997; Corbeil *et al.*, 2001). Sua função, até então, é desconhecida, porém, células expressando CD133 representam uma fração do total de células que compõem um tumor cerebral. E ainda, CD133 também é expressa em células-tronco neurais normais de cérebro humano em desenvolvimento, sugerindo que a célula de origem de um tumor no cérebro pode ser uma célula-tronco normal neural (Singh *et al.*, 2003). Estudos recentes mostram que a expressão de CD133 é característica de subpopulação de células-tronco em tumores glioneuronais malignos (TGNMs). Embora, as CD133+ e CD133- possam formar esferas flutuantes e desenvolver recidivas tumorais após ressecção do tumor cerebral, elas possuem propriedades distintas e as CD133-, por exemplo, parecem ser resistentes a quimioterapias (Patru *et al.*, 2010).

**SSEA4**, antígeno embrionário estágio 4 é membro da família SSEAs e é considerado específico de células embrionárias. Está ligado à pluripotencialidade sendo também expresso em células de carcinomas humanos, células germinativas humanas, células mesenquimais e células precoces do neuroepitélio (Kannagi *et al.*, 1983; Draper *et al.*, 2002). Vários outros membros desta família, como SSEA1/CD15, foram descritos em células-tronco neurais (Capela and Temple, 2002). Os antígenos de superfície celular mais comumente usados para identificar as células-tronco embrionárias são os glicolipídeos SSEA3 e SSEA4 e antígenos de keratan sulfato **Tra-1-60** e Tra-1-81 (Adewumi *et al.*, 2007).

**TRA 1-60** e SSEA4 são moléculas de superfície conhecidas como marcadores de células estaminais embrionárias humanas e, desempenham um

papel importante na regulação do desenvolvimento de células-tronco embrionárias humanas (Barraud *et al.*, 2007).

**Factores de transcrição** são proteínas intracelulares reguladoras que se ligam ao DNA, facilitando a ligação entre a enzima RNA-polimerase e o DNA, permitindo assim a transcrição e a futura transdução de sinais intracelulares. No entanto, muitos dos alvos coadjuvantes desses fatores de transcrição não estão bem caracterizados. Além disso, não se sabe se fatores adicionais em conjunto com células-tronco estão envolvidos no estabelecimento e manutenção do estado de células-tronco (Wong *et al.*, 2011).

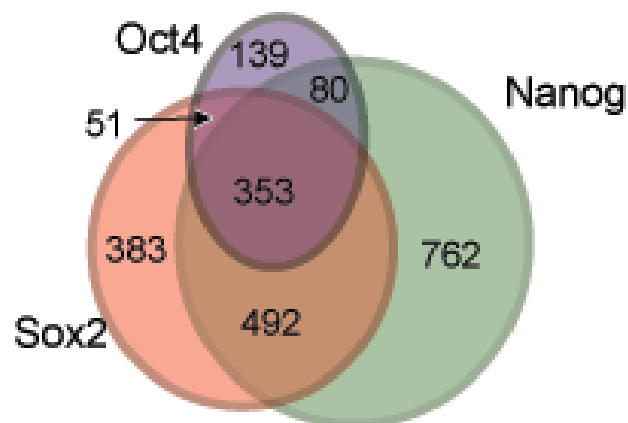
A família SOX tem 11 genes descritos e **SOX1** tem sua expressão restrita ao neuroectoderma do embrião. SOX1 está envolvido no sistema nervoso central no início do desenvolvimento (Nitta *et al.*, 2006; Guth and Wegner, 2008).

**SOX2** é fator de transcrição mais importante da família SOX. É encontrado em células-tronco embrionárias e em células neurais em estágios iniciais do desenvolvimento (Tomioka *et al.*, 2002). A produção de células-tronco com pluripotência induzida por fatores de transcrição, SOX2 mostrou-se essencial ao lado de Oct-3/4. Embora estudos sustentem a atuação conjunta de SOX2 e Oct-3/4, o modo como isto ocorre ainda não é conhecido. Quando a expressão do gene SOX2 diminui significativamente as células se diferenciam (Takahashi and Yamanaka, 2006).

**Oct-3/4** é um fator de transcrição, restrito à células totipotentes e pluripotentes (Scholer *et al.*, 1990). A expressão contínua de Oct-3/4 em células-tronco embrionárias (CTE) mantêm bons níveis para a manutenção da

pluripotência. Quando existe um aumento em até 50% da função deste fator de transcrição haverá diferenciação no endoderma e no mesoderma primitivo, enquanto a diminuição induz a formação de trofoectoderma concomitante com a perda da pluripotência (Niwa *et al.*, 2000). Esse gene não é apenas restrito a células-tronco embrionárias e pluripotentes mas está também implicado com a tumorigênese (Hochedlinger *et al.*, 2005).

Regiões promotoras vinculadas em 90% a Oct4 e Sox2 também são ocupadas por Nanog. A literatura sugere que Oct4, Sox2 e Nanog funcionam em conjunto para regular uma proporção significativa de seus genes-alvo em células-tronco embrionárias humanas (Bydlowski *et al.*, 2009).



**Figura 8.** Diagrama de Venn mostrando o número de genes regulados por Sox2, Oct4 e Nanog, individualmente e em interação, em células indiferenciadas. Baseado em [http://jura.wi.mit.edu/young\\_public/hESregulation/Target\\_genes.html](http://jura.wi.mit.edu/young_public/hESregulation/Target_genes.html)

## **2. OBJETIVOS**

---

## 2.1. OBJETIVO GERAL

**D**emonstrar a eventual presença de células-tronco na massa tumoral da linhagem de GBM95, um Glioblastoma humano.

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. **C**aracterizar por imunocitoquímica a presença de marcadores típicos de células-tronco como: nestina, CD 133, SSEA4, TRA1-60, SOX1, SOX2 e Oct-3/4, em subpopulação celular de GBM95 mantido em cultivo.
2. **V**erificar as propriedades “tronco” destas células-tronco tumorais, analisando a propriedade de gerar oncoesferas e ainda tumores quando xenotransplantados;
3. **A**valiar o efeito do ambiente cerebral na diferenciação das células-tronco de GBM através da análise da expressão dos marcadores acima citados no tumor original, no tumor xenotransplantado e nas culturas de células provenientes do GBM original e após transplante, comparando esses resultados;
4. **A**valiar o percentual de células com propriedades tronco na massa celular de GBM95.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

---



### 3.1. CULTURAS DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO

O Laboratório de Morfogênese Celular (LMC) tem estabelecido culturas a partir de Glioblastomas humanos, ressecados pela equipe de neurocirurgia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF). O Glioblastoma humano (GBM95) um destes tumores foi bem caracterizado como glioblastoma pelo Serviço de Anatomia Patológica do HUCFF/UFRJ. Ele foi estabelecido em cultura de células pelo LMC, com o devido consentimento do Paciente. Os procedimentos experimentais usados nesta dissertação de Mestrado estão de acordo com o Comitê de Ética do Ministério da Saúde em Pesquisa com o registro CONEP n.º 2340, de 2001. A linhagem de glioblastoma GBM95 utilizada foi estabelecida anteriormente durante a tese de mestrado de Claudia Lins (1995) e caracterizada na tese de doutorado de Jane Cristina Faria Amaral (2005).

Esta linhagem foi utilizada a partir de estoque de sua 10ª passagem congelado em nitrogênio líquido. O repique desta linhagem e seu novo estoque para estudo permitiu que utilizássemos células em cultura até a 20ª passagem. Os procedimentos de cultura foram os mesmos indicados na tese de doutorado citada acima e no artigo (Faria *et al.*, 2006).

Estas células ao serem descongeladas foram rapidamente lavadas em meio Dubelcco's Modified Eagle Medium com suplemento F12 (DMEM-F12-Gibco), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB-Gibco) para retirarmos o meio de congelamento (SFB/10% de Dimetilsulfóxido (DMSO-Sigma). Estas células foram então centrifugadas a 1500rpm por 5min e ressuspensas em

meio de DMEM-F12, sendo em seguida plaqueadas em garrafas de cultura de 25cm<sup>2</sup> ou placa de 24 poços com lamínulas de vidro, previamente revestidas com poli-L-lisina (Sigma) e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A cada passagem, por tripsinização, as células foram armazenadas em N<sub>2</sub> líquido em meio de congelamento e também mantidas em cultura, para posterior utilização. O meio era trocado a cada três dias até que a cultura estivesse perto da confluência e as células eram processadas para caracterização por imunocitoquímica. Em seguida, as células mantidas em placas de 24 poços foram fixadas com Paraformaldeído 4%.

### 3.2. CRESCIMENTO DE ONCOESFERAS

Células dissociadas foram semeadas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> e cultivadas em meio DMEM F-12. Após confluência, as células foram lavadas com PBS por 5 vezes e mantidas em meio NS34, contendo os suplementos: N2, o qual incita o crescimento e expressão de neurônios pós-mitóticos e células tumorais de fenótipo neuronal; G5, estimula a proliferação e diferenciação das células-tronco neuronais em neurônios e astrócitos e B27, usado para crescimento e viabilidade, a longo prazo, dos neurônios (todos da Invitrogen). Depois de 2 a 15 dias em cultura, a partir das células aderentes, células começaram a se soltar formando aglomerados. Estes foram transferidas para outras garrafas em meio NS34, onde inicialmente voltam a aderir e em poucos dias desaderem novamente, mantendo-se em oncoesferas. Após centrifugação, 2/3 deste meio era trocado semanalmente.

### 3.3. ENSAIO DE INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO

Oncoesferas parcialmente dissociadas foram plaqueadas em meio DMEM-F12 sem adição de SFB ou com 10%, em placa de 24 poços. Em seguida foram mantidas por 24, 48 ou 72 horas na intenção de observarmos a diferenciação em células astrogliais.

Fizemos o mesmo utilizando o meio Neurobasal suplementado com B27 para estimular a diferenciação neuronal. E, usando meio DMEM-F12 suplementado com N2 1x, FGFb 5ng/ml, PDGF AA 10ng/ml para favorecer a diferenciação de oligodendrócitos.

### 3.4. ENSAIO DE AUTO-RENOVAÇÃO-CLONALIDADE

Oncoesferas foram dissociadas e plaqueadas em placa de 96 poços, na densidade de 1 a 5 células por poço, utilizando 100 µl de meio NS34, o qual mantém as células em suspensão. Uma vez por semana adicionávamos 10 µl de meio. Depois de 30/60 dias, algumas destas células, menos de 1%, começaram a se dividir formando oncoesferas primárias, ou seja, se auto-renovando.

### 3.5. XENOTRANSPLANTES

#### 3.5.1 Condições dos Animais de Laboratório

Os animais foram mantidos de acordo com as normas e diretrizes do **National Institute of Health** (NIH) e autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa (CEUAP) (Protocolo DAHEICB 015), em ambiente adequadamente climatizado (Biotério com temperatura controlada e mantida

por sistema de refrigeração automática entre 25° e 30°C e ciclos de 12h de luminosidade por dia).

### 3.5.2. Realização dos Xenotransplantes

Os xenotransplantes foram realizados em colaboração com os alunos de Iniciação Científica Marcus Aguiar e Marcelo César, e com a aluna de Mestrado Celina Garcia. Utilizando-se um aparelho para estereotáxia, as células de GBM95 (variações de aproximadamente 50.000 a 100.000) eram injetadas no cérebro de camundongos, simulando o crescimento do tumor. A técnica consiste em: Usando coordenadas estereotáxicas, a anestesia dos animais, fixação do animal ao aparelho etc., injetávamos células da linhagem GBM95 em camundongos adultos machos, com idade em torno de 3 meses. (Coordenadas no *corpus striatum*: 3mm à esquerda do Bregma e 3mm de profundidade). O volume injetado foi de 3µl, administrados durante 40 minutos. Os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina seguindo protocolo padrão para pequenos roedores. Quinze dias após a inoculação, os tumores foram extraídos do cérebro dos camundongos através de dissecação. As células foram dissociadas e plaqueadas em garrafas de cultura ou em placas de 24 poços para posterior análise.

### 3.6. IMUNOCITOQUÍMICA

Para esta técnica, seguimos orientações previamente descritas por (Garcia-Abreu *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 1997). Células dissociadas por tripsinização e semeadas em lâminulas de vidro, por um período de 48h. Passado o estresse, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 min. para análise de proteínas do citoesqueleto. As células foram e permeabilizadas com Triton X-100 (Reagen) 0,2% em tampão fosfato salino (PBS) por 5 min., à temperatura ambiente. Após o bloqueio com albumina bovina de soro (Gibco) BSA/PBS 5%, as células foram incubadas com anticorpos primários *overnight* (ON) à 4°C. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário específico, conjugados com fluoresceína (FITC) ou rodamina (TR) por 1h, à temperatura ambiente (TA). Após este período as células foram lavadas com PBS e incubadas por 5 minutos com DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole-Sigma) para coloração dos núcleos. Todas as imunomarcações tiveram controles negativos, ou seja, reações realizadas pela omissão do anticorpo primário (Faria *et al.*, 2006). As lâminas foram observadas em microscópio de luz **Nikon TE 300** e microscópio confocal **Leica TCS SP5**. As áreas selecionadas de cada lâmina foram capturadas utilizando-se o *software* Image-Pro Express. Os anticorpos primários utilizados e diluições seguem descritos na tabela abaixo:

Anticorpos Primários	Fabricante	Classificação	Diluição
$\beta$ III-tubulina	Promega	Monoclonal	1:1000
CD133	Miltenyi Biotec Inc.	Monoclonal	1:11
GFAP	DAKO	Policlonal	1:500
Nestina	CHEMICON	Monoclonal	1:200
Neurofilamento	IMUNOTECH	Monoclonal	1:50
	NOVOCASTA	Monoclonal	1:100
Oct-3/4	Santa Cruz	Monoclonal	1:100
OLIG 2	CHEMICON	Policlonal	1:1000
SSEA4	Millipore	Monoclonal	1:100
SOX1	Millipore	Policlonal	1:100
SOX2	Millipore	Policlonal	1:100
TRA1-60	Millipore	Monoclonal	1:100
Vimentina	DAKO	Monoclonal	1:200

**Tabela 1.** Lista de anticorpos primários utilizados para realização de **imunocitoquímica** neste trabalho.

Anticorpos Secundários	Fabricante	Classificação	Diluição
<b>Alexa Fluor 488</b>	Molecular Probes	IgG de camundongo	<b>1:500</b>
<b>Alexa Fluor 546</b>	Molecular Probes	IgG de coelho	<b>1:500</b>

**Tabela 2.** Lista de anticorpos secundários utilizados para revelação, por **imunocitoquímica**, de anticorpos primários.

### 3.7. ENSAIO ELETROFORÉTICOS e *WESTERN BLOT*

#### 3.7.1. Extração de proteínas

**A** extração de proteínas totais de células de GBM foi feita a partir da tripsinização e posterior centrifugação das células. Ao *pelet* celular foram acrescentados 100µl de tampão ripa constituído de PBS; 1% NP-40; 0,5% deoxilato de sódio; 0,1% SDS adicionado de 1µl de inibidor de protease (Sigma). Este extrato foi homogeneizado, sendo passado algumas vezes em seringa de 1ml com agulha de insulina (Erlich *et al.*, 2007). Logo após as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

A dosagem pelo método de Bradford consiste da quantificação dos complexos formados entre o corante azul de *Coomassie* G-250 e as proteínas da amostra. A ligação da proteína ao corante desloca a absorção máxima do corante de 465nm para 595nm, permitindo que sua concentração possa ser lida em leitor de Elisa com absorbância de 595nm pela comparação com uma curva padrão constituída por proteína conhecida, BSA (Sigma).

#### 3.7.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida

**O** perfil protéico dos extratos celulares (20µg de proteína total) foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo o método de Laemmli (1970). O gel de poliacrilamida consiste de gel concentrador (*stacking gel*, 25 mM de Tris/HCl,

pH 6,8; 0,1% de SDS, 5% de acrilamida e 0,13% de bisacrilamida) e um gel de separação (*running gel*, 0,4mM de Tris/HCl pH8.8, 0,1% SDS, 7% de acrilamida e 0,13% de bisacrilamida). A corrida eletroforética foi realizada a 100V, em tampão Tris-Glicina, pH 8.8 com 0,1% de SDS. Após a corrida eletroforética, os géis foram transferidos para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) para posterior detecção imunológica de SOX2 e Oct-3/4.

### 3.7.3. Transferência de Proteínas

Após a migração eletroforética, as proteínas foram transferidas eletricamente para membranas de PVDF, de acordo com o método de Towbin *et al.* (1979). O gel foi embebido no tampão de transferência (0,025 M Tris/HCl, 0,192 mM glicina, 10% metanol) juntamente com a membrana de PVDF. O gel foi posto em contato com a membrana e a transferência foi feita em cuba apropriada, com o mesmo tampão de transferência descrito acima, a 4°C, 100V, por 90 minutos. Após a transferência, as membranas de PVDF foram coloridas com Vermelho de Ponceau 2% (Pharmacia), em TCA 3% para visualização das proteínas transferidas. Os sítios inespecíficos foram bloqueados numa solução que consiste de TBST [20 mM de Tris-HCl pH 7,6 e 137mM de cloreto de sódio com 0,1% Tween 20 (Merck)] acrescido de 5% leite em pó desnatado, durante 1h, lavadas com TBST e incubadas com anticorpos como descrito a seguir.



