Carolina de Oliveira Rodini

**Contribuição das células-tronco mesenquimais para as propriedades
tumorigênicas de células de glioblastoma humano**

**Contribution of mesenchymal stem cells to the tumorigenic properties of
human glioblastoma cells**

São Paulo

2016

Carolina de Oliveira Rodini

**Contribuição das células-tronco mesenquimais para as propriedades
tumorigênicas de células de glioblastoma humano**

**Contribution of mesenchymal stem cells to the tumorigenic properties of
human glioblastoma cells**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para obtenção de Título
de Doutor em Ciências, na Área de BIOLOGIA /
GENÉTICA.

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Rodini, Carolina Oliveira

Contribuição das células-tronco mesenquimais para as propriedades tumorigênicas de células de glioblastoma humano

Número de páginas: 183

Tese de doutorado - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Glioblastoma 2. Células-tronco Mesenquimais 3. Microambiente tumoral 4. TGFB1

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto
Orientador

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese para meus pais, Elaine e Bruno,
e minha irmã, Camila, por serem exemplos e
sempre acreditarem em mim;

Para meu marido, Guilherme, por todo amor e
apoio.

AGRADECIMENTOS

Durante toda a fase do Doutorado tive o incentivo e o apoio de pessoas especiais.

Agradeço todo o amor e o exemplo de cada um de vocês!

À Deus, por me iluminar nessa e em todas as outras trajetórias até o momento e proporcionar momentos maravilhosos com minha querida família;

Aos meus pais, Elaine e Bruno, por todo amor incondicional e apoio constante desde que fui colocada no mundo. Vocês sempre serão exemplos! Agradeço novamente à Deus por ter me escolhido como filha de pais tão maravilhosos;

Ao meu marido, Guilherme, por todo o companheirismo, paciência e por sempre acreditar em mim! Sinto-me aconchegada e protegida ao seu lado. Te amo muito!

À minha irmã-amiga, Camila, que me apoia e faz parte de todas as minhas decisões. A distância não significa nada para nossa amizade. É um exemplo profissional e mãezona que, junto com meu cunhado Eduardo, me deu um tesouro! Meu tesouro Bernardo;

Aos meus avós, Maria e Bira (*in memoriam*), e à querida tia, Ana, pelo carinho e por fazerem parte de nossas vidas.

Agradeço todos os amigos e colegas que fizeram parte deste trabalho e do meu aprendizado! Um bom trabalho não se faz sozinho!

Ao Prof. Keith, que me conhece desde que decidi começar a formação acadêmica. Agradeço todos os conselhos, a confiança, a dedicação, o aprendizado e a oportunidade em seu laboratório. Tudo isso foi fundamental;

Às meninas do laboratório, pois lá há força feminina! Semedo, Tamara, Marina, Aline e, em especial, Pathe, Kaid, Pereira, Bia e Santos;

Pathe, você me iniciou na cultura celular e sempre me ajudou nos experimentos e nas discussões quando precisei. Agradeço toda sua dedicação e todos os momentos de descontração e companheirismo; você quer café?

Kaid, o que falar de você e de sua energia? Você transforma o dia, trazendo sua leveza e proporcionando boas risadas e papos-cabeça;

Pereira, amiga desde a época da UNIFESP! Adoro você, suas conversas e sua sabedoria!

Bia, o que seria de mim sem seus conselhos e de sua ajuda no microscópio? Mesmo com pouco tempo de convivência sei que você é um exemplo e tem um coração precioso;

Santos, cadê você menina? Sinto saudades da época em que você estava no lab. Agradeço todo o incentivo e os conselhos que você me deu!

A todos aqueles que passaram pelo laboratório e contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho e de minha formação, Adriana, Daniela, Mayara, Bruno, Gabi, Seixas, Rosanna, Daiana, Isabela, Joanna, Sheila, Lucas Sabá, Vivek, Lucas Price, Fábio;

À Amanda, agradeço toda a colaboração e companheirismo durante a realização do estudo de proteômica. Os dados, com certeza, foram essenciais para enriquecer esta tese;

Às alunas da Profa. Mayana por sempre disponibilizarem o banco de células. Em especial à Mariane Secco, pela disponibilidade, por coletar e fornecer as células-tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical utilizadas neste trabalho;

À Karina Griesi, pela prontidão e auxílio na geração de vírus para estabelecer as culturas das células-tronco mesenquimais transduzidas;

À Helo, por toda a prontidão em adquirir os animais para os experimentos, além de seus cuidados essenciais ao biotério;

A todos os alunos e os especialistas dos demais laboratórios do CEPID, pela disposição em ajudar sempre que necessário;

A todos os professores e funcionários do IB/USP, por todo auxílio oferecido.

Às agências de fomento, FAPESP (CEPID), CNPq INCT e Capes.

EPÍGRAFE

“Só crescemos à medida que nos damos a
algo mais alto que nós mesmos”

Antoine de Saint-Exupéry

NOTA DO AUTOR

A proposta deste trabalho consistiu em avaliar a contribuição de células-tronco mesenquimais (CTM) para as propriedades tumorigênicas de células de glioblastoma humano (GBM). Além do GBM ser um tumor grave com grande impacto na sobrevida dos pacientes, cada vez mais tem se dado importância à ação do microambiente tumoral para a tumorigênese, indicando-se a necessidade em considerá-lo também um alvo terapêutico. Dentre os componentes do microambiente, estão as CTM provenientes da medula óssea ou de diversos locais como o próprio sítio tumoral que, por apresentarem tropismo em direção às células tumorais, passam a incorporar o nicho tumoral. Assim, as CTM secretam citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que podem atuar como fatores pró ou antitumorais, dependendo do tipo tumoral ou fase de sua evolução. Primeiramente, consideramos a importância da citocina *TGFB1* liberada por CTM no comportamento de GBM, já que em neoplasias o *TGFB1* pode promover crescimento tumoral, indução de transição epitélio-mesenquimal, evasão à vigilância do sistema imunológico, invasão, disseminação de células tumorais e metástases. Nesse contexto, nossos resultados indicaram que o *TGFB1* secretado por CTM produziu efeito pró-tumorigênico apenas quando presente em altos níveis, estimulando significativamente a proliferação celular de GBM. Por outro lado, a presença de contato físico entre células de GBM com as CTM induziu efeitos pró-tumorigênicos independentes do nível de *TGFB1* liberado por elas. Adicionalmente, o estudo do secretoma de meios condicionados derivados desses cocultivos celulares indicou diversas proteínas, a maioria envolvida na composição de exossomos, produzidas exclusivamente ou diferencialmente expressas nessa condição. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que há uma interação dinâmica entre essas células e que, de fato, as CTM são capazes de interferir nas propriedades tumorigênicas de células de GBM quando presentes no microambiente tumoral. Visto que os efeitos pró-tumorigênicos encontrados provavelmente ocorreram devido a mecanismos alternativos que envolvem o contato físico celular, além da ação de outras proteínas ou de um conjunto de proteínas, outras questões surgem como perspectivas para projetos futuros.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
1. CÂNCER	12
2. CÂNCER DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	13
2.1. <i>Características histopatológicas de astrocitomas</i>	14
3. MICROAMBIENTE TUMORAL	20
4. TROPISMO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AOS SÍTIOS TUMORAIS	24
4.1. <i>Efeitos de células-tronco mesenquimais em diversos tipos de câncer</i>	26
4.2. <i>Efeitos de células-tronco mesenquimais em gliomas</i>	29
5. VIA DE SINALIZAÇÃO TGFB NO CÂNCER	32
5.1. <i>Via de sinalização canônica de TGFB/SMAD</i>	33
5.2. <i>Via de sinalização não-canônica de TGFB</i>	34
5.3. <i>Desregulação da via TGFB no câncer</i>	35
6. TGFB E PROPRIEDADES TUMORIGÊNICAS DE GBM	36
6.1. <i>Ação pró-tumorigênica de CTM em câncer cerebral?</i>	38
OBJETIVOS	39
MATERIAIS E MÉTODOS	40
1. CULTIVO CELULAR	40
2. QUANTIFICAÇÃO DE TGFB1 EM CTM	42
2.1. <i>Quantificação dos níveis de transcritos de TGFB1 por qRT-PCR</i>	42
2.2. <i>Quantificação da proteína TGFB1 em meios condicionados e extratos celulares</i>	43
2.3. <i>Isolamento e confirmação de exossomos para quantificação de TGFB1</i>	45
3. OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS SILENCIADAS PARA O GENE TGFB1	45
3.1. <i>Clonagem dos plasmídeos para transfecção e transdução viral</i>	45
3.2. <i>Método de extração de plasmídeo</i>	46
3.3. <i>Transduções virais</i>	47
4. ENSAIOS CELULARES FUNCIONAIS IN VITRO	50
4.1. <i>Ensaio de viabilidade e proliferação celular de células U87FP635 na presença de meios condicionados de CTM transduzidas</i>	50

4.2. Ensaio de migração celular na presença de meios condicionados de CTM transduzidas.....	51
4.3. Proliferação celular de U87FP635 na presença de cocultivos celulares com CTM transduzidas.....	52
4.4. Ensaio de migração e invasão celular de U87FP635 pelo método modificado de Boyden (transwell) na presença das CTM transduzidas.....	52
4.5. Ensaio de invasão celular 3D na presença das CTM transduzidas	53
5. ENSAIO DE TUMORIGÊNESE <i>IN VIVO</i> SUBCUTÂNEO.....	54
6. PROTEÔMICA DOS MEIOS CONDICIONADOS DERIVADOS DE COCULTIVOS CELULARES.....	55
6.1. Digestão proteica por RapiGest™ SF Surfactant.....	55
6.2. Processamento das amostras e análise do perfil proteico por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem.....	56
6.3. Planejamento e aquisição dos dados de proteômica shotgun	56
6.4. Processamento dos dados proteômicos.....	57
6.5. Análise dos dados e análise funcional por biologia de sistemas	57
RESULTADOS.....	58
1. EXPRESSÃO BASAL DE <i>TGFB1</i> EM CTM DE DIVERSAS FONTES BIOLÓGICAS..	58
2. SILENCIAMENTO DE <i>TGFB1</i> EM CTM	60
3. QUANTIFICAÇÃO DE <i>TGFB1</i> EM EXOSSOMOS DERIVADOS DE CTM APÓS SILENCIAMENTO ESTÁVEL.....	62
4. ENSAIOS CELULARES FUNCIONAIS <i>IN VITRO</i>	66
4.1. <i>TGFB1</i> secretado por CTM aumenta significativamente a viabilidade e a proliferação de células de GBM.....	66
4.2. Aumento na quantidade de células viáveis de GBM também é influenciado por contato célula-célula com CTM <i>in vitro</i>	67
4.3. Perfil das quantificações de <i>TGFB1</i> em meios condicionados de cocultivos celulares	71
4.4. Comportamento invasivo de células tumorais é afetado pelo contato com CTM...75	
5. CONTATO COM CTM AUMENTA A TUMORIGENICIDADE DE CÉLULAS DE GBM <i>IN VIVO</i>	85
6. ESTUDO DO SECRETOMA DE MEIOS CONDICIONADOS DE COCULTIVOS DE CTM E CÉLULAS DE GBM.....	89
6.1. Proteínas exclusivas de cocultivo celular	97
6.2. Proteínas superexpressas de cocultivo celular.....	97

6.3. <i>Proteínas exclusivas e superexpressas durante o cocultivo celular</i>	97
6.4. <i>Proteínas hipoexpressas de cocultivo celular</i>	98
DISCUSSÃO	99
CONCLUSÕES	111
RESUMO	112
ABSTRACT	114
REFERÊNCIAS	116
ANEXOS	131
BIOGRAFIA	182

INTRODUÇÃO

1. CÂNCER

O câncer tem sido apontado como uma das principais causas de morte por doença no mundo, causando impactos cada vez maiores na sociedade. Estima-se que em 2012 houve cerca de 14,1 milhões de novos casos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes em todo o mundo (Projeto Globocan 2012, da *International Agency for Research on Cancer- IARC* e da WHO). Nos EUA, o câncer foi responsável por cerca de 584 mil mortes no ano de 2012, índice inferior apenas ao encontrado para a doença isquêmica do coração (WHO, 2012; CDC, 2013). No Brasil, dados estatísticos mais recentes de 2014 (WHO, 2014) indicaram que cerca de 74% de todas as mortes ocorridas no país, considerando-se a população com idades entre 30 e 70 anos, foram em consequência a doenças não-transmissíveis. Destas, o câncer aparece como segunda causa mais comum, correspondendo a 17% do total de mortes.

Segundo o *National Cancer Institute* dos EUA (NCI-NIH) o câncer representa um conjunto de doenças relacionadas, caracterizadas pela presença de células tumorais com divisão celular descontrolada e com capacidade de alcançar tecidos adjacentes, desprendendo-se de seu sítio de origem e atingindo locais distantes no organismo, por meio da corrente sanguínea ou do sistema linfático. A frequência dos diversos tipos de câncer pode diferir dependendo do nível de desenvolvimento do país. Em geral, nos países desenvolvidos, os tipos mais comuns são respectivamente o câncer de próstata, de pulmão e de cólon/reto, para homens; e de mama, de cólon/reto e de pulmão para as mulheres (INCA, 2014). Nos EUA, as taxas médias anuais de incidência, ajustadas por idade, do câncer de próstata e do câncer de mama são de 201,40 e 171,20 a cada 100 mil habitantes, respectivamente (OSTROM et al., 2014). Em países em desenvolvimento, os tipos mais frequentes são o câncer de pulmão, de estômago e de fígado para homens; e de mama, de colo do útero e de pulmão para mulheres (INCA, 2014). No Brasil, a estimativa para o ano de 2015 foi de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, sendo a maior incidência para o câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil), seguido pelos

tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon/reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) (INCA, 2014).

Apesar de o câncer de Sistema Nervoso Central (SNC) ser um tipo mais raro de câncer, nos EUA, a sua taxa de incidência (27,86:100 mil) já é comparável às de Linfoma não-Hodgkin (26,50:100 mil), de melanoma (27,00:100 mil) e de câncer de bexiga (29,20:100 mil) (OSTROM et al., 2014). No Brasil, desconsiderando-se o câncer de pele do tipo não melanoma, o câncer do SNC varia de oitavo a décimo segundo lugar em frequência, a depender da região do país e do sexo. Em homens, é o oitavo mais frequente no norte e o décimo na região sudeste; para mulheres, é o oitavo na região centro-oeste e décimo segundo no nordeste (INCA, 2014).

2. CÂNCER DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O câncer do SNC representa 1,9% de todas as neoplasias malignas no mundo, sendo que as maiores taxas de incidência se encontram nos países de origem Européia. As taxas de incidência são maiores em indivíduos acima de 85 anos e menores em crianças entre 0 e 14 anos de idade (OSTROM et al., 2014). No Brasil, estima-se que cerca de 4,96 mil casos novos tenham ocorrido em homens e 4,13 mil em mulheres, que correspondem a um risco estimado de incidência de 5,07: 100 mil para homens e 4,05: 100 mil para mulheres (INCA, 2014). Apesar de relativamente raro, esse tipo de câncer possui alta relevância clínica, uma vez que é responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade.

Dos tipos tumorais que podem surgir no SNC, existem os tumores malignos que crescem a partir de células gliais ou precursoras, denominados de gliomas. Os gliomas são responsáveis por 80% dos tumores primários malignos do SNC e, dependendo do tipo celular de origem, podem ser classificados como astrocitomas, glioblastomas, oligodendrogliomas, ependimomas, tumores mistos neuronais e gliais, além de outras histologias mais raras e não especificadas (ALIFIERIS; TRAFALIS, 2015; LOUIS et al., 2007; OSTROM et al., 2015).

2.1. Características histopatológicas de astrocitomas

Os tumores originados a partir de astrócitos, um tipo de célula glial abundante que promove regulação local, sustentação e nutrição aos neurônios, são os astrocitomas. Os astrocitomas são tumores heterogêneos que podem apresentar infiltração difusa em estruturas adjacentes ou distantes do cérebro (KLEIHUES et al., 2002). A WHO classifica estes tumores em quatro graus dependendo das características histopatológicas: Grau I, astrocitomas pilocíticos, que são tumores benignos e relativamente circunscritos e ocorrem principalmente em crianças; Grau II, astrocitomas de baixo grau, caracterizados por celularidade moderada, atipia nuclear moderada, figuras mitóticas ausentes ou raras e com crescimento tumoral lento; Grau III, comumente referido como glioma anaplásico, mas que compreende astrocitomas anaplásicos, oligoastrocitomas anaplásicos mistos e oligodendrogliomas anaplásicos, que são caracterizados por aumento da celularidade, atipia nuclear e atividade mitótica, além de mais proliferativos e infiltrativos quando comparados aos astrocitomas de grau II; e Grau IV, glioblastoma (GBM), que são histologicamente semelhantes aos astrocitomas anaplásicos, mas são caracterizados pela presença de necrose e proliferação glomerulóide microvascular, significativamente mais proliferativos, invasivos e angiogênicos quando comparados aos outros grupos. O GBM contém tecidos neoplásicos e estromais, que contribuem para seu padrão histológico heterogêneo (AGNIHOTRI et al., 2013; MCLENDON; ADESINA, 2015; STUPP et al., 2014). Na figura 1 estão apresentados cortes histopatológicos apenas dos astrocitomas de alto grau, tais como astrocitoma anaplásico (grau III) e o GBM (grau IV) (MCLENDON; ADESINA, 2015).

Figura 1. Imagens de microscopia de cortes histopatológicos corados com hematoxilina e eosina, 40 X de ampliação. A) Astrocitoma anaplásico; demonstrando alta densidade celular associada com pleomorfismo nuclear significativo e atividade mitótica. B) GBM; demonstrando proliferação vascular endotelial; necrose tumoral; astrócitos fibrilares e proliferação endotelial vascular, respectivamente (Fonte das imagens: McLendon & Adesina, 2015).

Dentre os tipos de gliomas, o GBM é o tipo mais comum e fatal e representa a maioria (55,1%), correspondendo a 46,1% de todos os tumores malignos do SNC em adultos, com taxa de incidência de 3,20 para cada 100 mil indivíduos. A média de idade dos pacientes no momento do diagnóstico é de 64 anos, sendo 1,5 vezes mais comum em homens do que em mulheres e 2 vezes mais comum em brancos em relação aos negros (OSTROM et al., 2014, 2015). Nos últimos 20 anos, a incidência aumentou ligeiramente devido, em sua maioria, à melhoria no diagnóstico radiológico, especialmente em idosos (FISHER et al., 2007).

2.2. Glioblastoma humano

O GBM foi identificado pela primeira vez em 1863 por Rudolf Virchow como um tumor com células de origem glial por meio de técnicas macroscópicas e microscópicas que finalmente deram origem à classificação moderna dos tumores cerebrais (AGNIHOTRI et al., 2013; DAVID, 1988; GLOBUS; STRAUSS, 1925). Geralmente, localiza-se nos hemisférios cerebrais, mas pode ser encontrado em qualquer lugar do encéfalo ou medula espinal.

Os possíveis sintomas clínicos apresentados por pacientes com GBM, dependendo da localização tumoral, são dores de cabeça, déficits neurológicos focais, confusão, perda de memória, alterações de personalidade, de fala, da visão e presença de convulsões. Grande parte desses sintomas decorre do aumento da pressão intracraniana causada pelo rápido crescimento tumoral. O diagnóstico é realizado por exames de imagens como ressonância magnética (RM), que pode ser associada à outras tecnologias como RM funcional, imagem ponderada em difusão, imagens de tensor de difusão, RM contrastada dinâmica, cintilografia de perfusão, espectroscopia de prótons por RM e tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (WEN; KESARI, 2008).

Atualmente, após avaliação clínica e a realização do diagnóstico por imagem, o tratamento padrão é a ressecção cirúrgica máxima com preservação da função neurológica, seguida de radioterapia e quimioterapia concomitante e adjuvante com Temozolamida (TMZ) ou implantação de polímeros de carmustina no local cirúrgico. Análises histopatológicas e moleculares (LOH 1p/19q e metilação do promotor *MGMT*) a partir de fragmentos tumorais são realizadas para confirmação definitiva do diagnóstico (STUPP et al., 2014).

Em termos de tratamento, os tumores de grau III e IV (GBM) são agrupados e tratados de forma semelhante (ALIFIERIS; TRAFALIS, 2015). Após o tratamento clínico atual, a sobrevida média para pacientes com GBM é muito baixa, sendo de apenas 12-15 meses. Uma porcentagem pequena (10%) de pacientes, entretanto, consegue sobreviver por períodos mais longos (STUPP; ROILA, 2009).

2.2.1. Etiologia do Glioblastoma humano

A etiologia de GBM ainda não foi totalmente elucidada. Acredita-se que apesar de ser um tumor espontâneo, exposições à radiação ionizante e a fatores químicos como cloreto de vinila ou pesticidas, fumo, compostos aromáticos policíclicos e solventes possam ser considerados fatores de risco correlacionados ao seu desenvolvimento. Outros fatores adicionais como a exposições a campos eletromagnéticos e certos metais também têm sido

sugeridos na ocorrência de GBM (SPINELLI et al., 2010; WRENSCH et al., 2002).

Cerca de 1% dos casos de GBM é de origem familiar (SCHWARTZBAUM et al., 2006), mas sabe-se que as características genéticas desses tumores são diferentes daqueles de origem esporádica (DANIELS et al., 2007). O GBM pode ocorrer no curso de algumas doenças genéticas como a esclerose tuberosa (PADMALATHA et al., 1980), Síndrome de Turcot (GRIPS et al., 2002), Síndrome de neoplasia endócrina múltipla tipo IIA (SÁNCHEZ-ORTIGA et al., 2009), neurofibromatose tipo I (BROEKMAN et al., 2009), Síndrome de Li-Fraumeni e Síndrome de Von Hippel-Lindau (SARKAR; CHIOCCA, 2012).

2.2.2. Subtipos clínicos de Glioblastoma humano

De acordo com a apresentação clínica, o GBM pode ser classificado como primário (*de novo*) ou secundário (KLEIHUES; OHGAKI, 1999). A forma mais comum, cerca de 95%, é denominada de GBM primário, que se caracteriza por ser um tumor muito agressivo de crescimento rápido e normalmente ocorre em indivíduos com idade igual ou acima de 55 anos (OHGAKI et al., 2004). O GBM secundário ocorre, geralmente, em indivíduos mais jovens (45 anos ou menos) e origina-se a partir de um astrocitoma de grau mais baixo de malignidade que eventualmente se transforma em GBM, dentro de um período aproximado de 10-15 anos (ALIFIERIS; TRAFALIS, 2015; SARKAR; CHIOCCA, 2012). Sabe-se que apesar de não serem distinguíveis morfológicamente, os dois subtipos clínicos apresentam características genéticas específicas. Frequentemente, o GBM primário apresenta amplificação e superexpressão do gene que codifica o receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*), assim como do gene *Mouse Double Minute 2 (MDM2)*, que codifica um inibidor de p53. Outras características são mutações de *Phosphatase and tensin homolog (PTEN)* e deleções homozigotas de *CDKN2A*. Em GBM secundário, observa-se ativação da via relacionada ao receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (*PDGF-A* e *PDGFR- α*), e mutações mais prevalentes de p53, *IDH1*, amplificações de *MET* (ALIFIERIS; TRAFALIS, 2015; KLEIHUES; OHGAKI, 1999).

As características genéticas apresentadas nos tumores têm sido consideradas para a complementação do prognóstico clínico. Por exemplo, a presença de mutações de *IDH1*, em menos de 5% dos GBM primários e em mais do que 80% dos GBM secundários, é capaz de prever a resposta do GBM à terapia com TMZ. Os diferentes desfechos clínicos de pacientes com tumores que apresentaram mutações de *IDH1* demonstram a importância crescente de se buscar novos alvos prognósticos e terapêuticos. Hartmann e colaboradores (2010) mostraram que o estado de mutação de *IDH1* foi o fator prognóstico principal e independente para prever a sobrevida de pacientes com gliomas. Outros fatores importantes foram idade, diagnóstico (astrocitoma anaplásico ou GBM) e metilação do promotor *MGMT*, outro dado utilizado atualmente para prever a resposta terapêutica durante o tratamento com TMZ. Em concordância com esse estudo, uma recente meta-análise indicou correlação de melhores taxas de sobrevida com as mutações de *IDH1* em GBM (CHENG et al., 2013). Estas associações de marcadores com a classificação utilizada pela WHO têm sido utilizadas não só em testes diagnósticos para prever a sobrevida, mas também avaliar a eficiência de novas drogas.

2.2.3. *Classificação molecular de Glioblastoma humano*

Recentemente, uma nova classificação baseada na heterogeneidade molecular do GBM foi proposta a partir de dados gerados pelo *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), um Projeto que pertence ao NIH. Estudos moleculares e de genômica avaliaram diversos tipos de GBM e os classificaram, de acordo com o perfil de expressão genética, em quatro subtipos moleculares distintos denominados em clássico, mesenquimal, pró-neural ou neural (VERHAAK et al., 2010; Figura 2).

Figura 2. Características genéticas e moleculares de GBM. Análise genômica proposta por TCGA de GBM primário e secundário e consequente classificação em quatro grupos moleculares distintos com base em alterações específicas (Figura modificada de Agnihotri e colaboradores, 2013).

O subtipo clássico é caracterizado por presença de amplificação de *EGFR* em 95% dos casos, 93% de amplificações no cromossomo 7 e deleções do cromossomo 10, perda de *PTEN* e padrão de expressão de célula astrocítica, enquanto que anormalidades em *IDH1*, *TP53*, *PDGFRA* ou *NF1* não são comuns. O subtipo mesenquimal é definido por mutações de *NF1* e *PTEN*, padrão de expressão de marcadores de células de Schwann e de micróglias, com menor frequência de amplificação de *EGFR* do que em outros tipos de GBM. Esse subtipo está associado a menores taxas de sobrevida global. O subtipo pró-neural é caracterizado por amplificação de *PDGFRA*, mutações em *TP53* e *IDH1* com um perfil de expressão de oligodendrócito, com apresentação geralmente em indivíduos jovens, sendo comum em GBM secundário. Por fim, o subtipo neural que é caracterizado por perfil de expressão semelhante ao de tecido cerebral normal com a presença de marcadores de células neurais, astrócitos e oligodendrócitos (AGNIHOTRI et al., 2013; VERHAACK et al., 2010).

Esses diversos tipos moleculares de GBM podem levar a diferentes respostas aos tratamentos, como por exemplo a constatação de Verhaak e colaboradores (2010) que relataram que a resposta à quimioterapia e

radioterapia era diferente em pacientes com GBM de subtipos moleculares distintos. O complemento de novas classificações dos diferentes perfis de GBM na clínica e terapêutica podem tornar os tratamentos cada vez mais personalizados direcionando drogas para alvos específicos do câncer (ALIFIERIS; TRAFALIS, 2015).

3. MICROAMBIENTE TUMORAL

Além da heterogeneidade genética encontrada entre as próprias células tumorais, o tumor é composto por outras subpopulações ou tipos celulares. Dentre as células tumorais, há uma pequena subpopulação com características de células-tronco (CT), denominadas CT de câncer que possuem papel na recorrência e resistência do tumor aos tratamentos (SEYMOUR; NOWAK; KAKULAS, 2015). Ainda, há diversos outros tipos celulares que compõem o microambiente tumoral, consideradas células estromais, que podem contribuir na progressão do tumoral e promover metástases. Estes tipos celulares que são recrutados para o microambiente do tumor são células endoteliais, pericitos, fibroblastos, diversas classes de leucócitos, macrófagos, fibroblastos associados ao tumor (CAFs, *cancer-associated fibroblasts*), células-tronco mesenquimais (CTM) e outros componentes do nicho tumoral (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; PIETRAS; OSTMAN, 2010).

Durante a progressão tumoral, o microambiente exerce contínua comunicação parácrina, criando um circuito dinâmico de sinalização para promover a inicialização e o crescimento tumoral (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; PIETRAS; OSTMAN, 2010). O progresso das pesquisas tem demonstrado, cada vez mais, a importância da ação das células estromais na tumorigênese. A figura 3 mostra o microambiente tumoral com os tipos celulares encontrados tanto na composição de tumores sólidos primários como após a colonização metastática (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011), assim como os possíveis papéis funcionais dessas células na tumorigênese e progressão tumoral (HANAHAHAN; COUSSENS, 2012).

Figura 3. Esquema das células estromais do microambiente tumoral e seus possíveis papéis funcionais favorecendo a capacidade dos diversos *hallmarks*. O microambiente permite o crescimento tumoral primário, a invasão e depois o crescimento metastático (Figura modificada de Hanahan & Weinberg, 2011 e Hanahan & Coussens, 2012).

Um dos diversos tipos celulares estromais são os CAFs (HANAHAAN; WEINBERG, 2011), que são fibroblastos originados de tecidos conjuntivos próximos aos tumores e/ou células progenitoras mesenquimais, em particular CTM locais ou derivadas da medula óssea, recrutados e induzidos para diferenciar-se em miofibroblastos (definidos por expressarem actina alfa de músculo liso; α SMA) (PAUNESCU et al., 2011) ou em adipócitos (definidos por expressarem a proteína 4 de ligação a ácido graxo; FABP4) (ROSEN; MACDOUGALD, 2006).

