

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

BRYAN ÔRTERO PEREZ GONÇALVES

**ANÁLISE DA HETEROGENEIDADE CELULAR E PARTICIPAÇÃO DO
FENÔMENO DE TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL (EMT) NA
CARCINOGENESE E QUIMIORESISTÊNCIA DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA
E NEUROBLASTOMA**

Belo Horizonte,
2019

BRYAN ÔRTERO PEREZ GONÇALVES

**ANÁLISE DA HETEROGENEIDADE CELULAR E PARTICIPAÇÃO DO
FENÔMENO DE TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL (EMT) NA
CARCINOGENESE E QUIMIORESISTÊNCIA DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA
E NEUROBLASTOMA**

Dissertação submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Dr. Dawidson de Assis Gomes
Coorientadora: Dra. Luciana Maria Silva

Belo Horizonte
2019

043

Gonçalves, Bryan Ôrtero Perez.

Análise da heterogeneidade celular e participação do fenômeno de transição epitélio-mesenquimal (EMT) na carcinogênese e quimioresistência de células de glioblastoma e neuroblastoma [manuscrito] / Bryan Ôrtero Perez Gonçalves. – 2019.

142 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Dawidson de Assis Gomes. Coorientadora: Dra. Luciana Maria Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Glioblastoma. 3. Neuroblastoma. 4. Cisplatino. 5. Transição Epitelial-Mesenquimal. 6. Células-Tronco Neoplásicas. I. Gomes, Dawidson de Assis. II. Silva, Luciana Maria. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615




ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE BRYAN ÔRTERO PEREZ GONÇALVES, orientado pelo Prof.Dr. Dawidson Assis Gomes, aos vinte dias do mês de novembro de 2019 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Análise da heterogeneidade celular e participação do fenômeno de transição epitélio-mesenquimal(EMT) na carcinogênese e quimioresistência de células de glioblastoma e neuroblastoma", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dawidson Assis Gomes, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Elaine Maria de Souza Fagundes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Glória Regina Franco (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Luciana Maria Silva - Coorientadora (FUNED), aprovado; Dr. Dawidson Assis Gomes - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

APROVADO
 REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 20 de novembro de 2019.


 Dr. Elaine Maria de Souza Fagundes (UFMG)


 Dr. Glória Regina Franco (UFMG)


 Dr. Luciana Maria Silva - Coorientadora (FUNED)


 Leda Quercia Vianna
 Presidente do Colegiado de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Agradeço primeiramente ao criador do universo, ao senhor Deus, pela minha vida e por estar ao meu lado todo este tempo.

À minha família, em especial meus pais, Ana e Luiz, que infelizmente não estão mais presentes fisicamente neste plano, mas onde quer que estejam saibam que sou grato por tudo que fizeram por mim. Ao meu namorado e amigo, Eduardo Resende, por estar ao meu lado durante esses dois anos de mestrado e por ter feito de mim uma nova pessoa desde quando o conheci.

Agradeço a todos da Fundação Ezequiel Dias, em especial aos membros do Serviço de Biologia Celular (SBC). Agradeço aos meus amigos de laboratório que estiveram comigo não somente nos momentos de alegria, mas também nas horas difíceis, são eles: Diego, Débora, Paula, Marco, Ana Paula, Tamires, Gabriel, Bárbara Raphaella e Diana. À Heloisa e Christiane, servidoras da FUNED, por manterem um impecável funcionamento do sistema de qualidade no laboratório, e pela agradável companhia. À Rita pessoa incrível que é responsável pelo setor de lavagem e esterilização de materiais, e mais do que isso, que se tornou uma grande amiga. Em especial à Milene, por sempre me ajudar com meus experimentos.

Agradeço a duas grandes figuras na minha vida acadêmica que fizeram parte de momentos importantes da minha vida e se tornaram duas mães científicas. À Letícia da Conceição Braga pela colaboração, preocupação com o meu aprendizado e crescimento pessoal e profissional, você é fonte de inspiração! À Luciana, chefe do SBC e que me acolheu quando ainda estava no segundo período de graduação. Não sabia que a data 01/08/14, momento que comecei minha Iniciação Científica ao seu lado, mudaria tantas coisas em minha vida, trazendo ao mesmo tempo aprendizado, crescimento científico e sobretudo maturidade.

Ao professor Dawidson por ter me aceitado como aluno no programa de Bioquímica e Imunologia. Ao professor e eterno amigo, Thiago Ratton, pois minha jornada científica começou quando você me apresentou à Luciana.

Agradeço ao Anderson Santos, ex-aluno de doutorado do departamento, por ter me auxiliado no início do projeto com o cultivo de neuroesferas, e por sempre estar disposto a me ajudar. Ao Fábio Ribeiro, por ter me ajudado com as análises no bioanalyzer. À Sílvia Fialho por ter disponibilizado as dependências do seu laboratório e a sua aluna Bárbara Silvestrini por ter me auxiliado no treinamento da CAM.

À Gaby, Júlia, Luiza e Patrick, pelos momentos felizes que me proporcionaram, juntos somos o “Gajulupabrawn”. À Isadora Sena pela ajuda com as análises histológicas. À Rânia e Paula, servidoras da FUNED pelo auxílio com as imagens das lâminas histológicas da CAM.

Agradeço a cada professor que passou pela minha vida, desde o ensino básico, fundamental, médio e superior, pois esta linda profissão a qual eu desejo seguir é a base para formação de qualquer outro profissional.

Por fim, meus sinceros agradecimentos a todos que acreditaram em mim e contribuíram de alguma forma para que este momento acontecesse.

Este trabalho foi desenvolvido no Serviço de Biologia Celular / Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias, em parceria com o programa de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

RESUMO

O câncer é uma das disfunções patológicas que mais causam temor na sociedade, perdendo somente para as doenças cardiovasculares em relação ao número de mortes. Um dos modelos que melhor explica a heterogeneidade celular observada em diferentes tipos de tumores é a presença de células-tronco do câncer (CSCs). CSCs podem se originar de células adultas diferenciadas que retornam a um estágio indiferenciado através do mecanismo conhecido como transição epitélio-mesenquimal (EMT). EMT em câncer dá origem a células com características metastáticas tais como: perda de adesão à matriz extracelular (MEC) e contato célula-célula, aumento da motilidade e resistência à apoptose. Em condições fisiológicas normais, após a embriogênese, os sinais que mantêm o evento EMT são completamente suprimidos, entretanto, observa-se que em tumores do sistema nervoso central (SNC) há uma reativação deste fenômeno. O objetivo deste trabalho foi avaliar a heterogeneidade celular e a participação do fenômeno EMT *in-vitro*, em linhagens celulares tumorais de glioblastoma/astrocitoma e neuroblastoma, nos modelos monocamada e de enriquecimento de CSC's por meio da formação de neuroesferas. As metodologias utilizadas foram: cultivo *in-vitro* de linhagens celulares de glioblastomas (U-87 MG e LN-18) e neuroblastoma (KELLY e IMR-32) nos modelos monocamada e neuroesferas; determinação do IC₅₀ (concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das células) frente ao tratamento quimioterápico com cisplatina, cuja dose determinada no modelo monocamada foi utilizada nas neuroesferas; avaliação dos transcritos *STAT3*, *ZEB1*, *TWIST1*, *TGF-beta1* e o longo RNA *HOTAIR* por qPCR em tempo real; caracterização de subpopulações celulares por citometria de fluxo e utilização do modelo da membrana corioalantoica (CAM) como estudo de recidiva oncológica e agressividade tumoral. Entre os resultados obtidos destacam-se: (i) modulação da expressão dos transcritos reguladores do fenômeno EMT após tratamento, sendo que a linhagem IMR-32 caracterizada como a mais sensível à cisplatina neste trabalho, superexpressou *STAT3* e *TGF-beta1* no modelo neuroesfera tratada; (ii) as linhagens de glioblastoma e neuroblastoma apresentam diferentes subpopulações celulares expressando marcadores mesenquimais, neurais e hematopoiéticos; (iii) as linhagens de neuroblastoma apresentam uma subpopulação celular com características de células supressoras derivadas da mielóide (MDSCs); (iv) os tumores que cresceram na CAM a partir de células residuais ao tratamento mostraram padrões de organização diferente dos controles. Sendo assim, nossos achados dão forte suporte a ideia de que as definições de características fenotípicas dos tumores podem ajudar a estabelecer melhores estratégias terapêuticas para o desenvolvimento de novas drogas alvos ou na descoberta de novos alvos de drogas.

Palavras-chave: glioblastoma, neuroblastoma, cisplatina, neuroesferas, *emt*, *cscs*

ABSTRACT

Cancer is one of the pathological dysfunctions that cause the most fear in society, losing only to cardiovascular disease in relation to the number of deaths. One of the models that best explains the cell heterogeneity observed in different types of tumors is the presence of cancer stem cells (CSCs). CSCs may originate from differentiated adult cells that return to an undifferentiated stage through the mechanism known as the epithelial-mesenchymal transition (EMT). EMT in cancer gives rise to cells with metastatic characteristics such as loss of extracellular matrix (ECM) adhesion and cell-cell contact, increased cell motility and resistance to apoptosis. Under normal physiological conditions, after embryogenesis, the signals that maintain the EMT are completely suppressed, however, it is observed that in central nervous system (CNS) tumors there is a reactivation of this phenomenon. The objective of this work was to evaluate the cellular heterogeneity and the participation of the EMT phenomenon *in-vitro*, in glioblastoma/astrocytoma and neuroblastoma tumor cell lines, in the monolayer and CSC enrichment models through the formation of neurospheres. The methodologies used were: *in-vitro* culture of glioblastoma (U-87 MG and LN-18) and neuroblastoma (KELLY and IMR-32) cell lines in monolayer and neurosphere models; determination of the IC₅₀ (concentration capable of inhibiting 50% cell growth) against cisplatin chemotherapy treatment, whose dose determined in the monolayer model was used in the neurospheres; evaluation of *STAT3*, *ZEB1*, *TWIST1*, *TGF-beta1* transcripts and long non-coding RNA, *HOTAIR*, by real time PCR; characterization of cell subpopulations by flow cytometry and use of the chorioallantoic membrane (CAM) model as a study of cancer recurrence and tumor aggressiveness. Among the results, the following observations were made: (i) exposure to cisplatin promote changes in expression of EMT regulatory transcripts, and the IMR-32 cell line characterized as the most sensitive to cisplatin in this work, overexpressed *STAT3* and *TGF-beta1* in the treated neurosphere model; (ii) glioblastoma and neuroblastoma cell lines present different cellular subpopulations expressing mesenchymal, neural and hematopoietic markers; (iii) neuroblastoma cell lines show a cell subpopulation with myeloid-derived suppressor cell characteristics (MDSCs) and (iv) tumors generated from residual cells, after exposure to cisplatin, grafted on CAM showed different patterns of organization than controls. Thus, our findings strongly support the idea that definitions of tumor phenotypic characteristics may help to establish better therapeutic strategies for the development of new drug targets.

Keywords: glioblastoma, neuroblastoma, cisplatin, neurospheres, *emt*, *cscs*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, excluindo os casos de pele não melanoma.....	14
Figura 2: As características do câncer.....	15
Figura 3: Transição epitélio-mesenquimal (EMT).....	17
Figura 4: Ativação da cisplatina e indução de danos ao DNA.....	24
Figura 5: Tipos celulares oriundos da crista neural.....	25
Figura 6: Modelo esquemático da membrana corioalantoica (CAM) para estudo de recidiva oncológica e metástase.....	30
Figura 7: Representação esquemática do sistema Transwell.....	40
Figura 8: Cálculo para avaliar a alteração da TEER das células tratadas em relação ao controle.....	41
Figura 9: Fotomicrografia das linhagens celulares cultivadas em monocamada.....	43
Figura 10: Fotomicrografia das linhagens celulares cultivadas no modelo de enriquecimento de CSCs.....	44
Figura 11: Análise da curva de sobrevida das linhagens celulares cultivadas em monocamada e tratadas com cisplatina.....	45
Figura 12: Distribuição dos valores de IC ₅₀ entre as linhagens celulares.....	46
Figura 13: Análise morfológica da linhagem U-87 MG nos modelos monocamada e neuroesfera.....	48
Figura 14: Análise morfológica da linhagem LN-18 nos modelos monocamada e neuroesfera.....	59
Figura 15: Análise morfológica da linhagem KELLY nos modelos monocamada e neuroesfera.....	50
Figura 16: Análise morfológica da linhagem IMR-32 nos modelos monocamada e neuroesfera.....	51
Figura 17: Análise da integridade do RNA total extraído das amostras em monocamada e neuroesfera.....	52
Figura 18: Análise dos alvos de EMT por qPCR utilizando SYBR.....	53
Figura 19: Curva de amplificação do lncRNA <i>HOTAIR</i> e do controle endógeno <i>ACTB</i> utilizando sondas TaqMan.....	55
Figura 20: Análise do perfil de glicosilação de U-87 MG.....	57
Figura 21: Análise do perfil de glicosilação de KELLY.....	58
Figura 22: Análise de clusters de diferenciação relacionados à presença de células tronco neurais (NSCs).....	59
Figura 23: Análise de clusters de diferenciação relacionados à presença de células tronco mesenquimais (MSCs).....	61
Figura 24: Análise de marcadores hematopoéticos.....	63
Figura 25: Rede de interação proteína-proteína e processos biológicos avaliados.....	65
Figura 26: Análise da expressão de Aldeído Desidrogenase (ALDH).....	67
Figura 27: Análise do ciclo celular por citometria de fluxo.....	69
Figura 28: Análise da resistência transepitelial/endotelial (TEER) nas linhagens celulares U-87 MG, LN-18 e KELLY cultivadas em monocamada no transwell.....	71
Figura 29: Aspecto dos tumores formados pela linhagem U-87 MG a partir de células residuais ao tratamento com cisplatina.....	73
Figura 30: Cortes longitudinais dos tumores formados pela U-87 MG no modelo monocamada.....	74
Figura 31: Cortes longitudinais dos tumores formados pela U-87 MG no modelo neuroesfera.....	75

Figura 32: Aspecto dos tumores formados pela linhagem LN-18 a partir de células residuais ao tratamento com cisplatina.....	76
Figura 33: Cortes longitudinais dos tumores formados pela LN-18 no modelo monocamada.....	77
Figura 34: Cortes longitudinais dos tumores formados pela LN-18 no modelo neuroesfera.....	78
Figura 35: Aspecto dos tumores formados pela linhagem KELLY a partir de células residuais ao tratamento com cisplatina.....	79
Figura 36: Cortes longitudinais dos tumores formados pela KELLY no modelo monocamada.....	80
Figura 37: Cortes longitudinais dos tumores formados pela KELLY no modelo neuroesfera.....	81
Figura 38: Aspecto dos tumores formados pela linhagem IMR-32 a partir de células residuais ao tratamento com cisplatina.....	82
Figura 39: Cortes longitudinais dos tumores formados pela IMR-32 no modelo monocamada.....	83
Figura 40: Cortes longitudinais dos tumores formados pela IMR-32 no modelo neuroesfera.....	84
Figura 41: Modelo esquemático das alterações promovidas pelo tratamento com cisplatina nos modelos monocamada e neuroesfera, da linhagem U-87 MG.....	85
Figura 42: Modelo esquemático das alterações promovidas pelo tratamento com cisplatina nos modelos monocamada e neuroesfera, da linhagem LN-18.....	86
Figura 43: Modelo esquemático das alterações promovidas pelo tratamento com cisplatina nos modelos monocamada e neuroesfera, da linhagem KELLY.....	87
Figura 44: Modelo esquemático das alterações promovidas pelo tratamento com cisplatina nos modelos monocamada e neuroesfera, da linhagem IMR-32.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação do grau dos tumores do Sistema Nervoso Central segundo a Organização Mundial da Saúde.....	26
Tabela 2: Concentrações da cisplatina testadas em cada linhagem celular no modelo monocamada.....	33
Tabela 3: Sequência e concentração dos iniciadores utilizados.....	36
Tabela 4: Informações sobre as lectinas utilizadas no estudo.....	38
Tabela 5: Informações dos anticorpos utilizados na citometria de fluxo.....	39

LISTA DE SIGLAS

ALDH	<i>Aldehyde dehydrogenase</i>
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
COSMIC	<i>Catalogue of somatic mutations in cancer</i>
CSC	<i>Cancer stem cell</i>
DAPI	<i>4,6-diaminidino-2-phenylindole</i>
DEAB	<i>N,N-diethylaminobenzaldehyde</i>
DMEM/F12	<i>Dulbecco's modified eagle's médium/nutriente mixture f-12 ham</i>
EGF	<i>Epidermal growth fator</i>
EMT	<i>Epithelial-to-mesenchymal transition</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
GBM	Glioblastoma
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MEC	Matriz extra celular
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NCI	National cancer institute
NSC	<i>Neural Stem Cell</i>
NB	Neuroblastoma
PBS	<i>Phosphate buffered saline (tampão fosfato-salino)</i>

SFB Soro fetal bovino

SNC Sistema Nervoso Central

WHO *World Health Organization*

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Câncer	17
1.2 Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT)	19
1.3 Células-Tronco do Câncer.....	23
1.4 Tumores do Sistema Nervoso Central.....	24
1.4.1 Neuroblastoma	25
1.4.2 Glioblastoma	29
1.5 Utilização do modelo da membrana corioalantóica (CAM) para estudo de recidiva oncológica	32
2. OBJETIVO GERAL	33
2.1 Objetivos específicos.....	34
3. METODOLOGIA	34
3.1 Cultivo celular	34
3.1.1 Cultivo em monocamada.....	35
3.1.2 Cultivo em neuroesferas.....	35
3.2 Solubilização da cisplatina	35
3.3 Ensaio de viabilidade celular.....	35
3.4 Caracterização morfológica por microscopia.....	37
3.4.1 Microscopia de fluorescência.....	37
3.4.2 Imunofluorescência	37
3.5 Biologia Molecular.....	37
3.5.1 Extração, quantificação e análise da integridade do RNA total	37
3.5.2 Tratamento do RNA total com DNase e síntese de cDNA	38
3.5.3 Análise de alvos por qPCR utilizando SYBR™	39
3.5.4 Análise do lncRNA <i>HOTAIR</i> utilizando TaqMan™	40
3.6 Caracterização celular por citometria de fluxo.....	40
3.6.1 Análise do perfil de glicosilação	40
3.6.2 Análise de clusters de diferenciação (CDs).....	41
3.6.3 Análise intracelular de Aldeído desidrogenase (ALDH).....	42
3.6.4 Análise da dinâmica do ciclo celular.....	42
3.7. Ensaio de Resistência Transepitelial/Endotelial (TEER).....	43
3.8 Ensaio da membrana corioalantoica (CAM).....	44
3.9. Análise de dados	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45

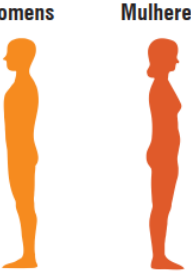
3.1	Cultivo celular	45
3.2	Análise da sobrevivência celular e determinação do IC ₅₀	47
3.3	Caracterização morfológica por microscopia de fluorescência.....	48
3.4	Ensaio de biologia molecular.....	51
3.4.1	Análise dos transcritos utilizando SYBR	52
3.4.2	Análise do lncRNA <i>HOTAIR</i> utilizando sondas TaqMan.....	54
3.5	Caracterização celular por citometria de fluxo.....	56
3.5.1	Análise do perfil de glicosilação	56
3.5.2	Análise de clusters de diferenciação	58
3.5.3	Análise de aldeído desidrogenase (ALDH).....	65
3.5.4	Análise da dinâmica do ciclo celular.....	67
3.6	Avaliação da resistência transepitelial	69
3.7	Células de tumores do sistema nervoso após exposição à cisplatina apresentaram capacidade de crescerem no modelo da CAM	71
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
6	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS	88
	APÊNDICES	98

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Atualmente a definição científica de câncer enquadra as neoplasias malignas, caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células transformadas. Existem cerca de 200 tipos de cânceres, correspondentes aos vários tipos de células do corpo, e que se diferenciam entre si pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, sejam vizinhos ou distantes (NCI, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2005). Segundo a Organização Mundial da Saúde, OMS (*World Health Organization – WHO*), o câncer faz parte do grupo de doenças não transmissíveis (DNT), além do câncer, as doenças cardiovasculares, respiratórias e diabetes também fazem parte deste grupo. Este grupo de doenças correspondem à principal causa de óbitos no mundo, sendo responsáveis por cerca de 41 milhões de óbitos (equivalente a 71% de todas as mortes anuais). O câncer é uma das disfunções patológicas que mais causam temor na sociedade, perdendo somente para as doenças cardiovasculares em relação ao número de mortes (17.9 e 9 milhões de pessoas por ano, respectivamente) (WHO, 2018).

A estimativa para o Brasil biênio 2018-2019, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), apontou a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer para cada ano. O perfil epidemiológico no Brasil é parecido com os demais países da América Latina, onde cânceres de próstata em homens e mama nas mulheres são os mais frequentes (INCA, 2018) (Figura 1). A estimativa mundial para o ano de 2020 realizada pelo projeto GLOBOCAN/*International Agency for Research on Cancer* (IARC), foi de 18.1 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes, indicando um acentuado aumento na incidência e mortalidade provocados pelo câncer, respectivamente (IARC, 2018).

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

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, excluindo os casos de pele não melanoma. FONTE: INCA, 2018.

Acredita-se que a iniciação e progressão de um câncer, processo conhecido como carcinogênese, é resultado da aquisição de sucessivas alterações genômicas em células normais (YAO; DAI, 2014). A manutenção da estabilidade genômica é fundamental para a integridade celular, prevenindo desta forma, erros que normalmente acontecem durante a replicação do DNA, ou advindos de estresses genotóxicos endógenos como aqueles causadas por espécies reativas de oxigênio (ROS), ou exógenos, como radiação ultravioleta (UV), radiação ionizante, e produtos químicos conhecidos como xenobióticos, dentre estes: o álcool, o tabaco e pesticidas (ALI; BHATTACHARYA, 2014).

Além da perda da estabilidade genômica, outras características são essenciais durante a carcinogênese e contribuem para a formação de um microambiente tumoral (CASEY *et al.*, 2015). Para que células normais evoluam para um estado neoplásico é preciso que elas adquiram algumas dessas características, dentre elas: 1) sustentação da sinalização proliferativa; 2) resistência à morte celular programada, a apoptose; 3) evasão dos supressores tumorais e 4) capacidade de invadir tecidos adjacentes e colonizar locais diferentes do tumor primário, processo conhecido como metástase (Figura 2) (HANAHAN; WEIBERG, 2011).

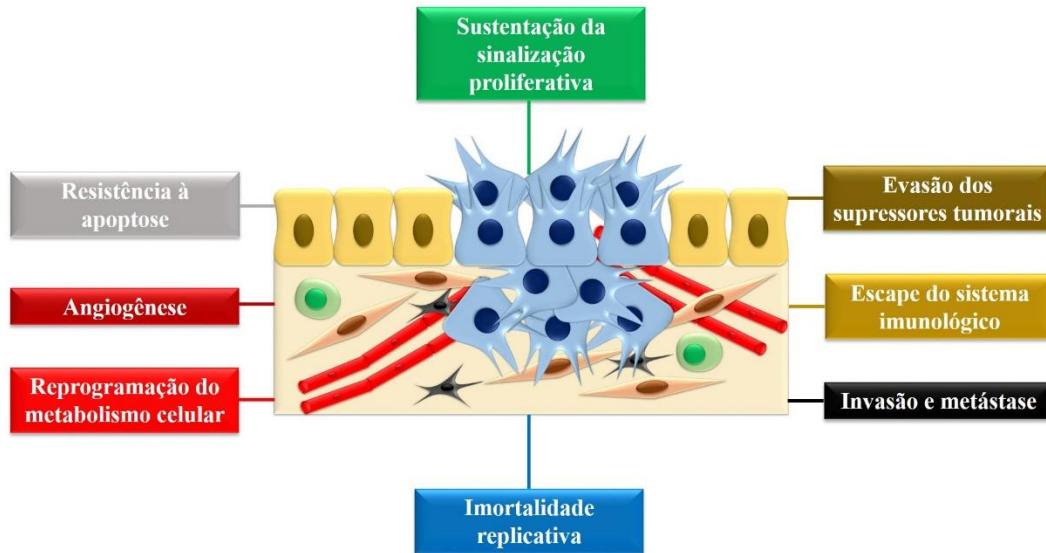


Figura 2: As características do câncer. FONTE: Adaptado de HANAHAN; WEIBERG, 2011.

A progressão do câncer frequentemente é vista como um modelo de evolução Darwiniana. Neste contexto, forças atuando sobre as células cancerígenas selecionam aquelas com maior probabilidade de sobreviver, ou seja, células que respondem melhor às mudanças dentro do microambiente tumoral, pois adquiriram fenótipos necessários para sobreviver, proliferar, disseminar e sobretudo resistir às tentativas de eliminação terapêutica. As variações

no fenótipo celular e no potencial adaptativo contribuem para a heterogeneidade intratumoral (dentro do tumor) e intertumoral (entre pacientes diagnosticados com o mesmo subtipo tumoral) (WAHL; SPIKE, 2017). O termo heterogeneidade tumoral é definido pela presença de diferentes populações celulares ou clones que abrigam perfis genotípicos e fenotípicos distintos. Essa heterogeneidade tumoral desempenha papel fundamental no crescimento, progressão e resistência à terapia além de confundir o diagnóstico do tumor (INDA *et al.*, 2014).

Um dos modelos que melhor explica a heterogeneidade celular observada em diferentes tipos de tumores é a presença de células-tronco do câncer (CSCs). Neste modelo, é proposto uma organização hierárquica na qual uma subpopulação de células-tronco com capacidade de auto-renovação e diferenciação em tipos celulares distintos é responsável pela sustentação do crescimento do tumor (VISVADER; LINDEMAN, 2008; REYA *et al.*, 2001). CSCs podem se originar de células-tronco mutadas ou células adultas diferenciadas que retornam a um estágio indiferenciado através do mecanismo conhecido como transição epitélio-mesenquimal (EMT). EMT em câncer dá origem a células com características metastáticas tais como: perda de adesão à matriz extracelular (MEC) e contato célula-célula, além da resistência à apoptose (DONGRE; WEIBERG, 2018; KIM *et al.*, 2017).

1.2 Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT)

O fenômeno de transição epitélio-mesenquimal (EMT) (Figura 3), é um evento altamente orquestrado e que envolve uma série de mudanças as quais levam a perda das características de células epiteliais como a diminuição de moléculas de adesão (E-caderina, claudinas e ocludinas) e de filamentos intermediários de citoqueratina, bem como um rearranjo na polaridade apical-basal, conduzindo a aquisição de propriedades de células mesenquimais como um formato fusiforme semelhante à fibroblastos e capacidade de invasão e migração por meio do remodelamento da matriz extracelular (MEC) com a liberação de metaloproteases e expressão de fibronectina, N-caderina, vimentina, laminina e colágeno tipo I. Durante a EMT a formação de projeções ricas em filamentos de actina conhecidas como filopódios eleva a capacidade de invasão e motilidade de células mesenquimais (KIM *et al.*, 2017).

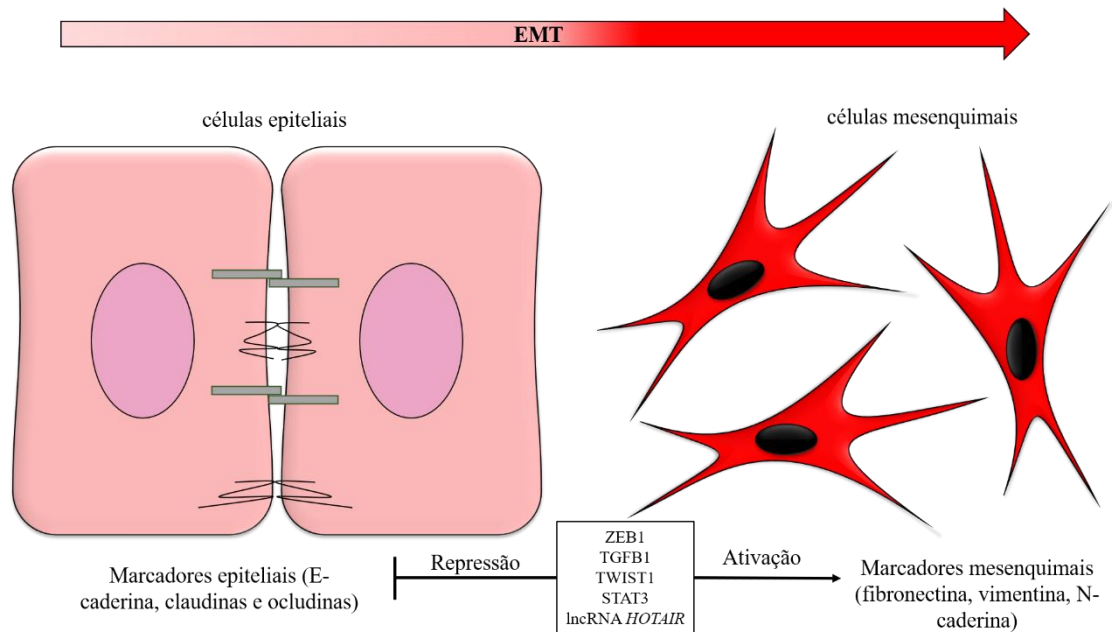


Figura 3- Transição epitélio-mesenquimal (EMT). O fenômeno EMT é caracterizado pela perda de marcadores epiteliais como E-caderina, claudinas e ocludinas e uma aquisição de marcadores mesenquimais, como fibronectina, vimentina e N-caderina. Os reguladores mestres deste evento incluem os fatores de transcrição ZEB1, TWIST1, dímeros de STAT3, o lncRNA *HOTAIR* e a proteína TGFB1. Fonte: Autoria própria.

A perda da expressão de E-caderina e consequente desestabilização das junções de adesão é um evento importante durante a EMT. Os fatores que induzem o fenômeno EMT podem ser classificados quanto a habilidade de reprimir direta ou indiretamente o gene de E-caderina. Proteínas “dedos de zinco” ou *Zinc finger* das superfamílias *Snail* e *Zeb* são repressores diretos do gene de E-caderina, estes fatores de transcrição incluem Snail1, Snail2 (Slug) e Zeb1/2. Já os fatores de transcrição da família bHLH (*basic helix-loop-helix*), estes incluem Twist1/2, são repressores indiretos do gene de E-caderina. Todos os fatores de transcrição citados acima possuem a capacidade de se ligarem à uma sequência na região promotora do gene da E-caderina, conhecida como E-box. Desta forma, alterando os perfis de metilação e acetilação e inibindo a transcrição gênica (SERRANO; MAZIVEYI; ALAHARI, 2016; GARG, 2013).

Células epiteliais podem migrar ativamente durante condições fisiológicas ou patológicas, desta forma, o evento EMT pode ser classificado de acordo com as circunstâncias em que ocorre e ser dividido em três tipos. O tipo 1 possui importante papel durante a embriogênese, especialmente na gastrulação, processo que origina as três camadas germinativas (endoderma, ectoderma e mesoderma), como também na formação do coração e da crista neural. Defeitos durante EMT tipo 1 na embriogênese estão relacionados à uma condição

patológica em recém-nascidos conhecida como fenda palatina. EMT tipo 2 está relacionado à cicatrização de feridas, regeneração tecidual e fibrose. Durante a cicatrização de feridas e regeneração tecidual, EMT estimula a geração de fibroblastos, células clássicas do tecido conjuntivo, para substituírem a parte lesionada, um fato interessante é que o epitélio da superfície dos ovários passa por este evento após o período de ovulação, este processo é desencadeado pelo fator de crescimento epidérmico (EGF). Já em fibrose tecidual, EMT induz deposição de MEC, infiltrado de células inflamatórias e acúmulo de fibroblastos, o principal fator de crescimento que desencadeia este processo é o fator de transformação do crescimento beta (TGFB) (KIM *et al.*, 2017; BARRIERE *et al.*, 2015).

Durante a carcinogênese, o processo EMT tipo 3 pode converter células epiteliais cancerosas primárias em células mesenquimais invasivas e com mobilidade aumentada, podendo causar metástases. EMT tipo 3 é essencial para que células tumorais escapem do processo de morte celular desencadeada pela apoptose, *anoikis* (um tipo particular de morte celular que ocorre devido à perda de ancoragem à MEC) e senescência celular, além de contribuir para o escape do sistema imunológico. Além disso, EMT tem sido fortemente relacionado à formação e manutenção de células-tronco tanto na embriogênese quanto no câncer. Na literatura casos de quimio/radioresistência estão associados à presença de subpopulações enriquecidas de CSCs oriundas do fenômeno EMT (KIM *et al.*, 2017; JOLLY *et al.*, 2015; SINGH; SETTLEMAN, 2010).

Muitos longos RNAs não-codificantes (*lncRNAs*) tem sido relacionados com a modulação de marcadores do fenômeno de transição epitélio-mesenquimal e também no surgimento e manutenção de CSCs. Muitos *lncRNAs* compartilham algumas características comuns com os RNAs mensageiros (mRNAs) tais como: são transcritos pela RNA polimerase II, sofrem processamento pós-transcricional com adição do sinal de poliadenilação e CAP 5'. Dentre os *lncRNAs* envolvidos no fenômeno EMT em câncer, destaca-se o *HOTAIR* (*Hox transcript antisense intergenic RNA*), um *lncRNA* com aproximadamente 2.2 kb e 6 éxons, transcrito a partir do locus *HOXC*, localizado no cromossomo 12q.13.13. Estudos têm demonstrado que a superexpressão de *HOTAIR* está relacionado à um pobre prognóstico em diferentes tipos de cânceres, como os de colorretal, ovário, mama e tumores do sistema nervoso central (XU *et al.*, 2016; HAJJARI; SALAVATY, 2015; YARMISHYN; KUROCHKIN, 2015; ZHANG *et al.*, 2013; GUTSCHNER; DIEDERICHS, 2012).

Os fatores de transcrição STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), também possuem importante papel no fenômeno EMT. As proteínas STAT são consideradas fatores de transcrição latentes, pois estão presentes no citoplasma aguardando para serem ativados. A via de ativação clássica dessas proteínas ocorre após ligação de IL-6 ou EGF à IL-6R ou EGFR, respectivamente, culminando na dimerização do receptor e aproximação das proteínas da família Janus Kinase (JAKs) a eles acopladas. Desta forma, JAKs fosforilam umas às outras e ao receptor, que servirá de sítio para ligação de STAT3 e consequente fosforilação e formação de dímeros de STAT. Dímeros de STAT3 ativos são translocados para o núcleo e se ligam à sequências específicas no DNA ativando a transcrição de genes. Dentre os alvos de STAT3 destacam-se os reguladores mestres do evento EMT: ZEB, TWIST e SNAIL, além do lncRNA *HOTAIR* (CAI *et al.*, 2018; LI; HUANG, 2017; WENDT *et al.*, 2014).

Outro evento bioquímico a ser considerado durante a EMT é a glicosilação. Glicosilação se refere à um processo enzimático de adição de carboidratos à outras moléculas como lipídeos e proteínas. Praticamente todas proteínas de membrana ou secretadas sofrem modificações pós-traducionais deste tipo, podendo ser chamadas de glicoproteínas. Existem diferentes glicanos ligados à uma proteína, sendo estes: 1) N-ligados: adicionados ao nitrogênio da cadeia lateral de arginina (Arg) ou asparagina (Asn); 2) O-ligados: glicanos adicionados ao oxigênio da hidroxila de cadeias laterais de serinas (Ser) ou treoninas (Thr); 3) fosfoglicanos: glicanos adicionados ao fosfato de uma fosfoserina; 4) C-ligados: se trata de um raro tipo de glicosilação aonde carboidratos são adicionados ao carbono da cadeia lateral de um triptofano e 5) Glipliação: proteínas são ligadas à membrana celular por meio de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (LI *et al.*, 2016; PINHO; REIS, 2015).

Células cancerosas que estão passando pela EMT aumentam a glicólise e captação da glicose. Esta alteração metabólica é importante para a geração de precursores biosintéticos que acabam alterando o perfil celular de glicosilação, originando assinaturas únicas de glicanos em diferentes tipos de tumores. Além disso, um perfil de glicosilação aberrante está envolvido na progressão do câncer, invasão, metástases, resistência à drogas e manutenção e diferenciação de CSCs (BARKEER *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2018; FONSECA *et al.*, 2016).

1.3 Células-Tronco do Câncer

A hipótese de células-tronco do câncer (*cancer stem cells* – CSCs) é um modelo atrativo e que melhor explica a heterogeneidade comumente observada em tumores sólidos e os eventos de quimio/radiorresistência e recidiva oncológica. Neste modelo, uma organização hierárquica de células com capacidade de auto-renovação e diferenciação em tipos celulares diferentes por divisão assimétrica é responsável pela sustentação do crescimento do tumor. CSCs foram inicialmente descritas em leucemia mieloide aguda por Lapidot e colaboradores (1994) que mostraram um raro subtipo celular $CD34^+CD38^-$, compreendendo entre 0.01-1% da população total do tumor, capaz de induzir leucemia quando transplantado em camundongos imunodeficientes (VISVADER; LINDEMAN, 2008).

Um dos métodos mais utilizados para o estudo de CSCs *in-vitro* é por meio do modelo de tumoresferas. Neste modelo, uma suspensão celular é semeada em baixa densidade em meio de cultura desprovido de soro fetal bovino (SFB) e suplementado com fatores que favorecem o crescimento de células-tronco como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF). Hidrocortisona, insulina e progesterona são conhecidas por induzir o crescimento de células-tronco e podem ser adicionadas, assim como heparina, para estabilizar a ligação de bFGF ao seu receptor. O modelo de tumoresferas foi inicialmente descrita em tumores cerebrais, para a formação de neuroesferas e enriquecimento de células-tronco neurais (NSCs) nesses tumores (WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015).

Existem diferentes teorias a respeito da origem de CSCs, dentre elas a de que CSCs são originadas de células-tronco/progenitoras normais que adquiriram a capacidade de formar tumores quando sofreram alterações genéticas. Outra teoria explica o surgimento de CSCs a partir de células somáticas que adquiriram características tronco ao passarem pela transição epitélio-mesenquimal (EMT) (AYOB; RAMASAMY, 2018; KIM *et al.*, 2017).

Desde sua descoberta, CSCs têm sido frequentemente isoladas e estudadas em diferentes tumores como nos de mama, ovário, próstata e do sistema nervoso central. A combinação de diferentes marcadores como CD133 (*Prominin 1*), CD44, CD24, moléculas de adesão celular como EpCAM, transportadores da família ABC e até a expressão da enzima Aldeído Desidrogenase (ALDH), tem sido utilizada para isolar subpopulações celulares enriquecidas de

CSCs. Em câncer de mama, a fração CD44⁺ CD24^{-low} é indicativo da presença de CSCs (AYOB; RAMASAMY, 2018; VISVADER; LINDEMAN, 2008).

Em glioblastomas e neuroblastomas, CD133 (*Prominin 1*) têm sido associado à presença de NSCs (AYOB; RAMASAMY, 2018; VISVADER; LINDEMAN, 2008). Outro candidato à marcador de NCSs é a molécula de adesão CD24, uma glicoproteína de membrana ancorada à GPI. Na literatura, a alta expressão desta molécula em neuroblastomas está associada com o potencial metastático desses tumores para a medula óssea (BAHMAD *et al.*, 2019). Um estudo conduzido por Soni e demais colaboradores (2017), analisou a expressão de CD24 em células-tronco do câncer em amostras clínicas de pacientes com glioblastoma e correlacionaram a alta expressão desta molécula com uma baixa sobrevida. Além disso, Lo *et al* (2009) mostraram que CD24 possui importante papel nas propriedades infiltrativas de glioblastomas. Outro marcador associado ao fenótipo de NSCs é a molécula de adesão neural (NCAM/CD56). CD56 é uma proteína que pertence à superfamília de imunoglobulinas. CD56 já foi descrito por estar associado com um comportamento mais agressivo, aumento da capacidade metastática e expressão de marcadores de CSCs em tumores do sistema nervoso (MARKOVSKY *et al.*, 2017).

NSCs não são o único tipo de células-tronco observadas em tumores do sistema nervoso central, células com perfil fenotípico semelhante à células-tronco mesenquimais (MSCs) já foram descritas. De acordo com a definição clássica, MSCs são células progenitoras com morfologia fusiforme semelhante à fibroblastos e possuem capacidade de diferenciação *in-vitro* em linhagens celulares do mesoderma como: adipócitos, condrócitos e osteócitos. Além disso, MSCs humanas expressam CD73, CD90, CD105 e CD146 e são negativas para marcadores hematopoiéticos como CD14, CD19, CD34, CD45 e HLA-DR (ULLAH; SUBBARAO; RHO, 2015; LV *et al.*, 2014).

1.4 Tumores do Sistema Nervoso Central

Muitos tumores têm origem no cérebro e medula espinhal, que juntos, compõem o Sistema Nervoso Central (SNC). Tumores do SNC constituem um grupo de neoplasias especialmente relevante devido ao impacto na longevidade e bem estar dos pacientes. Segundo o INCA, a estimativa para o Brasil, biênio 2018-2019, era de 5.810 novos casos de câncer do SNC em homens e 5.510 em mulheres para cada ano. Em homens, neoplasias malignas do SNC são a décima causa de câncer enquanto nas mulheres são a nona (Figura 1) (INCA, 2018). De

acordo com o projeto GLOBOCAN/IARC, a incidência mundial estimada para o ano de 2020 foi de 309.040 mil casos, embora este número seja menor quando comparado a outros tipos de câncer, a taxa de mortalidade é alta em tumores do SNC, 251.964 mil (CANCER RESEARCH UK, 2019; IARC, 2018).

Como todos os tumores, os do SNC podem ser classificados como primários ou secundários bem como benignos ou malignos. Em adultos, a maioria das neoplasias são secundárias causadas por metástases de outros tumores oriundos de diferentes órgãos como cânceres de mama, cólon, melanoma e rim, enquanto em crianças muitos são tumores primários originados das células que formam o SNC. Tumores do SNC primários representam apenas 2% dos casos em adultos, 25% em crianças e cerca de 15% em adolescentes. Em adultos, tumores cerebrais aumentam de acordo com a idade (CANCER RESEARCH UK, 2019).

Tumores cerebrais e da medula espinhal são nomeados de acordo com o tipo de células que os formam e a sua localização primária no SNC. Dentre os tumores do sistema nervoso central, destacam-se dois grupos: 1) tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos que compreendem glioblastomas, astrocitomas e oligodendrogliomas e 2) tumores embrionários que englobam meduloblastomas e neuroblastomas (LOUIS *et al.*, 2016).

1.4.1 Neuroblastoma

Dentre os tumores do SNC embrionários destaca-se o Neuroblastoma (NB), um tumor sólido que engloba entre 8-10% de todos os tumores em crianças até 15 anos de idade, sendo responsável por até 15% de todos os óbitos causados por tumores pediátricos. Em alguns pacientes o NB pode regredir espontaneamente conduzindo a completa recuperação sem qualquer tratamento. Em outros casos, crianças com NB desenvolvem um tumor metastático com pobre prognóstico (KHOLODENKO *et al.*, 2018; TOMOLONIS; AGARWAL; SHOHET, 2018).

Pacientes com NB de baixo ou intermediário risco, possuem prognóstico favorável e taxa de sobrevida de cinco anos em 90% dos casos. Entretanto, no caso de NB de alto risco, o qual é detectado em aproximadamente 60% dos casos, o prognóstico é desfavorável com poucas oportunidades de tratamento eficazes, e apesar da terapia agressiva, a taxa de sobrevida de até cinco anos permanece abaixo de 50% dos casos (KHOLODENKO *et al.*, 2018; TOMOLONIS; AGARWAL; SHOHET, 2018). Na maioria dos casos de pacientes com NB de alto risco, a

amplificação do oncogene MYCN é um fator prognóstico ruim e indicativo de doença metastática (BORRIELLO *et al.*, 2016).

Após o diagnóstico, o tratamento para NB inclui remoção cirúrgica, quando cabível, para tentar remover a maior parte do tumor e em alguns casos o tumor pode ser completamente retirado e tratamentos adicionais não são necessários. A quimioterapia pode ser utilizada antes da cirurgia para tentar diminuir o tumor e facilitar sua remoção. Já para alguns grupos de risco, quimio/radioterapia se tornam necessárias após o procedimento cirúrgico. O protocolo de quimioterapia consiste de ciclos que são repetidos a cada três ou quatro semanas. A duração do tratamento depende do grupo de risco em que a criança se encontra. Pacientes com NB de alto risco geralmente requerem tratamentos mais prolongados. Quimioterapia em NBs usualmente inclui uma combinação de drogas citotóxicas, dentre elas: ciclofosfamidas, vincristina, doxorrubicina, etoposídeo, topotecano, carboplatina ou cisplatina (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018; ZAGE, 2018).

O quimioterápico cisplatina ou cis-diaminodicloroplatina (II) fórmula molecular $PtCl_2N_2H_6$ promove ligações cruzadas (*crosslinks*) mono, inter ou intrafitas (Figura 4). O meio intracelular promove a dissociação dos cloretos da estrutura molecular da cisplatina. O produto hidrolisado é um importante eletrófilo que possui a capacidade de reagir com nucleófilos como grupos sulfidrilas em proteínas e átomos doadores de nitrogênio nos ácidos nucleicos. A ligação da cisplatina ao nitrogênio 7 (N7) nos anéis de purinas resulta na formação de adutos de DNA interrompendo desta forma a dinâmica do ciclo celular e induzindo a morte celular programada, conhecida como apoptose (ALDOSSARY, 2019; ROCHA *et al.*, 2018).

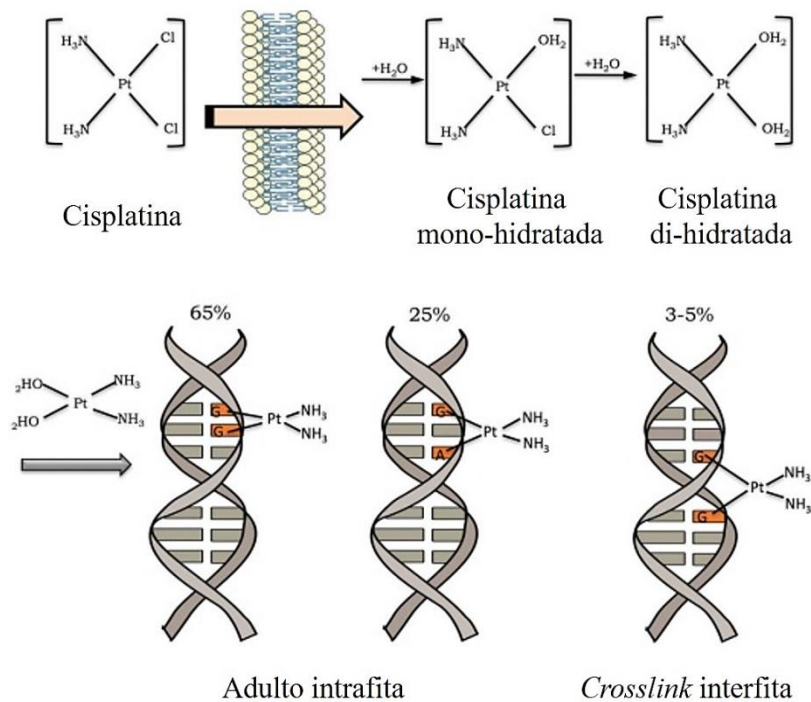


Figura 4: Ativação da cisplatina e indução de danos ao DNA. No meio intracelular, a cisplatina perde seus átomos de cloro e ganha duas moléculas de água se tornando um composto capaz de interagir com bases púricas (Adenina e Guanina), formando adultos de DNA ou ligações cruzadas entre as duas fitas (*crosslink*). FONTE: ROCHA *et al.*, 2018.

O tratamento de NB permanece um desafio devido à complexa heterogeneidade celular do tumor. Histologicamente, NBs consistem de dois tipos celulares, neuroblastos e células de Schwann, e podem ser classificados em quatro tipos morfológicos: 1) ganglioneuroma (onde células de Schwann são dominantes); 2) ganglioneuroblastoma misto (que compreende os dois tipos celulares); 3) ganglioneuroblastoma nodular (predominância de clones agressivos de neuroblastos e poucas células de Schwann) e 4) neuroblastoma (pobre em células de Schwann). Esta segregação morfológica representa os níveis de diferenciação do tumor mediada pela quimiotaxia de células de Schwann que secretam fatores anti-proliferativos e de diferenciação para neuroblastos. Portanto, ganglioneuromas representam um NB que é totalmente maturado e diferenciado devido à riqueza de células de Schwann presentes no estroma (TOMOLONIS; AGARWAL; SHOHET, 2018).

Neuroblastomas são originados a partir das células da crista neural. A crista neural é uma população celular embrionária transitória que surge durante os eventos de gastrulação e neurulação e migra por todo o embrião em desenvolvimento, diferenciando-se em diversos tecidos incluindo parte do esqueleto craniofacial, sistema nervoso simpático e periférico, células cromafins adrenais e melanócitos. Dito isto, a complexidade de tecidos derivados da

crista neural sugere a presença de progenitores multipotentes e o desenvolvimento, manutenção e diferenciação desta população de células é um processo altamente complexo. A indução, especificação, delaminação e diferenciação da crista neural envolve vias bioquímicas e moleculares rigidamente controladas. Alterações em qualquer um desses processos pode gerar neuroblastos iniciadores de tumores (TOMOLONIS; AGARWAL; SHOHET, 2018).

Como mencionado anteriormente, o processo de migração de células a partir da crista neural é dependente do evento de transição epitélio-mesenquimal (EMT). Este fenômeno contribui para a perda de adesão das células da crista neural com as células neuroepiteliais vizinhas adquirindo um fenótipo mesenquimal migratório, permitindo que as células da crista neural migrem para longe do tubo neural e colonizem locais distantes para maior especificação e diferenciação (Figura 5). Em condições fisiológicas normais, após a embriogênese, os sinais que mantêm o evento EMT ativo são completamente suprimidos, entretanto, observa-se que em tumores do sistema nervoso há uma reativação dos fatores e sinais necessários para a delaminação e migração de células da crista neural (KHOLODENKO *et al.*, 2018).

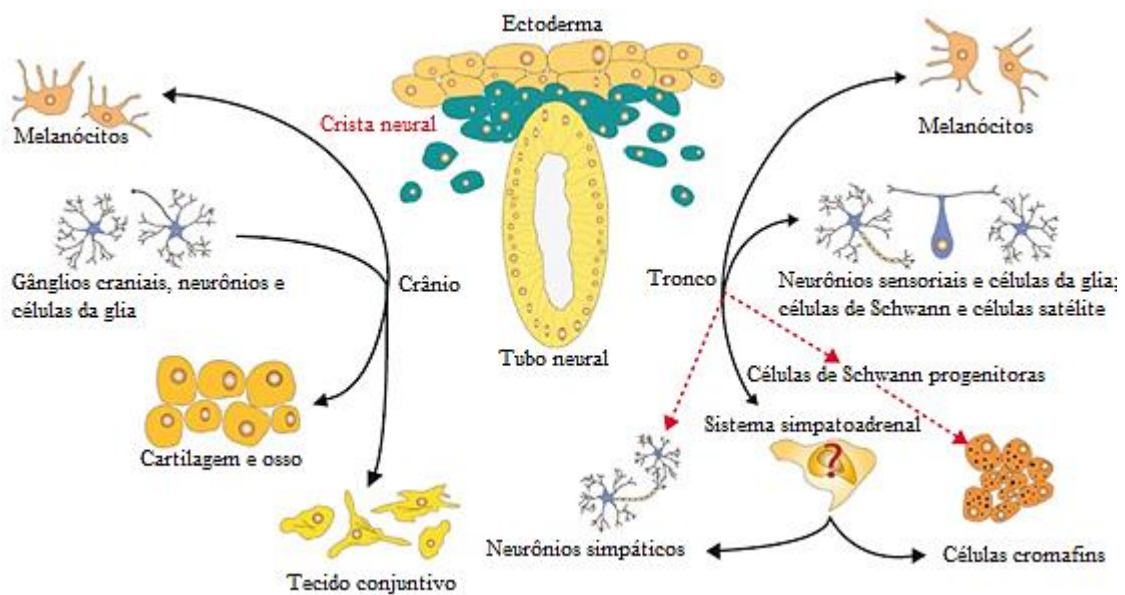


Figura 5: Tipos celulares oriundos da crista neural. Células da crista neural passam pelo fenômeno EMT e adquirem capacidade de migrar e colonizar locais distantes para se diferenciarem em outros tipos celulares como neurônios, células da glia, melanócitos e células cromafins. FONTE: KHOLODENKO, 2018.

Em NBs, as principais vias EMT têm sido relacionadas ao desenvolvimento de resistência à drogas e com uma menor sobrevida geral. Piskareva e demais colaboradores (2015), mostraram *in-vitro* utilizando linhagens celulares de NB resistentes à cisplatina, um

enriquecimento de genes envolvidos com fenótipo mesenquimal (TOMOLONIS; AGARWAL; SHOHET, 2018).

1.4.2 Glioblastoma

Glioblastoma (GBM) é um tumor cerebral maligno grau IV (Tabela 1) que acomete principalmente adultos (aproximadamente 15% de todos os casos de tumores cerebrais em adultos). Gliomas de baixo grau (I e II) crescem lentamente por muitos anos antes de manifestarem sintomas enquanto GBMs grau IV crescem rapidamente e são altamente vascularizados e infiltrativos. Uma vez diagnosticado, a expectativa de vida para gliomas grau I e glioblastomas grau IV são de 10 e 1.5 anos, respectivamente (DE WEILLE, 2014).