### 3.7.4. Imunodeteção e visualização de proteínas

**A**s membranas de PVDF foram incubadas com anticorpos primários policlonal anti-SOX2 (Chemicon), monoclonal anti-Oct3/4 (Santa Cruz), ou anti- $\alpha$ -tubulina ou anti-ciclofilina B (Promega), *overnight* a 4°C. A seguir, foram realizadas novas lavagens em TBST seguidas por uma segunda incubação, por uma hora à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho ou camundongo conjugado à peroxidase (Invitrogen). Mais lavagens em TBST foram feitas. Por fim, o complexo antígeno-anticorpo foi revelado através do método de intensificação da quimioluminescência pelo luminol (Super Signal WestPico, Synapse). O método ECL consiste basicamente na oxidação do luminol, reação catalisada pela peroxidase, em presença de peróxido de hidrogênio. Intensificadores químicos sustentam a emissão de luz do luminol, que imprime as bandas correspondentes às proteínas imunodetectadas em filmes radiográficos. Esses filmes, então, foram revelados com HC-110 (Kodak) e fixados (fixador para raio X Dental/ Kodak).

Os filmes radiográficos do Western blot para SOX2 e Oct3/4 expressos em CTTs foram escaneados para análise densitométrica, a qual foi realizada através do programa Image J. As bandas de SOX2 e Oct3/4 foram mensuradas, o peso molecular aparente determinado e a intensidade do sinal apresentada como unidades arbitrárias da densidade óptica (O.D.). Os resultados foram expressos como a relação da O.D. das duas proteínas (SOX2 e Oct3/4) por anti- $\alpha$ -tubulina ou anti-Ciclofilina B, utilizada como controle de carregamento.

Foram analisados os filmes radiográficos de 3 ensaios feitos independentemente. Anticorpos primários utilizados, fabricante, classificação, e diluições, listados na **tabela 3** e secundários **tabela 4**.

Anticorpos Primários	Fabricante	Classificação	Diluição
$\alpha$ -tubulina	Promega	Monoclonal	1:10.000
Ciclofilina B	Promega	Monoclonal	1:10.000
Oct-3/4	Santa Cruz	Monoclonal	1:200
SOX2	Millipore	Policlonal	1:500

**Tabela 3.** Lista de anticorpos primários utilizados em **Western blot**.

Anticorpos Secundários	Fabricante	Classificação	Diluição
Goat anti-coelho	Invitrogen	IgG (H+L)	1:3000
Goat anti-camundongo	Invitrogen	IgG (H+L)	1:3000

**Tabela 4.** Lista de anticorpos secundários conjugados à peroxidase utilizados em **Western blot**.

### 3.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Como a microscopia eletrônica é uma técnica que permite uma melhor visualização das estruturas celulares, por seu maior poder de resolução, resolvemos lançar mão desta técnica, na intenção de estudarmos agentes que poderiam estar influenciando na morfogênese das células de GBM95. Estas técnicas foram realizadas em colaboração com a em colaboração com a Mestre Mair Medeiros e a aluna de doutorado Alice Reis.

#### 3.8.1. PREPARO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E VARREDURA:

##### 3.8.1.1. Fixação

Após a confluência das células em garrafas, o meio de cultura foi desprezado e as garrafas foram lavadas 2x 5min. com tampão cacodilato 0,1M pH 7.4, para remover os debris, células não aderidas e resíduo do próprio meio de cultura. Para fixação, utilizamos Glutaraldeído 2%, Paraformaldeído 4% (Karnovsky) preparados com tampão cacodilato 0,1M pH 7.4. Para cada garrafa de 25cm<sup>2</sup> utilizou-se um volume de 5ml de fixador, deixados a temperatura ambiente por 2h e depois na geladeira por pernoite.

##### 3.8.1.2. Pós Fixação

No dia seguinte, retiramos o excesso de fixador, e lavamos 3 x 5min. com tampão cacodilato 0,1M pH 7.4, raspamos as células com um rodinho (scraping) colocando-as em eppendorfs, e a seguir fizemos a pós fixação com solução de Tetróxido de Ósmio 1% mais ferrocianeto de potássio 1,6% por

20min., no escuro. Nesta etapa, o pellet torna-se bem escuro (negro). Após este tempo, retiramos a solução e lavamos 3 x 5min. por centrifugação, com tampão cacodilato 0,1M pH 7.4.

### **3.8.1.3. Desidratação**

**I**niciamos a desidratação com acetona em concentrações crescentes de 30, 50, 60, 70, 80, 90% com duas trocas a cada 7min. e mais 3 trocas de acetona 100% a cada 7 minutos. As etapas acima (**Fixação, Pós Fixação e Desidratação**) são comuns para as duas técnicas: microscopia de Transmissão e Varredura.

## **3.8.2. MICROSCOPIA DE TRANSMISSÃO**

### **3.8.2.1. Infiltração de Resina**

**R**etiramos a acetona e colocamos a mistura de epon x acetona 1:1, *overnight*, no agitador. Esta mistura foi substituída por epon puro por mais ou menos 6 a 8 horas no agitador. Após este tempo, retiramos do eppendorf pedacinhos do pellet com auxílio de um palito, tipo japonês, colocando-os nas placas, bem na extremidade indicada e, com sua devida etiqueta. Completamos o epon nas placas, retiramos as bolhas e, levamos estas placas para uma estufa à 60°C, por 48 horas, para a completa polimerização do epon.

### **3.8.2.2. Desbaste e Ultramicrotomia**

**Q**uando a polimerização se completou, retiramos as placas da estufa e, conseqüentemente, retiramos os blocos das placas. Então, passamos para a

fase de Desbaste que significa: aparar o bloco manualmente, retirando todo o excesso de resina com uma lâmina de aço, com gume unilateral, tendo auxílio de uma lupa e, formando a figura de um trapézio, onde a base maior não deve ultrapassar 1,5mm e o material deve ficar bem centralizado na face deste trapézio a ser fatiada no ultramicrótomo.

Para isto, preparamos uma navalha de vidro, num equipamento chamado "Knife-maker" a partir de barras de vidro especiais para ME. Esta barra de vidro, bem limpa, livre de gordura, é cortada em quadrados que são depois recortadas em triângulos, depois se passa uma fita isolante em um dos ângulos, formando uma cavidade (o barquinho que encheremos de água, onde os cortes fatiados irão boiar) que será vedada com esmalte. As navalhas de vidro são ótimas, porém, muito frágeis o que força a substituição freqüente durante os cortes.

Aqui então, começa a ultramicrotomia. Utilizamos primeiramente a navalha de vidro para obtenção de cortes semifinos, aproximadamente 400nm. Colocamos o bloquinho numa peça apropriada do ultramicrótomo, ajustando-o para que fique paralelo à navalha que também foi ajustada e teve seu barquinho cheio de água destilada. Aproximamos a navalha, lentamente, e iniciamos os cortes. Com os primeiros cortes, acertamos o bloco, e à medida que o trapézio sai inteiro, começamos a recolher estes cortes (coloração discretamente verde e rosa) que ficam flutuando no barco da navalha, com auxílio de uma alça com fio de cobre. Os cortes são depositados em gotas de água sobre lâminas extremamente limpas, que imediatamente são levadas a uma placa quente para que a água evapore ajudando a

aderência dos cortes nas lâminas. Em seguida, coramos estes cortes com azul de toluidina 1% diluído em solução também 1% de bórax (pinga-se uma gota do corante sobre os cortes), estas lâminas são colocadas sobre uma placa quente, até que a gota comece a secar nas bordas, então, são lavadas com álcool 70%, retornando para a placa quente para secar. As lâminas são montadas com lamínulas e entellan (Merck) e observadas ao microscópio óptico.

### **3.8.2.3. Cortes Ultra-finos**

**P**ara os cortes ultra-finos, utilizamos a navalha de diamante. Colocamos o bloco no ultramicrotomo devidamente ajustado, posicionando a faca com o ângulo de acordo com a orientação do fabricante. Seguindo os mesmos procedimentos de utilização da faca de vidro (descritos acima), quando os cortes começam a sair com a face do trapézio inteira, ajustamos o ultramicrotomo quanto à espessura dos cortes que, de acordo com o que é chamado de “cor de interferência” a coloração ideal para cortes ultrafinos varia entre dourado, prata ou cinza. Utilizamos cortes com 70nm (coloração prata) então, à medida que o corte é feito e sai do gume da navalha aderem-se uns aos outros formando uma fita, com auxílio de um cílio colado a um palito, escolhemos os cortes e os recolhemos na face fosca da grade de cobre, por ter maior aderência. Esta gradícula deve estar bem limpa, e para isso, são imersas em ácido nítrico e água destilada. Após o recolhimento dos cortes, secamos a grade colocando-a sobre papel de filtro, com o lado fosco (onde estão os cortes) voltado para cima.

#### 3.8.2.4. Contrastação

**P**ara observar melhor a morfologia da célula, nada melhor que aumentar seu contraste (coloração). Então, usando uma placa de petri forrada com parafilme, o acetato de uranila 5% é filtrado sobre a placa, formando uma gota, na qual colocamos a grade com a face fosca, do material, voltada para baixo, durante 30 minutos e, protegida de luz. Após esse tempo, lavamos bem a grade, com água destilada, e secamos em papel de filtro. Usando o mesmo procedimento, contrastamos a grade por 15 minutos em Citrato de Chumbo, filtrado. Esta contrastação foi realizada em uma câmara contendo pastilhas de Hidróxido de Sódio (NaOH) para evitar a precipitação do Chumbo, o que dificulta a visualização do material. Passados 15 minutos lavamos a grade com água destilada e a secamos em papel de filtro. Guardamos em uma caixinha, apropriada, até o momento da visualização ao Microscópio Eletrônico de Transmissão (**Figura 23 A e B**).

#### 3.8.3. MICROSCOPIA DE VARREDURA

##### 3.8.3.1. Secagem

**E**sta etapa foi feita promovendo-se a substituição de acetona ou etanol inseridos no material por CO<sub>2</sub> líquido, tendo todo cuidado com a preservação das estruturas, para isto, o procedimento é feito rapidamente permeabilizando a estrutura para facilitar a penetração de substâncias fixadoras. Este método é conhecido como **ponto crítico**, onde, utilizou-se um aparelho especial para o processo de passagem do CO<sub>2</sub> líquido para o estado gasoso sem formar uma interface gás/líquido o que poderia deformar o material. Esse processo se dá

sob temperatura e pressão atmosférica determinadas. Após esta etapa, o material foi retirado do aparelho para ser processado na etapa seguinte (Benchimol *et al.*, 1996).

### **3.8.3.2. Evaporação com Ouro**

O material foi cuidadosamente montado em suporte de alumínio forrado com fita condutora dupla-face de carbono e metalizado com ouro pelo método de "sputtering" em aparelho Balzers. A metalização vai impedir a penetração profunda dos elétrons facilitando a formação da imagem **(Figura 23 C e D)**. Este material observado em microscópio eletrônico de Transmissão Zeiss 900 e Varredura Jeol 5310, localizado no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho-UFRJ. As imagens digitais foram obtidas através do programa Sem Afore® JEOL 3.0 Pro na resolução de 1024 X 768 pixels.

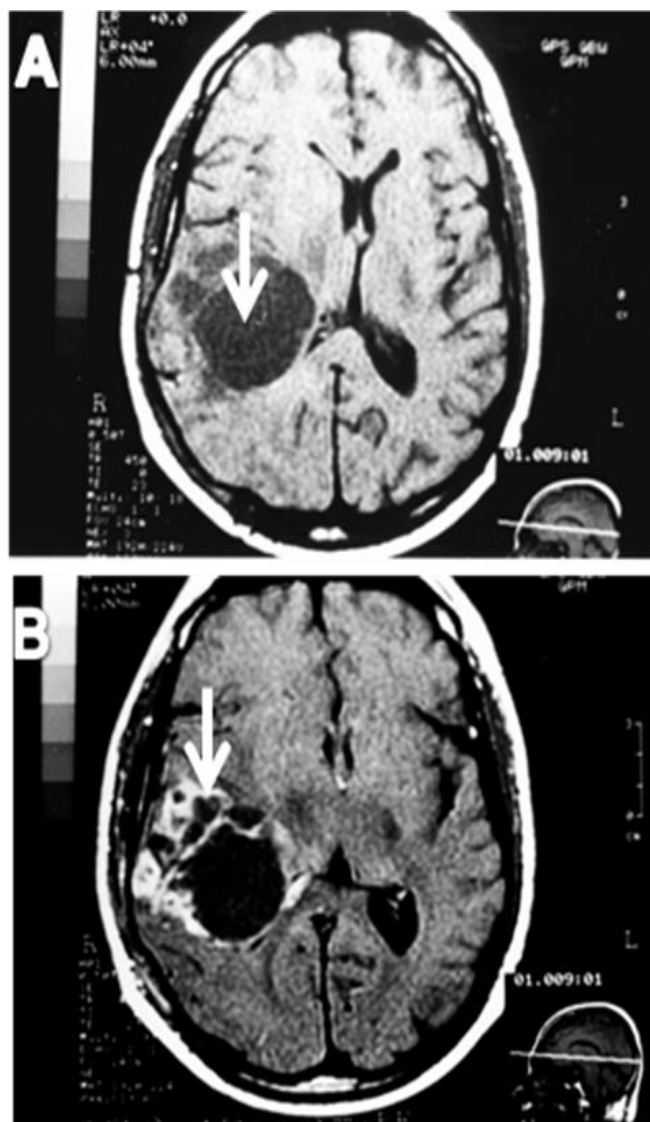


## **4. RESULTADOS**

---

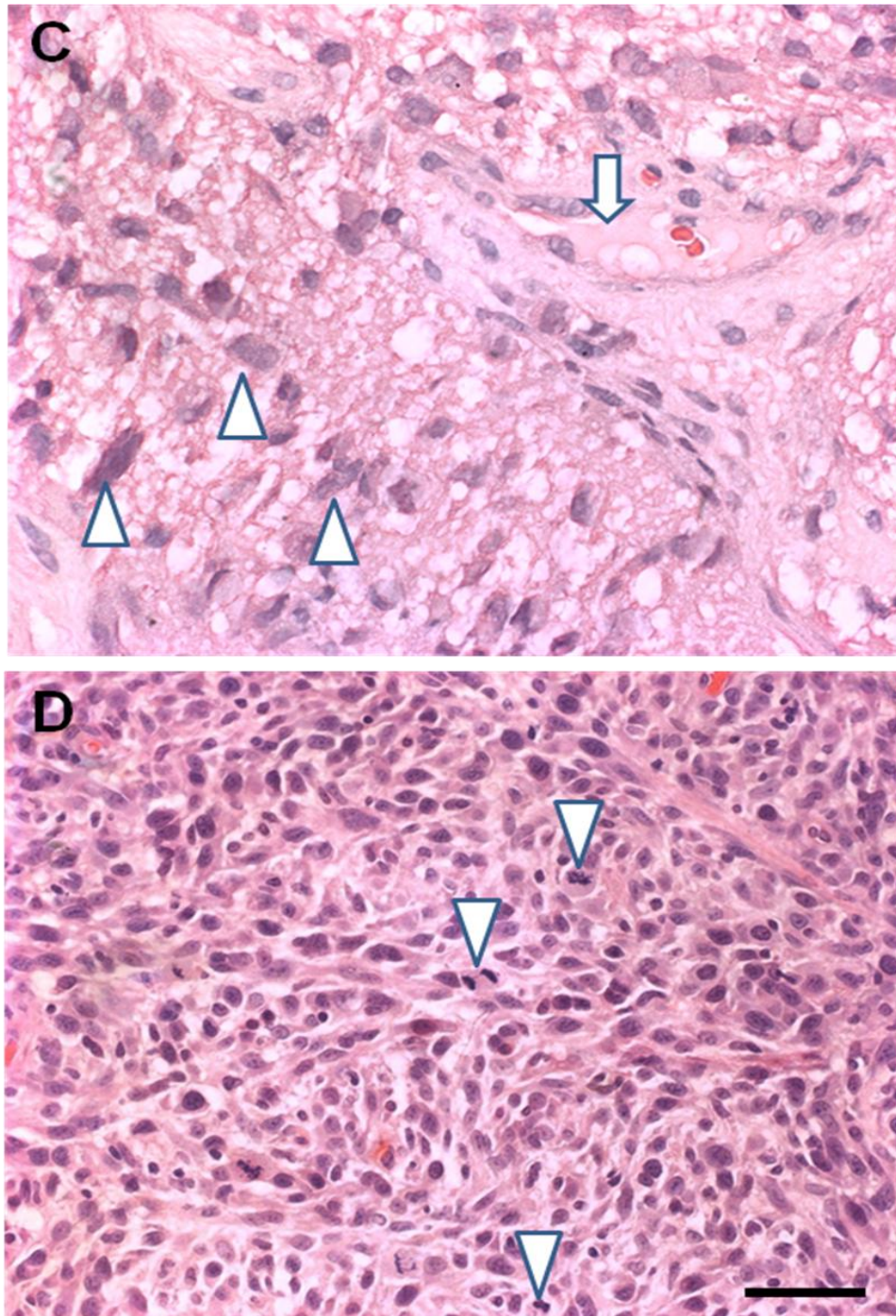
#### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM DE GBM95

O objetivo deste estudo foi verificar a possível (eventual) existência de células-tronco na linhagem de GBM95. Em imagem de Ressonância magnética do paciente (**Figura 9**), podemos observar os aspectos da lesão com pouca delimitação do tumor (**A**) (seta). E em **B**, a lesão se mostra mais heterogênea com foco central de necrose (seta).