CAFs associados aos tumores podem expressar e secretar proteínas sinalizadoras que incluem fatores de crescimento como fator de crescimento de hepatócitos (HGF), membros da família do fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), fator 1 derivado de células estromais (SDF-1) e uma variedade de fatores de crescimento fibroblástico (FGF) que estimulam a proliferação celular (CIRRI; CHIARUGI, 2011; EREZ et al., 2010; FRANCO et al., 2010; KALLURI; ZEISBERG, 2006; ORIMO et al., 2005; RÄSÄNEN; VAHERI, 2010; ROSEN; MACDOUGALD, 2006; SPAETH et al., 2009). Além disso, os CAFs podem influenciar a transição epitélio-mesenquimal (TEM) por meio da secreção de TGFB (CHAFFER; WEINBERG, 2011), que por sua vez pode afetar outros *hallmarks* do câncer, como ativação de invasão celular e metástases, sustentação da atividade proliferativa e evasão ao sistema imunológico.

A Tabela 1 apresenta os tipos e subtipos celulares encontrados no microambiente tumoral (HANAHAAN; COUSSENS, 2012). Destaca-se, no quadrado vermelho, a presença das CTM que podem dar origem aos CAFs, além de favorecerem o suporte para as CT de câncer e promoverem efeitos positivos na angiogênese e no comportamento invasivo. As funções dos tipos celulares encontrados no nicho tumoral estão escritas em vermelho (pró-tumorigênicas) e em azul (antitumorigênicas).

Tabela 1. Tipos e subtipos celulares encontrados no microambiente tumoral e funções pró e antitumorigênicas (Informações extraídas de Hanahan & Coussens, 2012).

Tipo celular	Subtipo	Funções
Células imunes infiltrativas	Células T CD4-Th2, Treg, Células B	mitogênica, recrutamento e ativação de células mielóides, supressão linfócitos T citotóxicos (CTL) morte de células tumorais: via direta ou indireta através de CTL
	CTL, células Natural Killer (NK) e NKT	morte de células tumorais
	Macrófagos	pró-angiogênico, pró-invasivo,pró-metastático, mitogênico, inibe apoptose, suprime a morte por CLT morte de células de tumorais, apresentação de antígeno
	Monócitos inflamatórios, células supressoras de origem mielóide	pró-angiogênico, pró-invasivo,pró-metastático, supressor de CTL e da atividade citotóxica de células NK e NKT
	Neutrófilos	mutagênico, mitogênico, recrutamento de células imunes infiltrativas (IICs), pró-angiogênico, pró-invasivo, pró-metastático anti-metastático, morte de células tumorais
	Mastócitos	mitogênico, pró-angiogênico, pró-invasivo, recrutamento IICs, supressor de CTL e de atividade citotóxica de células NK e NKT
	Plaquetas	pró-metastático, pró-angiogênico
Células fibrobrásticas associadas ao Câncer (CAFs)	miofibroblastos α SMA+ e CTM	pró-angiogênico, pró-invasivo, suporte de células tronco de câncer
	Fibrobrastos ativados	mitogênico, pró-sobrevivência, pró-angiogênico, recrutamento e ativação de IICs, pró-invasivo, pró-metastático e suporte metabólico ações supressivas de ativação incompleta de fibroblastos
	Adipócitos ativados	recrutamento e ativação de IICs, suporte metabólico, pró-metastático
Células endoteliais	células endoteliais <i>tip</i> , <i>stalk</i> e do tubo	angiogênese para suporte de oxigênio de nutrientes do sangue, produção parácrina de fatores tróficos, recrutamento de IICs, modulação da origem e disseminação de células tumorais, limita a inflamação de CTL e NK e NKT
Pericitos	Pericitos (imaturos e maduros)	modulação de angiogenese e tráfego celular e suportam a funcionalidade celular

Devido as CTM apresentarem características de multipotência, com capacidade de diferenciação em diversos tipos de células de origem mesodérmica, como osteoblastos, condrócitos, adipócitos, miócitos e fibroblastos, entre outros (BERGFELD; DECLERCK, 2010; DENNIS; CHARBORD, 2002; VALTIERI; SORRENTINO, 2008) e exibirem propriedades imunomodulatórias e secretoras, elas podem afetar o desenvolvimento do câncer de diversas formas. Uma vez presentes, as CTM também poderiam favorecer o desenvolvimento de tumores por alterar a sobrevivência de células tumorais, promovendo efeito antiapoptótico; contribuir com a vascularização local, por meio da produção de fatores angiogênicos; promover motilidade e potencial metastático das células tumorais, por meio da produção de quimiocinas como CCL5; e facilitar o escape de células tumorais da vigilância do sistema

imunológico devido as suas propriedades imunomodulatórias, inibindo a atividade de linfócitos Th1, células dendríticas, células B e células *natural killer* (BERGFELD; DECLERCK, 2010). Adicionalmente, são consideradas interações por meio de exossomos e microvesículas liberadas pelas CTM para o espaço extracelular.

Os exossomos são pequenas vesículas extracelulares biologicamente ativas, liberadas pelas células, que podem carrear microRNA, mRNA, fatores proteicos e lipídeos e se fundir às membranas de outras células. Pesquisas têm demonstrado implicações dos exossomos derivados de células estromais e tumorais no aparecimento do câncer, na progressão tumoral e nos processos de metástases, pois após liberação do conteúdo no espaço intracelular (Mahmoudi et al., 2015; Milane et al., 2015) das células tumorais, ocorre a modulação de vias de sinalização que pode alterar respostas comportamentais. Além disso, evidências sugerem que os exossomos derivados dos próprios tumores podem agir em alguns *hallmarks* do câncer, como promover sinalização proliferativa, resistência à morte celular, induzir angiogênese e ativar invasão e metástases. Ainda, estudos relatam a importante ação dos exossomos na inibição do sistema imunológico e promoção da inflamação como escape das células tumorais à destruição imune (MEEHAN; VELLA, 2015).

4. TROPISMO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AOS SÍTIOS TUMORAIS

O tropismo migratório das CTM é um fenômeno bem documentado e caracteriza-se pela migração e fixação das CTM em locais com inflamação, lesões teciduais e neoplasias (DWYER et al., 2010; HALL; ANDREEFF; MARINI, 2007). Acredita-se que seu recrutamento para o sítio tumoral seja mediado por fatores de crescimento e citocinas secretados pelas células tumorais e que, quando as CTM chegam ao microambiente, essas secretam diversos fatores que suportam o crescimento tumoral. Enfim, as CTM e células tumorais interagem entre si e são estimuladas mutuamente umas pelas outras (SPAETH et al., 2009).

Devido propriedades secretoras, imunomoduladoras e migratórias, o comportamento de CTM tem sido explorado em diversos cenários com o objetivo

de avaliar suas funções como ferramenta em medicina regenerativa, para entrega de drogas terapêuticas ou até mesmo como promessa de terapias celulares. Alguns autores sugerem que as CTM poderiam alcançar tumores ou partes inacessíveis cirurgicamente, distribuir-se de forma eficiente no sítio tumoral e entregar substâncias antitumorais (HONG et al., 2009). Por outro lado, sabe-se atualmente que essas células podem alterar o desenvolvimento e a progressão tumoral e, por apresentarem efeitos ainda controversos na literatura, estudos ainda devem ser conduzidos a fim de esclarecer esse mecanismo.

Pesquisas com interesse em estudar o papel das CTM na progressão do câncer são crescentes, assim sendo, seu tropismo a tumores e sua presença na composição estromal foram demonstrados em vários tipos tumorais tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*. Ishii e colaboradores (2003) investigaram a origem de células estromais encontradas em câncer pancreático humano em modelos animais (subcutâneo) e detectaram a presença de células endoteliais e de miofibroblastos, ambos derivados da medula óssea (MO). Os miofibroblastos foram encontrados em maior quantidade e muito proliferativos, demonstrando sua importância na composição estromal para o desenvolvimento tumoral. Resultado semelhante foi encontrado por Direkze e colaboradores (2004) que, da mesma forma, demonstraram a contribuição das células da MO na formação do estroma tumoral, sendo responsáveis pela origem de fibroblastos e miofibroblastos em um modelo de tumor endócrino pancreático.

A atração das CTM humanas derivadas de MO (CTM-MO) foi estudada em modelo animal de câncer de cólon humano após administração intravenosa. Na quarta semana da inoculação, imagens de PET (*positron emission tomography*) indicaram a presença de CTM em tumores microscópicos e os resultados mostraram que elas se proliferam e se diferenciam, por exemplo em células endoteliais, para a formação de uma parte do estroma (HUNG et al., 2005). Nessa linha, outro grupo de pesquisadores comprovou, por meio de imagens bioluminescentes de CTM-MO expressando luciferase, o direcionamento e a incorporação dessas células em modelos de câncer de mama e tumor ovariano. Neste estudo, a via de inoculação intravenosa ou intraperitoneal não influenciou na chegada as CTM aos sítios tumorais (KIDD et al., 2009).

Já em gliomas, o tropismo seletivo foi demonstrado primeiramente em modelos de ratos (9L), após administração intracraniana de CTM (NAKAMURA et al., 2004). Essa atração das CTM em direção aos gliomas é tão específica que mesmo quando administradas sistemicamente, ou na região intracranial contralateral, elas são capazes de alcançar o tumor e permanecer na região por semanas em modelos animais ortotópicos (MENON et al., 2012; NAKAMIZO et al., 2005; WU et al., 2008). Chien e colaboradores (2011) mostraram que esse mecanismo migratório está envolvido com a ativação da via *SDF-1/CXCR4*. Essa via tem sido correlacionada com a progressão neoplásica e metástase, uma vez que a quimiocina SDF-1 está envolvida na sobrevivência de carcinomas, proliferação e metástase, além de ser liberada por CTM; e CXCR4 é seu principal receptor, presente em diversos tumores (MA et al., 2011).

De fato, as CTM migram em resposta aos estímulos celulares. O tropismo de CTM em direção às CT de gliomas foi observado apenas quando as CT de câncer estavam em estado proliferativo. Na presença de inativação de ciclo celular e/ou de diferenciação das CT de gliomas em células nervosas terminais, a migração das CTM foi afetada (LIU et al., 2014). Apesar de ter sido comprovado o tropismo de CTM de diversas origens aos variados tipos de câncer, seus efeitos na tumorigênese ainda são muito controversos.

4.1. Efeitos de células-tronco mesenquimais em diversos tipos de câncer

O comportamento migratório das CTM para sítios tumorais é uma das características que as distinguem dos fibroblastos e de outras células de origem mesenquimal. Antes de explorar o mecanismo migratório em terapias celulares, os efeitos e a caracterização das citocinas ou fatores solúveis envolvidos na regulação parácrina são de extrema importância (MOTALN; TURNSEK, 2015). Apesar de, até o momento, não haver evidências de formação de tumores em pacientes tratados com CTM em uma variedade de indicações, a possibilidade das CTM promoverem crescimento tumoral e metástase é motivo de preocupação sobre a segurança de seu uso como ferramenta na medicina regenerativa ou como veículos de entrega de medicamentos (KLOPP et al., 2011). Os efeitos das CTM no desenvolvimento tumoral variam

substancialmente dependendo da origem celular e do modelo animal utilizado, além de poderem ocorrer de maneira isolada ou conjunta, dependendo do tipo de câncer e fase da doença.

Parte dos estudos relatam ações pró-tumorigênicas de CTM em melanomas, células tumorais derivadas de CTM de MO, câncer de cólon, pulmão, mama e próstata. Primeiramente em melanoma, Djouad e colaboradores (2003) mostraram o favorecimento das CTM murinas na incidência tumoral em modelos animais independentemente da via de administração (subcutânea ou intravenosa). O efeito positivo das CTM em melanoma também foi demonstrado, mais tarde, em outro estudo (KUCEROVA et al., 2010), no qual ensaios *in vivo* mostraram que as CTM derivadas de tecido adiposo (CTM-TA) diminuem a latência do tumor e suportam o crescimento tumoral subcutâneo até quando administradas pequenas doses de células tumorais. Inclusive, os fatores solúveis liberados pelas CTM foram suficientes para aumentar a incidência de tumores quando as células de melanoma foram administradas nos camundongos juntamente com o meio condicionado (MC) derivado de CTM. *In vitro*, as CTM exerceram efeitos positivos na proliferação celular, suprimiram a apoptose e modularam respostas celulares na presença de drogas citotóxicas. A avaliação das citocinas derivadas de MC dos cocultivos celulares chamou a atenção para os efeitos parácrinos das CTM, devido aumento de fatores pró-angiogênicos como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e outros fatores correlacionados com inflamação, como fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF).

Nesse contexto, Zhu e colaboradores (2006) encontraram que CTM-MO fetais e adultas favorecerem o crescimento *in vivo* subcutâneo de células CTM de MO transformadas e de câncer de cólon (F6 ou SW480). Os tumores derivados da associação das células tumorais com as CTM-MO apresentaram características histopatológicas mais agressivas, como aumento na quantidade de vasos, necrose e alto nível de invasão para tecidos adjacentes. Esses resultados foram confirmados por técnicas de imuno-histoquímica, mostrando o caráter mais agressivo com a expressão positiva para o marcador de proliferação PCNA e de angiogênese F-VIII e negativa para nm23, um supressor metastático tumoral.

Efeitos pró-tumorigênicos foram encontrados em estudo com carcinoma de pulmão, no qual foram observadas maiores taxas de crescimento tumoral, viabilidade celular e menor apoptose das células tumorais quando associados às CTM-TA. Condições de cocultivo celular direto, ou adição de MC derivado de CTM-TA, foram capazes de estimular a proliferação celular tumoral após 48 horas (h) de tratamento (YU et al., 2008). Esse efeito parácrino de CTM também foi encontrado utilizando-se MC derivados de CTM-MO em câncer de mama e próstata. Adicionalmente, ensaios *in vivo* demonstraram que os grupos em que foram administradas células tumorais juntamente com as CTM-MO apresentaram aumento de volume tumoral acompanhado de maior quantificação da área de vasos sanguíneos (ZHANG et al., 2013).

Por outro lado, em células tumorais derivadas de hepatoma, câncer de pulmão e mama, as CTM proporcionaram efeitos antitumorigênicos. Em modelos animais de hepatoma, a presença de CTM derivadas de derme humana aumentou o período de latência e produziu diminuição no tamanho tumoral. Assim como os cocultivos celulares inibiram a proliferação e aumentaram a apoptose celular, o tratamento com o MC proporcionou menor eficiência na formação de colônias e diminuição na proliferação celular. Esses resultados foram associados à diminuição da regulação via *WNT*, representada por diminuição da expressão de β -catenin, Bcl-2, c-Myc, PCNA e survivina nas células tumorais (QIAO et al., 2008b). Outro estudo do mesmo grupo encontrou resultados inibitórios semelhantes associados a supressão da via *WNT* em linhagem celular de câncer de mama (MCF-7) tratadas com MC derivado de CTM (QIAO et al., 2008a).

Recentemente, a presença das CTM-MO foi correlacionada com efeitos antitumorigênicos em modelos de neoplasias de pulmão (subcutâneo ou de câncer no pulmão). Independentemente do modelo ou da via de administração (local ou sistêmica) as CTM foram associadas com a diminuição de crescimento tumoral devido a inibição de proliferação celular. Curiosamente, houve indução na formação de vasos, mas esse aumento não se traduziu em diferença na quantidade de hemoglobina entregue às células tumorais. Apesar dos vasos sanguíneos apresentarem-se mais longos no grupo associado às CTM, houve redução no número (KÉRAMIDAS et al., 2013).

4.2. Efeitos de células-tronco mesenquimais em gliomas

Na literatura, resultados controversos sobre os efeitos das CTM são encontrados mesmo em estudos realizados com mesmo tipo tumoral. Em gliomas, não é diferente. O cultivo de células de gliomas (9L) com contato celular com CTM-MO de ratos inibiu a proliferação celular (NAKAMURA et al., 2004). Resultados semelhantes foram encontrados por Kucerova e colaboradores (2010), que observaram diminuição na proliferação celular de GBM (8MGBA), especialmente quando as CTM-TA foram administradas em maiores proporções em relação as células de GBM. Os efeitos inibitórios foram confirmados *in vivo* pela diminuição na incidência tumoral (KUCEROVA et al., 2010) e no volume tumoral no grupo tratado com as CTM (CHIEN et al., 2011).

Além da proliferação celular, as CTM podem inibir a migração celular de gliomas (DASARI et al., 2010; VELPULA; DASARI; RAO, 2012). A presença de CTM derivadas de cordão umbilical humano (CTM-Cuh) causou efeitos citotóxicos em células de gliomas representados por inibição de proliferação e aumento de apoptose celular. A apoptose induzida por CTM-Cuh foi mediada pela inibição de *XIAP* (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) e ativação de *Smac/DIABLO*, uma proteína mitocondrial que potencializa algumas formas de apoptose. Já a inibição da migração celular esteve envolvida tanto com a regulação positiva de *PTEN*, um supressor tumoral envolvido em diversos tipos de câncer incluindo GBM, como hipoexpressão de genes da via de sinalização *Akt* e *PI3K*, importantes para o ciclo celular.

Esses resultados inibitórios vão ao encontro dos obtidos por Ho e colaboradores (2013), onde células de gliomas tratadas com CTM-MO apresentaram morte celular *in vitro* demonstrada não só pela redução da proliferação celular, mas também da angiogênese das células progenitores endoteliais na presença de MC. O mesmo ocorreu *in vivo*, com diminuição do volume tumoral e da densidade vascular. Neste estudo, essa ação antitumorigênica em gliomas foi correlacionada a diminuição da regulação da via *PDGF/PDGFR*, conhecida por ter seu papel na angiogênese e malignidade de gliomas.

Apesar de a maioria dos efeitos de CTM observados em gliomas demonstrarem influências antitumorigênicas, alguns estudos relatam efeitos

contrários. Existem evidências de que diferentes fontes de CTM podem proporcionar propriedades distintas e influenciar no tipo de sinalização de citocinas durante a interação celular entre GBM e CTM. Esse fato pôde ser destacado com o estudo de Akimoto e colaboradores (2013) que detectou que enquanto CTM-Cuh inibiram o crescimento celular e causaram apoptose em gliomas, as CTM-TA promoveram o crescimento celular. O mecanismo pelo qual as CTM-Cuh promoveram apoptose foi através da via TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), via mais expressa em CTM-Cuh do que em CTM-TA. No grupo das CTM-TA, os tumores cotransplantados apresentaram grande vascularização e maiores níveis de expressão de fatores angiogênicos (VEGF, angiopoietina 1, PDGF e IGF) e SDF-1/CXCL12 foram encontrados. Sabe-se que a via CXCL12 inibe a ativação da via TRAIL em GBM, sugerindo que as CTM-TA promoveram o desenvolvimento de GBM por induzir a angiogênese e inibir a apoptose. A ação pró-tumorigênica de CTM-TA também já havia sido relatada anteriormente, proporcionando maiores taxas de crescimento/viabilidade celular e menor apoptose das células tumorais de GBM (U87MG) quando em cocultivo celular direto, ou adição de MC derivado de CTM-TA (YU et al., 2008).

Adição de MC derivados dos cocultivos de linhagem de GBM U251MG com CTM fetais coletados nos dias iniciais (3-9 dias) também foram capazes de causar efeito positivo na proliferação celular em gliomas. Entretanto, efeito inverso foi observado quando utilizado MC obtidos em dias diferentes (15-21 dias), exercendo efeito inibitório na proliferação até a parada da divisão celular dos gliomas (CHISTIAKOVA; POLIANSKAIA, 2014). A diminuição no índice mitótico já havia sido observada em células U87MG, em um estudo anterior (MOTALN et al., 2012), após cocultivo celular com CTM-MO. Como esse resultado foi observado juntamente com alterações morfológicas, sugeriu-se indução de senescência pelas CTM. Ainda, essa interação celular também foi capaz de interferir no comportamento das CTM-MO, que apresentou maior proliferação e invasão na presença de células de GBM (MOTALN et al., 2012). Comportamento similar foi demonstrado por Velpula e colaboradores (2012) no qual esferas formadas por CTM-Cuh adquiriram comportamento invasivo na presença das esferas de gliomas, destruindo-as.

Diferentemente de utilizar CTM de diferentes origens como ferramenta, alguns estudos mais recentes têm dado atenção às células com características de CTM que já estão presentes no próprio estroma tumoral, que são consideradas CTM que foram atraídas para o cérebro e para o microambiente tumoral (CTM-T). Kong e colaboradores (2013) estudaram as CTM-T derivadas do próprio glioma no comportamento de CT de câncer e verificaram que sua presença aumenta cerca de três vezes a proliferação celular de gliomas quando comparado ao controle cultivado sozinho. No modelo animal, as CT de câncer que haviam sido previamente cocultivadas com as CTM-T apresentaram aumento significativo do volume tumoral e menores taxas de sobrevivência animal. Esse resultado pode ter ocorrido devido a maior expressão significativa de CD31, um marcador de formação de microvasos, encontrado nesses tumores, sugerindo a contribuição das CTM para o estado mais agressivo tumoral devido ao aumento da angiogênese.

Posteriormente em outro estudo, as CTM-T foram definidas com os mesmos marcadores de CTM (Lin-Sca-1+CD9+CD44+CD166+/-) e com capacidade multipotente de diferenciação, e sua presença correlacionada com proliferação celular e progressão tumoral em gliomas (BEHNAN et al., 2014). Curiosamente, as CTM-T demonstraram potencial tumorigênico quando inoculadas em modelos animais, diferentemente dos outros estudos que utilizam CTM. Esse resultado chama atenção para algumas considerações realizadas anteriormente por Klopp e colaboradores (2011), que mencionam que a discrepância dos resultados obtidos na literatura pode envolver diversas condições, por exemplo, a possibilidade das CTM utilizadas estarem contaminadas com uma proporção de células tumorais.

Outras causas para resultados controversos podem ocorrer devido à falta de caracterização de CTM com a utilização de marcadores específicos e ensaios de multipotencialidade, variação na quantidade de CTM e na proporção em relação as células tumorais utilizadas, na confluência e passagem das células utilizadas, no período do desenvolvimento tumoral em que a CTM foi inserida, a presença ou não do contato celular, a variabilidade entre doadores (idade, fonte, características genéticas e epigenéticas, exposição a diferentes fatores ambientais de risco) e o fato das células sofrerem interferência de meios de

cultivo *in vitro* como suplementos de SFB ou fatores de crescimento que podem alterar o fenótipo celular (KLOPP et al., 2011).

Sabe-se que os fatores solúveis liberados por GBM são responsáveis pela atração eficiente das CTM para os sítios de lesão e que os fatores liberados por CTM podem alterar direta e/ou indiretamente o desenvolvimento de tumores. Embora pouco compreendido, o tropismo de CTM a tumores pode ser um mecanismo importante para o estabelecimento do nicho tumoral. Além da geração de células que compõem o estroma tumoral, as CTM produzem citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento com amplo espectro de ação pró-oncogênica. Uma citocina importante produzida por CTM é o TGFB1, um peptídeo multifuncional com atividade anti-inflamatória e trófica.

5. VIA DE SINALIZAÇÃO *TGFB* NO CÂNCER

A superfamília de TGFB é formada por mais de 30 fatores que podem ser separados em dois grupos. Fatores como activinas, nodal, lefty, miostatina e TGFB pertencem a um grupo da família, enquanto BMPs (*bone morphogenetic proteins*), hormônio antiumuelleriano e diversos fatores de crescimento e de diferenciação compartilham outro grupo (DERYNCK; AKHURST, 2007; MASSAGUÉ, 2008; ROBERTS; WAKEFIELD, 2003; SHI; MASSAGUÉ, 2003). Três isoformas de TGFB (TGFB1, TGFB2 e TGFB3) foram identificadas, sendo que cada uma é codificada por genes diferentes (MASSAGUÉ, 1998, 2008) e compartilham cerca de 70% de homologia em suas sequências. A isoforma mais estudada é a TGFB1, seus receptores são expressos em todos os tecidos e a via de sinalização está envolvida em diversas doenças.

O TGFB, fator de crescimento transformador beta, é uma citocina regulatória envolvida na regulação de tecidos epiteliais e neurais, sistema imunológico e reparação tecidual. Embora o TGFB mantenha a homeostase tecidual prevenindo o aparecimento de tumores por meio da regulação da proliferação, diferenciação, sobrevivência e adesão, as neoplasias possuem a capacidade de alterar essa influência supressora do TGFB. Assim, vias de sinalização de TGFB patológicas promovem crescimento tumoral, indução de

TEM, invasão, evasão a vigilância do sistema imunológico, disseminação de células cancerosas e metástases (LEBRUN, 2012; MASSAGUÉ, 2008).

5.1. Via de sinalização canônica de TGFB/SMAD

A proteína TGFB passa por alguns processos intracelulares antes de sua secreção celular. Uma das modificações intracelulares mais importantes é a clivagem da pró-região C-terminal (peptídeo associado à latência - LAP) da porção N-terminal da proteína (TGFB maduro ou ativo) (KHALIL, 1999). Cada subunidade de TGFB é sintetizada como uma molécula precursora inativa ligada às proteínas acessórias (LAP e LTBP) que podem ser armazenadas na matriz extracelular (MEC) e rapidamente ser clivada e ativada por vários mecanismos proteolíticos para se tornar biodisponível. Como os receptores de TGFB são expressos de forma ubíqua, sugere-se que a regulação de sua atividade seja complexa e multifatorial (KHALIL, 1999; LEBRUN, 2012).

Na via de sinalização canônica de TGFB1, a transdução do sinal é iniciada com a ligação do ligante a um complexo específico de receptores serina / treonina-cinase (tipo I e tipo II). O receptor de tipo II é constitutivamente autofosforilado e, após a ligação do ligante, transfosforila a região justamembranar do receptor de tipo I. A ativação do receptor tipo I é o principal componente do complexo de receptores de TGFB pois controla diversas vias de sinalização *downstream*, incluindo via canônica dependente de Smad e os mecanismo de sinalizações independentes de Smad (MOUSTAKAS; HELDIN, 2005; SHI; MASSAGUÉ, 2003). Em seguida, o receptor I ativado recruta e fosforila os fatores de transcrição Smads 2 e 3 (do grupo do TGFB) ou Smads 1, 5 e 8 (do grupo BMP), formando as R-Smads, que se desligam do receptor e associam-se com a Smad4 no citoplasma. O complexo de Smad é então translocado para o núcleo onde interage com vários fatores de transcrição, coativadores, ou correpressores para regular a expressão do gene alvo (SHI; MASSAGUÉ, 2003). A via de sinalização canônica e não canônica de TGFB estão demonstradas na Figura 4.

5.2. Via de sinalização não-canônica de TGFB

Existem outras vias de ativação de TGFB independentes de Smad, conhecidas por via de sinalização não-canônica. Estas ativações podem ocorrer por meio de ligantes de TGFB que ativem JNK/p38 (*Jun N-terminal kinase*-JNK) e ajam de forma sinérgica com a sinalização por Smads para estimular a apoptose e a TEM (LEBRUN, 2012); ou da via de MAPK (*mitogen activated protein kinase*) para induzir a TEM (DAVIES et al., 2005; LEE et al., 2007; YAN; WINAWER; FRIEDMAN, 1994). Também são conhecidas ativações da via de RhoGTPases, levando a reorganização do citoesqueleto, a motilidade celular e invasão, através da ativação da RhoA, Cdc42 e Rac (BHOWMICK et al., 2001; EDLUND et al., 2002) e da via de sinalização PI3-K/Akt/mTOR (*phosphoinositide 3-kinase/protein kinase*) com consequente regulação da inibição do crescimento celular (Chen et al, 1998) e indução de TEM (LAMOUILLE; DERYNCK, 2007; PERON et al., 2001). As vias de sinalização não-canônicas de TGFB têm sido investigadas em cultura de células, mas sua relevância para o câncer humano permanece desconhecida (MASSAGUÉ, 2008).

Figura 4. Via de sinalização canônica de TGFβ/Smad e não-canônica de TGFβ/PI3K/Akt; RhoGTPases; p38/JNK e MAPK e suas correlações com TEM, migração, invasão, proliferação celular e apoptose (Figura modificada de Lebrun, 2012).

5.3. Desregulação da via TGFβ no câncer

Embora alguns relatos tenham mostrado que o TGFβ age como inibidor no crescimento de células tumorais, esses resultados foram obtidos durante a fase inicial de desenvolvimento de neoplasias. Com a progressão tumoral, mudanças no microambiente tumoral ocorrem, tornando o TGFβ um promotor do crescimento tumoral, invasão, metástase e angiogênese (SUN et al., 2014). Ainda, na tentativa de evitar os efeitos supressores tumorais da via de TGFβ, algumas células de câncer podem acumular mutações tendo como resposta a inativação para os receptores de TGF e proteínas Smads. Crescentes evidências indicam que a via de sinalização relacionada ao grupo BMP está envolvida nessa desregulação (FENG; DERYNCK, 2005; MASSAGUÉ, 2008; SHI; MASSAGUÉ, 2003; TAYLOR; WRANA, 2008).