Tabela 1: Classificação do grau dos tumores do Sistema Nervoso Central segundo a Organização Mundial da Saúde

Grau	Descrição	Tipos representativos
Grau I (baixo grau)	Células tumorais se assemelham mais as células normais sob microscopia e crescem mais lentamente que tumores grau II, III e IV. Raramente espalham para tecidos vizinhos. Podem ser curados se removidos completamente por cirurgia.	Astrocitoma pilocítico Ganglioglioma Subependimoma
Grau II	Células tumorais crescem mais lentamente que tumores grau III e IV. Podem se espalhar para tecidos vizinhos e pode ocorrer recidiva oncológica. Alguns tumores podem se tornar tumores de alto grau (IV).	Astrocitoma difuso Ependimoma Oligodendroglioma

		Astrocitoma anaplásico
		Oligodendroglioma anaplásico
Grau III	Morfologia de células tumorais são bem diferentes de células normais e crescem mais rapidamente que tumores grau I e II. Possivelmente se espalham para tecidos vizinhos.	Oligoastrocitoma anaplásico
		Ependimoma anaplásico
		Ganglioglioma anaplásico
Grau IV (alto grau)	Morfologia das células tumorais não se assemelha às células normais. Crescimento e capacidade de espalharem para outros tecidos é rápida. Pode haver áreas de morte celular no tumor. Tumores grau IV geralmente não possuem cura.	Glioblastoma
		Gliosarcoma
		Glioblastoma de células gigantes

FONTE: NCI, 2018.

Atualmente, o tratamento para GBM inclui cirurgia para tentar retirar a maior parte do tumor, entretanto, devido à sua natureza infiltrativa, a ressecção completa raramente é possível. Após a cirurgia, o paciente é submetido à radioterapia e tratamento adjuvante com o quimioterápico Temozolomida (TMZ), um agente alquilante do DNA (ZHANG; STEVENS; BRADSHAW, 2012). Entretanto, o quimioterápico cisplatina também é utilizado no tratamento de glioblastomas, além disso, estudos clínicos de fase II tem mostrado o efeito sinérgico da combinação entre TMZ e cisplatina (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017; WANG *et al.*, 2017; VAN; HEGI; STUPP, 2006; BRANDES *et al.*, 2004). Apesar da terapia agressiva, a maioria dos pacientes sofrem recidiva devido a heterogeneidade de GBMs e a dificuldade que agentes terapêuticos possuem em atravessar a barreira hematoencefálica (SZOPA *et al.*, 2017).

Alguns marcadores moleculares tem sido utilizados na clínica para segregação dos pacientes com GBM, alguns possuem valor diagnóstico, enquanto outros são utilizados como fatores prognósticos (fornecem informações sobre progressão, sobrevida geral e até mesmo recorrência da doença) ou preditivos (auxiliam na tomada de decisões quanto ao melhor tratamento de acordo com a biologia do tumor) (SZOPA *et al.*, 2017; KARSY *et al.*, 2015).

Um biomarcador prognóstico clássico em GBM é a Isocitrato Desidrogenase (IDH), uma enzima que participa do ciclo de Krebs e que produz CO₂ e α -cetogluturato por meio de uma reação de descarboxilação oxidativa do seu substrato, o isocitrato. Mutações nesta enzima promovem o aumento da produção do oncometabólito D-2-hidroxiogluturato, o qual pode alterar os padrões de metilação de DNA em GBMs e conseqüentemente a transcrição gênica. Além disso, mutações em IDH podem diminuir a formação de um dos produtos oriundos das reações catalisadas por essa enzima, o NADPH, resultando no aumento do estresse oxidativo e eventualmente danos ao DNA. Mutações no gene que codifica o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) possuem forte prognóstico clínico em GBMs. Aproximadamente 10-60% dos pacientes com GBM primário contém uma variante deste receptor conhecida como EGFRvIII culminando na ativação constitutiva das vias de sinalização mitogênicas em GBMs. (SZOPA *et al.*, 2017; KARSY *et al.*, 2015; INDA *et al.*, 2014).

Um exemplo de biomarcador preditivo em GBMs é a enzima de reparo de DNA O-6-Metilguanina-DNA-Metiltransferase (MGMT), que transfere grupo alquila do oxigênio na posição 6 (O6) de guaninas para um resíduo de cisteína. Hipermetilação no promotor do gene desta proteína culmina na redução da sua expressão e sensibilização ao tratamento com o agente alquilante temozolomida (SZOPA *et al.*, 2017; KARSY *et al.*, 2015).

Apesar dos biomarcadores prognósticos e preditivos utilizados na clínica, o tratamento para GBMs é limitado. Parte desta limitação é devido à heterogeneidade desses tumores, sendo que a origem celular de GBMs é um fator importante para a diversidade de subtipos moleculares e celulares. Acredita-se que GBMs podem ser originados de três tipos celulares, células tronco neurais (NSCs), astrócitos derivados de NSCs e células precursoras de oligodendrócitos (OPCs). Desta forma, tumores gliais geralmente são uma mistura de astrócitos, oligodendrócitos e neurônios (YAO *et al.*, 2018; DE WEILLE, 2014).

Estudos mostraram que a fonte de GBMs poderiam ser células-tronco dormentes presentes na zona subventricular (SVZ) (JIAO; CHEN, 2008), células progenitoras recrutadas após lesões no cérebro (SALVATI *et al.*, 2004) ou relacionadas à idade (CÁRLEN *et al.*, 2009; ARVIDSSON *et al.*, 2002), ou, células gliais ativadas após algum dano cerebral ou inflamação. Após alguma lesão, células da micróglia são as primeiras a serem ativadas e a migrarem para o local lesionado (ROBEL; BERNINGER; GÖTZ, 2011). Um belíssimo trabalho desenvolvido por Lee *et al* (2018), mostrou que NSCs presentes na SVZ e que acumularam mutações em seu DNA, são capazes de originar GBMs. Após adquirirem o número de mutações necessárias,

NSCs adotam um fenótipo migratório e metastático por meio do fenômeno EMT (YAO *et al.*, 2018; DE WEILLE, 2014).

Verhaak e colaboradores (2010), analisaram 840 genes do transcriptoma de amostras clínicas de pacientes com GBM e as estratificaram em quatro subtipos: 1) Neural; 2) Pro-neural; 3) Clássico e 4) Mesenquimal. Dentre estes subtipos, o mesenquimal (MES) e pro-neural (PN) são os mais prevalentes representando 32.4% e 32.73% dos casos, respectivamente. O subtipo MES demonstra alta correlação com o processo EMT, estando enriquecido de genes que são ativamente expressos durante este evento enquanto o subtipo PN expressa genes associados com neurogênese. O subtipo MES é o mais agressivo e está fortemente associado com pobre prognóstico ao contrário do subtipo PN, caracterizado por um melhor prognóstico (FEDELE *et al.*, 2019; SZOPA *et al.*, 2017).

Apesar dessa separação, estudos tem demonstrado que o subtipo pro-neural pode alterar para o mesenquimal aumentando radio/quimiorresistência em GBMs. Piao e colaboradores (2013) mostraram que a transição pro-neural para mesenquimal favoreceu à resistência de células de GBM após terem sido tratadas com anti-VEGF (bevacizumabe). Os eventos moleculares que disparam essa transição são similares ao evento de transição epitélio-mesenquimal, como ativação das vias de sinalização STAT3 e TGFB1 e dos fatores de transcrição ZEB1 e TWIST1, além da expressão de proteínas de superfície de membrana encontradas em células com fenótipo tronco mesenquimal: CDs 73, 90, 105 e 146 (BEHNAN; FINOCCHIARO; HANNA, 2019; FEDELE *et al.*, 2019).

1.5 Utilização do modelo da membrana corioalantóica (CAM) para estudo de recidiva oncológica

A membrana corioalantóica (CAM) está localizada diretamente abaixo da casca do ovo do embrião de galinha em formação é altamente vascularizada e responsável pela troca de gases do embrião. O crescimento da CAM se inicia no 3º dia de desenvolvimento embrionário e até o 13º a CAM está completamente diferenciada. Histologicamente, o epitélio superior da CAM é de origem ectodérmica, enquanto o estroma e o epitélio inferior são de origem mesodérmica e endodérmica, respectivamente. A matriz extracelular da CAM é rica em fibronectina, laminina e colágeno tipo IV além de glicosaminoglicanos. Desta forma, as características da CAM fornecem um microambiente para o crescimento de xenoinxertos de tumores humanos e

estudo de recidiva oncológica (RIBATTI, 2017; NOWAK-SLIWINSKA; SEGURA; IRUELA-ARISPE, 2014; DERYUGINA; QUIGLEY, 2008) (Figura 6).

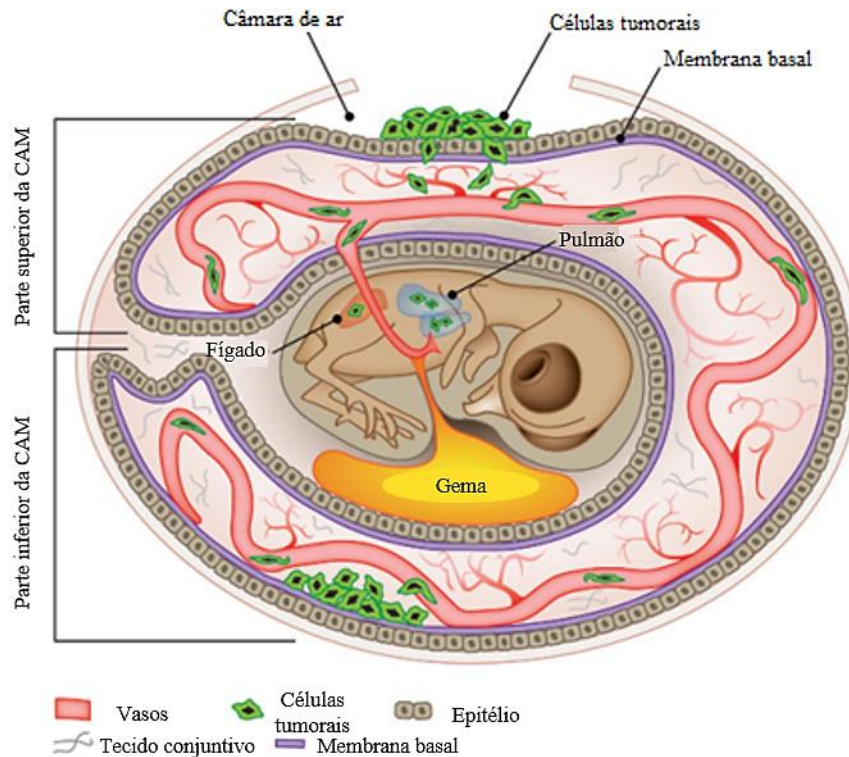


Figura 6: Modelo esquemático da membrana corioalantoica (CAM) para estudo de recidiva oncológica e metástase. Xenoenxertos de tumores colocados sobre a CAM se desenvolvem em um curto período de tempo graças ao microambiente rico em vasos sanguíneos e proteínas da matriz extracelular. FONTE: adaptado de LIU *et al.*, 2013.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a heterogeneidade celular e a participação do fenômeno de transição epitélio-mesenquimal *in-vitro*, em linhagens celulares de glioblastoma/astrocitoma e neuroblastoma nos modelos monocamada e de enriquecimento de CSC's por meio da formação de neuroesferas.

2.1 Objetivos específicos

- Estabelecer o cultivo *in-vitro* de linhagens celulares de tumores do Sistema Nervoso Central (U-87 MG, LN-18, KELLY e IMR-32) nos modelos monocamada e de enriquecimento de células tronco do câncer (CSCs) por meio de neuroesferas;
- Determinar o IC₅₀ das linhagens celulares frente ao tratamento quimioterápico com cisplatina;
- Avaliar a participação do fenômeno EMT via análise dos transcritos (*STAT3*, *ZEB1*, *TWIST1*, *TGF-beta1* e o *lncRNA HOTAIR*) no mecanismo de quimioresistência em modelos monocamada e neuroesfera antes e após tratadas com o IC₅₀ determinado;
- Avaliar o perfil do marcador epitelial (E-caderina) e mesenquimal (Fibronectina), bem como núcleo e citoesqueleto nas linhagens celulares em monocamada e neuroesferas;
- Caracterizar as subpopulações celulares quanto a expressão de marcadores de superfície de membrana envolvidos no processo EMT e o perfil de glicosilação;
- Avaliar a dinâmica do ciclo celular nas linhagens celulares em monocamada e neuroesfera antes e após tratadas com cisplatina;
- Analisar a integridade da monocamada celular por meio da medida da resistência transepitelial (TEER);
- Utilizar o modelo da membrana corioalantoica (CAM) como estudo de recidiva oncológica e agressividade tumoral.

3. METODOLOGIA

3.1 Cultivo celular

Os ensaios foram realizados utilizando dois modelos de cultura celular: I) cultura em monocamada e II) cultura em neuroesferas, conforme descrito a seguir. As linhagens foram mantidas em estufa úmida e atmosfera enriquecida com 5% de CO₂ à 37°C. Antes de cada experimento, as células foram submetidas a procedimentos de repique com uma solução

não enzimática de EDTA 15 mM (Sigma cat. E6758) por 20 minutos à 37°C. Os experimentos foram realizados obedecendo um determinado número de passagem.

3.1.1 Cultivo em monocamada

As linhagens celulares tumorais U-87 MG (glioblastoma/astrocitoma cat. HTB-14™), LN-18 (glioblastoma/astrocitoma cat. CRL-2610™) e IMR-32 (neuroblastoma cat. CCL-127™) foram adquiridas do American Type Culture Collection (ATCC®) e a linhagem KELLY (neuroblastoma cat. 92110411) foi adquirida da Sigma®. As linhagens celulares U-87 MG, LN-18 e KELLY foram cultivadas em meio DMEM Alta Glicose (Gibco cat. 12100-038) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB Gibco cat. 210115-K), 1% de L-glutamina 0.2 M, 1% de aminoácidos não essenciais (Sigma® cat. M7145), D-glucose (Sigma cat. G7021) e 1% de piruvato de sódio (Sigma cat. P2256). A linhagem IMR-32 foi cultivada em MEM (Gibco cat. G1100-053) com 10% de SFB, D-glucose, HEPES 1M (Sigma cat. H3375) e L-glutamina 0.2 mM.

3.1.2 Cultivo em neuroesferas

As linhagens celulares foram semeadas em placas de suspensão (1×10^5 /mL) em meio de enriquecimento de CSCs utilizando o meio DMEM-F12 suplementado com 2% de B-27 50x (Thermo Fisher Scientific™ cat. 1750444), 20ng/mL de EGF (Sigma® cat. E1257), 20ng/mL de bFGF (ImmunoTools cat. 11343623) e hidrocortisona 0,5 µg/mL (Sigma cat. H0888) e incubadas durante sete dias para obtenção das neuroesferas. No terceiro dia de cultivo, metade do volume do meio de cultura foi substituído por um meio novo.

3.2 Solubilização da cisplatina

A solução de trabalho do quimioterápico cisplatina (Sigma® cat. 479306 / peso molecular 300,01 g/mol) foi preparada utilizando tampão fosfato-salina (PBS 1x), 10 mg do quimioterápico foram solubilizados em PBS 1x para que a droga ficasse à 1mg/mL.

3.3 Ensaio de viabilidade celular

A citotoxicidade celular mediada pelo tratamento quimioterápico com cisplatina foi avaliada utilizando o reagente brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este ensaio baseia-se na atividade das células viáveis de reduzirem o reagente

MTT por meio das enzimas desidrogenases mitocondriais. A redução deste composto origina o formazan, um cristal de cor violeta insolúvel em água, mas que pode ser solubilizado em solventes orgânicos possibilitando a leitura colorimétrica por espectrofotometria (LOBNER, 2000; MOSMANN, 1983). A redução do MTT é diretamente proporcional a atividade mitocondrial, podendo desta forma, determinar a viabilidade celular. As linhagens celulares foram semeadas em placas de 96 poços nas seguintes concentrações: U-87 MG, KELLY e IMR-32 (5×10^4 células/poço) e LN-18 ($2,5 \times 10^4$ células/poço).

Após atingirem monocamada, o meio de cultivo foi retirado de cada poço e as células foram incubadas com diferentes concentrações de cisplatina (Tabela 2). Após 24h, o meio de cultura foi retirado e adicionado o MTT em meio sem suplementação (100µL/poço) a 0,5 mg/mL. Seguindo uma nova incubação por 3hrs, e em seguida a placa foi centrifugada por 10 minutos a 1000 RPM, o sobrenadante foi desprezado e adicionado 100 µL/poço do solvente orgânico DMSO (Merck cat. #K35781952610), a fim de solubilizar os cristais de formazan. Finalmente, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax® M5e) à 550 nM. Após a leitura no espectrofotômetro, a sobrevivência dos poços tratados foi calculada dividindo o valor da absorbância das células tratadas pela média do controle de vida e multiplicado por 100. Vale ressaltar que o experimento foi realizado também em triplicatas biológicas. O valor de IC₅₀ (concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das células) foi estimado utilizando o programa Dr Fit versão 1.042 (DI VEROLI, 2015).

Tabela 2 – Concentrações da cisplatina testadas em cada linhagem celular no modelo monocamada

Linhagens celulares cultivadas em monocamada	Concentrações de cisplatina testadas (µg/mL)
U-87 MG	200/ 100/ 50/ 25/ 12,5/ 6,25
LN-18	30/ 15/ 7,5/ 3,75/ 1,875/ 0,9375
KELLY	20/ 10/ 5/ 2,5/ 1,25/ 0,625
IMR-32	5/ 2,5/ 1,25/ 0,625/ 0,3125

3.4 Caracterização morfológica por microscopia

As marcações foram visualizadas no microscópio de fluorescência da Carl Zeiss (Axiovert 200M) e registradas utilizando o programa Carl Zeiss AxioVision Rel. 4.8.2.

3.4.1 Microscopia de fluorescência

A análise morfológica das linhagens celulares cultivadas nos modelos monocamada e neuroesfera foi realizada antes e após tratamento com cisplatina. Após serem fixadas com formaldeído 4% (Vetec cat. 0907996) a temperatura ambiente e depois de serem permeabilizadas durante 20 minutos com Triton X-100 0,1%, essas células foram marcadas por 20 minutos utilizando sondas Faloidina Alexa Fluor® 488 (Invitrogen™ cat. A12379) que reconhece filamentos de actina e em seguida, por cinco minutos utilizando sondas fluorescentes que marcam núcleo celular, DAPI (Invitrogen™ cat. D1306).

3.4.2 Imunofluorescência

As células foram fixadas com formaldeído 4% por 1h em temperatura ambiente e permeabilizadas com Triton X-100 0,1% por 20 minutos. Em seguida os poços foram lavados três vezes com PBS 1x e, em seguida, incubados com tampão de bloqueio (10% de SFB e 1% BSA em PBS 1x) por 60 minutos. Após esse período, as células foram incubadas com os anticorpos primários anti E-caderina (BD Biosciences cat. 610182) e anti-fibronectina (Invitrogen cat. 21316), diluídos em tampão de bloqueio nas concentrações recomendadas pelo fabricante por 45 minutos. Em seguida os poços foram lavados com PBS 1x por três vezes e aplicou-se o anticorpo secundário anti-IgG mouse conjugado com FITC cat. F5262 (SIGMA®) nos poços incubados com o anticorpo primário para E-caderina e o secundário anti-IgG goat conjugado com o fluorocromo Alexa 594 no poço incubado com anti-fibronectina. Após 2 horas de incubação, os poços foram lavados três vezes com PBS 1x e os núcleos das células marcados com DAPI (300 nM) por 5 minutos.

3.5 Biologia Molecular

3.5.1 Extração, quantificação e análise da integridade do RNA total

O RNA total foi extraído das linhagens celulares nos modelos monocamada e

neuroesfera antes e após o tratamento quimioterápico com o IC_{50} determinado, para isto foi utilizado o reagente TRIzol[®] (SIGMA[®]) de acordo com as instruções do fabricante. As células foram centrifugadas e o sobrenadante desprezado. Para cada 1×10^6 de células foi adicionado 1 mL de TRIzol. O reagente com as células foi homogeneizado até obter-se uma consistência com característica viscosa. O lisado celular foi transferido para microtubos de 1,5 mL e adicionados 200 μ L de clorofórmio para cada 1 mL de trizol, sendo agitado vigorosamente no vórtex por 15 segundos. As amostras foram incubadas por 3 minutos a 30°C no banho seco centrifugando em seguida por 15 minutos a 12.000g, em centrífuga refrigerada a 4°C. Após a centrifugação, formou-se três fases: 1ª fase RNA; 2ª fase proteína e 3ª fase DNA. A primeira fase foi aspirada cuidadosamente e transferida para outro microtubo de 1,5 mL com 500 μ L de isopropanol para cada 1 mL de Trizol, e então a amostra foi incubada por 10 minutos a 30°C em banho seco, centrifugando em seguida por 15 minutos a 12.000g a 4°C. Nesta fase ocorreu a sedimentação do RNA total. Em seguida foi adicionado 1 mL de etanol 75% e o RNA total foi centrifugado por 5 minutos a 7.500g a 4°C. Esta etapa foi repetida três vezes. Após a terceira centrifugação, o etanol foi descartado e o sedimento seco à temperatura ambiente, sendo ressuscitado no final da extração em água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC).

A quantificação do RNA total extraído foi realizada em espectrofotômetro de microvolume NanovueTM Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life, USA). Foram avaliados os seguintes parâmetros na quantificação: concentração, absorbâncias à 230 nm, 260 nm e 280 nm, além das razões entre as absorbâncias 260/280 e 260/230. A qualidade das amostras de RNA foi avaliada por eletroforese capilar no equipamento Bioanalyzer 2100 utilizando o Pico LabChip kit (Agilent Technologies #UE12BK30) de acordo com instruções do fabricante. A presença de duas bandas íntegras e sem arrastes, correspondentes às subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal, foram determinantes para considerar as amostras com qualidade para continuidade dos experimentos.

3.5.2 Tratamento do RNA total com DNase e síntese de cDNA

O total de 2 μ g de cada RNA total extraído foi tratado com o kit RNase-Free DNase Set[®] (Qiagen), conforme as instruções do fabricante. Foram acrescentados em um microtubo 2 μ g de RNA total, 2 μ L de tampão e 0,2 μ L de DNase. O volume foi completado com água DEPC para 20 μ L. As amostras foram incubadas por 30 minutos, a 37°C, e em

seguida, por 5 minutos a 65°C. O cDNA foi obtido utilizando-se o kit M-MLV Reverse Transcriptase (SIGMA® cat. M1302). Utilizou-se o volume/reacção dos seguintes reagentes: i) RT Buffer 1x - 2,5 µL; ii) MLV RT Enzima 200 U – 1,25 µL; iii) DNTP 0,5 mM – 1,25 µL e iv) Oligo d(T) 0,5µg – 1 µL. Foram utilizados 10 µL da amostra de RNA tratado (1 µg) com DNase e o volume final da reacção completado com Água Nuclease Free (SIGMA®), para 25 µL.

3.5.3 Análise de alvos por qPCR utilizando SYBR™

Para análise dos transcritos *ZEB1*, *TWIST1*, *TGFB1* e *STAT3* e dos controles endógenos *HPRT1* e *RPS26* (Tabela 3) foi utilizado o GoTaq qPCR MasterMix (Promega cat. A6001), conforme especificações do fabricante. A concentração do cDNA por reacção foi de 80 ng. Para averiguar contaminação por DNA genômico, foi utilizado o RNA total tratado com DNase na mesma concentração que o cDNA, nos poços identificados como NoRT (No Reverse Transcriptase) e para monitorar contaminações dos reagentes, completou-se o volume da reacção com Água Nuclease Free, nos poços identificados como NTC (No Template Control), para cada alvo. A ciclagem da PCR em tempo real foi realizada no equipamento QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific™), nas seguintes temperaturas: 95°C por 2 minutos (ativação da enzima Taq DNA polimerase); 95° C por 3 segundos (desnaturação das fitas) e 60°C por 30 segundos (passo único para anelamento e extensão). Em seguida, foi realizada uma curva de melting para avaliar a dissociação dos primers em função da temperatura. Este ensaio foi realizado em duplicatas técnicas e biológicas.

Tabela 3 – Sequência e concentração dos iniciadores utilizados

Gene	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Concentração (nM)
<i>ZEB1</i>	FW 5'TTACACCTTTGCATACAGAACCC3' RV 5'TTTACGATTACACCCAGACTGC3'	300FW/300RV
<i>TWIST1</i>	FW 5'GTCCGCAGTCTTACGAGGAG3' RV 5'GCTTGAGGGTCTGAATCTTGCT3'	300FW/200RV
<i>TGFB1</i>	FW 5'AACTGCTTCCTGTATGGGGTC3' RV 5'AAGGCGTCGTCGAATGGACTC3'	250FW/250RV
<i>STAT3</i>	FW 5'TTCTGGGCACAAACACAAAAG3' RV 5'TCAGTCACAATCAGGGAAGC3'	150FW/150RV
<i>HPRT1</i>	FW 5'CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT3' RV 5'AGACGTTTCAGTCTGTCCATAA3'	250FW/250RV
<i>RPS26</i>	FW 5'CGTGCTTCCCAAGCTGTACGTGA3' RV 5'CGATTCCGGACTACCTTGCTGTG3'	250FW/300RV

3.5.4 Análise do lncRNA *HOTAIR* utilizando TaqMan™

A expressão do longo RNA *HOTAIR* (*Hox transcript antisense intergenic RNA*) nas linhagens celulares foi avaliada utilizando TaqMan® Non-Coding RNA Assays (Applied Biosystems™ cat. PN4426961). Utilizou-se o TaqMan® Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific™ cat.4440038), conforme especificações do fabricante. A concentração de cada cDNA por reação foi de 40 ng. Foi utilizado como controle endógeno sondas para *ACTB*. O volume final de cada reação foi de 20 µL. Assim como nos ensaios com SYBR, foram utilizados controles NoRT e NTC para monitorar contaminação por DNA genômico e dos reagentes, respectivamente. A amplificação e coleta de dados foi realizada pelo equipamento QuantStudio 5 de acordo com a ciclagem estabelecida pelo fabricante. Este ensaio foi realizado em duplicatas técnicas, porém, somente uma vez.

3.6 Caracterização celular por citometria de fluxo

As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACS CANTO II (BD Bioscience) utilizando o software de aquisição FACSDiva 6.1.3 As análises posteriores de cada marcação foram realizadas utilizando o software FlowJo versão 10.

3.6.1 Análise do perfil de glicosilação

Para a análise do perfil de glicosilação das linhagens celulares de trabalho cultivadas no modelo monocamada e neuroesfera foram utilizadas oito tipos de lectinas conjugadas com o fluorocromo Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Cada lectina reconhecendo diferentes resíduos de carboidrato conforme as especificações do fabricante (Tabela 4). As células foram coletadas e lavadas com tampão de marcação (PBS 1x + 0,1% de azida sódica + 1% de SFB) e ressuspendidas em 100 µL de lectinas diluídas em PBS 1x (exceto a Concanavalina A que foi aplicada na concentração final de 100 µg, a concentração final das demais foi 25 µg). Após cinco minutos de marcação no escuro, foram adquiridos 15.000 eventos no citômetro de fluxo. As células não marcadas foram utilizadas para delimitar a marcação positiva.

Tabela 4 – Informações sobre as lectinas utilizadas no estudo.

Lectina	Glicano que reconhece	Catálogo
Isolectina GS-IB4	Terminal α -D-galactosil	I21411
Concanavalina A	Resíduos α -manopiranosil e α -glicopiranosil	C11252
GSII	Terminal não redutor α ou β ligado a N-acetil-D-glicosamina	L21415
Fitohemaglutinina-L (PHA-L)	Resíduos de N-acetilglucosamina β (1-2) manopiranosil	L11270
PNA	Terminal β -galactose	L21409
Wheat Germ Agglutinin (WGA)	Ácido siálico (N-acetilmurâmico) e N-acetilglicosamina	W11261
SBA	Terminal α ou β N-acetilglicosamina e resíduos glicopiranosil	L11272
HPA	α -N-acetilgalactosamina	L11271

3.6.2 Análise de clusters de diferenciação (CDs)

A imunofenotipagem das linhagens celulares cultivadas nos modelos monocamada e neuroesfera foi realizada utilizando o painel de anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos descrito na tabela 5. A eliminação de sobreposição de cores foi realizada após o desenho experimental na plataforma “Spectrum Viewer” da BD Bioscience. As linhagens celulares foram coletadas e lavadas com PBS 1x por cinco minutos à 1000 RPM. Após este passo, as amostras foram ressuspensas em tampão de marcação com os anticorpos conjugados e seus respectivos controles de isotipo. As amostras foram incubadas durante 15 minutos a 4°C e protegidas da luz. Em seguida, foram novamente centrifugadas e ressuspensas em 300 μ L do tampão. Foram adquiridos 15.000 eventos no citômetro de fluxo. Vale ressaltar que a imunofenotipagem foi realizada em duplicatas biológicas para cada célula nos modelos estudados.

Tabela 5 – Informações dos anticorpos utilizados na citometria de fluxo

Anticorpo	Fluorocromo	Fabricante	Lote ou Catálogo	Concentração	Isotipo
CD133	PE	Milteny Biotec	Lote: 5130531177	1:11	IgG1k+PE
CD34	APC	BD	555824	8 µL em 40	IgG1k+APC
CD45	AmCyam	BD	339192	2 µL em 40	IgG1k+AmCyam
CD146	PE	BD	550315	6 µL em 40	IgG1k+PE
CD73	FITC	BD	561254	2 µL em 40	IgG1k+FITC
CD105	PerCP-Cy 5.5	BD	560819	1,5 µL em 40	IgG1k+PerCP-Cy 5.5
CD90	PeCy 7	BD	561558	2 µL em 40	IgG1k+PeCy 7
CD24	FITC	Immuno Tools	21275513	2 µL em 40	IgG1k+FITC
HLA-DR	PE	Immuno Tools	21388994	2 µL em 40	IgG2a+PE
CD19	V450	BD	4006877	2 µL em 40	IgG1k+V450
CD14	PE	BD	555398	8 µL em 40	IgG2ak+PE
CD56	APC	BD	555518	8 µL em 40	IgG1k+APC

3.6.3 Análise intracelular de Aldeído desidrogenase (ALDH)

Para identificação das células ALDH⁺ foi utilizado o kit ALDEFLUOR Stem Cell Identification (Stemcell Technologies cat. #01700) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foi coletado 1×10^6 células e lavadas com PBS 1x durante cinco minutos por 1000 RPM. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 mL do tampão de marcação disponibilizado pelo kit e foi adicionado 5 µL do reagente ALDEFLUOR, substrato intracelular de ALDH que entra por difusão passiva nas membranas de células viáveis. Após este passo, 500 µL foram adicionados à um novo tubo contendo 5 µL do reagente DEAB, um inibidor seletivo de ALDH e utilizado como um controle negativo no momento em que delimitamos a população celular positiva para ALDH (ZHOU *et al.*, 2019). Foram adquiridos 100.000 eventos no citômetro de fluxo conforme indicação do fabricante do kit.

3.6.4 Análise da dinâmica do ciclo celular

Para avaliar os efeitos de cisplatina na dinâmica do ciclo celular, as linhagens celulares U-87 MG, LN-18 e KELLY em monocamada e no modelo neuroesfera foram marcadas

utilizando DAPI (POZAROWSKI; DARZYNKIEWICZ, 2004). As células foram coletadas e lavadas com PBS 1x por cinco minutos à 1000 RPM. Em seguida foram fixadas em etanol 70% por no mínimo 2 horas, após esse período, as células foram novamente lavadas com PBS 1x e posteriormente marcadas protegidas da luz, com uma solução de DAPI à 300 nM e Triton X-100 1% diluídos em PBS 1x, durante 30 minutos. Foram adquiridos 15.000 eventos no citômetro de fluxo, lidos no canal do fluorocromo Pacific-blue. As análises do ciclo celular foram realizadas dentro de uma plataforma específica do FlowJo, onde é necessário a identificação manual somente da fase 2N (G₁) e automaticamente as outras fases do ciclo são reconhecidas, S e 4N (G₂/M)

3.7. Ensaio de Resistência Transepitelial/Endotelial (TEER)

Neste ensaio, as linhagens celulares em monocamada foram cultivadas sobre a membrana de um inserto de 24 mm de diâmetro do sistema Transwell[®] da Corning (cat. 3452) (Figura 7). A membrana possui poros de 3 µM e é feita de poliéster (PET). A resistência celular (TEER) foi mensurada após as células atingirem monocamada (T₀h) com o auxílio de um par de eletrodos do equipamento Millicell[®] ERS-2 da Millipore, e depois de serem tratadas com Cisplatina no IC₅₀ calculado e TGF-α à 10 ng/mL (Sigma cat. T7924) nos tempos 3, 6, 24, 48 e 72h. O valor da TEER é dado em Ohms (Ω) e para obter a resistência correta, deve-se subtrair o valor da resistência do poço com células, do poço somente com o meio de cultivo, e multiplicar a resistência obtida, pela área da membrana (4.67 cm²). Posterior à este cálculo, dividiu-se ainda a TEER do inserto contendo células tratadas (com cisplatina ou TGF-α) pelo inserto das células somente com o meio de cultivo (controle), para cada tempo avaliado e multiplicou-se por 100 (figura 8).

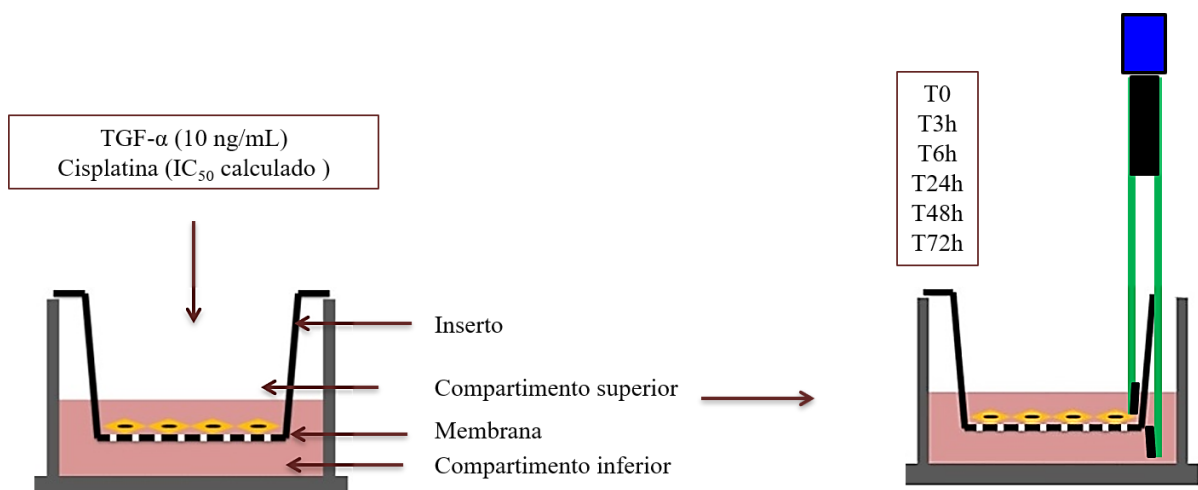


Figura 7: Representação esquemática do sistema Transwell. Fonte: Adaptado de < <https://www.corning.com/emea/de/products/life-sciences/products/permeable-supports/transwell-snapwell-netwell-falcon-permeable-supports.html>>.

$$\text{Alteração da TEER (\%) das células tratada em relação ao controle} = \frac{\text{TEER do tratamento (t}_x\text{)}}{\text{TEER do controle (t}_x\text{)}} \times 100$$

Figura 8: Cálculo para avaliar a alteração da TEER das células tratadas em relação ao controle.

3.8 Ensaio da membrana corioalantoica (CAM)

Ovos fertilizados de *Gallus gallus domesticus* foram adquiridos no nono dia embrionário do incubatório RIVELLI localizado na cidade de Mateus Leme, Minas Gerais, e mantidos em incubadora umidificada à 37,7 ° C (Premium Ecológica). Uma abertura na casca do ovo foi realizada cuidadosamente utilizando tesouras e pinças estéreis. A membrana localizada logo abaixo do ovo foi umedecida com PBS 1x e retirada, desta forma foi possível visualizar a CAM. A abertura foi selada com fita adesiva e os ovos foram mantidos na incubadora até o momento de aplicar as células no 10º dia de desenvolvimento embrionário. Para a realização deste experimento 3×10^5 células nos modelos monocamada e neuroesfera de U-87 MG, LN-18, KELLY e IMR-32 ressuspendidas em 40 µL de PBS 1x foram colocadas próximo ao vaso sanguíneo de maior calibre. Após a deposição das células, os ovos foram colocados novamente na incubadora. Seis ovos foram utilizados para cada grupo (células sem tratamento e residuais ao tratamento com cisplatina, além do controle de PBS 1x). O experimento durou até o 13º dia e teve a dispensa do comitê de ética uma vez que o sistema nervoso do embrião ainda não está completamente formado (Apêndice 7). Os ovos foram fotografados para registro do crescimento dos tumores com auxílio do estereomicroscópio SZ61 (Olympus) e o software à ele acoplado. Parte da CAM contendo os tumores foi retirada e fixada em paraformaldeído 10% para análises histológicas e coradas com hematoxilina e eosina.

3.9. Análise de dados

Os dados de qPCR foram analisados na plataforma Cloud (Thermo Fisher Scientific), a fim de determinar os Cts para cada alvo. A expressão relativa foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Este método analisa as mudanças na expressão dos alvos na amostra tratada em relação a mesma amostra não tratada (também chamada de calibradora ou amostra de referência), considerando o controle endógeno como normalizador. Assim, é possível verificar a subexpressão ou superexpressão dos genes alvo (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O banco de dados STRING (versão 10.5) foi usado para a visualização de uma rede de interação proteína-proteína (PPI) (SZKLARCZYK *et al.*, 2014), enquanto o perfil TP53 das linhagens celulares foi obtido no banco de dados TP53 IARC (<http://p53.iarc.fr/CellLines.aspx>.) As análises estatísticas foram realizadas no software SPSS 20 (IBM) usando os métodos mais apropriados para cada análise.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cultivo celular

A figura 9 mostra uma micrografia das linhagens cultivadas no modelo monocamada. Embora classificadas como glioblastomas/astrocitomas, U-87 MG e LN-18 apresentam padrões morfológicos e de crescimento distintos, quando cultivadas no modelo monocamada. A linhagem U-87 MG é constituída de células com morfologia alongada e de crescimento lento, e embora saibamos que tumores gliais são uma mistura de astrócitos, oligodendrócitos e neurônios (YAO *et al.*, 2018; DE WEILLE, 2014), essa linhagem apresenta células com características fortemente associadas à neurônios. Resultados iniciais deste trabalho, confirmaram esses achados ao cultivarmos U-87 MG sobre uma matriz de laminina e fibronectina onde foi possível visualizar extensas projeções semelhantes a prolongamentos de neurônios em cultura, além disso, identificamos a presença de sinapsina nessas células, uma fosfoproteína que reveste vesículas de sinapse em neurônios e regula o tráfego e liberação dessas vesículas no terminal pré-sináptico (SONG; AUGUSTINE, 2015) (Apêndice 1). Já LN-18 possui a tendência de crescer em colônias, além disso, observamos células menores crescendo ao redor de células maiores e que se assemelham à macrófagos, lembrando que por ser um

glioblastoma é comum encontrar células deste tipo uma vez que micróglia são macrófagos com funções de fagocitose no sistema nervoso (Apêndice 2) (ROESCH *et al.*, 2018). As linhagens KELLY e IMR-32 possuem morfologia semelhante, ambas crescem em colônias e soltam facilmente da garrafa de cultivo.

A figura 10 mostra uma micrografia das linhagens celulares cultivadas no modelo neuroesfera no terceiro dia (momento em que houve a troca de meio), e no sétimo e último dia de incubação. Observamos que as neuroesferas de U-87 MG e LN-18 formam estruturas tridimensionais mais compactas do que as formadas pelas linhagens KELLY e IMR-32, as quais são facilmente dissociadas por pipetagens.

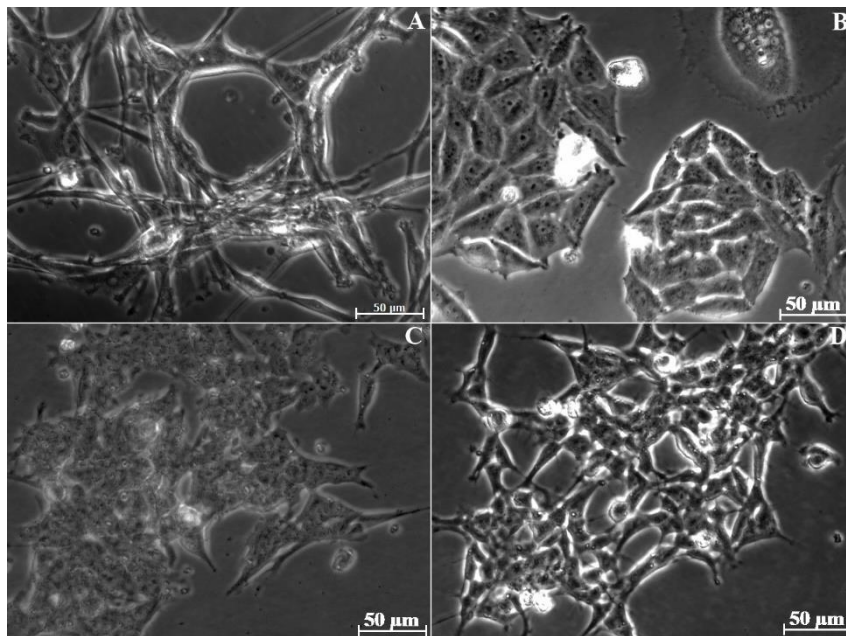


Figura 9: Fotomicrografia das linhagens celulares cultivadas em monocamada. A) U-87 MG; B) LN-18; C) KELLY e D) IMR-32.

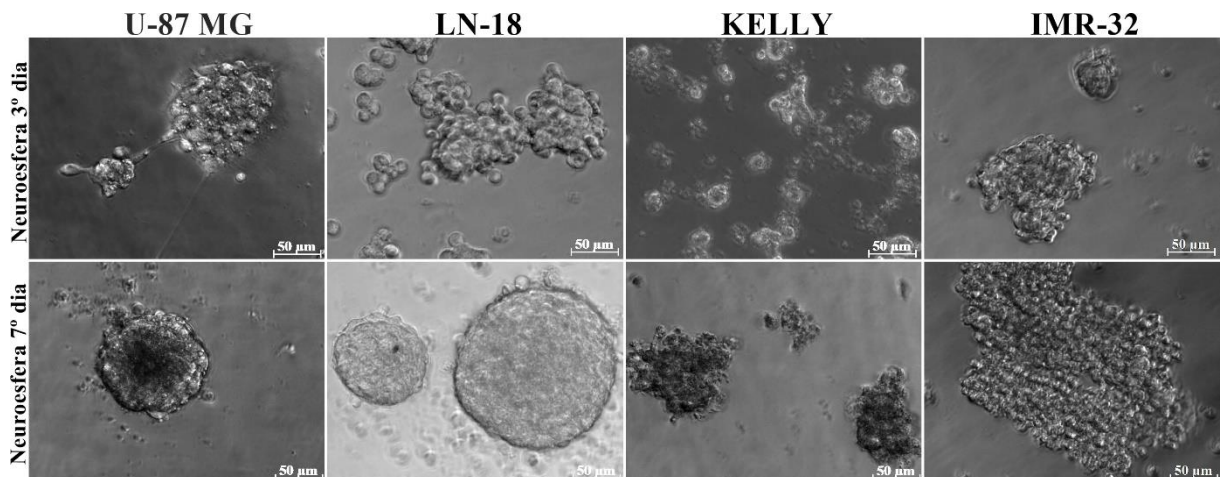


Figura 10: Fotomicrografia das linhagens celulares cultivadas no modelo de enriquecimento de CSCs.

3.2 Análise da sobrevida celular e determinação do IC₅₀

Nossos resultados mostraram diferenças estatísticas na curva de sobrevida de cada linhagem celular em monocamada tratada com cisplatina (Figura 11). Baseado na análise da curva de sobrevida, os valores de IC₅₀ foram estimados por meio do software Dr Fit. A média do IC₅₀ de três experimentos independentes foi calculada (Apêndice 3). Análises estatísticas revelaram uma clara distribuição da dose necessária para inibir 50% do crescimento entre as linhagens (Figura 12). A linhagem U-87 MG demonstrou-se a mais resistente ao tratamento com cisplatina (125,13 µg/mL), seguida de LN-18 (13,7 µg/mL). As linhagens de neuroblastoma KELLY e IMR-32 foram as mais sensíveis ao tratamento com cisplatina, o IC₅₀ determinado para cada uma foi 6,83 e 2,29 µg/mL, respectivamente.

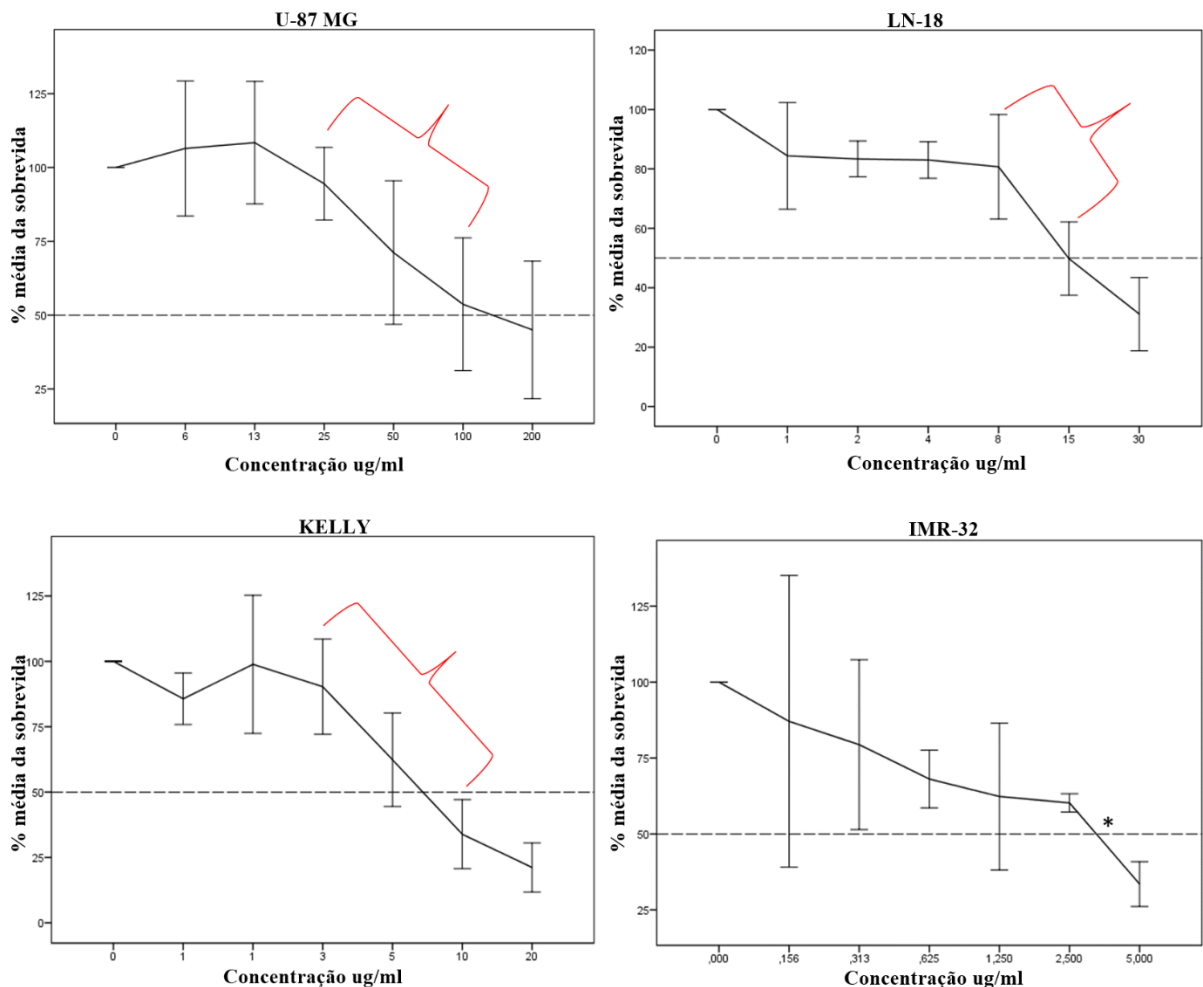


Figura 11: Análise da curva de sobrevida das linhagens celulares cultivadas em monocamada e tratadas com cisplatina. Observa uma dose-resposta entre 25-100 µg/mL para U-87 MG; 8-15 µg/mL para LN-18; 3-10 µg/mL para KELLY e entre 2,5-5 µg/mL para IMR-32. $p < 0,05$. Anova pos-hoc LSD.

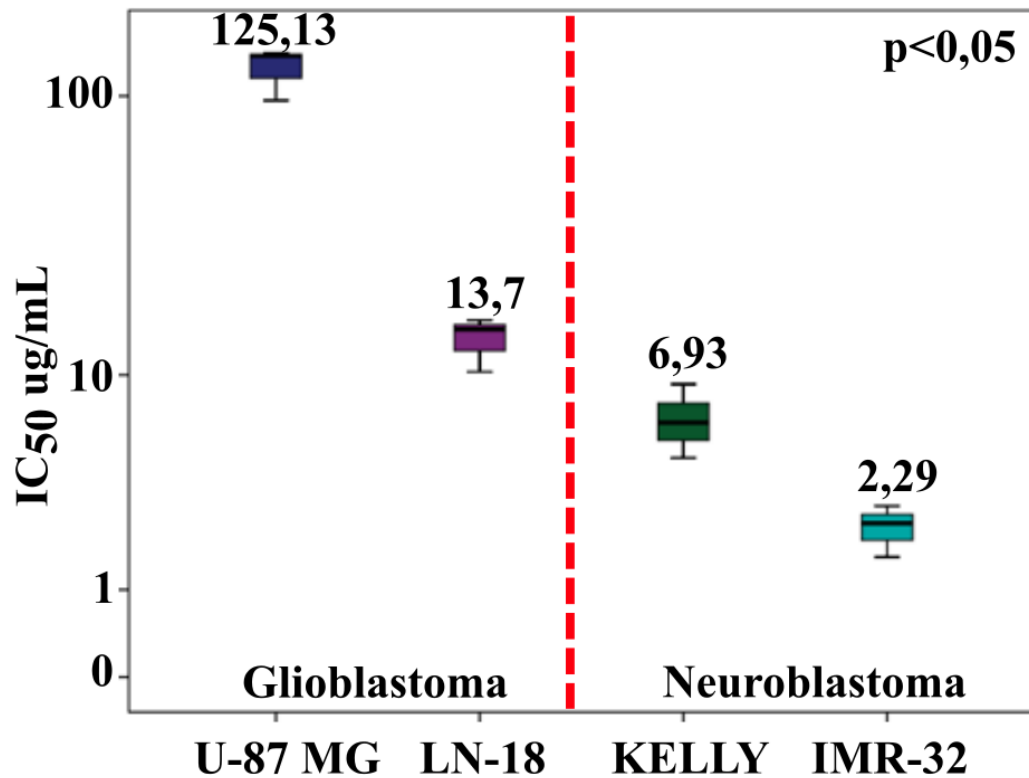


Figura 12: Distribuição dos valores de IC₅₀ entre as linhagens celulares. A linhagem U-87 MG demonstrou-se a mais resistente ao tratamento com cisplatina (125,13 µg/mL), seguida de LN-18 (13,7 µg/mL). As linhagens de neuroblastoma KELLY e IMR-32 foram as mais sensíveis ao tratamento com cisplatina, o IC₅₀ determinado para cada uma foi 6,83 e 2,29 µg/mL, respectivamente. Kruskal Wallis.

Hoje o tratamento do câncer ainda é aplicado de forma indiscriminada entre pacientes diagnosticados com o mesmo tumor e no mesmo estágio, sem levar em consideração o perfil celular e molecular de cada paciente o que leva a diferentes respostas ao tratamento (NCI, 2017; VERMA, 2012). Desta forma, a presença de CSCs resistentes à quimioterapia citotóxica padrão pode explicar os eventos de recidiva oncológica comumente observados (BAYIN; MODREK; PLACANTONAKIS, 2014). Por isto, decidimos utilizar o IC₅₀ determinado para cada linhagem celular em monocamada nas neuroesferas, uma vez que este modelo de enriquecimento de CSCs pode fornecer informações a respeito da quimiorresistência mediada por esse tipo celular em tumores do SNC.

3.3 Caracterização morfológica por microscopia de fluorescência

Durante a EMT, as células epiteliais perdem a expressão de marcadores epiteliais como E-caderina e junções aderentes, e passam a expressar marcadores mesenquimais, como N-

caderina, fibronectina e vimentina. Estas alterações refletem em uma mudança morfológica celular, onde as células adquirem aspectos fusiformes característicos de células mesenquimais (Ribeiro; Paredes, 2014).

Nos ensaios de microscopia de fluorescência observamos que as células em monocamada da U-87 MG (Figura 13) são negativas para o marcador epitelial E-caderina e positiva para o marcador mesenquimal fibronectina (Figura 14) e para a proteína do citoesqueleto F-actina. Após o tratamento com cisplatina as células permaneceram com um perfil E-caderina- e fibronectina+, entretanto, perderam completamente a expressão de F-actina. As neuroesferas de U-87 MG apresentam o perfil E-caderina- e tanto antes quanto após tratamento são positivas para F-actina e fibronectina, observa-se entretanto que as células que se encontram na periferia das neuroesferas tratadas perderam a expressão de F-actina e fibronectina, enquanto as que estão mais no centro, mantiveram.

A linhagem LN-18 é negativa para os marcadores estudados em seu modelo monocamada (Figuras 13 e 14), entretanto, no modelo neuroesfera observa-se expressão de fibronectina e F-actina, permanecendo o perfil E-cad-. A princípio, o tratamento com cisplatina não alterou visualmente a expressão das proteínas fibronectina e F-actina.

A linhagem celular KELLY em seu modelo monocamada não expressou E-caderina antes ou após o tratamento (Figura 13). A maior parte das células na monocamada controle são negativas para F-actina e não foi observado marcação para fibronectina, entretanto, ao tratar as células em monocamada, a linhagem KELLY aumentou visualmente a expressão de F-actina e de fibronectina secretada (Figura 14). No modelo neuroesfera controle da linhagem KELLY não foi observado nenhuma expressão dos marcadores estudados, ao tratar com cisplatina, observou-se marcação da proteína fibronectina. A linhagem IMR-32 não expressa fibronectina, F-actina ou E-caderina no modelo monocamada controle ou após tratamento quimioterápico, entretanto, após o tratamento do modelo neuroesfera com cisplatina observou-se a expressão de fibronectina (Figuras 13 e 14).