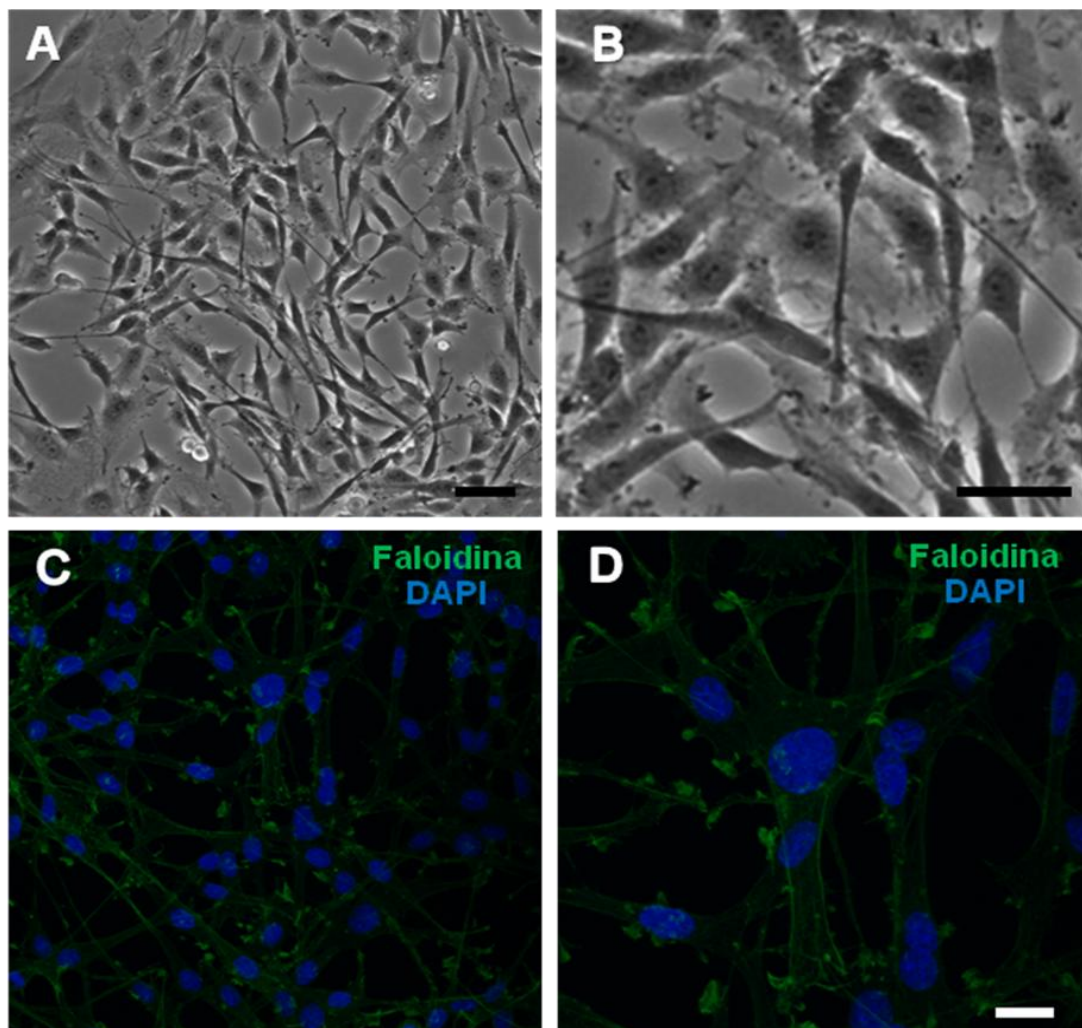
**Figura 9. Descrição de GBM95. Ressonância magnética** Cedida pelo Serviço de Radiologia do HUCFF-UFRJ, em **T1(A)**, observa-se lesão com sinal heterogêneo (seta). Seqüência em **T2 (B)** mostra lesão heterogênea com componente central de necrose e edema perilesional (seta).

Em microscopia óptica, por HE (Figura 9A), observamos que este tumor apresenta intensa proliferação vascular (seta), atipias nucleares (ponta de seta) (C), algumas células com mitoses atípicas são facilmente observadas (D).



**Figura 9A. Descrição de GBM95. Hematoxilina Eosina**  
Em análise por microscopia óptica, observamos abundante proliferação vascular (seta), atipias nucleares (ponta de seta) (C), várias figuras em mitose (ponta de seta) (D). Barra: 50µm.

A linhagem GBM95 foi utilizada a partir de estoque congelado em Nitrogênio líquido. As células descongeladas foram repicadas gerando um novo estoque que nos permitiu utilizá-las em todo o estudo. Estas células estabelecidas em cultura, morfologicamente, em sua maioria, apresentam aspecto fibroblástico de forma poligonal, mostrando características astrocíticas de aspectos fibrosos como vemos em contraste de fase na **figura 10, A e B** e em citoquímica mostrando os filamentos do citoesqueleto celular revelados pela Faloidina conjugada ao FITC, em **C e D** em menor e maior aumento exibindo a integridade morfológica.

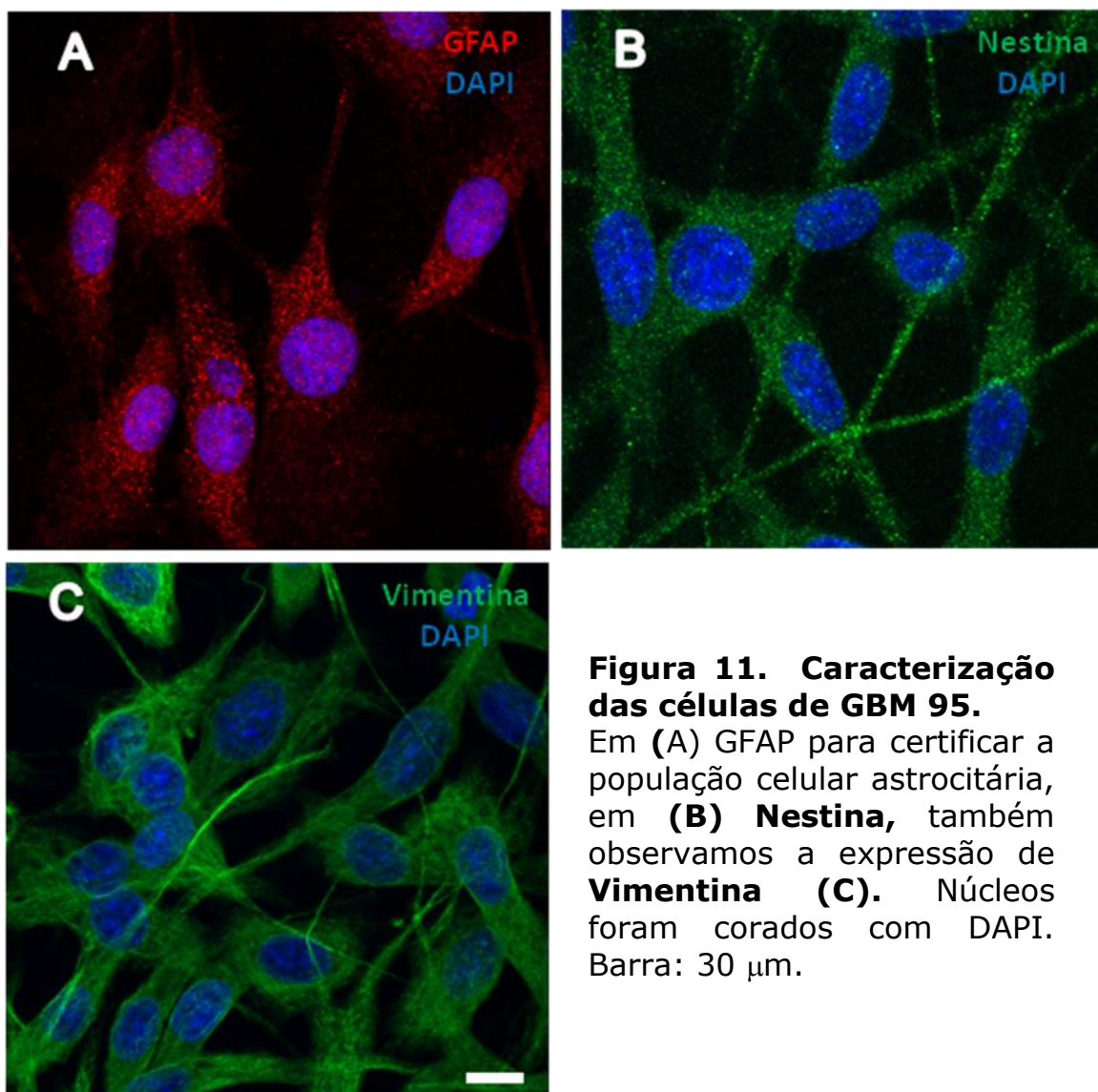


**Figura 10. Aspecto morfológico de células de GBM 95.**

Em contraste de fase, estas células apresentam morfologia com limites muito claros **A e B**. Imagens obtidas em microscópio de luz TE 300 (Nikon, Japão). Em citoquímica, filamentos de actina F, revelados por Faloidina **C e D**. Núcleos foram corados com DAPI. Barra: 50µm e 30µm.



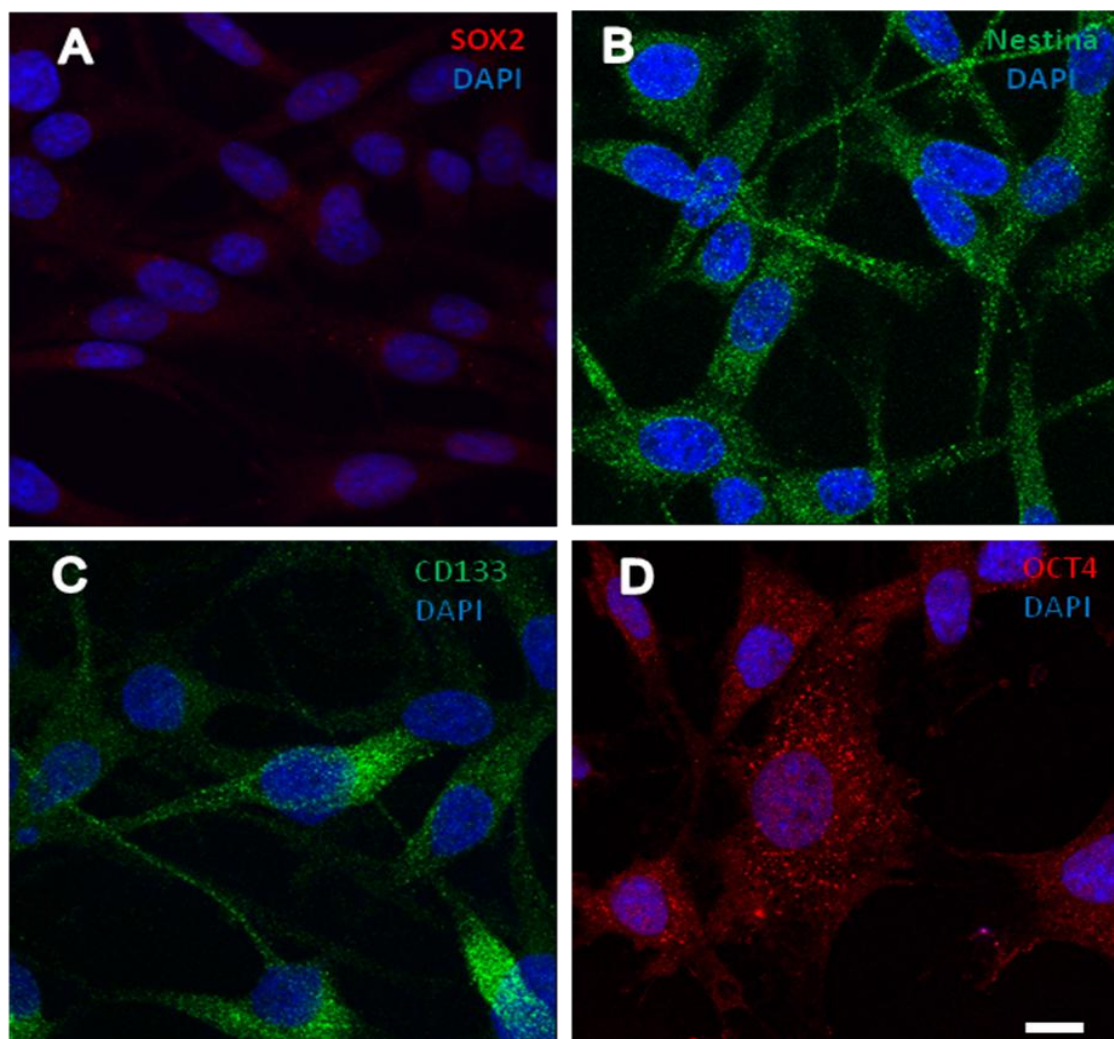
Em estudos feitos em nosso laboratório com Glioblastomas humanos mostramos que suas células apresentam diferença na marcação para GFAP e Nestina o que sugere que tais células tumorais são heterogêneas quanto a seus estágios de diferenciação. Para certificar esta heterogeneidade observada anteriormente, resolvemos verificar a presença de características positivas para **GFAP**, onde observamos o citoesqueleto celular corado por fluorescência (vermelho) e **Nestina** corado por fluorescência (verde) e núcleos corados com DAPI (azul), **figura 11 A e 11 B** respectivamente. Na **figura 11C** constatamos a presença de células marcadas para **Vimentina**.



**Figura 11. Caracterização das células de GBM 95.**

Em (A) GFAP para certificar a população celular astrocitária, em (B) **Nestina**, também observamos a expressão de **Vimentina** (C). Núcleos foram corados com DAPI. Barra: 30  $\mu$ m.