A citocina TGFB1 apresenta-se frequentemente expressa em tumores malignos do SNC (GOLD, 1999; KJELLMAN et al., 2000; PIEK et al., 1999), onde está associada ao crescimento celular, migração, invasão, angiogênese e inibição da resposta imunológica (JENNINGS; PIETENPOL, 1998; PLATTEN; WICK; WELLER, 2001). Em gliomas, o aumento da expressão de *TGFB* correlaciona-se com o grau de malignidade. A contribuição de TGFB para a patogênese tumoral pode estar relacionada ao suporte do crescimento do tumor, autorrenovação de CT de gliomas e inibição da imunidade antitumoral. É conhecido que o TGFB estimula a expressão VEGF assim como *plasminogen activator inhibitor* (PAI) e algumas metaloproteinases de matriz (MMPs) envolvidas no remodelamento vascular, angiogênese e degradação da matriz extracelular (KAMINSKA; KOCYK; KIJEWSKA, 2013).

6. TGFB E PROPRIEDADES TUMORIGÊNICAS DE GBM

No GBM, o fenótipo mesenquimal é uma marca de agressividade do tumor, mas os mecanismos regulatórios responsáveis por esse fenótipo ainda são pouco conhecidos (CARRO et al., 2010). Tal fenótipo pode estar associado a mecanismos semelhantes à TEM, processo em que há alterações moleculares e celulares em que as células perdem suas características epiteliais, como adesão célula-célula, polaridade basal planar e apical e falta de motilidade, passando a adquirir características tipicamente mesenquimais como motilidade, capacidade de invasão e alta resistência a apoptose. Dessa forma, no câncer, a TEM é associada a invasão tumoral, disseminação metastática e aquisição de resistência a terapias (MICALIZZI; FARABAUGH; FORD, 2010; POLYAK; WEINBERG, 2009). O fenótipo mesenquimal, portanto, poderia explicar a agressividade e o prognóstico clínico desfavorável associado ao GBM.

Estudos de uma variedade de tipos de câncer demonstraram que inibidores de TGFB, ou de seus receptores, podem reduzir as metástases e/ou as propriedades de invasão tumoral (DUMONT; ARTEAGA, 2003; GE et al., 2004; SUBRAMANIAN et al., 2004; YINGLING; BLANCHARD; SAWYER, 2004). Esses resultados são provavelmente devidos a inativação das vias envolvidas na TEM, o que suporta o relevante envolvimento do TGFB nas TEM oncogênicas associadas com a progressão do câncer (DERYNCK; AKHURST; BALMAIN,

2001; DUMONT; ARTEAGA, 2003; GOTZMANN et al., 2004; ROBERTS; WAKEFIELD, 2003).

Apesar de ter sido demonstrada a correlação de TGFB1 com a progressão tumoral na literatura, o papel do TGFB1 na tumorigênese de gliomas ainda é um tanto controverso. Em dois estudos independentes, o TGFB promoveu efeitos antitumorigênicos em gliomas. Assim como Ashley e colaboradores (1998), que mostraram a correlação do aumento da secreção de TGFB e a redução do crescimento do tumor *in vivo*, Pan e colaboradores (2006) também encontraram inibição do crescimento de células de U87MG, tanto *in vitro* como *in vivo*, na presença de TGFB1. Contrastando com esses resultados, outros estudos sugerem o papel pró-tumorigênico em gliomas. Wesolowska e colaboradores (2008) demonstraram que o silenciamento do gene que codifica o receptor tipo II de TGFB1 aboliu a migração e a invasão de GBM *in vitro*, além de diminuir para 50% a tumorigenicidade em modelos animais. Nessa mesma linha, outros estudos (ANIDO et al., 2010; IKUSHIMA et al., 2009) demonstraram que a inibição do TGFB1 autócrino em células de gliomas diminuiu significativamente a tumorigenicidade destas células. Embora encontrem-se resultados opostos da ação do TGFB1 em gliomas na literatura, sua influência na tumorigênese tem sido comprovada.

Além da importância do TGFB1 autócrino, ou seja, liberado pelas próprias células tumorais, Sliwa e colaboradores (2007) demonstraram que o TGFB1 liberado pelas micróglias, fonte primária de TGFB1 no cérebro em condições patológicas (LINDHOLM et al., 1992), aumentou significativamente a proliferação e a invasão celular em gliomas.

Curiosamente, a citocina TGFB1 também é expressa por CTM derivadas de diferentes fontes biológicas como MO, TA e sangue de Cuh (YOO et al., 2009). Assim, é pertinente a hipótese da contribuição de CTM ao desenvolvimento de tumores, incluindo-se possíveis efeitos parácrinos no nicho tumoral, envolvendo, por exemplo, a secreção de citocinas como TGFB1.

6.1. Ação pró-tumorigênica de CTM em câncer cerebral?

O envolvimento de CTM no câncer é um tema recente de pesquisa que tem demonstrado grande potencial na geração de conhecimento sobre a fisiopatologia de diferentes tipos de câncer. As CTM podem contribuir direta e/ou indiretamente para o desenvolvimento de tumores e o esclarecimento dos mecanismos envolvidos pode trazer novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias alvo-dirigidas. CTM de diferentes fontes biológicas podem ser recrutadas ao sítio tumoral. No cérebro, o nicho perivascular é uma importante fonte de CTM (APPAIX et al., 2014). Embora pouco compreendido, esse tropismo de CTM a tumores pode ser um mecanismo importante para o estabelecimento de nichos tumorais e metastáticos. Quando presentes no estroma tumoral, as CTM podem originar outras células estromais além de produzir diversos fatores como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento com amplo espectro de ação pró-oncogênica. Um exemplo de citocina importante produzida por CTM é o TGFB1, um peptídeo multifuncional com atividade anti-inflamatória, trófica e sabidamente conhecido por induzir a TEM, mecanismo envolvido no processo metastático em vários tipos tumorais. No SNC, o TGFB1 favorece o desenvolvimento de GBM, principal tumor primário maligno em frequência e letalidade, atualmente sem tratamento efetivo. Considerando-se as recentes evidências de células com fenótipo de CTM em amostras de GBM humano, levanta-se a questão da relevância dessas CTM ao desenvolvimento de GBM. Apesar da controvérsia acerca dessa questão, há indícios na literatura que fundamentam a hipótese de uma possível ação pró-tumorigênica de CTM. Nesse contexto, o presente trabalho propôs investigar a interação entre CTM e células de GBM, com o intuito de avançar o conhecimento sobre os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de tumores malignos do SNC associados a prognóstico clínico altamente desfavorável.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral verificar a possível contribuição de células-tronco mesenquimais em relação às propriedades tumorigênicas de células de glioblastoma humano.

Os objetivos específicos foram:

- I. Verificar o efeito do TGFB1 secretado por células-tronco mesenquimais sobre propriedades tumorigênicas de células de glioblastoma humano *in vitro*;
- II. Avaliar o efeito da interação entre células-tronco mesenquimais e células de glioblastoma humano sobre propriedades pró-tumorigênicas;
- III. Analisar o secretoma de meios condicionados de culturas de células-tronco mesenquimais e células de glioblastoma humano e identificar proteínas diferencialmente expressas em decorrência da interação entre esses dois tipos celulares.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. CULTIVO CELULAR

A fim de verificar o efeito do TGFB1 secretado por CTM sobre propriedades tumorigênicas de células de GBM humano *in vitro*, foram selecionadas CTM que mais expressassem TGFB1 a partir de culturas celulares obtidas de pacientes, previamente caracterizadas como CTM, e disponíveis no biorrepositório do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano. As CTM avaliadas originaram-se de diversas fontes biológicas como medula óssea (M10), cordão umbilical (UCmsc3, UCmsc4 e UCmsc5) e tecido adiposo (PLAJ3, PLAX1 e ABDOJ1).

Considerando-se que a influência das CTM seria também avaliada por meio de cocultivo direto (com contato celular) com as células de GBM, e que haveria a necessidade de identificação dos tipos celulares, optou-se por utilizar células de GBM humano da linhagem celular comercial de U87MG com expressão estável de uma proteína fluorescente vermelha - TagFP635 (U87FP635) que fluorescem sob excitação a 588 nm (emissão em 635 nm) e foram gentilmente cedidas pelo Pesquisador Dr. Tiago Góss dos Santos e pela Coordenadora Dra. Vilma Regina Martins, ambos do grupo de Biologia Celular e Molecular do Hospital A.C. Camargo. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Biociências da USP (CAAE: 46293315.0.0000.5464).

Inicialmente, as células U87FP635 foram avaliadas por meio de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo a fim de confirmar a expressão de fluorescência vermelha das células. Tanto na microscopia (Figura 5-A.), quanto na citometria de fluxo (Figura 5-B), a maioria das células tumorais apresentaram a fluorescência. Para citometria de fluxo, a linhagem celular U87MG foi considerada como controle para células sem fluorescência.

Figura 5. Confirmação de fluorescência vermelha em células U87FP635. A) Fotomicrografias das células U87FP635 sob luz branca e fluorescente, respectivamente. À extrema direita, observam-se ambas as imagens sobrepostas. B) Análise por citometria de fluxo de células U87MG sem fluorescência e células U87FP635 vermelhas.

As CTM e a linhagem celular U87FP635 foram cultivadas em meio DMEM “Low Glucose” (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) e 1% de solução de 100μg/mL Penicilina/100 μg/mL Estreptomicina (Gibco). As células foram mantidas a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada três dias. Ao atingirem uma confluência de 80% as células eram lavadas com solução salina tamponada (PBS) (Gibco) e as culturas

eram tratadas com 0,05% tripsina e 5 mM EDTA (Gibco) por 2-5 minutos a 37° C, para semeá-las em novos frascos de cultura.

2. QUANTIFICAÇÃO DE TGFB1 EM CTM

2.1. Quantificação dos níveis de transcritos de TGFB1 por qRT-PCR

2.1.1. Extração de RNA

Ao atingirem uma confluência de 80%, as células foram lavadas com PBS e submetidas à extração de RNA total utilizando *RNeasy® Mini Kit* (50) (Qiagen Inc., Cat.No.74104). Os procedimentos foram realizados de acordo com recomendações do fabricante, sob condições estéreis, em ambiente controlado, a fim de se evitar contaminação por RNases. O processo DNase I do kit *RNase-Free DNase Set* (Qiagen) foi adicionado, conforme indicações do fabricante, para a eliminação de DNA genômico.

Ao final da extração, o RNA foi solubilizado em 50 µL de água livre de RNases. A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria a 260 nm (NanoDrop®, Qiagen) com auxílio do programa ND1000 v.3.5.2 e a qualidade do RNA foi verificada pela razão de DO 260 nm/280 nm. As amostras de RNA foram armazenadas a -80°C até o momento de sua utilização.

2.1.2. Reação de transcrição reversa

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA extraído de cada amostra, utilizando-se a enzima *Superscript™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Carlsbad/CA), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. A reação inicial conteve oligo (dT)₂₀(50µM), dNTPMix 10mM, H₂O DEPC e RNA, em um volume final de 13 µL. Essa solução foi aquecida a 65°C por 5 minutos, resfriada a 4°C por 2 minutos e, em seguida, centrifugada por 15 segundos à 14000 rpm (Modelo *Mini Spin*, EPPENDORF). Após a centrifugação, a reação foi complementada com 1X *First-Strand Buffer*, 5mM DTT, 40 Unidades de *RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor* e 200 Unidades de *Superscript™ III RT* (em um volume final de 20µL). Finalmente, a síntese de cDNA foi realizada

por incubação a 50°C por 60 minutos. A reação foi inativada por aquecimento a 70°C por 15 minutos, seguido de incubação a 4°C até a sua estocagem final a -20°C. A síntese de cDNA foi realizada em um termociclador *MyGene™ Series Peltier Thermal Cycler* (Modelo MG96G, *Long Gene®*).

2.1.3. qRT-PCR

O cDNA foi utilizado nas reações subsequentes de PCR em tempo real, monitoradas pelo método de incorporação de *Sybr Green* (kit *Power SYBR® Green PCR Master Mix*, Applied Biosystems, UK). A reação de PCR em tempo real foi realizada em um termociclador modelo 7500 (Applied Biosystems) e a solução de amplificação conteve 10 pmoles de cada *primer* e 2 µL de cDNA, em um volume final de 25 µL. A sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. *Primers* utilizados e suas respectivas sequências 5'-3'

PRIMER		SEQUÊNCIA (5' – 3')	TEMPERATURA
TGFB1	Forward	AAG GAC CTC GGC TGG AAG TG	64
	Reverse	CCC GGG TTA TGC TGG TTG TA	62
β-ACTINA	Forward	CGA CAG GAT GCA GAA GGA G	62
	Reverse	TCC TGC TTG CTG ATC CAC AT	60
TBP	Forward	GAG CTG TGA TGT GAA GTT TCC	62
	Reverse	TCT GGG TTT GAT CAT TCT GTA G	62

2.2. Quantificação da proteína TGFB1 em meios condicionados e extratos celulares

O kit *Quantikine® ELISA (Human TGF-β1 Immunoassay; R&D Systems)* foi utilizado de acordo com as orientações do fabricante para quantificar a concentração da proteína TGFB1 ativa em MC e extratos celulares. As quantificações de TGFB1 (pg/mL) nas amostras foram obtidas a partir da realização de curva padrão (2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 0 pg/mL).

Para a obtenção dos MC para quantificação proteica de TGFB1, as CTM foram cultivadas até atingir a confluência de 60 - 80% em garrafas T75 (Corning). Em seguida, o meio foi retirado e descartado, as células lavadas duas vezes com

10 mL de PBS para remover células mortas e proteínas provenientes do SFB, e 10 mL de meio DMEM sem SFB foi adicionado à garrafa. Após 24 h, o MC foi coletado e centrifugado (250 x g) para precipitação de restos celulares e o sobrenadante foi então concentrado 10 vezes para testes, por tubos de centrifugação *Amicon® Ultra 15 mL Filters 3 kDa membrane* (Merck Millipore). A concentração foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante e os meios foram filtrados com filtros de seringa 0.22 µm (Millipore) ao final do procedimento. Posteriormente, para utilização em ensaios celulares, os MC foram coletados em larga escala e concentrados conforme descrito, mas com ajustes de volumes para o cultivo das CTM em garrafas T225 (Corning) e com a diferença dos MC serem concentrados cerca de 1000 vezes.

Para realização dos extratos proteicos, as células foram lavadas com PBS e tratadas com *Tryple Select* (Gibco). Após obtidos os *pellets* celulares, as células foram lisadas com o tampão RIPA (Sigma Aldrich) e mantidas a 4°C por 5 minutos para completa lise celular. O lisado foi clarificado por meio da centrifugação a 8000 x g por 10 minutos a 4°C.

Para a quantificação proteica de TGFB1, o padrão e as amostras foram distribuídos em placas que já continham o anticorpo monoclonal específico para o TGFB1 humano. Após uma série de lavagens e etapas, o anticorpo policlonal específico foi adicionado e, depois da incubação e lavagens, o substrato foi adicionado, proporcionando uma intensidade de coloração proporcional à concentração proteica de TGFB1.

A densidade óptica foi determinada utilizando um leitor de microplacas no comprimento de 450 nm e corrigida com os dados da leitura a 540 nm, conforme sugerido pelo fabricante. Os dados coletados foram analisados por meio do programa *Enzo - Life Sciences*, obtendo-se a Curva padrão *-4P Logistic fit curve fit*, tornando possível a quantificação das amostras em pg/mL.

Tanto para selecionar o tipo de CTM que mais secretasse o TGFB1 nos MC dentre as diversas fontes avaliadas quanto para comparar as CTM submetidas à transdução viral e selecionar uma cultura de células que apresentasse o maior *knockdown* de *TGFB1*, foi necessário analisar quantidade da proteína TGFB1 por mg de proteína total contida nos MC e extratos proteicos. A quantificação proteica total dos sobrenadantes e dos extratos foi obtida por meio do método *Pierce® BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific).

2.3. Isolamento e confirmação de exossomos para quantificação de *TGFB1*

O isolamento de exossomos foi realizado apenas nas culturas de CTM transduzidas (conforme detalhado no item 3, abaixo) e com a confirmação prévia do *knockdown* pela quantificação proteica de MC por ELISA. As células foram cultivadas até atingir confluência de 60 – 80% e carenciadas de SFB por 24 h. O MC foi coletado para realização do *clearance* com centrifugações sequenciais (300g-10min; 2000g-10min; 10000g-30 min) e submetido ao *ExoQuick™* (System Biosciences) para purificação dos exossomos, de acordo com protocolo do fabricante.

Em seguida, os exossomos foram separados igualmente a fim de verificar a marcação para os anticorpos específicos como CD81, CD9 e CD63. Os exossomos foram precipitados em tubos com *beads* de látex (10 µL) por 15 min em temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µL de PBS e centrifugados 2 min, 10000 rpm/12000 g. Adicionou-se 100 µL de glicina (1 M), incubando por 30 min em temperatura ambiente. Os exossomos foram lavados duas vezes com PBS, centrifugados 10000 rpm, por 3 min, e ressuspensos em 20 µL de PBS. Foram adicionados 2 µL do anticorpo de interesse (diluição 1:10) com incubação *overnight*, 4°C. Após a incubação, foram lavados 2 vezes com PBS e ressuspensos em 200 µL de PBS para análise no FACSDiva™ (BD Biosciences).

3. OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS SILENCIADAS PARA O GENE *TGFB1*

3.1. Clonagem dos plasmídeos para transfecção e transdução viral

A clonagem foi realizada pelo método de eletroporação, no qual as bactérias competentes, juntamente com DNA plasmideal, são submetidas a um campo elétrico forte e breve que leva a abertura de poros na membrana celular através dos quais entram os plasmídeos. Para o silenciamento do gene *TGFB1*, utilizou-se o kit *HuSH™ shRNA Plasmid Panels 29-mer* (OriGene), composto por

quatro vetores de expressão shRNA independentes e um vetor inespecífico *scrambled* como controle negativo.

Para a transformação, foi adicionado 1 µL (1ng) de DNA plasmideal, fornecido pelo kit, em tubos contendo 50 µL de bactérias *E. Coli* DH10B descongeladas e mantidas no gelo. Esta solução foi transferida para cubetas de eletroporação de 0,2 cm (Bio-Rad Laboratories) e submetida a um pulso elétrico de 2,5 Kv. Imediatamente após o pulso, foi adicionado 1 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido na cubeta para remover e transferir as células para tubos eppendorf de 1,5 mL, incubando por cerca de 1 h em estufa a 37 °C, sob agitação. Em seguida, os tubos foram colocados em *mini spin* (Eppendorf) para centrifugação a 10000 rpm por 3 minutos e o excesso de meio LB (900 µL) foi retirado. O *pellet* foi ressuspendido no meio LB restante e transferido para placas com meio LB sólido com 50 µg/mL de Kanamicina (AMRESCO), permanecendo na estufa a 37°C por 12 h para obtenção de colônias.

3.2. Método de extração de plasmídeo

Após o crescimento das bactérias transformadas em meio sólido seletivo, uma colônia de cada placa foi selecionada e introduzida em 5 mL meio LB líquido com 50 µg/µL de Kanamicina. Os tubos contendo os meios com bactérias foram deixados no *shaker* a 37°C, 250 rpm, por 12 h para crescimento das bactérias. No dia seguinte, uma parte dos plasmídeos foi estocada e outra parte foi, novamente, colocada para crescer.

Para estocagem foram adicionados 450 µL da solução de bactérias em *criovials* contendo 50 µL de glicerol 80 %. Os *criovials* foram congelados em nitrogênio líquido e guardados em freezer – 80 °C. Para crescimento das bactérias, foram adicionados 50 µL da solução de bactérias em erlenmeyers contendo 50 mL de meio LB líquido com Kanamicina e, novamente, foram submetidas a agitação no *shaker* a 37°C por 12 h. Depois, os meios foram transferidos para tubos do tipo *falcon* de 50 mL e centrifugados por 15 min a 7197 g para obter apenas o *pellet* de bactérias e realizar a purificação dos plasmídeos. A extração e a purificação dos plasmídeos foram realizadas com kit

comercial *GeneJET Plasmid Midiprep* (Thermo Scientific) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

3.3. Transduções virais

3.3.1. Transfecção em células empacotadoras *Phoenix-AMPHO*

A fim de verificar se os vetores plasmideais clonados seriam incorporados pelas células e funcionavam corretamente, foi realizada a transfecção em células empacotadoras *Phoenix-AMPHO* (ATCC ® CRL-3213™). A presença de fluorescência GFP nessas células foi utilizada como controle de sucesso para a transfecção. Para a transfecção, utilizou-se o agente lipossomal *Lipofectamine LTX* e *Reagente Plus* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Células *Phoenix-AMPHO* foram plaqueadas em placas de seis poços e mantidas a 37 °C, sob atmosfera de 5 % de CO₂ por 24 h. No dia seguinte, realizou-se a transfecção seguindo as quantidades previamente padronizadas. Em um tubo, foram adicionados 0,5 mL de *OptiMEM* (Gibco), 5 µg dos vetores fornecidos pelo kit e 5 µL de reagente *Plus* por poço a ser transfectado. A solução foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente. Em um novo tubo, foram adicionados 0,5 mL de *OptiMEM* e 20 µL de *Lipofectamine LTX*, também por poço a ser transfectado. Após a incubação, 0,5 mL de solução contendo o vetor retroviral foram transferidos para o tubo contendo a lipofectamina e incubado por 30 minutos. Um total de 1 mL da solução contendo o DNA com lipofectamina foi transferido para cada poço a ser transfectado e incubado a 37° C, sob atmosfera de 5% de CO₂. A figura 6 representa a eficiência de uma das transfecções.

Figura 6. Fotomicrografias sob luz branca, fluorescente e imagens sobrepostas, respectivamente, mostrando a eficiência da transfecção do vetor shRNA TGFB1 - 16 após 48 h do procedimento. Observa-se uma eficiência de aproximadamente 90% de transfecção nas células Phoenix Ampho (Barra=1000 µm).

Após confirmação das transfecções, os vetores foram utilizados para adquirir as culturas celulares de CTM com *knockdown* estável de *TGFB1*.

3.3.2. *Transfecção em células HEK-293 e transdução viral para silenciamento de TGFB1 em CTM*

O *knockdown* de *TGFB1* em CTM foi realizado via empacotamento viral em células HEK-293 e em colaboração com a pesquisadora do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, Dra. Karina Griesi Oliveira. Assim, células HEK-293 foram plaqueadas em uma placa de 15 cm de diâmetro, com meio DMEM-*High* suplementado com 10% de SFB. Após alcançarem confluência ideal, foi realizado o subcultivo de células na razão 1 placa: 5 placas até obter placas suficientes, ou seja, 2 placas por plasmídeo. A transfecção foi realizada após as células atingirem cerca de 70% de confluência. Em seguida, foram realizadas as transfecções dos vetores plasmídeos shRNA *scrambled*, shRNA TGFB1 - 13, shRNA TGFB1 - 14, shRNA TGFB1 - 15 e shRNA TGFB1 - 16 nas células HEK-293. Para isso, foram adicionados em 5mL de DMEM: CMV-GP (9,2 µg/placa), VSVG (4,6 µg/placa) e os vetores TGFB1-GI335413, TGFB1-GI335414, TGFB1-GI335415, TGFB1-GI335416 ou *scrambled* TGFB1-TR30013 (13,8 µg/placa). O meio foi filtrado (filtro de 0,22 µm); a seringa lavada com mais 7 mL de meio, obtendo um volume final de 12 mL. Após, foi adicionado 1,325 mL de PEI (polímeros de cargas positivas) para cada preparação de 12 mL. Incubado em temperatura ambiente por 5' e aplicado 1mL da preparação em cada placa de HEK-293. Após 6 h, o meio das placas foi trocado por DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB.

A obtenção dos vírus foi realizada após 48 h da transfecção. O meio das placas foi coletado e filtrado separadamente para realizar a ultra-centrifugação (2 h a 19400 rpm, a 12 °C). Os tubos foram cuidadosamente pesados antes desse procedimento. Após a ultra-centrifugação, o sobrenadante foi removido e 100 µL de meio DMEM-*High* foi acrescentado, sem homogeneizar. Incubado em temperatura 2-8 °C *overnight* para ressuspensão. Ainda neste dia, foram descongeladas as CTM (passagem 3) e plaqueadas 8×10^4 células por poço (placa de 6 poços), um poço para cada vetor, em meio DMEM com 10% SFB

No dia seguinte, após a ressuspensão dos vírus em geladeira, adicionou-se em cada tubo 1 mL de meio DMEM com 10% SFB e a solução foi filtrada. O meio das placas contendo CTM foi retirado sendo adicionado o vírus já filtrado no poço. Depois, as células permaneceram na estufa por 24 h e o meio foi trocado após esse período.

De acordo com o manual do plasmídeo HuSH™-Origene, as células transduzidas devem apresentar resistência à Puromicina (Figura 7).

Após a transdução viral e quando as CTM transduzidas atingiram a confluência de 80%, foi realizado o subcultivo com meio DMEM suplementado adicionando-se a Puomicina na concentração 0,5 µg/mL para realizar a seleção

de células transduzidas. A Puromicina foi mantida por 2 semanas para eliminar todas as células que não incorporaram o vetor, e as células foram congeladas a cada passagem.

4. ENSAIOS CELULARES FUNCIONAIS *IN VITRO*

4.1. *Ensaio de viabilidade e proliferação celular de células U87FP635 na presença de meios condicionados de CTM transduzidas*

Para os ensaios realizados na presença dos MC, foram utilizados MC derivados das CTM transduzidas que haviam sido preparados conforme citado anteriormente. Estes MC estavam concentrados 1000 vezes e estocados em freezer -80°C já quantificados. Em todos os ensaios realizados na presença de MC concentrado derivados das CTM *scrambled* foi utilizada a concentração de 10 ng/mL de TGFβ1. Essa concentração foi escolhida por já ter sido relatada suficiente para exercer influências no comportamento celular (LAMOUILLE; DERYNCK, 2007; LEE; CHOI; JOO, 2013).

Para o ensaio de proliferação celular, as células U87FP635 foram previamente carenciadas de SFB por 24 h para sincronização do ciclo celular. Foram plaqueadas $2,5 \times 10^3$ células U87FP635 em meio DMEM suplementado com 0,5% de SFB, em triplicata, em placas de 96 poços e mantidas em estufa com controle de temperatura e umidade por 3 h até as mesmas aderirem. Essa porcentagem de SFB foi padronizada anteriormente sendo que ela permite que as células U87FP635 permaneçam viáveis durante o período do ensaio em uma baixa taxa proliferativa. Assim, mantendo uma taxa proliferativa baixa, a visualização de uma possível diferença na proliferação celular das células de GBM seria mais facilmente detectada quando fossem incubadas com MC das CTM.

Após as células U87FP635 aderirem na placa, o meio foi retirado e as células foram submetidas aos seguintes tratamentos: DMEM (0,5% SFB) juntamente com MC de CTM *scrambled* (10 ng/mL de TGFβ1); DMEM (0,5% SFB) juntamente com MC de CTM shTGFβ1 (quantidade normalizada pela mesma concentração de proteína total utilizada no grupo *scrambled*) e o controle DMEM (0,5% SFB). Os grupos foram analisados após 72 h de incubação em

estufa sob condições ideais. Para a contagem de células viáveis, o meio de cultura foi recolhido e as células foram soltas sob ação de tripsina, centrifugadas a 300 x g por 5 minutos (min) e o *pellet* celular ressuspendido em 30 µL de DMEM. As células totais foram contadas com auxílio da câmara de Neubauer e azul de tripan.

Para contagem do índice mitótico, o mesmo procedimento foi realizado, com a diferença que as células U87FP635 foram plaqueadas em lâminas Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System (Thermo Scientific) submetidas aos mesmos grupos de tratamento e, após 72 h, fixadas com formaldeído a 3,7% durante 30 min, em seguida corado com 1 µg/ml de DAPI, durante 2 min, cuidadosamente lavadas em PBS e as lâminas montadas com VECTASHIELD® (Vector Laboratories). Em seguida, 1000 células por lâmina foram contadas sob microscopia de fluorescência em três lâminas diferentes para cada grupo experimental.

4.2. Ensaio de migração celular na presença de meios condicionados de CTM transduzidas

O ensaio de migração celular realizado na presença de MC foi avaliado com o kit Oris™ cell migration assay, que utiliza uma estrutura no formato de rolha (*plug*) de silicone para impedir as células de aderirem nessa região, quando plaqueadas em placas de 96 poços. Após 12 h de plaqueamento (5×10^4 células), o *plug* foi retirado formando uma região sem células U87FP635 aderidas de diâmetro de 2 mm, no centro de cada poço. Após a retirada dessa estrutura, as células tornam-se livres para migrar para o centro do poço. Os grupos experimentais foram: DMEM (0% SFB) juntamente com MC de CTM *scrambled* na concentração de 10 ng/mL de proteína TGFB1; DMEM (0% SFB) juntamente com MC de CTM shTGFB1 (quantidade normalizada pela mesma concentração de proteína total utilizada no grupo *scrambled*) e controle DMEM (0% e 10% SFB). Como esse ensaio é realizado por até 36 h, não houve a necessidade em manter a concentração de 0,5% de SFB nos meios para as células permanecerem viáveis. A avaliação migração foi realizada por meio do cálculo da área migrada, observada nas fotos de microscopia, nos tempos 12, 24 e 36 h.