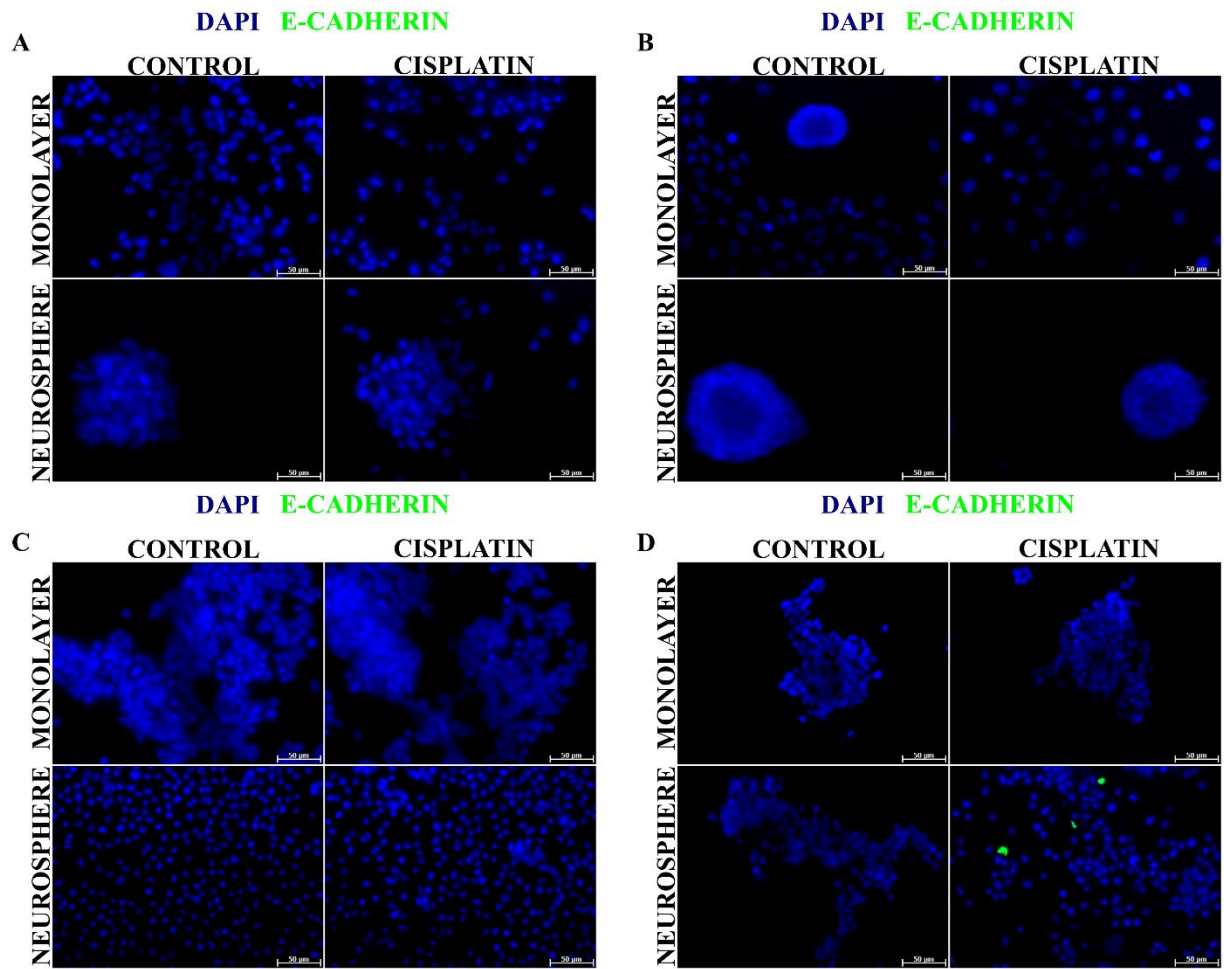


Figura 13: Imunofluorescência para o marcador epitelial E-caderina. A) U-87 MG; B) LN-18; C) KELLY e D) IMR-32. Núcleo foi marcado com DAPI. Aumento 20x. Escala: 50 µM.

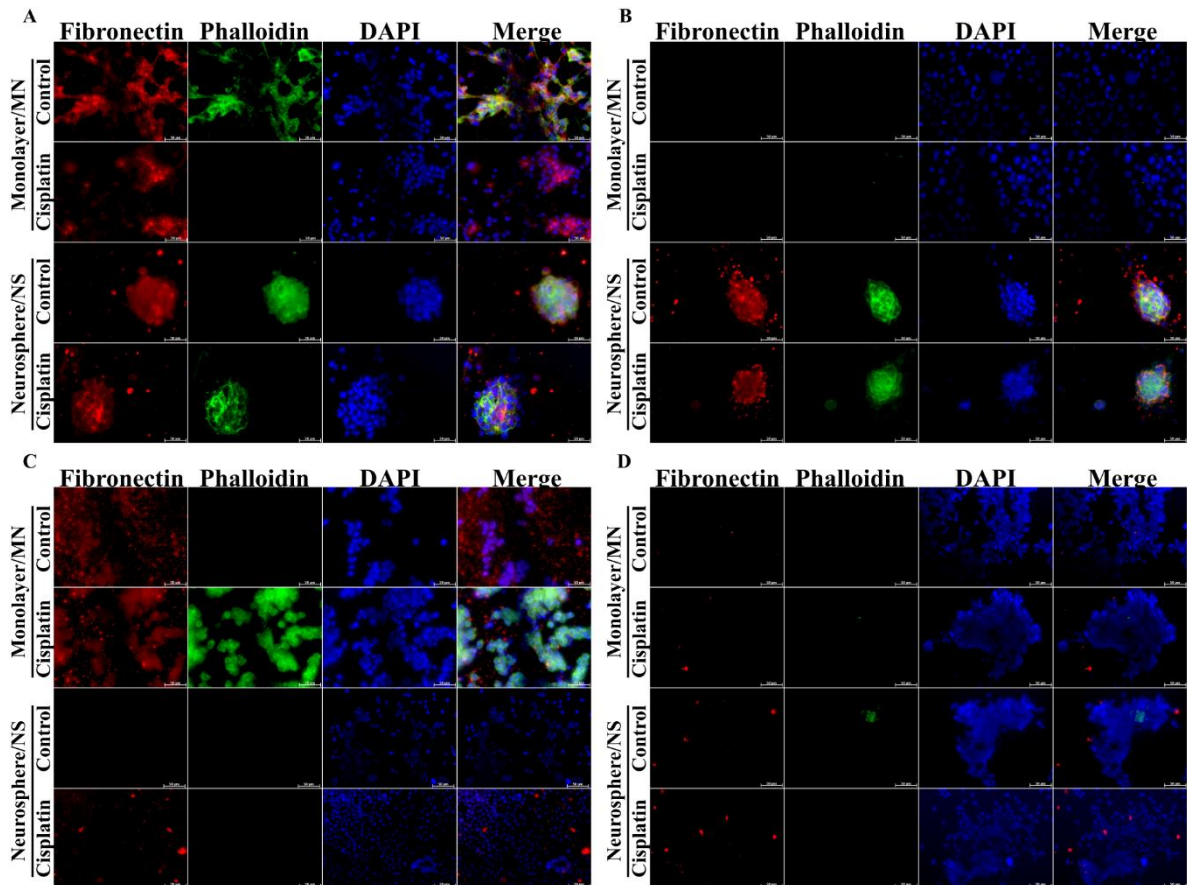


Figura 14: Perfil do marcador mesenquimal Fibronectina e da proteína do citoesqueleto F-actina, entre as linhagens celulares. A) U-87 MG; B) LN-18; C) KELLY e D) IMR-32. Núcleo foi marcado com DAPI. Aumento 20x. Escala: 50 μM.

3.4 Ensaios de biologia molecular

Após a extração do RNA total das linhagens celulares de trabalho nos modelos monocamada e neuroesfera antes e após o tratamento com cisplatina, as amostras foram quantificadas no equipamento Nanovue™ Plus (Apêndice 4) e a integridade analisada no Bioanalyzer 2100. A presença das subunidades ribossomais 18S e 28S sem arrastes em todas as amostras, foram determinantes para afirmar que as amostras de RNA total estavam íntegras e adequadas para dar continuidade ao estudo (Figura 15). Em seguida foi realizado o tratamento com DNase e a síntese do cDNA.

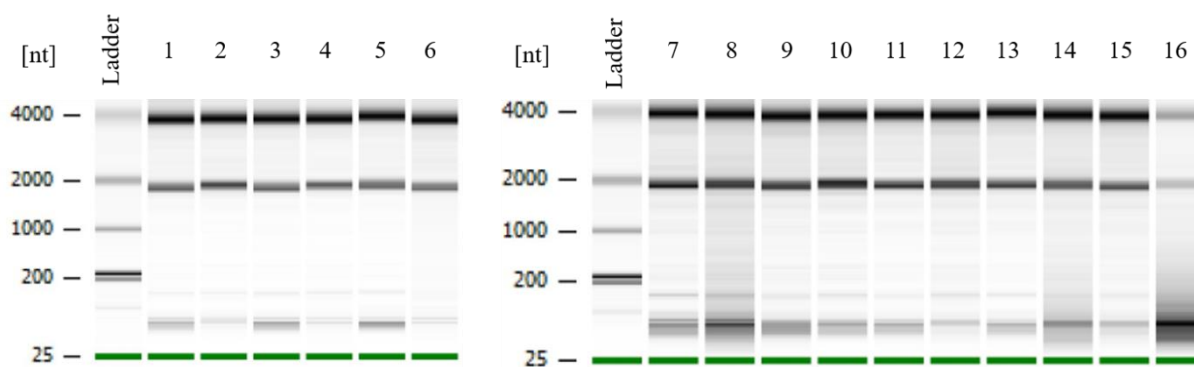


Figura 15: Análise da integridade do RNA total extraído das amostras em monocamada e neuroesfera. 1) U-87 MG monocamada controle; 2) U-87 MG neuroesfera controle; 3) LN-18 monocamada controle; 4) LN-18 neuroesfera controle; 5) KELLY monocamada controle; 6) KELLY neuroesfera controle; 7) IMR-32 monocamada controle; 8) IMR-32 neuroesfera controle; 9) U-87 MG monocamada tratada; 10) U-87 MG neuroesfera tratada; 11) LN-18 monocamada tratada; 12) LN-18 neuroesfera tratada; 13) KELLY monocamada tratada; 14) KELLY neuroesfera tratada; 15) IMR-32 monocamada tratada e 16) IMR-32 neuroesfera tratada.

3.4.1 Análise dos transcritos utilizando SYBR

As curvas de dissociação e amplificação dos alvos analisados por SYBR estão representadas como dados suplementares (Anexo 5). Para calcular a expressão relativa nas amostras tratadas, utilizou-se as amostras não tratadas como calibradoras. As análises estatísticas dos alvos reguladores de EMT (figura 16) mostraram que em U-87 MG após o tratamento com cisplatina, os genes estavam subexpressos nos modelos monocamada e neuroesfera. LN-18 superexpressou o alvo *TWIST1* após o tratamento da monocamada com cisplatina e no modelo neuroesfera tratada todos os alvos estavam subexpressos. Na linhagem celular KELLY, todos os alvos ficaram subexpressos após tratamento. A linhagem celular IMR-32 que foi a mais sensível ao tratamento com cisplatina, superexpressou *STAT3* e *TGFB1* no modelo neuroesfera tratada. Na monocamada tratada de IMR-32, com exceção de *TGFB1* que se encontrava em nível basal, todas os outros genes ficaram subexpressos.

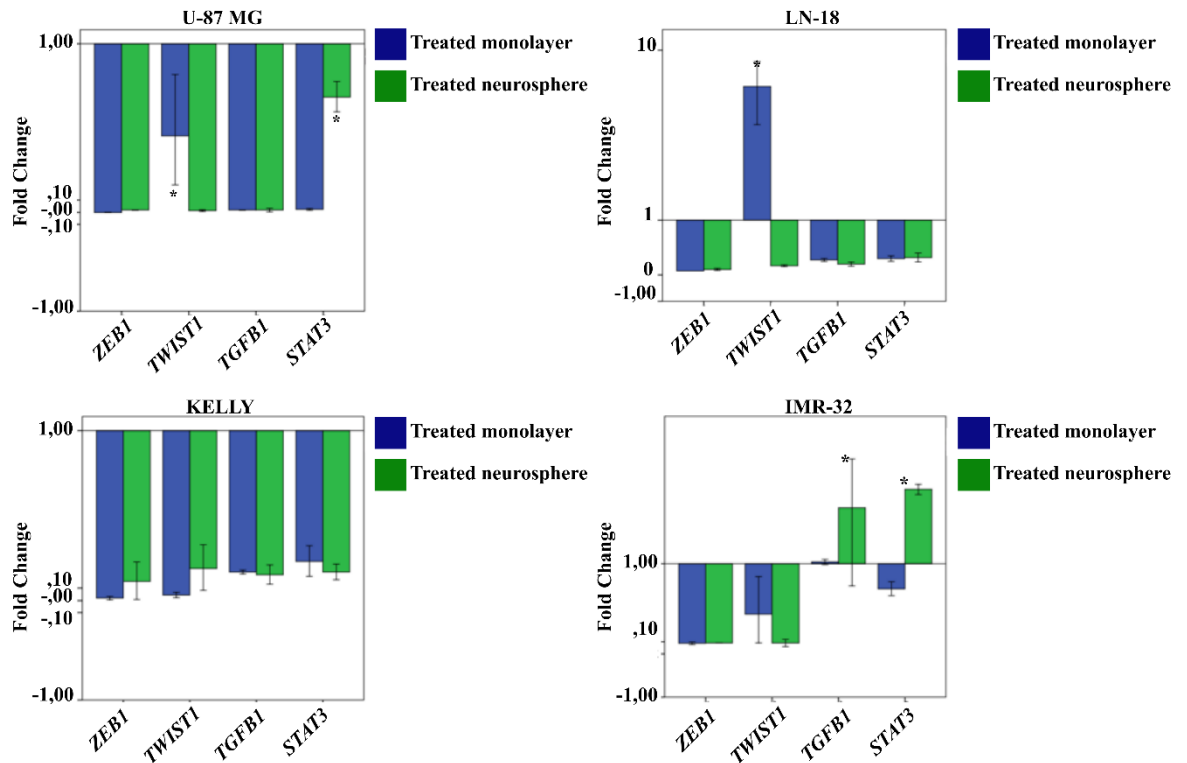


Figura 16: Análise dos alvos de EMT por qPCR utilizando SYBR. Amostras não tratadas foram utilizadas como calibradoras neste estudo. Após o tratamento com cisplatina, os genes estavam subexpressos nos modelos monocamada e de enriquecimento de CSCs em U-87 MG. LN-18 superexpressou o alvo *TWIST1* após o tratamento da monocamada e no modelo neuroesfera tratada todos os alvos estavam subexpressos. Na linhagem celular KELLY, todos os alvos ficaram subexpressos após tratamento. A linhagem celular IMR-32 que foi a mais sensível ao tratamento com cisplatina, superexpressou *STAT3* e *TGFB1* no modelo neuroesfera tratada. Na monocamada tratada de IMR-32, com exceção de *TGFB1* que se encontrava em nível basal, todas os outros genes ficaram subexpressos. * $p < 0,05$. Anova Post Hoc LSD. $n = 2$.

As alterações na expressão gênica que contribuem para a repressão do fenótipo epitelial e ativação do fenótipo mesenquimal, envolve fatores transcricionais como dímeros de STAT3, proteínas da família ZEB (1/2) e TWIST(1/2), além da expressão de moléculas como TGF-beta1 (CAI *et al.*, 2018; LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014; LEE *et al.*, 2014).

Os fatores de transcrição TWIST possuem importante papel no fenômeno EMT. Em especial TWIST1, que em células cancerígenas, diminui a expressão de genes epiteliais como E-caderina e promove o aumento da expressão de genes mesenquimais, como o da Fibronectina. Assim como TWIST1, ZEB1 é outro fator transcricional que regula a expressão de E-caderina ao se ligar às regiões conhecidas como acentuadores (*Enhancers*) diminuindo a eficiência da transcrição deste gene. Além disso, a proteína TGF-beta1 possui importante papel durante o

evento EMT, pois, é capaz de alterar a plasticidade das células epiteliais e promover o remodelamento da composição da matriz extracelular, estimulando a expressão de proteínas como colágeno e fibronectina, além de estar envolvida na diferenciação e manutenção de Células Tronco do Câncer (CSC's) (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014; WANG *et al.*, 2012).

Proteínas da família STAT possuem papel importante em diversos eventos biológicos. A ativação constitutiva de STAT3 tem sido frequentemente observada em uma variedade de tumores, inclusive os do sistema nervoso central. Evidências mostraram que a ativação aberrante de STAT3 contribui para proliferação celular, diferenciação, migração e sobrevivência das células tumorais. Além disso, dímeros de STAT3 possuem importante papel na ativação da transcrição de genes reguladores de EMT como ZEB1, TWIST1, Snail e Slug. Na literatura, é descrito que dímeros de STAT3 ativados promovem a transcrição do lncRNA HOTAIR, nosso próximo alvo de estudo que será discutido abaixo. Além disso, Zhang *et al* (2018) mostraram um efeito sinérgico entre HOTAIR e STAT3, os quais promovem migração e invasão celular em células de câncer cervical.

3.4.2 Análise do lncRNA HOTAIR utilizando sondas TaqMan

Nosso próximo alvo de estudo foi o lncRNA HOTAIR, utilizamos as amostras de cDNA obtidas a partir do RNA total extraído antes e após o tratamento com cisplatina nas linhagens em monocamada e neuroesfera. Este ensaio foi possível, uma vez que os lncRNAs possuem um sinal de poliadenilação na extremidade 3', também chamada de cauda poli A, igual aos mRNAs codificadores de proteínas (Yarmishyn; Kurochkin, 2015). Como controle endógeno, ou seja, expresso constitutivamente em células eucarióticas, optou-se por utilizar sondas para o alvo ACTB (Beta-actina).

A curva de amplificação dos alvos está representada na figura 17. Somente as linhagens celulares LN-18, KELLY e IMR-32 no modelo monocamada controle amplificaram para o alvo HOTAIR, ambas com Cts 37. Sendo que houve uma perda de expressão deste alvo na monocamada tratada e no modelo de enriquecimento de CSCs dessas mesmas linhagens. Desta

forma, não foi possível calcular a expressão relativa dessas amostras, mas as amostras foram normalizadas em relação ao controle endógeno β -actin (*ACTB*) (Δ Ct LN-18: 18,01; Δ Ct KELLY: 18,75; IMR-32: 16,85).

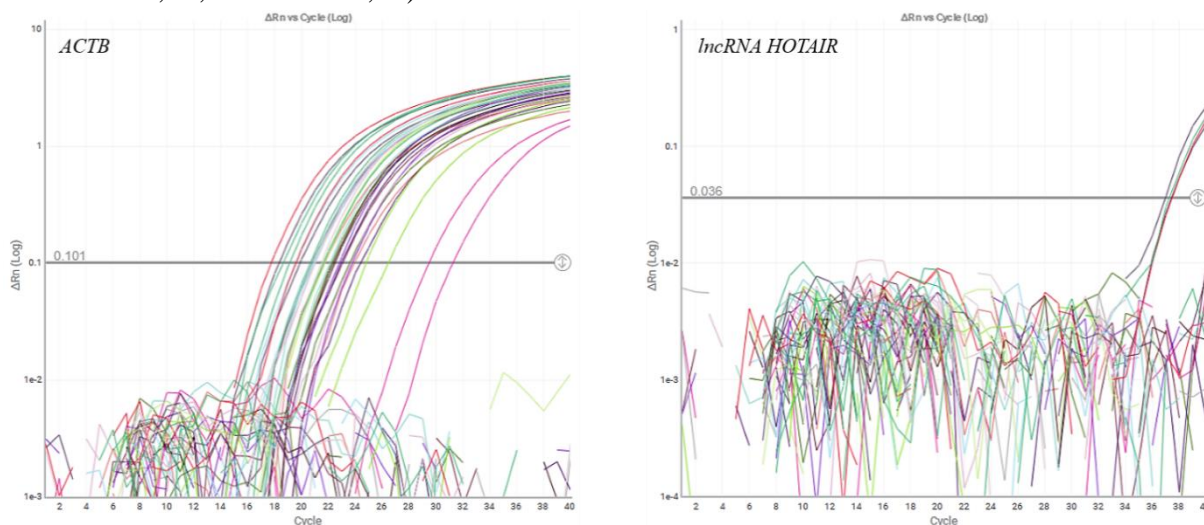


Figura 17: Curva de amplificação do lncRNA *HOTAIR* e do controle endógeno *ACTB* utilizando sondas TaqMan. Somente as linhagens celulares LN-18, KELLY e IMR-32 no modelo monocamada, amplificaram para o alvo *HOTAIR*. (Δ Ct LN-18: 18,01; Δ Ct KELLY: 18,75; IMR-32: 16,85).

Longos RNAs não codificantes (lncRNAs) possuem diferentes funções dentro da célula, como a regulação transcricional e pós-transcricional. Além disso, lncRNAs são reguladores-chaves da expressão de determinados genes envolvidos nas vias de proliferação, migração, metástase e morte celular, se associando a complexos de remodelamento da cromatina e regulando a maquinaria epigenética durante a diferenciação celular (HAJJARI; SALAVATY, 2015). Assim, a desregulação de determinados lncRNAs afeta importantes processos relacionados a oncogênese, incluindo o crescimento e proliferação celular. Além disso, a superexpressão de determinados lncRNAs contribui para processos metastáticos. Com isso, lncRNAs passaram a ser considerados alvos promissores no desenvolvimento de novas terapias para o câncer, especialmente por possuírem expressão tecido específica (HAJJARI; SALAVATY, 2015; GUTSCHNER; DIEDERICHS, 2012;).

HOTAIR pode-se associar ao complexo de remodelamento da cromatina PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) promovendo a trimetilação dos resíduos de lisina 27 das histonas H3 (H3K27me3) como no gene da E-caderina, desta forma, o silenciamento do gene da E-caderina conduz a perda de adesão entre as células tumorais facilitando com que estas adquiram motilidade e invasão tecidual, como visto no processo EMT (GUPTA et al., 2010). De acordo com Pádua *et al.*, (2013) células que superexpressam *HOTAIR*, possuem genes

indutores de EMT, como ZEB1, TWIST1 e marcadores mesenquimais como fibronectina, altamente expressos. Além disso, este mesmo trabalho mostrou em células de câncer de mama tratadas com TGF-beta1 um aumento na expressão do lncRNA *HOTAIR*.

3.5 Caracterização celular por citometria de fluxo

Após a aquisição das amostras no software FACSDiva 6.1.3 os dados foram exportados em formato FCS e analisados posteriormente no FlowJo versão 10 (Apêndice 6).

3.5.1 Análise do perfil de glicosilação

As análises do perfil de glicosilação foram realizadas por citometria de fluxo utilizando lectinas conjugadas com fluorocromo. Lectinas são proteínas capazes de reconhecerem e se ligarem reversivelmente através de um domínio não catalítico, em resíduos de carboidratos específicos (NAEEM; SALEEMUDDIN; HASAN KHAN, 2007). A marcação com WGA foi utilizada como um controle, uma vez que esta lectina reconhece resíduos de ácido siálico e que são comuns em tumores do sistema nervoso (BEROIS; OSINAGA, 2014; MOSKAL; KROES; DAWSON, 2009). Carvalho *et al* (2018) mostraram que o perfil de glicosilação de células epiteliais difere de células mesenquimais. Em células epiteliais observa-se uma abundância de glicanos que terminam em resíduos de galactose, N-acetilgalactosamina ou N-acetiglicosamina. Além disso, em células epiteliais é comum a presença de proteínas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (GPI). Em células mesenquimais, observa-se aumento de glicanos que terminam em resíduos de manose e diminuição de proteínas ancoradas à GPI.

As análises estatísticas do perfil de glicosilação de U-87 MG (Figura 18) mostraram um aumento na marcação com PNA na monocamada tratada, uma lectina que reconhece carboidratos típicos de células epiteliais (terminal β -galactose), e diminuição na marcação com Concanavalina A na neuroesfera tratada, uma lectina que reconhece glicanos que normalmente estão presentes em células mesenquimais (resíduos α -manopiranosil e α -glicopiranosil). Desta forma, indicando que no modelo monocamada tratada prevaleceu-se células com perfil de glicosilação epitelial e no modelo neuroesfera houve perda da população celular com perfil de glicosilação mesenquimal. No modelo monocamada tratada de KELLY (Figura 18) a diminuição da marcação com Isolectina GS-IB₄ (reconhece terminal α D-galactosil), GSII (reconhece terminal não redutor α ou β ligado a N-acetil-D-glicosamina) e SBA (reconhece terminal α ou β de N-acetil glicosamina e resíduos glicopiranosil) e aumento da marcação com Concanavalina A, são indícios de que o tratamento favoreceu a sobrevivência de células com

perfil de glicanos típicos de células mesenquimais e perda da população com perfil de glicosilação comumente observado em células epiteliais. Na neuroesfera não houve diferenças significativas.

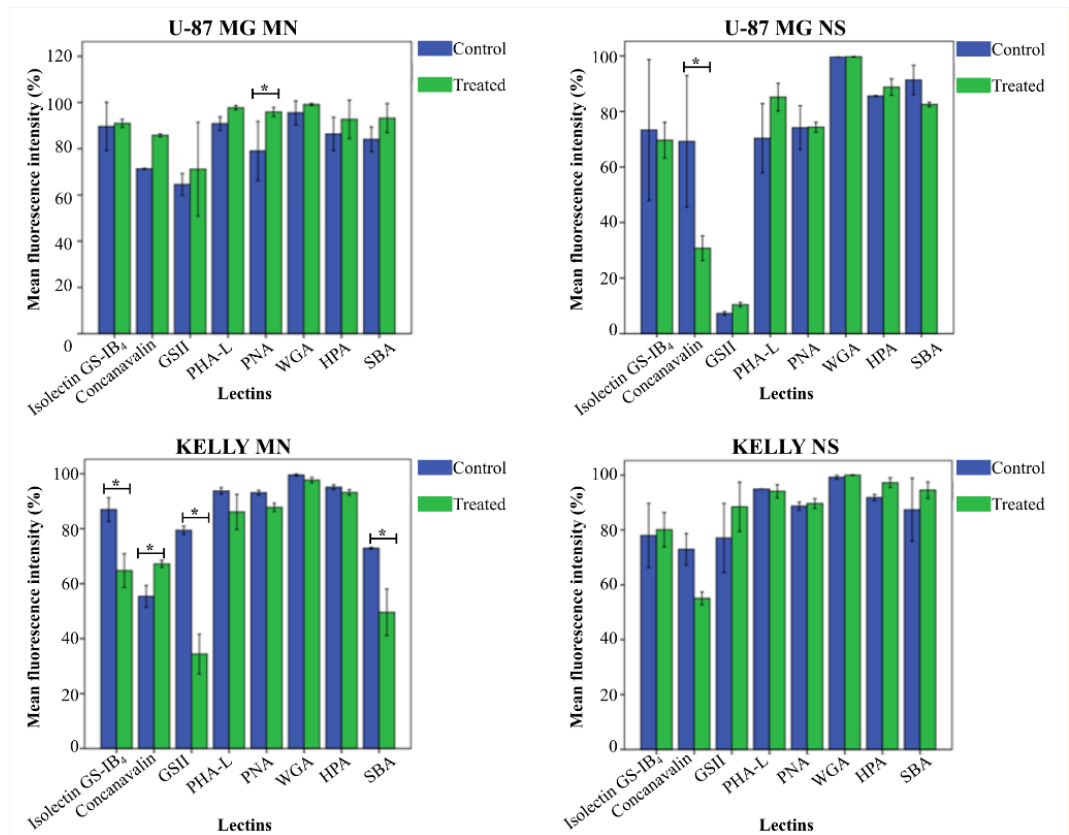


Figura 18: Análise do perfil de glicosilação das linhagens U-87 MG e KELLY. Na linhagem de glioblastoma U-87 MG foi observado um aumento na marcação com PNA na monocamada tratada, uma lectina que reconhece carboidratos típicos de células epiteliais, e diminuição na marcação com Concanavalina A na neuroesfera tratada, uma lectina que reconhece glicanos que normalmente estão presentes em células mesenquimais. Desta forma, indicando que no modelo monocamada tratada prevaleceu-se células com perfil de glicosilação epitelial e no modelo neuroesfera houve perda da população celular com perfil de glicosilação mesenquimal. A diminuição da marcação com Isolectina GS-IB₄, GSII e SBA e aumento da marcação com Concanavalina A, na monocamada tratada da linhagem celular KELLY, são indícios de que o tratamento favoreceu a sobrevivência de células com perfil de glicanos típicos de células mesenquimais e perda da população com perfil de glicosilação comumente observado em células epiteliais. Na neuroesfera não houve diferenças significativas. Anova Post Hoc LSD. * $p < 0,05$. $n=2$.

Para as linhagens LN-18 e IMR-32 (Apêndice 6) não observamos diferença estatística no modelo monocamada e o modelo neuroesfera dessas linhagens não foi finalizado até o momento devido a alguns contratemplos com a citometria de fluxo.

3.5.2 Análise de clusters de diferenciação

As análises dos CDs neurais (Figura 19) mesenquimais (Figura 20) e hematopoiéticos (Figura 21) nas linhagens celulares cultivadas nos modelos monocamada e neuroesfera mostraram uma heterogeneidade fenotípica entre as linhagens de tumores do sistema nervoso central. Em relação aos marcadores neurais, somente as linhagens de neuroblastoma KELLY e IMR-32 mostraram subpopulações celulares enriquecidas de CD24, sendo que houve uma perda desta subpopulação no modelo neuroesfera de KELLY. Nenhuma das linhagens de trabalho apresentou subpopulações enriquecidas para CD56 ou CD133.

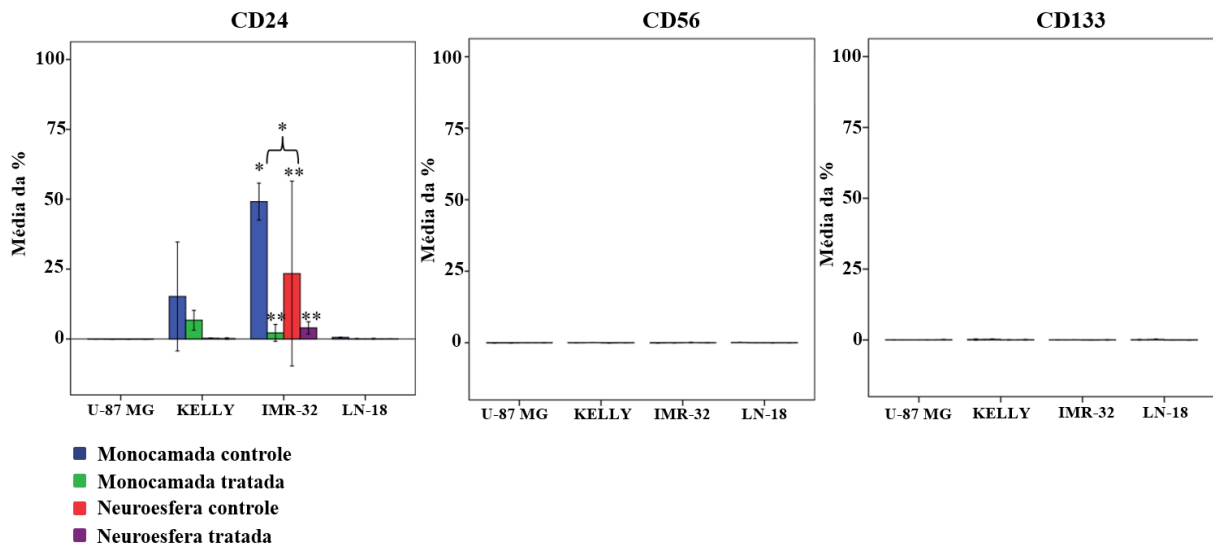


Figura 19: Análise de clusters de diferenciação relacionados à presença de células tronco neurais (NSCs). Somente as linhagens de neuroblastoma KELLY e IMR-32 apresentaram subpopulações celulares enriquecidas de CD24, sendo que houve uma perda desta subpopulação no modelo neuroesfera de KELLY. Nenhuma das linhagens de trabalho apresentou subpopulações enriquecidas para CD56 ou CD133. Anova Post Hoc LSD. * $p < 0,05$. $n=2$.

CD24 é uma sialoglicoproteína de membrana ancorada à GPI e possui importante função durante a diferenciação de neuroblastos. Esta glicoproteína é considerada um biomarcador para diferenciação de células-tronco neural. Além disso, CD24 possui papéis importantes na biologia do sistema nervoso como a regulação de vias associadas à migração, crescimento de projeções e na formação de novos neurônios, processo conhecido como neurogênese (GILLIAN *et al.*, 2017; PRUSZAK *et al.*, 2009). Em glioblastomas e neuroblastomas esta molécula é considerada um marcador de NSCs. Na literatura, é descrito que a medida que as células de neuroblastomas se diferenciam, a expressão de CD24 diminui (SONI *et al.*, 2017; LO *et al.*, 2009; PONCET *et al.*, 1996). Em neuroblastomas, a presença da molécula de adesão neuronal CD56 é

frequentemente associada com a progressão do câncer, já em glioblastomas, a perda de NCAM indica tumores com fenótipo agressivo e pobre prognóstico (MARKOVSKY *et al.*, 2017).

CD133 (prominina 1) é uma glicoproteína transmembrana que possui 9 sítios de glicosilação nos loops extracelulares. A glicosilação de CD133 altera toda sua estrutura terciária e estabilidade. Muitos dos estudos com CD133 utilizam anticorpos que reconhecem epítomos glicosilados da molécula, desta forma, a detecção acurada de prominina 1 pode ser limitada devido aos diferentes padrões de glicosilação desta proteína e que ditam inclusive se ela estará ou não presente na membrana celular. A função fisiológica de CD133 na progressão do câncer permanece desconhecida. Especula-se que esta proteína esteja envolvida na organização da membrana celular (GLUMAC; LEBEAU, 2018; CHOY *et al.*, 2012). Singh *et al* (2003) foram os primeiros a identificar uma subpopulação de células em meduloblastomas e gliomas co-expressando CD133 e nestina, um marcador para NSCs.

Consistente com o modelo de CSCs, que propõe que esta subpopulação representa uma fração rara dentro dos tumores, a expressão de CD133 é tipicamente baixa nos tumores do SNC ou quase indetectáveis, como demonstrado nas nossas análises de citometria de fluxo. Na literatura entretanto, a expressão deste marcador é controversa uma vez que células CD133^{negativas} têm sido descritas como capazes de iniciar tumores em camundongos imunodeficientes, desta forma, sugerindo que CD133 não é um marcador universal para CSCs em tumores do SNC (AYOB; RAMASAMY, 2018; VISVADER; LINDEMAN, 2008).

Na análise dos CDs mesenquimais, as linhagens celulares de glioblastoma U-87 MG e LN-18 foram as únicas que apresentaram subpopulações expressando CD73, sendo que para U-87 MG houve uma perda desta subpopulação nos modelos monocamada e neuroesfera tratada, já para LN-18, não foi observado enriquecimento da subpopulação CD73+ no modelo 3D, somente no modelo 2D. Nossos resultados mostraram ainda que exceto U-87 MG, todas as outras linhagens celulares mostraram frações celulares positivas para CD90. A linhagem U-87 MG apresentou subpopulações CD146+ apenas no modelo monocamada controle ao contrário das outras linhagens que apresentaram subpopulações positivas para este marcador nos modelos estudados seja controle ou após tratamento, com exceção da LN-18 que perdeu a expressão de CD146 na neuroesfera tratada. E somente na neuroesfera controle de LN-18 observou-se uma baixa porcentagem da subpopulação positiva para CD105.

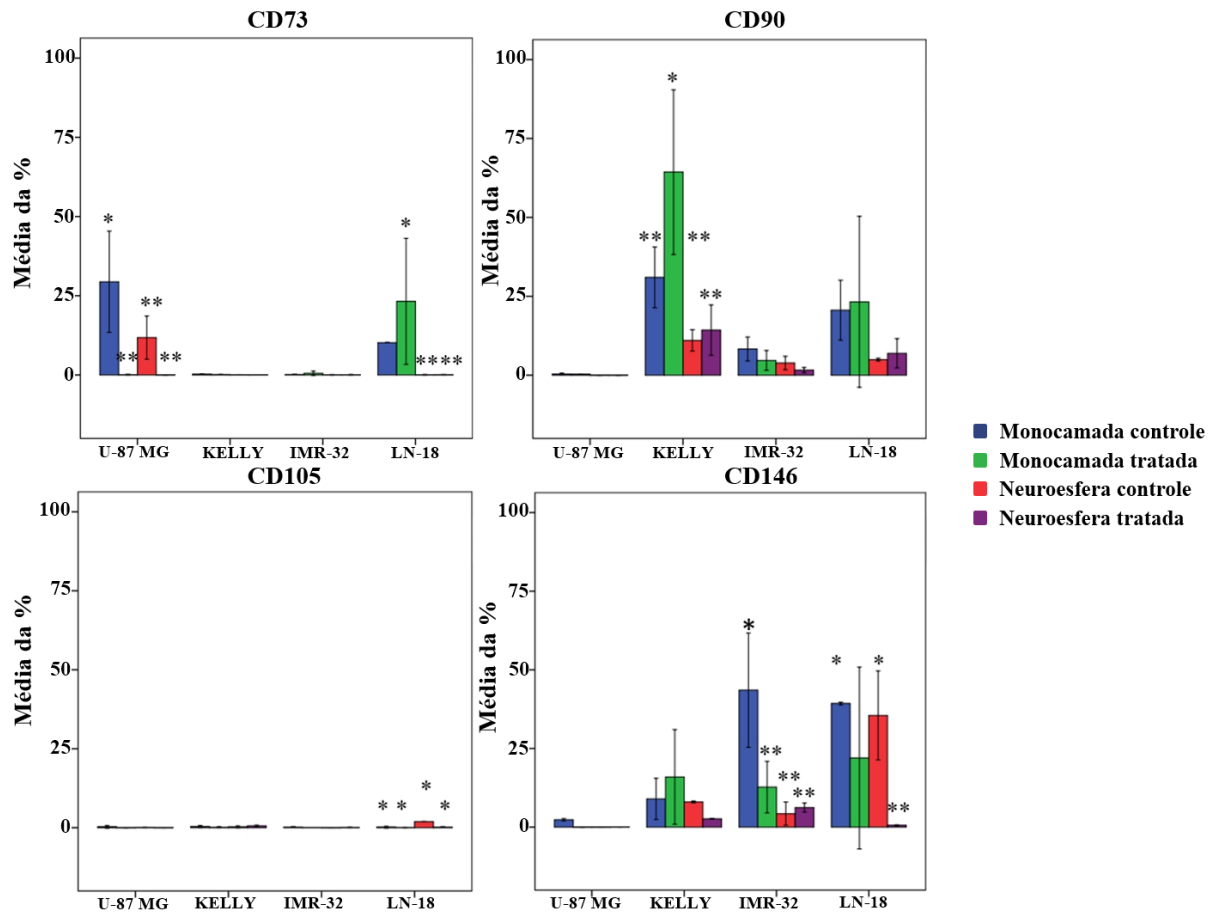


Figura 20: Análise de clusters de diferenciação relacionados à presença de células tronco mesenquimais (MSCs). As linhagens celulares de glioblastoma U-87 MG e LN-18 foram as únicas que apresentaram subpopulações expressando CD73, sendo que para U-87 MG houve uma perda desta subpopulação nos modelos monocamada e neuroesfera tratada, já para LN-18, não foi observado enriquecimento da subpopulação CD73+ no modelo 3D, somente no modelo 2D. Nossos resultados mostraram ainda que exceto U-87 MG, todas as outras linhagens celulares mostraram frações celulares positivas para CD90. A linhagem U-87 MG apresentou subpopulações CD146+ apenas no modelo monocamada controle ao contrário das outras linhagens que apresentaram subpopulações positivas para este marcador nos modelos estudados seja controle ou após tratamento, com exceção da LN-18 que perdeu a expressão de CD146 na neuroesfera tratada. E somente na neuroesfera controle de LN-18 observou-se uma baixa porcentagem da subpopulação positiva para CD105. Anova Post Hoc LSD. * p<0,05. n=2.

CD73 (também conhecida como ecto-5'-nucleotidase) é uma proteína de superfície celular ancorada à GPI. A forma madura desta proteína em humanos contém quatro sítios que podem ser glicosilados, desta forma, CD73 ocorre em diferentes glicofomas. CD73 possui funções enzimáticas e não enzimáticas. Como uma nucleotidase, catalisa a hidrólise de adenosina monofosfato (AMP) em adenosina e fosfato. A adenosina resultante está implicada em uma variedade de processos fisiológicos como crescimento celular, diferenciação e supressão do

sistema imune. Além da sua função enzimática, CD73 atua como receptor para moléculas da matriz extracelular, como tenascina, fibronectina e laminina, regulando desta forma adesão celular, crescimento, migração e diferenciação, indicando que CD73 possui importante papel em células neoplásicas (ADZIC; NEDELJKOVIC, 2018; GAO; DONG; ZHANG, 2014).

CD90 (Thy-1) é uma proteína N-glicosilada de superfície celular ancorada à GPI, envolvida na adesão célula-célula e célula-matriz. Thy-1 é um marcador clássico para células mesenquimais. Curiosamente, CD90 está envolvido na inibição do desenvolvimento de neuritos, ativação de células T e apoptose, migração e adesão celular durante o processo de cicatrização de feridas. Na literatura já foi descrita que esta molécula possui importante papel no controle da migração de células de glioblastoma (AVRIL *et al.*, 2017). Fiegel *et al* (2008) mostraram que pacientes com neuroblastoma e que não apresentam Thy-1 possuem uma sobrevida geral menor do que aqueles que expressão essa proteína. CD105, também conhecido como endoglina, é uma glicoproteína de membrana que funciona como receptor acessório para ligantes da superfamília TGF-beta, os quais estão envolvidos com proliferação celular, diferenciação e migração (MALEKI *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2013).

CD146, também denominada molécula de adesão de melanoma ou simplesmente MCAM, é uma importante glicoproteína envolvida na adesão e migração de células endoteliais. Além disso CD146 está envolvido com a capacidade de formação de novos vasos sanguíneos. MCAM possui a capacidade de promover o remodelamento do citoesqueleto celular. Notavelmente, CD146 é um candidato atrativo para identificação de MSCs (MALEKI *et al.*, 2014).

A linhagem celular U-87 MG foi a única enriquecida de subpopulações expressando o marcador hematopoiético HLA-DR, e no seu modelo neuroesfera tratada, houve uma diminuição da subpopulação positiva para este marcador. Não observamos expressão dos CDs 19, 34 ou 45 em qualquer uma das linhagens celulares, e as linhagens de neuroblastoma mostraram-se enriquecidas de subpopulações celulares positivas para CD14, enquanto LN-18 apresentou uma baixa porcentagem para subpopulações positivas para este marcador, no modelo neuroesfera controle.

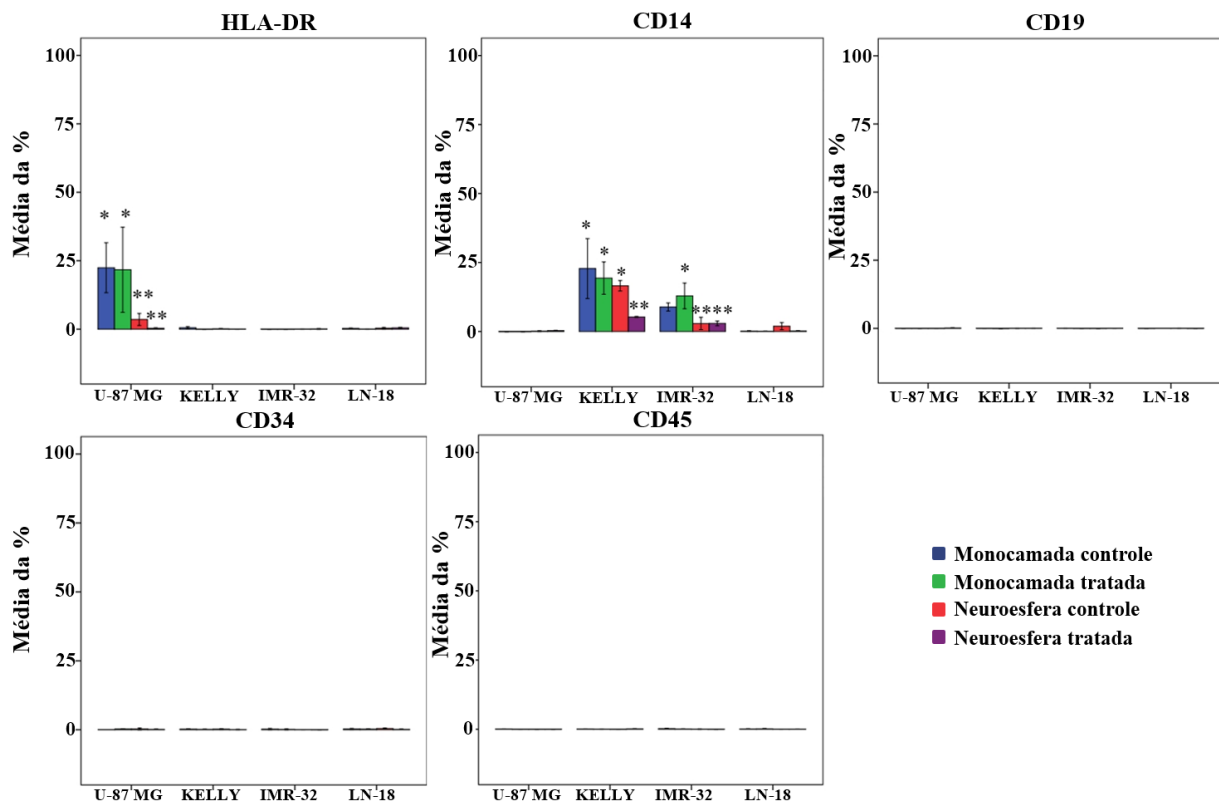


Figura 21: Análise de marcadores hematopoiéticos. A linhagem celular U-87 MG foi a única enriquecida de subpopulações expressando o marcador hematopoiético HLA-DR, e no seu modelo neuroesfera tratada, houve uma diminuição da subpopulação positiva para este marcador. Não observamos expressão dos CDs 19, 34 ou 45 em qualquer uma das linhagens celulares, e as linhagens de neuroblastoma mostraram-se enriquecidas de subpopulações celulares positivas para CD14, enquanto LN-18 apresentou uma baixa porcentagem para subpopulações positivas para este marcador, no modelo neuroesfera controle. Anova Post Hoc LSD. * $p < 0,05$. $n=2$.

HLA-DR é uma molécula clássica do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC-II), formado por heterodímeros $\alpha\beta$ ancorados na membrana celular. HLA-DR é constitutivamente expresso em células apresentadoras de antígenos tais como células dendríticas, monócitos, linfócitos B e células T ativadas, mas a expressão desta molécula pode ser induzida em outros tipos celulares, incluindo células tumorais, particularmente em respostas inflamatórias. Estudos tem demonstrado uma alta expressão de HLA-DR em gliomas e uma baixa taxa de sobrevivência associada à esta característica. Entretanto, não está claro se a superexpressão desta molécula é decorrente da infiltração no SNC de células do sistema imune (DUNNE *et al.*, 2017; FAN *et al.*, 2017).

CD14 é uma molécula que existe em duas formas, solúvel e ancorada à membrana por meio de GPI. CD14 ancorada à membrana está presente em células de origem mieloide e atua como co-receptor de TLR4 (*toll like receptor*) para detecção de lipopolissacarídeo (LPS)

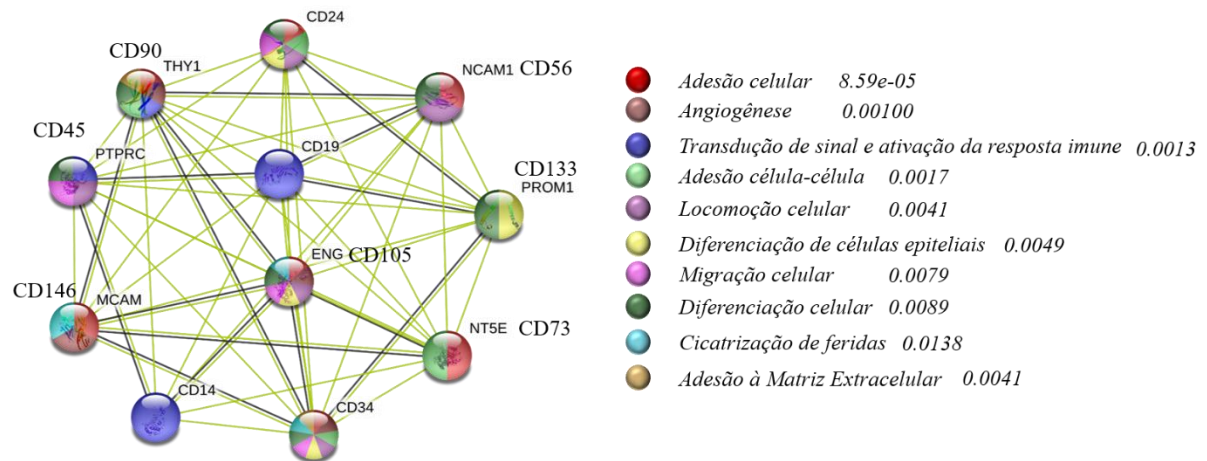
(MALVANDI; MEHRZAD; MOGHADDAM, 2011; DEININGER; MEYERMANN; SCHLUESENER, 2003). Um estudo conduzido por Grasseli e colaboradores (2018) mostrou que a modulação de TLR4 influencia a proliferação e diferenciação de NSC.

CD19 é uma glicoproteína transmembrana que pertence a superfamília de imunoglobulina (Ig). Esta molécula possui um único domínio transmembrana com a porção N-terminal voltada para o meio extracelular e C-terminal citoplasmático. Seu domínio citoplasmático contém resíduos de tirosina próximo ao C-terminal, e que são essenciais para a função biológica de CD19. Esta glicoproteína está envolvida principalmente na ativação de células B induzida por imunoglobulinas. CD19 atua em conjunto com o receptor de linfócitos B (BCR) e outras moléculas de superfície permitindo o recrutamento e ligação de várias quinases à jusante (*down-stream*) (WANG; WEI; LIU, 2012).

A proteína transmembrana CD34 tem sido utilizada para identificação e isolamento de células tronco hematopoiéticas (HSCs) e progenitoras durante transplante de medula. Acredita-se que CD34 está envolvido na proliferação e migração de células hematopoiéticas, além de inibir a diferenciação de células progenitoras (NIELSEN; MCNAGNY, 2008).

CD45, também conhecido como PTPRC (proteína tirosina-fosfatase, receptor tipo C), é uma proteína transmembrana expressa em abundância na superfície de células hematopoiéticas nucleadas. Esta molécula é conhecida por regular a fosforilação de proteínas da família SRC e da família JAK kinase (PORCU *et al.*, 2012).

Por fim, realizamos uma análise no banco de dados STRING para explorar interações proteína-proteína (PPI) entre os diferentes clusters de diferenciação avaliados neste trabalho (Figura 22). Diferentes processos biológicos comumente observados durante o fenômeno EMT foram avaliados utilizando informações do Gene Ontology, como I) adesão celular; II) Angiogênese; III) Adesão célula-célula e à MEC; IV) Diferenciação celular e V) locomoção celular. O score de confiança da rede foi fornecido pelo STRING ($p < 1.0 \cdot 10^{-16}$). E a taxa de falsa descoberta (false discovery rate) para cada processo biológico encontra-se ao lado de cada um na imagem abaixo. O único CD que não foi predito pela rede foi HLA-DR.



$$p < 1.0 \cdot 10^{-16}$$

Figura 22: Rede de interação proteína-proteína e processos biológicos avaliados. Somente HLA-DR não foi previsto pelo banco de dados.

A presença de subpopulações CD14^{positiva} e HLA-DR^{negativa} nas linhagens celulares de neuroblastoma, condizem com o perfil fenotípico de uma população celular conhecida como células supressoras derivadas da mielóide, ou simplesmente MDSC (*Myeloid Derived Suppressor Cells*). Este grupo heterogêneo de células é caracterizado pela presença de células mielóides imaturas originadas da medula óssea, precursoras de granulócitos, macrófagos e células dendríticas. Essa população celular é dividida em dois grupos, monocíticas (M-MDSC) e granulocíticas/polimorfonucleares (PMN-MDSC). M-MDSC são caracterizadas pela presença de CD14, enquanto PMN-MDSC expressam CD15, entretanto, ambas carecem do marcador HLA-DR. De modo geral, MDSCs são os principais reguladores da resposta imune no câncer. Em pacientes com câncer, MDSC inibem ativação de linfócitos T CD4 e CD8 e recrutam células T-reguladoras (T-reg), esta última também envolvida na supressão da resposta imune. Além disso, MDSCs promovem a manutenção de subpopulações celulares com fenótipo de células tronco do câncer, facilitam a angiogênese bem como invasão e metástase (OSTRAND-ROSENBERG; FENSELAU, 2018; VLADIMIROVNA *et al.*, 2016).

Os mecanismos que regulam a diferenciação e a função de MDSCs incluem a participação de proteínas STAT3 fosforiladas. A ativação da via de sinalização STAT3 culmina na expressão de importantes moléculas que estão envolvidas na carcinogênese, dentre elas VEGF, bFGF, metaloprotease 9 (MMP9) e TGF-beta1. Tais proteínas estão envolvidas na angiogênese, crescimento/diferenciação celular e remodelação da matriz extracelular (SU *et al.*, 2018; DUFAIT *et al.*, 2016). Além disso, encontramos na literatura que o lncRNA *HOTAIR* têm sido

relacionado indiretamente com o recrutamento de MDSCs em diferentes tumores como carcinoma hepatocelular e de células escamosas de cabeça e pescoço (LEIJA-MONTAYA *et al.*, 2019).