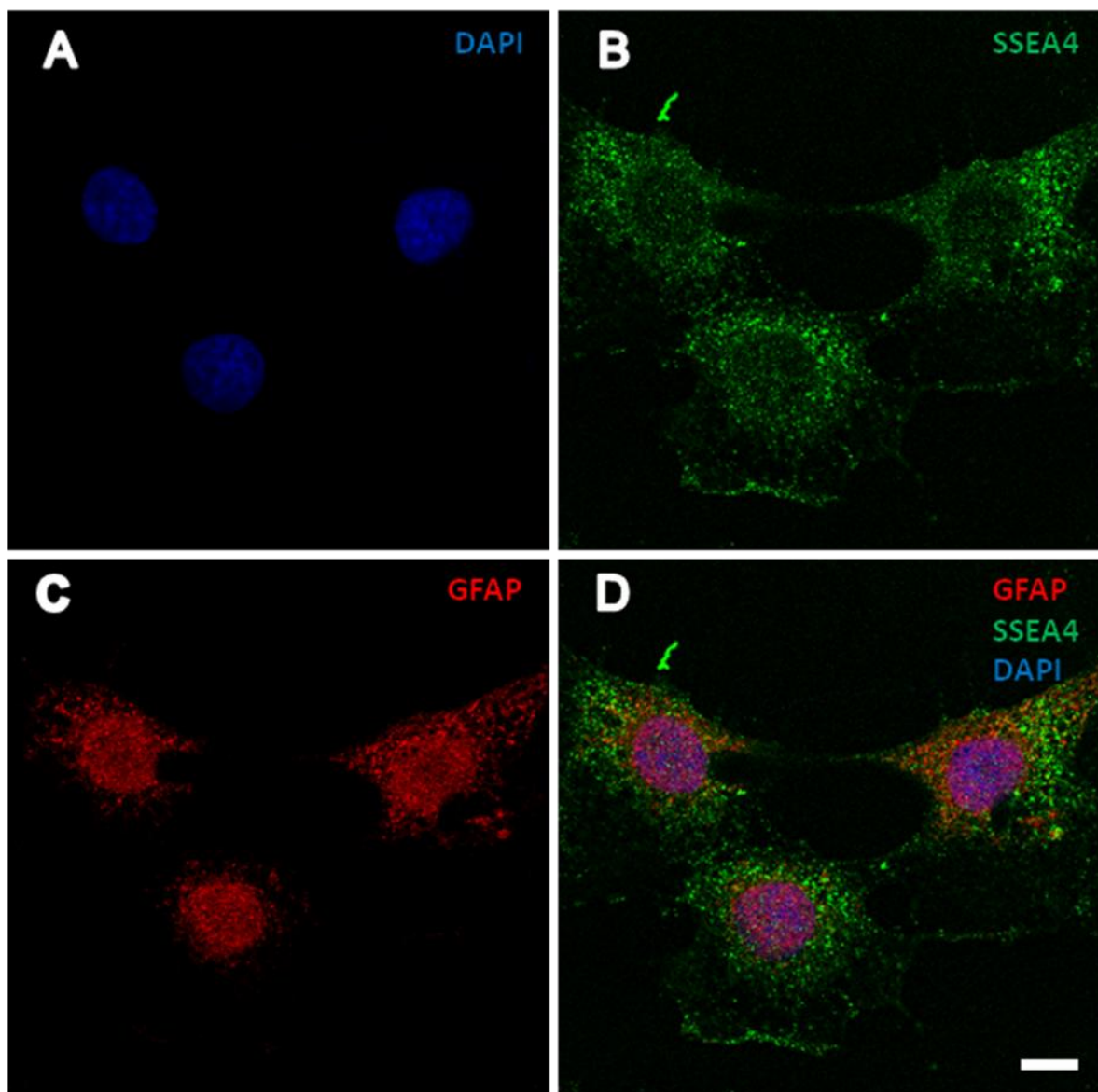
Confirmada a presença de células indiferenciadas, usamos outros marcadores como na **figura 12**, **SOX2** fator de transcrição que como outros, lideram a superexpressão dos genes que levam à indiferenciação e manutenção da pluripotencialidade (A) células coradas em vermelho. **Nestina**, marcador de células indiferenciadas (B), **CD133**, antígeno de membrana reconhecido como marcador de células hematopoiéticas e de células tronco neurais (C) coradas em verde. E **Oct-3/4**, fator de transcrição determinante de pluripotência (D) corada em vermelho. **MARCADORES** típicos de células-tronco detectam células em cultura de GBM95.



**Figura 12. Células indiferenciadas de GBM95.**

Estas expressam macadores **SOX2** (A), **Nestina** (B), **CD133** 9C) e **Oc-3/4** (D) todos, anticorpos típicos de células pluripotentes. Núcleos foram corados com DAPI. Barra = 30µm.

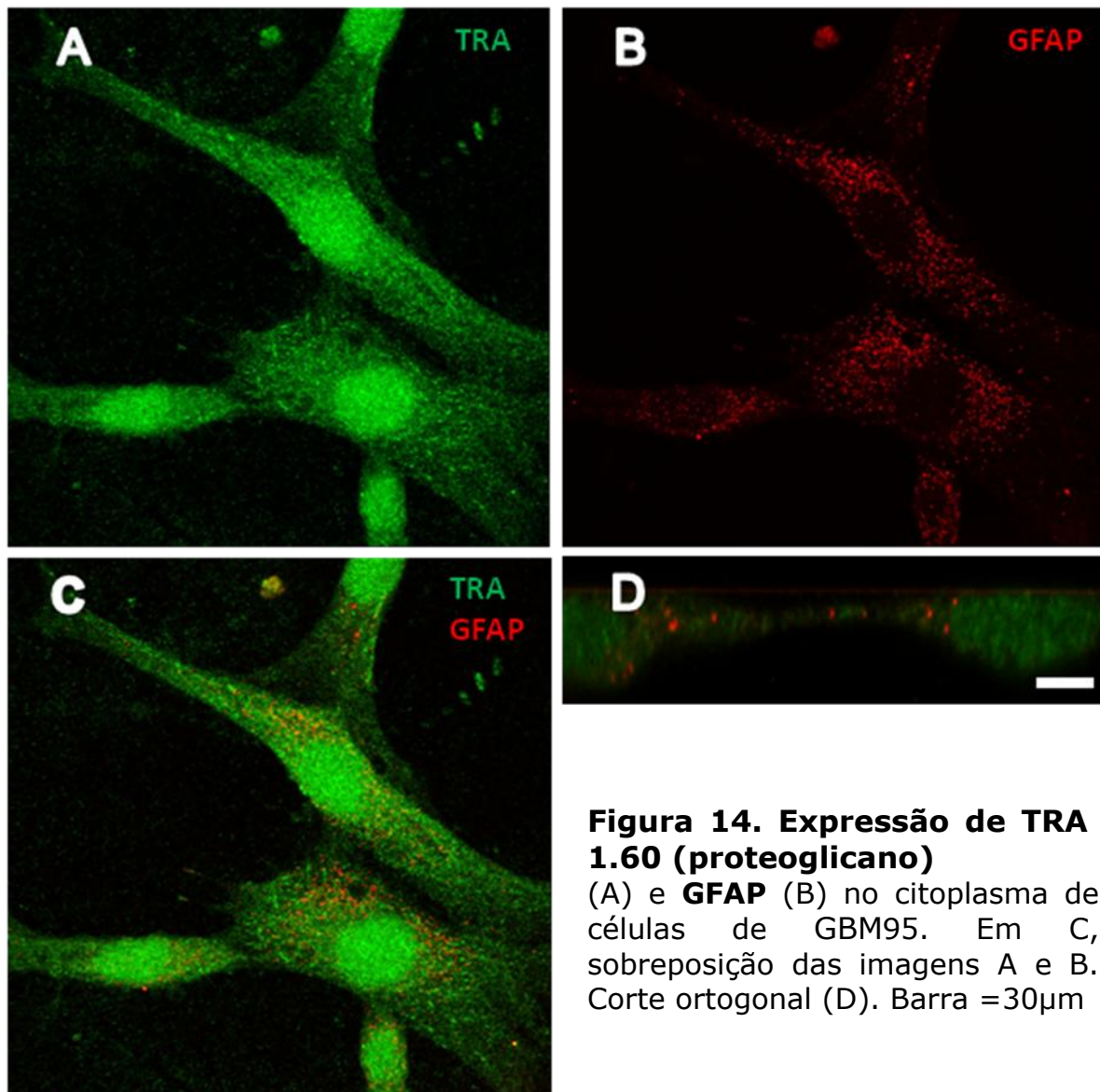
Ainda observando células indiferenciadas, fizemos marcação para **SSEA4 (Figura 13)**, antígeno embrionário estágio específico 4 da família de antígenos SSEAs, que é um dos antígenos de superfície celular mais comumente usado para identificar as células-tronco embrionárias humanas.



**Figura 13. Células indiferenciadas de GBM95.** Núcleos foram corados com **DAPI** (A). Em B **SSEA4** (verde), em C **GFAP** (vermelho). Em D sobreposição das imagens A, B e C. Barra = 30µm.



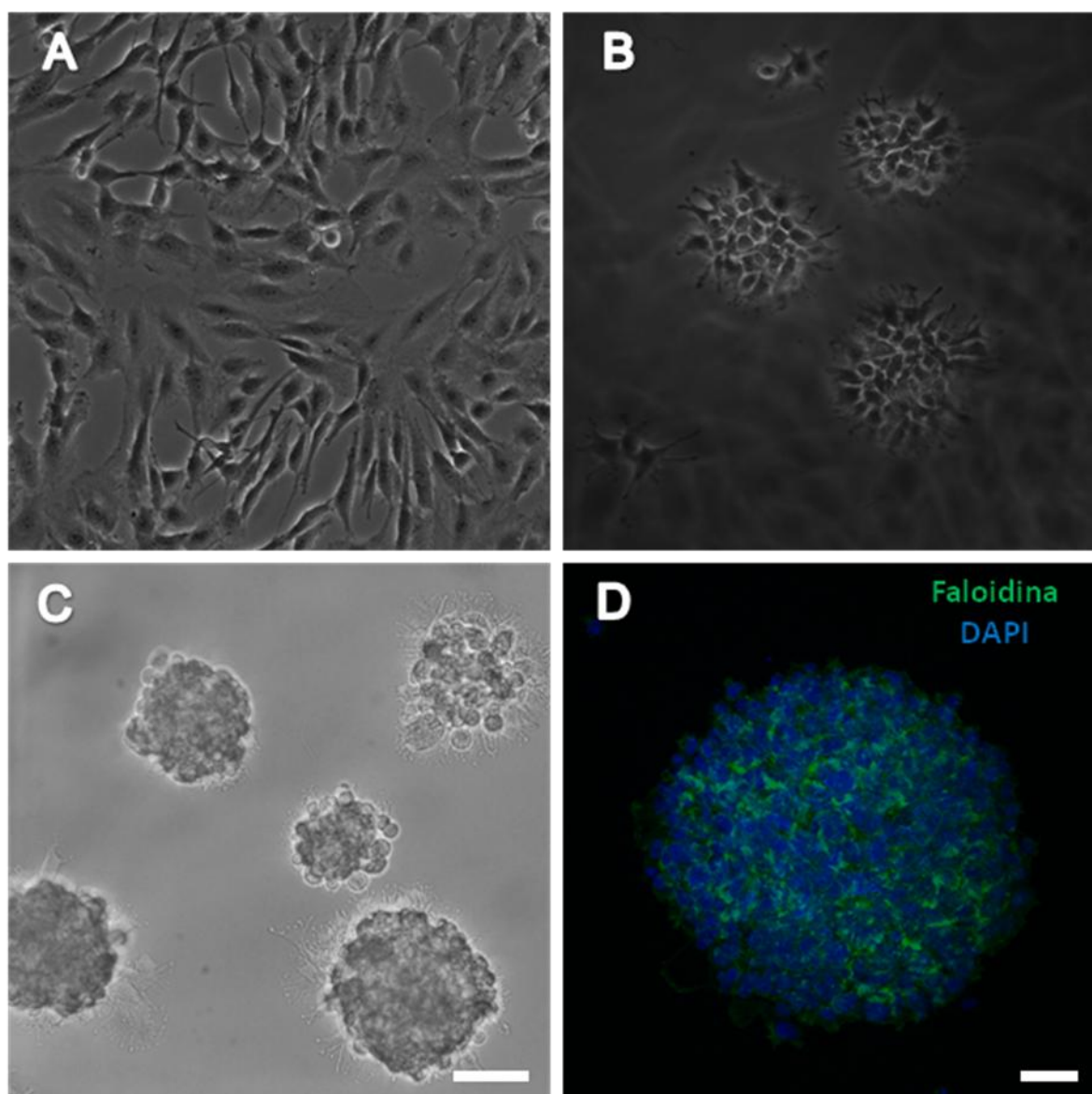
Outro antígeno que é expresso em tumores humanos e muito utilizado para identificação de células-tronco embrionárias humanas é o proteoglicano, keratan sulfato TRA 1-60 (**Figura 14**).



**Figura 14. Expressão de TRA 1.60 (proteoglicano)** (A) e **GFAP** (B) no citoplasma de células de GBM95. Em C, sobreposição das imagens A e B. Corte ortogonal (D). Barra = 30 $\mu$ m



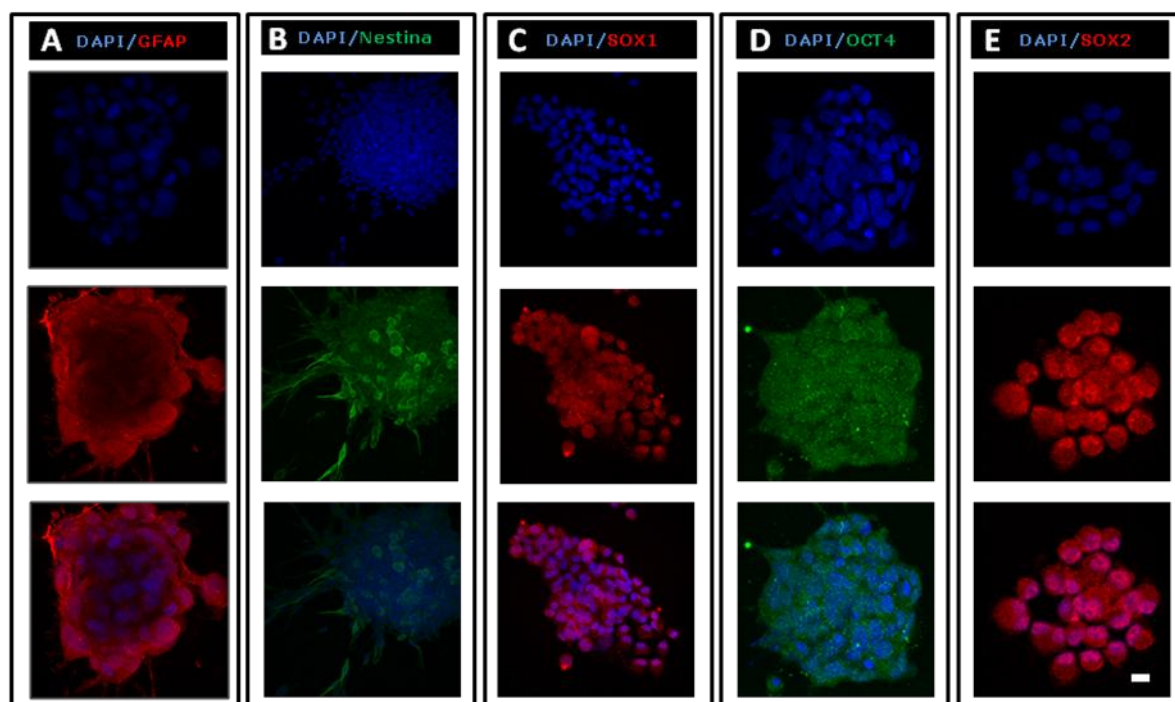
Com objetivo de demonstrarmos a existência de células com potencial tronco entre as demais células de GBM95, **(Figura 15)** as mantivemos em tratamento com meio sem soro contendo EGF e FGFb (A) e obtivemos esferas flutuantes em cultura (B), oncoesferas (C). Citoquímica para Faloidina (D).



**Figura 15. Aspectos morfológicos de células GBM95 após xenotransplante (A).**

Início da formação de Oncoesferas **(B)**. Em **C**, oncoesferas formadas. Em **D**, distribuição de filamentos de actina, corados com Faloidina conjugado com Alexa Fluor 488. Núcleos foram corados com DAPI. Barra:50 e 30 $\mu$ m

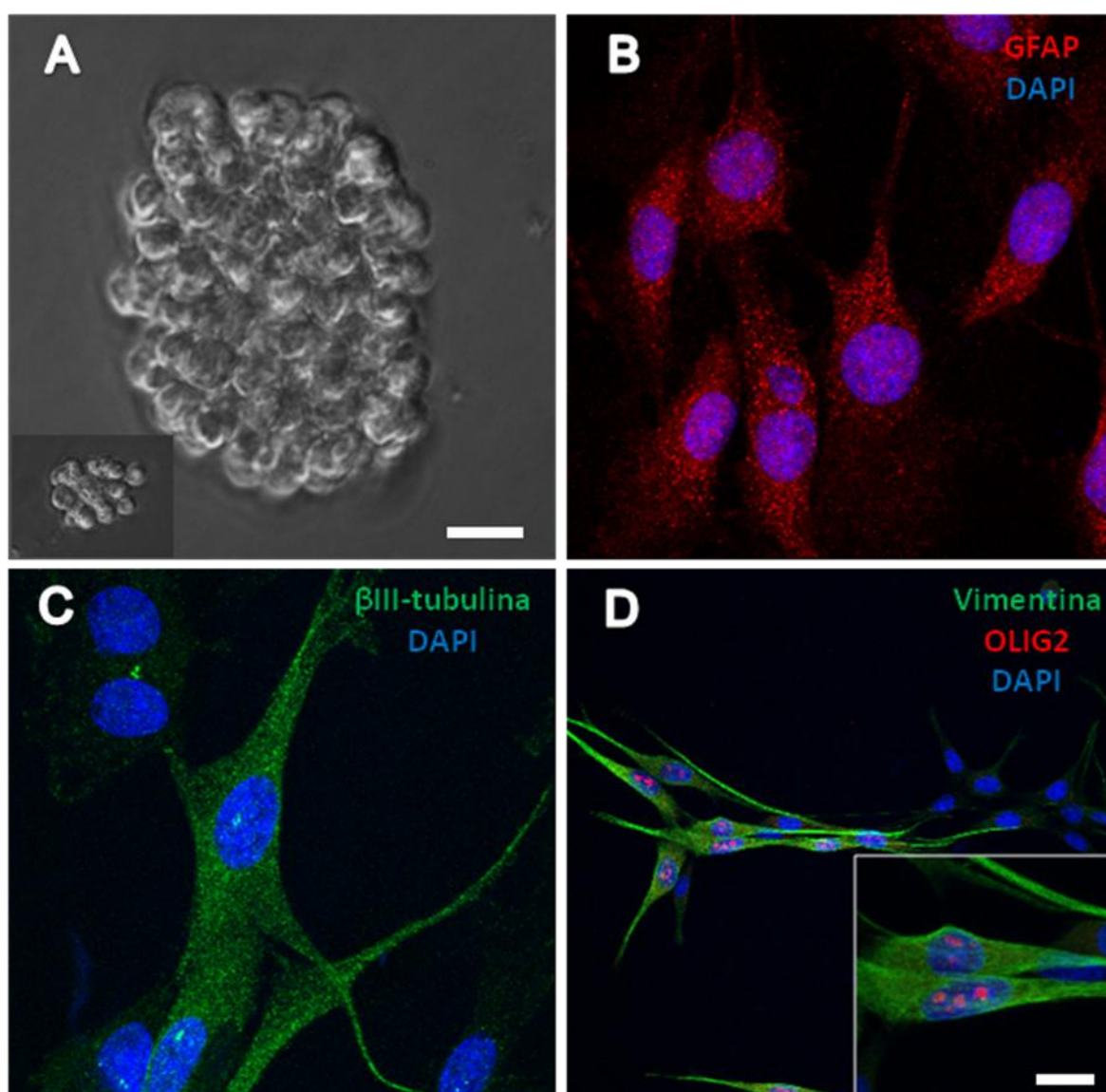
Oncoesferas da linhagem de GBM95 expressam marcadores de células pluripotentes (**Figura 16**) **GFAP** (A), **Nestina** (B), **SOX1** fator de transcrição na determinação neural (C), **Oct-3/4** (D) e **SOX2** (E).