4.3. Proliferação celular de U87FP635 na presença de cocultivos celulares com CTM transduzidas

Além dos ensaios com MC, foram realizados ensaios com cocultivos celulares, que podem ser realizados de forma direta ou indireta. Para o ensaio de cocultivo celular direto, em que as células tumorais foram mantidas em contato direto com as CTM durante o experimento, as CTM transduzidas (*scrambled* e shTGFB1) foram plaqueadas em poços (placas de 24 poços) juntamente com as células U87FP635. A proporção de células tumorais e CTM foi mantida em 1:1 ($1,48 \times 10^4$ células). Para o cocultivo celular indireto, foram utilizadas placas de 6 poços próprias para cocultivo celular com insertos (*transwell*) de poros de $0,4 \mu\text{m}$ (Transwell, Costar - 3422), permitindo a livre passagem dos fatores solúveis no meio. Neste ensaio, a proporção de células tumorais e CTM também foi mantida em 1:1 ($3,5 \times 10^4$ células).

Como os ensaios possuíam duração de 72 h de cocultivo celular direto e indireto, houve a necessidade em manter uma quantidade mínima, mas suficiente, de 0,5% de SFB. Para contabilizar as células U87FP635 nos ensaios de cocultivo direto, as células fluorescentes vermelhas observadas com auxílio da câmara de Neubauer sob microscopia de fluorescência foram consideradas células tumorais viáveis. Previamente, já havia sido realizada uma padronização que confirmasse que as células não viáveis possuem ausência de fluorescência. Para o cocultivo indireto, as células foram contadas com auxílio da câmara de Neubauer e azul de tripan.

4.4. Ensaio de migração e invasão celular de U87FP635 pelo método modificado de Boyden (*transwell*) na presença das CTM transduzidas

O ensaio de migração celular na presença das CTM transduzidas foi realizado por meio do método modificado de Boyden, em câmaras de migração compostas por uma membrana de polycarbonato contendo poros de $8 \mu\text{m}$ (Transwell, Costar). No primeiro dia de experimento, 1×10^5 CTM transduzidas (*scrambled* ou shTGFB1) foram plaqueadas nos poços e, após aderidas, foram lavadas com PBS e adicionado DMEM sem SFB. Após 24 h em que as CTM

teriam secretados seus fatores no meio, foram adicionados aos poços os insertos com 100 μ L de meio DMEM sem SFB contendo de células U87FP635, na concentração de 1×10^6 células/mL. Proporção de células tumorais e mesenquimais utilizada foi de 1:1. As placas, contendo os insertos, foram transferidas para a estufa a 37° C e 5% CO₂ pelo tempo necessário para as células migrarem. A migração foi analisada em triplicata no tempo 12 h.

O ensaio de invasão foi realizado de forma semelhante ao de migração celular. Entretanto, antes de iniciar a manipulação da cultura celular, os insertos foram preparados com Matrigel (Corning) para servir como barreira a ser ultrapassada pelas células após migrarem. Para isso, o matrigel foi diluído de acordo com as recomendações do fabricante (Fator de diluição indicada pelo lote do Matrigel em 25 mL de DMEM) e mantido em gelo. Após diluir em meio DMEM gelado, foram transferidos 100 μ L de Matrigel para cada inserto e aguardado a solidificação em temperatura ambiente por 2 h. Após, foi iniciado o plaqueamento celular de acordo com o ensaio de migração celular. O tempo analisado de invasão celular foi de 12 h.

Após o tempo de 12 h percorrido, os insertos foram lavados duas vezes em PBS, fixados com paraformol 3,7% por 2 min, permeabilizados com metanol absoluto por 20 min, corados com azul de toluidina 1% e boráx 1% por 15 min protegidos da luz. As células que não migraram, mas que permaneceram na região superior da membrana, foram retiradas com o auxílio de uma haste de algodão. A coloração das células foi dissolvida com SDS 0,1% após incubação de 30 min a 37 °C. A quantificação foi realizada por meio de leitura espectrofotométrica (624 nm) em triplicata.

4.5. Ensaio de invasão celular 3D na presença das CTM transduzidas

A atividade invasiva das células tumorais também foi analisada por meio do kit *Cultrex® 96 Well 3D Spheroid BME Cell Invasion Assay* (Amsbio™). As células foram cultivadas em placas de 96 poços (*96-well low-attachment round plate*, Corning) com meio especializado para a formação de esferas (*Spheroid Formation ECM*) na densidade de 3×10^3 células U87FP635 por poço, ou 3×10^3 células U87FP635 juntamente com as CTM transduzidas na proporção 1:1. Uma

vez completa a formação de esferas, essas foram embebidas em matriz de invasão fornecida pelo kit composta por proteínas de membranas que formam uma rede que favorece a invasão celular. A invasão celular foi acompanhada por uma semana e o meio suplementado adicionado a cada 3 dias. A análise foi realizada sob microscópio digital (*EVOS Cell Imaging System*, Life Technologies) e a área invadida foi quantificada através do programa ImageJ®.

5. ENSAIO DE TUMORIGÊNESE *IN VIVO* SUBCUTÂNEO

O ensaio de tumorigênese *in vivo* foi realizado em animais imunossuprimidos do tipo BALB/c Nude de nove semanas e foi separado em duas etapas. Primeiramente, com o objetivo de verificar a influência da presença de CTM na tumorigênese da U87FP635, 15 camundongos foram distribuídos em três grupos. No primeiro grupo, a suspensão de células continha 1×10^6 CTM juntamente com 1×10^6 células de U87FP635 a cada 100 μ L (proporção 1:1) e, para os grupos-controle, foram realizadas outras duas soluções, uma contendo apenas 1×10^6 CTM e outra com 1×10^6 células U87FP635 a cada 100 μ L. As soluções foram administradas com auxílio de uma seringa de 1 mL (BD Plastipak) na região subcutânea do flanco esquerdo.

Após esse resultado, a outra etapa foi realizada com um novo experimento para comparar o crescimento tumoral das células U87FP635 quando administrada juntamente com as CTM transduzidas (*scrambled* ou shTGFB1), a fim de estabelecer se há correlação do crescimento tumoral com o TGFB1 liberado pelas CTM. O crescimento tumoral foi acompanhado semanalmente com auxílio de um paquímetro digital (Western PRO DC-6). A curva de crescimento tumoral é dada pela seguinte fórmula:

$$\frac{D_{maior} \times D_{menor}^2}{2}$$

O estudo em animais foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa em animais da Universidade de São Paulo (CEUA protocolo no. 132/2011).

Forma de Análise dos Resultados

Os resultados foram analisados de forma comparativa entre os grupos controle e experimentais. Os dados foram expressos como média $\pm$ DP. Comparações entre grupos experimentais foram feitas por teste *t-student* ou por análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de comparação múltipla de Tukey ou de Bonferroni. O nível de significância $p < 0,05$ foi adotado para todos os experimentos, sendo representados: * $p < 0,005$; ** $p < 0,002$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

6. PROTEÔMICA DOS MEIOS CONDICIONADOS DERIVADOS DE COCULTIVOS CELULARES

As proteínas dos MC derivados do contato celular de CTM e U87FP635 foram avaliadas por estudo proteômico realizado em colaboração com a Ms. Amanda Faria Assoni e com o Dr. Valdemir Melechco Carvalho, pesquisador e assessor científico sênior da divisão de pesquisa e desenvolvimento do Grupo Fleury. Assim, cerca de 300 mL de MC de cada grupo experimental (MC de células U87FP635 cocultivadas com CTM *scrambled* ou shTGFB1 e MC dos cultivos celulares individuais) foram coletados e concentrados para as análises.

6.1. Digestão proteica por RapiGest™ SF Surfactant

Para digestão proteica utilizou-se 50 μ g de proteína total dos MC derivados de cocultivos e respectivos controles diluídos em uma solução de Bicarbonato de Amônio (50 mM) para um volume final de 60 μ L. As proteínas das foram desnaturadas com uma solução de 0,2% *RapiGest™ SF Surfactant* (Waters) por 15 min em temperatura de 80°C, reduzidas com 2,5 μ L de ditioneitol (100 mM) por 30 min em temperatura de 60°C, alquiladas com 2,5 μ L de iodoacetamida (300 mM) por 30 min em temperatura ambiente e digeridas enzimaticamente com tripsina (grau proteômico) na proporção 1:50 (enzima : proteína) *overnight* a 37°C. Após, o *RapiGest™* foi hidrolisado com 10 μ L de uma solução de 5% ácido trifluoroacético (TFA) e as amostras foram incubadas por 90 min a 37°C. Amostras foram centrifugadas (16000 g) por 30 min a 6°C e 16 μ L de um padrão interno (*yeast alcohol dehydrogenase-P00330 a 1 pmol/ μ L*) foi adicionado.

6.2. *Processamento das amostras e análise do perfil proteico por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem*

As amostras foram analisadas por um sistema *nanoACQUITY* (Waters) composto por uma bomba binária, uma bomba auxiliar e um amostrador. Os peptídeos foram capturados, dessalinizados e concentrados em uma coluna de captura *Symmetry C18* (180 μm $\times$ 20 mm, 5 μm) por meio de uma fase móvel composta por água com 0,1% de ácido trifluoroacético a um fluxo de 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ por 5 min. Em seguida, os peptídeos foram separados em uma coluna analítica *HSS C18* (75 μm $\times$ 150 mm, 1.7 μm) pela eluição por um gradiente linear de 2 % de DMSO em água com 0,1 % de ácido fórmico e 5 % de DMSO em acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico. A proporção da solução orgânica foi elevada de 0 a 60 % em 80 min.

O sistema cromatográfico é diretamente acoplado a um espectrômetro de massas em tandem do tipo *Q-Exactive* (ThermoScientific), equipado com uma fonte do tipo nano-eletrospray, um quadrupolo para seleção de íons precursores, um dispositivo de armazenamento de íons para injeções pulsadas (*C-Trap*), uma célula de colisão para experimentos de HCD (*H*igher Energy Collisional Dissociation), e um analisador do tipo Orbitrap para análise de massas por transformada de Fourier. As aquisições dos dados espectrais foram obtidas pelo modo de aquisição dd-MS² (Top15), que compreende uma varredura completa seguida de uma aquisição dependente de dados dos 15 íons mais intensos com a aplicação de uma energia de colisão normalizada de 35.

6.3. *Planejamento e aquisição dos dados de proteômica shotgun*

As amostras foram aleatorizadas em bloco para aquisição de quatro ou nove replicatas técnicas (aquisições repetidas de uma mesma amostra biológica). O espectrômetro de massas em tandem do tipo *Q-Exactive* foi calibrado no modo positivo no início de cada sequência analítica. As sequências analíticas tiveram início após a aquisição de extrato de linhagem celular humana Mino (*new mantle cell lymphoma*) para controle de qualidade de número de proteínas identificadas.

6.4. *Processamento dos dados proteômicos*

Os dados adquiridos foram processados pelo programa MaxQuant (COX; MANN, 2008) especificamente desenhado para dados de alta resolução e quantitativos. A identificação proteica foi realizada pela ferramenta de busca Andromeda utilizando o banco de dados do proteoma humano UniProtKB (**SwissProt junho 2015**). Os seguintes parâmetros foram aplicados na identificação: permissão de no máximo duas clivagens incompletas pela tripsina, modificação fixa por carbamidometilação das cisteínas e modificações variáveis por acetilação da porção N-terminal e oxidação da metionina. A quantificação foi baseada na estratégia sem marcação (*Label-free quantification*- LFQ). Foi realizada uma validação cruzada da identificação proteica por meio da plataforma *Trans-Proteomic Pipeline* (TPP) utilizando o X!Tandem como ferramenta de busca e aplicando os mesmos parâmetros usados na análise pelo Andromeda/MaxQuant.

6.5. *Análise dos dados e análise funcional por biologia de sistemas*

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o teste-*t* com o software *Perseus*, considerando significativas as análises com $p < 0,05$. As proteínas identificadas na plataforma do MaxQuant foram consideradas para análise somente caso obtivessem probabilidades acima de 95% no módulo *Protein Prophet* do sistema X!Tandem/TPP.

As análises de biologia de sistemas foram realizadas através do software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). O banco de dados de referência utilizado foi o *Ingenuity Knowledge Base* (Genes) incluindo somente relações diretas considerando moléculas e relações na espécie humana e observadas experimentalmente.

RESULTADOS

1. EXPRESSÃO BASAL DE *TGFB1* EM CTM DE DIVERSAS FONTES BIOLÓGICAS

Para caracterizar o perfil de expressão de *TGFB1* em CTM derivadas de diversas fontes biológicas e selecionar a CTM que mais expressasse *TGFB1*, avaliou-se a amplificação de transcritos de *TGFB1* em CTM derivadas de medula óssea, cordão umbilical e tecido adiposo. A CTM de medula óssea (M10) e a de cordão umbilical (UCmsc3) foram as culturas que apresentaram maior quantidade de transcritos de *TGFB1* (Figura 8)

Figura 8. Expressão de *TGFB1* obtida por qRT-PCR e normalizada por A) *TBP* e B) *BACTINA* (*ACTB*) nas diversas culturas celulares: U87MG (GBM); M10 (CTM de medula óssea); UCmsc3, UCmsc4 e UCmsc5 (CTM de cordão umbilical); ABDOJ1, PLAX1, PLAJ3 (CTM de tecido adiposo).

Como o objetivo dessa etapa do trabalho foi investigar os efeitos parácrinos das CTM no microambiente tumoral e especificamente a ação do TGFB1 liberado por elas, a quantificação proteica de TGFB1 secretado no MC foi o principal fator considerado para a seleção.

Os meios condicionados (MC) de culturas de CTM de diversas fontes biológicas foram coletados, concentrados, e analisados comparativamente quanto à concentração de TGFB1 secretado. Na figura 9, nota-se que apesar de as CTM M10 e UCmsc3 terem apresentado maior nível de transcritos de *TGFB1*, esse resultado não se reproduziu no nível proteico dos MC. A maior concentração de TGFB1 ativo secretado foi apresentada pela CTM derivada do cordão umbilical UCmsc4. A quantificação do MC das células U87FP635 está apresentada no gráfico apenas para efeito comparativo.

Figura 9. Quantificação da proteína TGFB1 por ELISA em MC de CTM. Amostras: M10 (medula óssea); UCmsc3, UCmsc4 e UCmsc5 (cordão umbilical); ABDOJ1, PLAX1, PLAJ3 (tecido adiposo). Valores (TGFB1 pg/mg de proteína total) encontrados para MC concentrados.

Portanto, as CTM da amostra UCmsc4 demonstraram ser as de maior capacidade de secreção de TGFB1, justificando seu uso como ferramenta nos experimentos subsequentes. Essas células foram submetidas à transdução viral e selecionadas com Kanamicina, conforme descrito anteriormente, para obtenção de culturas de CTM com *knockdown* permanente de *TGFB1* e seu respectivo controle negativo (*scrambled*).

2. SILENCIAMENTO DE *TGFB1* EM CTM

O *knockdown* de *TGFB1* em CTM foi inicialmente testado com quatro diferentes sequências silenciadoras, gerando subculturas de CTM denominadas: CTM sh*TGFB1* - 13, CTM sh*TGFB1* - 14, CTM sh*TGFB1* – 15 e CTM sh*TGFB1* – 16, conforme o plasmídeo utilizado para o silenciamento gênico. Essas culturas celulares transduzidas foram avaliadas para selecionar a que apresentasse melhor eficiência de *knockdown* de *TGFB1*.

A expressão gênica de *TGFB1* foi então avaliada por qRT-PCR nessas células, utilizando-se a expressão de dois genes controles endógenos, *TBP* e *ACTB*, para normalização dos dados. A Figura 10 (A e B) demonstra o nível de expressão de *TGFB1* normalizado pelo respectivo gene endógeno e apresenta as porcentagens de *knockdown* encontradas para cada plasmídeo, quando comparado à expressão em células controle (CTM *scrambled*).

Figura 10. Quantificação dos níveis de expressão de *TGFB1* por meio de qRT-PCR em CTM após transdução viral e seleção com Kanamicina. A) Quantificação normalizada com endógeno *TBP*. O maior nível de *knockdown* foi de 81,03%, encontrado em CTM sh*TGFB1* - 16. B) Quantificação normalizada com endógeno *ACTB*. As células CTM sh*TGFB1* – 16 também apresentaram o maior nível de *knockdown* (84,67%).

De acordo com os resultados obtidos na análise, observa-se que as CTM *scrambled* apresentaram expressão de transcritos de *TGFB1* mais semelhante às CTM não manipuladas, e que o *knockdown* mais eficiente, com aproximadamente 82% de silenciamento, ocorreu nas CTM shTGFB1 - 16.

Os estudos da ação do TGFB1 no microambiente tumoral e nas interações celulares exigiram a seleção das CTM que apresentasse o melhor *knockdown* de *TGFB1* no nível proteico, principalmente no nível de TGFB1 secretado. Assim, além da confirmação do *knockdown* em extratos celulares, os MC de CTM submetidas à transdução viral (*scrambled*, shTGFB1 – 13, shTGFB1 – 14, shTGFB1 – 15 e shTGFB1 – 16) e CTM não manipulada tiveram suas concentrações de TGFB1 quantificadas pelo método de ELISA.

A figura 11 demonstra as diferenças na eficiência do *knockdown* de *TGFB1* entre os extratos celulares das amostras, com a cultura de CTM shTGFB1 – 16 apresentando a menor expressão de TGFB1, cerca de 65% de *knockdown*, em concordância com os resultados obtidos por qRT-PCR.

Figura 11. Quantificação da proteína TGFB1 em extratos celulares de CTM. Assim como o resultado encontrado na análise por qRT-PCR, as CTM shTGFB1 - 16 possuem o menor nível proteico de TGFB1. Os valores estão apresentados em picogramas de TGFB1/mg de Proteína Total.

A avaliação dos níveis de TGFB1 liberado na sua forma ativa nos MC constatou, mais uma vez, que o maior nível de *knockdown* foi das CTM shTGFB1 – 16, cerca de 79,25% (Figura 12).

Figura 12. Quantificação da proteína TGFB1 em MC. Consistente com os resultados anteriores, as CTM shTGB1 - 16 apresentaram o menor nível de TGFB1 secretado, confirmando maior nível de *knockdown*. Os valores estão apresentados em picogramas de TGFB1/mg de proteína total.

3. QUANTIFICAÇÃO DE TGFB1 EM EXOSSOMOS DERIVADOS DE CTM APÓS SILENCIAMENTO ESTÁVEL

Além da comunicação celular entre as células tumorais e CTM ocorrer por meio de efeitos parácrinos devido fatores solúveis secretados no microambiente, essa interação também pode ocorrer por vias de exossomos. Como o TGFB1 pode ser liberado pelas células como fator solúvel, mas também empacotados em exossomos, viu-se a importância em avaliar a expressão de TGFB1 em exossomos após o *knockdown* de *TGFB1*. Após a purificação das exossomos a partir de MC frescos de CTM *scrambled* e CTM shTGFB1 já selecionada (shTGFB1 – 16), os MC coletados frescos foram separados em três partes e submetidos à purificação de exossomos pelo *Kit ExoQuick™*. A primeira parte de exossomos purificados foi fixada para avaliação por microscopia eletrônica de

transmissão (Figura 13), a segunda parte foi submetida à marcações para confirmação do perfil dos exossomos por citometria de fluxo (Figura 14) e a última parte utilizada para extrair as proteínas para a quantificação de TGFB1 pelo método de ELISA (Figura 15-A e B).

Figura 13. Microvesícula isolada de CTM *scrambled* visualizada por microscopia eletrônica de transmissão (Barra = 0,1 μ m).

O perfil de expressão de marcadores tipicamente encontrados em exossomos (CD81, CD9 e CD63) foi avaliado por citometria de fluxo. Em amostras de ambos os grupos experimentais (CTM *scrambled* e CTM shTGFB1) foram encontradas altas porcentagens de exossomos, confirmando a pureza da extração.

A) Exossomos derivados de CTM *scrambled*

B) Exossomos derivados de CTM shTGFB1

Figura 14. Análise de marcadores específicos de exossomos CD81(FITC), CD9 (PE) e CD63 (APC), por citometria de fluxo, em exossomos derivados de A) CTM controles (*scrambled*) e B) CTM submetidas ao silenciamento de *TGFB1* (shTGFB1).

Após confirmação da purificação dos exossomos por citometria de fluxo, estes foram quantificados quanto ao nível proteico de TGFB1. A Figura 15-A mostra que o *knockdown* do gene *TGFB1* também interfere na concentração de TGFB1 liberado das células por meio de exossomos. A quantificação de TGFB1 no MC (concentrado 10 X) está demonstrada como comparativo (Figura 15-B). Nota-se que a quantidade de TGFB1 por mg de proteína total secretado via exossomos é superior à quantidade secretada na forma livre.

Figura 15. Quantificação de TGFB1 em pg/mg de proteína total em A) Exossomos isolados das CTM transduzidas e B) MC derivados das CTM transduzidas.

Por fim, após todas as confirmações do *knockdown* no nível de transcritos e de proteínas (extratos celulares e secretados), os MC de CTM *scrambled* e CTM shTGFB1 foram coletados, concentrados 1000 vezes, quantificados e estocados em freezer -80 °C para posterior realização dos ensaios celulares. Parte dos estudos funcionais foi conduzida com a presença dos MC das CTM transduzidas, visando avaliar a influência dos fatores liberados, assim como o papel do TGFB1, e seus efeitos parácrinos no comportamento de células de GBM. Ainda, estudos adicionais abordaram métodos mais semelhantes ao que mimetizassem a interação celular no microambiente tumoral, utilizando a presença das próprias CTM transduzidas em conjunto com as de GBM, como descrito adiante.

4. ENSAIOS CELULARES FUNCIONAIS *IN VITRO*

4.1. *TGFB1* secretado por CTM aumenta significativamente a viabilidade e a proliferação de células de GBM

MC de culturas de CTM, quando adicionados às culturas de células de GBM da linhagem U87FP635, alteraram as propriedades das células tumorais. Sobrenadantes ricos em TGFB1 secretado (10 ng/mL), provenientes de culturas de CTM *scrambled*, aumentaram significativamente a quantidade de células tumorais U87FP635 viáveis em cultura, após incubação de 72 h, em comparação ao grupo controle (ausência de sobrenadante). O mesmo efeito não foi observado quando células tumorais U87FP635 foram incubadas, nas mesmas condições, com sobrenadante de culturas de CTM que tiveram o gene *TGFB1* silenciado (CTM shTGFB1) (Figura 16).

Figura 16. Ensaio de Proliferação de células U87FP635 na ausência (Controle) e na presença de meio condicionado de CTM transduzidas (*scrambled* e shTGFB1). A contagem de células foi realizada em Câmara de Neubauer após 72 h do ensaio. Observa-se que houve maior número de células na contagem do grupo *scrambled* quando comparado aos outros grupos.

Uma influência positiva na proliferação de células tumorais incubadas com MC de culturas de CTM *scrambled* também foi verificada, conforme indicado pelo aumento significativo na porcentagem de células U87FP635 em mitose (índice mitótico), quando comparado ao grupo controle (Figura 17). Mais uma vez, esse efeito positivo das CTM sobre a proliferação de células tumorais não foi observado quando o gene *TGFB1* foi silenciado nas CTM. Em conjunto, esses resultados indicam que a exposição de células tumorais U87FP635 a níveis elevados de TGFB1 secretados por CTM é suficiente para promover a

proliferação celular, sugerindo possível influência positiva no desenvolvimento tumoral.

Figura 17. Contagem de células U87FP635 em mitose na ausência (Controle) e na presença de meio condicionado de CTM transduzidas (*scrambled* e shTGFB1). A contagem de células foi realizada sob microscopia de fluorescência após 72 h do ensaio. Observa-se que houve maior número de células na contagem do grupo *scrambled* quando comparado aos outros grupos.

4.2. Aumento na quantidade de células viáveis de GBM também é influenciado por contato célula-célula com CTM *in vitro*

Com o objetivo de interpretar de forma mais clara o resultado positivo obtido a partir do ensaio de proliferação celular na presença dos MC de CTM, foram realizados ensaios adicionais na presença de CTM transduzidas. Esses ensaios foram compostos de cocultivo celulares entre células de GBM e CTM, método utilizado para avaliar a influência de um tipo celular específico no comportamento de outro tipo celular. Já que as CTM exibem tropismo aos sítios tumorais e compõem o estroma, o cultivo associado de CTM com células U87FP635 se aproximaria mais ao que ocorreria no microambiente tumoral e possibilitaria avaliar essa condição na proliferação das células tumorais. Ainda, o cocultivo com as CTM transduzidas possibilitou avaliar se há diferença entre o grupo de U87FP635 cultivado na presença da CTM shTGFB1 ou de CTM *scrambled*, ou seja, se o nível basal de TGFB1 liberado pelas CTM também teria a capacidade em alterar a proliferação tumoral.

No cocultivo direto após 48 (Figura 18-A) e 72 h (Figura 18-B), em que as células tumorais U87FP635 permaneceram em contato físico com as CTM transduzidas, observou-se um aumento significativo na quantidade de células fluorescentes vermelhas e viáveis quando comparadas ao cultivo das células

tumorais sozinhas. Apesar desse efeito positivo das CTM sobre o aumento da população de células tumorais viáveis, não houve diferença estatística das contagens celulares entre os grupos cocultivados diretamente com a CTM shTGFB1 ou CTM *scrambled*. Esse último resultado indica que o efeito das CTM não depende dos níveis de TGFB1 secretados por elas.

A)

B)

Figura 18. Avaliação da quantidade de células tumorais U87FP635 fluorescentes viáveis na presença ou ausência de CTM, sob condições de cocultivo direto após A) 48 h e B) 72 h. CTM *scrambled* = CTM transduzidas controles. CTM shTGFB1 = CTM com silenciamento estável de TGFB1.

Esse aumento na quantidade de células U87FP635 notado no cocultivo celular direto com CTM pôde ser, inclusive, visualizado nitidamente ao microscópio de fluorescência. Observou-se maior população de células fluorescentes vermelhas (U87FP635) no grupo em que foi realizado o cocultivo

celular (Figura 19-B) quando comparado ao cultivo celular individual de U87FP635 (Figura 19-A).

Figura 19. Fotomicrografias representativas do cocultivo celular direto após 72 h obtidas em contraste de fase (DIC) e RFP. A) Apenas células U87FP635 e B) Células U87FP635 na presença de CTM. Observa-se maior quantidade de células U87FP635 em cultivos com contato direto com CTM (Barra=1000 μ m).

Notadamente, esse estímulo pró-tumorigênico promovido pelas CTM mostrou ser dependente do contato célula-célula, uma vez que só foi observado na condição de cocultivo direto. Sob condições de cocultivo celular indireto, onde CTM e células tumorais se comunicam quimicamente, mas sem contato físico, não foram detectadas alterações significativas na população de células tumorais U87FP635 viáveis, nos mesmos períodos experimentais de 48 (Figura 20-A) e 72 h (Figura 20-B).

A)

B)

Figura 20. Avaliação da quantidade de células tumorais U87FP635 fluorescentes viáveis na presença ou ausência de CTM, sob condições de cocultivo indireto após A) 48 h e B) 72 h. CTM *scrambled* = CTM transduzidas controles. CTM shTGFB1 = CTM com silenciamento estável de *TGFB1*.

O resultado do cocultivo indireto permitiu concluir que, nesse caso, apenas a troca de fatores solúveis não foi suficiente para exercer influência no comportamento proliferativo das células tumorais. Por outro lado, o contato célula-célula demonstrou ser uma condição importante para promover melhora da dinâmica de interação/comunicação celular, com indução de aumento de células tumorais viáveis por CTM, independentemente do silenciamento de *TGFB1*. Para esclarecer essa questão, os MC dos cocultivos direto e indireto de CTM e células tumorais foram coletados e quantificados quanto a concentração de TGFB1 presente no meio.

4.3. Perfil das quantificações de TGFB1 em meios condicionados de cocultivos celulares

Para investigação do perfil de secreção de TGFB1 na condição de cocultivo celular, os MC foram coletados após 72 h, tempo escolhido devido a maior concentração de fatores liberados. Na figura 21, a concentração de TGFB1 determinada nos MC dos diferentes grupos experimentais indica que as células U87FP635 possuem uma produção endógena de TGFB1, que quase não se alterou quando estas foram submetidas ao cocultivo direto com as CTM shTGFB1. Já quando as células U87FP635 se encontravam em cocultivo direto com as CTM *scrambled*, observou-se maior concentração significativa de TGFB1 ($p \leq 0,001$), o que já era esperado pois somam-se TGFB1 liberados no MC pelos dois tipos celulares. Mais uma vez, nessa condição experimental, foi possível confirmar que o *knockdown* de *TGFB1* durante o ensaio de fato resultou em menor quantidade de TGFB1 no MC, comparativamente as CTM *scrambled*.

A)

B)

Figura 21. Quantificação de TGFB1 em A) Picogramas de TGFB1/mg de proteína total e B) TGFB1/mL nos MC dos grupos experimentais de cocultivo direto.