Portanto, nosso trabalho dá fortes indícios da presença de M-MDSCs nas linhagens de neuroblastomas. Um subtipo celular que até então não era alvo deste estudo mas que deixou questionamentos quanto a sua participação na carcinogênese de neuroblastomas, especialmente tratando da IMR-32, que foi a mais sensível ao tratamento com cisplatina e se mostrou enriquecida de diferentes subpopulações celulares e teve os genes *STAT3* e *TGFBI* superexpressos no modelo neuroesfera após tratamento com cisplatina. Além disso, tanto em IMR-32 quanto KELLY expressaram em seu modelo monocamada controle o lncRNA *HOTAIR*, o que nos leva a seguinte dúvida e abre portas para experimentos futuros: seria este lncRNA envolvido com a presença de M-MDSC em neuroblastomas? Isto confrontaria talvez a importância deste alvo como regulador de EMT em células tronco mesenquimais, uma vez que a presença de fenótipos mesenquimais especialmente nas linhagens de glioblastoma, parecem não ter relação com a expressão de *HOTAIR*.

3.5.3 Análise de aldeído desidrogenase (ALDH)

Após análise dos clusters de diferenciação que definem diferentes subpopulações com características neurais, mesenquimais ou hematopoiéticas, avaliamos a expressão de aldeído desidrogenase nas linhagens celulares (Figura 23).

A linhagem celular U-87 MG apresenta subpopulações que expressam ALDH nos modelos monocamada e neuroesfera controle, entretanto, as subpopulações que expressavam este marcador desaparecem após tratamento. A linhagem LN-18 apresentou uma subpopulação positiva para ALDH na neuroesfera controle (<2%). Para a linhagem KELLY, observamos subpopulações ALDH⁺ no modelo monocamada tratada e um aumento no modelo neuroesfera controle, entretanto, ao tratar as neuroesferas com cisplatina, houve uma perda das células que expressavam este marcador. A linhagem IMR-32 foi a que teve uma maior porcentagem de

células ALDH⁺ na monocamada controle, os níveis de aldeído desidrogenase diminuíram nos demais modelos, entretanto, ainda é possível observar subpopulações expressando ALDH.

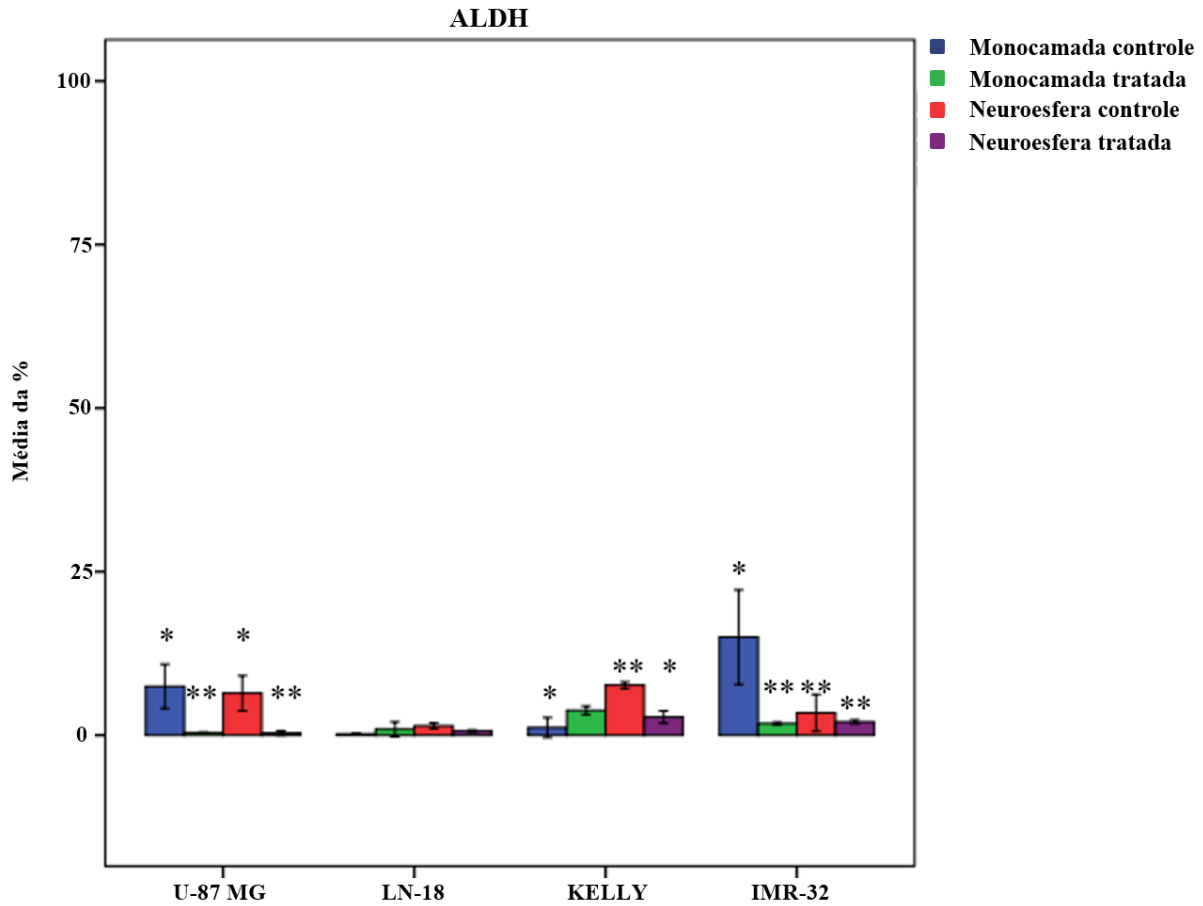


Figura 23: Análise da expressão de Aldeído Desidrogenase (ALDH). A linhagem celular U-87 MG apresenta subpopulações que expressam ALDH nos modelos monocamada e neuroesfera controle, entretanto, as subpopulações que expressavam este marcador desaparecem após tratamento. A linhagem LN-18 apresentou uma subpopulação positiva para ALDH na neuroesfera controle (<2%). Para a linhagem KELLY, observamos subpopulações ALDH⁺ no modelo monocamada tratada e um aumento no modelo neuroesfera controle, entretanto, ao tratar as neuroesferas com cisplatina, houve uma perda das células que expressavam este marcador. A linhagem IMR-32 foi a que teve uma maior porcentagem de células ALDH⁺ na monocamada controle, os níveis de aldeído desidrogenase diminuíram nos demais modelos, entretanto, ainda é possível observar subpopulações expressando ALDH. Anova Post Hoc LSD. * p<0,05. n=2.

A superfamília ALDH consiste de 19 enzimas dependentes de NADP(+) e que participam no metabolismo de aldeídos exógenos (drogas e álcool) e endógenos (lipídeos, aminoácidos ou vitaminas), em seus ácidos carboxílicos correspondentes. Essas enzimas possuem uma distribuição variada entre diferentes órgão e tecidos, e estão localizadas no citoplasma, mitocôndria, núcleo e retículo endoplasmático (VASSALI, 2019; IBRAHIM *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2015).

Como mencionado anteriormente, uma das características durante a origem e progressão do câncer é a reprogramação do metabolismo celular. ALDHs tem sido amplamente utilizadas na identificação de CSCs epiteliais pois possuem papel importante no metabolismo dessas células. Membros da família ALDH1 estão envolvidos na biossíntese de ácido retinoico (AR). AR regula uma variedade de processos fisiológicos durante o desenvolvimento embrionário e remodelamento de tecidos em adultos. Inibição de ALDH culmina na diminuição da sinalização mediada pela ligação de AR aos seus receptores nucleares, diminuindo a diferenciação celular e favorecendo a auto-renovação de CSCs. Em glioblastomas, é descrito que o tratamento com AR promove a diferenciação de CSCs de glioblastoma e reduzem a presença dessas células nesses tumores. Da mesma forma, em neuroblastomas o tratamento com AR ativa a via de sinalização fosfatidilinositol-3-kinase (PI3K) e a ativação desta via é necessária para diferenciação celular mediada por ácido retinoico (VASSALI, 2019; IBRAHIM *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2015).

Além do seu papel na via do AR, enzimas ALDH são importantes na remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e em reduzir os estresses oxidativos induzidos por radiação UV. Estes achados indicam que ALDHs exibem atividades antioxidantes em CSCs. CSCs ALDH⁺ são descritas como resistentes à uma variedade de drogas quimioterápicas, dentre elas a cisplatina. Em gliomas, o fenótipo mesenquimal associado à radiorresistencia pode ser revertido por meio da inibição de ALDH1 (VASSALI, 2019; IBRAHIM *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2015).

3.5.4 Análise da dinâmica do ciclo celular

Nosso próximo passo foi entender como o tratamento com cisplatina interfere na dinâmica do ciclo celular das linhagens celulares U-87 MG, LN-18 e KELLY, nos modelos monocamada e neuroesfera. Até o presente momento, não foi possível avaliar o ciclo celular da linhagem IMR-32.

A análise estatística da cinética do ciclo celular das linhagens celulares (figura 24) mostrou que naturalmente, há um aumento de células na fase G₁ no modelo neuroesfera da U-87 MG em relação à monocamada, e na neuroesfera tratada observa-se um acúmulo maior de células nesta fase do ciclo em relação à todos os modelos. O tratamento com cisplatina promoveu um aumento de células na fase S da monocamada, e em G₂ não foi observado alguma alteração significativa. Na linhagem celular LN-18, observou-se que o tratamento na monocamada diminuiu a quantidade de células em G₁ e culminou no aumento de células em G₂, nenhuma

alteração foi observada após o tratamento no modelo neuroesfera de LN-18. Para a linhagem KELLY, nenhuma diferença foi observada após o tratamento com cisplatina, entre os modelos estudados.

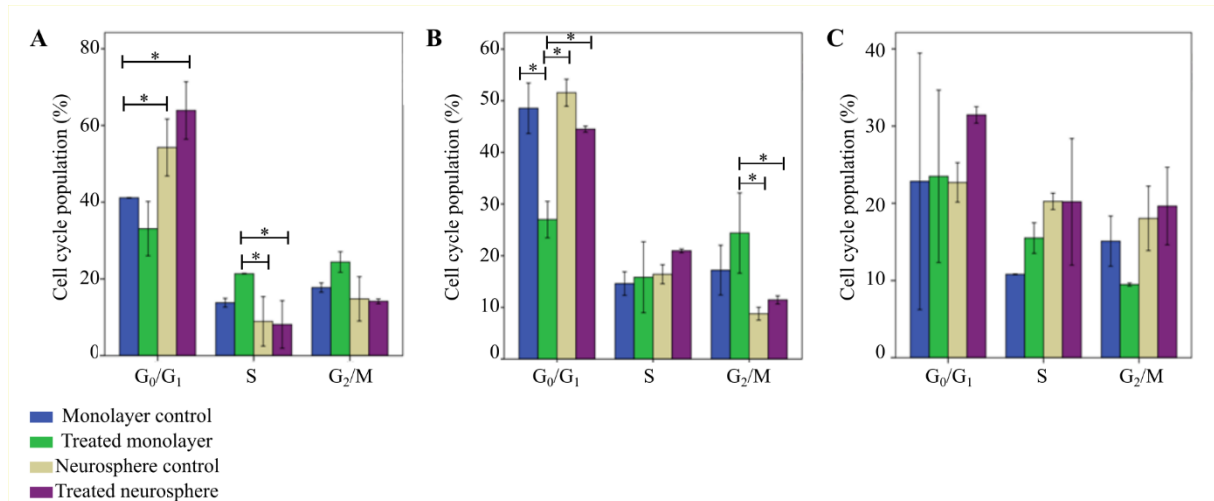


Figura 24: Análise do ciclo celular por citometria de fluxo das linhagens celulares U-87 MG (A) LN-18 (B) e KELLY (C). Naturalmente, há um aumento de células na fase G₁ no modelo neuroesfera da U-87 MG em relação à monocamada, e na neuroesfera tratada observa-se um acúmulo maior de células nesta fase do ciclo em relação à todos os modelos. O tratamento com cisplatina promoveu um aumento de células na fase S na monocamada, e em G₂ não foi observado alguma alteração significativa. Na linhagem celular LN-18, observou-se que o tratamento na monocamada diminuiu a quantidade de células em G₁ e culminou no aumento de células em G₂, nenhuma alteração foi observada após o tratamento no modelo neuroesfera de LN-18. Para a linhagem KELLY, nenhuma diferença foi observada após o tratamento com cisplatina, entre os modelos estudados. Anova Post Hoc LSD. * p < 0,05. n=2.

A análise do ciclo celular por citometria de fluxo permite a discriminação de células que diferem no conteúdo de ácido desóxirribonucleico (DNA), ou seja, células em G₁ versus aquelas que possuem seu material genético duplicado em G₂/M, e células em fase S que apresentam conteúdo de DNA intermediário. A progressão entre as fases do ciclo celular é regulada principalmente por proteínas conhecidas como ciclinas dependentes de quinases (CDKs) (DARZYNKIEWICZ, 2014).

Células de mamíferos possuem três pontos de verificação (*checkpoints*) e que permitem às células repararem o dano no DNA antes que prossigam no ciclo celular. Caso o dano exceda a capacidade de reparo, as células permanecem em senescência ou é ativado a morte celular por apoptose. A ativação da proteína supressora de tumor TP53 é um passo importante durante o checkpoint localizado entre as fases G₁/S. p53 induz a transcrição de p21, um inibidor de CDK,

desta forma, impedindo que as células deem continuidade no ciclo celular sem que o dano ao DNA seja reparado (BENADA; MACUREK, 2015).

O aumento da proporção de células nas fases S e G₂/M é considerado um indicativo no aumento do potencial proliferativo que é uma característica prognóstica ruim em alguns tipos de tumores (DARZYNKIEWICZ, 2014). Células podem sair do ciclo celular e entrarem em um estado quiescente em G₀. Células-tronco adultas, incluindo aquelas residentes no cérebro são encontradas nesta fase até que recebam algum estímulo, como a resposta frente à algum dano. Células-tronco do câncer quiescentes são descritas como os principais determinantes na resistência quimioterápica (QEMO; PORTER, 2019; CHEN *et al*, 2016).

Uma análise do perfil TP53 das linhagens celulares mostrou que, as linhagens U-87 MG e IMR-32 possuem esta proteína ativa, sem mutações. Já as linhagens LN-18 e KELLY possuem um perfil TP53 mutado. O perfil TP53 é uma característica importante frente à resposta ao tratamento quimioterápico. Células cancerígenas deficientes de p53 carecem do checkpoint entre G₁/S, o que culmina na divisão celular juntamente com os danos no DNA, entretanto, por não possuírem esta via ativa, as células são mais sensíveis aos quimioterápicos que agem diretamente no DNA, como é o caso da cisplatina. Em contrapartida, células com p53 selvagem (*Wild Type*), conseguem reparar danos ao DNA como os causados por agentes quimioterápicos citotóxicos, e desta forma resistem ao tratamento (BENADA; MACUREK, 2015).

3.6 Avaliação da resistência transepitelial

A figura 25 mostra a análise da resistência transepitelial (TEER) das linhagens celulares cultivadas em monocamada sob a membrana microporosa do transwell. A linhagem U-87 MG mostrou uma diminuição de sua resistência celular nas primeiras 24hrs ao tratamento com cisplatina, entretanto, ao retirar o meio de cultivo contendo a droga (linhas vermelhas tracejadas) observamos uma discreta recuperação na TEER desta linhagem, um fenômeno parecido é observado após o tratamento com TGF-alpha.

Ao contrário de U-87 MG, a TEER de LN-18 aumentou nas primeiras seis horas durante o tratamento com cisplatina e diminuiu 24hrs depois. Após a retirada dos estímulos, a monocamada passou por um tempo com sua TEER baixa mas recuperou 72hrs depois do tratamento com cisplatina, entretanto, a TEER permaneceu baixa após ter retirado TGF-alpha.

A linhagem KELLY demonstrou-se um modelo refratário, pois observamos um aumento da TEER durante o período de incubação com cisplatina, um comportamento semelhante foi observado ao tratar as células com TGF-alpha. Após a retirada dos estímulos observamos que somente 72hrs após o tratamento com cisplatina, houve uma queda abrupta de sua resistência celular, o mesmo não foi observado no tratamento com TGF-alpha.

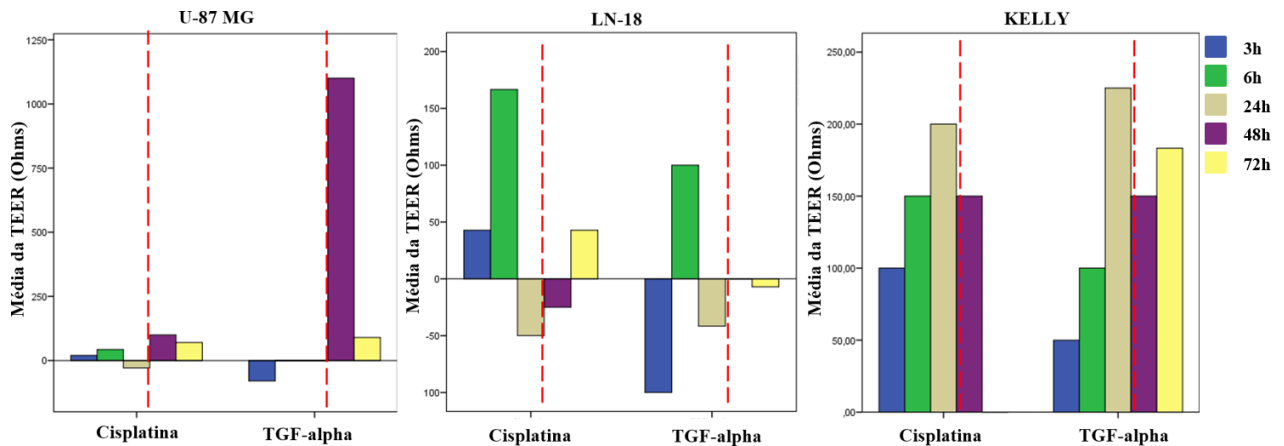


Figura 25: Análise da resistência transepitelial/endotelial (TEER) nas linhagens celulares U-87 MG, LN-18 e KELLY cultivadas em monocamada no transwell. Linhas tracejadas indicam o momento em que houve substituição por um meio sem estímulos. Aumento da resistência reflete na capacidade de recuperação celular frente ao dano, enquanto a diminuição pode estar relacionada à eventos de diferenciação, morte celular ou alteração na permeabilidade das membranas celulares. TGF-alpha foi utilizado como controle positivo pois induz migração e diferenciação celular.

Graças a passagem de íons do compartimento superior para o inferior entre as membranas celulares (via paracelular) e por dentro das células (via transcelular), é gerado uma corrente elétrica e que é inversamente proporcional à resistência celular. Desta forma, conseguimos avaliar a integridade da monocamada celular, uma vez que a alteração na permeabilidade à íons pode ser causada devido à eventos de migração celular, diferenciação ou proliferação (ELBRECHT; LONG; HICKMAN, 2016; CHEN; EINSPANIER; SCHOEN, 2015). TGF-alpha foi utilizado como controle positivo pois foi descrito na concentração utilizada, por causar migração celular, portanto, acaba alterando a resistência da monocamada celular (WANG *et al.*, 2012; MCCLINTOCK; CERESA, 2010).

As células epiteliais estão conectadas entre si por meio de junções intercelulares (junções de oclusão, desmossomos e junções de adesão). Estas junções permitem que o epitélio funcione como uma barreira seletiva, controlando assim os processos de transporte de moléculas entre os lados apical e basal do corpo, mantendo a homeostase. Durante o fenômeno EMT, as junções celulares são desconstruídas e à medida que o evento avança, a expressão das

proteínas que formam essas junções é transcricionalmente reprimida, o que estabiliza a perda de junções epiteliais, levando a uma diminuição na polaridade das células do epitélio, resultando em uma diminuição da TEER (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014).

Sendo assim, a medida da TEER em uma monocamada celular é um método muito sensível e confiável para confirmar a integridade e permeabilidade da monocamada, além disso, é um método não invasivo podendo ser aplicado para monitorar células vivas durante vários estágios de crescimento e diferenciação (SRINIVASAN *et al.*, 2015).

3.7 Células de tumores do sistema nervoso após exposição à cisplatina apresentaram capacidade de crescerem no modelo da CAM

As linhagens celulares U-87 MG, LN-18, KELLY e IMR-32 nos modelos monocamada e neuroesfera, foram expostas à cisplatina utilizando o IC₅₀ determinado para cada uma. Após o período de incubação de 24h, as células foram coletadas e lavadas com PBS 1x para remover quaisquer resíduos do quimioterápico e então aplicadas sobre a membrana corioalantoica (CAM).

O apêndice 7 indica que o tratamento com PBS 1x, veículo utilizado na aplicação das células, não alterou a morfologia da CAM. As setas indicam uma camada de células epiteliais que circundam e delimitam o mesênquima adjacente, tecido rico em vasos sanguíneos. Na figura 26, observamos os aspectos macroscópicos do tumor formado pela linhagem U-87 MG enxertada na CAM. Foi observado o crescimento celular dos modelos monocamada e neuroesfera, mesmo após o tratamento com cisplatina, indicando ainda que o tratamento promoveu o crescimento de um tumor com características macroscópicas diferentes das células sem tratamento.

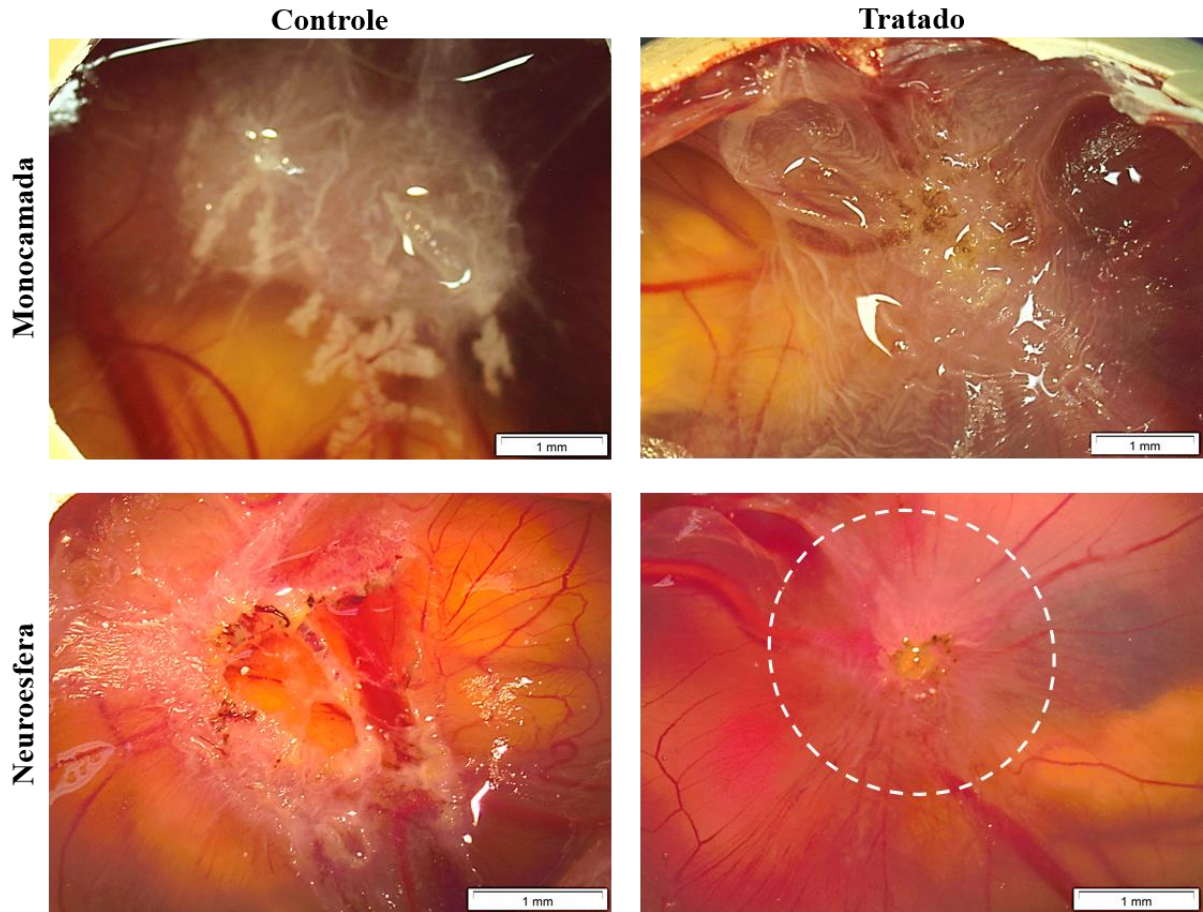


Figura 26: Aspecto macroscópico dos tumores formados pela linhagem U-87 MG a partir de células residuais ao tratamento com cisplatina. Aumento 0,67x.

Na figura 27 observamos os aspectos morfológicos dos tumores formados pelo enxerto do da U-87 MG em monocamada. Nos tumores formados pela monocamada controle (A e A') formações de grupos celulares do tumor dentro da CAM são indicados pelas setas vermelhas, e setas verdes indicam regiões com células similares à fibroblastos. Foi observado uma região de transição celular entre o tumor e a CAM, delimitado por uma linha amarela pontilhada. A maior parte do tumor é composta de pequenas células com aspectos granulares (P1). O tumor formado após exposição à cisplatina (B e B') apresenta características distintas do controle, como a presença de três nítidas populações celulares (P2, P3 e P4) e ausência das células com aspectos granulares vistas no tumor controle. Regiões semelhantes à tecidos epiteliais queratinizados são indicadas por setas pretas.

Nos tumores formados pelo modelo neuroesfera da U-87 MG (figura 28), foi observado a formação de estruturas semelhantes à vilosidades no controle (círculo preto pontilhado – A e A'), formação de grupos celulares (seta vermelha) e uma extensa região de invasão na CAM (seta branca pontilhada). O tratamento com cisplatina promoveu alterações na organização celular com perda das estruturas semelhantes à vilosidades (B e B'). Formação de um tecido epitelial queratinizado é observado após o tratamento (setas pretas).

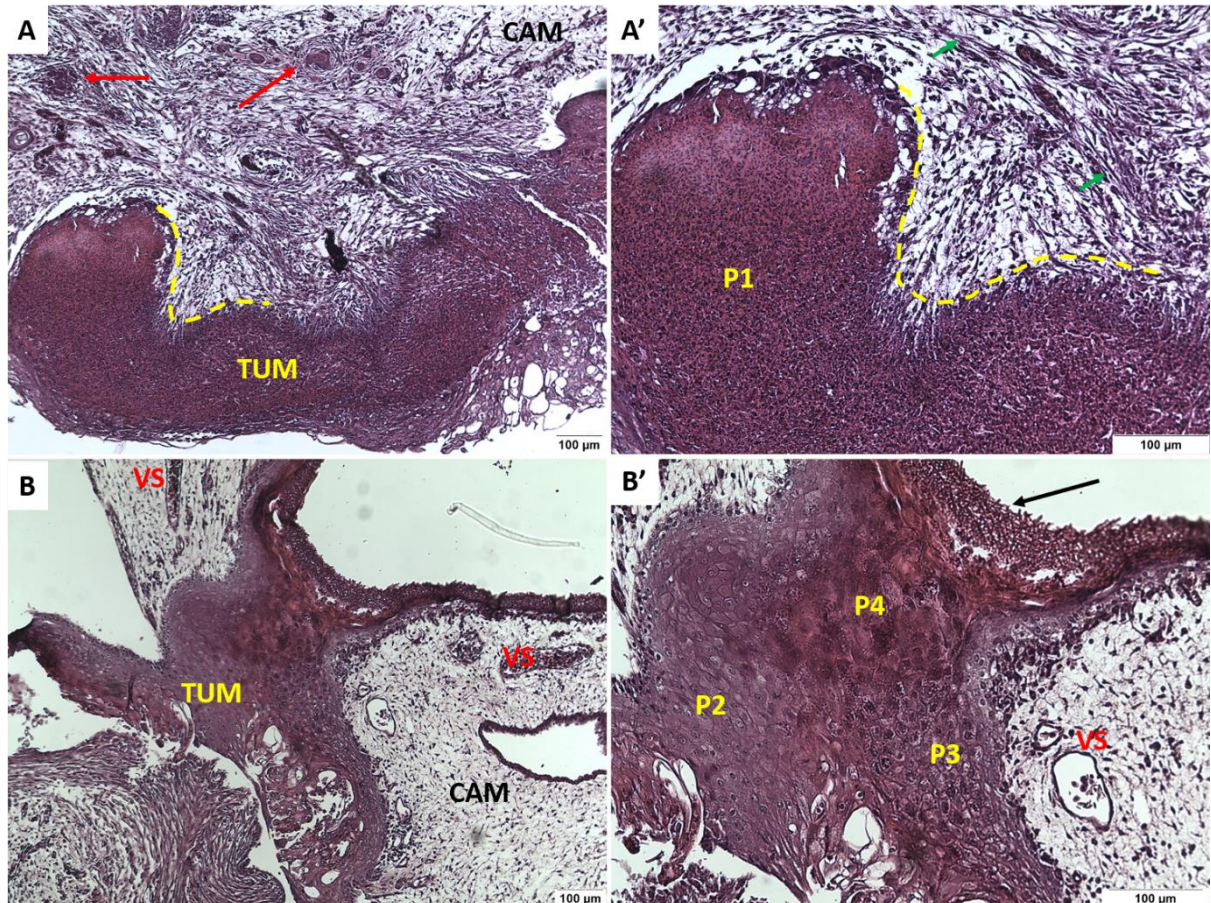


Figura 27: Cortes longitudinais dos tumores formados pela U-87 MG no modelo monocamada. Controle: A e A' e tratado: B e B'. Aumento de 10x e 20x. Legenda: TUM (tumor), CAM (membrana corioalantoica), VS (vasos sanguíneos), setas vermelhas (indicam grupos celulares do tumor dentro da CAM), setas verdes (células semelhantes à fibroblastos), seta preta (tecido epitelial queratinizado), linhas amarelas pontilhadas (área de transição entre o tumor e a CAM), P1 à P4 (diferentes populações celulares). Cortes de 0,4 µM.

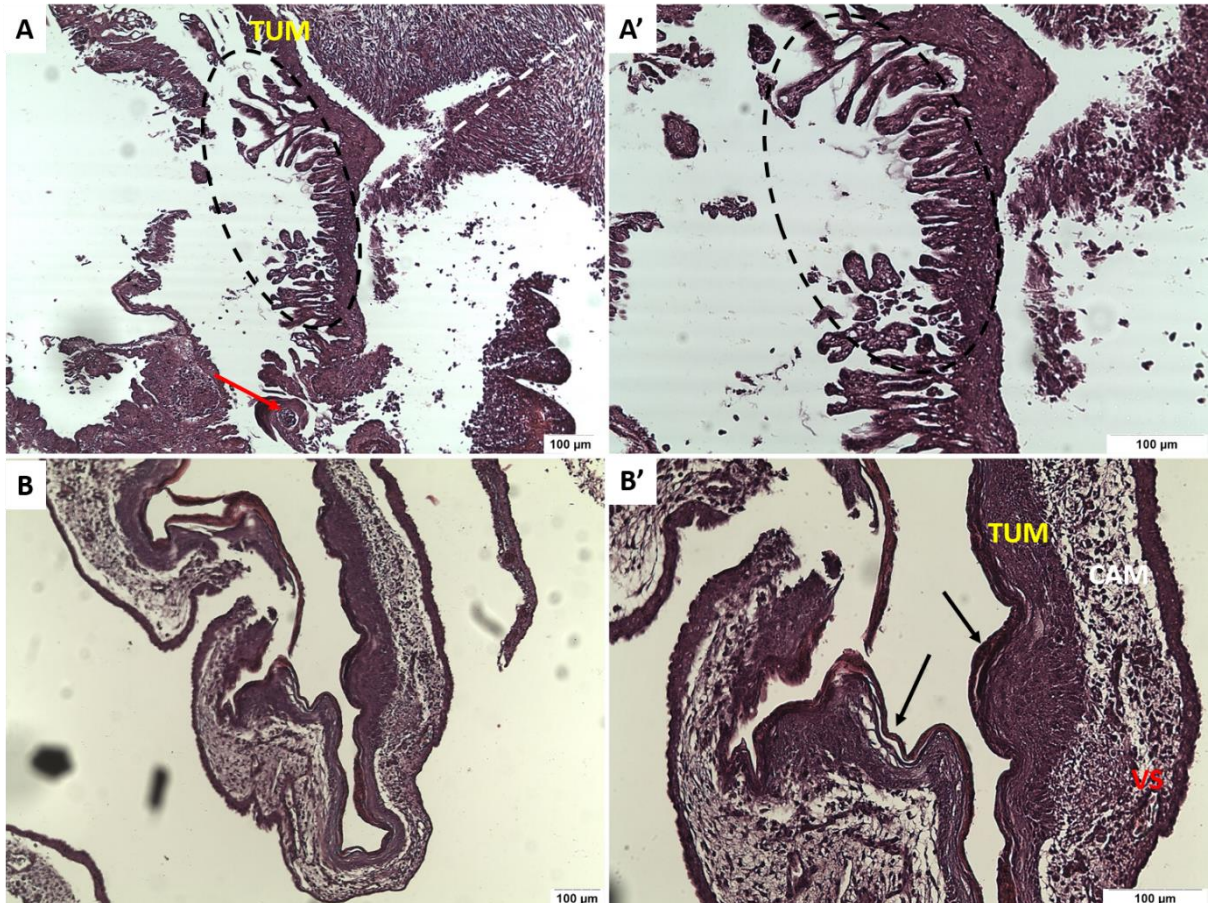


Figura 28: Cortes longitudinais dos tumores formados pela U-87 MG no modelo neuroesfera. Controle: A e A' e tratado: B e B'. Aumento de 10x e 20x. Legenda: TUM (tumor), CAM (membrana corioalantoica), VS (vasos sanguíneos), setas vermelhas (indicam grupos celulares do tumor dentro da CAM), seta preta (tecido epitelial queratinizado), círculos pretos pontilhados (estruturas semelhantes à vilosidades). Cortes de 0,4 μ M.

Assim como U-87 MG, foi observado a capacidade de crescimento de células residuais ao tratamento para as linhagens LN-18 (figura 29). As análises histológicas da CAM mostraram a presença de duas principais subpopulações celulares (P1 e P2) no tumor formado pelo enxerto da monocamada controle (figura 30). A região circulada indica células com aspecto de tecido adiposo unilocular, e as setas pretas indicam formações de tecidos epiteliais queratinizado tanto no controle, quanto após exposição à cisplatina.

Os tumores originados do enxerto de células em neuroesfera da LN-18 na CAM, mostraram padrões de organizações completamente distintos daqueles formados pela linhagem em

monocamada (figura 31). A região de invasão do tumor é indicada por uma seta branca pontilhada. Foi observado formações semelhantes à vilosidades nos tumores controles (círculo preto pontilhado), vale ressaltar que essas estruturas também apareceram no tumor formado pela neuroesfera controle da U-87 MG. A presença de duas populações celulares (P1 e P2) foi delimitada por uma linha amarela pontilhada, sendo que P2 é a que aparentemente tem uma capacidade de invasão maior. Após o tratamento com cisplatina observa-se o desaparecimento das estruturas semelhantes à vilosidades e o surgimento de outro subtipo celular (P3) com características morfológicas diferentes daquelas encontradas em P1 ou P2. Estruturas semelhantes à epitélio queratinizado são indicadas pela seta preta. Grupos de células do tumor dentro da CAM estão indicadas por setas vermelhas. Curiosamente, observa-se uma área do tumor dentro da CAM corada com eosina (asteriscos brancos) que até então não foi observada para as outras linhagens.

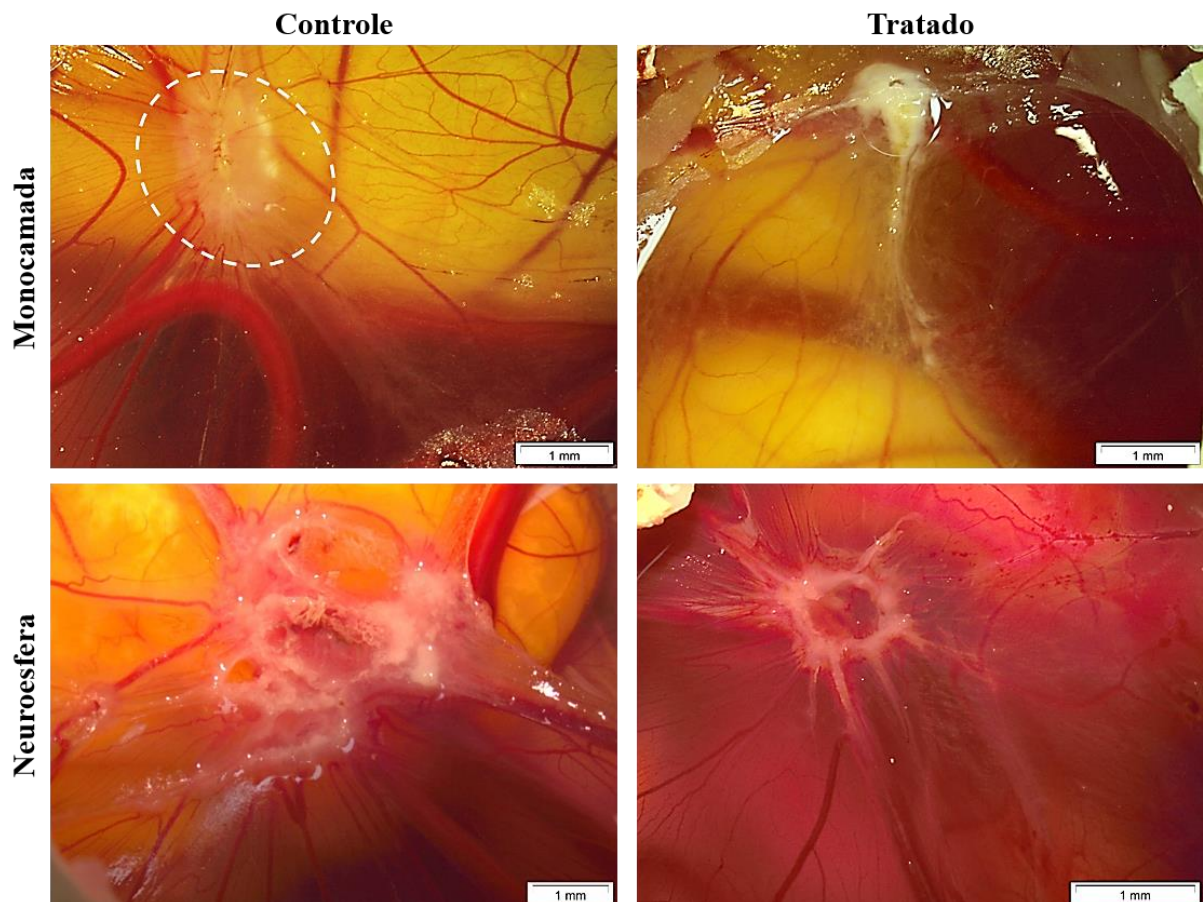


Figura 29: Aspecto macroscópico dos tumores formados pela linhagem LN-18 a partir de células residuais ao tratamento com cisplatina. Aumento 0,67x.

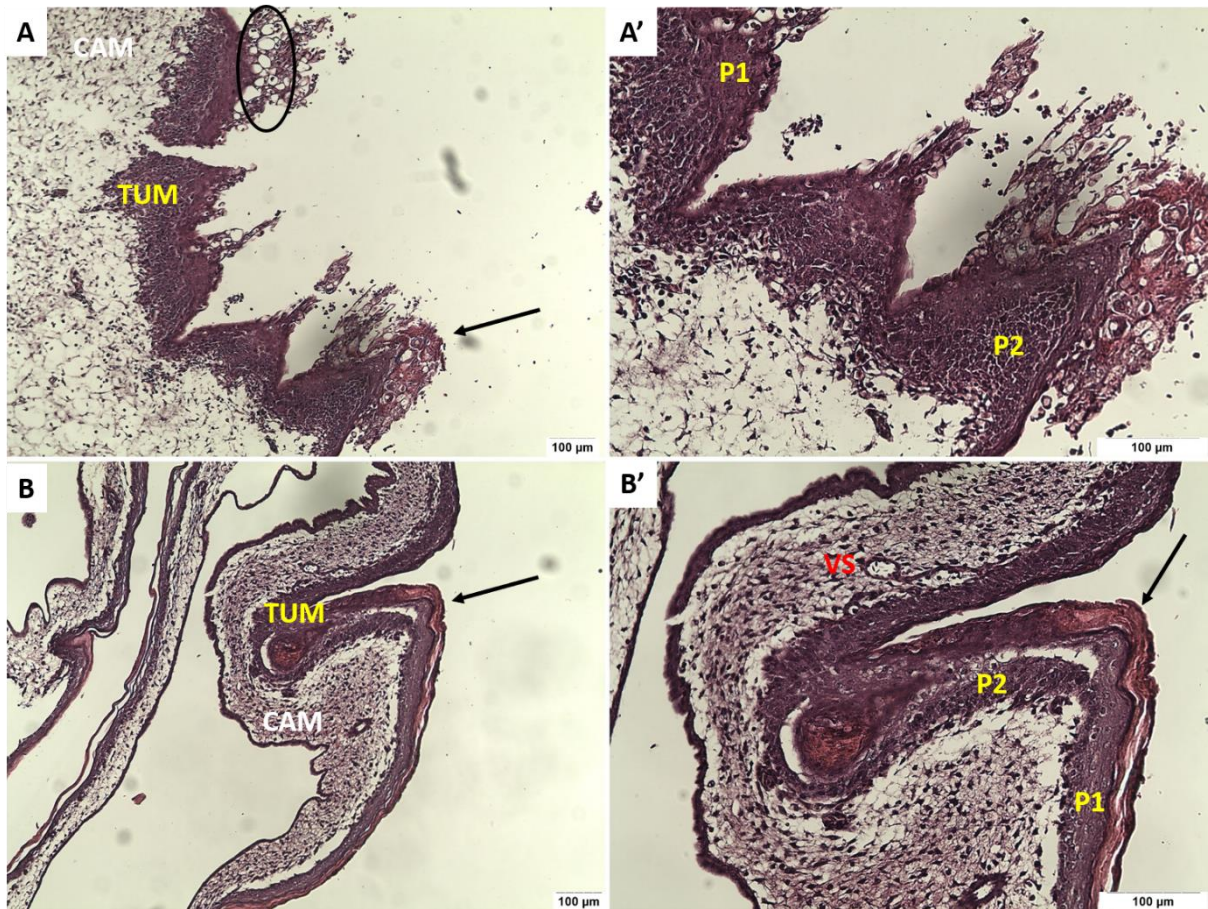


Figura 30: Cortes longitudinais dos tumores formados pela LN-18 no modelo monocamada. Controle: A e A' e tratado: B e B'. Aumento de 10x e 20x. Legenda: TUM (tumor), CAM (membrana corioalantoica), VS (vasos sanguíneos), seta preta (tecido epitelial queratinizado), círculos pretos (estruturas semelhantes células de tecido adiposo unilocular), P1 e P2 (duas populações celulares que diferem na morfologia). Cortes de 0,4 μ M.

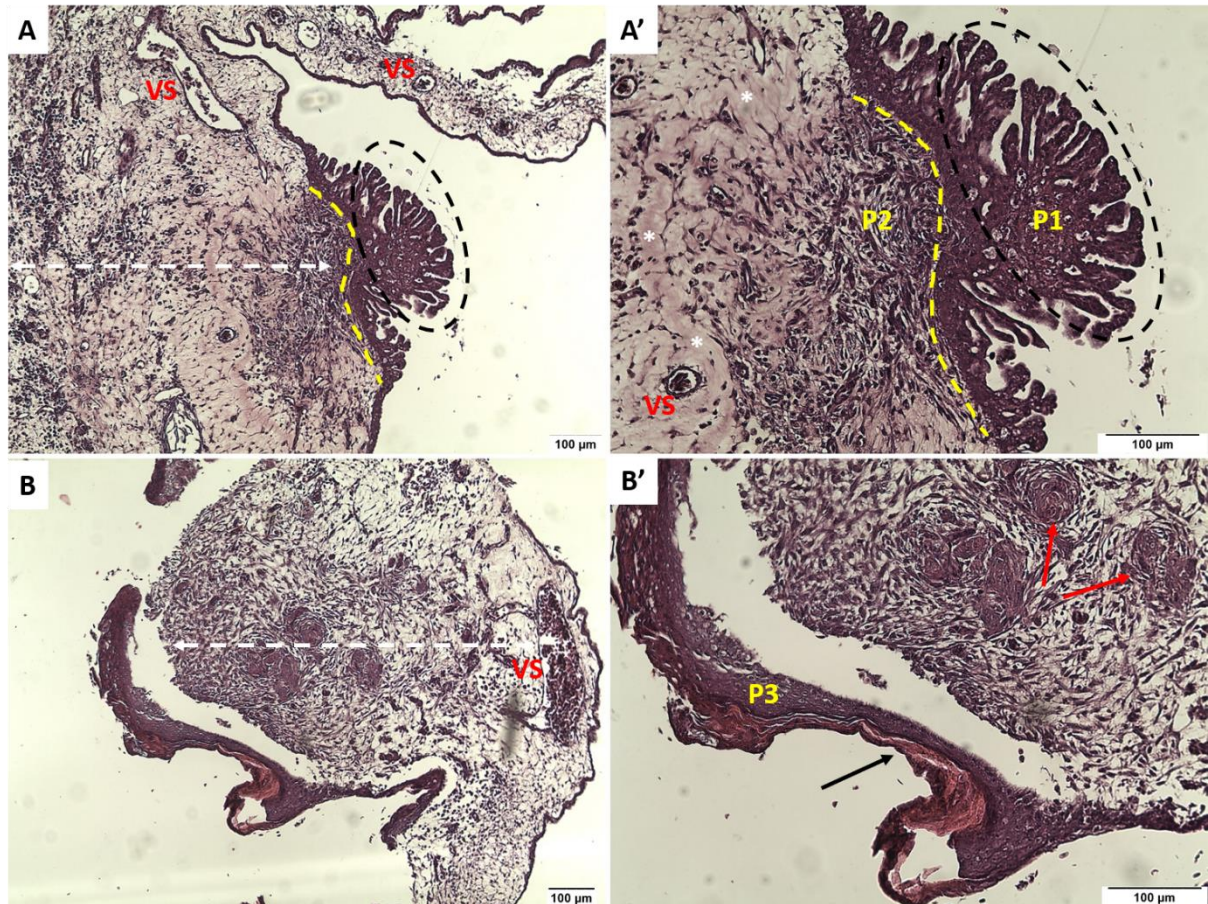


Figura 31: Cortes longitudinais dos tumores formados pela LN-18 no modelo neuroesfera. Controle: A e A' e tratado: B e B'. Aumento de 10x e 20x. Legenda: TUM (tumor), CAM (membrana corioalantoica), VS (vasos sanguíneos), setas brancas (área de invasão do tumor na CAM), setas vermelhas (indicam grupos celulares do tumor dentro da CAM), seta preta (tecido epitelial queratinizado), círculos pretos pontilhados (estruturas semelhantes à vilosidades), P1 à P3 (três diferentes subpopulações que diferem morfológicamente), linha amarela pontilhada (delimitação entre P1 e P2). Cortes de 0,4 μ M.

Os aspectos macroscópicos dos tumores formados pela linhagem KELLY são vistos na figura 32. Nas análises histológicas observamos uma extensa área do tumor ao redor da CAM, formado pelo enxerto de células da monocamada controle (figura 33 - A e A'), com a presença de estruturas semelhantes à vilosidades (círculos pretos pontilhados). Após a exposição da monocamada à cisplatina (B e B'), observa-se que os tumores que cresceram na CAM são visualmente menores tanto macroscopicamente quanto na histologia. Uma clara delimitação entre o tumor e a CAM, é observado (linhas amarelas pontilhadas).

Os tumores formados pelo enxerto da linhagem KELLY no modelo neuroesfera estão representados na figura 34. No tumor formado pelas células sem tratamento prévio com cisplatina (A e A') observa-se a presença de uma população celular identificada como P1. A

área do tumor é visualmente menor do que aquele formado após exposição das células ao quimioterápico (linha preta pontilhada em B indica invasão do tumor na CAM). O tumor formado por neuroesferas residuais ao tratamento indica a presença de três subpopulações celulares com características morfológicas distintas (P1, P2 e P3). P1 é composto por células maiores e com citoplasma mais abundante que as outras, semelhante a população das células no tumor sem tratamento só que em maior quantidade. As células em P2 apresentam morfologia semelhante à condrócitos (células que compõe o tecido cartilaginoso) e P3 é formado por uma fina camada de células colunares que estão na interface tumor x CAM. As setas vermelhas indicam grupos de células do tumor dentro da CAM.

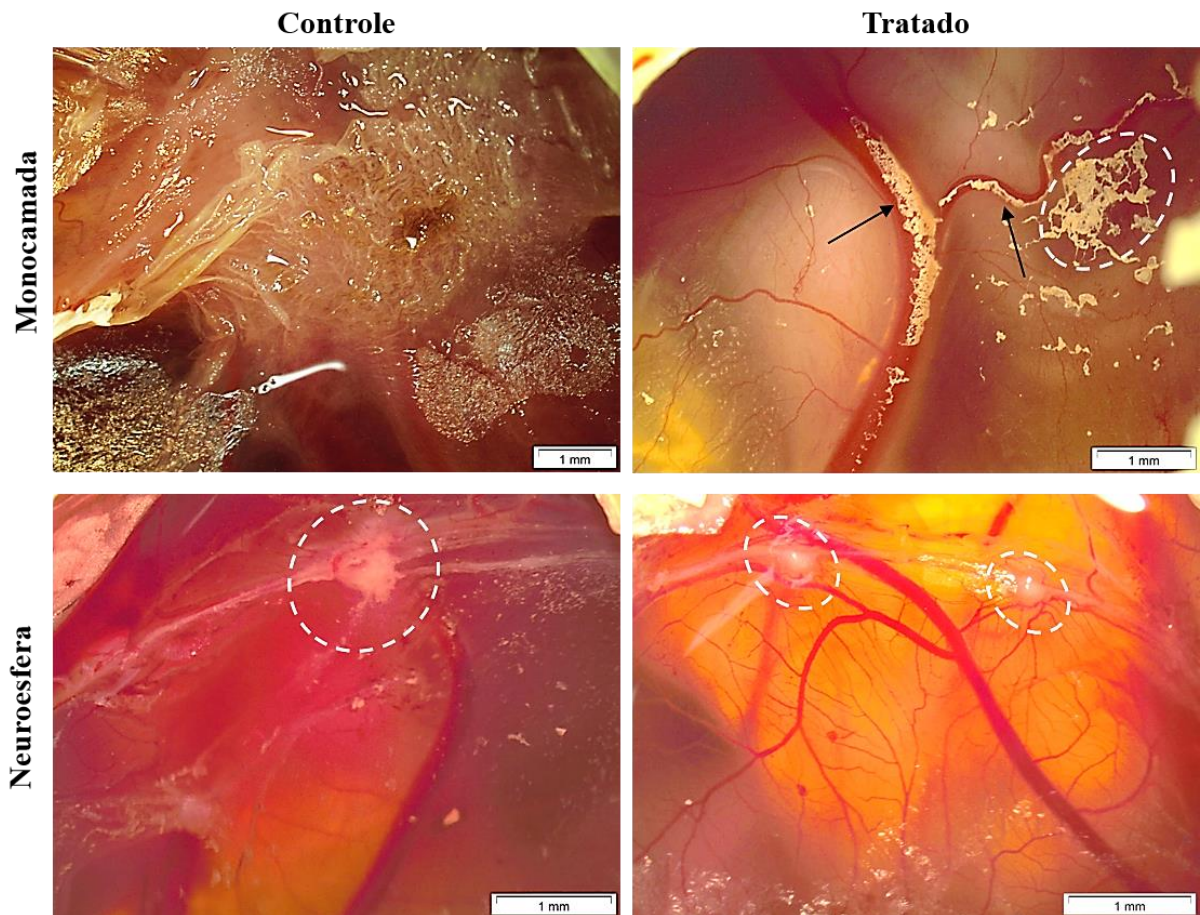


Figura 32: Aspecto macroscópico dos tumores formados pela linhagem KELLY a partir de células residuais ao tratamento com cisplatina. Aumento 0,67x.