**Figura 16. Oncoesferas de GBM95 expressando marcadores de células tronco.**

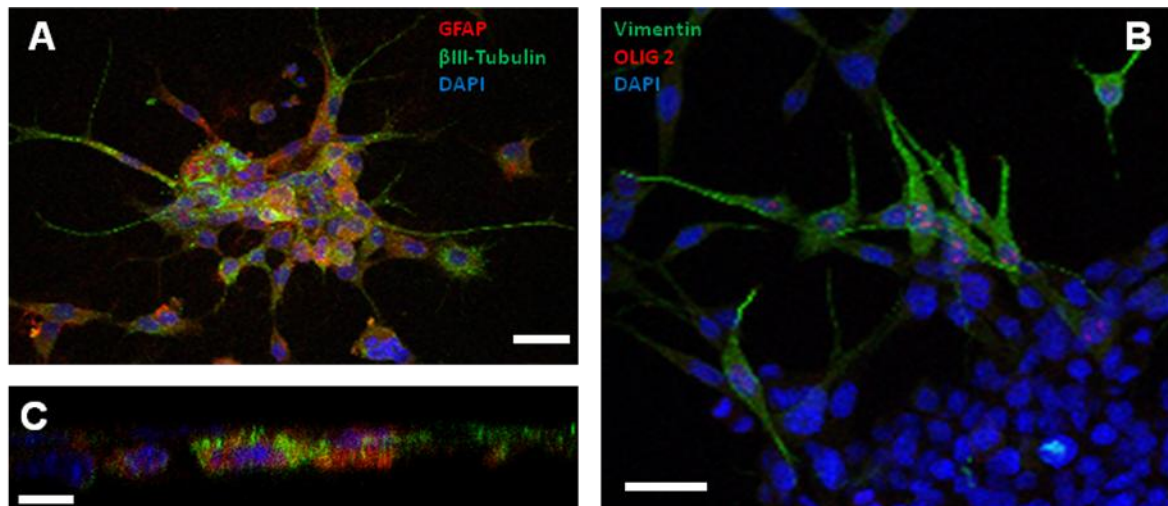
GFAP (A), Nestina (B), SOX1 (C), OCT4 (D) e SOX2 (E). Núcleos foram corados com DAPI. Barra = 30 $\mu$ m.

No processo de auto-renovação-clonalidade as oncoesferas foram dissociadas e colocadas em placa de 96 poços, 1 a 5 células por poço, utilizando 100  $\mu$ l de meio NS34 mantendo as células em suspensão. Depois de 30/60 dias, algumas destas células, menos de 1% começaram a se dividir formando oncoesferas primárias (**Figura 17A**). Estas células foram cultivadas na presença de diferentes suplementos e se diferenciam em células de linhagem neural: astrócitos (**B**), neurônios (**C**) e oligodendrócitos (**D**).



**Figura 17. Linhagem GBM95** Apresenta células com propriedades tronco e potencial de auto-renovação, isto favorece a indução da indiferenciação celular na forma de oncoesferas flutuantes tendo capacidade de auto-renovação (A). Apresentam poder se diferenciar em astrócitos (B), neurônios (C) e oligodendrócitos (D) Inseto: marcação para Vimentina e OLIG2. Barra = 30 $\mu$ m.

Estas células foram cultivadas na presença de diferentes suplementos e se diferenciam em células de linhagem neural.



**Figura 18. Células derivadas de oncoesferas de GBM95.**

Algumas destas células apresentaram co-localização de GFAP (vermelho) com  $\beta$ III-tubulina (verde) (A). Em (B) as células diferenciadas marcam para Olig2 nuclear (vermelho) e citoesqueleto verde (vimentina). (C) corte ortogonal. Núcleos foram corados com DAPI. Barra = 30 $\mu$ m.

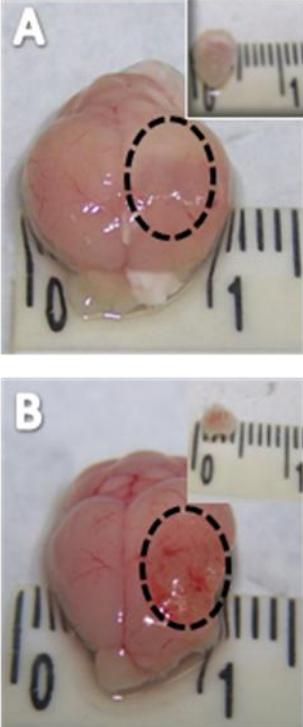
- **Células de GBM95, tipo tronco geram tumor se xenotransplantados**

Para avaliar a influência do ambiente in vivo na diferenciação de células GBM95, xenotransplantamos essas células no cérebro de camundongos (A) células diferenciadas e em B células indiferenciadas (células pluripotentes) (**Figura 19**). O número de tumores formados são apresentados nas tabelas abaixo (**Figura 19**). Após 15 dias, dissecamos a massa do tumor e estabelecemos estas células em cultura (C). Tratando estas células com meio sem soro contendo EGF e FGFb induzimos a indiferenciação (D) (**Figura 19A**).

Nº de Células diferenciadas	Nº de animais/ Tumores formados
$10^5$	6/6

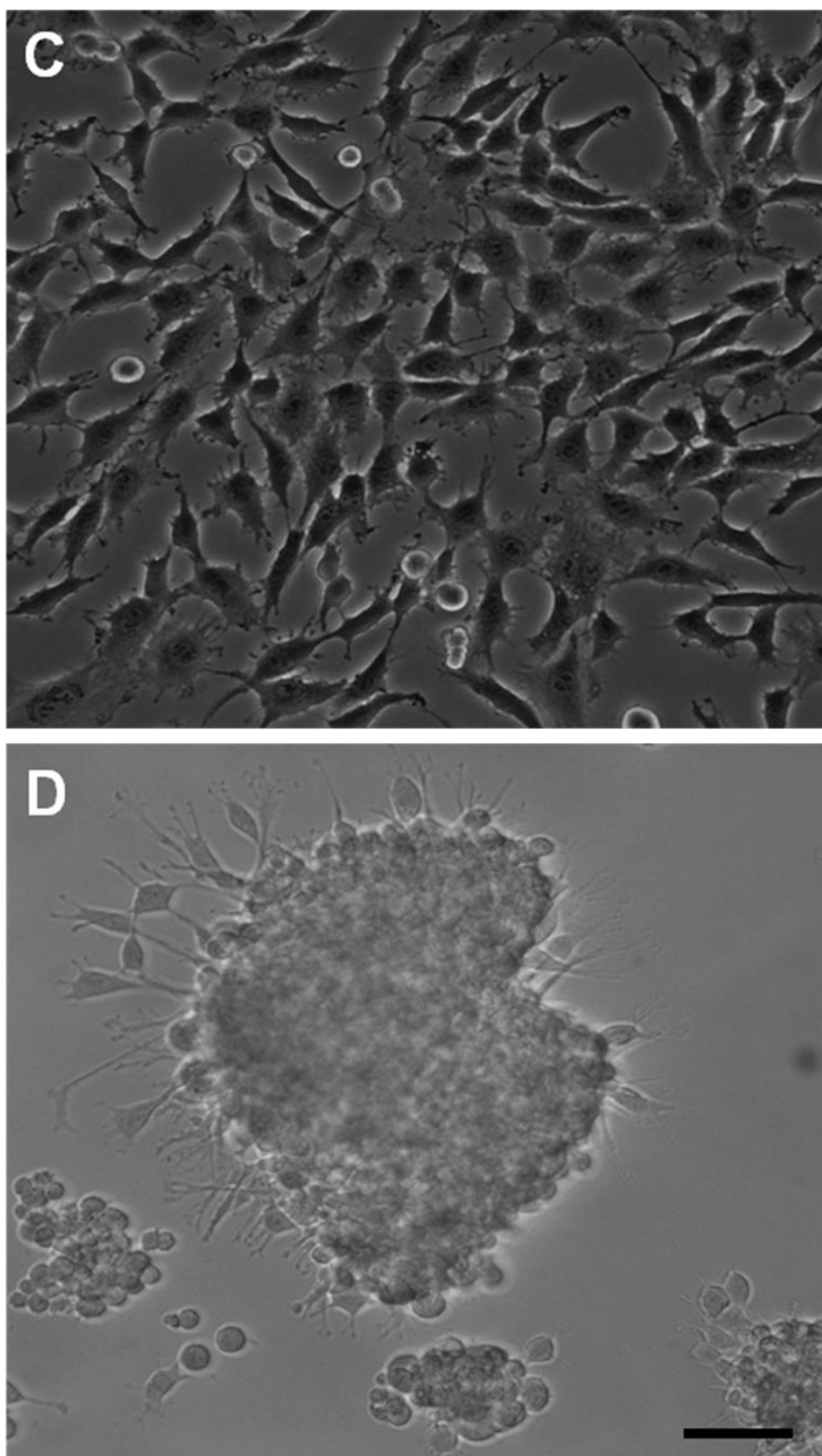
  

Nº de Células indiferenciadas (Células-tronco tumorais)	Nº de animais/ Tumores formados
$10^5$	4/4

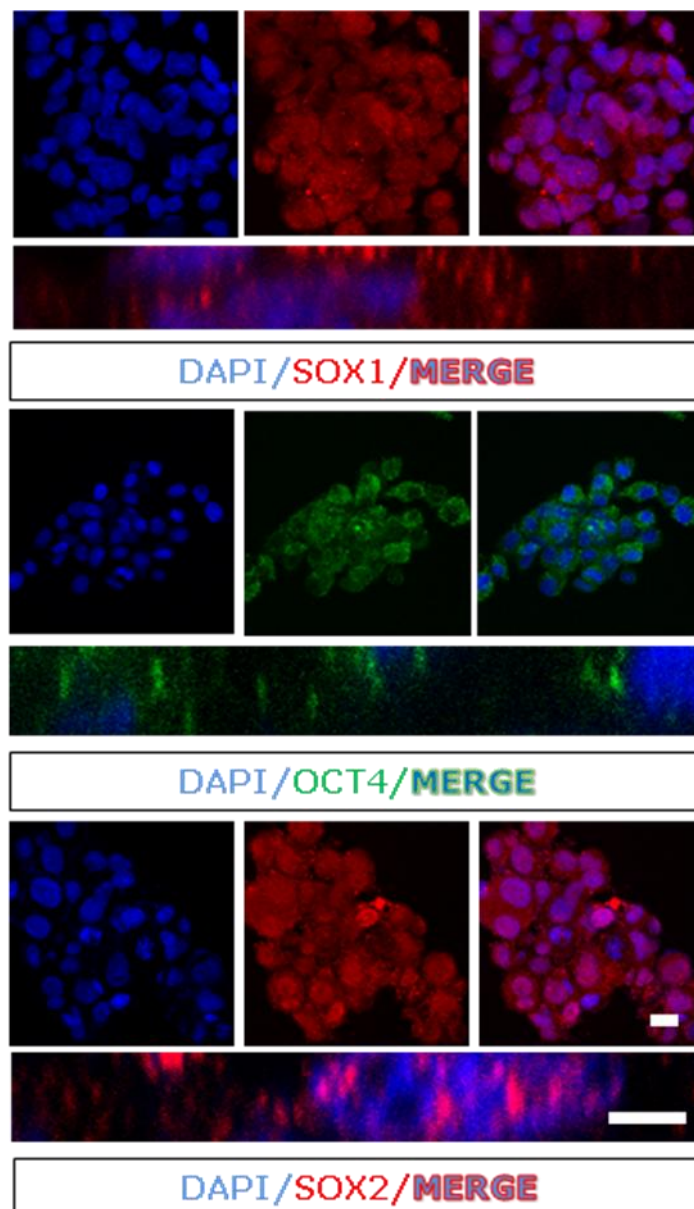
**Figura 19. Células de GBM95 xenotransplantadas em cérebro de camundongos induzem a formação de tumor.** Células diferenciadas de GBM95 foram xenotransplantadas em cérebro de camundongos (A) bem como células indiferenciadas (B).





**Figura 19A. O Ambiente Vivo induz um estado indiferenciado de células GBM95.** Células de GBM95 foram xenotransplantadas em cérebro de camundongos e, após 15 dias, dissecamos a massa tumoral (figuras A e B) e estabelecemos estas células em cultura (C). (D) Formação de Oncoesfera. Barra = 50 $\mu$ m.

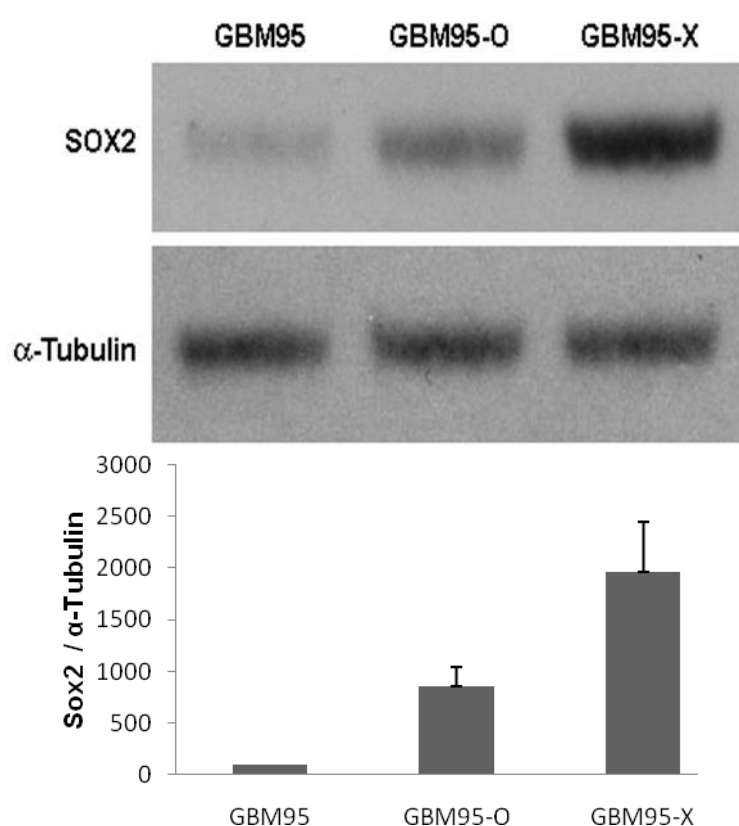
Após estabelecimento destas células em cultura e tratamento com EGF e FGFb, as células indiferenciadas foram selecionadas. Usamos marcadores de células pluripotentes para caracterizá-las.