É importante ressaltar que, embora tenha sido constatada uma concentração significativamente maior de TGFB1 em MC do cocultivo de células U87FP635 com as CTM *scrambled*, isso não refletiu em diferenças estatísticas na quantidade de células tumorais U87FP635 viáveis, quando comparado ao grupo de células U87FP635 cocultivadas com as CTM shTGFB1. Ressalta-se ainda que a concentração média de TGFB1 detectada nos MC desses cocultivos celulares mostrou ser cerca de 10 vezes inferior à concentração de TGFB1 usada nos ensaios celulares com MC concentrados de CTM apenas.

Em relação aos cocultivos indiretos, sabe-se que a utilização do método de insertos para cocultivo celulares permite a livre passagem dos fatores liberados pelas células, possibilitando suas interações químicas independentemente de contato físico. No entanto, optou-se por analisar

separadamente as concentrações de TGFB1 tanto nos MC contidos nos compartimentos inferiores (CTM transduzidas presentes nos poços) quanto nos compartimentos superiores (células U87FP635 presentes nos insertos).

Nos compartimentos inferiores, as quantificações realizadas em MC contidos dos grupos CTM *scrambled* e CTM shTGFB1 (Figura 22) mostraram que a concentração de TGFB1 não se altera significativamente quando essas células são cocultivadas indiretamente com as células U87FP635, ou seja, os níveis de TGFB1 liberado são muito semelhantes aos basais apresentados pelas CTM controles ou silenciadas, preservando-se a diferença estatística da quantidade de TGFB1 secretado por elas.

A)

B)

Figura 22. Quantificação de TGFB1 em A) Picogramas de TGFB1/mg de proteína total e B) TGFB1/mL nos MC dos grupos experimentais do cocultivo indireto. MC contidos nos poços, compartimentos inferiores.

Nos compartimentos superiores, as quantificações de TGFB1 foram importantes para confirmar a passagem pelos poros dos fatores liberados pelas células que estão na câmara inferior (CTM transduzidas) e atingir as células de interesse, células U87FP635. As análises demonstraram que há um aumento significativo ($p \leq 0,005$) na concentração de TGFB1 em MC contidos nos compartimentos superiores quando as células U87FP635 são cocultivadas com as CTM *scrambled* (U87FP635 + CTM *scrambled*), que provavelmente está relacionado à soma de TGFB1 secretados por ambas as células. Já o grupo U87FP635 + CTM shTGFB1 apresentou nível de TGFB1 semelhante ao cultivo isolado de U87FP635, que pode ser explicado devido à pouca liberação de TGFB1 pelas CTM shTGFB1. Para efeito comparativo, os valores para os grupos CTM *knockdown* e CTM *scrambled* individuais estão como referências (Figura 23).

A)

B)

Figura 23. Quantificação de TGFB1 em A) Picogramas de TGFB1/mg de proteína total e B) TGFB1/mL nos sobrenadantes dos grupos experimentais do cocultivo indireto. Sobrenadantes contidos nos insertos, compartimentos superiores.

Considerando-se que ambos os tipos de sistema de cocultivo de células revelaram um padrão similar de expressão de proteínas TGFB1, o aumento do número de células tumorais, no caso de contato célula-célula, de fato não foi decorrente das alterações dos níveis desta proteína.

4.4. Comportamento invasivo de células tumorais é afetado pelo contato com CTM

A capacidade de células tumorais migrarem e invadirem tecidos subjacentes são parâmetros relacionados com maior agressividade em diversos tipos tumorais. Essa característica pode dar origem ao processo de metástase, no qual as células perdem adesão ao tumor original e conseguem migrar, invadir tecidos vizinhos, atingir a circulação sanguínea e metastizar para tecidos distantes. Nesse contexto, avaliou-se o comportamento de migração e invasão das células U87FP635 na presença das CTM transduzidas (*scrambled* ou shTGFB1) ou de seus MC, com o objetivo de verificar se há alteração desse comportamento na presença dessas células e se esse comportamento pode estar envolvido com a liberação de TGFB1 pelas CTM.

O Comportamento das células tumorais na presença de CTM transduzidas foi verificado em ensaios com a câmara de Boyden (*transwell*), o qual possibilitou avaliar propriedades tanto de migração quanto de invasão celular. Na análise do comportamento migratório, as células tumorais U87FP635 apresentaram aumento de migração quando as CTM transduzidas (*scrambled* ou shTGFB1) estavam presentes no compartimento inferior após 12 h (Figura 24-A). Esse aumento ocorreu de forma independente dos níveis de TGFB1 liberado pelas CTM. Para o grupo controle, foi apenas adicionado meio de cultivo celular sem suplementos, demonstrando uma baixa capacidade migratória basal das células tumorais.

Para o ensaio de invasão celular, a capacidade das células U87FP635 em invadir o matrigel e migrar para a face inferior da câmara também foi significativamente alterada quando as CTM transduzidas (*scrambled* ou shTGFB1) estavam presentes no compartimento inferior após 12 h. Nesse caso, também não foi possível encontrar diferença estatística na invasão de células cocultivadas na presença de CTM *scrambled* ou CTM shTGFB1, após 12 h

(Figura 24-B), indicando efeito independente de TGFB1.

A)

B)

Figura 24. Ensaio de A) migração e B) invasão celular realizado em *transwell* após 12 h. Células tumorais U87FP635 apresentaram aumento significativo de migração e invasão celular na presença das CTM transduzidas.

O aumento do comportamento migratório e invasivo das células U87FP635 é justificado pela propriedade quimioatrativa que as células tumorais exibem em direção às CTM. Entretanto, nessas condições experimentais, o contato celular, mas não os níveis de TGFB1 secretados pelas CTM, apresentaram influência no padrão de migração e invasão das células tumorais.

De fato, a simples adição de MC de CTM transduzidas às culturas de células tumorais não provocou o mesmo efeito. Conforme apresentado na Figura 25, quando a capacidade de migração das células U87FP735 foi analisada *in vitro* na presença ou ausência de MC de CTM transduzidas, sem comunicação celular direta ou indireta, por até 36 h, não foi detectado aumento na capacidade de migração celular. Ao contrário, notou-se que na condição controle (0% de

SFB), as células tumorais exibiram comportamento migratório basal significativamente maior que os grupos tratados com MC de CTM. Esse efeito também foi independente do silenciamento de *TGFB1*.

A)

B)

Figura 25. Ensaio de migração celular na ausência e na presença de MC das células transduzidas (*scrambled* e shTGFB1). A) Fotos de microscopia representativas dos grupos nos tempos 12, 24 e 36 h (Barra=1000 μm). B) Quantificação da área migrada nos tempos 12, 24 e 36 h.

Ao mimetizar as condições de desenvolvimento tumoral por meio de um ensaio de invasão celular em 3D, pôde-se confirmar o efeito positivo do contato com CTM na capacidade invasiva de células de GBM. A figura 26-A apresenta fotomicrografias representativas de esferas tumorais exibindo protrusões invasivas na matriz de hidrogel, analisadas por um período de até sete dias. A análise estatística da área invadida (μm^2) pelas células tumorais revelou diferença estatística significativa entre o grupo de esferas formadas com células tumorais apenas, em relação aos grupos de esferas formadas com células tumorais associadas com as CTM transduzidas. As esferas compostas de células tumorais com CTM transduzidas originaram prolongamentos invasivos mais abundantes, apresentando maior área total de prolongamentos emitidos. Não foi observado efeito dependente de TGFB1, apenas influência da presença das CTM que foi significativa a partir do quarto dia de experimento (Figura 26-B).

A)

B)

Figura 26. Ensaio de invasão 3D *in vitro* de esferas tumorais de U87FP635 na ausência ou presença de CTM transduzidas (*scrambled* e shTGFB1) em matriz invasiva. A) fotomicrografias representativas da capacidade invasiva de esferas tumorais (Barra= 400 μm). B) Cinética de crescimento da área invadida ao longo de sete dias de cultivo em matriz invasiva.

Análises mais detalhadas dos diversos planos das esferas de invasão foram obtidas por microscoscópio de fluorescência confocal com o objetivo de verificar a composição celular dos prolongamentos invasivos das esferas formadas por células U87FP635 com CTM transduzidas (*scrambled* e shTGFB1). Na figura 27 estão as imagens de projeções de intensidade máxima das esferas, no dia sete do experimento, obtidas em contraste de fase (DIC), com a fluorescência RFP e a sobreposição dessas duas imagens (merge).

Essa análise permitiu visualizar as células presentes nas esferas e nos prolongamentos e sugeriu que todos os prolongamentos invasivos das esferas compostas por células U87FP635+CTM *scrambled* e U87FP635+CTM shTGFB1 eram compostos apenas de células fluorescentes vermelhas, indicando que apenas as células tumorais, e não as CTM, fazem parte da porção invasiva das esferas.

Figura 27. Imagens de projeções de intensidade máxima por microscopia confocal das esferas em 3D formadas apenas por células U87FP635; por células U87FP35 na presença das CTM *scrambled* e por células U87FP35 na presença das CTM shTGFB1 após sete dias de acompanhamento. Observa-se que os prolongamentos invasivos são formados por células tumorais fluorescentes (RFP em vermelho). Imagens em DIC (contraste de fase), RFP e merge dessas duas imagens (Barra=200 μm).

Tendo em vista que o nível de TGFB1 liberado pelas CTM transduzidas não alterou o comportamento invasivo das células tumorais, novos ensaios de invasão foram realizados para complementar o estudo. Assim, CTM da mesma origem que as transduzidas, com o diferencial de expressarem a proteína verde fluorescente GFP (CTM-GFP), foram utilizadas devido a possibilidade de monitoramento detalhado da dinâmica de invasão celular. Fotomicrografias fluorescentes por microscopia confocal de três dias diferentes das esferas compostas por apenas células U87FP635, apenas CTM-GFP ou compostas por ambos tipos celulares (células U87FP635 com CTM-GFP) permitiram avaliar a localização das células.

Nos dias 0 e 3, foram visualizados ambos tipos celulares (células tumorais RFP e as CTM-GFP), com CTM-GFP preferencialmente localizadas em regiões mais externas/superficiais das esferas tumorais. No dia 3, foi possível identificar que as CTM-GFP foram responsáveis pela maioria dos prolongamentos invasivos iniciais. Surpreendentemente, no último dia de acompanhamento (dia 7), não foi mais possível detectar as CTM-GFP nem nos prolongamentos invasivos e nem na região central da esfera. Respectiveiros controles são mostrados para comparação (Figura 28).

Figura 28. Imagens de projeções de intensidade máxima por microscopia confocal das esferas invasivas em 3D ao longo de sete dias. As imagens demonstram esferas tumorais composta por células U87FP635 (RFP em vermelho) cocultivadas com células CTM-GFP (GFP em verde) com núcleos corados em DAPI (azul) e respectivos controles (esferas contidas apenas por células U87FP635 ou por CTM-GFP). As imagens evidenciam que na esfera composta por ambos os tipos celulares as CTM-GFP podem ser visualizadas somente até o terceiro dia de ensaio. No último dia, apenas prolongamentos invasivos tumorais (RFP) puderam ser detectados (Barra=200 μm).

Em detalhe (Figura 29), foi possível identificar raras CTM-GFP, permitindo confirmar que o aumento da área invadida foi proporcionado pelo comportamento de células tumorais, influenciada pela presença inicial de CTM.

Figura 29. Imagens de projeções de intensidade máxima por microscopia confocal demonstram os detalhes da esfera tumoral em 3D composta por células U87FP635 (RFP em vermelho) cocultivadas com células CTM-GFP (GFP em verde) com núcleos corados em DAPI (azul) após sete dias de experimento. A imagem evidencia que os prolongamentos invasivos apresentam a fluorescência RFP, ou seja, são compostos por células tumorais, e que raras CTM-GFP estão presentes ao final do experimento (Barra=100 μm).

5. CONTATO COM CTM AUMENTA A TUMORIGENICIDADE DE CÉLULAS DE GBM *IN VIVO*

O ensaio subcutâneo de tumorigênese *in vivo* foi realizado em duas etapas. Primeiramente, investigou-se se a administração de CTM juntamente com as células tumorais de GBM, alterava o surgimento ou a cinética de crescimento tumoral. Nesse estudo, 15 camundongos imunossuprimidos do tipo BALB/c Nude de 9 semanas foram distribuídos em três grupos (U87FP635, U87FP635+CTM e CTM), cinco animais em cada grupo e, após a inoculação das células na região subcutânea, o crescimento tumoral foi acompanhado semanalmente com auxílio de um paquímetro. A figura 30 apresenta o crescimento do volume tumoral (mm^3) ao longo de 90 dias de experimentação.

Figura 30. Desenvolvimento de tumor subcutâneo a partir da inoculação de células U87FP635, CTM, ou mistura de células U87FP635 com CTM.

Para o grupo administrado apenas com CTM, nenhum animal evoluiu com crescimento tumoral, o que já era esperado devido a ausência de potencial tumorigênico dessas células. Para os outros dois grupos, U87FP635 e U87FP635+CTM, de cinco animais em que as células foram inoculadas, três (60%) apresentaram crescimento tumoral em cada grupo. Apesar do mesmo número de animais apresentarem crescimento tumoral para esses dois grupos, houve diferença no período de latência tumoral (período anterior a manifestação tumoral) e nos volumes tumorais. Para o grupo em que as células U87FP635 foram administradas sozinhas, a primeira manifestação de crescimento tumoral

se deu 73 dias após a inoculação, sendo que para o grupo U87FP635+CTM isso ocorreu cerca de 20 dias antes. Os volumes tumorais também foram significativamente maiores ($p \leq 0,005$) no grupo de células tumorais coadministradas com CTM.

Finalizado o período de 90 dias de acompanhamento, os camundongos foram eutanasiados e os tumores foram dissecados e pesados para comparação entre os grupos. A diferença no crescimento tumoral foi confirmada pela diferença estatística entre os valores dos pesos dos tumores ($p \leq 0,001$), fortalecendo o resultado de que o desenvolvimento tumoral *in vivo* é significativamente aumentado quando células U87FP635 estão associadas às CTM (Figura 31-A e B).

Figura 31. A) Imagens representativas dos tumores dissecados. B) Diferença estatisticamente significativa entre os valores de peso encontrados para os tumores dos grupos experimentais U87FP635 e U87FP635 associado às CTM.

Após a confirmação desses resultados, um novo ensaio *in vivo* foi realizado para estabelecer se há correlação desse efeito das CTM sobre o crescimento tumoral com o nível de TGFB1 liberado pelas CTM. Assim, comparou-se o crescimento tumoral das células U87FP635 quando administradas juntamente com as CTM transduzidas (*scrambled* ou shTGFB1). Para esse estudo, 24 camundongos BALB/c Nude foram distribuídos em dois

grupos (12 camundongos por grupo) e acompanhados por 90 dias. A evolução tumoral acompanhada no período é apresentada na Figura 32.

Figura 32. Desenvolvimento de tumor subcutâneo a partir da inoculação de células U87FP635 com CTM com ou sem silenciamento estável de *TGFB1*. CTM *scrambled* = CTM transduzidas controles. CTM shTGFB1 = CTM com silenciamento estável de *TGFB1*.

Apesar do aumento no crescimento tumoral observado quando as células tumorais são coadministradas com CTM, a segunda parte do ensaio *in vivo* demonstrou que esse efeito foi independente do nível de TGFB1 liberado pelas CTM. Embora não tenha sido encontrada diferença na latência tumoral entre esses grupos, a incidência de animais com tumores foi maior no grupo de células tumorais coadministradas com CTM *scrambled*. Dos 12 animais de cada grupo, 9 animais (75%) apresentaram tumor subcutâneo no grupo U87FP635 + CTM *scrambled* enquanto que apenas 7 animais (58%) apresentaram tumor no grupo U87FP635 + CTM shTGFB1. Não houve diferenças estatísticas para os valores dos pesos dos tumores entre os grupos experimentais (Figura 33-A e B).

A)

B)

Figura 33. A) Imagens representativas dos tumores dissecados. B) Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de peso encontrados para os tumores dos grupos experimentais U87FP635 + CTM *scrambled* e U87FP635 + CTM shTGFB1.

Durante todo o período foram respeitadas as normas do Comitê de ética em animais. A maioria dos camundongos foram acompanhados até completar 90 dias do experimento, mas caso o camundongo apresentasse condições como perda de peso corporal considerável, atingisse o volume máximo/diâmetro máximo tumoral ou apresentasse ulcerações de pele, o camundongo era eutanasiado. Abaixo, a Figura 34 apresenta a sobrevivência dos camundongos. Não houve diferença estatística para os grupos.

Figura 34. Porcentagem de camundongos vivos ao longo do experimento dos grupos experimentais U87FP635 + CTM *scrambled* e U87FP635 + CTM shTGFB1. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos experimentais.

Esses resultados sugerem que o contato célula-célula aumenta não apenas a quantidade de células tumorais U87FP635 viáveis e sua capacidade invasiva, mas também a tumorigenicidade dessas células *in vivo*. Apesar dos efeitos observados do TGFB1 secretado por CTM sobre a viabilidade de células tumorais *in vitro*, um mecanismo alternativo, dependente de contato celular, parece prevalecer com relação aos efeitos pró-tumorigênicos de CTM. Para se investigar fatores proteicos potencialmente envolvidos em efeitos parácrinos decorrentes da interação entre CTM e células de GBM, realizou-se um estudo proteômico dos MC desses tipos celulares quando cultivados isoladamente ou em conjunto.

6. ESTUDO DO SECRETOMA DE MEIOS CONDICIONADOS DE COCULTIVOS DE CTM E CÉLULAS DE GBM

Em função dos resultados anteriores terem indicado um efeito pró-tumorigênico de CTM dependente de interação direta com células tumorais, mas independente de TGFB1 secretado por CTM, partiu-se para um estudo proteômico com o intuito de identificar proteínas secretadas durante esse contato celular e investigar possíveis proteínas que possam estar envolvidas na tumorigênese de GBM. Assim, os MC concentrados de cocultivos celulares (U87+CTM *scrambled* e U87+CTM shTGFB1) e dos cultivos individuais de CTM (*scrambled* e shTGFB1) e U87FP365 foram avaliados por espectrometria de massas (LC-MS/MS). Inicialmente, as proteínas dos MC identificadas com alta fidelidade foram agrupadas na forma de *clusters* (Figura 35). A Análise dos *clusters* revelou que o perfil das proteínas contidas nos MC derivados dos dois grupos de cocultivos celulares foi muito semelhante. O mesmo foi observado quando comparado o perfil proteico das CTM transduzidas, provavelmente devido a alteração de expressão apenas do *TGFB1*. Portanto, para as análises seguintes, os dois grupos de cocultivos celulares foram agrupados como um só (grupo cocultivo), assim como as CTM *scrambled* e CTM shTGFB1 (grupo CTM).

Figura 35. *Heatmap* das proteínas identificadas e separadas na forma de *Clusters*. Visualmente é possível identificar três clusters principais U87, cocultivos celulares (U87+CTM *scrambled* e U87+CTM shTGFB1) e CTM (*scrambled* e shTGFB1).

Após os agrupamentos, o diagrama de Venn mostrou 351 proteínas presentes em MC derivados dos cocultivos celulares, 286 para o cultivo celular individual de CTM e 397 para o cultivo celular individual de U87FP635. Além de identificar 248 proteínas encontradas em comum nos três grupos de MC analisados, entre outras combinações que podem ser visualizadas no diagrama abaixo (Figura 36). Todas as proteínas identificadas estão na tabela do ANEXO 1.

Figura 36. Diagrama de Venn representando as proteínas comuns e diferentes aos três grupos de MC analisados (CTM, U87FP635 e cocultivo celular).

Do total de 351 proteínas do cocultivo celular, 10 proteínas foram encontradas apenas nesses grupos e 126 apresentaram-se diferencialmente expressas em comparação aos controles (CTM e U87FP635), sendo 52 superexpressas e 74 hipoexpressas (Tabela 3). Localizações e características dessas proteínas estão mais detalhadas no ANEXO 2.

As principais anotações funcionais para as proteínas exclusivas e diferencialmente expressas nos cocultivos celulares estão na Figura 37.

Tabela 3. Proteínas exclusivas e diferencialmente expressas (superexpressas ou hipoexpressas) encontradas em cocultivos celulares de células tumorais U87FP635 com CTM.

UniProt	Proteínas exclusivas do cocultivo celular
Q12907	lectin, mannose-binding 2
O14773	tripeptidyl peptidase I
Q9NY33	dipeptidyl-peptidase 3
Q9BTY2	fucosidase, alpha-L- 2, plasma
Q99715	collagen, type XII, alpha 1
Q02952	A kinase (PRKA) anchor protein 12
P35080	profilin 2
P31150	GDP dissociation inhibitor 1
O60888	cutA divalent cation tolerance homolog (E. coli)
Q14247	cortactin
UniProt	Proteínas superexpressas do cocultivo celular
Q9ULV4	coronin, actin binding protein, 1C
P07737	profilin 1
P15311	hypothetical protein LOC100129652; ezrin
P05121	serpin peptidase inhibitor, clade E/ nexin, plasminogen activator inhibitor type 1
Q9C0K3	actin-related Arp11
O43707	actinin, alpha 4
P16930	fumarylacetoacetate hydrolase (fumarylacetoacetase)
P28066	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 5
P26038	moesin
O75368	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like
Q92520	family with sequence similarity 3, member C
O75369	filamin B, beta (actin binding protein 278)
P35579	myosin, heavy chain 9, non-muscle
O60888	cutA divalent cation tolerance homolog (E. coli)
P35580	myosin, heavy chain 10, non-muscle
P13693	similar to tumor protein, translationally-controlled 1
Q15149	similar to Plectin 1 (PLTN) (PCN) (Hemidesmosomal protein 1) (HD1)
P06753	tropomyosin 3
Q7Z406	myosin, heavy chain 14
P60900	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 6
P61158	ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)
P13611	versican
Q9BQ16	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 3
P25786	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 1
P25787	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 2
O75635	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 7
P27797	calreticulin
P35609	actinin, alpha 2
P62158	calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta); calmodulin 2 ; calmodulin 1

UniProt	Proteínas superexpressas do cocultivo celular (Continuação)
P12814	actinin, alpha 1
P00491	nucleoside phosphorylase
P61160	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)
P58107	epiplakin 1
P68032	actin, alpha, cardiac muscle 1
P55072	valosin-containing protein
P35749	myosin, heavy chain 11, smooth muscle
Q13219	PAPPA antisense RNA; pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1
Q08043	actinin, alpha 3
Q01518	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)
Q96D15	reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain
P35237	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 6
P09238	matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)
Q9P1U1	ARP3 actin-related protein 3 homolog B (yeast)
P50395	GDP dissociation inhibitor 2
P23284	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)
Q16658	fascin homolog 1, actin-bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)
Q9UNN8	protein C receptor, endothelial (EPCR)
P08254	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
Q08629	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1
P68133	actin, alpha 1, skeletal muscle
P21810	biglycan
Q13740	hypothetical protein activated leukocyte cell adhesion molecule
UniProt	Proteínas hipoexpressas do cocultivo celular
P07355	annexin A2 pseudogene 3; annexin A2; annexin A2 pseudogene 1
P17655	calpain 2, (m/II) large subunit
P78417	glutathione S-transferase omega 1
P19021	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase
P27816	microtubule-associated protein 4
P60709	actin, beta
P08865	ribosomal protein SA pseudogene 9; 8; 58; 19; 18; 15; 61; 29; 12
P68371	tubulin, beta 2C
P61604	heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)
P16035	TIMP metalloproteinase inhibitor 2
P55786	hypothetical protein FLJ11822; aminopeptidase puromycin sensitive
Q9BYX7	POTE ankyrin domain family, member K
Q14194	collapsin response mediator protein 1
Q99497	Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7
P14649	myosin, light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle
Q06830	peroxiredoxin 1
A5A3E0	POTE ankyrin domain family, member F
P68104	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha-like 7;3; 1; alpha 1
Q05639	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2
P04083	annexin A1
P18669	phosphoglycerate mutase 1 (brain)

UniProt	Proteínas hipoexpressas do cocultivo celular (Continuação)
P22314	ubiquitin-like modifier activating enzyme 1
P60903	S100 calcium binding protein A10
P68363	hypothetical gene supported by AF081484; NM_006082; tubulin, alpha 1b
P80303	nucleobindin 2
P41250	glycyl-tRNA synthetase
P41219	peripherin
Q58FF3	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 2 (pseudogene)
P09972	aldolase C, fructose-bisphosphate
P55290	cadherin 13, H-cadherin (heart)
P14550	aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase)
P15259	phosphoglycerate mutase 2 (muscle)
P24534	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2 and factor 1 beta 2-like
P46821	microtubule-associated protein 1B
P35442	thrombospondin 2
P02751	fibronectin 1
Q8N0Y7	phosphoglycerate mutase family member 4
Q99536	vesicle amine transport protein 1 homolog (T. californica)
P80723	brain abundant, membrane attached signal protein 1
O00469	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2
P04075	aldolase A, fructose-bisphosphate
Q15121	phosphoprotein enriched in astrocytes 15
P17936	insulin-like growth factor binding protein 3
P16152	carbonyl reductase 1
Q16352	internexin neuronal intermediate filament protein, alpha
Q16555	dihydropyrimidinase-like 2
P13667	protein disulfide isomerase family A, member 4
Q16610	extracellular matrix protein 1
P30044	peroxiredoxin 5
P22392	non-metastatic cells 1, protein (NM23A)
P14625	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1
P08670	vimentin
Q09666	AHNAK nucleoprotein
P09382	lectin, galactoside-binding, soluble, 1
P63104	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein
Q5VTE0	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha-like 7; 3; alpha 1
P12110	collagen, type VI, alpha 2
Q14112	nidogen 2 (osteonidogen)
P07197	neurofilament, medium polypeptide
P60660	myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle
P07196	neurofilament, light polypeptide
P35555	fibrillin 1
Q15582	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa
Q9UI42	carboxypeptidase A4
Q9H853	tubulin, alpha 4b (pseudogene)
P26641	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma

UniProt	Proteínas hipoexpressas do cocultivo celular (Continuação)
O43854	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3
P35754	glutaredoxin (thioltransferase)
O75874	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble
P26022	pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta
O60664	mannose-6-phosphate receptor binding protein 1
P63261	actin, gamma 1
Q6S8J3	POTE ankyrin domain family, member E
P23381	tryptophanyl-tRNA synthetase

A)

B)

Figura 37. Principais anotações funcionais conforme análise por *DAVID Bioinformatics* para as proteínas A) exclusivas e B) diferencialmente expressas (hipo ou superexpressas) encontradas em cocultivos celulares de CTM com células tumorais U87FP635.

As proteínas exclusivas, superexpressas ou hipoexpressas também foram analisadas pelo programa *Ingenuity* para se obter as redes funcionais e vias de sinalizações enriquecidas ou hipoexpressas durante o cocultivo celular.

6.1. Proteínas exclusivas de cocultivo celular

As proteínas exclusivas encontradas durante o contato celular direto entre as células de GBM e CTM estão envolvidas em redes de crescimento e de proliferação celular, desenvolvimento tecidual e ciclo celular. As principais vias de sinalizações enriquecidas, com suas respectivas proteínas principais, foram Via de polaridade celular planar (PFN2); Interações de Agrin na junção neuromuscular (CTTN); Regulação da motilidade através da reorganização do citoesqueleto de actina por Rho e Vias de Sinalização Rho (PFN2).

6.2. Proteínas superexpressas de cocultivo celular

As proteínas superexpressas encontradas durante o contato celular entre as células de GBM e CTM estão envolvidas em duas redes A) Morte e sobrevivência celular, Doenças Neurológicas, esqueléticas e musculares e B) Organização, Morfologia celular, Função celular e manutenção. As principais vias canônicas enriquecidas, com suas respectivas proteínas, foram Via de sinalização do citoesqueleto de actina (ACTN4, ACTR2, EZR, MSM, PFN1); Via de sinalização RhoA (ACTR2, EZR, MSM, PFN1); Via de sinalização RhoGDI (ACTR2, EZR, GDI2, MSM) e de Ubiquitinação de proteínas (PSMA1, PSMA2, PSMA5, PSMA6).

6.3. Proteínas exclusivas e superexpressas durante o cocultivo celular

Uma análise adicional considerando as proteínas exclusivas e as superexpressas como um único grupo foi realizada. O conjunto de proteínas exclusivas e superexpressas durante o contato celular entre as células de GBM e CTM estavam envolvidas em três redes A) Organização/estrutura celular,

manutenção e função celular, morfologia celular; B) Ciclo celular, câncer, anormalidades e lesão do organismo; C) Câncer, anormalidades e lesão do organismo, morte e sobrevivência celular. As principais vias de sinalizações, com suas respectivas proteínas, foram a Via de Sinalização de citoesqueleto de actina (ACTA1, ACTC1, ACTN1, ACTN2, ACTN3, ACTN4, ACTR2, ACTR3, EZR, MSN, MYH9, MYH10, MYH11, MYH14, PFN1, PFN2); Via de sinalização de junção aderente epitelial (ACTA1, ACTC1, ACTN1, ACTN2, ACTN3, ACTN4, ACTR2, ACTR3, MYH9, MYH10, MYH11, MYH14); Via de sinalização de ILK (ACTA1, ACTC1, ACTN1, ACTN2, ACTN3, ACTN4, FLNB, MYH9, MYH10, MYH11, MYH14); Via de sinalização de extravasamento de leucócitos (ACTA1, ACTC1, ACTN1, ACTN2, ACTN3, ACTN4, CTTN, EZR, MMP3, MMP10, MSN); Via de remodelamento de junção aderente epitelial (ACTA1, ACTC1, ACTN1, ACTN2, ACTN3, ACTN4, ACTR2, ACTR3).