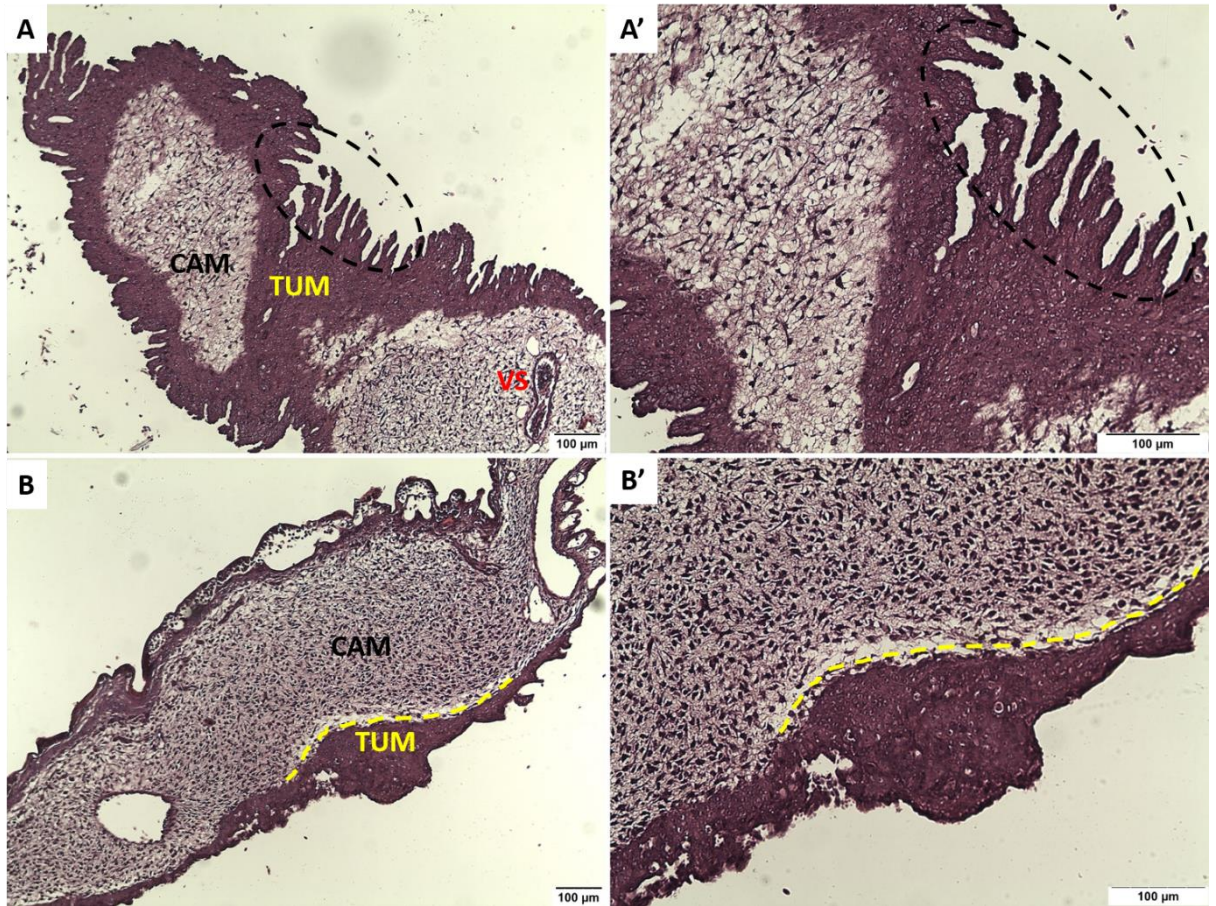


Figura 33: Cortes longitudinais dos tumores formados pela KELLY no modelo monocamada. Controle: A e A' e tratado: B e B'. Aumento de 10x e 20x. Legenda: TUM (tumor), CAM (membrana corioalantoica), VS (vasos sanguíneos), círculos pretos pontilhados (estruturas semelhantes à vilosidades), linha amarela pontilhada (delimitação entre o tumor e a CAM). Cortes de 0,4 μ M.

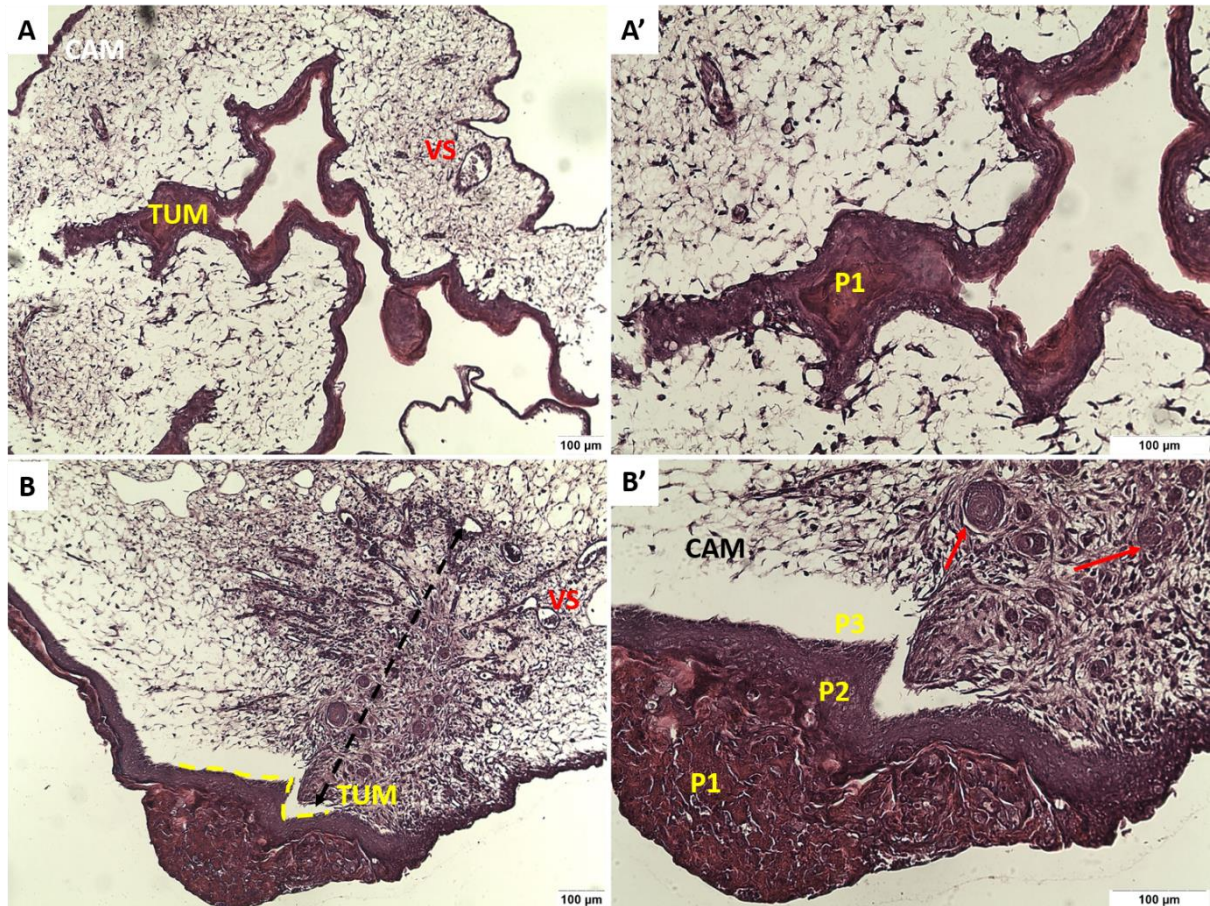


Figura 34: Cortes longitudinais dos tumores formados pela KELLY no modelo neuroesfera. Controle: A e A' e tratado: B e B'. Aumento de 10x e 20x. Legenda: TUM (tumor), CAM (membrana corioalantoica), VS (vasos sanguíneos), seta preta pontilhada (área de invasão do tumor na CAM), setas vermelhas (indicam grupos celulares do tumor dentro da CAM), P1 à P3 (três diferentes subpopulações que diferem morfologicamente), linha amarela pontilhada (delimitação entre P3 e a CAM invadida por células do tumor). Cortes de 0,4 μ M.

Nossos achados mostraram ainda que a sensibilidade não é o único determinante no tratamento do câncer, pois embora tenha sido caracterizado nos ensaios de citotoxicidade com o menor IC_{50} entre as linhagens, IMR-32 tanto em seu modelo monocamada quanto enriquecimento de CSCs foi capaz de crescer na CAM (figura 35). Vale ressaltar ainda que o fenótipo híbrido dessa linhagem, com diferentes subpopulações celulares refletiu no crescimento dessa linhagem na CAM. Nossos ensaios mostraram sobretudo subpopulações com características de MDSCs, sendo que tais células são descritas por promover a manutenção de CSCs no microambiente tumoral, a angiogênese e o crescimento do câncer.

O corte histológico dos tumores formados pela linhagem IMR-32 em monocamada, estão representados na figura 36. Observamos a presença de duas populações morfologicamente distintas (P1 e P2) no tumor formado pelas células controle (A e A'). Após exposição à

cisplatina, não é observado uma clara distinção entre subpopulações no tumor e aparentemente o tratamento não reduziu o crescimento da linhagem IMR-32. Nas análises histológicas dos tumores formados pela deposição das neuroesferas da IMR-32 na CAM (figura 37), observa-se uma extensa área de invasão do tumor na CAM, com o acúmulo de células com características fibroblásticas (setas verdes). Uma clara delimitação entre a região do tumor formado por células residuais e a CAM, foi delimitada por uma linha amarela pontilhada (B). Setas vermelhas mostram células tumorais que invadiram a CAM e formaram grupos. Tecido epitelial queratinizado é indicado pela seta preta.

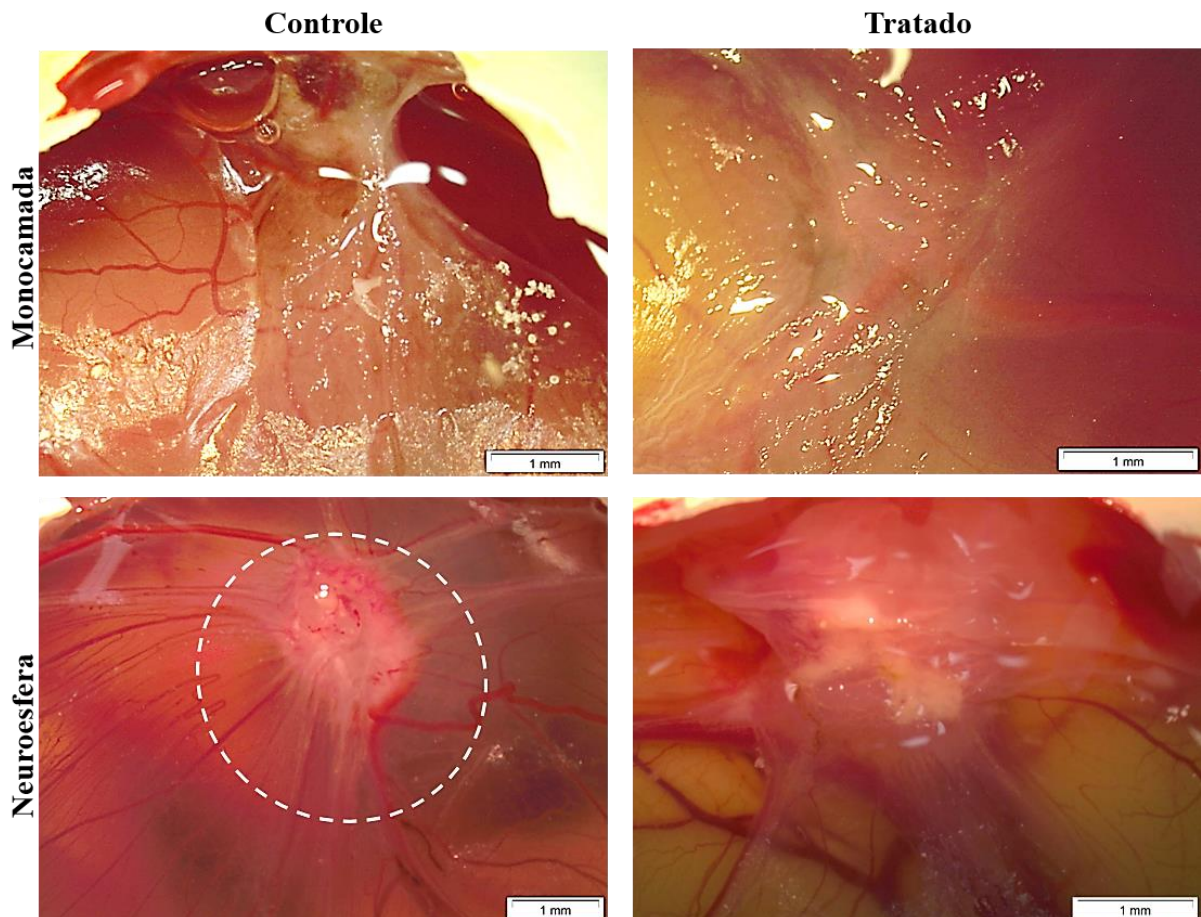


Figura 35: Aspecto macroscópico dos tumores formados pela linhagem IMR-32 a partir de células residuais ao tratamento com cisplatina. Aumento 0,67x.

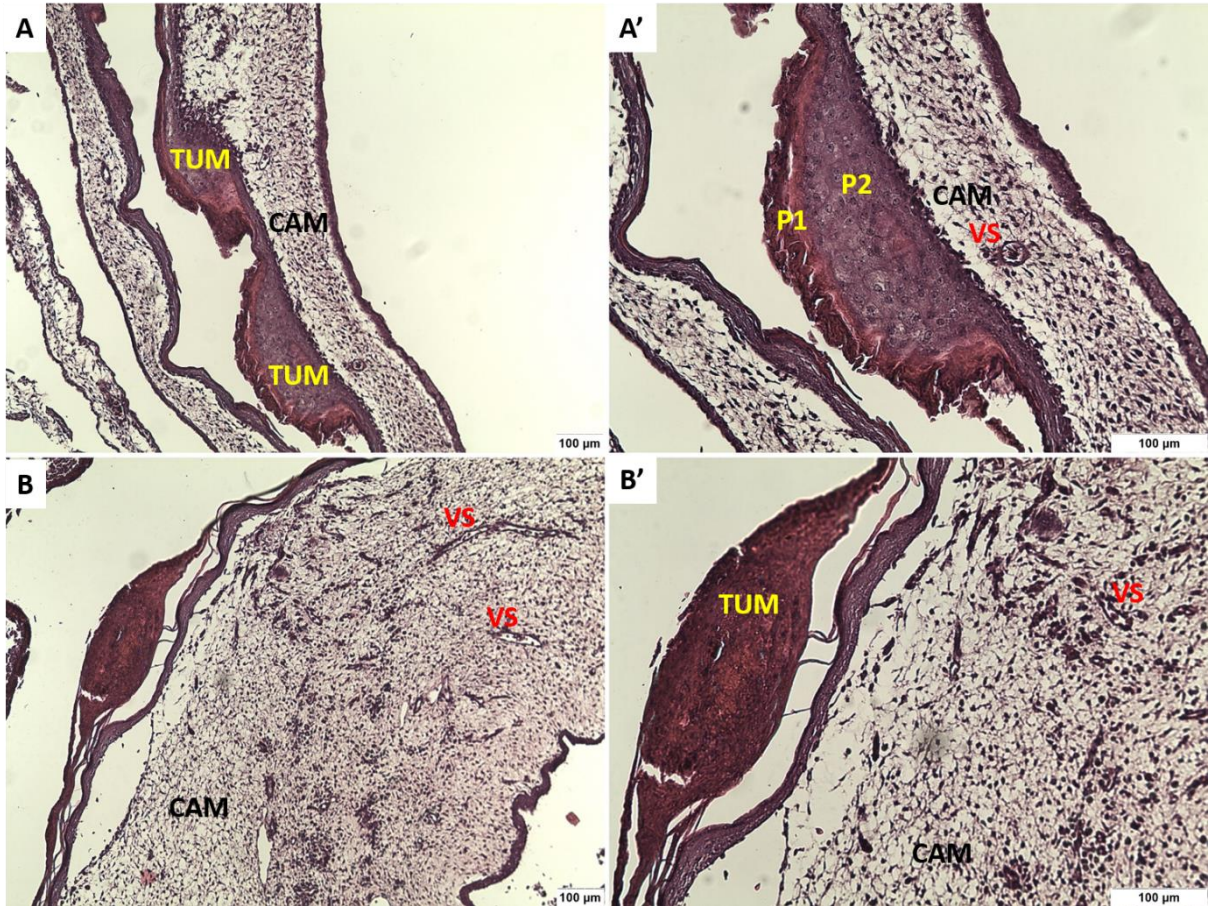


Figura 36: Cortes longitudinais dos tumores formados pela IMR-32 no modelo monocamada. Controle: A e A' e tratado: B e B'. Aumento de 10x e 20x. Legenda: TUM (tumor), CAM (membrana corioalantoica), VS (vasos sanguíneos), P1 e P2 (presença de duas subpopulações celulares morfológicamente distintas). Cortes de 0,4 μM.

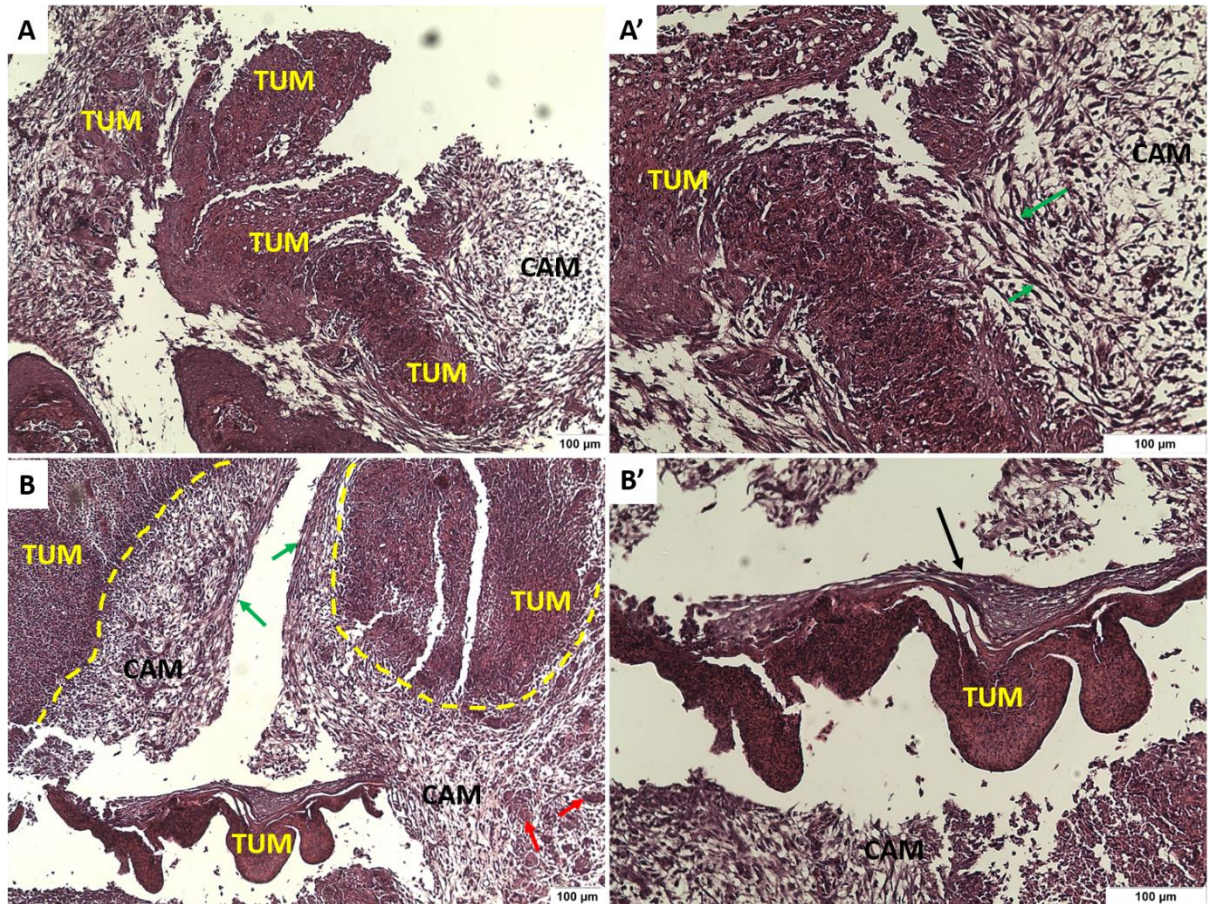


Figura 37: Cortes longitudinais dos tumores formados pela IMR-32 no modelo neuroesfera. Controle: A e A' e tratado: B e B'. Aumento de 10x e 20x. Legenda: TUM (tumor), CAM (membrana corioalantoica), VS (vasos sanguíneos), setas vermelhas (indicam grupos celulares do tumor dentro da CAM), seta preta (tecido epitelial queratinizado), setas verdes (presença de fibroblastos), linha amarela pontilhada (delimitação entre a área do tumor e a CAM). Cortes de 0,4 µM.

A membrana corioalantoica tem sido utilizada por muitos anos para o crescimento de xenoinxertos de tumores, incluindo glioblastomas e neuroblastomas. O modelo tem se tornado especialmente atrativo por permitir o crescimento de tumores em poucos dias, além de refletir as condições fisiológicas de um microambiente tumoral, como a rápida vascularização e a presença de proteínas da MEC. A CAM é um modelo de baixo custo e que permite a triagem de uma variedade de agentes quimioterápicos (DEBORD *et al.*, 2018). Vale ressaltar que as análises histológicas serão avaliadas por patologistas para uma melhor compreensão das alterações celulares promovidas pelo crescimento dos tumores, além disso, marcações imunohistoquímicas serão necessárias para determinar os subtipos celulares.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um modelo esquemático das alterações celulares promovidas pelo tratamento com cisplatina, foi desenhado para cada linhagem celular, a fim de reunir os achados deste trabalho. Em síntese, a linhagem U-87 MG (Figura 38), foi a mais resistente ao tratamento e trata-se de uma população celular híbrida, pois expressa marcadores epiteliais, mesenquimais e hematopoiéticos, tanto na monocamada quanto neuroesfera controle. No modelo monocamada tratada prevaleceu subpopulações expressando o marcador hematopoiético HLA-DR e mesenquimais, diferente da neuroesfera tratada, onde observa-se somente um fenótipo mesenquimal. Células residuais ao tratamento da monocamada ou neuroesfera foram capazes de crescerem na CAM.

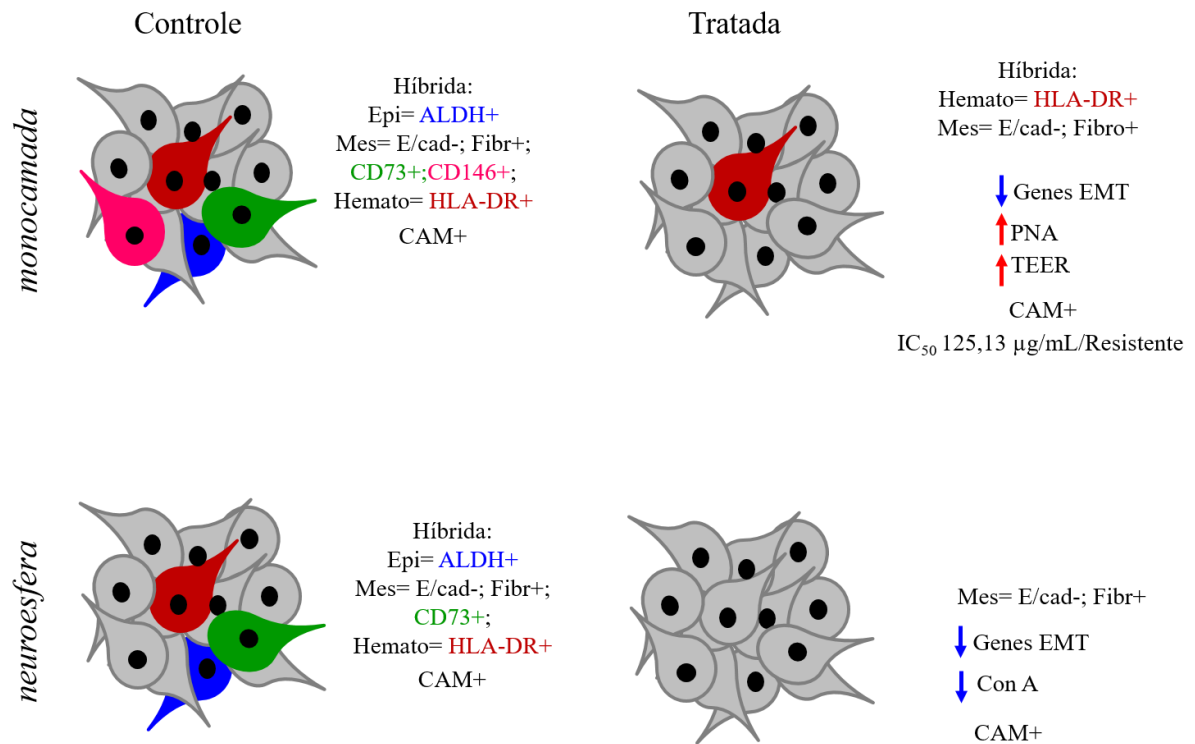
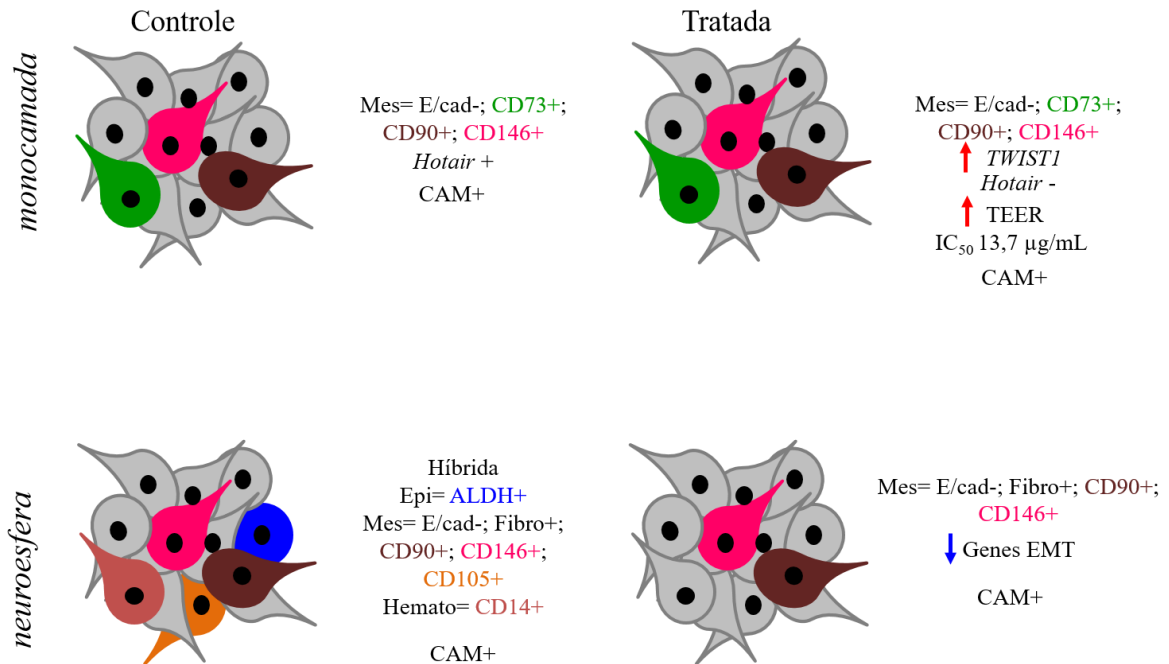


Figura 38: Modelo esquemático das alterações promovidas pelo tratamento com cisplatina nos modelos monocamada e neuroesfera, da linhagem U-87 MG.

A linhagem LN-18 (Figura 39) foi a segunda mais resistente à cisplatina. As células em monocamada possuem um fenótipo predominantemente mesenquimal o qual permanece mesmo após o tratamento. Esta linhagem expressava o lncRNA *HOTAIR* na monocamada controle e após tratamento, perdeu a expressão deste alvo e *TWIST1* ficou superexpresso na monocamada tratada. O modelo neuroesfera desta linhagem é caracterizado por diferentes subpopulações celulares que expressavam marcador epitelial (ALDH), mesenquimais

(Fibronectina, CDs 90 e 146) e hematopoiético (CD14) entretanto, após tratamento, prevaleceu somente o fenótipo mesenquimal, além disso, os genes reguladores de EMT ficaram subexpressos. Assim como U-87 MG, células residuais ao tratamento da monocamada ou neuroesfera foram capazes de crescerem na CAM.

Figura 39: Modelo esquemático das alterações promovidas pelo tratamento com cisplatina nos modelos monocamada e neuroesfera, da linhagem LN-18.



A linhagem KELLY (Figura 40) foi uma das linhagens sensíveis à cisplatina. O modelo monocamada controle e tratado apresentou o mesmo perfil fenotípico, onde observamos subpopulações que expressavam o marcador neural CD24 (não observado nas linhagens de glioblastoma), marcadores mesenquimais, hematopoiético e epitelial. A monocamada controle amplificou para o alvo HOTAIR, entretanto, após tratamento não observa-se mais a expressão deste lncRNA. Já as células cultivadas em neuroesfera perderam a subpopulação que expressava o marcador neural e aquelas que expressavam os marcadores mesenquimais, hematopoiético e epitelial prevaleceram, o mesmo fenótipo é observado na neuroesfera tratada.

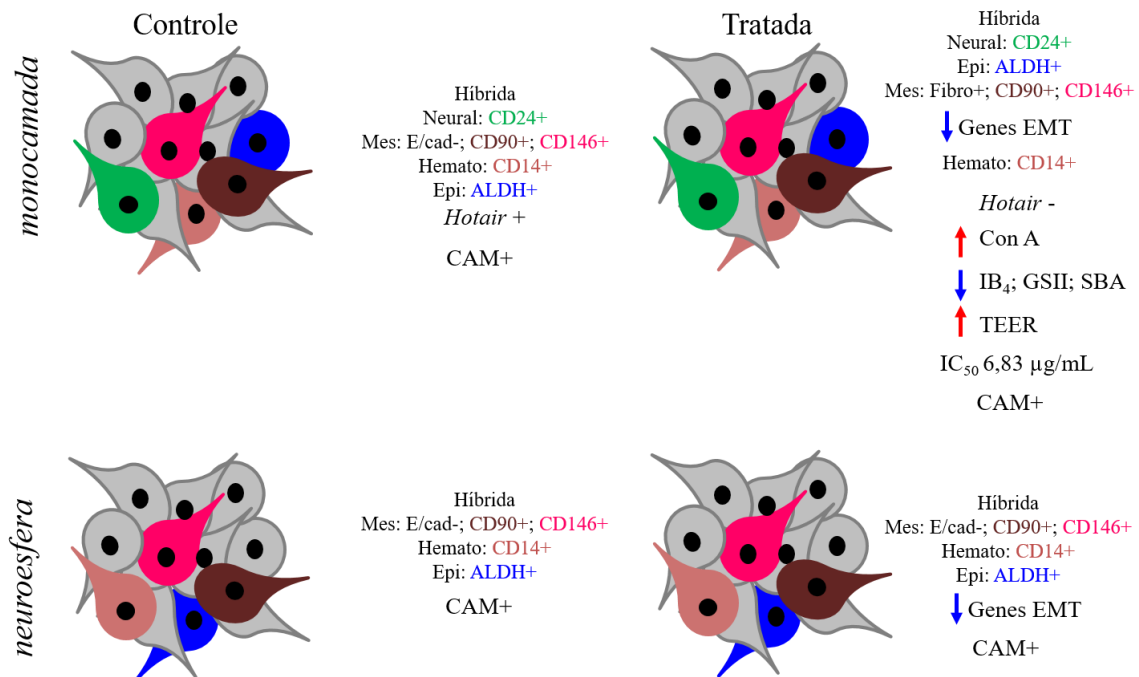


Figura 40: Modelo esquemático das alterações promovidas pelo tratamento com cisplatina nos modelos monocamada e neuroesfera, da linhagem KELLY.

IMR-32 (Figura 41) foi caracterizada neste trabalho como a mais sensível à cisplatina. Foi observado que esta linhagem apresentou subpopulações enriquecidas para o marcador neural CD24, epitelial ALDH, mesenquimais (CDs 90 e 146) e hematopoiético CD14, e este fenótipo foi mantido mesmo após o tratamento da monocamada ou neuroesfera. O modelo monocamada controle desta linhagem amplificou para *HOTAIR* e após o tratamento perdeu-se a expressão deste alvo. Curiosamente, foi observado uma expressão a nível basal de *TGFBI* na monocamada tratada e este mesmo alvo e *STAT3* ficaram superexpressos após o tratamento do modelo de enriquecimento de CSCs. Como já mencionado anteriormente, IMR-32 e KELLY demonstraram um fenótipo típico de células MDSC monocíticas caracterizado pela presença de CD14 e ausência de HLA-DR. MDSCs é um subtipo celular que está envolvido com a supressão da resposta imune, angiogênese, metástase e manutenção de CSCs. Desta forma, isto poderia explicar o fenótipo híbrido dessas linhagens e a capacidade de terem crescido na CAM.

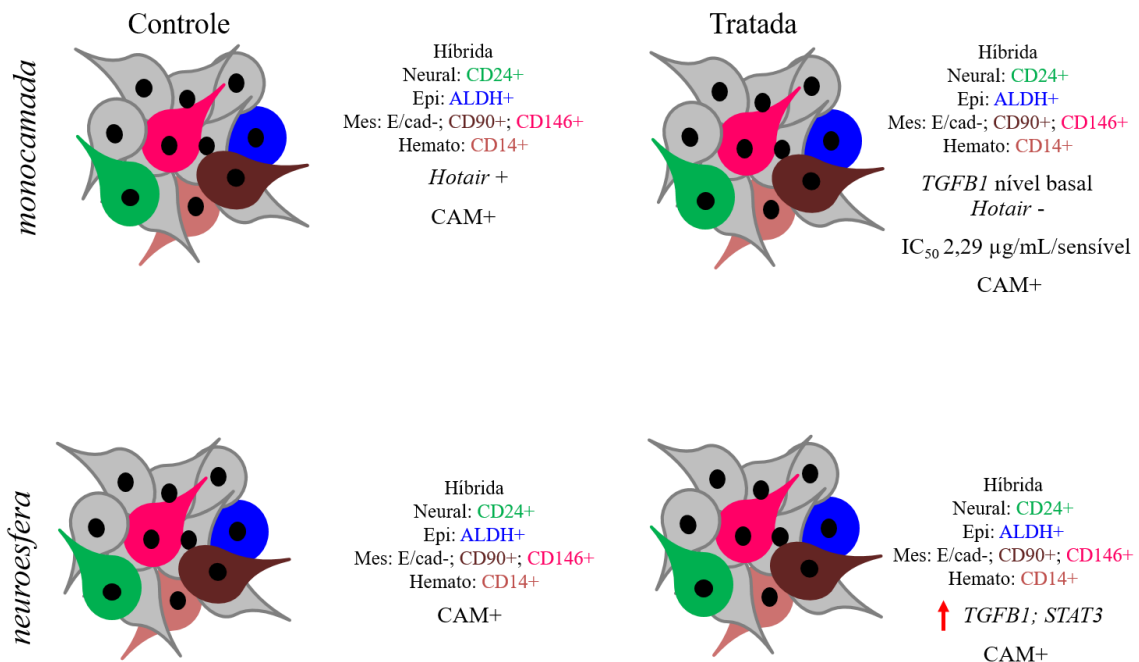


Figura 41: Modelo esquemático das alterações promovidas pelo tratamento com cisplatina nos modelos monocamada e neuroesfera, da linhagem IMR-32.

6 CONCLUSÕES

- Nosso estudo tem demonstrado uma grande heterogeneidade celular dentro dos tumores do SNC;
- A ausência da expressão de *HOTAIR* nas linhagens LN-18, KELLY e IMR-32 após o tratamento não foi acompanhada da perda do fenótipo mesenquimal, sugerindo que ele não é essencial na manutenção dessa característica;
- A expressão de CDs hematopoiéticos, mesenquimais e neurais difere entre as linhagens;
- As linhagens celulares KELLY e IMR-32 se mostraram mais enriquecidas para CSCs e apresentaram um fenótipo híbrido com a presença de subpopulações com características de MDSCs;
- O aumento da TEER após tratamento com cisplatina reflete a capacidade de recuperação celular ao dano enquanto a diminuição indica eventos de diferenciação, proliferação/morte celular ou alteração na permeabilidade celular;

- Nossos resultados demonstraram que a sensibilidade à cisplatina não é o único determinante para a eficácia do tratamento uma vez que as linhagens mais sensíveis mostraram um fenótipo híbrido e enriquecido de CSCs que resultou na capacidade de crescimento na CAM após tratamento;
- O aumento de *TGFBI* e *STAT3* na neuroesfera tratada de IMR-32, reflete que o tratamento pode induzir proliferação e diferenciação celular, mediada por esses alvos;
- O sistema da CAM serviu como um modelo xenográfico de estudo de recidiva oncológica;
- Os tumores que cresceram na CAM a partir de células residuais ao tratamento com cisplatina mostraram padrões de organização diferentes dos tumores oriundos de células sem tratamento.

Sendo assim, nossos achados dão forte suporte a ideia de que as definições de características fenotípicas dos tumores podem ajudar a estabelecer melhores estratégias terapêuticas para o desenvolvimento de novas drogas alvos ou na descoberta de novos alvos de drogas.

REFERÊNCIAS

- ADZIC, Marija; NEDELJKOVIC, Nadezda. Unveiling the role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in astrocyte migration by using pharmacological tools. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 153, 2018.
- ALDOSSARY, Sara A. Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 12, n. 1, p. 7-15, 2019.
- ALI, Asfa; BHATTACHARYA, Santanu. DNA binders in clinical trials and chemotherapy. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 16, p. 4506-4521, 2014.
- ALMEIDA VL, Leitão A, Reina LD, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MT. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**. 2005 Jan;28(1):118-29.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Treating Neuroblastomas, 2018. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/neuroblastoma/treating.html>>. Acesso em: 14 de julho de 2019.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Chemotherapy for Adult Brain and Spinal Cord Tumors, 2017. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/brain-spinal-cord-tumors-adults/treating/chemotherapy.html>>. Acesso em: 16 de julho de 2019.

ARVIDSSON, Andreas *et al.* Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. **Nature medicine**, v. 8, n. 9, p. 963, 2002.

AVRIL, Tony *et al.* CD90 expression controls migration and predicts dasatinib response in glioblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 23, p. 7360-7374, 2017.

AYOB, Ain Zubaidah; RAMASAMY, Thamil Selvee. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. **Journal of biomedical science**, v. 25, n. 1, p. 20, 2018.

BARKEER, Srikanth *et al.* Glycosylation of cancer stem cells: function in stemness, tumorigenesis, and metastasis. **Neoplasia**, v. 20, n. 8, p. 813-825, 2018.

BARRIERE, Guislaine *et al.* Epithelial mesenchymal transition: a double-edged sword. **Clinical and translational medicine**, v. 4, n. 1, p. 14, 2015.

BAHMAD, Hisham F. *et al.* Cancer Stem Cells in Neuroblastoma: Expanding the Therapeutic Frontier. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 12, p. 131, 2019.

BAYIN, Nermin Sumru; MODREK, Aram Sandaldjian; PLACANTONAKIS, Dimitris George. Glioblastoma stem cells: molecular characteristics and therapeutic implications. **World journal of stem cells**, v. 6, n. 2, p. 230, 2014.

BEHNAN, Jinan; FINOCCHIARO, Gaetano; HANNA, Gabi. The landscape of the mesenchymal signature in brain tumours. **Brain**, v. 142, n. 4, p. 847-866, 2019.

BENADA, Jan; MACUREK, Libor. Targeting the checkpoint to kill cancer cells. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1912-1937, 2015.

BEROIS, Nora; OSINAGA, Eduardo. Glycobiology of neuroblastoma: impact on tumor behavior, prognosis, and therapeutic strategies. **Frontiers in oncology**, v. 4, p. 114, 2014.

BRANDES, Alba A. *et al.* First-line chemotherapy with cisplatin plus fractionated temozolomide in recurrent glioblastoma multiforme: a phase II study of the Gruppo Italiano Cooperativo di Neuro-Oncologia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 9, p. 1598-1604, 2004.

BORRIELLO, Lucia *et al.* More than the genes, the tumor microenvironment in neuroblastoma. **Cancer letters**, v. 380, n. 1, p. 304-314, 2016.

CAI, Zhihong *et al.* Signalling mechanism (s) of epithelial–mesenchymal transition and cancer stem cells in tumour therapeutic resistance. **Clinica Chimica Acta**, v. 483, p. 156-163, 2018.

CANCER RESEARCH UK. Brain, other CNS and intracranial tumours incidence statistics. Disponível em: < <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/brain-other-cns-and-intracranial-tumours/incidence#heading-One>>. Acesso em: 12 de julho de 2019.

CARLÉN, Marie *et al.* Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 259, 2009.

CARVALHO-CRUZ, Patricia *et al.* Cellular glycosylation senses metabolic changes and modulates cell plasticity during epithelial to mesenchymal transition. **Developmental Dynamics**, v. 247, n. 3, p. 481-491, 2018

CASEY, Stephanie C. *et al.* Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2015. p. S199-S223.

CHEN, Shuai; EINSPANIER, Ralf; SCHOEN, Jennifer. Transepithelial electrical resistance (TEER): a functional parameter to monitor the quality of oviduct epithelial cells cultured on filter supports. **Histochemistry and cell biology**, v. 144, n. 5, p. 509-515, 2015.

CHEN, Wanyin *et al.* Cancer stem cell quiescence and plasticity as major challenges in cancer therapy. **Stem cells international**, v. 2016, 2016.

CHOY, Winward *et al.* CD133 as a marker for regulation and potential for targeted therapies in glioblastoma multiforme. **Neurosurgery Clinics**, v. 23, n. 3, p. 391-405, 2012.

Darzynkiewicz Z, Zhao H. Cell cycle analysis by flow cytometry. *Els.* 2014.

DEBORD, Logan C. *et al.* The chick chorioallantoic membrane (CAM) as a versatile patient-derived xenograft (PDX) platform for precision medicine and preclinical research. **American journal of cancer research**, v. 8, n. 8, p. 1642, 2018.

DEININGER, Martin H.; MEYERMANN, Richard; SCHLUESENER, Hermann J. Expression and release of CD14 in astrocytic brain tumors. **Acta neuropathologica**, v. 106, n. 3, p. 271-277, 2003.

DERYUGINA, Elena I.; QUIGLEY, James P. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. **Histochemistry and cell biology**, v. 130, n. 6, p. 1119-1130, 2008.

DE WEILLE, Jan. On the genesis of neuroblastoma and glioma. **International Journal of Brain Science**, v. 2014, 2014.

DI VEROLI, Giovanni Y. *et al.* An automated fitting procedure and software for dose-response curves with multiphasic features. **Scientific reports**, v. 5, p. 14701, 2015

DONGRE, Anushka; WEINBERG, Robert A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. **Nature reviews Molecular cell biology**, p. 1, 2018.

DUFAIT, Inès *et al.* Signal transducer and activator of transcription 3 in myeloid-derived suppressor cells: an opportunity for cancer therapy. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, p. 42698, 2016.

DUNNE, Margaret R. *et al.* HLA-DR expression in tumor epithelium is an independent prognostic indicator in esophageal adenocarcinoma patients. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 66, n. 7, p. 841-850, 2017.

ELBRECHT, Daniel H.; LONG, Christopher J.; HICKMAN, James J. Transepithelial/endothelial Electrical Resistance (TEER) theory and applications for microfluidic body-on-a-chip devices. **tc**, v. 1, n. 1, p. 1, 2016.

FAN, Xing *et al.* Expression of HLA-DR genes in gliomas: correlation with clinicopathological features and prognosis. **Chinese Neurosurgical Journal**, v. 3, n. 1, p. 27, 2017.

FEDELE, Monica *et al.* Proneural-Mesenchymal Transition: Phenotypic Plasticity to Acquire Multitherapy Resistance in Glioblastoma. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 11, p. 2746, 2019.

FIEGEL, Henning C. *et al.* Lack of Thy1 (CD90) expression in neuroblastomas is correlated with impaired survival. **Pediatric surgery international**, v. 24, n. 1, p. 101-105, 2008.

FONSECA, Leonardo Marques da *et al.* Glycosylation in cancer: interplay between multidrug resistance and epithelial-to-mesenchymal transition?. **Frontiers in oncology**, v. 6, p. 158, 2016.

GARG, Minal. Epithelial-mesenchymal transition-activating transcription factors-multifunctional regulators in cancer. **World journal of stem cells**, v. 5, n. 4, p. 188, 2013.

GAO, Zhao-wei; DONG, Ke; ZHANG, Hui-zhong. The roles of CD73 in cancer. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

GILLIAM, Daniel T. *et al.* The CD24 surface antigen in neural development and disease. **Neurobiology of disease**, v. 99, p. 133-144, 2017.

GUPTA, Rajnish A. *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. **Nature**, v. 464, n. 7291, p. 1071, 2010.

GUTSCHNER, Tony; DIEDERICHS, Sven. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. **RNA biology**, v. 9, n. 6, p. 703-719, 2012.

GLUMAC, Paige M.; LEBEAU, Aaron M. The role of CD133 in cancer: a concise review. **Clinical and translational medicine**, v. 7, n. 1, p. 18, 2018.

GRASSELLI, Chiara *et al.* Toll-like receptor 4 modulation influences human neural stem cell proliferation and differentiation. **Cell death & disease**, v. 9, n. 3, p. 280, 2018.

HAJJARI, Mohammadreza; SALAVATY, Abbas. HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers. **Cancer biology & medicine**, v. 12, n. 1, p. 1, 2015.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. 2011 Mar 4;144(5):646-74.

IBRAHIM, Ali IM *et al.* Expression and regulation of aldehyde dehydrogenases in prostate cancer. **J Cancer Metastasis Treat**, v. 4, p. 44, 2018.

INDA, Maria-del-Mar *et al.* Glioblastoma multiforme: a look inside its heterogeneous nature. **Cancers**, v. 6, n. 1, p. 226-239, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2018 – Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: < <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 10 de julho de 2019.

International Agency For Research On Cancer. Estimated number of incident cases from 2018 to 2040, all cancers, both sexes, all ages. Disponível em: < http://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=0&population=900&mode=population&sex=0&cancer=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0>. Acesso em: 10 de julho de 2019.

JIAO, Jianwei; CHEN, Dong Feng. Induction of neurogenesis in nonconventional neurogenic regions of the adult central nervous system by niche astrocyte-produced signals. **Stem cells**, v. 26, n. 5, p. 1221-1230, 2008.

JOLLY, Mohit Kumar *et al.* Implications of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype in metastasis. **Frontiers in oncology**, v. 5, p. 155, 2015.

KARSY, Michael *et al.* A practical review of prognostic correlations of molecular biomarkers in glioblastoma. **Neurosurgical focus**, v. 38, n. 3, p. E4, 2015.

KHOLODENKO, Irina V. *et al.* Neuroblastoma origin and therapeutic targets for immunotherapy. **Journal of immunology research**, v. 2018, 2018.

KIM, Do *et al.* Epithelial mesenchymal transition in embryonic development, tissue repair and cancer: a comprehensive overview. **Journal of clinical medicine**, v. 7, n. 1, p. 1, 2017.

LAMOUILLE, Samy; XU, Jian; DERYNCK, Rik. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 15, n. 3, p. 178, 2014.

LAPIDOT, Tsvee *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. **Nature**, v. 367, n. 6464, p. 645, 1994.

LEE, Jin-Ku *et al.* Targeting the epithelial to mesenchymal transition in glioblastoma: the emerging role of MET signaling. **OncoTargets and therapy**, v. 7, p. 1933, 2014

LEE, Joo Ho *et al.* Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. **Nature**, v. 560, n. 7717, p. 243, 2018.

LEIJA-MONTOYA, Gabriela *et al.* Long non-coding RNAs: regulators of the activity of myeloid-derived suppressor cells. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1734, 2019.

LO, Hui-Wen *et al.* A novel splice variant of GLI1 that promotes glioblastoma cell migration and invasion. **Cancer research**, v. 69, n. 17, p. 6790-6798, 2009.

Lobner D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis?. *Journal of neuroscience methods*. 2000 Mar 15;96(2):147-52.

LOUIS, David N. *et al.* The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Acta neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803-820, 2016.

LI, Bo; HUANG, Chen. Regulation of EMT by STAT3 in gastrointestinal cancer. **International journal of oncology**, v. 50, n. 3, p. 753-767, 2017.

LI, Xiang *et al.* Role of glycans in cancer cells undergoing epithelial–mesenchymal transition. **Frontiers in oncology**, v. 6, p. 33, 2016.

LIN, Ching-Shwun *et al.* Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. **Histology and histopathology**, v. 28, n. 9, p. 1109, 2013.

LIU, Min *et al.* The histone methyltransferase EZH2 mediates tumor progression on the chick chorioallantoic membrane assay, a novel model of head and neck squamous cell carcinoma. **Translational oncology**, v. 6, n. 3, p. 273, 2013.

LV, Feng-Juan *et al.* Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. **Stem cells**, v. 32, n. 6, p. 1408-1419, 2014.

MALEKI, Masoud *et al.* Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. **International journal of stem cells**, v. 7, n. 2, p. 118, 2014.

MALVANDI, Amir Mohammad; MEHRZAD, Jalil; MOGHADDAM, Masoud Saleh. Gene expression quantification of toll like receptors 2, 4 and co-molecules in human glioblastoma cell line (U87-MG): toward a new in vitro model of inflammation. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 14, n. 5, p. 428, 2011.

MARKOVSKY, Ela *et al.* Targeting NCAM-expressing neuroblastoma with polymeric precision nanomedicine. **Journal of Controlled Release**, v. 249, p. 162-172, 2017.

MCCLINTOCK, Jennifer L.; CERESA, Brian P. Transforming growth factor- α enhances corneal epithelial cell migration by promoting EGFR recycling. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 51, n. 7, p. 3455-3461, 2010.

MOSKAL, Joseph R.; KROES, Roger A.; DAWSON, Glyn. The glycobiology of brain tumors: disease relevance and therapeutic potential. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 9, n. 10, p. 1529-1545, 2009.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

NAEEM, Aabgeena; SALEEMUDDIN, M.; HASAN KHAN, Rizwan. Glycoprotein targeting and other applications of lectins in biotechnology. **Current Protein and Peptide Science**, v. 8, n. 3, p. 261-271, 2007.

NCI (National Cancer Institute), 2015. What Is Cancer? Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso em: 10 de julho de 2019.

NCI (National Cancer Institute), 2018. Adult Central Nervous System Tumors Treatment (PDQ®)–Patient Version. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/brain/patient/adult-brain-treatment-pdq>>. Acesso em: 13 de julho de 2019.

NCI (National Cancer Institute), 2017. Precision Medicine in Cancer Treatment. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/precision-medicine>>. Acesso em: 16 de setembro de 2019.

NIELSEN, Julie S.; MCNAGNY, Kelly M. Novel functions of the CD34 family. **Journal of cell science**, v. 121, n. 22, p. 3683-3692, 2008.

NOWAK-SLIWINSKA, Patrycja; SEGURA, Tatiana; IRUELA-ARISPE, M. Luisa. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. **Angiogenesis**, v. 17, n. 4, p. 779-804, 2014.

OSTRAND-ROSENBERG, Suzanne; FENSELAU, Catherine. Myeloid-derived suppressor cells: immune-suppressive cells that impair antitumor immunity and are sculpted by their environment. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 2, p. 422-431, 2018.

PÁDUA ALVES, Cleidson et al. Brief report: the lincRNA Hotair is required for epithelial-to-mesenchymal transition and stemness maintenance of cancer cell lines. **Stem cells**, v. 31, n. 12, p. 2827-2832, 2013.

PIAO, Yuji *et al.* Acquired resistance to anti-VEGF therapy in glioblastoma is associated with a mesenchymal transition. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 16, p. 4392-4403, 2013.

PINHO, Salomé S.; REIS, Celso A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 9, p. 540, 2015.

PISKAREVA, Olga et al. The development of cisplatin resistance in neuroblastoma is accompanied by epithelial to mesenchymal transition in vitro. **Cancer letters**, v. 364, n. 2, p. 142-155, 2015.

PONCET, Christian *et al.* CD24, a glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule, is transiently expressed during the development of human central nervous system and is a marker of human neural cell lineage tumors. **Acta neuropathologica**, v. 91, n. 4, p. 400-408, 1996.

PORCU, Michaël *et al.* Mutation of the receptor tyrosine phosphatase PTPRC (CD45) in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 119, n. 19, p. 4476-4479, 2012.

POZAROWSKI, Piotr; DARZYNKIEWICZ, Zbigniew. Analysis of cell cycle by flow cytometry. In: **Checkpoint Controls and Cancer**. Humana Press, 2004. p. 301-311.

PRUSZAK, Jan *et al.* CD15, CD24, and CD29 define a surface biomarker code for neural lineage differentiation of stem cells. **Stem cells**, v. 27, n. 12, p. 2928-2940, 2009.

QEMO, Ingrid; PORTER, Lisa A. Cell Cycle Dynamics in Glioma Cancer Stem Cells. In: **Brain Tumor Stem Cells**. Humana Press, New York, NY, 2019. p. 117-126.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**. 2001 Nov 1;414(6859):105-11.

RIBATTI, Domenico. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. **Reproductive Toxicology**, v. 70, p. 97-101, 2017.

RIBEIRO, Ana Sofia; PAREDES, Joana. P-cadherin linking breast cancer stem cells and invasion: a promising marker to identify an “intermediate/metastable” EMT state. **Frontiers in oncology**, v. 4, p. 371, 2015.

ROBEL, Stefanie; BERNINGER, Benedikt; GÖTZ, Magdalena. The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 88, 2011.

ROCHA, Clarissa Ribeiro Reily *et al.* DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. **Clinics**, v. 73, 2018.

ROESCH, Saskia *et al.* When immune cells turn bad—tumor-associated microglia/macrophages in glioma. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 436, 2018.

SERRANO-GOMEZ, Silvia Juliana; MAZIVEYI, Mazvita; ALAHARI, Suresh K. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. **Molecular cancer**, v. 15, n. 1, p. 18, 2016.

SINGH, Anurag; SETTLEMAN, J. E. M. T. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 34, p. 4741, 2010.

SINGH, Sheila K. *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. **Cancer research**, v. 63, n. 18, p. 5821-5828, 2003.

SONG, Sang-Ho; AUGUSTINE, George J. Synapsin isoforms and synaptic vesicle trafficking. **Molecules and cells**, v. 38, n. 11, p. 936, 2015.

SONI, Priyanka *et al.* CD24 and nanog expression in stem cells in glioblastoma: Correlation with response to chemoradiation and overall survival. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 18, n. 8, p. 2215, 2017.

SRINIVASAN, Balaji *et al.* TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. **Journal of laboratory automation**, v. 20, n. 2, p. 107-126, 2015.

SU, Yu-Lin *et al.* STAT3 in tumor-associated myeloid cells: multitasking to disrupt immunity. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 6, p. 1803, 2018.

SZKLARCZYK, Damian *et al.* STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic acids research**, v. 43, n. D1, p. D447-D452, 2014.

SZOPA, Wojciech *et al.* Diagnostic and therapeutic biomarkers in glioblastoma: current status and future perspectives. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.

TOMOLONIS, Julie A.; AGARWAL, Saurabh; SHOHET, Jason M. Neuroblastoma pathogenesis: deregulation of embryonic neural crest development. **Cell and tissue research**, v. 372, n. 2, p. 245-262, 2018.

ULLAH, Imran; SUBBARAO, Raghavendra Baregundi; RHO, Gyu Jin. Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective. **Bioscience reports**, v. 35, n. 2, p. e00191, 2015.