**Figura 20.** Uso de marcadores de células pluripotentes após xenotransplante. SOX1, Oct-3/4, SOX2. Barra = 30μm.

- **A expressão dos marcadores SOX2 e Oct-3/4 aumentam após xenotransplante**

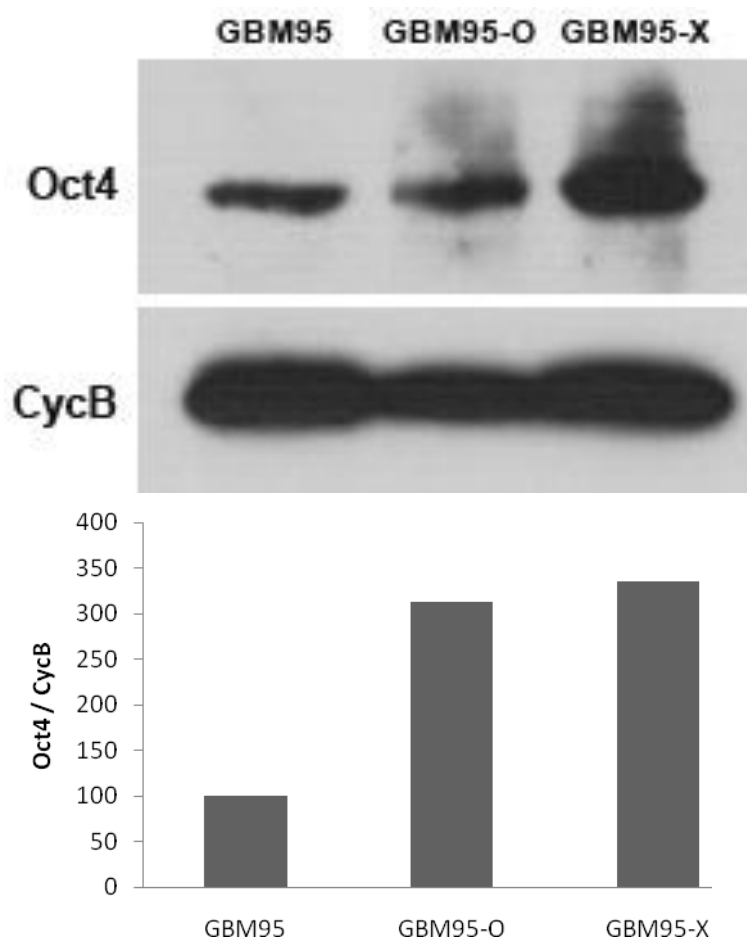
Células desdiferenciadas GBM95 expressam maior nível de SOX2 (um marcador de auto-renovação e células indiferenciadas) que as células GBM95 originais. Os níveis de expressão SOX2 em células GBM95 xenotransplantadas (GBM95-X) são aproximadamente 10 vezes maior do que em células GBM95-O e 20 vezes maior do que em células GBM95 analisadas por western blot.



**Figura 21. Expressão das proteínas SOX2 (A) e  $\alpha$ -tubulina (B)** como controle de carregamento, analisadas por *Western blot* em células de GBM95, GBM95-O e GBM95-X. Os níveis de expressão SOX2 em células GBM95 xenotransplantadas (GBM95-X) são aproximadamente 10 vezes maior do que em células GBM95-O e 20 vezes maior do que em células GBM95. Os gráficos mostram os valores obtidos a partir do programa *Scion Image*. Barra = 30 $\mu$ m.

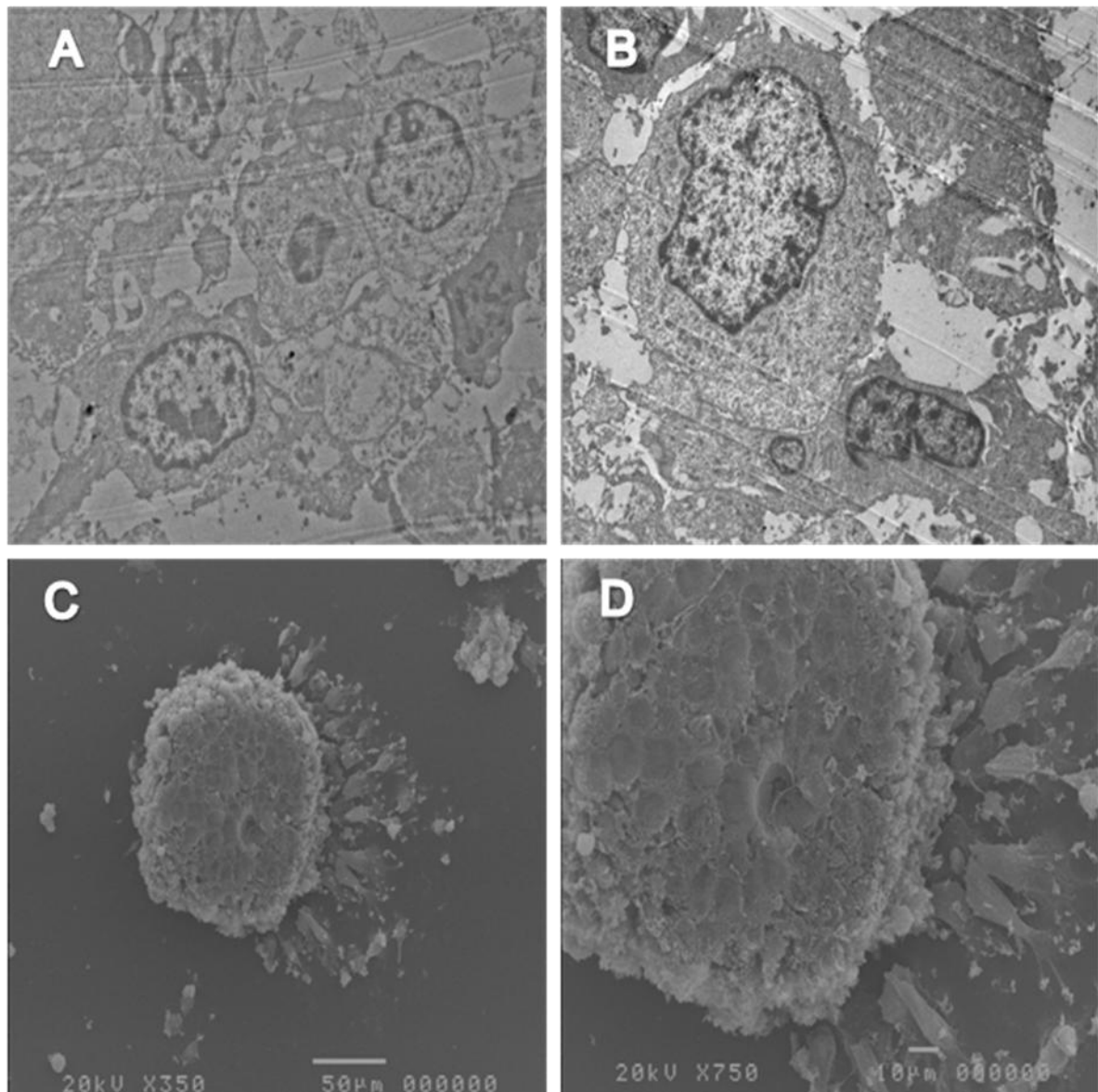


Os níveis de expressão Oct-3/4 em células GBM95 xenotransplantadas (GBM95-X) parecem ser maiores do que em células GBM95-O e em células GBM95 analisadas por western blot. Resultado preliminar.



**Figura 22. Expressão das proteínas Oct-3/4 (A) e Ciclofilina B (B)** como controle de carregamento, analisadas por *Western blot* em células de GBM95, GBM95-O e GBM95-X. Os níveis de expressão Oct-3/4 em células GBM95 xenotransplantadas (GBM95-X), também parecem estar maior que nas outras duas amostras.

Células de GBM95 em oncoesferas, observadas por Microscopia de Transmissão e Microscopia de Varredura.



**Figura 22. Microscopia de Transmissão e Varredura de oncoesferas de GBM95. A e B** mostra células com núcleos de tamanhos diferentes. **C e D** mostram as células de GBM95 em colônias.

## **5. DISCUSSÃO**

---

## 5.1. DISCUSSÃO

A origem celular dos gliomas tem sido bastante estudada. O surgimento de um câncer depende da ocorrência de diferentes fatores: **mutações naturais, duplicação anormal do material genético durante a multiplicação celular e reparo anormal de defeitos prévios.** Divisões celulares desordenadas e o fato de que o sistema imunológico não combate competidamente para destruir tais células, podem levar ao início do processo neoplásico. A mitose desenfreada provocará o aparecimento de clones de células menos diferenciadas (Holland, 2001a). Uma hipótese muito defendida recentemente é a de que tumores em geral e gliomas em especial podem conter na massa tumoral células-tronco. Células-tronco por divisão mitótica assimétrica originam novas células-tronco e células pré-cancerosas (Berger et al., 2004).

Neste trabalho de dissertação analisamos a heterogeneidade da população celular de um glioblastoma humano obtido de paciente do nosso hospital, por remoção cirúrgica. O estabelecimento de cultura de células deste tumor de fato mostrou subpopulações de células que marcavam para GFAP, um marcador astrocitário típico e nestina. A marcação de células do glioblastoma que expressam nestina, um marcador de precursores celulares pode sugerir que algumas destas células que ainda estejam num estágio precoce se comportem como células precursoras (Faria et al., 2006).

Este foi o ponto central de nossa investigação. Há células com caráter tronco na massa tumoral do glioblastoma humano GBM 95?

A imagem de Ressonância magnética do paciente, analisada pela equipe de neurocirurgia e Serviço de Patologia do HUCFF (**Figura 9**), mostra na seqüência em **T1(A)**, uma lesão heterogênea com limites pouco definidos, e captação irregular de contraste. A seqüência em **T2 (B)** mostra também uma lesão heterogênea, porém, evidenciando o componente central de necrose (centro da lesão) e marcando edema perilesional que se estende pela substância branca, podendo haver áreas de hemorragia (DeAngelis, 2001). De acordo com a classificação de OMS, este tumor possui características para ser classificado como um glioblastoma apresenta atipias nucleares, mitoses, proliferação vascular abundante e necrose (**C e D**) (**Figura 9A**). Histologicamente correlaciona-se com as imagens da ressonância (DeAngelis, 2001; Kumar et al., 2008).

Este tumor foi estabelecido em cultura e congelado, em Nitrogenio líquido em nosso laboratório. Após o descongelamento das células tumorais, estabelecemos cultura. Morfologicamente, as células, em sua maioria, apresentaram aspecto fibroblástico, mostrando características astrocíticas de aspectos fibrosos, como visto por (Moura Neto et al., 1985) em astrócitos cerebelares (**Figuras 10 A e B**). Nas **Figuras 10 C e D**, utilizando a técnica de citoquímica, evidenciamos os filamento de citoesqueleto de actina dessas células revelados por Faloidina.

Estudos realizados anteriormente com células de GBM95, em nosso laboratório, foi mostrado que células, apresentam diferenças na expressão de GFAP e Nestina (Faria et al., 2006). Como salientamos acima, isto sugere que

tais células tumorais são heterogêneas quanto a seus estágios de diferenciação.

Já que estas células, morfologicamente, apresentam características astrocitárias, começamos a analisá-las, confirmando seu padrão positivo para a proteína glial fibrilar acídica (**GFAP**), conhecida como um marcador típico de diferenciação astrocitária ((Bignami et al., 1972). Estas, em monocamada celular, foram reveladas por fluorescência (vermelho) e núcleos corados com DAPI (azul) como mostrado na **figura 11A** (Kleihues and Sobin, 2000; Kleihues et al., 2002; Faria et al., 2006).

A certificação da expressão de Nestina em células de GBM95 foi para caracterizar os achados anteriores. Nesta marcação (**Figura 11B**) vemos a revelação da proteína revelada por fluorescência verde; na **Figura 11C** usamos o marcador de citoesqueleto, anti-vimentina que é expressa em células de origem mesenquimal, além ser vista como marcador presente em qualquer célula mantida em cultura.

Para entendermos melhor a heterogeneidade observada, resolvemos verificar a presença de células indiferenciadas. Estas exibem características positivas (**Figura 12**) para **SOX2** proteína típica de células progenitoras imaturas (**A**) **Nestina** marcador de progenitor celular, descrita em tumores gliais humanos (**B**), **CD133** marcador de células-tronco. Células CD133+ e CD133- caracteristicamente formam esferas flutuantes. Estas células parecem ser resistentes à quimioterapia e portanto capazes de desenvolver recidivas tumorais (**C**) e, **OCT4** fator de transcrição, regulador de auto-renovação e marcador de células-tronco indiferenciadas durante o processo cancerígeno

(D) (Scholer et al., 1990; Kleihues and Sobin, 2000; Kleihues et al., 2002; Tomioka et al., 2002; Tai et al., 2005; Bao et al., 2006; Takahashi and Yamanaka, 2006; Atlasi et al., 2007; Patru et al., 2010) Nossos dados são semelhantes aos descritos na literatura. Assim, nossos resultados de fato apontam para uma subpopulação do GBM95 (- de 1%) que possivelmente apresenta propriedades tronco.

Alguns trabalhos indicam que o antígeno específico **SSEA4** comumente usado como marcador de superfície celular no sistema nervoso central identificam células-tronco neurais, podendo também identificar células-tronco embrionárias pluripotentes humanas. Assim como **SSEA4**, **TRA 1-60** são moléculas de superfície conhecidos como marcadores de células estaminais embrionárias humanas além de desempenharem um papel importante na regulação do desenvolvimento de células-tronco embrionárias humanas. Células indiferenciadas de GBM95 expressam as proteínas **SSEA4 (Figura 13)** e **TRA 1-60 (Figura 14)** mostrando que na população de células tumorais existem células de origem neural e estaminais (Draper et al., 2002; Son et al., 2005; Zhang et al., 2006; Barraud et al., 2007).

Para estudarmos mais detalhadamente estas células, fizemos ensaios de formação de oncoesferas (**Figura 15**).

Estas oncoesferas exibem fenótipos de células pluripotentes de GBM95 expressando proteínas características de células-tronco/progenitoras (**Figura 16**) **GFAP (A)**, **Nestina (B)**, Análises funcionais demonstram que Sox1 e Sox2 estão envolvidos na regulação da auto-renovação e diferenciação de células progenitoras neurais. **SOX1** é um gene neuroectodermal expresso por

células progenitoras embrionárias (Wichterle et al., 2002; Conti et al., 2005) **(C)**, **OCT4 (D)** e **SOX2** é expresso em todo o sistema nervoso central durante o desenvolvimento e embriogênese, tornando-se restrito em áreas com células progenitoras imaturas (Komitova and Eriksson, 2004; Nitta et al., 2006; Guth and Wegner, 2008). Portanto, um marcador molecular presente em células tronco neurais adultas (Ellis et al., 2004; Episkopou, 2005). Caracteristicamente, é expresso em oncoesferas **(E)** (Brazel et al., 2005).

Confirmamos o poder de renovação destas células plaqueando-as, individualmente. Algumas células, por divisão, foram formando esferas secundárias **(Figura 17A)** que ao serem dissociadas e colocadas na presença de diferentes fatores sofreram diferenciação para os três tipos celulares predominantes do SNC: **astrócitos**, quando tratadas com SFB expressam GFAP (vermelho) **(Figura 17B)**; **neurônios**, na presença do suplemento B27 uma combinação que promove a sobrevivência de neurônios, expressando  $\beta$ III-tubulina (verde) **(Figura 17C)** e **oligodendrócitos**, quando na presença de SFB, PDGF, as células exibiam imunomarcação nuclear para OLIG2 (vermelho) e o citoesqueleto exibindo vimentina (verde) **(Figura 17D)** e núcleos corados por DAPI ((Patru et al., 2010).

Animais Modelos têm contribuído bastante para o desenvolvimento científico da biologia dos gliomas, embora nenhum deles possa ser considerado ideal (Peterson et al., 1994; Pilkington et al., 1997).

Até o momento, não existe nenhum modelo de tumor animal capaz de simular exatamente o crescimento e vascularização dos gliomas humanos. O xenotransplante ortotópico **(transplante tumoral em seu tecido de origem**



**no animal receptor**) é o que melhor simula o padrão de crescimento dos glioma humanos (Lee et al., 2006).

Embora o implante possa ser feito de várias formas, os resultados mais interessantes têm sido obtidos quando o método de implante é feito por estereotaxia em sítios específicos (Kobayashi et al., 1980; Plunkett et al., 1988).

Baseados na hipótese de Paget, nós também acreditamos, que para o glioma o microambiente cerebral, definido pelo parênquima facilita a instalação do tumor e sua progressão. E mais, o microambiente cerebral parece manter o estado indiferenciado destas células e sua propriedade de gerar tumores, indica que estas têm características tronco.

Para avaliar a influência do ambiente *in vivo* na diferenciação de células GBM95, implantamos tanto células diferenciadas quanto células indiferenciadas (pluripotentes) em cérebro de camundongos (**Figura 19) A e B**. Quinze dias após a injeção, atestamos o desenvolvimento da massa tumoral primária (**Figura 19**) que foi dissecada e novamente colocada em cultura (**Figura 19A**). Estudando mais detalhadamente, estas células foram imunomarcadas (**Figura 20**) usando marcadores de células pluripotentes (SOX1, SOX2 e Oct-3/4). Analisando por Western blotting, surpreendentemente estas células apresentaram aumento significativo das proteínas SOX2 e Oct-3/4 (**Figura 21 e 22**) em comparação com as células originais e as oncoesferas isoladas a partir das células originais. Sugerindo que destas células e a passagem pelo microambiente cerebral fez aumentar a

pluripotencialidade o que possivelmente aumenta o potencial de tumorigenicidade (Molina et al., 2010).