6.4. Proteínas hipoexpressas de cocultivo celular

Para as proteínas hipoexpressas, foram encontradas as redes A) Crescimento e proliferação celular, câncer, lesões e anomalias do organismo; B) doenças do tecido conjuntivo, câncer, lesões e anormalidades do organismo e C) Movimento celular, desenvolvimento e função de sistema cardiovascular, Desenvolvimento do organismo. As principais vias de sinalizações representadas pelas proteínas hipoexpressas durante o contato celular entre as células de GBM e CTM, com suas respectivas proteínas, foram a de Reciclagem de ascorbato (GLRX, GSTO1); Degradação da sacarose (ALDOA, ALDOC) e Transporte de vitamina-C (GLRX, GSTO1).

DISCUSSÃO

O microambiente tumoral tem sido cada vez mais apontado como importante fator envolvido na progressão do câncer. Em diversos tipos de câncer, estudos têm comprovado o tropismo de CTM em direção aos tumores e sua incorporação no estroma tumoral. Nesse contexto, sabe-se que as CTM podem ser recrutadas localmente, ou da MO, e colaboram para várias funções tumorigênicas por originar os CAFs (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011), liberar exossomos com conteúdo capaz de modular vias de sinalização, e secretar proteínas, tais como fatores de crescimento, que podem estimular a proliferação celular tumoral (HANAHAHAN; COUSSENS, 2012) bem como a formação de metástases por meio da TEM (CHAFFER; WEINBERG, 2011).

Atualmente, não há um consenso sobre a ação das CTM quando estas alcançam os sítios tumorais. Assim, para contribuir com o conhecimento do papel das CTM na tumorigênese, o presente trabalho verificou sua influência no desenvolvimento de GBM. Ainda, como o TGFB pode regular a progressão de tumores malignos (STOVER; BIERIE; MOSES, 2007) e seu papel de promotor ou supressor tumoral depende de muitos outros aspectos relacionados à sua interação no microambiente tumoral (HAN et al., 2015), também foi investigada a ação parácrina do TGFB1 liberado pelas CTM nas características tumorigênicas de GBM.

Devido ao envolvimento do TGFB na progressão tumoral e na regulação de vários processos celulares relevantes às neoplasias como proliferação celular, migração e TEM (KATSUNO; LAMOUILLE; DERYNCK, 2013; PICKUP; NOVITSKIY; MOSES, 2013), a alteração dessa via tem sido considerada como alvo para novos medicamentos anticâncer. No sistema nervoso, o fato de o *TGFB* estar superexpresso em GBM e ser indetectável em tecidos normais do cérebro, sugere sua contribuição para a tumorigênese. Em gliomas, a via do TGFB está envolvida na manutenção de CT de gliomas (IKUSHIMA et al., 2009), proliferação (BRUNA et al., 2007) e invasão celular (WESOLOWSKA et al., 2008), angiogênese e imunossupressão (PLATTEN; WICK; WELLER, 2001). Tais efeitos têm sido atribuídos, em grande parte, ao TGFB produzido pelas próprias células tumorais. Entretanto, sabe-se que células estromais tumorais

também podem produzir TGFB, mas os efeitos do TGFB produzido por essa via ainda são pouco conhecidos. Tendo como base esse tema, o presente estudo foi composto por experimentos que pudessem evidenciar possíveis efeitos no comportamento tumorigênico de uma linhagem de GBM cultivada na presença de CTM, silenciadas ou não para o gene *TGFB1*, ou na presença de MC derivados dessas CTM. Para isso, foram escolhidos ensaios que mimetizassem o microambiente tumoral e que fornecessem informações sobre as características que estão correlacionadas com a agressividade tumoral, como proliferação/viabilidade celular, migração, invasão e tumorigênese *in vivo*.

Os resultados aqui apresentados mostraram que as CTM secretam TGFB1 na forma livre, ou associada a exossomos, e que esse TGFB1 exerce efeito significativamente positivo sobre a proliferação e viabilidade das células de GBM. Tal efeito sobre a proliferação de células de GBM viáveis foi verificado apenas em cultivos celulares realizados na presença de MC contendo altos níveis de TGFB1 secretado por CTM, mas não em MC de CTM contendo baixos níveis de TGFB1 em consequência ao silenciamento do respectivo gene. Esse achado sugere a relevância da ação parácrina dessa citocina regulatória quando produzida por outros tipos celulares contidos no microambiente tumoral, o que vai ao encontro dos resultados de Sliwa e colaboradores (2007), que demonstraram que o TGFB1 liberado pelas micróglia, fonte primária de TGFB1 no cérebro em condições patológicas (LINDHOLM et al., 1992), aumenta significativamente a proliferação e a invasão celular em gliomas.

Não obstante, no microambiente tumoral, o contato estreito, físico ou químico, entre células tumorais e estromais pode afetar o comportamento dessas células assim como o perfil de proteínas por elas produzidas. Ao mimetizar essa situação *in vitro*, verificou-se novamente um efeito significativo da presença de CTM sobre a quantidade de células de GBM viáveis, embora esse efeito tenha se mostrado independente do TGFB1 secretado por CTM, mas dependente do contato físico CTM-célula tumoral. Conforme esperado, as quantificações de TGFB1 contido no MC dos cocultivos celulares confirmaram menor concentração dessa citocina em cocultivos com CTM silenciadas para o respectivo gene. Em conjunto, esses achados indicam que, isoladamente, o TGFB1 secretado por CTM é capaz de estimular a proliferação de células de GBM quando presente em altos níveis, assim como o simples contato CTM-célula tumoral. Entretanto,

de forma interessante, esse contato célula-célula parece envolver um mecanismo alternativo e predominante ao efeito parácrino do TGFB1, uma vez que a proliferação de células de GBM também pôde ser estimulada pelo contato direto com CTM contendo o gene *TGFB1* silenciado, secretando níveis significativamente inferiores dessa citocina. Como discutido abaixo, esse efeito pró-tumorigênico do contato de CTM com células de GBM, independente de TGFB1, também foi observado em outros experimentos realizados sob condições que melhor mimetizam o microambiente tumoral.

Sabe-se que o tropismo celular entre as CTM e as células tumorais é mútuo e muito importante na progressão tumoral. Neste estudo, pôde-se demonstrar que as células de GBM apresentaram quimiotaxia celular em direção às CTM. Durante o processo metastático, ocorre a remodelação da matriz extracelular com o recrutamento de células inflamatórias e de CTM que contribuem como papel central para a formação do microambiente propício para o crescimento de células tumorais disseminadas. Esse microambiente, denominado de nicho metastático, produz fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e outras proteínas importantes que atraem as células tumorais circulantes do sangue e auxiliam na sobrevivência das células tumorais já disseminadas (ERLER et al., 2009; HIRATSUKA et al., 2006, 2008; KAPLAN et al., 2005; PSAILA; LYDEN, 2009; SLEEMAN et al., 2012).

Quando células de GBM foram cultivadas como esferóides tumorais, observou-se que a mobilidade dessas células foi significativamente aumentada pelo contato direto com CTM. Por meio de ensaio de invasão celular 3D, verificou-se que as células tumorais associadas às CTM apresentaram maior comportamento invasivo, constatado pela maior quantidade de prolongamentos emitidos a partir do esferóide tumoral na matriz de invasão. Análises mais detalhadas comprovaram que tais prolongamentos invasivos continham apenas células tumorais, confirmando o aumento significativo da capacidade de invasão das células de GBM mediado pelo contato com CTM e independente de TGFB1 secretado por essas células. Esses resultados reforçam a tese de que a presença de CTM na composição estromal pode favorecer o desenvolvimento tumoral.

De forma complementar ao aumento significativo observado sobre as propriedades de proliferação e invasão de células de GBM, experimentos de

tumorigênese ectópica também evidenciaram que células estromais, especificamente as CTM, contribuem com o desenvolvimento tumoral. Quando células de GBM foram coinjetadas com CTM *in vivo*, os respectivos tumores gerados foram significativamente maiores comparativamente aos tumores gerados pela injeção de células de GBM apenas. Novamente, esse aumento na cinética de crescimento tumoral foi dependente do contato com CTM, mas independente do TGFB1 secretado por essas células. Como relevância clínica desses achados, transpõe-se que quanto maior o tamanho do tumor, maior é a chance de desenvolvimento de metástases.

Recentemente, o modelo de progressão estromal envolvido no processo metastático, que consiste na intensa interação mútua das células tumorais com as células estromais, foi proposto por Sleeman e colaboradores (2012). Inicialmente, os tumores primários apresentam um aumento da instabilidade genômica das células tumorais o qual causa uma série de mutações e aberrações genéticas associadas às mudanças epigenéticas. Em paralelo, ocorre a progressão estromal, processo o qual as células estromais contribuem com todos os fatores liberados, podendo modificar as propriedades de diferenciação das células tumorais, por exemplo por meio da TEM e transição mesenquimal-epitelial que regulam as CT de câncer. Durante o processo, o rompimento da membrana basal permite a subsequente invasão tumoral, que expõe as células tumorais a novos microambientes e consequentemente estimula a progressão estromal. Quando ocorre a colonização metastática, todo o mecanismo mútuo, gradual e dinâmico apresentado nos focos primários se repetem nos focos secundários (SLEEMAN et al., 2012). Importante ressaltar que conforme o tumor primário cresce, quantidades crescentes de fatores indutores de nicho metastáticos se acumulam sistemicamente, resultando na indução da progressão do estroma no local secundário e formação de nichos metastático (SLEEMAN et al., 2012).

Embora metástases sejam raramente observadas em pacientes com GBM devido ao rápido desenvolvimento desse tipo de tumor, o GBM é caracterizado como um tumor altamente infiltrativo e apresenta alta resistência aos tratamentos vigentes, proporcionando curta sobrevida aos pacientes pós-diagnóstico. Essa alta capacidade de invadir o parênquima cerebral é um dos fatores que impossibilita sua completa ressecção cirúrgica, o que, aliado à alta

taxa proliferativa desse tumor, promove recidiva tumoral. Portanto, torna-se relevante a ação das CTM sobre células de GBM observadas no presente estudo, já que estimulou tanto a proliferação quanto a invasão tumoral, processos que contribuem com a progressão tumoral, assim como a velocidade de crescimento tumoral *in vivo*.

Além do efeito parácrino do TGFB1 secretado por CTM sobre as propriedades pró-tumorigênicas de GBM, a identificação do mecanismo pró-tumorigênico alternativo de CTM, dependente de contato célula-célula e independente de TGFB1, instigou a avaliação de outras proteínas secretadas durante o contato CTM-célula tumoral. Assim, optou-se por investigar outras proteínas potencialmente envolvidas nesse fenômeno por meio de estudo proteômico comparativo de MC em condições de contato celular direto e MC dos cultivos das células isoladas. Esse método possibilitou a identificação de proteínas presentes e diferencialmente expressas em MC derivados dos cocultivos celulares.

Apesar de ter sido confirmada por ELISA a secreção de TGFB1 pelas CTM, U87MG e cocultivos celulares, a proteômica dos MC não foi capaz de detectar consistentemente a presença do TGFB1. Esse fato pode ter ocorrido devido à variedade de proteínas mais abundantes presentes em MC, quando comparadas ao TGFB1. Nesse cenário, as proteínas encontradas e identificadas foram analisadas com o objetivo de selecionar as vias de sinalização enriquecidas, ou hiporreguladas, durante a interação das células de GBM e CTM.

Do total de proteínas identificadas, 52 foram superexpressas, 74 hipoexpressas e 10 foram detectadas exclusivamente durante o cocultivo celular direto, independente de sua origem, mostrando que a interação CTM-célula tumoral é capaz de modular fatores liberados no meio extracelular, ainda que sob condições *in vitro*, e que essas diferenças podem estar correlacionadas com o comportamento tumoral mais agressivo observado *in vitro* e *in vivo*. A análise dessas proteínas revelou que cerca de 80% das proteínas identificadas são encontradas em exossomos secretados no espaço extracelular. Esse resultado sugere que, apesar de a comunicação celular poder ocorrer por fatores solúveis liberados no meio extracelular, a comunicação por meio da liberação de exossomos parece ser altamente importante nesse processo. Importante ressaltar que neste estudo, apenas o conteúdo proteico dos exossomos foi

avaliado. A literatura atual demonstra que os exossomos não só carregam proteínas, mas também mRNAs e microRNAs (SKOG et al., 2008; TAYLOR; GERCEL-TAYLOR, 2008) que podem agir localmente ou serem transportados através do sangue para locais mais distantes para entregar seu conteúdo e interagir com células alvo, alterando seus comportamentos (THÉRY; OSTROWSKI; SEGURA, 2009).

Está bem estabelecida que a comunicação entre diversos tipos celulares ocorre principalmente por meio da secreção de proteínas que alcançam seus receptores na célula-alvo. Além desse mecanismo, a comunicação intercelular consequente da liberação de exossomos tem se tornando tema de interesse na pesquisa científica. Funcionalmente, o conteúdo dos exossomos pode induzir, amplificar e/ou modular respostas imunes, bem como alterar propriedades funcionais como capacidades migratória ou metastática, e transferir material genético afetando a célula receptora.

Skog e colaboradores (2008) demonstraram que as células de GBM liberam exossomos contendo mRNA, microRNA e proteínas angiogênicas. Além desses exossomos estimularem a proliferação celular em uma linhagem de glioma, indicando ação autócrina, os exossomos exerceram ação parácrina em células endoteliais estimulando a formação de túbulos/vasos sanguíneos. Efeitos parácrinos de exossomos também foram demonstrados em células tumorais na presença de exossomos derivados de CTM, sendo associados tanto na progressão tumoral quanto na supressão tumoral (YU; ZHANG; LI, 2014). Recentemente, em células de GBM, efeitos variados ocasionados pela internalização de exossomos derivados de CTM de diversas fontes foram relatados. Enquanto que os exossomos derivados de CTM-TA estimularam a proliferação celular de GBM, os exossomos de CTM-MO e de CTM-Cuh inibiram a proliferação e induziram apoptose (DEL FATTORE et al., 2015). Outro estudo recente, em câncer de mama, demonstrou que a internalização de exossomos derivados de CTM foi associada com a aquisição de novas propriedades das células tumorais, alterando funcionalidades celulares e fornecendo a capacidade de reorganizar o microambiente tumoral (YANG et al., 2015).

De todas as proteínas encontradas no presente estudo, muitas já foram descritas com ação em células tumorais e encontradas em exossomos e no meio extracelular. Para as análises, foram consideradas proteínas mais relevantes ao

tema, e que poderiam explicar parte dos resultados obtidos durante a interação com contato direto entre as células tumorais e CTM. No entanto, sabe-se que a comunicação celular é complexa e que provavelmente um conjunto de proteínas associadas e com funções semelhantes possam ser responsáveis por alterações no comportamento tumoral.

Os MC derivados de cocultivos celulares com contato físico entre CTM e GBM apresentaram proteínas exclusivas, i.e. provavelmente produzidas em função do contato célula-célula, das quais algumas já foram descritas com ação em células tumorais. Vias importantes para movimentação celular como Via de polaridade celular planar; Interações de Agrin na junção neuromuscular; Regulação da motilidade através da reorganização do citoesqueleto de actina por Rho e Vias de Sinalização Rho apresentaram-se enriquecidas nessa condição.

Uma das proteínas expressas exclusivamente com o contato celular foi a Profilin 2 (PFN2). Acredita-se que PFN2 regule a polimerização da actina como resposta a sinais extracelulares. Um estudo de Kim e colaboradores (2015) indicou que a *PFN2* afeta o potencial metastático e o padrão de pluripotência de CT de câncer colorretal por meio da regulação de marcadores envolvidos na TEM (*E-cadherin* e *snail*) e na pluripotência (*CD133*, *SOX2*, e *B-catenin*). Além disso, análises por *microarray* de um painel de 60 linhagens celulares de diversos tipos de câncer humano, dentre elas uma de GBM (SNV-19, derivada da linhagem U251), identificaram um perfil genético de radiosensibilidade das células tumorais. Quando encontrou-se baixa expressão de *PFN2*, observou-se que as células eram mais radiosensíveis (KIM et al., 2012). Nesses tumores, quando o perfil de expressão de *PFN2* está associado a outros sete genes relacionados à adesão celular (*ACTN1*, *CCND1*, *HCLS1*, *ITGB5*, *PTPRC*, *RAB13*, *WAS*), observa-se um enriquecimento da via de sinalização de integrina e TEM. As integrinas são moléculas que se ligam à matriz extracelular e regulam diversas funções nos tumores, como migração, invasão, proliferação e sobrevivência. Ainda, as integrinas fazem parte da ativação e modulação da via do TGF β , que é bem caracterizada como indutora de TEM. Posteriormente, um outro estudo avaliou esse painel em 463 amostras de GBM e o resultado mostrou que dos pacientes tratados com radioterapia, aqueles que apresentaram pior

sobrevida possuíam tumores radorresistentes com enriquecimento da via de TEM (MENG et al., 2014).

Outra proteína exclusiva relevante foi a *Cortactin* (CTTN), uma proteína do citoesqueleto frequentemente superexpressa em câncer, principalmente do tipo invasivo. A expressão de *CTTN* tem sido associada a agressividade tumoral em leucemia (GATTAZZO et al., 2014), câncer colorretal (QIU; ZHU; MA, 2011), câncer de esôfago (LUO; WANG, 2007), hepatoma (ZHOU et al., 2014) e outros. Essa proteína é considerada reguladora multifuncional do complexo Arp2/3 atuando na capacidade de migração e invasão celular, com papel importante para a formação de invadopodia, que são protrusões celulares de actina associadas com a degradação de matriz extracelular pelas células de câncer (WEAVER, 2008).

Aparentemente, a CTTN também regula a secreção de fatores de crescimento ou de sobrevivência celular. Em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, a presença da CTTN foi essencial para a secreção de diversos fatores com as MMPs sugerindo que sua expressão possa influenciar a secreção autócrina de múltiplos fatores como fatores de crescimento e angiogênicos, proteases e moléculas da matriz extracelular, agindo na agressividade tumoral (CLARK; WEAVER, 2008; CLARK et al., 2007). Recentemente, a superexpressão de *CTTN* foi confirmada em gliomas quando comparada aos tecidos não neoplásicos. Essa proteína demonstrou regular a formação de lamelipodia no processo envolvendo o complexo Arp2/3. Após a manipulação da expressão por siRNA, houve inibição da habilidade de migração e invasão celular, acarretando em redução em tamanho e tempo de persistência de lamelipodia das células tumorais (WANG et al., 2010).

Adicionalmente às proteínas exclusivamente detectadas durante o cocultivo celular, diversas proteínas se apresentaram super ou hipoexpressas nessa condição. Quando consideradas as proteínas exclusivas e as proteínas superexpressas como um único grupo, novas vias de sinalização se mostraram enriquecidas, sendo representadas pela Via de Sinalização de citoesqueleto de actina; Via de sinalização de junção aderente epitelial; Via de sinalização de extravasamento de leucócitos; Via de remodelamento de junção aderente epitelial.

Das proteínas superexpressas, ressalta-se o papel da Ezrin (EZR) na migração e invasão de GBM (WICK et al., 2001). Ezrin, radixin e moesin (ERM) e NF2 formam a família de proteínas ERM e agem conectando o citoesqueleto de actina às proteínas de membrana. Apesar de *NF2* ser considerado um supressor tumoral, *EZR* tem sido associada a invasão em diversos tipos de câncer, mas o mecanismo de contribuição em metástases ainda é desconhecido (BRUCE et al., 2007; ILMONEN et al., 2005; KHANNA et al., 2004; OHTANI et al., 1999; PANG et al., 2004; TOKUNOU et al., 2000; WENG et al., 2005). Em gliomas, *EZR* foi correlacionada com proliferação celular (MORALES et al., 2010) e o aumento da expressão demonstrou ser proporcional ao aumento da malignidade em tumores astrocíticos, demonstrando alta marcação em GBM (GEIGER et al., 2000; TYNNINEN et al., 2004).

Outra proteína superexpressa com papel interessante é *activated leukocyte cell adhesion molecule* (ALCAM/CD166), uma molécula que está altamente expressa em células progenitoras de GBM (CD133+). Kijima e colaboradores (2012) demonstraram que a quantidade de células positivas para ALCAM correlacionou-se com o grau histopatológico em gliomas. Inclusive, as sobrevidas global e livre da doença dos pacientes foram significativamente piores em pacientes com tumores expressando mais de 60% de células ALCAM+. Além disso, ensaios com linhagens celulares na presença de sobrenadantes de GBM com superexpressão de uma isoforma solúvel de ALCAM demonstraram aumento da invasão tumoral *in vitro* e a superexpressão de *ALCAM* promoveu a progressão tumoral *in vivo*. Recentemente, um estudo envolvendo microambiente tumoral em modelos animais de GBM utilizou a expressão desse marcador, juntamente com outros (CD44, CD91), para identificar uma população de células com características semelhantes às CTM presentes nos tumores. Os resultados demonstraram a importância dessas células infiltradas no tumor na progressão tumoral (BEHNAN et al., 2014).

Por fim, as proteínas hipoexpressas durante o contato celular entre as células de GBM e CTM demonstram hipofunção nas vias de sinalização de Reciclagem de ascorbato; Degradação da sacarose e Transporte de vitamina-C. Apesar de ter sido encontrada hipoexpressão de algumas proteínas com ação pró-tumorigênica, como a *Glutathione S-transferase Omega-1* (GSTO1) e Aldolase-A (ALDOA), também encontramos proteínas hipoexpressas com papel

tanto promotor como supressor tumoral, como a *TIMP Metallopeptidase Inhibitor 2* (TIMP2) e *Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3* (IGFBP3).

A GSTO1 faz parte do metabolismo antioxidativo. No câncer, é muito comum as células adquirirem características de resistência aos tratamentos por meio da superexpressão de enzimas que diminuem a toxicidade dos agentes terapêuticos. Altos níveis de glutatona têm sido associados com o desenvolvimento de resistência a diversas drogas, o que têm estimulado empresas farmacêuticas a pesquisar e gerar agentes anticâncer mais eficientes com ação na superfamília das glutatonas (TOWNSEND; TEW, 2003). GSTO1 possui papel antiapoptótico na resistência celular à toxicidade da cisplatina e sua superexpressão aparentemente está associada com a ativação de vias de sobrevivência (AKT e ERK1/2) e inibição de vias apoptóticas (JNK1) (PIAGGI et al., 2010).

No câncer, a proliferação celular pode ocorrer devido ao aumento da captação de glicose e de glicólise independentemente da concentração de oxigênio nas células, fenômeno conhecido como Efeito de Warburg. Uma das enzimas que fazem parte do metabolismo de glicose e que está frequentemente presente em tumores é a ALDOA (ASAKA et al., 1994; LINCET; ICARD, 2015). A ALDOA está envolvida em diversas funções além da função glicolítica, como na transdução de sinais (KIM et al., 2002), tráfego de vesículas (KAO et al., 1999) e mobilidade celular (BUSCAGLIA et al., 2006) e apresentou-se hipoexpressa nos cocultivos celulares. Na literatura, o *knockdown* de ALDOA em fibroblastos (NIH-3T3) transformados reduziu a proliferação celular (RITTERSON LEW; TOLAN, 2012) e, mais recentemente, Du e colaboradores (2014) demonstraram o potencial de ALDOA na capacidade metastática em carcinoma de pulmão.

Parte das proteínas hipoexpressas encontradas nos cocultivos celulares possui efeitos antitumorigênicos em algumas condições, como a TIMP2. As TIMPs são inibidoras de MMPs, proteínas conhecidas por degradarem todos os componentes estruturais da matriz extracelular e contribuírem para a progressão do tumor (HANAHAN; COUSSENS, 2012). Superexpressões de TIMPs foram correlacionadas com a redução de metástases em animais (DECLERCK; IMREN, 1994; KHOKHA, 1994; KOOP et al., 1994; MONTGOMERY et al., 1994) e, especificamente na TIMP2, agiu como um supressor da invasão tumoral,

causando redução do comportamento invasivo de células de câncer pancreático e de melanomas (RIGG; LEMOINE, 2001; VALENTE et al., 1998).

Em GBM, um complexo balanço entre *TIMP2* e *MMP-2* foi sugerido por Lu e colaboradores (2004). Embora a superexpressão de *TIMP2* em células U87MG tenha demonstrado aumento de ativação de *MMP-2* e aumento da invasão em células de GBM, a administração exógena ou a superexpressão de recombinante de *TIMP2* em quantidades mais elevadas em células U87MG resultou em inibição de *MMP-2*. Estes resultados mostram que efeitos diferentes em GBM podem ser encontrados dependendo do nível de aumento da expressão de *TIMP2*. Em células endoteliais humanas, a *TIMP2* inibe a reposta mitogênica a fatores de crescimento, como VEGF e FGF2 *in vitro*, e angiogênese *in vivo*, revelando um componente importante de efeito antiangiogênico independente da inibição de MMPs (SEO et al., 2003).

Por fim, a proteína IGFBP3, que também esteve hipoexpressa, demonstra efeitos controversos no câncer, revelando papéis antiproliferativos e apoptóticos (FANG et al., 2008; MEHTA et al., 2011) ou promovendo proliferação celular e sobrevivência (BURROWS et al., 2006; GRKOVIC et al., 2013). Ainda, foram encontrados níveis plasmáticos aumentados de IGFBP3 em pacientes com melhor prognóstico no câncer de próstata (SHARIAT et al., 2002) e câncer colorretal (FUCHS et al., 2008), assim como também foram associados com aumento de sobrevida em GBM (ELSTNER et al., 2011; YANG et al., 2014a). Um estudo de superexpressão de *IGFBP3* em células de GBM mostrou inibição da proliferação celular *in vitro* e da formação de tumores *in vivo* (YANG et al., 2014b).

Em suma, os principais achados do presente trabalho indicam que CTM produzem efeitos pró-tumorigênicos na linhagem celular de GBM estudada (U87FP635) e que esses efeitos podem ser induzidos por dois mecanismos alternativos e independentes: ação parácrina de TGFB1 secretado por CTM e ação mediada por contato célula-célula. Nas condições experimentais testadas, o mecanismo dependente de contato célula-célula demonstrou ser predominante. Ainda, o cultivo de células de GBM em contato físico com CTM alterou a produção de algumas proteínas liberadas no meio de cultivo, que podem estar envolvidas nos efeitos pró-tumorigênicos encontrados. Na literatura, diversas dessas proteínas foram reportadas no câncer, inclusive em

GBM. Quando encontradas em conjunto, algumas dessas proteínas ativam vias de sinalização que podem estar associadas com os comportamentos de agressividade tumoral observados neste estudo, como aumento da proliferação, migração e invasão tumoral.

CONCLUSÕES

- 1) CTM derivadas de medula óssea, de tecido adiposo e da veia de cordão umbilical apresentam expressão específica de *TGFB1*. CTM derivadas da veia de cordão umbilical secretam altos níveis de TGFB1 em meios condicionados, na forma livre ou por meio de exossomos;
- 2) A proteína TGFB1 presente em alta concentração em meios condicionados derivados de CTM de veia de cordão umbilical aumentou significativamente a proliferação e a viabilidade de células de GBM U87FP635;
- 3) As propriedades de proliferação, migração e invasão de células de GBM U87FP635 também foram significativamente aumentadas pelo contato físico dessas células tumorais com CTM derivadas de veia do cordão umbilical. Esse efeito foi independente do nível basal de TGFB1 liberado pelas CTM;
- 4) O contato com CTM de veia de cordão umbilical aumentou significativamente a tumorigenicidade de células de GBM U87FP635 *in vivo*. Tal efeito não foi influenciado por níveis de TGFB1 liberados pelas CTM;
- 5) O contato entre CTM de veia de cordão umbilical e células de GBM U87FP635 altera a quantidade e o tipo de proteínas secretadas em meios condicionados de cocultivos celulares, comparativamente aos meios condicionados de cultivos individuais dessas células. Dez proteínas envolvidas em redes de crescimento e de proliferação celular, desenvolvimento tecidual e ciclo celular foram exclusivamente detectadas durante o contato celular direto entre as células de GBM e CTM, oito das quais reportadas como componentes de exossomos.