VAN DEN BENT, Martin J.; HEGI, Monika E.; STUPP, Roger. Recent developments in the use of chemotherapy in brain tumours. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 5, p. 582-588, 2006.

VASSALLI, Giuseppe. Aldehyde dehydrogenases: Not just markers, but functional regulators of stem cells. **Stem cells international**, v. 2019, 2019.

VLADIMIROVNA, Irina Lyadova *et al.* Mesenchymal stem cells and myeloid derived suppressor cells: common traits in immune regulation. **Journal of immunology research**, v. 2016, 2016.

VERHAAK, Roel GW *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer cell**, v. 17, n. 1, p. 98-110, 2010.

VERMA, Mukesh. Personalized medicine and cancer. **Journal of personalized medicine**, v. 2, n. 1, p. 1-14, 2012.

VISVADER, Jane E.; LINDEMAN, Geoffrey J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. **Nature reviews cancer**, v. 8, n. 10, p. 755, 2008.

WAHL, Geoffrey M.; SPIKE, Benjamin T. Cell state plasticity, stem cells, EMT, and the generation of intra-tumoral heterogeneity. **NPJ breast cancer**, v. 3, n. 1, p. 14, 2017.

WANG, Cheng *et al.* Transforming growth factor alpha (TGF α) regulates granulosa cell tumor (GCT) cell proliferation and migration through activation of multiple pathways. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e48299, 2012.

WANG, Kemeng; WEI, Guoqing; LIU, Delong. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. **Experimental hematology & oncology**, v. 1, n. 1, p. 36, 2012.

WANG, Ming-Ke *et al.* Different roles of TGF- β in the multi-lineage differentiation of stem cells. **World journal of stem cells**, v. 4, n. 5, p. 28, 2012.

WANG, Yu *et al.* Continuous dose-intense temozolomide and cisplatin in recurrent glioblastoma patients. **Medicine**, v. 96, n. 10, 2017.

WENDT, Michael K. *et al.* STAT3 and epithelial–mesenchymal transitions in carcinomas. **Jak-stat**, v. 3, n. 2, p. e28975, 2014.

WHO (World Health Organization), 2018. Noncommunicable diseases. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>>. Acesso em: 10 de julho de 2019.

XU, Q. *et al.* Long non-coding RNA regulation of epithelial–mesenchymal transition in cancer metastasis. **Cell death & disease**, v. 7, n. 6, p. e2254, 2016.

XU, Xia *et al.* Aldehyde dehydrogenases and cancer stem cells. **Cancer letters**, v. 369, n. 1, p. 50-57, 2015.

YAO, Maojin *et al.* Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy. **Cellular & molecular immunology**, v. 15, n. 8, p. 737, 2018.

YAO, Yixin; DAI, Wei. Genomic instability and cancer. **Journal of carcinogenesis & mutagenesis**, v. 5, 2014.

YARMISHYN, Aliaksandr A.; KUROCHKIN, Igor V. Long noncoding RNAs: a potential novel class of cancer biomarkers. **Frontiers in genetics**, v. 6, p. 145, 2015.

ZAGE, Peter. Novel therapies for relapsed and refractory neuroblastoma. **Children**, v. 5, n. 11, p. 148, 2018.

ZHANG, Jihong; FG STEVENS, Malcolm; D BRADSHAW, Tracey. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. **Current molecular pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 102-114, 2012.

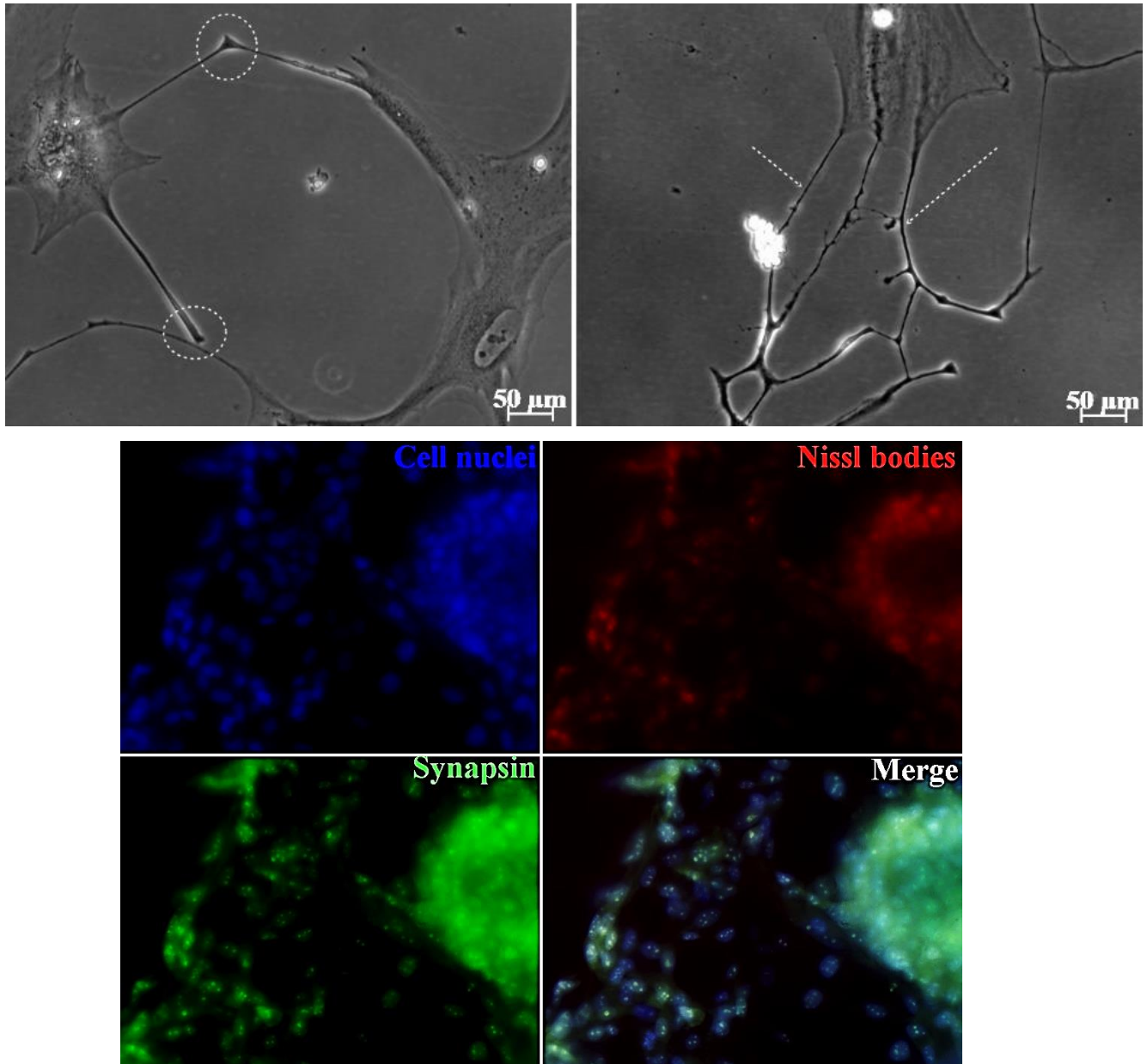
ZHANG, Jinsong *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR in carcinogenesis and metastasis. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 46, n. 1, p. 1-5, 2013.

ZHANG, Yan *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR and STAT3 synergistically regulate the cervical cancer cell migration and invasion. **Chemico-biological interactions**, v. 286, p. 106-110, 2018.

ZHOU, Lei *et al.* Identification of cancer-type specific expression patterns for active aldehyde dehydrogenase (ALDH) isoforms in ALDEFLUOR assay. **Cell biology and toxicology**, v. 35, n. 2, p. 161-177, 2019.

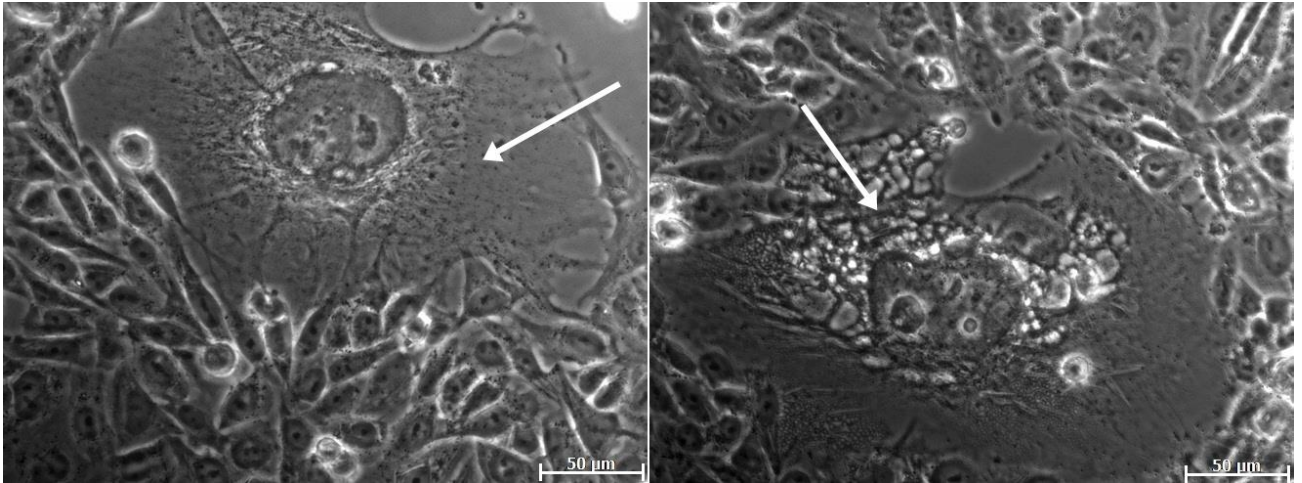
APÊNDICES

1- Caracterização morfológica por microscopia da monocamada de U-87 MG crescendo em uma superfície tratada com fibronectina/laminina



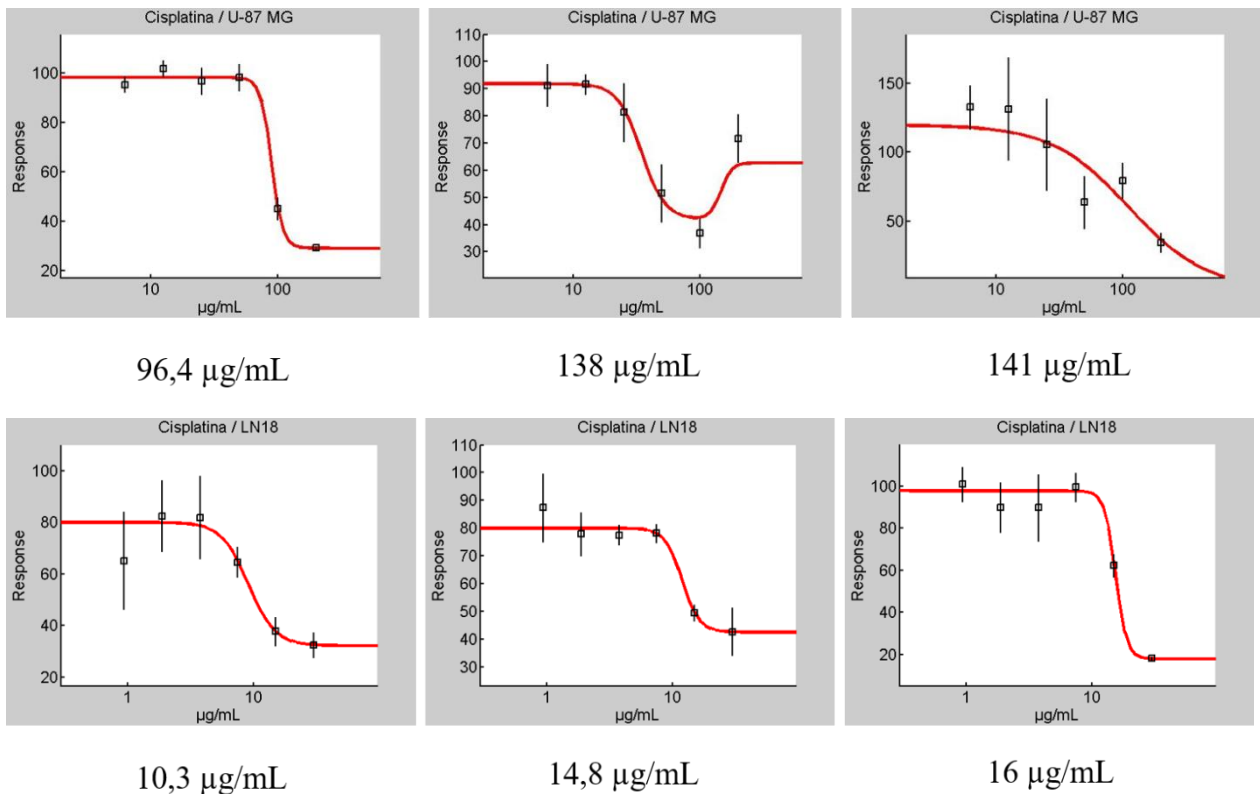
Legenda – Linhagem celular U-87 MG crescendo em uma superfície tratada com duas proteínas da MEC, fibronectina/laminina. Foram observadas na imagem sem fluorescência, estruturas semelhantes a botões sinápticos (círculos) e axônios (setas). A marcação com sondas fluorescentes para Corpúsculos de Nissl (caracterizados pela abundância de ribossomos aderidos ao retículo endoplasmático no corpo celular de neurônios), e com anticorpo para sinapsina (uma proteína que regula o tráfico de vesículas de sinapse), confirmou a presença de populações de neurônios nessa linhagem de glioblastoma. Aumento 10x.

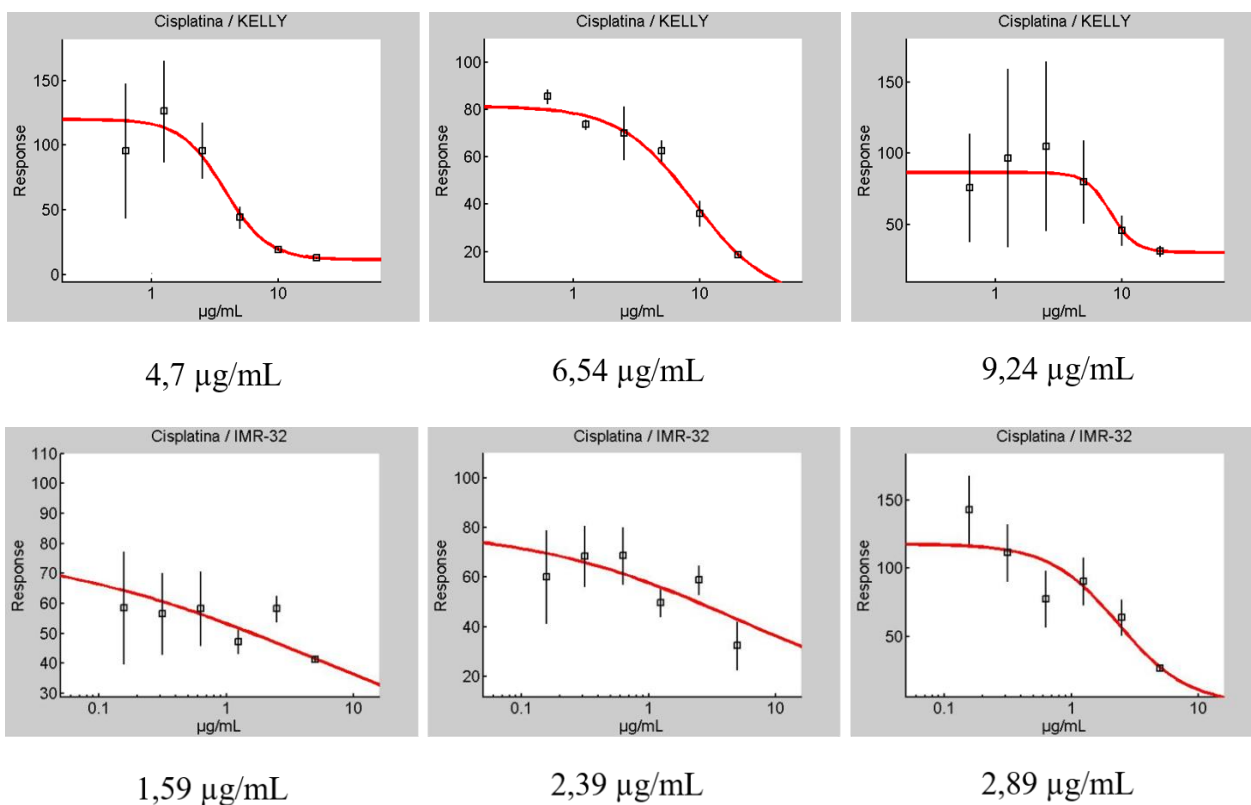
2- Células gigantes no cultivo em monocamada de LN-18



Legenda – As setas representam células gigantes com citoplasma abundante e núcleo grande e central, no cultivo em monocamada da linhagem celular LN-18. Vale ressaltar que micróglias são um tipo particular de células da glia originadas a partir de macrófagos, que são células que apresentam essas características. Aumento 20x.

3- Determinação do IC₅₀ das triplicatas biológicas de cada linhagem celular



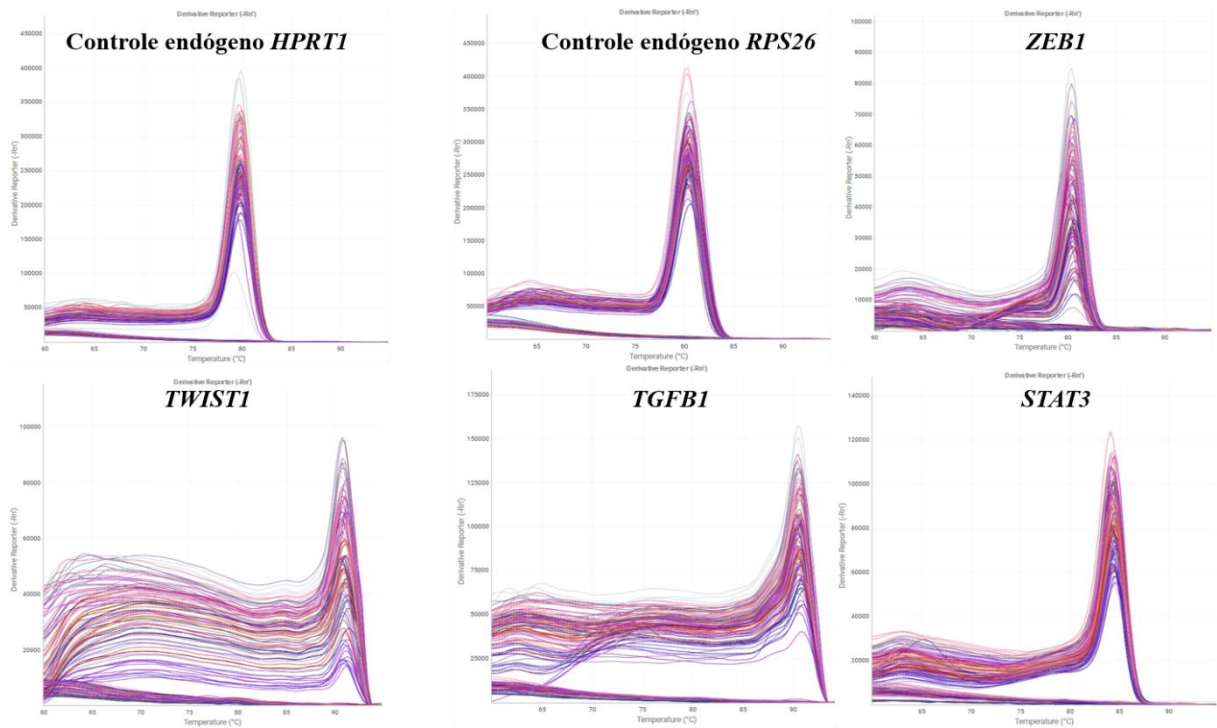
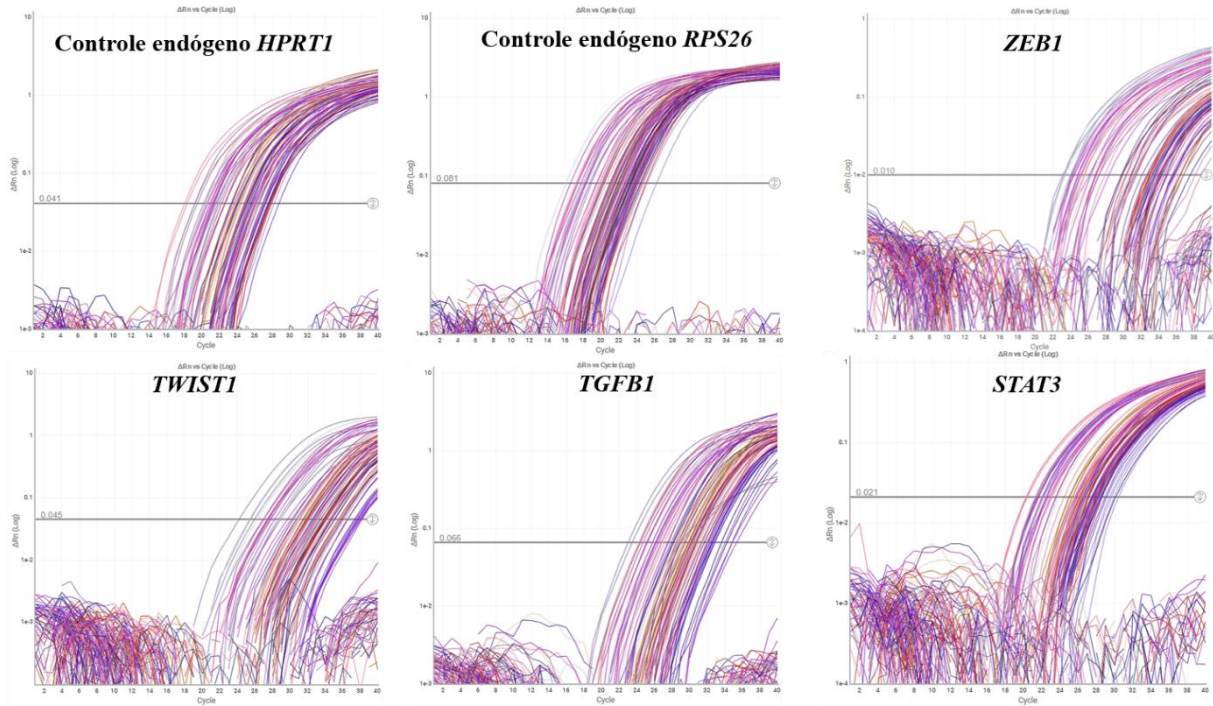


4- Quantificação das amostras de RNA total extraídas de cada linhagem celular

Linagem	Modelo	[]µg/µl	A230	A260	A280	A260/A230	A260/A280
U-87 MG	Monocamada controle	2,086	27,76	52,52	26,60	1,904	1,989
	Monocamada tratada	3,188	39,90	81,06	41,84	2,068	1,969
	Neuroesfera controle	0,613	9,44	15,7	8,21	1,682	1,944
	Neuroesfera tratada	0,910	12,69	23	11,9	1,828	1,959
LN-18	Monocamada controle	2,353	32,98	59,30	30,14	1,810	1,983
	Monocamada tratada	1,184	18,09	29,84	15,36	1,659	1,958
	Neuroesfera controle	0,710	8,180	17,9	9,37	2,220	1,933
	Neuroesfera tratada	1,032	12,36	26,13	13,54	2,144	1,952

KELLY	Monocamada control	2,560	28,730	64,23	32,43	2,246	1,988
	Monocamada tratada	0,614	14,780	15,60	8,58	1,056	1,843
	Neuroesfera control	0,549	6,78	13,9	7,21	2,069	1,943
	Neuroesfera tratada	1,152	13,42	28,93	15,04	2,166	1,931
IMR-32	Monocamada control	1,302	17,53	32,99	17,69	1,905	1,887
	Monocamada tratada	0,888	11,93	22,47	11,67	1,904	1,947
	Neuroesfera control	2,981	33,40	75,08	38,48	2.269	1.965
	Neuroesfera tratada	0,483	8,30	12,22	6,60	1,480	1,870

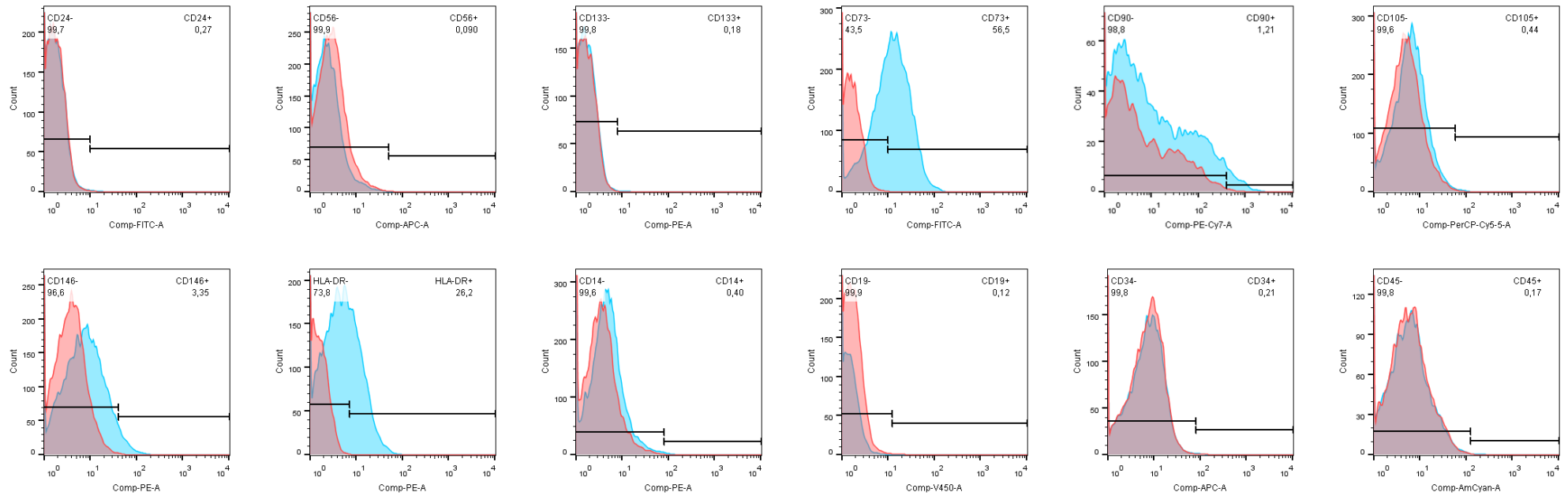
5- Curvas de amplificação e dissociação de qPCR utilizando SYBR



6- Dados representativos das análises de citometria de fluxo no FlowJo

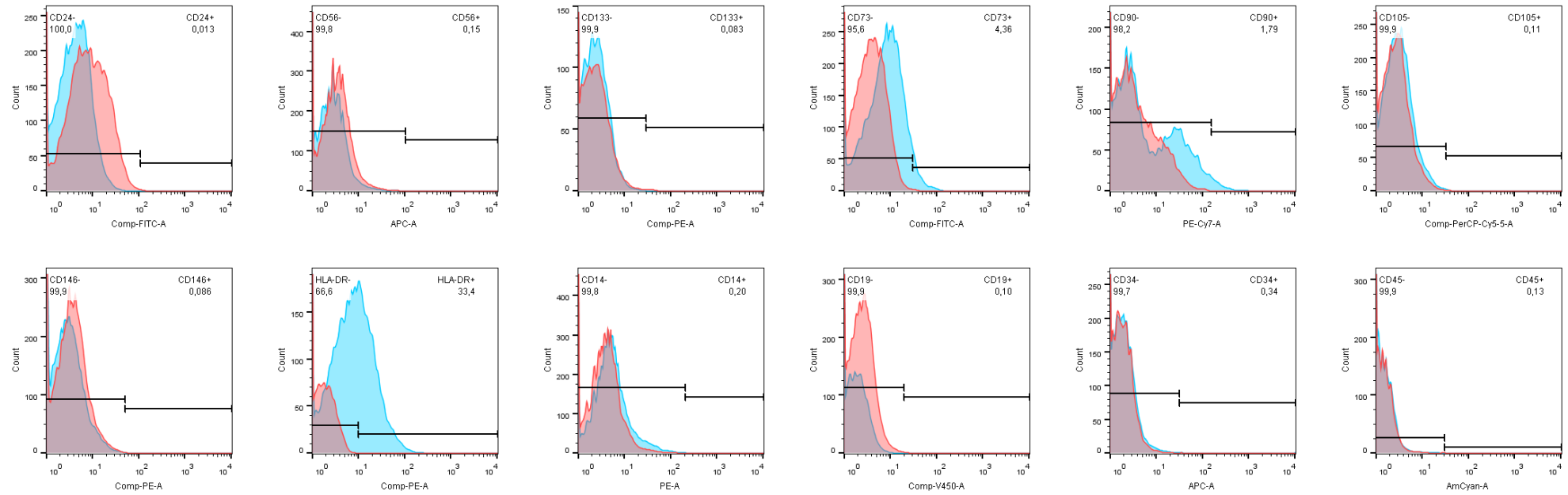
Imunofenotipagem U-87 MG monocamada controle

ISOTIPO MARCAÇÃO



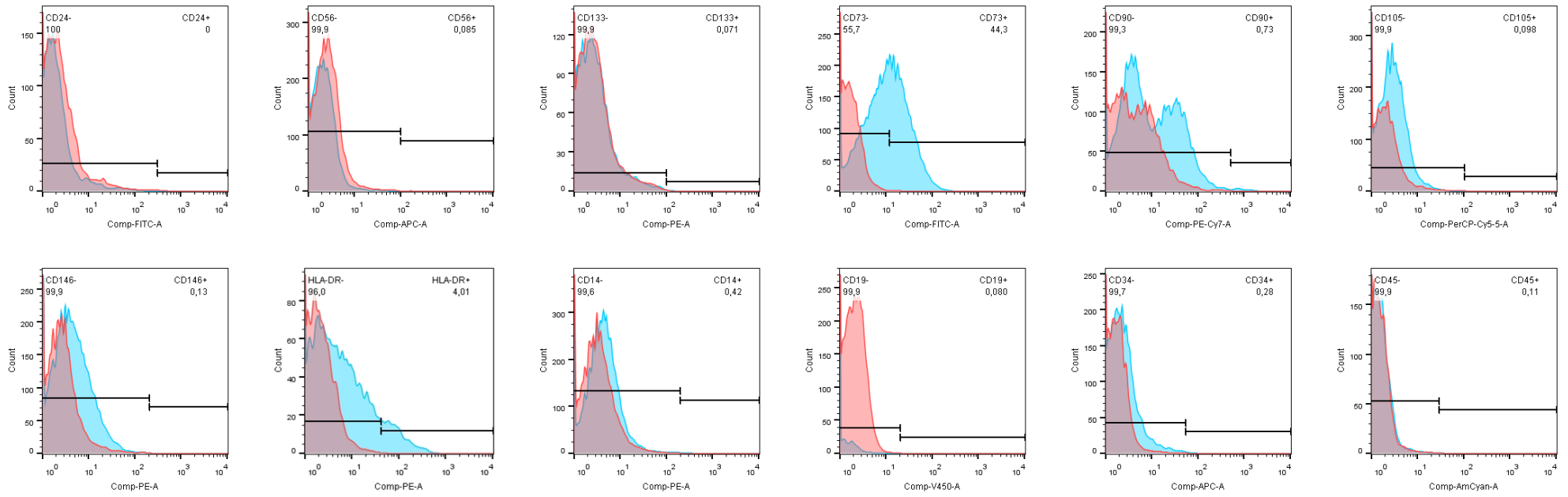
Imunofenotipagem U-87 MG monocamada tratada

ISOTIPO MARCAÇÃO



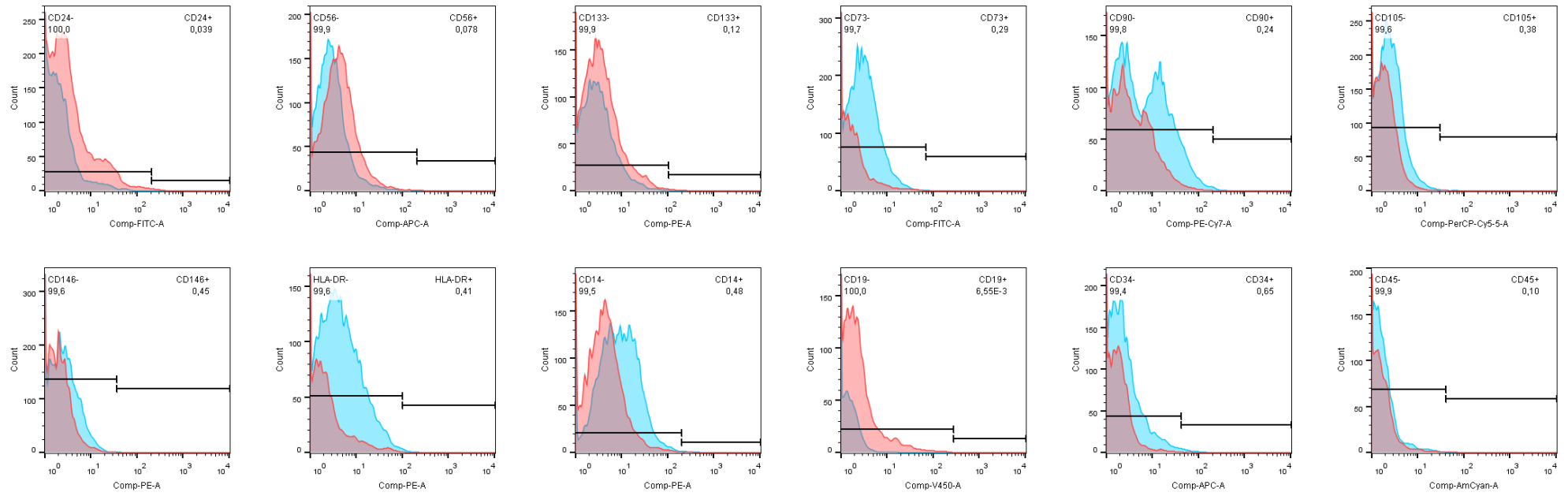
Imunofenotipagem U-87 MG neuroesfera controle

ISOTIPO MARCAÇÃO



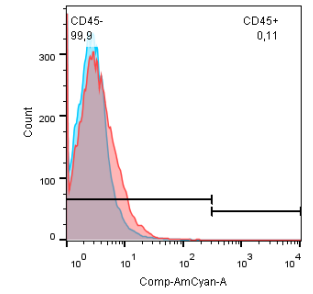
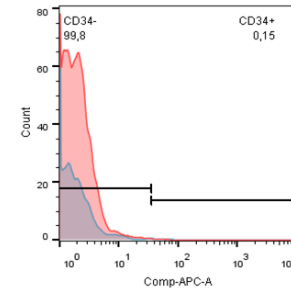
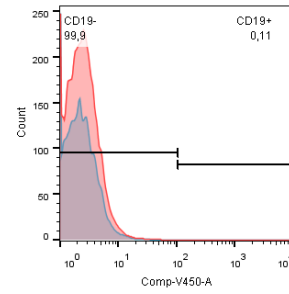
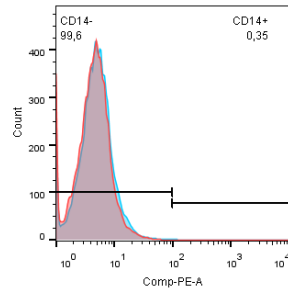
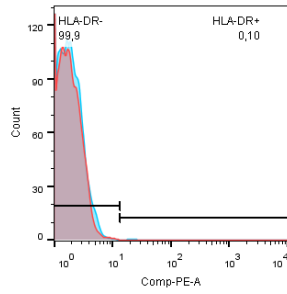
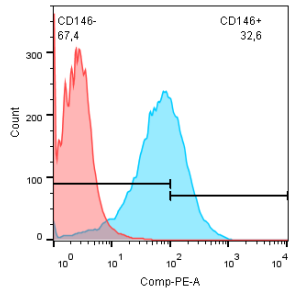
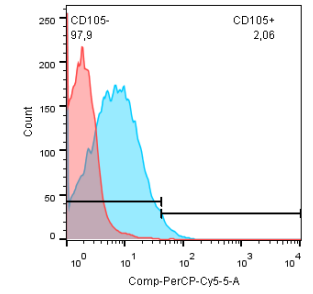
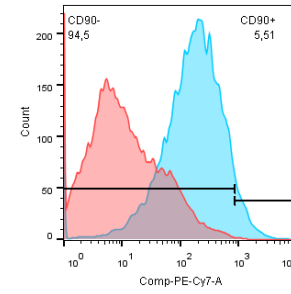
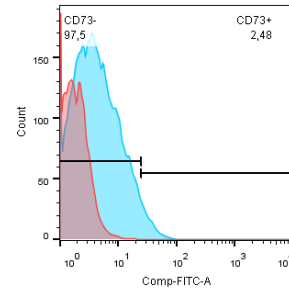
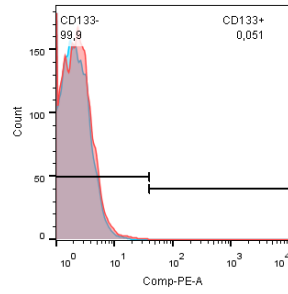
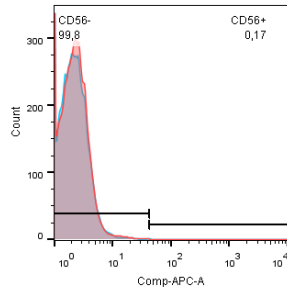
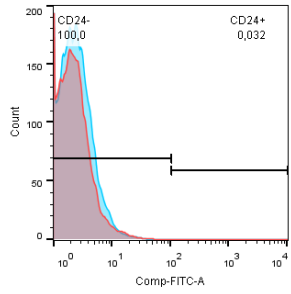
Imunofenotipagem U-87 MG neuroesfera tratada

ISOTIPO MARCAÇÃO



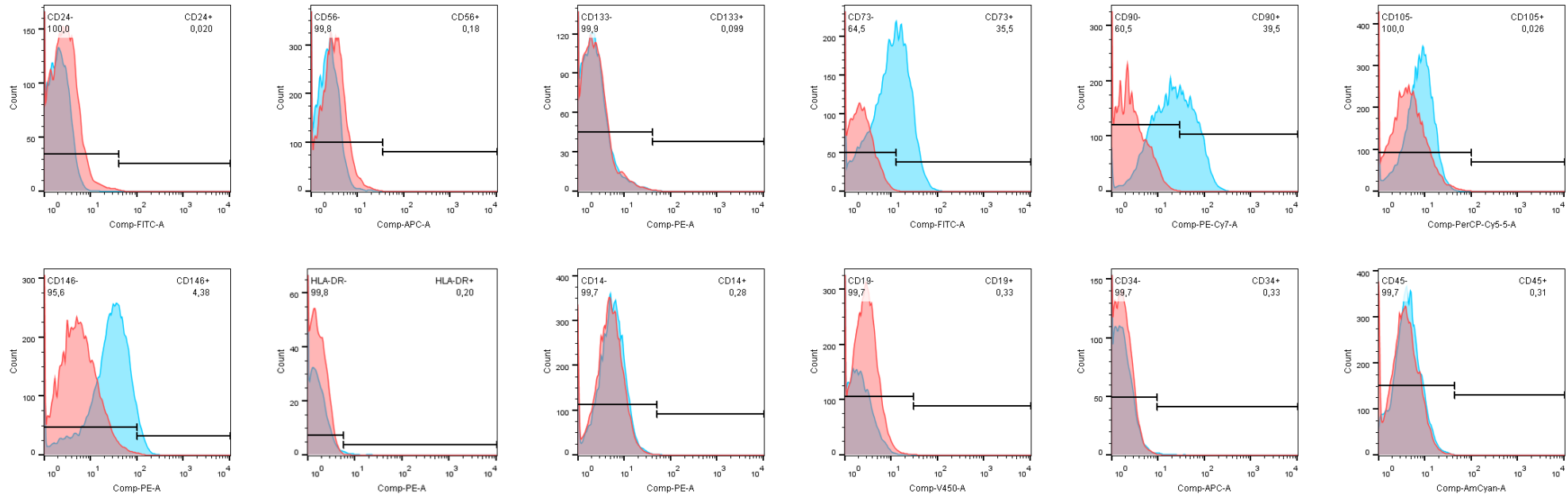
Imunofenotipagem LN-18 monocamada controle

ISOTIPO MARCAÇÃO



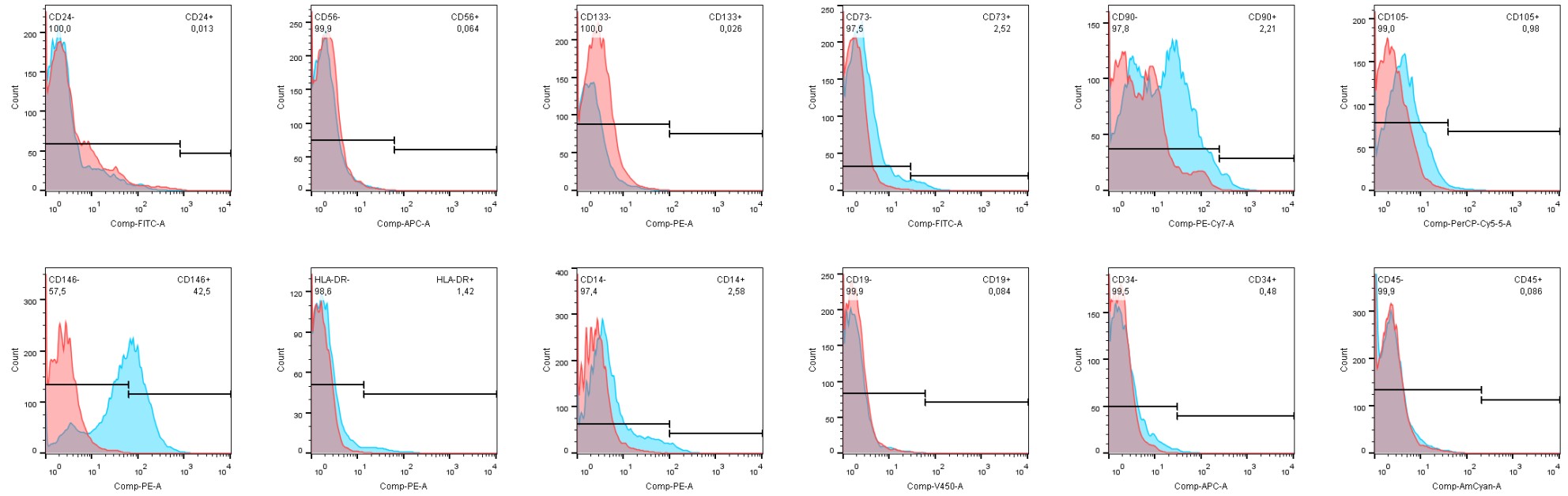
Imunofenotipagem LN-18 monocamada tratada

ISOTIPO MARCAÇÃO



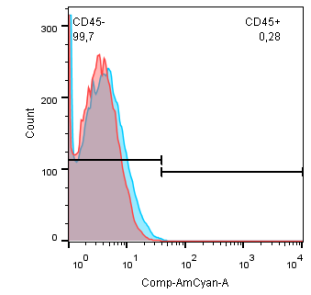
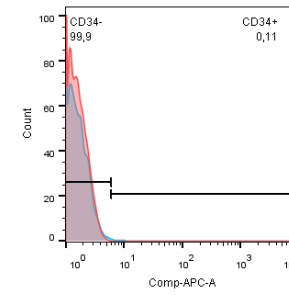
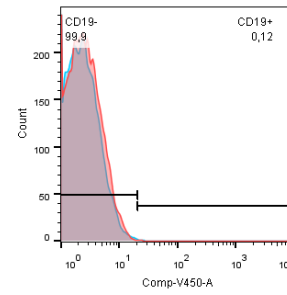
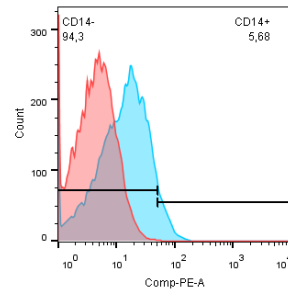
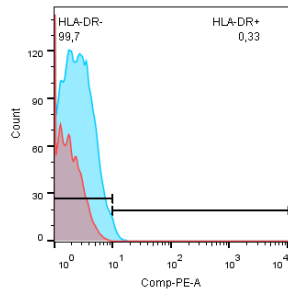
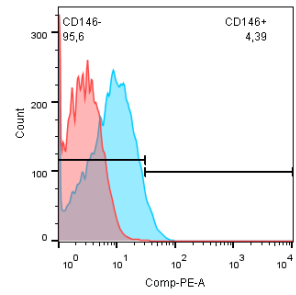
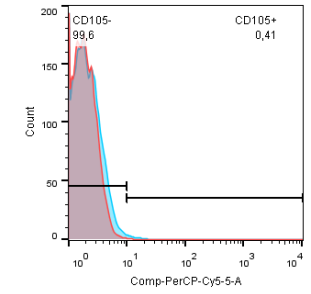
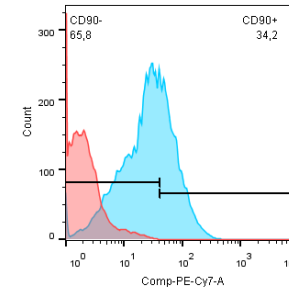
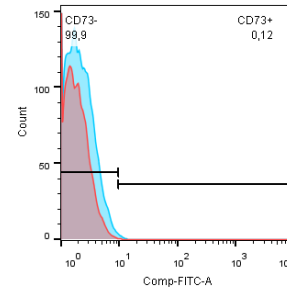
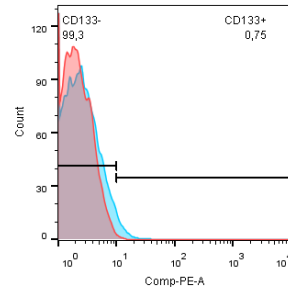
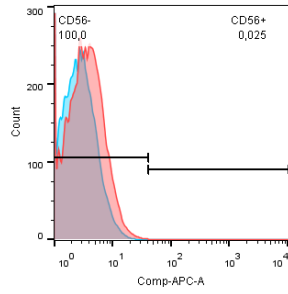
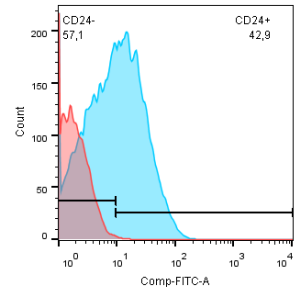
Imunofenotipagem LN-18 neuroesfera controle

ISOTIPO MARCAÇÃO



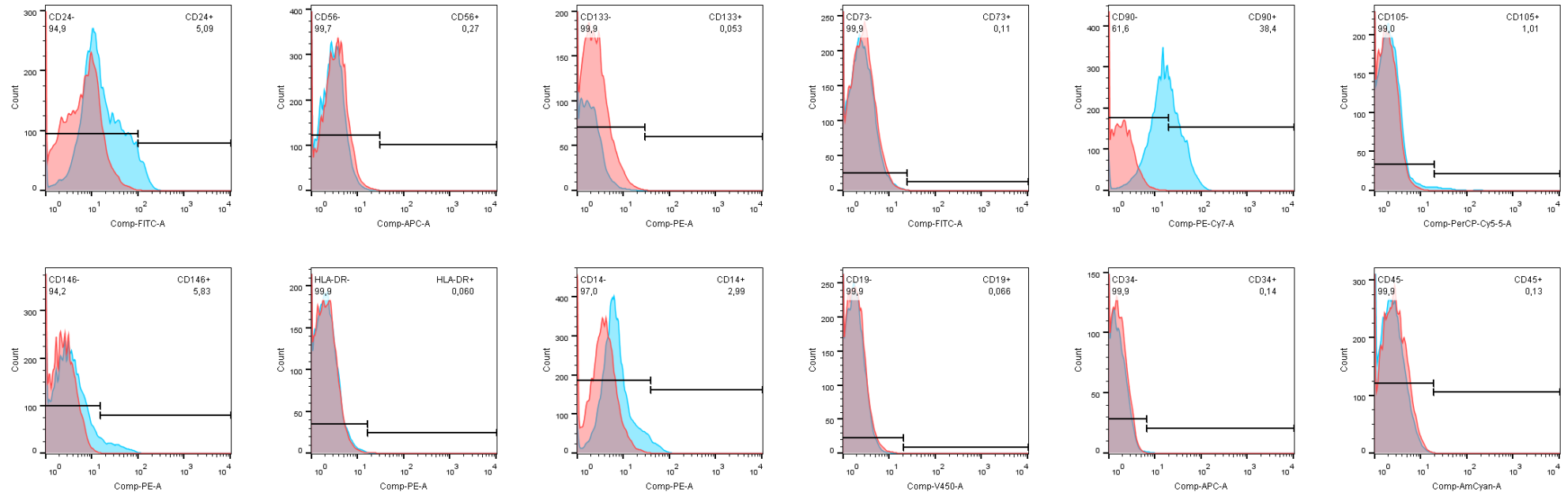
Imunofenotipagem KELLY monocamada controle

ISOTIPO MARCAÇÃO



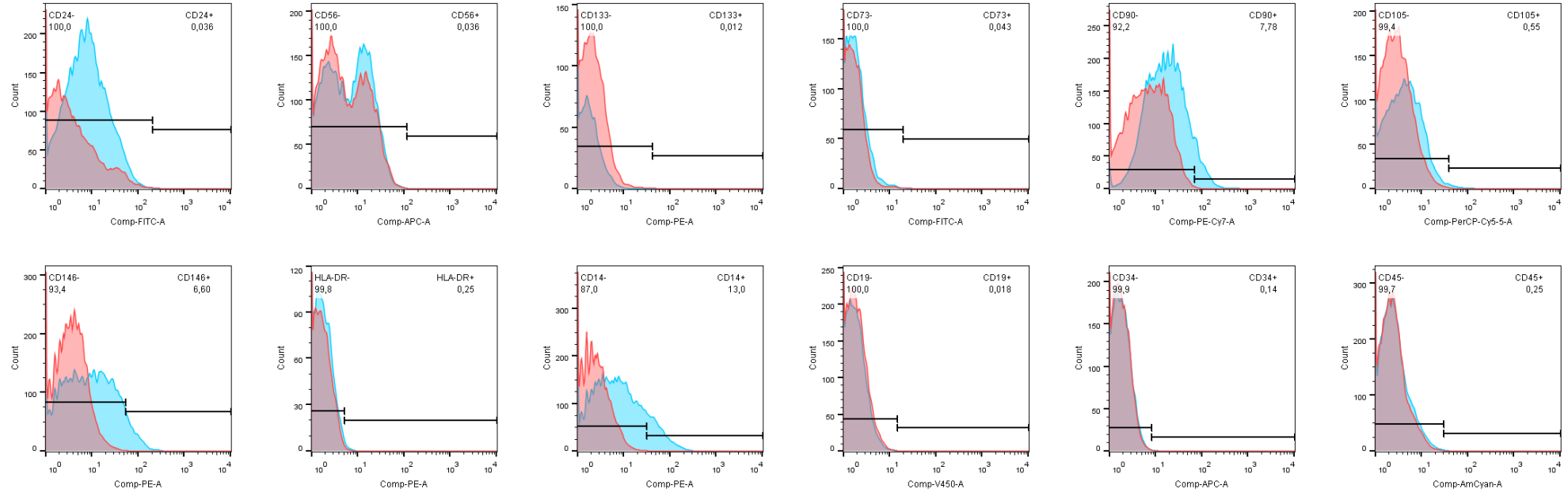
Imunofenotipagem KELLY monocamada tratada

ISOTIPO MARCAÇÃO



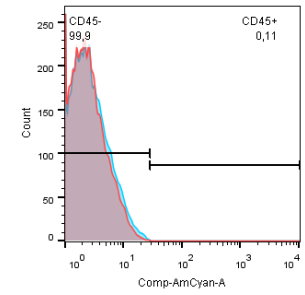
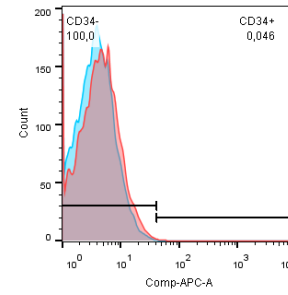
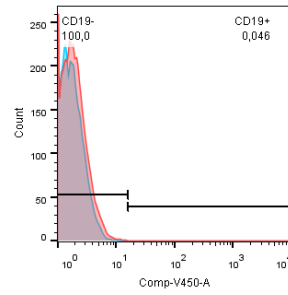
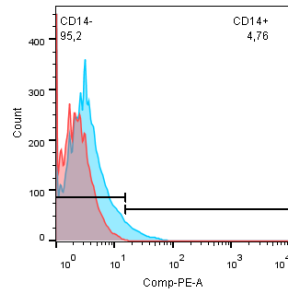
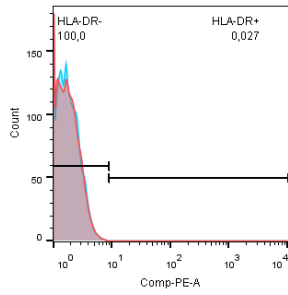
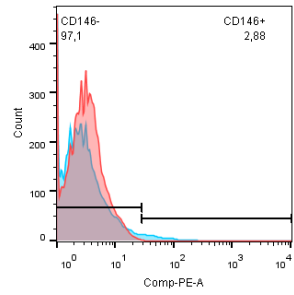
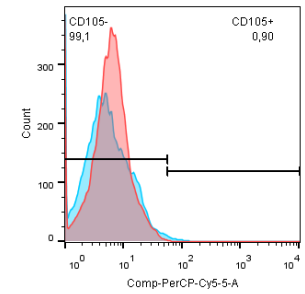
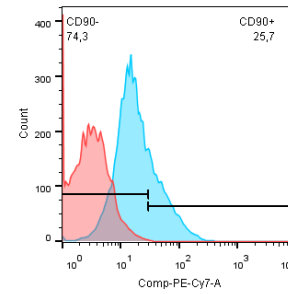
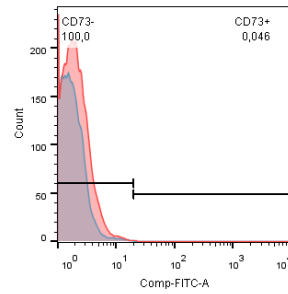
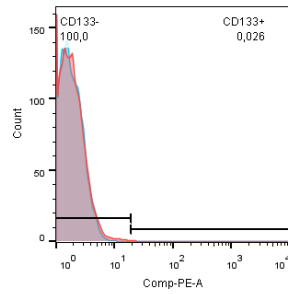
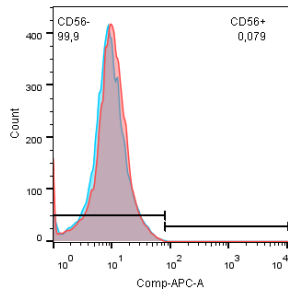
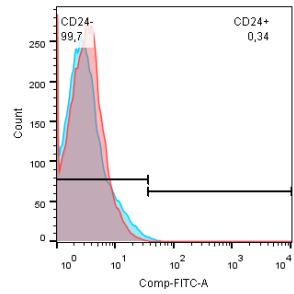
Imunofenotipagem KELLY neuroesfera controle