Iniciamos uma avaliação por microscopia eletrônica (**Figura 23**). Em resultados preliminares em microscopia de transmissão, as células apresentam núcleos tamanhos diferenciados (**A e B**) e em microscopia de varredura as células se apresentam em colônias com indícios de cavitação (**C e D**), porém, pouco pudemos analisar com esta técnica, pelo término do prazo para a dissertação, portanto, reservamos estes resultados para perspectivas futuras.

Este conjunto de resultados discutidos aqui, nos permitem, considerar a possível existência de células-tronco em GBM95.

Esta dissertação pode corroborar para a discussão de revisão de classificação de tumores gliais, especialmente GBM em virtude da presença de células-tronco. Mas sobretudo, esta dissertação corrobora a proposta da literatura de que CTT, podem responder pelo estabelecimento de tumores e por isso merecem ser alvos de rádio e quimioterapia.

## **6. CONCLUSÃO**

---

## 6.1. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que:

1. **C**élulas de Glioblastoma (GBM95) expressam OCT4 (um marcador de auto-renovação e células indiferenciadas), além de também expressarem CD133, um marcador de células-tronco.
2. **O**ncoesferas de GBM95 expressam uma variedade considerável de marcadores de células pluripotentes. (Nestina, OCT4, SOX1, SOX2 , GFAP e  $\beta$ III-tubulina)
3. **L**inhagem de GBM95 apresenta células indiferenciadas com propriedades de auto-renovação observada pela formação de esferas flutuantes em cultura.
4. **C**élulas GBM95 quando livres de soro, mas suplementado com PDGF, FGFb e N2 são capazes e de se diferenciarem em astrócitos (GFAP), neurônios( $\beta$ III-tub.) e oligodendrócitos (OLIG2).
5. **C**élulas diferenciadas de GBM95 original xenotransplantadas em cérebro camundongos de camundongos (GBM95-X) induzem a formação tumoral.
6. **C**élulas indiferenciadas de GBM95 oncoesferas xenotransplantadas em cérebro de camundongos (GBM95-XO) induzem a formação tumoral.
7. **A**mbiente *in vivo* induz aumento da expressão de marcador de indiferenciação e auto-renovação (SOX2).
8. **E**sta dissertação pode corroborar para a discussão de revisão de classificação de tumores gliais, especialmente GBM em virtude da presença de células-tronco e mesmo de células duplamente marcadas para neurônios e astrócitos. Mas, sobretudo esta dissertação corrobora a proposta da literatura que CTTs podem responder pelo estabelecimento de tumores e por isso merecem ser alvos de radio e quimioterapia

## **7. PERSPECTIVAS**

---

## 7.1. PERSPECTIVAS

**E**sta dissertação abre algumas questões sobre as propriedades tumorais do GBM95 e também levanta uma suposição de que os demais GBMs podem apresentar um quadro celular semelhante. Uma primeira questão parece-nos evidente, a de verificar se as demais linhagens de GBMs de que dispomos mostram propriedades semelhantes. Se positivo elas reforçariam a importância de uma reclassificação destes tumores com vistas a uma nova abordagem terapêutica.

- 7.1.1. **N**ão existe cura para este tipo de tumor, terapias alternativas em conjunto com o tratamento padrão (cirurgia + quimioterapia + radioterapia) podem aumentar a sobrevida do paciente. Há diversos fármacos que de certa forma inibem ou "atrapalham" o crescimento tumoral, e podem ser usados como métodos alternativos para o tratamento, como por exemplo os flavonoides que são conhecidos pelo efeito citotóxico sobre o tumor. Ainda, estudos seguem em direção aos efeitos dos flavonoides em tumores cerebrais, observando como essas substâncias afetavam o metabolismo tumoral, induzindo morte celular e interferindo na capacidade migratória das células cancerosas.

**O**utra questão que nos parece importante é analisar a formação das oncoesferas, para verificar se elas reproduzem tumor com zonas de necrose, se todas as células têm mesmo propriedades tronco. A abordagem deste problema pode ser pelo estudo ultra-estrutural destas oncoesferas.

- 7.1.2. **M**icroscopia eletrônica mostra a presença de material celular com cavitação. No centro da oncoesfera parece ter células mortas, possivelmente por falta de nutrientes.

## **8. BIBLIOGRAFIA**

---

## 8.1. REFERÊNCIAS

- Adams, J.M., Kelly, P.N., Dakic, A., Carotta, S., Nutt, S.L., Strasser, A., 2008. Role of "cancer stem cells" and cell survival in tumor development and maintenance. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73, 451-459.
- Adams, J.M., Strasser, A., 2008. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? *Cancer Res* 68, 4018-4021.
- Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P.W., Beighton, G., Bello, P.A., Benvenisty, N., Berry, L.S., Bevan, S., Blum, B., Brooking, J., Chen, K.G., Choo, A.B., Churchill, G.A., Corbel, M., Damjanov, I., Draper, J.S., Dvorak, P., Emanuelsson, K., Fleck, R.A., Ford, A., Gertow, K., Gertsenstein, M., Gokhale, P.J., Hamilton, R.S., Hampl, A., Healy, L.E., Hovatta, O., Hyllner, J., Imreh, M.P., Itskovitz-Eldor, J., Jackson, J., Johnson, J.L., Jones, M., Kee, K., King, B.L., Knowles, B.B., Lako, M., Lebrin, F., Mallon, B.S., Manning, D., Mayshar, Y., McKay, R.D., Michalska, A.E., Mikkola, M., Mileikovsky, M., Minger, S.L., Moore, H.D., Mummery, C.L., Nagy, A., Nakatsuji, N., O'Brien, C.M., Oh, S.K., Olsson, C., Otonkoski, T., Park, K.Y., Passier, R., Patel, H., Patel, M., Pedersen, R., Pera, M.F., Piekarczyk, M.S., Pera, R.A., Reubinoff, B.E., Robins, A.J., Rossant, J., Rugg-Gunn, P., Schulz, T.C., Semb, H., Sherrer, E.S., Siemen, H., Stacey, G.N., Stojkovic, M., Suemori, H., Szatkiewicz, J., Turetsky, T., Tuuri, T., van den Brink, S., Vintersten, K., Vuoristo, S., Ward, D., Weaver, T.A., Young, L.A., Zhang, W., 2007. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 25, 803-816.
- Allen, N.J., Barres, B.A., 2009. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* 457, 675-677.
- Alvarez-Buylla, A., Lim, D.A., 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41, 683-686.
- Alves, T.R., da Fonseca, A.C., Nunes, S.S., da Silva, A.O., Dubois, L.G., Faria, J., Kahn, S.A., Viana, N.B., Marcondes, J., Legrand, C., Moura-Neto, V., Morandi, V., 2011. Tenascin-C in the extracellular matrix promotes the selection of highly proliferative and tubulogenesis-defective endothelial cells. *Exp Cell Res* 317, 2073-2085.
- Ammirati, M., Vick, N., Liao, Y.L., Ciric, I., Mikhael, M., 1987. Effect of the extent of surgical resection on survival and quality of life in patients with supratentorial glioblastomas and anaplastic astrocytomas. *Neurosurgery* 21, 201-206.
- Arshad Chaudry, Stem Cell Bioengineering. 2004. The science creative quarterly.



- Atlasi, Y., Mowla, S.J., Ziaee, S.A., Bahrami, A.R., 2007. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *Int J Cancer* 120, 1598-1602.
- Attias, M., *Preparo de Material para Microscopia Eletrônica de Transmissão e*, 1996, In: Benchimol, M., Attias, M., Cunha e Silva, N.L., Carvalho, T.M.U., *Métodos de Estudo da Célula*. Rio de Janeiro: Editoração Eletrônica - FENORTE/UENF. 85-98.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., Rich, J.N., 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756-760.
- Barnholtz-Sloan, J.S., Sloan, A.E., Schwartz, A.G., 2003. Relative survival rates and patterns of diagnosis analyzed by time period for individuals with primary malignant brain tumor, 1973-1997. *J Neurosurg* 99, 458-466.
- Barraud, P., Stott, S., Mollgard, K., Parmar, M., Bjorklund, A., 2007. In vitro characterization of a human neural progenitor cell coexpressing SSEA4 and CD133. *J Neurosci Res* 85, 250-259.
- Berger, F., Gay, E., Pelletier, L., Tropel, P., Wion, D., 2004. Development of gliomas: potential role of asymmetrical cell division of neural stem cells. *Lancet Oncol* 5, 511-514.
- Bignami, A., Eng, L.F., Dahl, D., Uyeda, C.T., 1972. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 43, 429-435.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bradl, M., Lassmann, H., 2010. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 37-53.
- Brazel, C.Y., Limke, T.L., Osborne, J.K., Miura, T., Cai, J., Pevny, L., Rao, M.S., 2005. Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell* 4, 197-207.
- Burger, P.C., Green, S.B., 1987. Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* 59, 1617-1625.

- Campbell, L.L., Polyak, K., 2007. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* 6, 2332-2338.
- Capela, A., Temple, S., 2002. LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35, 865-875.
- Clarke, M.F., Becker, M.W., Agosto, 2006. O Potencial Maligno das Células-tronco. *Scientific American Brasil: Câncer - O Lado Maligno das Células-tronco*, n.51, p.39-46.
- Clarke, M.F., Fuller, M., 2006. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell* 124, 1111-1115.
- Conti, L., Pollard, S.M., Gorba, T., Reitano, E., Toselli, M., Biella, G., Sun, Y., Sanzone, S., Ying, Q.L., Cattaneo, E., Smith, A., 2005. Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol* 3, e283.
- Corbeil, D., Fargeas, C.A., Huttner, W.B., 2001. Rat prominin, like its mouse and human orthologues, is a pentaspan membrane glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 285, 939-944.
- Daumas-Duport, C., Beuvon, F., Varlet, P., Fallet-Bianco, C., 2000a. [Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications]. *Ann Pathol* 20, 413-428.
- Daumas-Duport, C., Beuvon, F., Varlet, P., Fallet-Bianco, C., 2000b. Gliomes: classifications de l'OMS et de l'Hôpital Sainte Anne. *Ann Pathol* 20, 413-428.
- DeAngelis, L.M., 2001. Brain tumors. *N Engl J Med* 344, 114-123.
- di Tomaso, E., London, N., Fuja, D., Logie, J., Tyrrell, J.A., Kamoun, W., Munn, L.L., Jain, R.K., 2009. PDGF-C induces maturation of blood vessels in a model of glioblastoma and attenuates the response to anti-VEGF treatment. *PLoS One* 4, e5123.
- Dirks, P.B., 2010. Brain tumor stem cells: the cancer stem cell hypothesis writ large. *Mol Oncol* 4, 420-430.
- Dominguez-Bendala, J., Ricordi, C., 2003. Stem cell therapies in reparative medicine. *Cell Transplant* 12, 329-334.
- Draper, J.S., Pigott, C., Thomson, J.A., Andrews, P.W., 2002. Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. *J Anat* 200, 249-258.

- Dresemann, G., 2010. Temozolomide in malignant glioma. *Onco Targets Ther* 3, 139-146.
- Ellis, P., Fagan, B.M., Magness, S.T., Hutton, S., Taranova, O., Hayashi, S., McMahon, A., Rao, M., Pevny, L., 2004. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci* 26, 148-165.
- Episkopou, V., 2005. SOX2 functions in adult neural stem cells. *Trends Neurosci* 28, 219-221.
- Erlich, R.B., Kahn, S.A., Lima, F.R., Muras, A.G., Martins, R.A., Linden, R., Chiarini, L.B., Martins, V.R., Moura Neto, V., 2007. STI1 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways. *Glia* 55, 1690-1698.
- Faria, J., Romao, L., Martins, S., Alves, T., Mendes, F.A., de Faria, G.P., Holanda, R., Takiya, C., Chimelli, L., Morandi, V., de Souza, J.M., Abreu, J.G., Moura Neto, V., 2006. Interactive properties of human glioblastoma cells with brain neurons in culture and neuronal modulation of glial laminin organization. *Differentiation* 74, 562-572.
- Fernandes, A.M., Meletti, T., Guimaraes, R., Stelling, M.P., Marinho, P.A., Valladao, A.S., Rehen, S.K., 2010. Worldwide survey of published procedures to culture human embryonic stem cells. *Cell Transplant* 19, 509-523.
- Folkman, J., Shing, Y., 1992. Angiogenesis. *J Biol Chem* 267, 10931-10934.
- Fuchs, E., Cleveland, D.W., 1998. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279, 514-519.
- Garcia-Abreu, J., Cavalcante, L.A., Moura Neto, V., 1995. Differential patterns of laminin expression in lateral and medial midbrain glia. *Neuroreport* 6, 761-764.
- Garcion, E., Wallace, B., Pelletier, L., Wion, D., 2004. RNA mutagenesis and sporadic prion diseases. *J Theor Biol* 230, 271-274.
- Gomes, D., de Nechaud, B., Maunoury, R., Moura Neto, V., Brigaudeau, C., Labrousse, F., Dupouey, P., 1997. Glial fibrillary acidic protein expression in a new human glioma cell line in culture before and after xenogenic transplantation into nude mice. *Acta Neuropathol* 94, 376-384.
- Guth, S.I., Wegner, M., 2008. Having it both ways: Sox protein function between conservation and innovation. *Cell Mol Life Sci* 65, 3000-3018.

- Hildebrand, J.G., 1997. Neuro-oncology: biological expectancies and everyday therapy. *Curr Opin Neurol* 10, 443-444.
- Hochedlinger, K., Yamada, Y., Beard, C., Jaenisch, R., 2005. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* 121, 465-477.
- Hockfield, S., McKay, R.D., 1985. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* 5, 3310-3328.
- Holland, E.C., 2001a. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet* 2, 120-129.
- Holland, E.C., 2001b. Progenitor cells and glioma formation. *Curr Opin Neurol* 14, 683-688.
- Huang, H., Colella, S., Kurrer, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H., 2000. Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. *Cancer Res* 60, 6868-6874.
- Iwamoto, F.M., Fine, H.A., 2010. Bevacizumab for malignant gliomas. *Arch Neurol* 67, 285-288.
- Johansson, C.B., Svensson, M., Wallstedt, L., Janson, A.M., Frisen, J., 1999. Neural stem cells in the adult human brain. *Exp Cell Res* 253, 733-736.
- Kannagi, R., Cochran, N.A., Ishigami, F., Hakomori, S., Andrews, P.W., Knowles, B.B., Solter, D., 1983. Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *EMBO J* 2, 2355-2361.
- Kanu, O.O., Hughes, B., Di, C., Lin, N., Fu, J., Bigner, D.D., Yan, H., Adamson, C., 2009. Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin Med Oncol* 3, 39-52.
- Kim, S.U., de Vellis, J., 2005. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81, 302-313.
- Kirsch, M., Schackert, G., Black, P.M., 2000. Anti-angiogenic treatment strategies for malignant brain tumors. *J Neurooncol* 50, 149-163.
- Kleihues, P., Burger, P.C., Scheithauer, B.W., 1993. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol* 3, 255-268.
- Kleihues, P., Louis, D.N., Scheithauer, B.W., Rorke, L.B., Reifenberger, G., Burger, P.C., Cavenee, W.K., 2002. The WHO classification of tumors

- of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61, 215-225; discussion 226-219.
- Kleihues, P., Ohgaki, H., 1999. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol* 1, 44-51.
  - Kleihues, P., Sobin, L.H., 2000. World Health Organization classification of tumors. *Cancer* 88, 2887.
  - Kleihues, P., Soylemezoglu, F., Schauble, B., Scheithauer, B.W., Burger, P.C., 1995. Histopathology, classification, and grading of gliomas. *Glia* 15, 211-221.
  - Kobayashi, N., Allen, N., Clendenon, N.R., Ko, L.W., 1980. An improved rat brain-tumor model. *J Neurosurg* 53, 808-815.
  - Komitova, M., Eriksson, P.S., 2004. Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 369, 24-27.
  - Korkaya, H., Wicha, M.S., 2007. Selective targeting of cancer stem cells: a new concept in cancer therapeutics. *BioDrugs* 21, 299-310.
  - Kumar, H.R., Zhong, X., Sandoval, J.A., Hickey, R.J., Malkas, L.H., 2008. Applications of emerging molecular technologies in glioblastoma multiforme. *Expert Rev Neurother* 8, 1497-1506.
  - Landry, C.F., Ivy, G.O., Brown, I.R., 1990. Developmental expression of glial fibrillary acidic protein mRNA in the rat brain analyzed by in situ hybridization. *J Neurosci Res* 25, 194-203.
  - Laws, E.R., Parney, I.F., Huang, W., Anderson, F., Morris, A.M., Asher, A., Lillehei, K.O., Bernstein, M., Brem, H., Sloan, A., Berger, M.S., Chang, S., 2003. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. *J Neurosurg* 99, 467-473.
  - Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N.M., Pastorino, S., Purow, B.W., Christopher, N., Zhang, W., Park, J.K., Fine, H.A., 2006. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 9, 391-403.
  - Legler, J.M., Gloeckler Ries, L.A., Smith, M.A., Warren, J.L., Heineman, E.F., Kaplan, R.S., Linet, M.S., 1999. RESPONSE: Re: Brain and Other Central Nervous System Cancers: Recent Trends in Incidence and Mortality. *J Natl Cancer Inst* 91, 2050A-22051.