RESUMO

Células-tronco mesenquimais (CTM) apresentam tropismo a tumores, sendo importantes componentes do estroma tumoral. No cérebro, o nicho perivascular é uma importante fonte de CTM, as quais podem contribuir direta e/ou indiretamente para o desenvolvimento de tumores, embora os mecanismos envolvidos sejam pouco conhecidos. No presente trabalho, investigou-se a influência de CTM sobre a proliferação, capacidade invasiva e tumorigenicidade de células de Glioblastoma (GBM) humano. Sabe-se que CTM produzem TGFB1, uma citocina multifuncional envolvida em imunomodulação, proliferação, migração e transição epitelial-mesenquimal de células tumorais. Experimentos *in vitro*, realizados com meios condicionados de CTM de cordão umbilical humano com silenciamento permanente do gene *TGFB1*, demonstraram que o TGFB1 secretado por CTM é capaz de aumentar significativamente a proliferação e viabilidade de células de GBM humano da linhagem U87FP635. Esses resultados revelam uma importante ação parácrina dessa citocina regulatória, quando produzida por outros tipos celulares contidos no microambiente tumoral. Entretanto, sob condições experimentais que melhor mimetizam o microambiente tumoral, detectou-se que CTM também afetam o comportamento de células tumorais por um mecanismo alternativo, dependente de contato celular, mas independente dos níveis de TGFB1 secretados pelas CTM. Sob condições de cocultivo celular, envolvendo contato físico entre CTM e células de GBM U87FP635, detectou-se um aumento significativo na quantidade de células tumorais viáveis. Quando cultivadas na forma de esferoides tumorais, o contato com CTM aumentou a capacidade invasiva das células U87FP635. Finalmente, em modelo *in vivo* ectópico de GBM, células U87FP635 geraram tumores mais desenvolvidos quando coinjetadas com CTM. Esses efeitos pró-tumorigênicos foram observados tanto em contato com CTM controles, quanto com CTM contendo o gene *TGFB1* permanentemente silenciado. Assim, esses achados indicam que CTM podem exercer efeitos pró-tumorigênicos por dois mecanismos alternativos e independentes: ação parácrina de TGFB1 secretado por CTM e ação mediada por contato célula-célula. Nas condições experimentais testadas, o mecanismo dependente de

contato célula-célula demonstrou ser predominante. O estudo proteômico do secretoma dessas células identificou 126 proteínas diferencialmente expressas além de 10 proteínas exclusivamente detectadas em meios condicionados de cocultivos de CTM com células de GBM U87FP635. Cerca de 80% dessas proteínas exclusivamente secretadas pelo contato célula-célula são componentes de exossomos e estão envolvidas em proliferação celular e desenvolvimento tecidual. Esses resultados apontam uma interação dinâmica de comunicação entre CTM e células tumorais, e revelam algumas proteínas interessantes potencialmente envolvidas em uma ação pró-tumorigênica de CTM mediada por contato celular.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) display tropism to tumors, being recruited to its microenvironment where they comprise the tumor stroma. In brain, perivascular niche is a substantial source of MSC. Although mechanisms involved are poorly understood, MSC may directly and/or indirectly contribute to tumor development. Herein, the influence of MSC on the proliferation, invasiveness and tumorigenicity of human glioblastoma cells (GBM) was investigated. Moreover, since MSC releases TGFB1, a multifunctional cytokine with roles in immunomodulation, proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition of tumor cells, we analyzed if MSC-secreted TGFB1 affects GBM behavior. *In vitro* studies performed in the presence of conditioned media from human umbilical cord MSC with a stable *TGFB1* gene expression knockdown showed that MSC-secreted TGFB1 is able to significantly increase the proliferation and viability of a GBM cell line (U87FP635). These results revealed an important paracrine effect of this regulatory cytokine when secreted by other cell types in tumor microenvironment. However, under experimental conditions that better mimic the tumor microenvironment, it was found that MSC also affect tumor cell behavior by an alternative mechanism dependent on cell-cell contact, but independent of TGFB1 levels secreted by MSC. The cell-cell contact between MSC and GBM U87FP635 significantly enhanced tumor viable cells. Additionally, the spheroid tumor cell culture with MSC cell contact increased the invasiveness of U87FP635 cells. Finally, *in vivo* ectopic implantation model showed more developed tumors when GBM U87FP635 cells were coinjected with MSC. These pro-tumorigenic effects were found both in cell-cell contact with control MSC, as with MSC containing *TGFB1* gene expression knockdown. Thus, these findings indicate that MSC can exert pro-tumorigenic effects by two alternative and independent mechanisms: paracrine action of TGFB1 secreted by MSC and action mediated by cell-cell contact. In the present experimental conditions, the cell-cell contact-dependent mechanism was predominant. The secretome proteomic study of those cells identified 126 differentially expressed proteins as well as 10 proteins exclusively detected in conditioned media from GBM U87FP635 cell cocultures with MSC. About 80% of proteins uniquely

secreted by cell-cell contact are exosomes components and are involved in cell proliferation and tissue development. These results indicate a dynamic interaction of communication between MSC and tumor cells and reveal some interesting proteins potentially involved in a MSC pro-tumorigenic action mediated by cell contact.

REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, S. et al. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 61, n. 1, p. 25–41, fev. 2013.
- AKIMOTO, K. et al. Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells inhibit, but adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote, glioblastoma multiforme proliferation. **Stem cells and development**, v. 22, n. 9, p. 1370–86, 2013.
- ALIFIERIS, C.; TRAFALIS, D. T. Glioblastoma Multiforme: Pathogenesis and Treatment. **Pharmacology & therapeutics**, v. 152, p. 63–82, 2 maio 2015.
- ANIDO, J. et al. TGF- β Receptor Inhibitors Target the CD44^{high}/Id1^{high} Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma. **Cancer Cell**, v. 18, n. 6, p. 655–668, 2010.
- APPAIX, F. et al. Brain mesenchymal stem cells: The other stem cells of the brain? **World journal of stem cells**, v. 6, n. 2, p. 134–43, 26 abr. 2014.
- ASAKA, M. et al. Alteration of aldolase isozymes in serum and tissues of patients with cancer and other diseases. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 8, n. 3, p. 144–8, jan. 1994.
- ASHLEY, D. M. et al. Endogenous expression of transforming growth factor beta1 inhibits growth and tumorigenicity and enhances Fas-mediated apoptosis in a murine high-grade glioma model. **Cancer research**, v. 58, n. 2, p. 302–9, 15 jan. 1998.
- BEHNAN, J. et al. Recruited brain tumor-derived mesenchymal stem cells contribute to brain tumor progression. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 32, n. 5, p. 1110–23, maio 2014.
- BERGFELD, S. A.; DECLERCK, Y. A. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 29, n. 2, p. 249–261, 22 abr. 2010.
- BHOWMICK, N. A. et al. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. **Molecular biology of the cell**, v. 12, n. 1, p. 27–36, jan. 2001.
- BROEKMAN, M. L. D. et al. Glioblastoma multiforme in the posterior cranial fossa in a patient with neurofibromatosis type I. **Case reports in medicine**, v. 2009, p. 757898, jan. 2009.
- BRUCE, B. et al. Expression of the cytoskeleton linker protein ezrin in human cancers. **Clinical & experimental metastasis**, v. 24, n. 2, p. 69–78, jan. 2007.
- BRUNA, A. et al. High TGF β -Smad Activity Confers Poor Prognosis in Glioma Patients and Promotes Cell Proliferation Depending on the Methylation of the PDGF-B Gene. **Cancer Cell**, v. 11, n. 2, p. 147–160, fev. 2007.

BURROWS, C. et al. Insulin-like growth factor binding protein 3 has opposing actions on malignant and nonmalignant breast epithelial cells that are each reversible and dependent upon cholesterol-stabilized integrin receptor complexes. **Endocrinology**, v. 147, n. 7, p. 3484–500, jul. 2006.

BUSCAGLIA, C. A. et al. Characterization of an aldolase-binding site in the Wiskott-Aldrich syndrome protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 3, p. 1324–31, 20 jan. 2006.

CARRO, M. S. et al. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. **Nature**, v. 463, n. 7279, p. 318–25, 21 jan. 2010.

CDC. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr61/nvsr61_04.pdf>. Acesso em: 26 out. 2015.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 331, n. 6024, p. 1559–64, 25 mar. 2011.

CHEN, R. H. et al. Suppression of transforming growth factor-beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. **Oncogene**, v. 17, n. 15, p. 1959–68, 15 out. 1998.

CHENG, H.-B. et al. IDH1 mutation is associated with improved overall survival in patients with glioblastoma: a meta-analysis. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 34, n. 6, p. 3555–9, dez. 2013.

CHIEN, L.-Y. et al. In vivo magnetic resonance imaging of cell tropism, trafficking mechanism, and therapeutic impact of human mesenchymal stem cells in a murine glioma model. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3275–84, abr. 2011.

CHISTIAKOVA, I. A.; POLIANSKAIA, G. G. [Influence of human fetal mesenchymal stem cells on glioma cell proliferation. A consequence of cellular crosstalk]. **Tsitologiia**, v. 56, n. 11, p. 800–8, jan. 2014.

CIRRI, P.; CHIARUGI, P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. **American journal of cancer research**, v. 1, n. 4, p. 482–97, jan. 2011.

CLARK, E. S. et al. Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. **Cancer research**, v. 67, n. 9, p. 4227–35, 1 maio 2007.

CLARK, E. S.; WEAVER, A. M. A new role for cortactin in invadopodia: regulation of protease secretion. **European journal of cell biology**, v. 87, n. 8-9, p. 581–90, set. 2008.

COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 1367–72, dez. 2008.

DANIELS, L. B. et al. Glioblastoma multiforme in two non-nuclear family members. **The Journal of the Louisiana State Medical Society: official organ of the Louisiana State Medical Society**, v. 159, n. 4, p. 215–22, jan. 2007.

DASARI, V. R. et al. Upregulation of PTEN in glioma cells by cord blood mesenchymal stem cells inhibits migration via downregulation of the PI3K/Akt pathway. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10350, jan. 2010.

DAVID, H. Rudolf Virchow and modern aspects of tumor pathology. **Pathology, research and practice**, v. 183, n. 3, p. 356–64, jun. 1988.

DAVIES, M. et al. Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF-beta1 involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways. **Journal of cellular biochemistry**, v. 95, n. 5, p. 918–31, 1 ago. 2005.

DECLERCK, Y. A.; IMREN, S. Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 30A, n. 14, p. 2170–80, jan. 1994.

DEL FATTORE, A. et al. Differential effects of extracellular vesicles secreted by mesenchymal stem cells from different sources on glioblastoma cells. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 15, n. 4, p. 495–504, 16 jun. 2015.

DENNIS, J. E.; CHARBORD, P. Origin and differentiation of human and murine stroma. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 20, n. 3, p. 205–14, jan. 2002.

DERYNCK, R.; AKHURST, R. J. Differentiation plasticity regulated by TGF- β family proteins in development and disease. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 9, p. 1000–1004, set. 2007.

DERYNCK, R.; AKHURST, R. J.; BALMAIN, A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nature genetics**, v. 29, n. 2, p. 117–29, out. 2001.

DIREKZE, N. C. et al. Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. **Cancer research**, v. 64, n. 23, p. 8492–5, 1 dez. 2004.

DJOUAD, F. et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. **Blood**, v. 102, n. 10, p. 3837–3844, 2003.

DU, S. et al. Fructose-bisphosphate aldolase a is a potential metastasis-associated marker of lung squamous cell carcinoma and promotes lung cell tumorigenesis and migration. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e85804, jan. 2014.

DUMONT, N.; ARTEAGA, C. L. Targeting the TGF beta signaling network in human neoplasia. **Cancer cell**, v. 3, n. 6, p. 531–6, jun. 2003.

DWYER, R. M. et al. Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer. **Stem cell research & therapy**, v. 1, n. 3, p. 25, jan. 2010.

- EDLUND, S. et al. Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. **Molecular biology of the cell**, v. 13, n. 3, p. 902–14, mar. 2002.
- ELSTNER, A. et al. Identification of diagnostic serum protein profiles of glioblastoma patients. **Journal of neuro-oncology**, v. 102, n. 1, p. 71–80, mar. 2011.
- EREZ, N. et al. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. **Cancer cell**, v. 17, n. 2, p. 135–47, 17 fev. 2010.
- ERLER, J. T. et al. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. **Cancer cell**, v. 15, n. 1, p. 35–44, 6 jan. 2009.
- FANG, P. et al. IGFBP-3 sensitizes prostate cancer cells to interferon-gamma-induced apoptosis. **Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society**, v. 18, n. 1, p. 38–46, fev. 2008.
- FENG, X.-H.; DERYNCK, R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 21, p. 659–93, jan. 2005.
- FISHER, J. L. et al. Epidemiology of Brain Tumors. **Neurologic Clinics**, v. 25, n. 4, p. 867–890, nov. 2007.
- FRANCO, O. E. et al. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 21, n. 1, p. 33–9, fev. 2010.
- FUCHS, C. S. et al. Plasma insulin-like growth factors, insulin-like binding protein-3, and outcome in metastatic colorectal cancer: results from intergroup trial N9741. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 14, n. 24, p. 8263–9, 15 dez. 2008.
- GATTAZZO, C. et al. Cortactin, another player in the Lyn signaling pathway, is over-expressed and alternatively spliced in leukemic cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Haematologica**, v. 99, n. 6, p. 1069–77, jun. 2014.
- GE, R. et al. Selective inhibitors of type I receptor kinase block cellular transforming growth factor-beta signaling. **Biochemical pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 41–50, 1 jul. 2004.
- GEIGER, K. D. et al. Ezrin immunoreactivity is associated with increasing malignancy of astrocytic tumors but is absent in oligodendrogliomas. **The American journal of pathology**, v. 157, n. 6, p. 1785–93, dez. 2000.
- GLOBUS, J.; STRAUSS, I. Spongioblastoma multiforme. **Arch Neurol Psychiatry**, v. 14, p. 139–151, 1925.
- GOLD, L. I. The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. **Critical**

reviews in oncogenesis, v. 10, n. 4, p. 303–60, jan. 1999.

GOTZMANN, J. et al. Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. **Mutation research**, v. 566, n. 1, p. 9–20, jan. 2004.

GRIPS, E. et al. [Glioblastoma multiforme as a manifestation of Turcot syndrome]. **Der Nervenarzt**, v. 73, n. 2, p. 177–82, fev. 2002.

GRKOVIC, S. et al. IGFBP-3 binds GRP78, stimulates autophagy and promotes the survival of breast cancer cells exposed to adverse microenvironments. **Oncogene**, v. 32, n. 19, p. 2412–20, 9 maio 2013.

HALL, B.; ANDREEFF, M.; MARINI, F. The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles. **Handbook of experimental pharmacology**, n. 180, p. 263–83, jan. 2007.

HAN, J. et al. TGF- β signaling and its targeting for glioma treatment. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 3, p. 945–55, jan. 2015.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer cell**, v. 21, n. 3, p. 309–22, 20 mar. 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.

HARTMANN, C. et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. **Acta neuropathologica**, v. 120, n. 6, p. 707–18, dez. 2010.

HIRATSUKA, S. et al. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. **Nature cell biology**, v. 8, n. 12, p. 1369–75, dez. 2006.

HIRATSUKA, S. et al. The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. **Nature cell biology**, v. 10, n. 11, p. 1349–55, nov. 2008.

HO, I. A. W. et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells suppress human glioma growth through inhibition of angiogenesis. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 31, n. 1, p. 146–55, jan. 2013.

HONG, X. et al. Antitumor treatment using interleukin-12-secreting marrow stromal cells in an invasive glioma model. **Neurosurgery**, v. 64, n. 6, p. 1139–46; discussion 1146–7, jun. 2009.

HUNG, S.-C. et al. Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v.

11, n. 21, p. 7749–56, 1 nov. 2005.

IKUSHIMA, H. et al. Autocrine TGF- β Signaling Maintains Tumorigenicity of Glioma-Initiating Cells through Sry-Related HMG-Box Factors. **Cell Stem Cell**, v. 5, n. 5, p. 504–514, 2009.

ILMONEN, S. et al. Ezrin in primary cutaneous melanoma. **Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 18, n. 4, p. 503–10, abr. 2005.

INCA. **Estimativa Incidência de câncer no Brasil**. Livro v. 1, 2014.

ISHII, G. et al. Bone-marrow-derived myofibroblasts contribute to the cancer-induced stromal reaction. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 309, n. 1, p. 232–40, 12 set. 2003.

JENNINGS, M. T.; PIETENPOL, J. A. The role of transforming growth factor beta in glioma progression. **Journal of neuro-oncology**, v. 36, n. 2, p. 123–40, jan. 1998.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392–401, maio 2006.

KAMINSKA, B.; KOCYK, M.; KIJEWSKA, M. TGF beta signaling and its role in glioma pathogenesis. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 986, p. 171–87, jan. 2013.

KAO, A. W. et al. Aldolase mediates the association of F-actin with the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 25, p. 17742–7, 18 jun. 1999.

KAPLAN, R. N. et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. **Nature**, v. 438, n. 7069, p. 820–7, 8 dez. 2005.

KATSUNO, Y.; LAMOUILLE, S.; DERYNCK, R. TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. **Current opinion in oncology**, v. 25, n. 1, p. 76–84, jan. 2013.

KÉRAMIDAS, M. et al. The dual effect of mesenchymal stem cells on tumour growth and tumour angiogenesis. **Stem cell research & therapy**, v. 4, n. 2, p. 41, jan. 2013.

KHALIL, N. TGF-beta: from latent to active. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 1, n. 15, p. 1255–63, dez. 1999.

KHANNA, C. et al. The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. **Nature medicine**, v. 10, n. 2, p. 182–6, fev. 2004.

KHOKHA, R. Suppression of the tumorigenic and metastatic abilities of murine B16-F10 melanoma cells in vivo by the overexpression of the tissue inhibitor of the metalloproteinases-1. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 86, n. 4, p. 299–304, 16 fev. 1994.

KIDD, S. et al. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding

microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 27, n. 10, p. 2614–23, out. 2009.

KIJIMA, N. et al. CD166/activated leukocyte cell adhesion molecule is expressed on glioblastoma progenitor cells and involved in the regulation of tumor cell invasion. **Neuro-oncology**, v. 14, n. 10, p. 1254–64, out. 2012.

KIM, H. S. et al. Identification of a radiosensitivity signature using integrative metaanalysis of published microarray data for NCI-60 cancer cells. **BMC genomics**, v. 13, p. 348, jan. 2012.

KIM, J. H. et al. Phospholipase D2 directly interacts with aldolase via its PH domain. **Biochemistry**, v. 41, n. 10, p. 3414–21, 12 mar. 2002.

KIM, M.-J. et al. Profilin 2 promotes migration, invasion, and stemness of HT29 human colorectal cancer stem cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 79, n. 9, p. 1438–1446, 2015.

KJELLMAN, C. et al. Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 89, n. 3, p. 251–8, 20 maio 2000.

KLEIHUES, P. et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 61, n. 3, p. 215–25; discussion 226–9, mar. 2002.

KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. **Neuro-oncology**, v. 1, n. 1, p. 44–51, jan. 1999.

KLOPP, A. H. et al. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 29, n. 1, p. 11–9, jan. 2011.

KONG, B. H. et al. Increased in vivo angiogenic effect of glioma stromal mesenchymal stem-like cells on glioma cancer stem cells from patients with glioblastoma. **International journal of oncology**, v. 42, n. 5, p. 1754–62, maio 2013.

KOOP, S. et al. Overexpression of metalloproteinase inhibitor in B16F10 cells does not affect extravasation but reduces tumor growth. **Cancer research**, v. 54, n. 17, p. 4791–7, 1 set. 1994.

KUCEROVA, L. et al. Tumor cell behaviour modulation by mesenchymal stromal cells. **Molecular Cancer**, v. 9, n. 1, p. 129, jan. 2010.

LAMOUILLE, S.; DERYNCK, R. Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. **The Journal of cell biology**, v. 178, n. 3, p. 437–51, 30 jul. 2007.

LEBRUN, J.-J. The dual role of TGFB in human cancer: From tumor suppression to cancer

metastasis. **ISRN Molecular Biology**, p. 28, 2012.

LEE, J.; CHOI, J.-H.; JOO, C.-K. TGF- β 1 regulates cell fate during epithelial-mesenchymal transition by upregulating survivin. **Cell death & disease**, v. 4, p. e714, jan. 2013.

LEE, M. K. et al. TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. **The EMBO journal**, v. 26, n. 17, p. 3957–67, 5 set. 2007.

LINCET, H.; ICARD, P. How do glycolytic enzymes favour cancer cell proliferation by nonmetabolic functions? **Oncogene**, v. 34, n. 29, p. 3751–9, jul. 2015.

LINDHOLM, D. et al. Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. **The Journal of cell biology**, v. 117, n. 2, p. 395–400, abr. 1992.

LIU, Z. et al. Mesenchymal stem cells show little tropism for the resting and differentiated cancer stem cell-like glioma cells. **International journal of oncology**, v. 44, n. 4, p. 1223–32, abr. 2014.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, ago. 2007.

LU, K. V et al. Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 promotes matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation and cell invasion in a human glioblastoma cell line. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 84, n. 1, p. 8–20, jan. 2004.

LUO, M.-L.; WANG, M.-R. CTTN (EMS1): an oncogene contributing to the metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. **Cell research**, v. 17, n. 4, p. 298–300, abr. 2007.

MA, M. et al. Mesenchymal stromal cells may enhance metastasis of neuroblastoma via SDF-1/CXCR4 and SDF-1/CXCR7 signaling. **Cancer letters**, v. 312, n. 1, p. 1–10, 15 dez. 2011.

MAHMOUDI, K.; EZRIN, A.; HADJIPANAYIS, C. Small extracellular vesicles as tumor biomarkers for glioblastoma. **Molecular Aspects of Medicine**, 25 jun. 2015.

MASSAGUÉ, J. TGF-beta signal transduction. **Annual review of biochemistry**, v. 67, p. 753–91, jan. 1998.

MASSAGUÉ, J. TGFbeta in Cancer. **Cell**, v. 134, n. 2, p. 215–30, 25 jul. 2008.

MCLENDON, R. E.; ADESINA, A. M. **Pathology of Diffuse Astrocytomas: Definition and Overview, Clinical Features, Imaging Studies**. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/1780914-overview>>. Acesso em: 2 dez. 2015.

MEEHAN, K.; VELLA, L. J. The contribution of tumour-derived exosomes to the hallmarks of cancer. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, p. 1–11, 19 out. 2015.

MEHTA, H. H. et al. IGFBP-3 is a metastasis suppression gene in prostate cancer. **Cancer**

research, v. 71, n. 15, p. 5154–63, 1 ago. 2011.

MENG, J. et al. A radiosensitivity gene signature in predicting glioma prognostic via EMT pathway. **Oncotarget**, v. 5, n. 13, p. 4683–93, 15 jul. 2014.

MENON, L. G. et al. Imaging of human mesenchymal stromal Cells: Homing to human brain tumors. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 107, n. 2, p. 257–267, 2012.

MICALIZZI, D. S.; FARABAUGH, S. M.; FORD, H. L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: Parallels between normal development and tumor progression. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, n. 2, p. 117–134, 2010.

MILANE, L. et al. Exosome Mediated Communication within the Tumor Microenvironment. **Journal of Controlled Release**, 2 jul. 2015.

MONTGOMERY, A. M. et al. Effect of tissue inhibitor of the matrix metalloproteinases-2 expression on the growth and spontaneous metastasis of a human melanoma cell line. **Cancer research**, v. 54, n. 20, p. 5467–73, 15 out. 1994.

MORALES, F. C. et al. Overexpression of ezrin inactivates NF2 tumor suppressor in glioblastoma. **Neuro-oncology**, v. 12, n. 6, p. 528–39, jun. 2010.

MOTALN, H. et al. Human mesenchymal stem cells exploit the immune response mediating chemokines to impact the phenotype of glioblastoma. **Cell transplantation**, v. 21, n. 7, p. 1529–45, jan. 2012.

MOTALN, H.; TURNSEK, T. L. Cytokines play a key role in communication between mesenchymal stem cells and brain cancer cells. **Protein and peptide letters**, v. 22, n. 4, p. 322–31, jan. 2015.

MOUSTAKAS, A.; HELDIN, C.-H. Non-Smad TGF-beta signals. **Journal of cell science**, v. 118, n. Pt 16, p. 3573–84, 15 ago. 2005.

NAKAMIZO, A. et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. **Cancer research**, v. 65, n. 8, p. 3307–18, 15 abr. 2005.

NAKAMURA, K. et al. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. **Gene therapy**, v. 11, n. 14, p. 1155–1164, 2004.

OHGAKI, H. et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. **Cancer research**, v. 64, n. 19, p. 6892–9, 1 out. 2004.

OHTANI, K. et al. Ezrin, a membrane-cytoskeletal linking protein, is involved in the process of invasion of endometrial cancer cells. **Cancer letters**, v. 147, n. 1-2, p. 31–8, 1 dez. 1999.

ORIMO, A. et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. **Cell**, v. 121, n. 3, p. 335–48, 6 maio 2005.

OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007-2011. **Neuro-oncology**, v. 16 Suppl 4, p. iv1–iv63, out. 2014.

OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. **Neuro-oncology**, v. 17 Suppl 4, p. iv1–iv62, out. 2015.

PADMALATHA, C. et al. Glioblastoma multiforme with tuberous sclerosis. Report of a case. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 104, n. 12, p. 649–50, dez. 1980.

PAN, J.-J. et al. Increased expression of TGF-beta1 reduces tumor growth of human U-87 Glioblastoma Cells in vivo. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, v. 55, n. 8, p. 918–27, ago. 2006.

PANG, S.-T. et al. Expression of ezrin in prostatic intraepithelial neoplasia. **Urology**, v. 63, n. 3, p. 609–12, mar. 2004.

PAUNESCU, V. et al. Tumour-associated fibroblasts and mesenchymal stem cells: more similarities than differences. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 15, n. 3, p. 635–46, mar. 2011.

PERON, P. et al. Potentiation of Smad transactivation by Jun proteins during a combined treatment with epidermal growth factor and transforming growth factor-beta in rat hepatocytes. role of phosphatidylinositol 3-kinase-induced AP-1 activation. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 13, p. 10524–31, 30 mar. 2001.

PIAGGI, S. et al. Glutathione transferase omega 1-1 (GSTO1-1) plays an anti-apoptotic role in cell resistance to cisplatin toxicity. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 5, p. 804–11, maio 2010.

PICKUP, M.; NOVITSKIY, S.; MOSES, H. L. The roles of TGFβ in the tumour microenvironment. **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 11, p. 788–99, nov. 2013.

PIEK, E. et al. Expression of transforming-growth-factor (TGF)-beta receptors and Smad proteins in glioblastoma cell lines with distinct responses to TGF-beta1. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 80, n. 5, p. 756–63, 1 mar. 1999.

PIETRAS, K.; OSTMAN, A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. **Experimental cell research**, v. 316, n. 8, p. 1324–31, 1 maio 2010.

PLATTEN, M.; WICK, W.; WELLER, M. Malignant glioma biology: role for TGF-beta in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. **Microscopy research and technique**, v. 52, n. 4, p. 401–10, 15 fev. 2001.

POLYAK, K.; WEINBERG, R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 4, p. 265–273, 2009.

PSAILA, B.; LYDEN, D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 4, p. 285–93, abr. 2009.

QIAO, L. et al. Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. **Cancer letters**, v. 269, n. 1, p. 67–77, 2008a.

QIAO, L. et al. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. **Cell research**, v. 18, n. 4, p. 500–7, abr. 2008b.

QIU, F.; ZHU, J.; MA, L. [Interference of invasion and metastasis of colorectal cancer cells by EMS1-siRNA encoded by a recombinant lentiviral vector]. **Zhonghua wei chang wai ke za zhi = Chinese journal of gastrointestinal surgery**, v. 14, n. 11, p. 887–91, nov. 2011.

RÄSÄNEN, K.; VAHERI, A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. **Experimental cell research**, v. 316, n. 17, p. 2713–22, 15 out. 2010.

RIGG, A. S.; LEMOINE, N. R. Adenoviral delivery of TIMP1 or TIMP2 can modify the invasive behavior of pancreatic cancer and can have a significant antitumor effect in vivo. **Cancer gene therapy**, v. 8, n. 11, p. 869–78, nov. 2001.

RITTERSON LEW, C.; TOLAN, D. R. Targeting of several glycolytic enzymes using RNA interference reveals aldolase affects cancer cell proliferation through a non-glycolytic mechanism. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 51, p. 42554–63, 14 dez. 2012.

ROBERTS, A. B.; WAKEFIELD, L. M. The two faces of transforming growth factor in carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 15, p. 8621–8623, 14 jul. 2003.

ROSEN, E. D.; MACDOUGALD, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 7, n. 12, p. 885–96, dez. 2006.

SÁNCHEZ-ORTIGA, R. et al. [Glioblastoma multiforme and multiple endocrine neoplastic type 2 A]. **Medicina clínica**, v. 133, n. 5, p. 196–7, 4 jul. 2009.

SARKAR, A.; CHIOCCA, E. A. Glioblastoma and Malignant Astrocytoma. **Brain Tumors**, p. 384–407, 2012.

SCHWARTZBAUM, J. A et al. Epidemiology and molecular pathology of glioma. **Nature clinical practice. Neurology**, v. 2, n. 9, p. 494–503; quiz 1 p following 516, 2006.

SEO, D.-W. et al. TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. **Cell**, v. 114, n. 2, p. 171–80, 25 jul. 2003.

SEYMOUR, T.; NOWAK, A.; KAKULAS, F. Targeting Aggressive Cancer Stem Cells in Glioblastoma. **Frontiers in oncology**, v. 5, p. 159, jan. 2015.

SHARIAT, S. F. et al. Association of preoperative plasma levels of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding proteins-2 and -3 with prostate cancer invasion, progression,

and metastasis. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 20, n. 3, p. 833–41, 1 fev. 2002.