ISOTIPO MARCAÇÃO



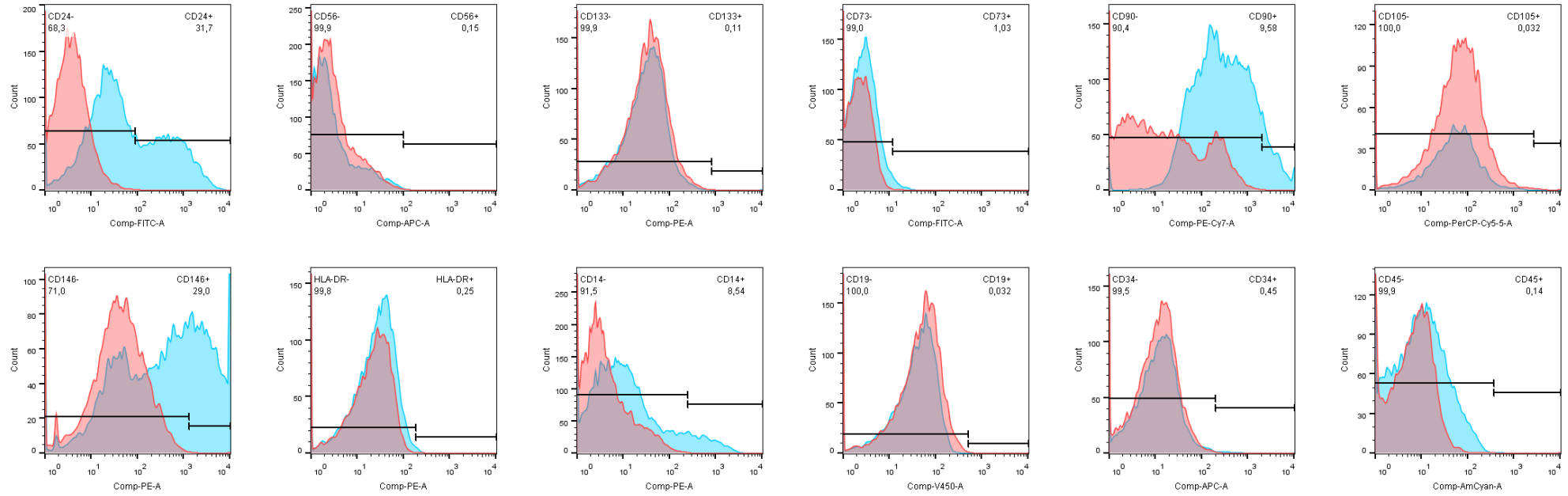
Imunofenotipagem KELLY neuroesfera tratada

ISOTIPO MARCAÇÃO



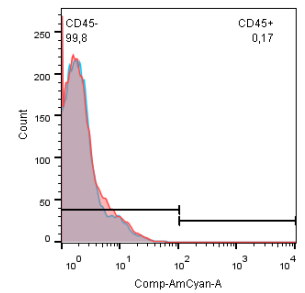
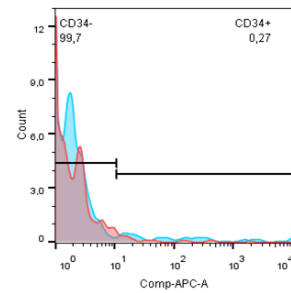
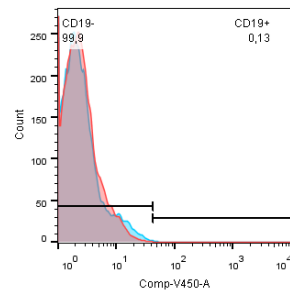
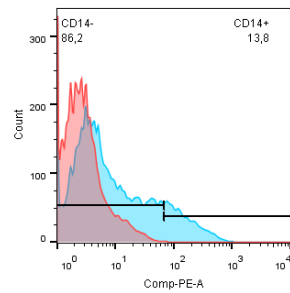
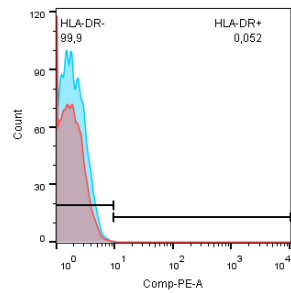
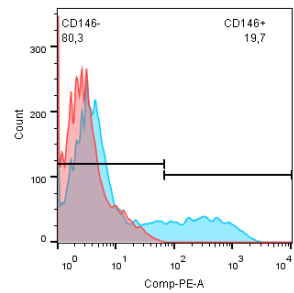
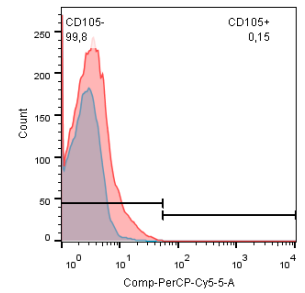
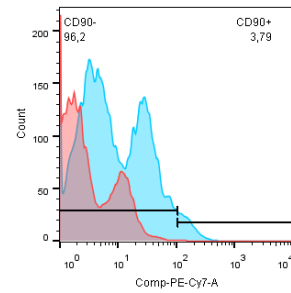
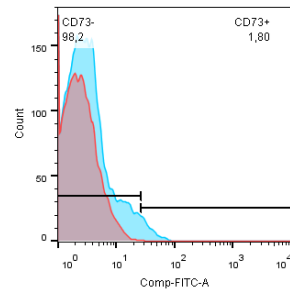
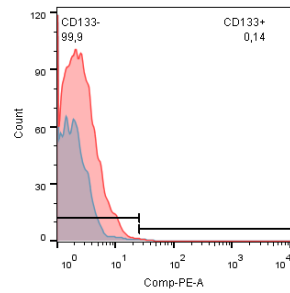
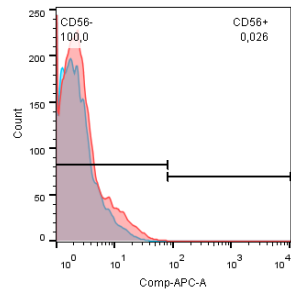
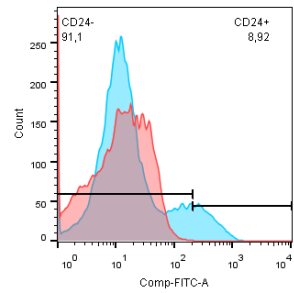
Imunofenotipagem IMR-32 monocamada controle

ISOTIPO MARCAÇÃO



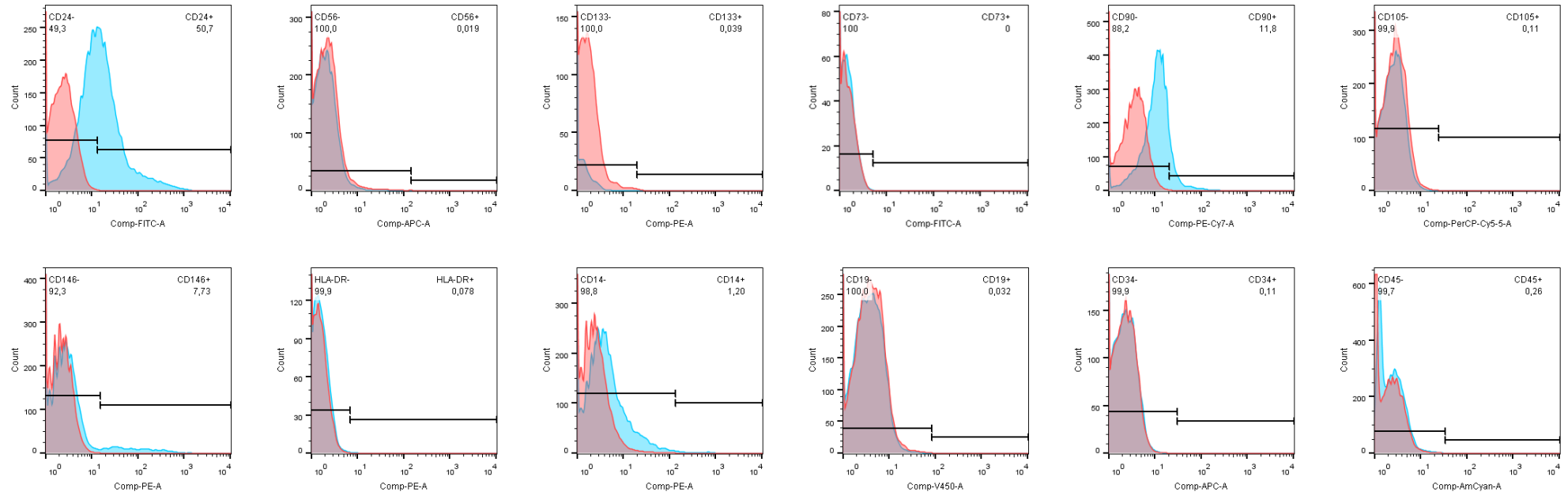
Imunofenotipagem IMR-32 monocamada tratada

ISOTIPO MARCAÇÃO



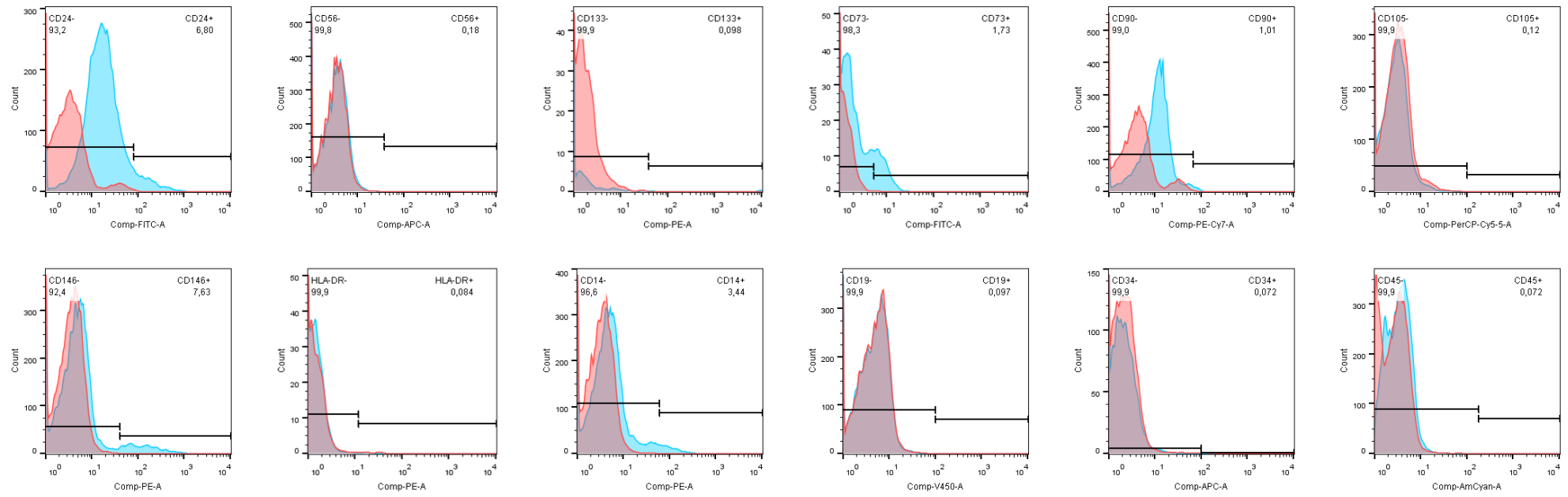
Imunofenotipagem IMR-32 neuroesfera controle

ISOTIPO MARCAÇÃO

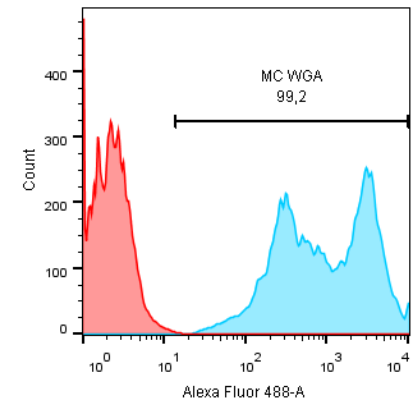
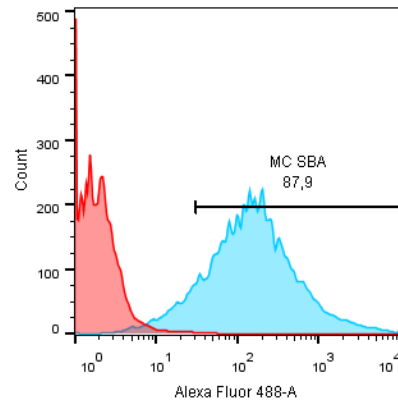
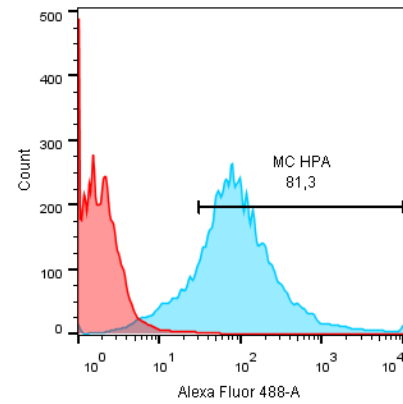
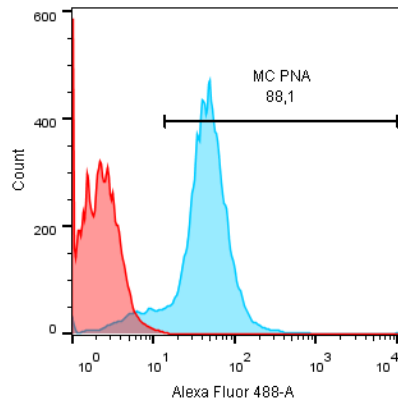
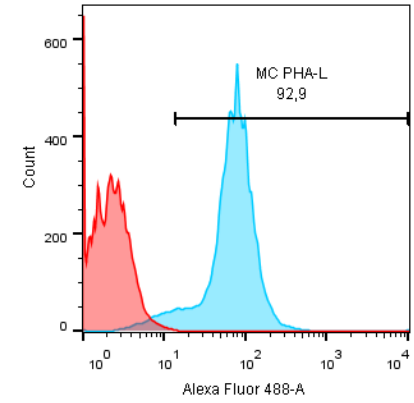
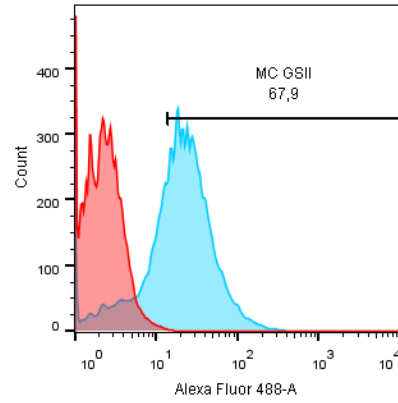
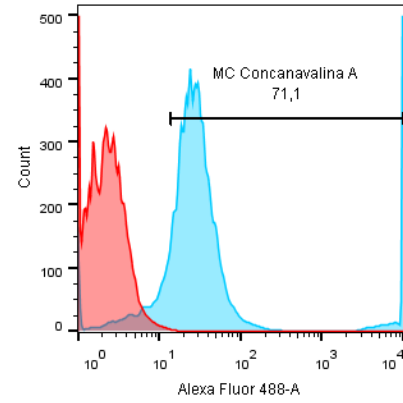
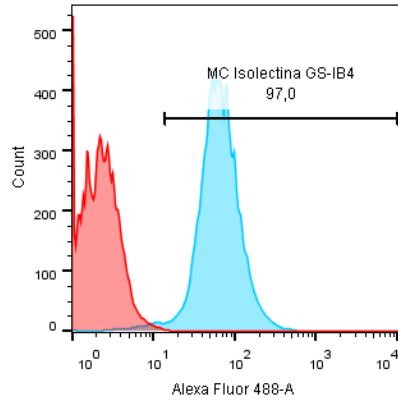


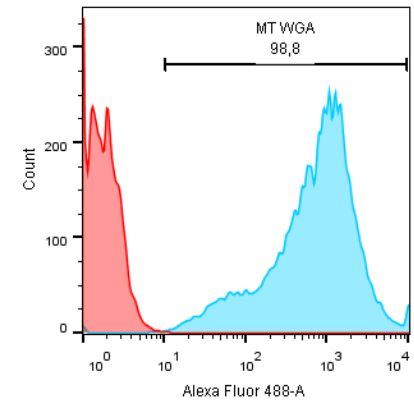
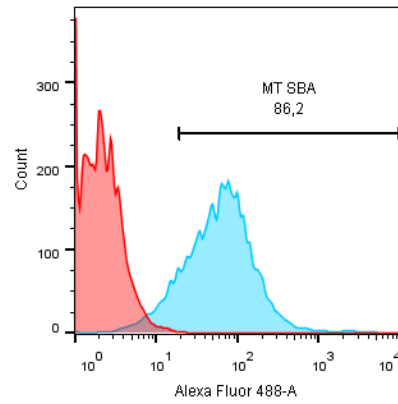
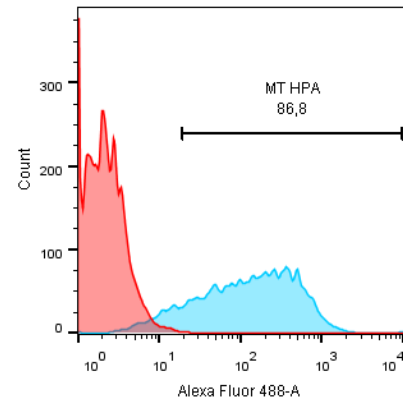
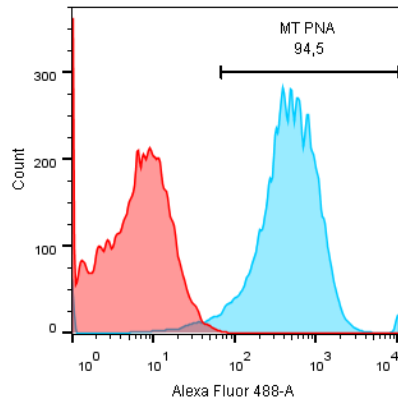
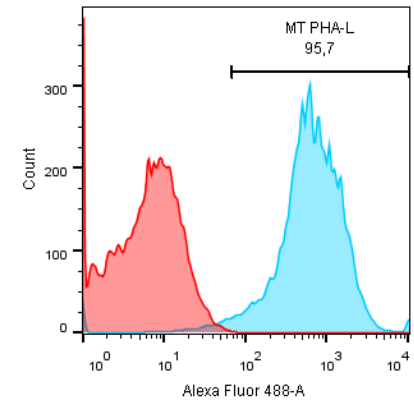
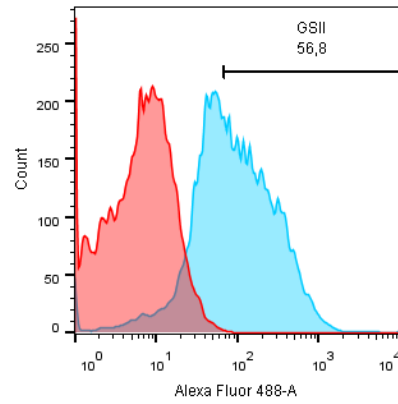
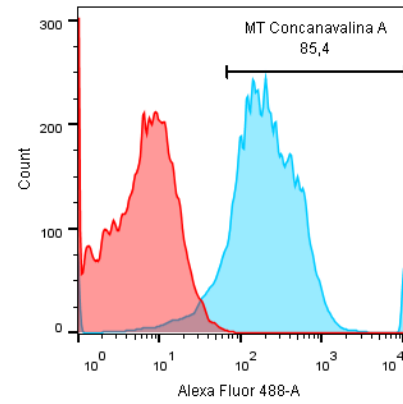
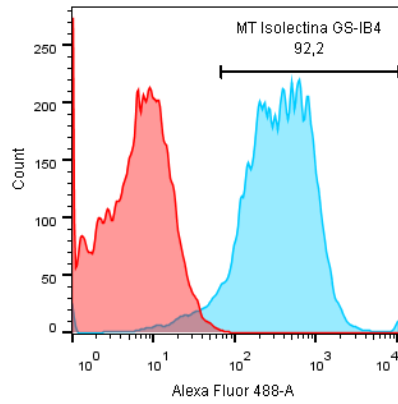
Imunofenotipagem IMR-32 neuroesfera tratada

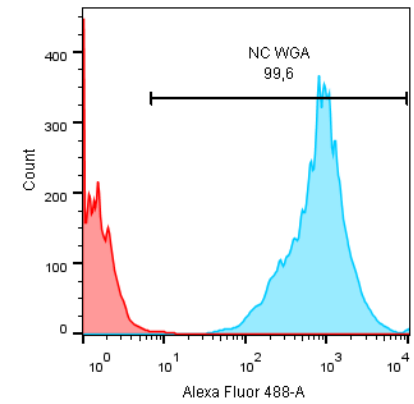
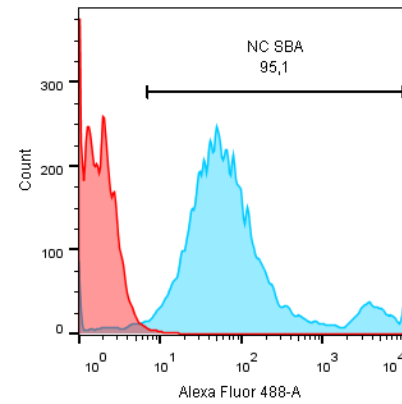
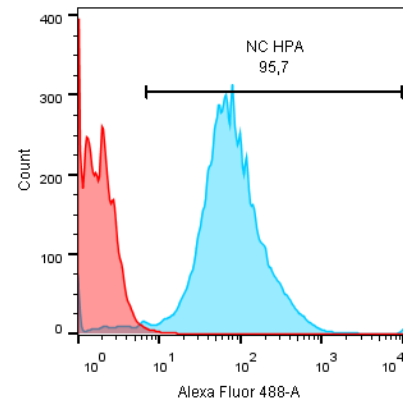
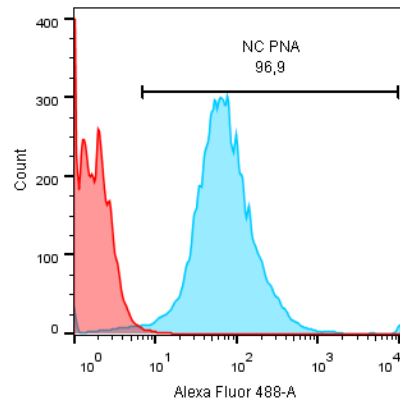
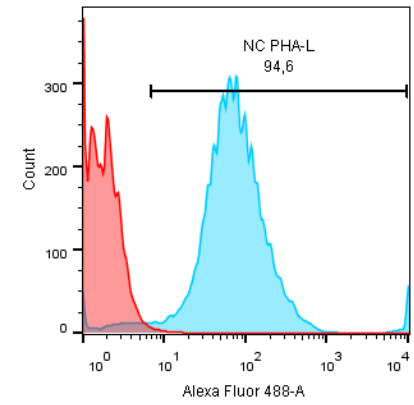
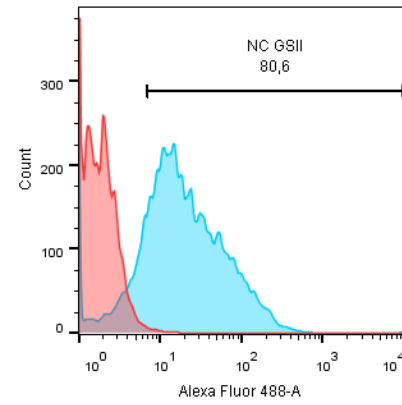
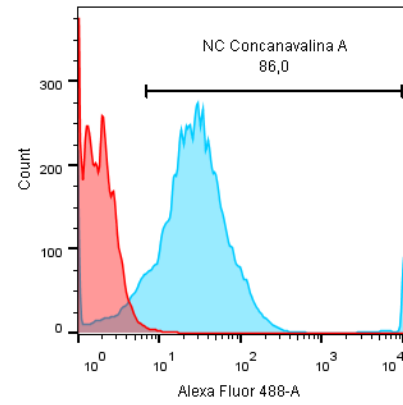
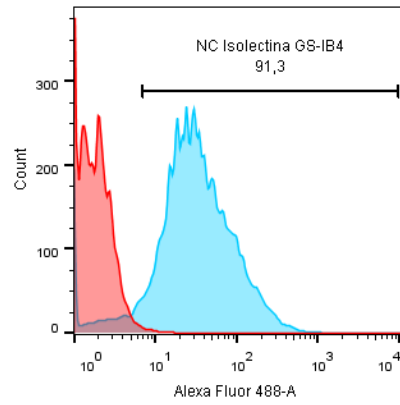
ISOTIPO MARCAÇÃO

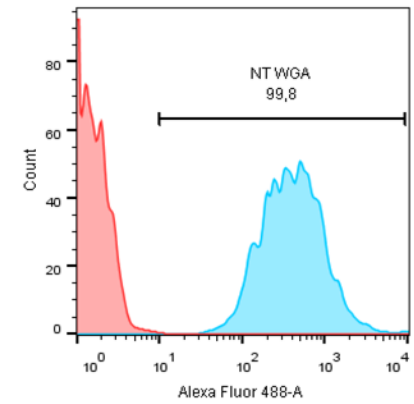
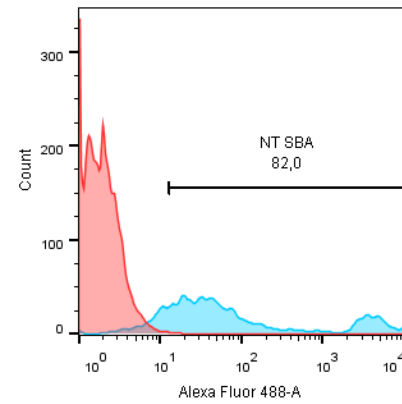
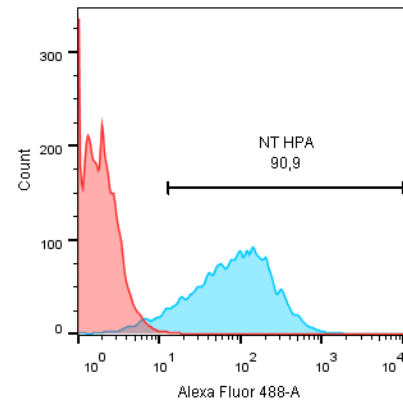
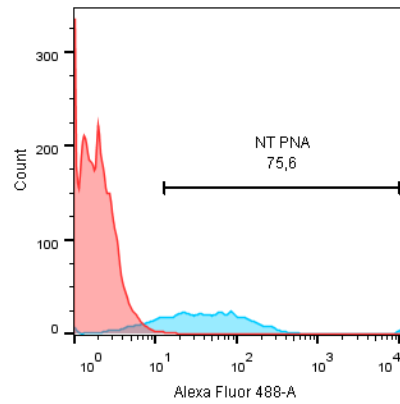
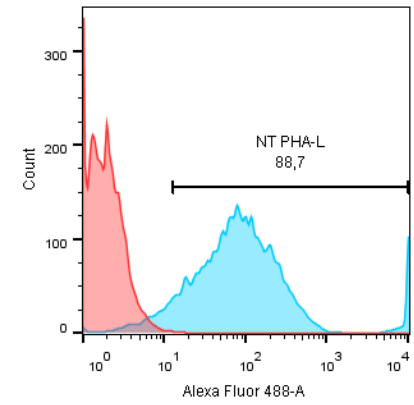
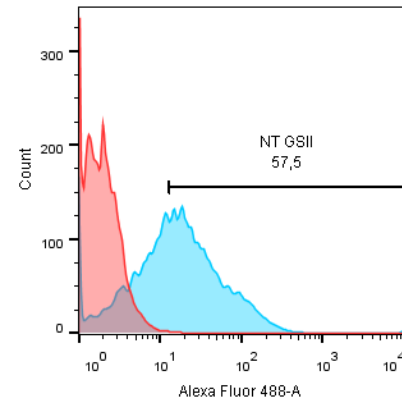
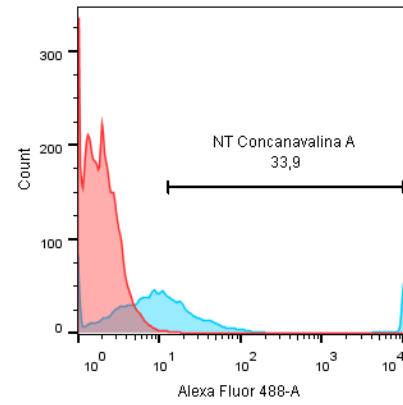
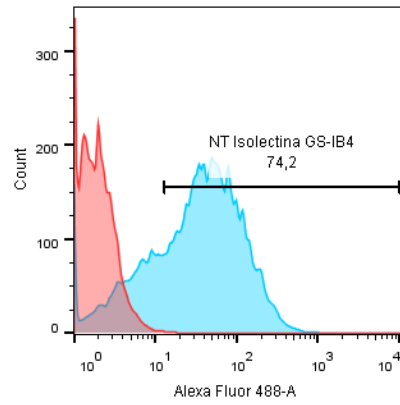


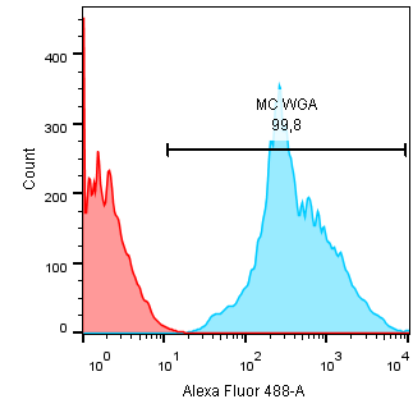
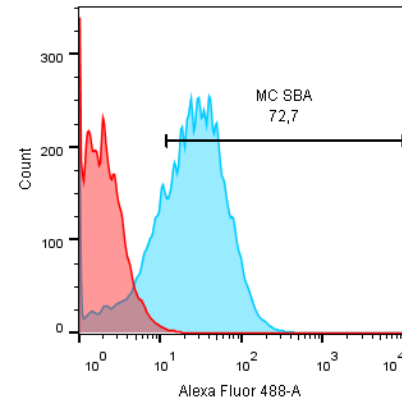
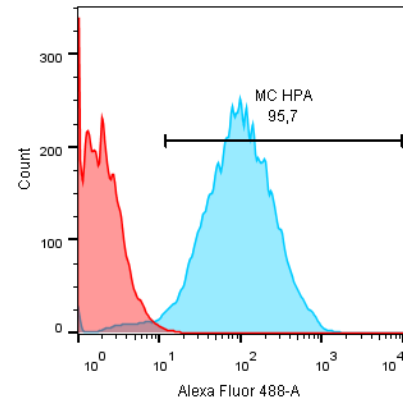
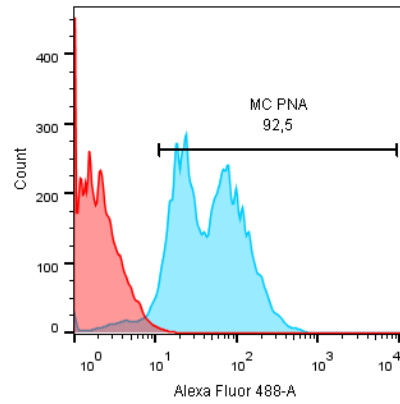
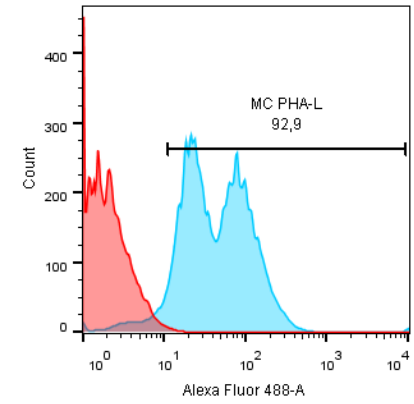
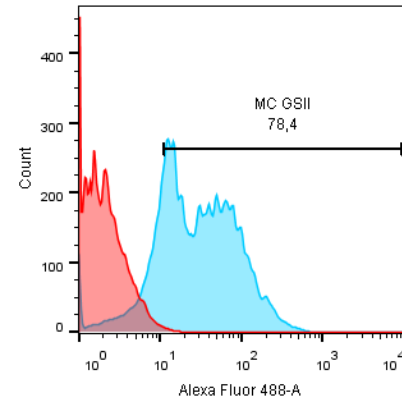
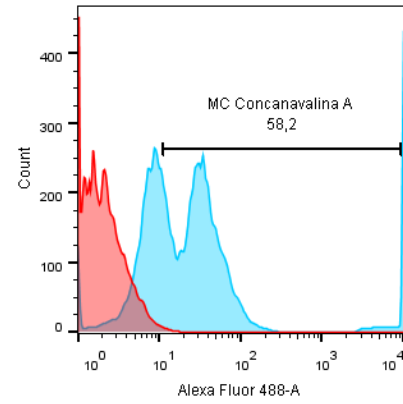
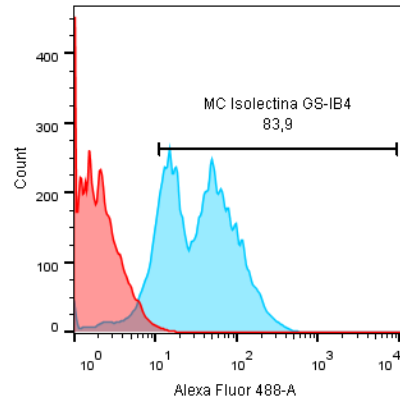
Marcação com lectinas U-87 MG monocamada controle (MC)

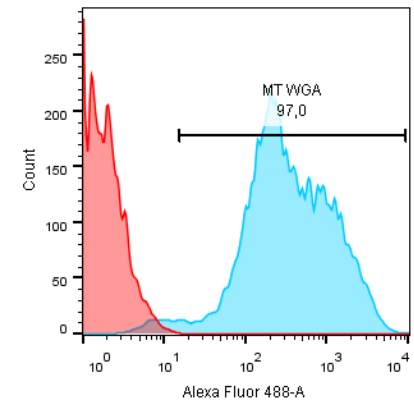
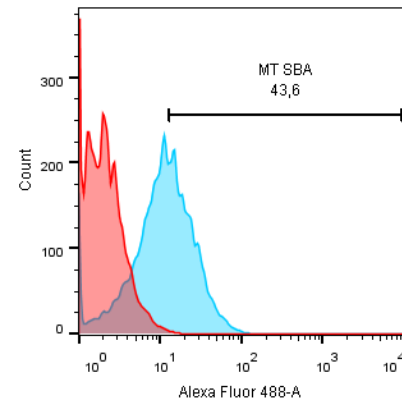
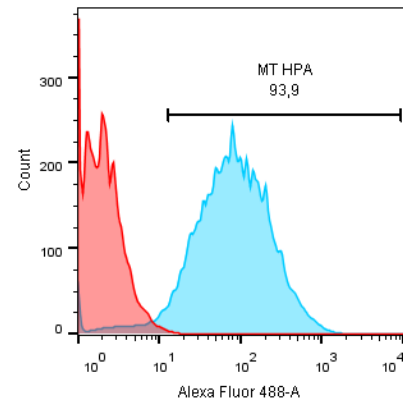
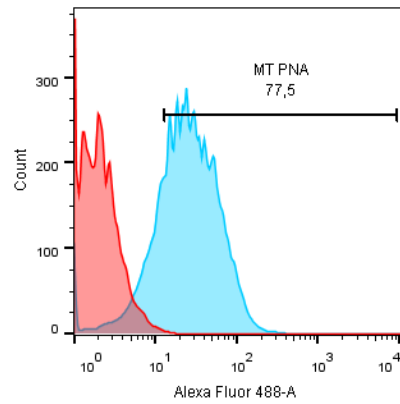
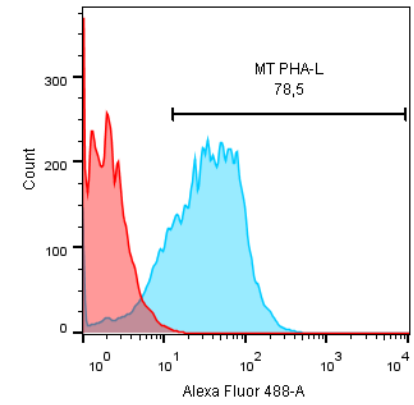
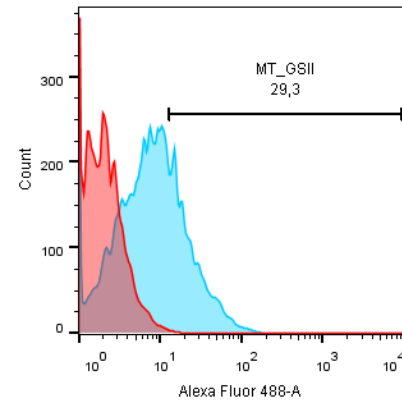
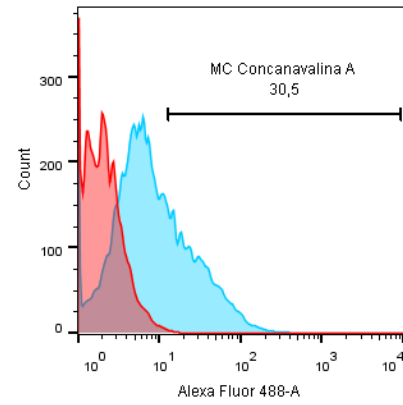
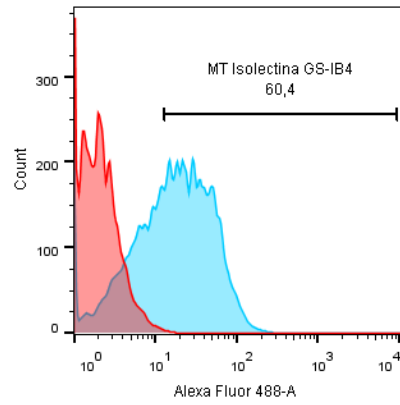


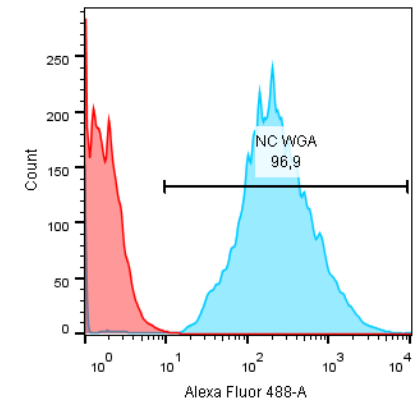
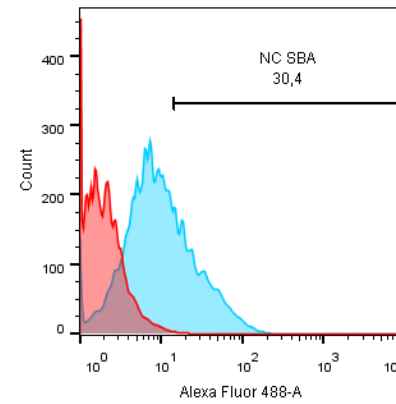
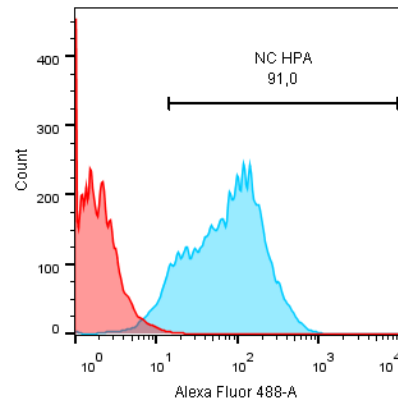
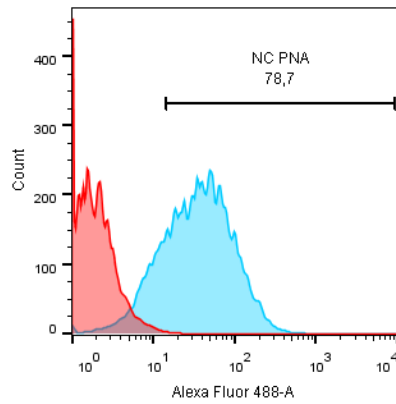
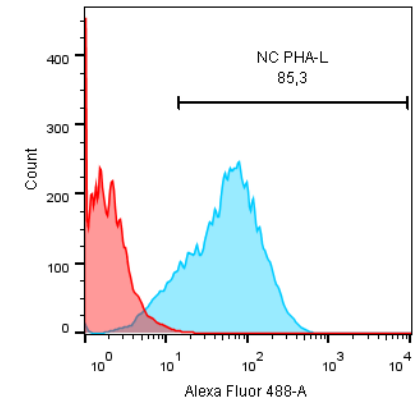
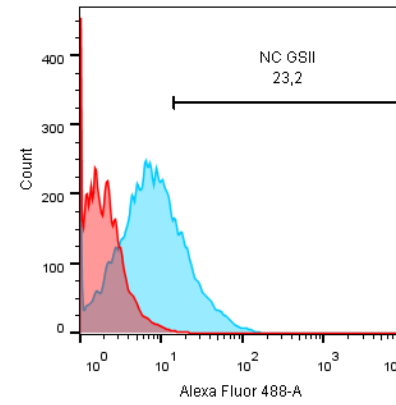
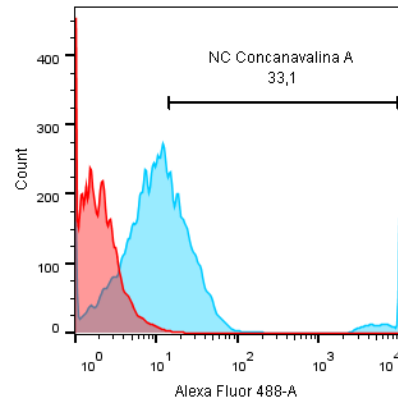
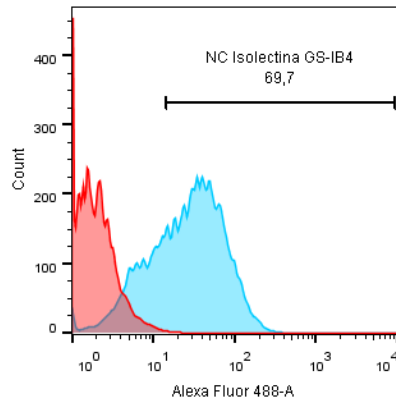
Marcação com lectinas U-87 MG monocamada tratada (MT)

Marcação com lectinas U-87 MG neuroesfera controle (NC)

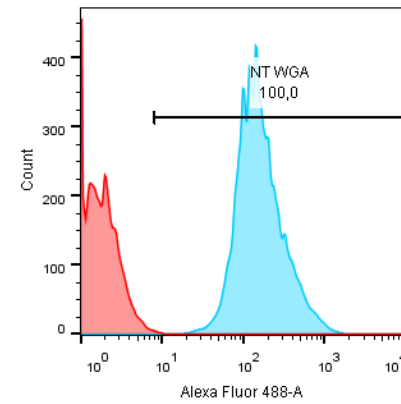
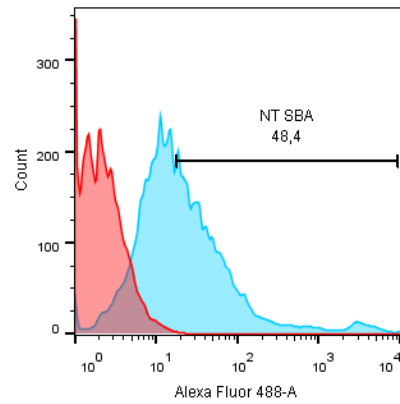
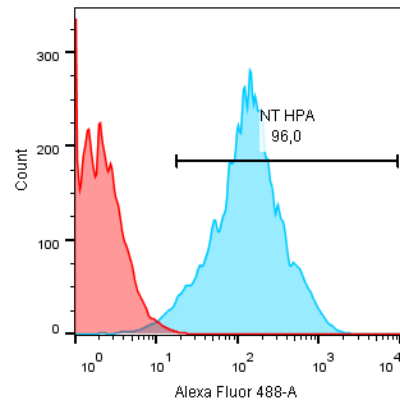
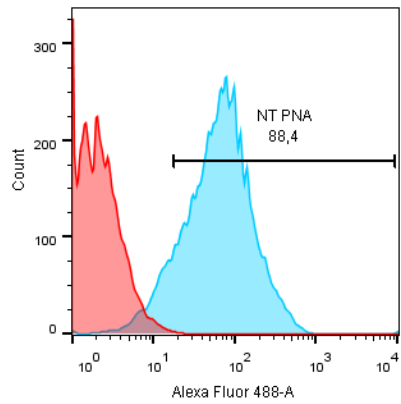
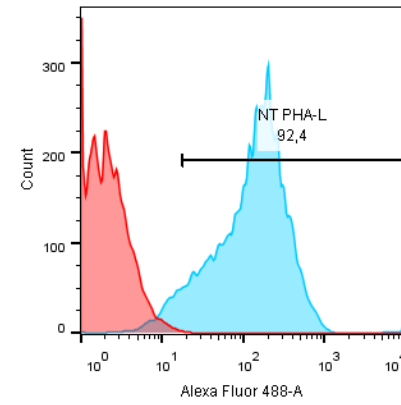
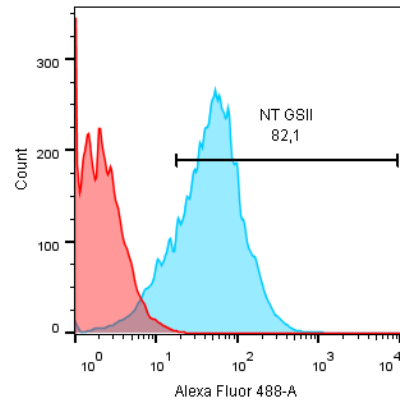
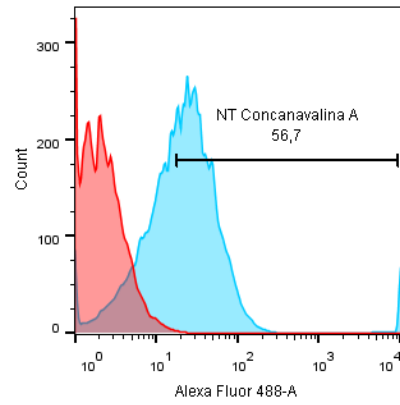
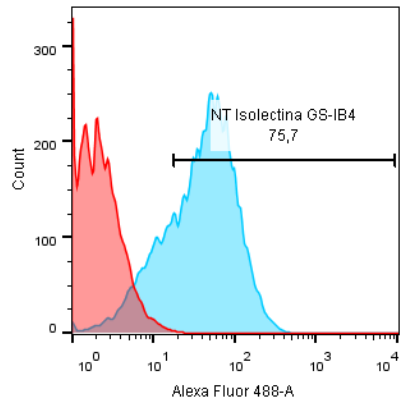
Marcação com lectinas U-87 MG neuroesfera tratada (NT)

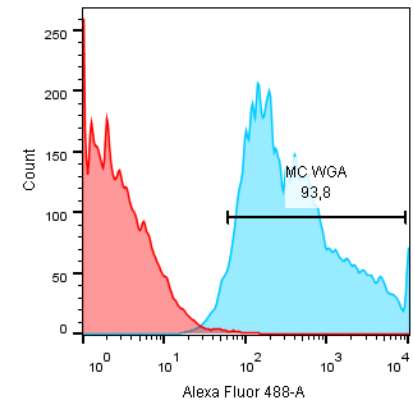
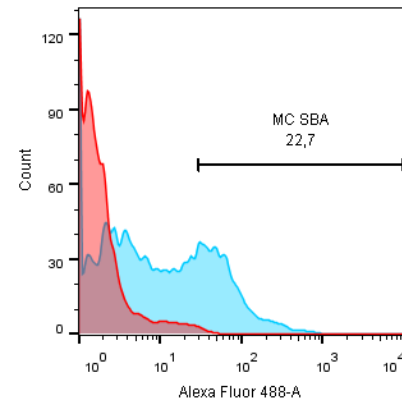
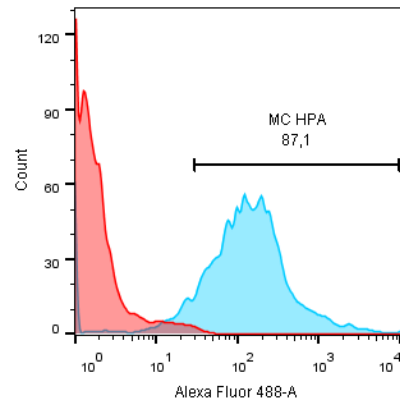
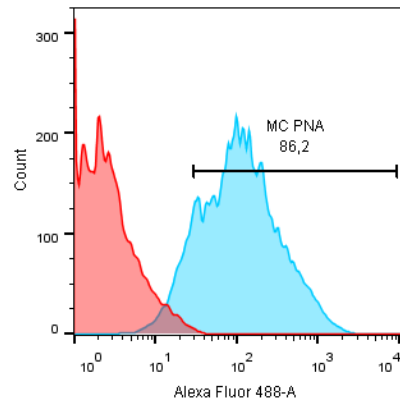
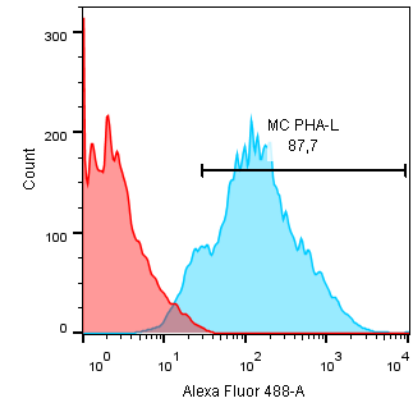
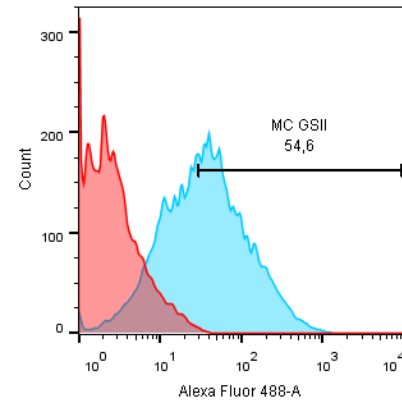
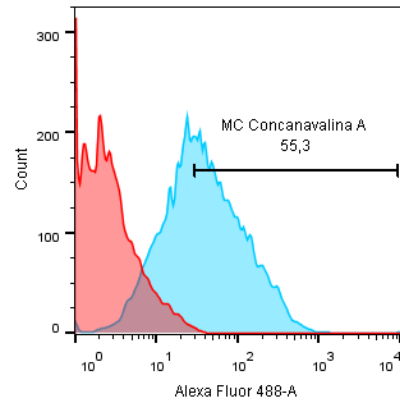
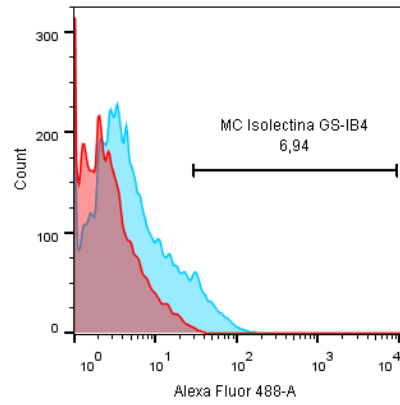
Marcação com lectinas KELLY monocamada controle (MC)