- Leibel, S.A., Scott, C.B., Loeffler, J.S., 1994. Contemporary approaches to the treatment of malignant gliomas with radiation therapy. *Semin Oncol* 21, 198-219.
- Lesser, G.J., Grossman, S., 1994. The chemotherapy of high-grade astrocytomas. *Semin Oncol* 21, 220-235.
- Liberski, P.P., Kordek, R., 1997. Ultrastructural pathology of glial brain tumors revisited: a review. *Ultrastruct Pathol* 21, 1-31.
- Lima, F.R., Gervais, A., Colin, C., Izembart, M., Neto, V.M., Mallat, M., 2001. Regulation of microglial development: a novel role for thyroid hormone. *J Neurosci* 21, 2028-2038.
- Loilome, W., Joshi, A.D., ap Rhys, C.M., Piccirillo, S., Vescovi, A.L., Gallia, G.L., Riggins, G.J., 2009. Glioblastoma cell growth is suppressed by disruption of Fibroblast Growth Factor pathway signaling. *J Neurooncol* 94, 359-366.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., Kleihues, P., 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114, 97-109.
- Maher, E.A., Furnari, F.B., Bachoo, R.M., Rowitch, D.H., Louis, D.N., Cavenee, W.K., DePinho, R.A., 2001. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 15, 1311-1333.
- Mallat, M., Chamak, B., 1994. Brain macrophages: neurotoxic or neurotrophic effector cells? *J Leukoc Biol* 56, 416-422.
- Martins, V.R., Graner, E., Garcia-Abreu, J., de Souza, S.J., Mercadante, A.F., Veiga, S.S., Zanata, S.M., Neto, V.M., Brentani, R.R., 1997. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat Med* 3, 1376-1382.
- Maurer, G.D., Tritschler, I., Adams, B., Tabatabai, G., Wick, W., Stupp, R., Weller, M., 2009. Cilengitide modulates attachment and viability of human glioma cells, but not sensitivity to irradiation or temozolomide in vitro. *Neuro Oncol* 11, 747-756.
- Merlo, A., 2003. Genes and pathways driving glioblastomas in humans and murine disease models. *Neurosurg Rev* 26, 145-158.
- Michalczyk, K., Ziman, M., 2005. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol* 20, 665-671.

- Miller, R.H., Raff, M.C., 1984. Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J Neurosci* 4, 585-592.
- Minniti, G., Salvati, M., Arcella, A., Buttarelli, F., D'Elia, A., Lanzetta, G., Esposito, V., Scarpino, S., Maurizi Enrici, R., Giangaspero, F., 2010. Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in elderly patients with glioblastoma treated with radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide. *J Neurooncol* 102, 311-316.
- Molina, J.R., Hayashi, Y., Stephens, C., Georgescu, M.M., 2010. Invasive glioblastoma cells acquire stemness and increased Akt activation. *Neoplasia* 12, 453-463.
- Moura Neto, V., Mallat, M., Alliot, F., Pessac, B., Prochiantz, A., 1985. Astrocytic cerebellar cell clones synthesize the beta' isoforms of the beta-tubulin protein family. *Neuroscience* 16, 333-341.
- Moura Neto, V., Neto, VM., Moura-Neto, V.; Lent, R., *Como Funciona o Sistema Nervoso - A Família dos Gliócitos*, 2008, In: Roberto Lent. (Org.). *Neurociência da Mente e do Comportamento*. 1ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.1, p. 61-88.
- Nitta, K.R., Takahashi, S., Haramoto, Y., Fukuda, M., Onuma, Y., Asashima, M., 2006. Expression of Sox1 during *Xenopus* early embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 287-293.
- Niwa, H., Miyazaki, J., Smith, A.G., 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24, 372-376.
- Norden, A.D., Drappatz, J., Wen, P.Y., 2008. Novel anti-angiogenic therapies for malignant gliomas. *Lancet Neurol* 7, 1152-1160.
- Nunes, M.C., Roy, N.S., Keyoung, H.M., Goodman, R.R., McKhann, G., 2nd, Jiang, L., Kang, J., Nedergaard, M., Goldman, S.A., 2003. Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med* 9, 439-447.
- Patru, C., Romao, L., Varlet, P., Coulombel, L., Raponi, E., Cadusseau, J., Renault-Mihara, F., Thirant, C., Leonard, N., Berhneim, A., Mihalescu-Maingot, M., Haiech, J., Bieche, I., Moura-Neto, V., Dumas-Duport, C., Junier, M.P., Chneiweiss, H., 2010. CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glioma-neuronal tumors. *BMC Cancer* 10, 66.

- Penuelas, S., Anido, J., Prieto-Sanchez, R.M., Folch, G., Barba, I., Cuartas, I., Garcia-Dorado, D., Poca, M.A., Sahuquillo, J., Baselga, J., Seoane, J., 2009. TGF-beta increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer Cell* 15, 315-327.
- Pesce, M., Scholer, H.R., 2001. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 19, 271-278.
- Peterson, D.L., Sheridan, P.J., Brown, W.E., Jr., 1994. Animal models for brain tumors: historical perspectives and future directions. *J Neurosurg* 80, 865-876.
- Pietsch, T., Wiestler, O.D., 1997. Molecular neuropathology of astrocytic brain tumors. *J Neurooncol* 35, 211-222.
- Pilkington, G.J., 1994. Tumour cell migration in the central nervous system. *Brain Pathol* 4, 157-166.
- Pilkington, G.J., Bjerkvig, R., De Ridder, L., Kaaijk, P., 1997. In vitro and in vivo models for the study of brain tumour invasion. *Anticancer Res* 17, 4107-4109.
- Plunkett, R.J., Weber, R.J., Oldfield, E.H., 1988. Stereotaxic implantation of dispersed cell suspensions into brain. A systematic appraisal of cell placement and survival. *J Neurosurg* 69, 228-233.
- Privat, A., 2003. Astrocytes as support for axonal regeneration in the central nervous system of mammals. *Glia* 43, 91-93.
- Pytel, P., Lukas, R.V., 2009. Update on diagnostic practice: tumors of the nervous system. *Arch Pathol Lab Med* 133, 1062-1077.
- Reardon, D.A., Rich, J.N., Friedman, H.S., Bigner, D.D., 2006. Recent advances in the treatment of malignant astrocytoma. *J Clin Oncol* 24, 1253-1265.
- Rutka, J.T., Ivanchuk, S., Mondal, S., Taylor, M., Sakai, K., Dirks, P., Jun, P., Jung, S., Becker, L.E., Ackerley, C., 1999. Co-expression of nestin and vimentin intermediate filaments in invasive human astrocytoma cells. *Int J Dev Neurosci* 17, 503-515.
- Salmon, I., Dewitte, O., Pasteels, J.L., Flament-Durand, J., Brotchi, J., Vereerstraeten, P., Kiss, R., 1994. Prognostic scoring in adult astrocytic tumors using patient age, histopathological grade, and DNA histogram type. *J Neurosurg* 80, 877-883.



- Sanai, N., Alvarez-Buylla, A., Berger, M.S., 2005. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med* 353, 811-822.
- Scholer, H.R., Dressler, G.R., Balling, R., Rohdewohld, H., Gruss, P., 1990. Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J* 9, 2185-2195.
- Schousboe, A., Sarup, A., Bak, L.K., Waagepetersen, H.S., Larsson, O.M., 2004. Role of astrocytic transport processes in glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem Int* 45, 521-527.
- Sell, S., 2004. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 51, 1-28.
- Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S.M., Goderie, S.K., Roysam, B., Temple, S., 2008. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 3, 289-300.
- Shih, A.H., Holland, E.C., 2004. Developmental neurobiology and the origin of brain tumors. *J Neurooncol* 70, 125-136.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., Dirks, P.B., 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63, 5821-5828.
- Slezak, M., Pfrieder, F.W., 2003. New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci* 26, 531-535.
- Sneed, P.K., Prados, M.D., McDermott, M.W., Larson, D.A., Malec, M.K., Lamborn, K.R., Davis, R.L., Weaver, K.A., Wara, W.M., Phillips, T.L., et al., 1995. Large effect of age on the survival of patients with glioblastoma treated with radiotherapy and brachytherapy boost. *Neurosurgery* 36, 898-903; discussion 903-894.
- Son, Y.S., Park, J.H., Kang, Y.K., Park, J.S., Choi, H.S., Lim, J.Y., Lee, J.E., Lee, J.B., Ko, M.S., Kim, Y.S., Ko, J.H., Yoon, H.S., Lee, K.W., Seong, R.H., Moon, S.Y., Ryu, C.J., Hong, H.J., 2005. Heat shock 70-kDa protein 8 isoform 1 is expressed on the surface of human embryonic stem cells and downregulated upon differentiation. *Stem Cells* 23, 1502-1513.
- Soulet, D., Rivest, S., 2008. Microglia. *Curr Biol* 18, R506-508.
- Stipursky, J., Romao, L., Tortelli, V., Neto, V.M., Gomes, F.C., 2011. Neuron-glia signaling: Implications for astrocyte differentiation and synapse formation. *Life Sci* 89, 524-531.

- Strojnik, T., Rosland, G.V., Sakariassen, P.O., Kavalari, R., Lah, T., 2007. Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival. *Surg Neurol* 68, 133-143; discussion 143-134.
- Stupp, R., Weller, M., 2010. 2010: neuro-oncology is moving! *Curr Opin Neurol* 23, 553-555.
- Tai, M.H., Chang, C.C., Kiupel, M., Webster, J.D., Olson, L.K., Trosko, J.E., 2005. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 26, 495-502.
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Teranishi, N., Naito, Z., Ishiwata, T., Tanaka, N., Furukawa, K., Seya, T., Shinji, S., Tajiri, T., 2007. Identification of neovasculature using nestin in colorectal cancer. *Int J Oncol* 30, 593-603.
- Tomioka, M., Nishimoto, M., Miyagi, S., Katayanagi, T., Fukui, N., Niwa, H., Muramatsu, M., Okuda, A., 2002. Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic Acids Res* 30, 3202-3213.
- Ullian, E.M., Christopherson, K.S., Barres, B.A., 2004. Role for glia in synaptogenesis. *Glia* 47, 209-216.
- VandenBerg, S.R., 1992. Current diagnostic concepts of astrocytic tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 51, 644-657.
- Varlet, P., Soni, D., Miquel, C., Roux, F.X., Meder, J.F., Chneiweiss, H., Daumas-Duport, C., 2004. New variants of malignant glioneuronal tumors: a clinicopathological study of 40 cases. *Neurosurgery* 55, 1377-1391: discussion 1391-1372.
- Visvader, J.E., 2011. Cells of origin in cancer. *Nature* 469, 314-322.
- Wang, J.C., Dick, J.E., 2005. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol* 15, 494-501.
- Weller, M., Wick, W., Hegi, M.E., Stupp, R., Tabatabai, G., 2010. Should biomarkers be used to design personalized medicine for the treatment of glioblastoma? *Future Oncol* 6, 1407-1414.
- Wen, P.Y., 2009. New therapies for recurrent glioblastomas. *F1000 Med Rep* 1.

- Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J.A., Jessell, T.M., 2002. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 110, 385-397.
- Wong, R.C., Ibrahim, A., Fong, H., Thompson, N., Lock, L.F., Donovan, P.J., 2011. L1TD1 is a marker for undifferentiated human embryonic stem cells. *PLoS One* 6, e19355.
- Yang, I., Aghi, M.K., 2009. New advances that enable identification of glioblastoma recurrence. *Nat Rev Clin Oncol* 6, 648-657.
- Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A.G., Olweus, J., Kearney, J., Buck, D.W., 1997. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5002-5012.
- Zhang, S., Greenfield, M.A., Mata, A., Palmer, L.C., Bitton, R., Mantei, J.R., Aparicio, C., de la Cruz, M.O., Stupp, S.I., 2006. A self-assembly pathway to aligned monodomain gels. *Nat Mater* 9, 594-601.

## **9. ANEXOS**

---

Certificate

ROSENILDE C. DE HOLANDA AFONSO

attended the XI Brazilian Symposium on Extracellular Matrix  
and VI International Symposium on Extracellular Matrix held  
in Armação dos Búzios, RJ, Brazil, on August 21-24, 2011.

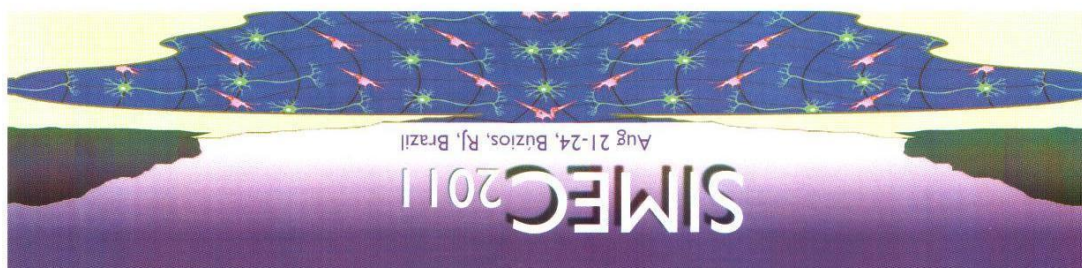


Ruy G. Jaeger



Cecilia Hedin Pereira

Organizing Committee  
SIMEC 2011



## Certificate

HUMAN GLIOBLASTOMA: A FATAL AND HETEROGENEOUS TUMOR

authored by

**AFONSO R. C. H., ASSAD S., LOBO D. S., MATIAS D., FARIA J. C. O., ROMÃO L. F., CÉSAR M. O., AGUIAR M. V. F., MATIOSZEK G. M. V., FERNANDES A. M., REHEN S., SOUZA J. M., NETO V. M.**

was presented at the Poster Session during the XI Brazilian Symposium on Extracellular Matrix and VI International Symposium on Extracellular Matrix held in Armação dos Búzios, RJ, Brazil, on August 21-24, 2011.



Ruy G. Jaeger



Cecilia Hedin Pereira

Organizing Committee  
SIMEC 2011











# Certificado

Certificamos que

**ROSENILDE CARVALHO DE HOLANDA AFONSO;SUZANA ASSAD KAHN;DENISE DA SILVEIRA LOBO; DIANA MATIAS;JANE CRISTINA DE OLIVEIRA FARIA;LUCIANA FERREIRA ROMÃO; MARCELO DE OLIVEIRA CÉSAR;MARCUS VINICIUS FARIA DE AGUIAR;GRASIELLA MARIA VENTURA MATIOSZEK;ALINE MARIE FEERNANDES;STEVENS REHEN;JORGE MARCONDES DE SOUZA;VIVALDO MOURA NETO**

apresentaram, no VI Congresso Brasileiro de Células-Tronco e Terapia Celular realizado no período de 28 de setembro a 01 de outubro de 2011, em Salvador - Bahia, trabalho intitulado "TUMOR STEM CELLS CHARACTERIZATION IN HUMAN GLIOBLASTOMA LINE", sob a forma de Poster.

162

Salvador, 01 de outubro de 2011



Ricardo Ribeiro dos Santos  
Presidente do VI Congresso Brasileiro de Células-Tronco e Terapia Celular



Rosalia Mendez-Otero  
Presidente da ABITCel

PROMOÇÃO / REALIZAÇÃO:



APÓIO:







XXIII CONGRESSO  
DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE  
MICROSCOPIA E MICROANÁLISE  
**15 a 18 de outubro de 2011**

O  
D  
A  
C  
I  
F  
I  
T  
R  
E  
C

**Certificamos que**

ROSENILDE CARVALHO DE HOLANDA AFONSO; SUZANA ASSAD KAHN; DENISE DA SILVEIRA LOBO; DIANA MATIAS; JANE CRISTINA DE OLIVEIRA FARIA; LUCIANA FERREIRA ROMAO; MARCELO DE OLIVEIRA CESAR; MARCUS VINICIUS FARIA DE AGUIAR; GRASIELLA MARIA VENTURA MATIOSZEK; ALINE MARIE FERNANDES; STEVENS REHEN; JORGE MARCONDES DE SOUZA; VIVALDO MOURA NETO

Participaram do XXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, realizado no período de 15 a 18 de outubro de 2011, no Atlântico Búzios Convention & Resort Armação dos Búzios-RJ - como autores do trabalho

“TUMOR STEM CELLS CHARACTERIZATION IN HUMAN GLIOBLASTOMA LINE”  
na modalidade PÔSTER

16695

Armação dos Búzios, 18 de outubro de 2011

*Wanderley de Souza*  
Dr. Wanderley de Souza  
Diretor da SBMM