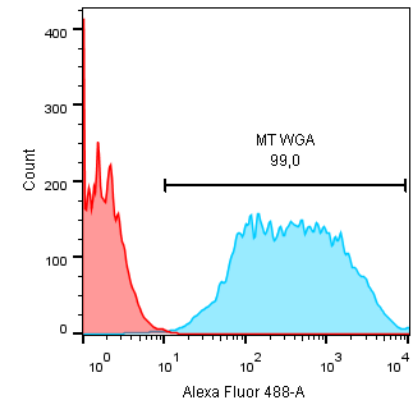
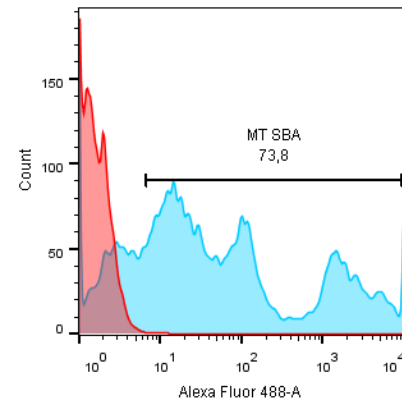
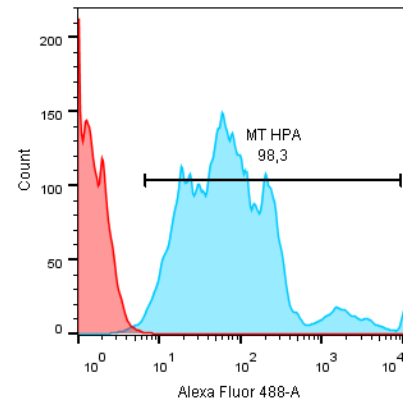
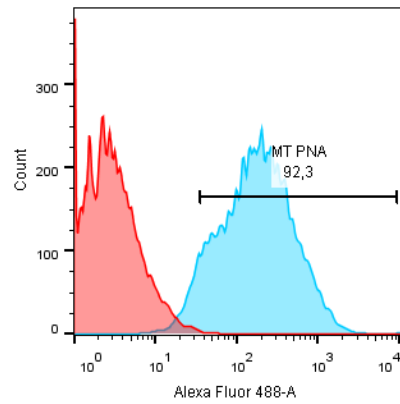
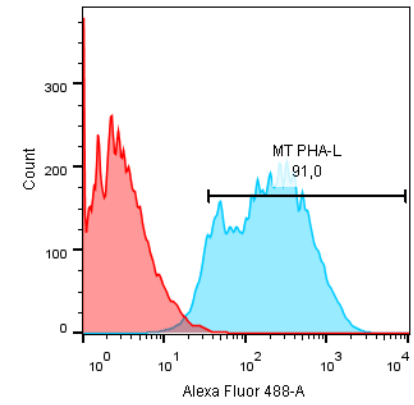
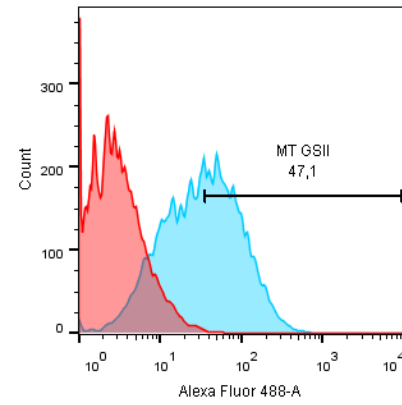
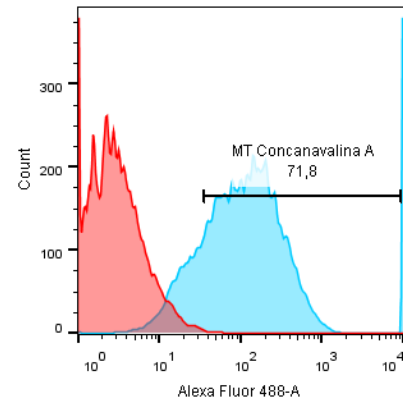
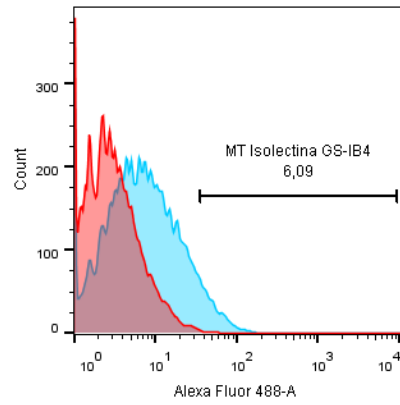
Marcação com lectinas KELLY monocamada tratada (MT)

Marcação com lectinas KELLY neuroesfera controle (NC)

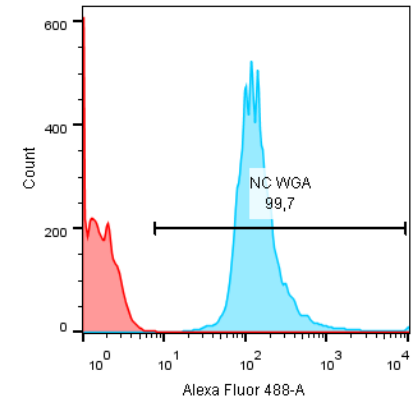
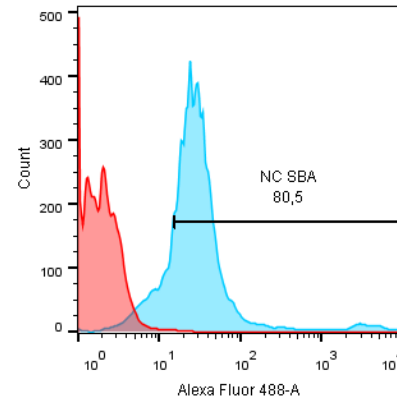
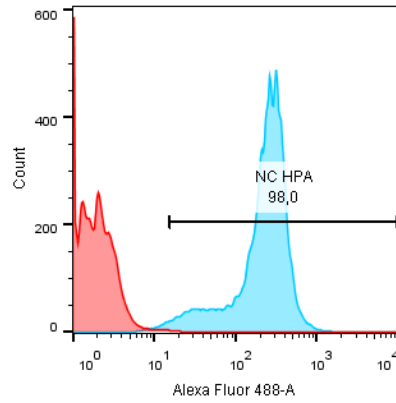
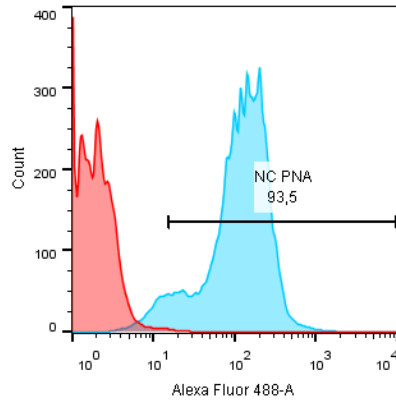
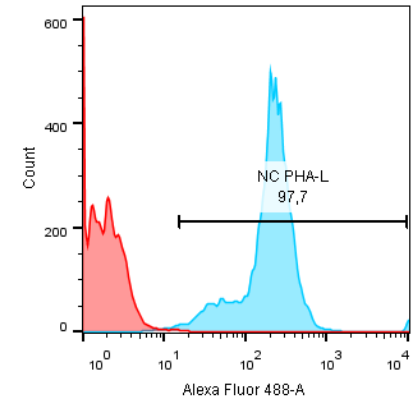
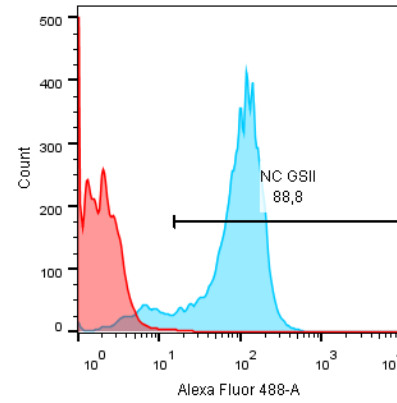
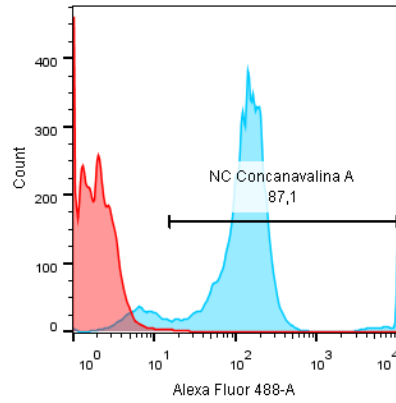
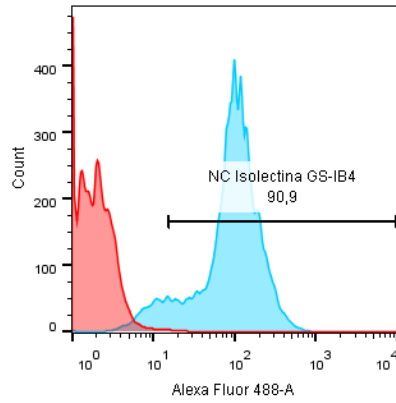
Marcação com lectinas KELLY neuroesfera tratada (NT)

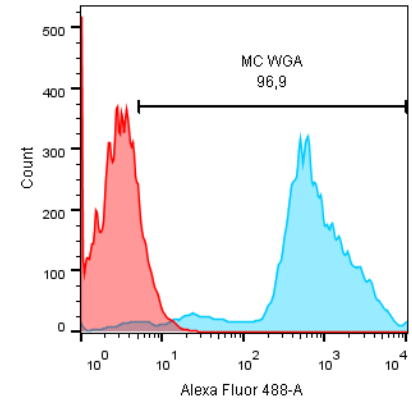
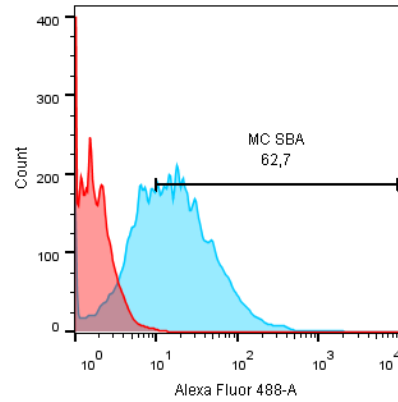
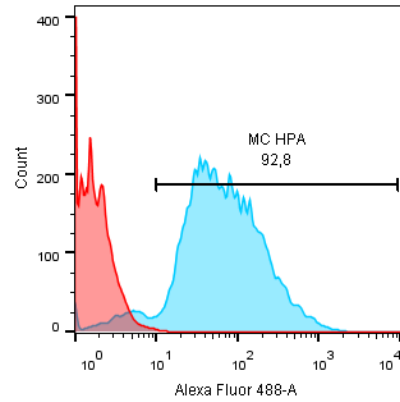
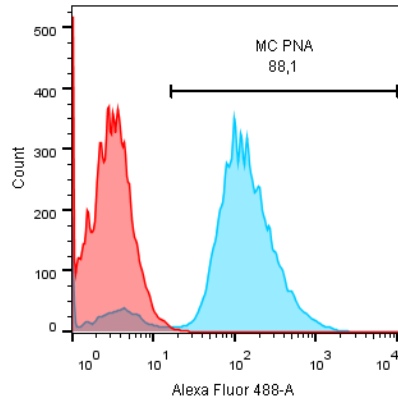
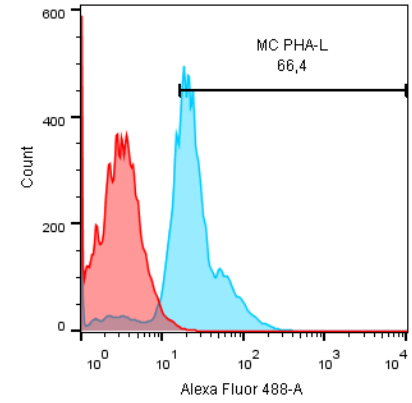
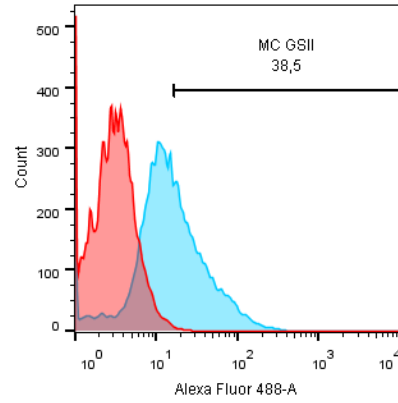
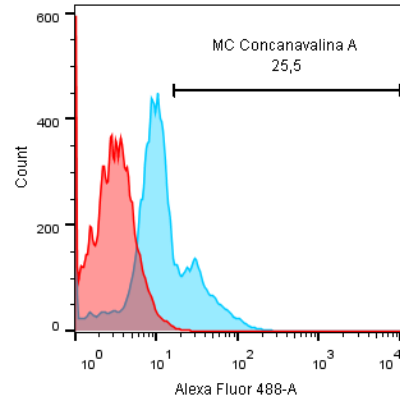
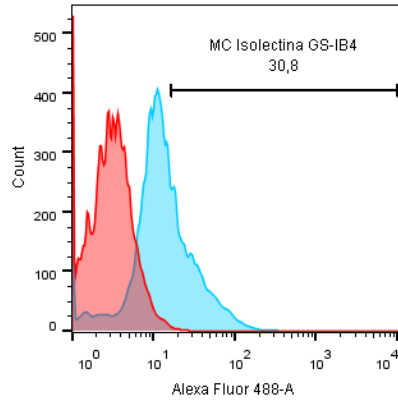


Marcação com lectinas IMR-32 monocamada controle (MC)

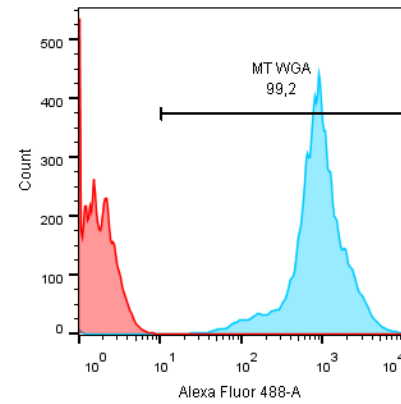
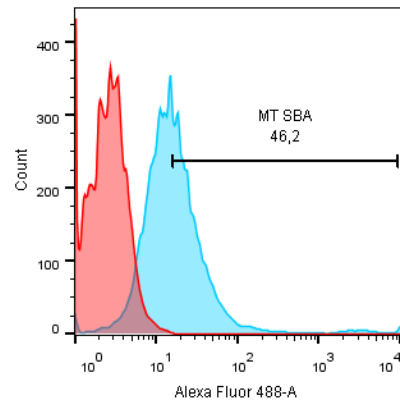
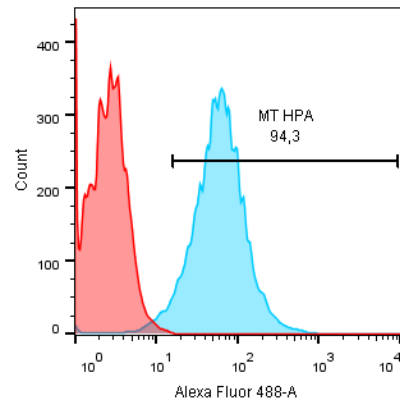
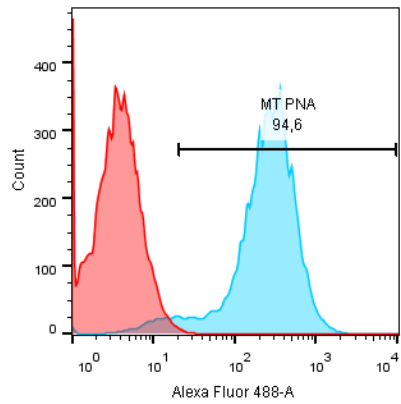
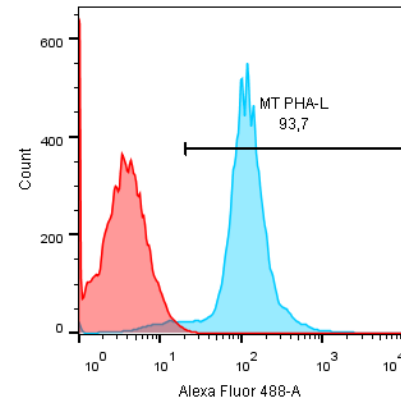
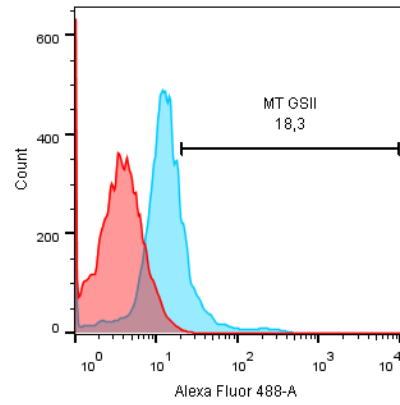
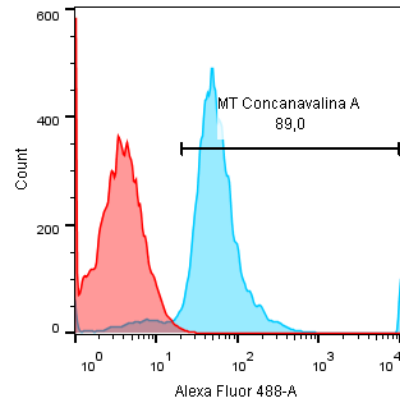
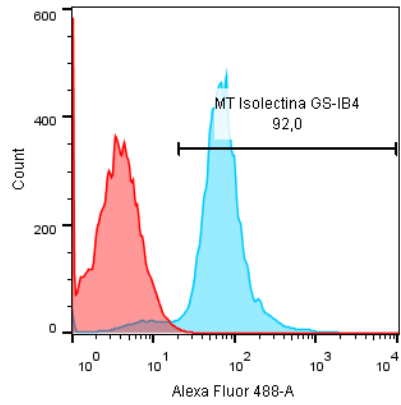
Marcação com lectinas IMR-32 monocamada tratada (MT)

Marcação com lectinas IMR-32 neuroesfera controle (NC)

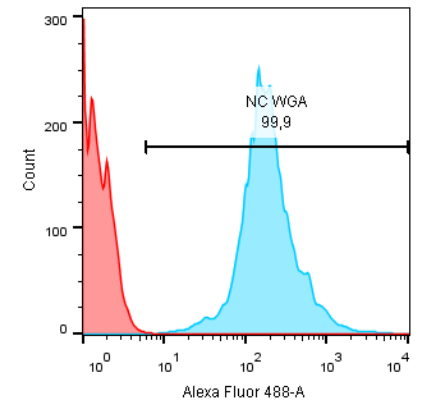
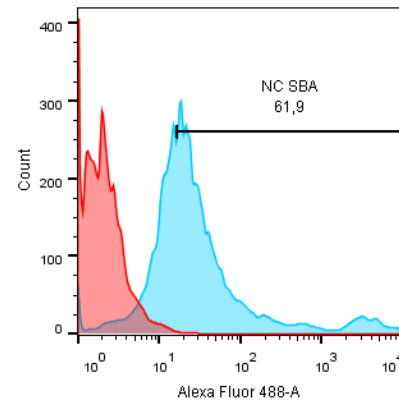
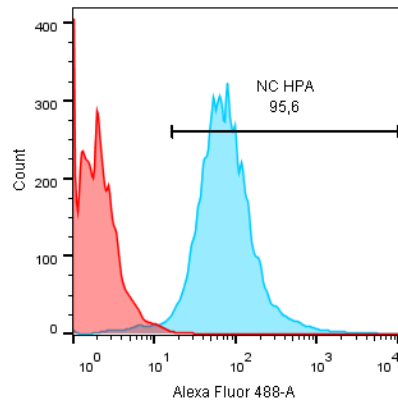
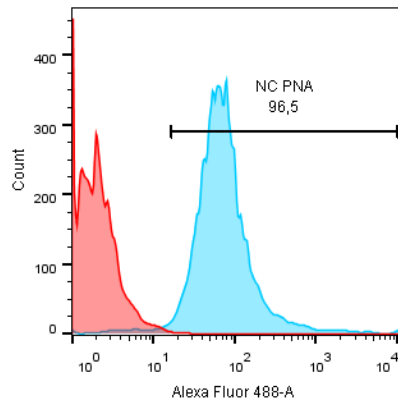
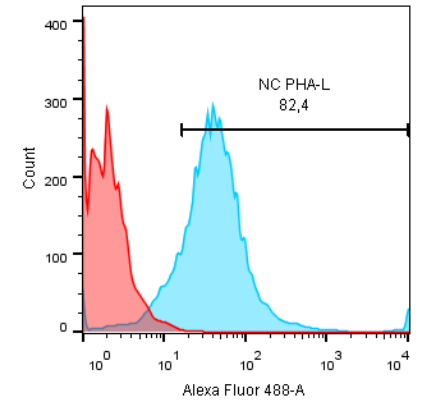
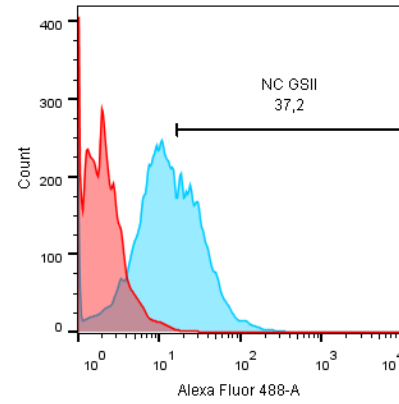
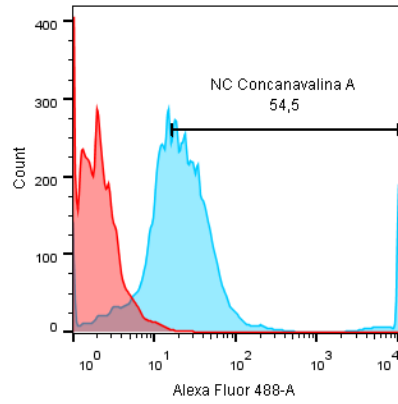
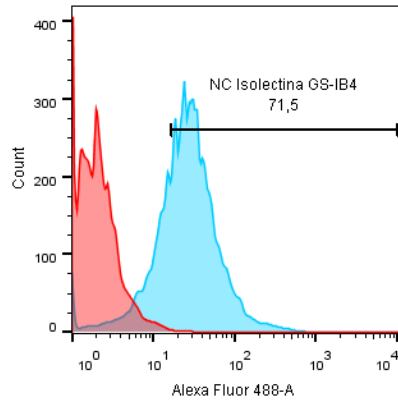


Marcação com lectinas LN-18 monocamada controle (MC)

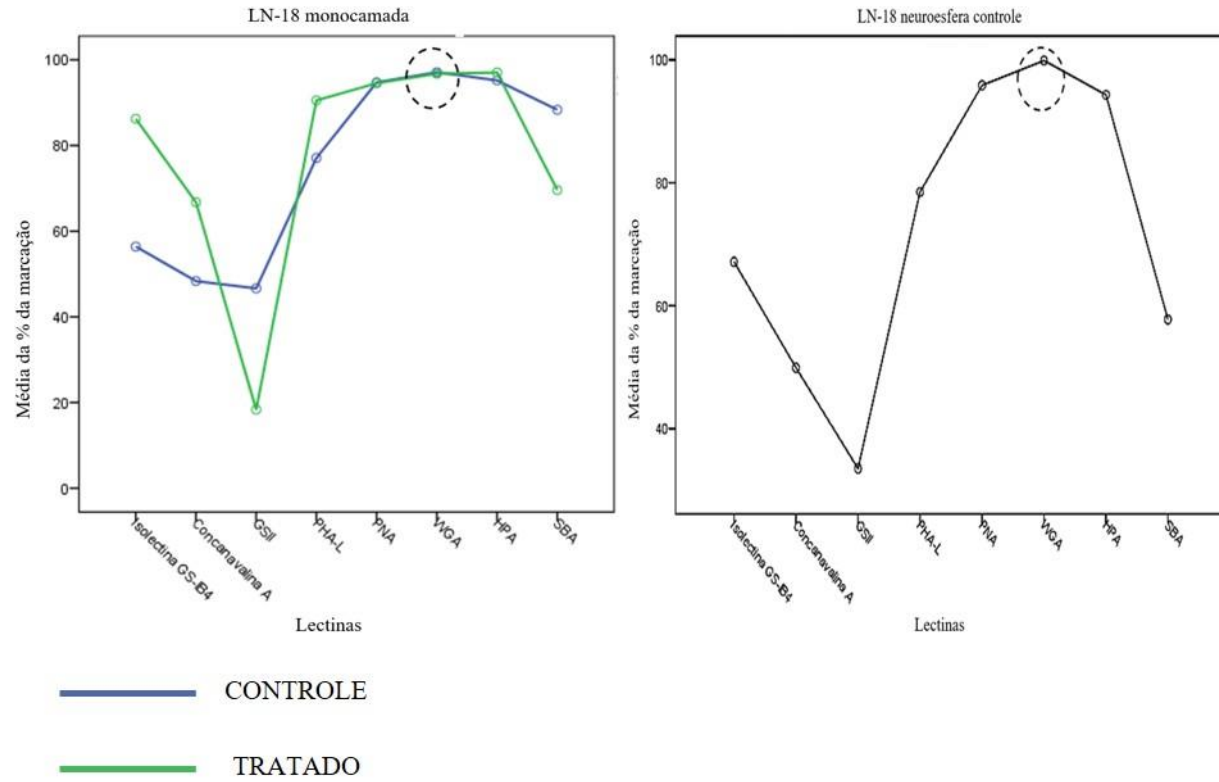
Marcação com lectinas LN-18 monocamada tratada (MT)



Marcação com lectinas LN-18 neuroesfera controle (NC)

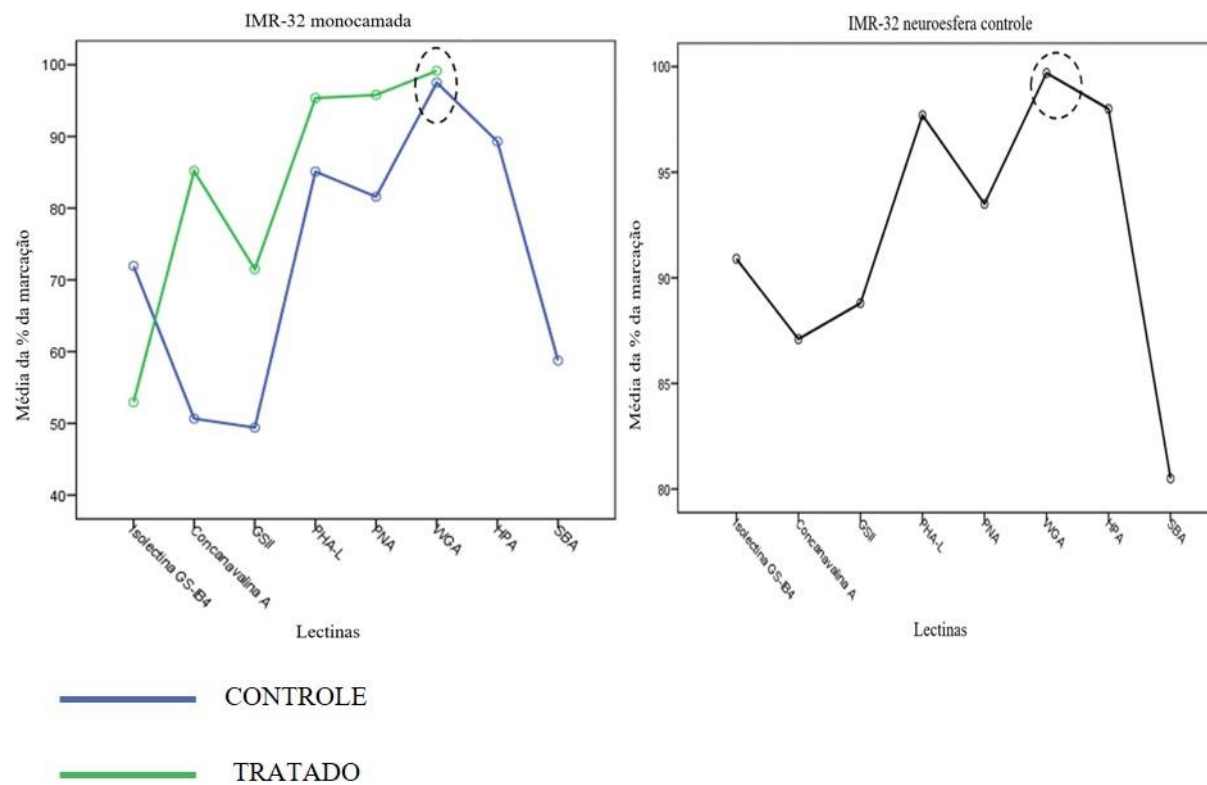


Análise do perfil de glicosilação da linhagem LN-18



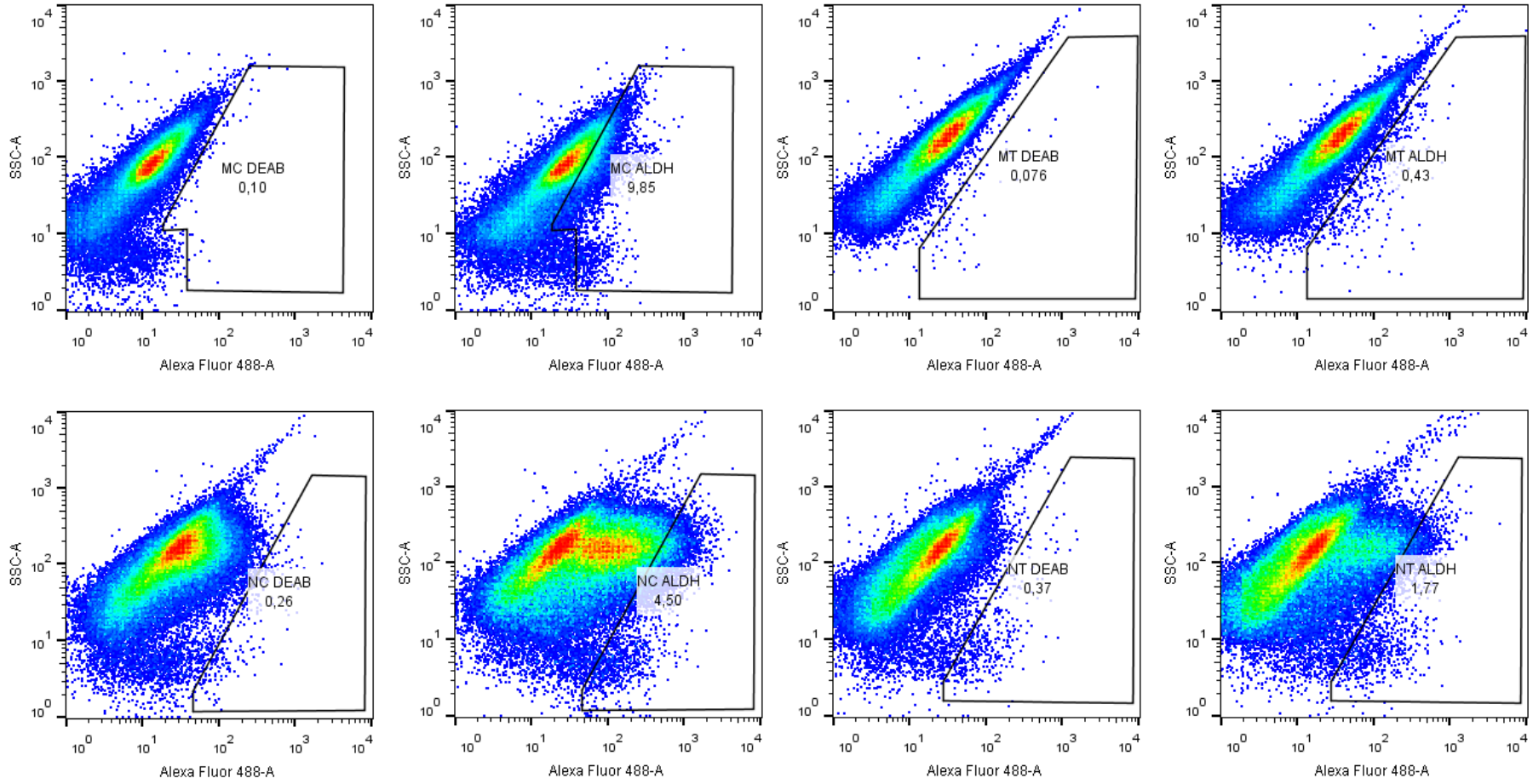
Legenda - Análise do perfil de glicosilação de LN-18. Nenhuma alteração significativa foi observada no modelo monocamada e o modelo neuroesfera ainda não foi finalizado. Anova Post Hoc LSD. n=2.

Análise do perfil de glicosilação da IMR-32

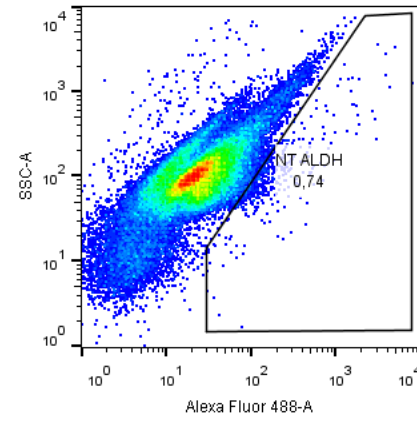
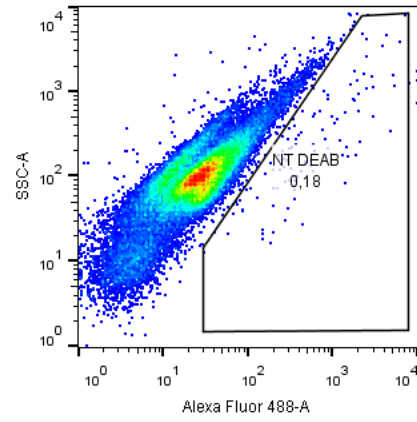
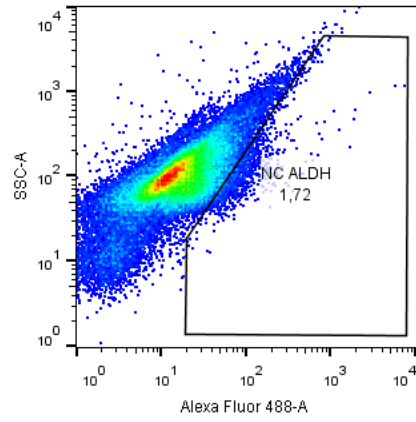
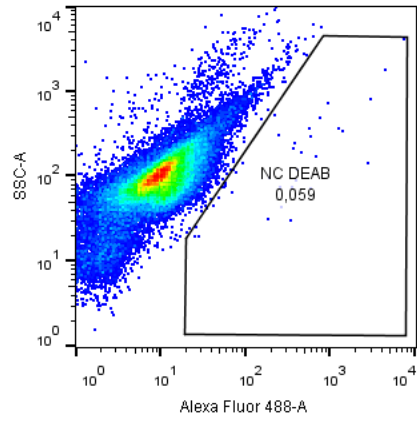
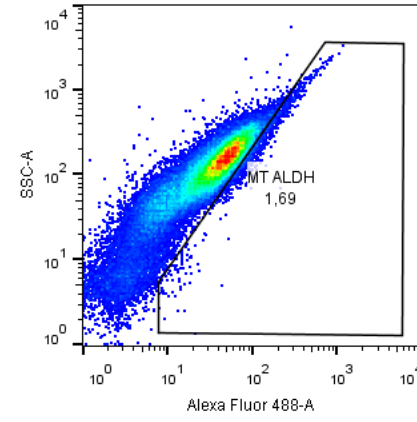
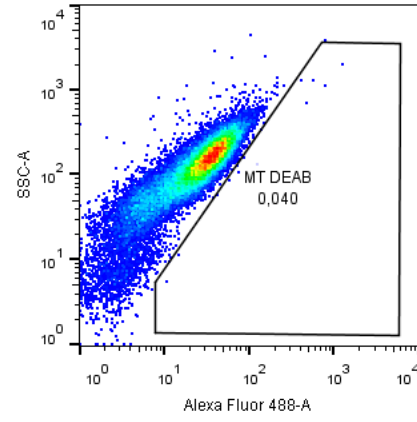
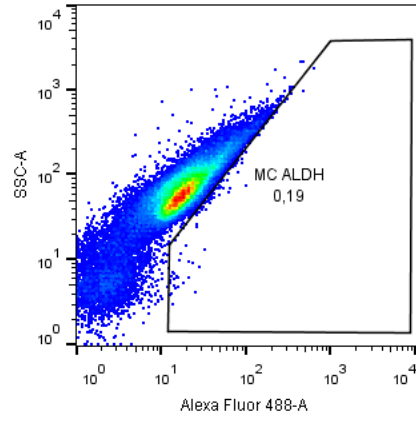
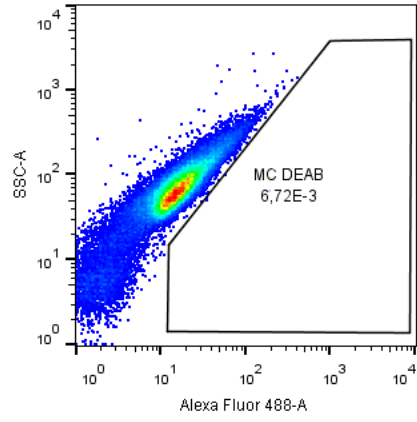


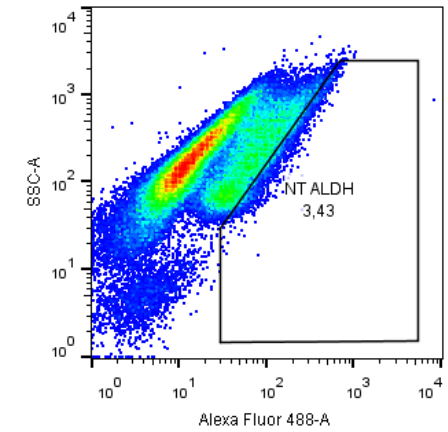
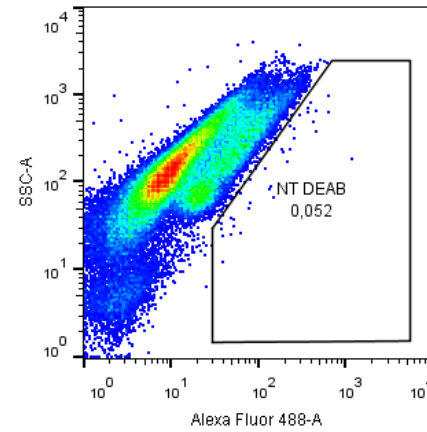
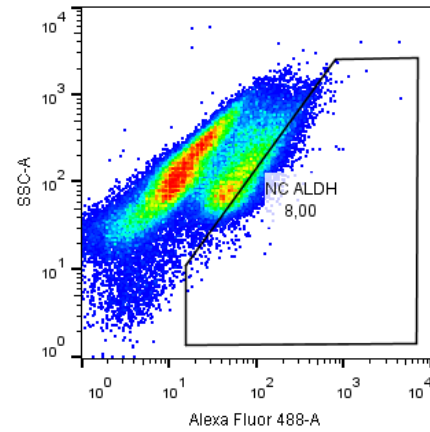
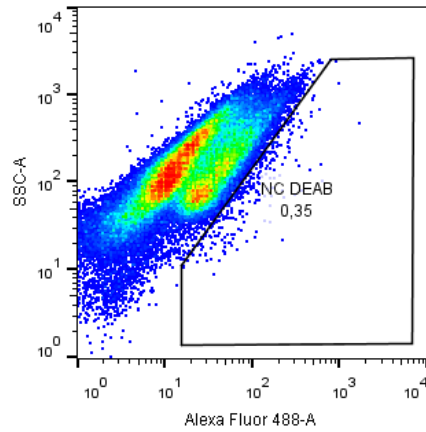
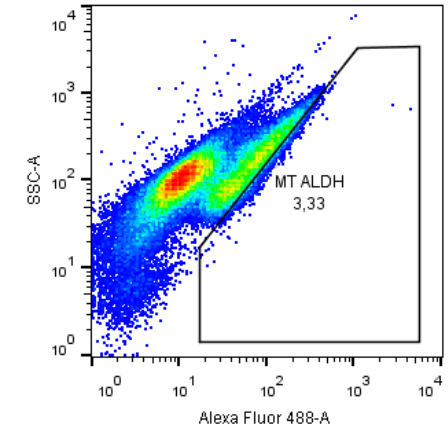
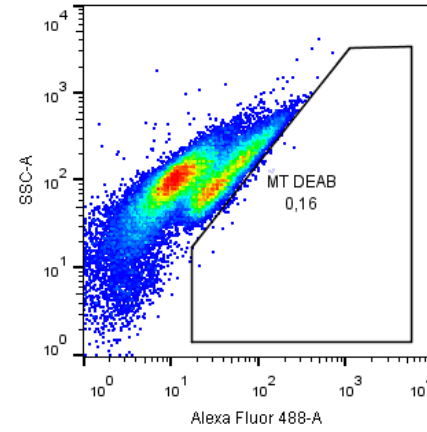
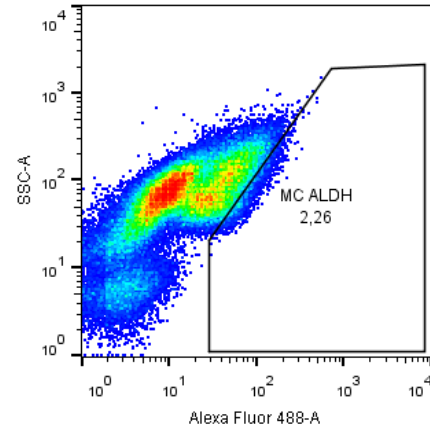
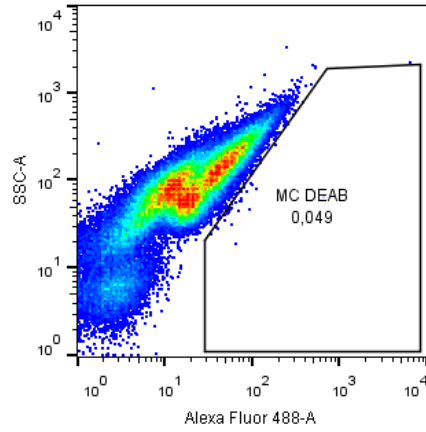
Legenda - Análise do perfil de glicosilação de IMR-32. Nenhuma alteração significativa foi observada no modelo monocamada e o modelo neuroesfera ainda não foi finalizado. Anova Post Hoc LSD. n=2.

Marcação de ALDH U-87 MG

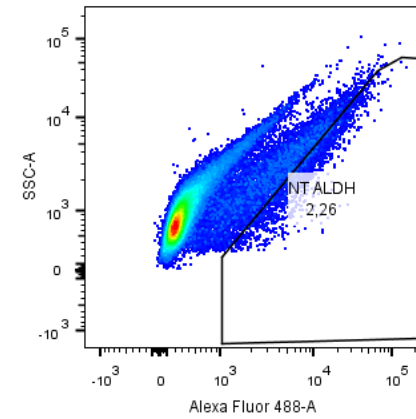
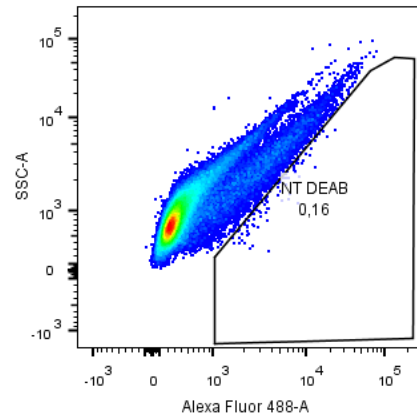
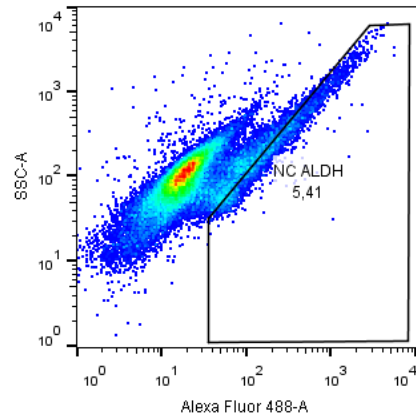
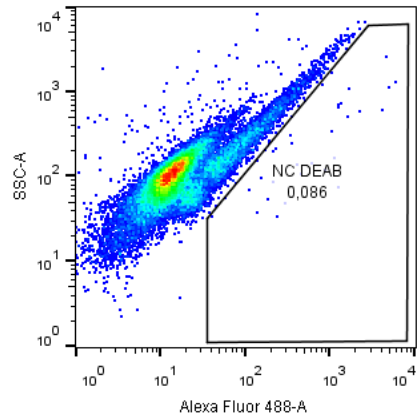
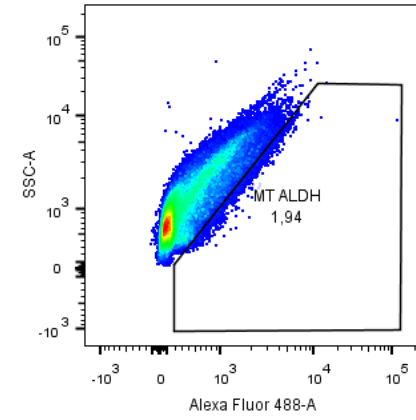
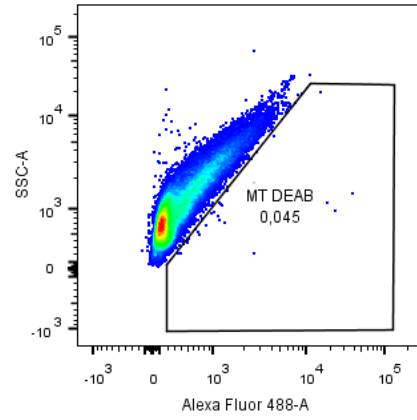
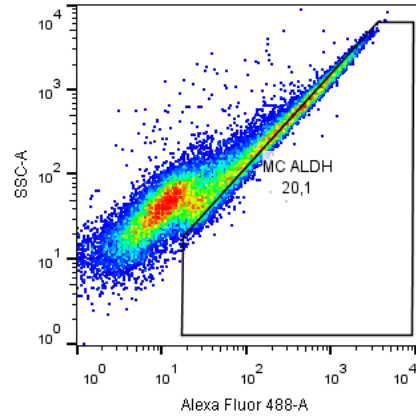
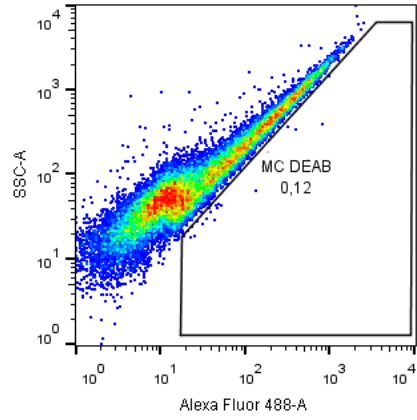


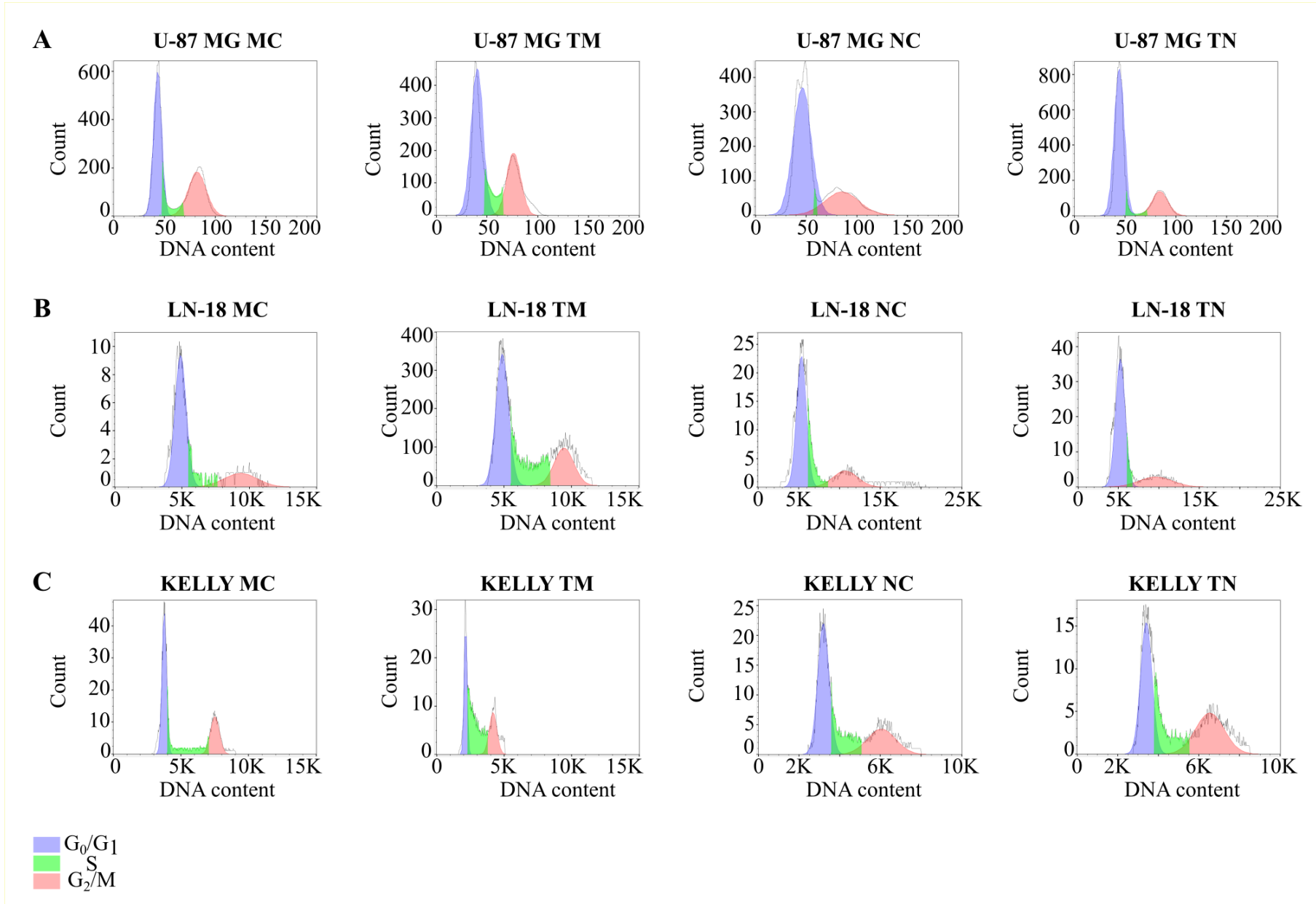
Marcação ALDH LN-18



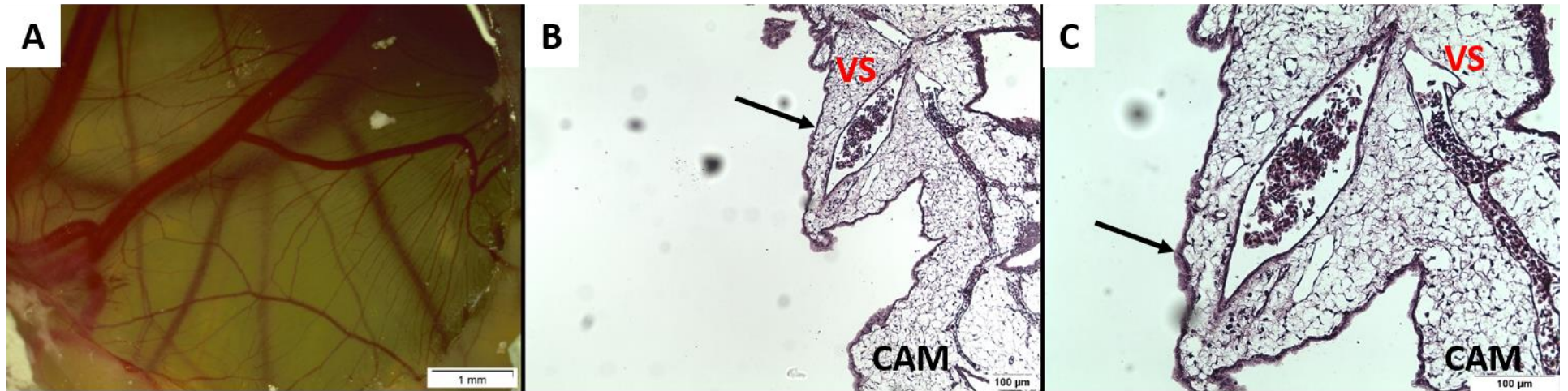
Marcação ALDH KELLY

Marcação ALDH IMR-32





7- Aspectos da CAM somente com a solução controle de PBS 1x.



Legenda: Setas pretas indicam epitélio da CAM que circunda o mesênquima, este último repleto de vasos sanguíneos (VS). A) aumento 0,67x. B) aumento 10x e C) 20x.

ANEXO: Liberação sobre necessidade de autorização do comitê de ética para experimentos da CAM



Participar da Construção do Sistema Único de Saúde,
Protegendo e Promovendo a Saúde

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

MEMORANDO CEUA Nº 006/2016

Em 14 de Outubro de 2016.

Para: Sílvia Lígório Fialho

Assunto: Resposta ao Memorando

Prezada Sílvia,

No reunião do dia 11/10/2016 foram colocados em pauta os memorandos DDTE/DPD Nº055/2016, Nº054/2016, Nº056/2016, Nº058/2016, Nº060/2016, Nº061/2016 e foram tomadas as seguintes decisões.

Em resposta ao Memorando DDTE/DPD Nº 055/2016, que se refere a prorrogação de validade do protocolo 057/2013, intitulado "Avaliação da Citotoxicidade da Imiquimod Veiculada em Nanopartículas em Células de Epiderme", a CEUA aceita a solicitação e prorroga por mais um ano o protocolo 057/2013, ficando válido até 11/10/2017.

Em resposta ao Memorando DDTE/DPD Nº054/2016, em referência à inclusão dos colaboradores Marina Franca Dias, Bruna Carolina Pinheiro e Olivier Araújo Leal, no projeto com protocolo 095/2014, intitulado "Avaliação do sistema polimérico contendo Dióxido de Titânio em modelo experimental de furúnculo", a CEUA em unanimidade aceita a inclusão dos colaboradores para atuação conforme exposto no memorando.

Em resposta aos Memorandos DDTE/DPD Nº056/2016, Nº059/2016, Nº063/2016, sobre o projeto com protocolo 098/2016, intitulado "Avaliação da eficácia clínica de sistemas poliméricos em modelos de inflamação ocular em cães", no assunto sobre inclusão da pesquisadora Gisela Almeida Maranhão Moraes (Nº056/2016), aprovou a inserção de oftalmologista no experimento. No que se trata de cães pretos, machos da raça New Zealand, para serem utilizados no experimento como controle, trata de inflamação ocular sem aplicação de formulação teste (Nº059/2016) e causa



FUNED
Fundação
Ezequiel Dias

Participar da Construção do Sistema Único de Saúde,
Protegendo e Promovendo a Saúde

~~para a incubação dos animais, durante os dias 10, 11, 12 e 13, como descrito no
memorando e os outros itens se alteração, em referência a solicitação nacional de
protocolo (Nº060/2016) de 13/06/2016 para realização de experimentos com a suspensão de
incubação, a CEUA solicita a submissão de novo protocolo, por entender que a alteração de mais
um firmeza no experimento altera consideravelmente os procedimentos aprovados no
protocolo 060/2016.~~

Em resposta ao Memorando DDTF/DPD Nº060/2016 em que se trata da utilização dos ovos
embrionários de até 11º dia de incubação para realização dos experimentos, a CEUA considera
facultativo a submissão do protocolo, desde de que haja garantia do controle dos dias da
incubação pelo pesquisador e que a data do experimento não ultrapasse o 14º dia de
incubação.

Atenciosamente,

Heloisa Helena Marques
ceua@funed.mg.gov.br
Coordenadora da CEUA Funed

Recebido em: 13 / 10 / 16

Ass:

Rua Conde Pereira Carneiro, nº 80 – Gamela
Belo Horizonte - MG - CEP: 30.510-073
funed@funed.mg.gov.br