SHI, Y.; MASSAGUÉ, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 685–700, 13 jun. 2003.

SKOG, J. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nature cell biology**, v. 10, n. 12, p. 1470–6, dez. 2008.

SLEEMAN, J. P. et al. Concepts of metastasis in flux: The stromal progression model. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, n. 3, p. 174–186, 2012.

SLIWA, M. et al. The invasion promoting effect of microglia on glioblastoma cells is inhibited by cyclosporin A. **Brain**, v. 130, n. 2, p. 476–489, 2007.

SPAETH, E. L. et al. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. **PloS one**, v. 4, n. 4, p. e4992, jan. 2009.

SPINELLI, V. et al. Occupational and environmental risk factors for brain cancer: a pilot case-control study in France. **Presse médicale (Paris, France : 1983)**, v. 39, n. 2, p. e35–44, fev. 2010.

STOVER, D. G.; BIERIE, B.; MOSES, H. L. A delicate balance: TGF-beta and the tumor microenvironment. **Journal of cellular biochemistry**, v. 101, n. 4, p. 851–61, 1 jul. 2007.

STUPP, R. et al. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 25 Suppl 3, p. iii93–101, set. 2014.

STUPP, R.; ROILA, F. Malignant glioma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 20 Suppl 4, p. 126–8, maio 2009.

SUBRAMANIAN, G. et al. Targeting endogenous transforming growth factor beta receptor signaling in SMAD4-deficient human pancreatic carcinoma cells inhibits their invasive phenotype¹. **Cancer research**, v. 64, n. 15, p. 5200–11, 1 ago. 2004.

SUN, J. et al. TGF- β promotes glioma cell growth via activating Nodal expression through Smad and ERK1/2 pathways. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 443, n. 3, p. 1066–72, 17 jan. 2014.

TAYLOR, D. D.; GERCEL-TAYLOR, C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. **Gynecologic oncology**, v. 110, n. 1, p. 13–21, jul. 2008.

TAYLOR, I. W.; WRANA, J. L. SnapShot: The TGFbeta pathway interactome. **Cell**, v. 133, n. 2, p. 378.e1, 18 abr. 2008.

THÉRY, C.; OSTROWSKI, M.; SEGURA, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 8, p. 581–93, ago. 2009.

TOKUNOU, M. et al. Altered expression of the ERM proteins in lung adenocarcinoma. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 80, n. 11, p. 1643–50, nov. 2000.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7369–75, 20 out. 2003.

TYNNINEN, O. et al. Ezrin expression in tissue microarray of primary and recurrent gliomas. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 30, n. 5, p. 472–7, out. 2004.

VALENTE, P. et al. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 75, n. 2, p. 246–53, 19 jan. 1998.

VALTIERI, M.; SORRENTINO, A. The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 217, n. 2, p. 296–300, nov. 2008.

VELPULA, K. K.; DASARI, V. R.; RAO, J. S. The homing of human cord blood stem cells to sites of inflammation: unfolding mysteries of a novel therapeutic paradigm for glioblastoma multiforme. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 11, n. 12, p. 2303–13, 15 jun. 2012.

VERGANI, V. et al. Inhibition of matrix metalloproteinases by over-expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits the growth of experimental hemangiomas. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 91, n. 2, p. 241–7, 15 jan. 2001.

VERHAAK, R. G. W. 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, 19 jan. 2010.

WANG, X. et al. VEGF and cortactin expression are independent predictors of tumor recurrence following curative resection of gastric cancer. **Journal of surgical oncology**, v. 102, n. 4, p. 325–30, 15 set. 2010.

WEAVER, A. M. Cortactin in tumor invasiveness. **Cancer letters**, v. 265, n. 2, p. 157–66, 8 jul. 2008.

WEN, P. Y.; KESARI, S. Malignant gliomas in adults. **The New England journal of medicine**, v. 359, n. 5, p. 492–507, 31 jul. 2008.

WENG, W.-H. et al. Prognostic impact of immunohistochemical expression of ezrin in highly malignant soft tissue sarcomas. **Clinical cancer research : an official journal of the American**

Association for Cancer Research, v. 11, n. 17, p. 6198–204, 1 set. 2005.

WESOŁOWSKA, A et al. Microglia-derived TGF-beta as an important regulator of glioblastoma invasion--an inhibition of TGF-beta-dependent effects by shRNA against human TGF-beta type II receptor. **Oncogene**, v. 27, n. 7, p. 918–930, 2008.

WHO. Noncommunicable Diseases (NCD) Country Profiles - Brazil. p. 1, 2014.

WHO 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/gho/countries/bra.pdf>>. Acesso em: 26 out. 2015.

WICK, W. et al. Ezrin-dependent promotion of glioma cell clonogenicity, motility, and invasion mediated by BCL-2 and transforming growth factor-beta2. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 10, p. 3360–8, 15 maio 2001.

WRENSCH, M. et al. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. **Neuro-oncology**, v. 4, n. 4, p. 278–99, out. 2002.

WU, X. et al. In vivo tracking of superparamagnetic iron oxide nanoparticle-labeled mesenchymal stem cell tropism to malignant gliomas using magnetic resonance imaging. Laboratory investigation. **Journal of neurosurgery**, v. 108, n. 2, p. 320–329, 2008.

YAN, Z.; WINAWER, S.; FRIEDMAN, E. Two different signal transduction pathways can be activated by transforming growth factor beta 1 in epithelial cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 18, p. 13231–7, 6 maio 1994.

YANG, C. H. et al. MicroRNA-21 promotes glioblastoma tumorigenesis by down-regulating insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP3). **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 36, p. 25079–87, 5 set. 2014a.

YANG, M. et al. [Expression of Versican and its clinical significance in gastric carcinoma]. **Zhonghua bing li xue za zhi Chinese journal of pathology**, v. 43, n. 7, p. 473–7, jul. 2014b.

YANG, Y. et al. Acquisition of new tumor cell properties by MSC-derived exosomes. **International journal of oncology**, v. 47, n. 1, p. 244–52, jul. 2015.

YINGLING, J. M.; BLANCHARD, K. L.; SAWYER, J. S. Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 12, p. 1011–22, dez. 2004.

YOO, K. H. et al. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. **Cellular Immunology**, v. 259, n. 2, p. 150–156, 2009.

YU, B.; ZHANG, X.; LI, X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 3, p. 4142–57, jan. 2014.

YU, J. M. et al. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. **Stem cells and development**, v. 17, n. 3, p. 463–73, jun. 2008.

ZHANG, T. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of breast and prostate tumors. **Stem cell research & therapy**, v. 4, n. 3, p. 70, jan. 2013.

ZHOU, J. et al. Synergistic effect of EMS1-shRNA and sorafenib on proliferation, migration, invasion and endocytosis of SMMC-7721. **Journal of molecular histology**, v. 45, n. 2, p. 205–16, abr. 2014.

ZHU, W. et al. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. **Experimental and molecular pathology**, v. 80, n. 3, p. 267–74, jun. 2006.

ANEXOS

ANEXO 1 – Conjunto de proteínas identificadas em meios condicionados de U87FP635, CTM e cocultivos celulares.

Proteínas comuns entre os três grupos (n=248)	UniProt	Nome da proteína
P46940	IQ motif containing GTPase activating protein 1	
P07437	tubulin, beta 5; tubulin, beta pseudogene 2; tubulin, beta pseudogene 1	
P17655	calpain 2, (m/II) large subunit	
P78417	glutathione S-transferase omega 1	
P27816	microtubule-associated protein 4	
O76061	stanniocalcin 2	
P37802	transgelin 2	
P23528	cofilin 1 (non-muscle)	
O14786	neuropilin 1	
P61769	beta-2-microglobulin	
P07737	profilin 1	
P11142	heat shock 70kDa protein 8	
P98160	heparan sulfate proteoglycan 2	
P28066	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 5	
Q8NBS9	thioredoxin domain containing 5 (endoplasmic reticulum); muted homolog (mouse)	
P41250	glycyl-tRNA synthetase	
Q92520	family with sequence similarity 3, member C	
O75369	filamin B, beta (actin binding protein 278)	
P14314	protein kinase C substrate 80K-H	
P62258	14-3-3 protein epsilon	
P00558	phosphoglycerate kinase 1	
P07237	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	
P13797	plastin 3 (T isoform)	
Q10471	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (GalNAc-T2)	
Q02818	nucleobindin 1	
Q99536	vesicle amine transport protein 1 homolog (T. californica)	
P18206	vinculin	
P52565	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	
P09871	complement component 1, s subcomponent	
P16152	carbonyl reductase 1	
P13667	protein disulfide isomerase family A, member 4	
P27348	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide	
P00491	nucleoside phosphorylase	
Q58FF8	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 2 (pseudogene)	
P14625	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	
P09486	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	
O75083	WD repeat domain 1	
P09382	lectin, galactoside-binding, soluble, 1	

P11021 hypothetical gene supported by AF216292; NM_005347; heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)
 P63104 tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide
 Q13219 PAPPA antisense RNA (non-protein coding); pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1
 Q5VTE0 eukaryotic translation elongation factor 1 alpha-like 7; alpha-like 3; alpha 1
 Q02809 procollagen-lysine 1, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1
 Q9H299 SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3
 P30101 protein disulfide isomerase family A, member 3
 P22692 insulin-like growth factor binding protein 4
 P00338 lactate dehydrogenase A
 P61088 ubiquitin-conjugating enzyme E2N (UBC13 homolog, yeast)
 P07108 diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-Coenzyme A binding protein)
 Q15582 transforming growth factor, beta-induced, 68kDa
 P62987 ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1
 Q15084 protein disulfide isomerase family A, member 6
 P06576 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide
 P06396 gelsolin (amyloidosis, Finnish type)
 O75874 isocitrate dehydrogenase 1 (NADP⁺), soluble
 P23284 peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)
 P14618 Pyruvate kinase, isozymes M1/M2 (Pyruvate kinase muscle isozyme) (Cytosolic thyroid hormone-binding protein)
 P07602 prosaposin
 P23381 tryptophanyl-tRNA synthetase
 P01033 TIMP metalloproteinase inhibitor 1
 P17174 glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble (aspartate aminotransferase 1)
 Q07021 complement component 1, q subcomponent binding protein
 P60709 actin, beta
 P31946 tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide
 P29401 transketolase
 P61604 heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)
 P16035 TIMP metalloproteinase inhibitor 2
 P13489 ribonuclease/angiogenin inhibitor 1
 P62328 thymosin-like 2 (pseudogene); thymosin-like 1 (pseudogene); thymosin beta 4, X-linked
 P05121 serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
 P31949 S100 calcium binding protein A11; S100 calcium binding protein A11 pseudogene
 P01024 similar to Complement C3 precursor; complement component 3; hypothetical protein LOC100133511
 P09651 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 3; A1; A1 pseudogene 2; A1 pseudogene
 Q06830 peroxiredoxin 1
 Q6EMK4 vasorin
 P00736 complement component 1, r subcomponent
 P40925 malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)
 P40926 malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)
 O75326 semaphorin 7A, GPI membrane anchor (John Milton Hagen blood group)
 P60903 S100 calcium binding protein A10
 Q15019 septin 2
 P21333 filamin A, alpha (actin binding protein 280)

P08123 collagen, type I, alpha 2
 O94985 calsyntenin 1
 Q13813 spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)
 Q9BRK5 stromal cell derived factor 4
 P60900 proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 6
 P24534 eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2; 1 beta 2-like
 P04792 heat shock 27kDa protein-like 2 pseudogene; heat shock 27kDa protein 1
 P13611 versican
 P01034 cystatin C
 P25788 proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3
 P25786 proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 1
 P25787 proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 2
 P00441 superoxide dismutase 1, soluble
 P27797 calreticulin
 P30086 phosphatidylethanolamine binding protein 1
 P30085 cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 1, cytosolic
 P61981 tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide
 Q01995 transgelin
 O60568 procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3
 Q16610 extracellular matrix protein 1
 P07900 heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 2; class A member 1
 P08670 vimentin
 Q09666 AHNAK nucleoprotein
 P48643 chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)
 P12110 collagen, type VI, alpha 2
 P26641 eukaryotic translation elongation factor 1 gamma
 O43854 EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3
 P13639 eukaryotic translation elongation factor 2
 Q14697 glucosidase, alpha; neutral AB
 P12109 collagen, type VI, alpha 1
 Q9UNN8 protein C receptor, endothelial (EPCR)
 O43852 calumenin
 Q16270 insulin-like growth factor binding protein 7
 Q01082 spectrin, beta, non-erythrocytic 1
 P04406 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like 6; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
 P09936 ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)
 Q9ULV4 coronin, actin binding protein, 1C
 P19022 cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)
 P19021 peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase
 P08865 ribosomal protein SA pseudogene 9; 8;58;19;18;15;61;29;12
 P55786 hypothetical protein FLJ11822; aminopeptidase puromycin sensitive
 P53396 ATP citrate lyase
 O43707 actinin, alpha 4
 P61978 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K; similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
 Q9UBP4 dickkopf homolog 3 (*Xenopus laevis*)
 Q99497 Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7
 P04080 cystatin B (stefin B)
 P68036 ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3
 P04083 annexin A1
 Q9Y490 talin 1
 P12111 collagen, type VI, alpha 3

P18669 phosphoglycerate mutase 1 (brain)
 P08572 collagen, type IV, alpha 2
 P22626 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1
 P06703 S100 calcium binding protein A6
 Q15113 procollagen C-endopeptidase enhancer
 Q15293 reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain
 Q9Y240 C-type lectin domain family 11, member A
 P60842 similar to eukaryotic translation initiation factor 4A; small nucleolar RNA, H/ACA box 67
 Q15149 Plectin 1 (PLTN) (PCN) (Hemidesmosomal protein 1) (HD1);intermediate filament binding protein 500kDa
 P02545 lamin A/C
 O00299 chloride intracellular channel 1
 P55290 cadherin 13, H-cadherin (heart)
 P08238 heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1
 P09211 glutathione S-transferase pi 1
 P10599 thioredoxin
 P24592 insulin-like growth factor binding protein 6
 P67936 tropomyosin 4
 P63241 eukaryotic translation initiation factor 5A; eukaryotic translation initiation factor 5A-like 1
 Q15262 protein tyrosine phosphatase, receptor type, K
 P34932 heat shock 70kDa protein 4
 P80723 brain abundant, membrane attached signal protein 1
 Q14974 karyopherin (importin) beta 1
 O00469 procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2
 P04075 aldolase A, fructose-bisphosphate
 Q15121 phosphoprotein enriched in astrocytes 15
 P12814 actinin, alpha 1
 P30041 peroxiredoxin 6
 P19105 myosin, light chain 12A, regulatory, non-sarcomeric
 P52907 capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1
 P30044 peroxiredoxin 5
 P22392 non-metastatic cells 1, protein (NM23A); NME1-NME2 readthrough transcript; non-metastatic cells 2, protein (NM23B)
 P30046 D-dopachrome tautomerase
 P68032 actin, alpha, cardiac muscle 1
 Q00610 clathrin, heavy chain (Hc)
 P60174 TPI1 pseudogene; triosephosphate isomerase 1
 Q9Y617 chromosome 8 open reading frame 62; phosphoserine aminotransferase 1
 Q9BRA2 thioredoxin domain containing 17
 P05388 ribosomal protein, large, P0 pseudogene 2;3;6
 O15143 Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B (ARP2/3 complex 41 kDa subunit) (p41-ARC)
 Q12841 follistatin-like 1
 P35237 serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 6
 P07195 lactate dehydrogenase B
 P50454 serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)
 P05067 amyloid beta (A4) precursor protein
 Q9UI42 carboxypeptidase A4
 P09603 colony stimulating factor 1 (macrophage)
 P50395 GDP dissociation inhibitor 2
 Q16658 fascin homolog 1, actin-bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)
 P36222 chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)

P26022 pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta
 P08253 matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)
 O60664 mannose-6-phosphate receptor binding protein 1
 Q6IBS0 twinfilin, actin-binding protein, homolog 2 (Drosophila)
 Q08380 lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein
 P07093 serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2
 P49720 proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 3
 P07355 annexin A2 pseudogene 3; annexin A2; annexin A2 pseudogene 1
 P20908 collagen, type V, alpha 1
 P15291 UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1
 P06733 enolase 1, (alpha)
 P14174 macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)
 P68371 tubulin, beta 2C
 O00391 quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1
 P55058 phospholipid transfer protein
 P16930 fumarylacetoacetate hydrolase (fumarylacetoacetase)
 P78371 chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)
 P22314 ubiquitin-like modifier activating enzyme 1
 P26038 moesin
 P68363 hypothetical gene supported by AF081484; NM_006082; tubulin, alpha 1b
 P06744 glucose phosphate isomerase
 Q9UHI8 ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1
 P60981 destrin (actin depolymerizing factor)
 P35579 myosin, heavy chain 9, non-muscle
 P09972 aldolase C, fructose-bisphosphate
 P54727 RAD23 homolog B (S. cerevisiae)
 P13693 tumor protein, translationally-controlled 1
 P06753 tropomyosin 3
 O14818 proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7
 P10809 heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin) pseudogene 5; 6 ; 1 ;4
 P52209 phosphogluconate dehydrogenase
 P10909 clusterin
 Q16881 thioredoxin reductase 1; hypothetical LOC100130902
 P15121 aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)
 P61158 ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)
 P46821 microtubule-associated protein 1B
 P35442 thrombospondin 2
 P02751 fibronectin 1
 Q14019 coactosin-like 1 (Dictyostelium)
 P07711 cathepsin L1
 P61916 Niemann-Pick disease, type C2
 Q6YHK3 CD109 molecule
 P17936 insulin-like growth factor binding protein 3
 P21291 cysteine and glycine-rich protein 1
 P62158 calmodulin 3 ; calmodulin 2; calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)
 Q16555 dihydropyrimidinase-like 2
 P61160 ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)
 P11047 laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)
 P07996 thrombospondin 1
 Q14118 dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)
 Q01518 CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)
 P60660 myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle
 P07858 cathepsin B

P35555	fibrillin 1
Q14315	filamin C, gamma (actin binding protein 280)
P62937	similar to TRIMCyp; peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A); peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)-like 3
P35754	glutaredoxin (thioltransferase)
P51884	lumican
Q08629	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1
P07339	cathepsin D
Q13740	hypothetical protein LOC100133690; activated leukocyte cell adhesion molecule
P28838	leucine aminopeptidase 3
P16070	CD44 molecule (Indian blood group)
Q08431	milk fat globule-EGF factor 8 protein
P00330	ADH1, Alcohol dehydrogenase 1
P0DMV9	HSPA1B, Heat shock 70 kDa protein 1B

Proteínas comuns entre cocultivo e CTM (n=15)	UniProt	Nome da proteína
	P05997	collagen, type V, alpha 2
	Q96D15	reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain
	O00468	agrin
	O75368	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like
	P55287	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)
	P02462	collagen, type IV, alpha 1
	P07585	decorin
	P00750	plasminogen activator, tissue
	P29966	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate
	P24593	insulin-like growth factor binding protein 5
	P21810	biglycan
	P55072	valosin-containing protein
	Q9Y4K0	lysyl oxidase-like 2
	Q9BUD6	spondin 2, extracellular matrix protein
	P03956	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)

Proteínas comuns entre U87 e CTM (n=9)	UniProt	Nome da proteína
	Q13443	ADAM metalloproteinase domain 9 (meltrin gamma)
	O75347	tubulin folding cofactor A
	Q14112	nidogen 2 (osteonidogen)
	O75531	similar to barrier-to-autointegration factor; barrier to autointegration factor 1
	P62857	ribosomal protein S28 pseudogene 6; ribosomal protein S28 pseudogene 9; ribosomal protein S28
	P14550	aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase)
	P80303	nucleobindin 2
	P32119	peroxiredoxin 2
	P30050	ribosomal protein L12 pseudogene 2;32;35;19;6;14

Proteínas comuns entre cocultivo e U87 (n=78)	UniProt	Nome da proteína
--	----------------	-------------------------

Q16531 damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa
 P33316 deoxyuridine triphosphatase
 Q13765 nascent polypeptide-associated complex alpha subunit
 P00367 glutamate dehydrogenase 1
 Q13200 proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2
 P01892 major histocompatibility complex, class I, A
 Q16769 glutaminyl-peptide cyclotransferase
 P29692 eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein)
 P31948 stress-induced-phosphoprotein 1
 P30153 protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A, alpha isoform
 P07686 hexosaminidase B (beta polypeptide)
 Q92820 gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolyglutamyl hydrolase)
 P23526 adenosylhomocysteinase
 P26006 integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)
 Q13822 ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2
 P15311 hypothetical protein LOC100129652; ezrin
 Q9BW59 chitinase domain containing 1
 P00568 adenylate kinase 1
 P62826 RAN, member RAS oncogene family
 P28799 granulin
 Q16543 cell division cycle 37 homolog (S. cerevisiae)
 P78539 sushi-repeat-containing protein, X-linked
 Q01105 SET nuclear oncogene; similar to SET translocation
 P30530 AXL receptor tyrosine kinase
 P05556 integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
 P38646 heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)
 P06748 nucleophosmin 1 (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) pseudogene 21
 P24347 matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)
 Q07954 low density lipoprotein-related protein 1 (alpha-2-macroglobulin receptor)
 P24821 tenascin C
 P26599 polypyrimidine tract binding protein 1
 P36871 phosphoglucomutase 1
 P55209 nucleosome assembly protein 1-like 1
 Q14126 desmoglein 2
 P11413 glucose-6-phosphate dehydrogenase
 Q9NS15 latent transforming growth factor beta binding protein 3
 P52823 stanniocalcin 1
 P19338 nucleolin
 O43570 carbonic anhydrase XII
 P33908 mannosidase, alpha, class 1A, member 1
 Q96TA1 family with sequence similarity 129, member B
 P08581 met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
 P12955 peptidase D
 O75635 serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 7
 P17931 lectin, galactoside-binding, soluble, 3
 P46926 glucosamine-6-phosphate deaminase 1
 P20618 proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 1
 P40121 capping protein (actin filament), gelsolin-like
 P30043 biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))
 Q8NBJ7 sulfatase modifying factor 2
 Q16706 mannosidase, alpha, class 2A, member 1
 O95336 6-phosphogluconolactonase

P28300	lysyl oxidase
P51858	hepatoma-derived growth factor (high-mobility group protein 1-like)
P07942	laminin, beta 1
P09104	enolase 2 (gamma, neuronal)
O15240	VGF nerve growth factor inducible
Q92743	HtrA serine peptidase 1
Q8NBJ4	golgi membrane protein 1
P07225	protein S (alpha)
P62805	histone cluster 1, (H4l, H4k, H4h, H4j, H4i, H4d,H4c, H4f, H4e, H4b, H4a); cluster 2, (H4a, H4b); cluster 4, H4
P05387	ribosomal protein, large, P2 pseudogene 3; ribosomal protein, large, P2
P22061	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase
P49327	fatty acid synthase
P31939	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase
P30040	endoplasmic reticulum protein 29
O43505	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 1; transferase 2
P48637	glutathione synthetase
P48307	tissue factor pathway inhibitor 2
O60462	neuropilin 2
P08254	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
Q9NRN5	olfactomedin-like 3
Q16719	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)
P52799	ephrin-B2
Q14766	latent transforming growth factor beta binding protein 1
Q14103	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (AU-rich element RNA binding protein 1, 37kDa)
Q9UKK9	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 5
P55083	microfibrillar-associated protein 4

Proteínas exclusivas de CTM (n=14)	UniProt	Nome da proteína
	Q99439	calponin 2
	P08476	inhibin, beta A
	P37837	transaldolase 1
	Q9UL46	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)
	O15144	actin related protein 2/3 complex, subunit 2, 34kDa
	Q92626	peroxidasin homolog (Drosophila)
	Q96FW1	OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 1
	P35556	fibrillin 2
	P09493	tropomyosin 1 (alpha)
	Q9Y696	chloride intracellular channel 4
	Q9Y5Z4	heme binding protein 2
	Q04917	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide
	O95497	vanin 1
	O95433	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 (yeast)

Proteínas exclusivas de cocultivos (n=10)	UniProt	Nome da proteína
	Q12907	lectin, mannose-binding 2

O14773 tripeptidyl peptidase I
 Q9NY33 dipeptidyl-peptidase 3
 Q9BTY2 fucosidase, alpha-L- 2, plasma
 Q99715 collagen, type XII, alpha 1
 Q02952 A kinase (PRKA) anchor protein 12
 P35080 profilin 2
 P31150 GDP dissociation inhibitor 1
 O60888 cutA divalent cation tolerance homolog (E. coli)
 Q14247 cortactin

Proteínas exclusivas de U87 (n=62)	UniProt	Nome da proteína
	Q12905	interleukin enhancer binding factor 2, 45kDa
	P49746	thrombospondin 3
	Q9BR76	coronin, actin binding protein, 1B
	P49321	nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)
	P17900	GM2 ganglioside activator
	P54819	adenylate kinase 2
	P38606	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A
	P05455	Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)
	P05452	C-type lectin domain family 3, member B
	P50502	similar to heat shock 70kD protein binding protein; suppression of tumorigenicity 13 (colon carcinoma)
	Q9UQ80	proliferation-associated 2G4, 38kDa; proliferation-associated 2G4 pseudogene 4
	P10768	esterase D/formylglutathione hydrolase
	Q9NP97	dynein, light chain, roadblock-type 1
	Q02388	collagen, type VII, alpha 1
	P49588	alanyl-tRNA synthetase
	P17987	hypothetical gene supported by BC000665; t-complex 1
	Q9Y6N7	roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila); similar to roundabout 1 isoform b
	Q04446	glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1
	Q9Y5F6	protocadherin gamma subfamily C, 3; C, 5; C, 4; protocadherin gamma subfamily A, 12
	O00560	syndecan binding protein (syntenin)
	Q6UVK1	chondroitin sulfate proteoglycan 4
	Q99880	histone cluster 1, H2bl
	P11940	poly(A) binding protein, cytoplasmic pseudogene 5; poly(A) binding protein, cytoplasmic 1
	Q04837	single-stranded DNA binding protein 1
	O00764	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase
	O60687	sushi-repeat-containing protein, X-linked 2
	P16949	stathmin 1
	O95782	adaptor-related protein complex 2, alpha 1 subunit
	P00749	plasminogen activator, urokinase
	O76003	glutaredoxin 3
	Q14914	prostaglandin reductase 1
	Q14956	glycoprotein (transmembrane) nmb
	P01137	transforming growth factor, beta 1
	P56537	eukaryotic translation initiation factor 6
	P10646	tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)
	P40227	chaperonin containing TCP1, subunit 6A (zeta 1)
	Q9Y2B0	canopy 2 homolog (zebrafish)

P15586	glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase
P41222	prostaglandin D2 synthase, hematopoietic; prostaglandin D2 synthase 21kDa (brain)
O95084	protease, serine, 23
Q13162	peroxiredoxin 4
Q86VP6	cullin-associated and neddylation-dissociated 1
P43490	nicotinamide phosphoribosyltransferase
P00751	complement factor B
P00492	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
P45974	ubiquitin specific peptidase 5 (isopeptidase T)
P08833	insulin-like growth factor binding protein 1
O75882	atractin
P49773	histidine triad nucleotide binding protein 1
Q13509	tubulin, beta 3; melanocortin 1 receptor (alpha melanocyte stimulating hormone receptor)
P78559	microtubule-associated protein 1A
P04062	glucosidase, beta; acid (includes glucosylceramidase)
Q16363	laminin, alpha 4
P19367	hexokinase 1
P49368	chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)
Q15435	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 7
Q8IVF2	AHNAK nucleoprotein 2
Q96PD2	discoïdin, CUB and LCCL domain containing 2
P07954	fumarate hydratase
Q9NQC3	reticulon 4
Q9Y4L1	hypoxia up-regulated 1
Q6UXH9	peptidase domain containing associated with muscle regeneration 1

ANEXO 2 – Conjunto de proteínas identificadas em meios condicionados de cocultivos celulares (exclusivas, superexpressas e hipoexpressas) e respectivas localizações/características.

UniProt	Proteínas exclusivas do cocultivo celular	Localizações e características
Q12907	lectin, mannose-binding 2	extracellular exosome, Golgi, endoplasmatic reticulum, positive regulation of phagocytosis, retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER, protein transport
O14773	tripeptidyl peptidase I	extracellular exosome, lissosome, epithelial cell differentiation, central nervous system development, protein catabolic process, proteolysis
Q9NY33	dipeptidyl-peptidase 3	extracellular exosome, cytoplasm, proteolysis
Q9BTY2	fucosidase, alpha-L- 2, plasma	extracellular exosome and space
Q99715	collagen, type XII, alpha 1	extracellular exosome and space, endodermal cell differentiation, cell adhesion,
Q02952	A kinase (PRKA) anchor protein 12	cytoplasm, cytoskeleton, cell cortex, positive regulation of cAMP biosynthetic process, regulation of protein kinase C signaling
P35080	profilin 2	extracellular exosome, cytoplasm, negative regulation of epithelial cell migration, positive regulation of ATPase activity, regulation of synaptic vesicle exocytosis
P31150	GDP dissociation inhibitor 1	cytoplasm, Golgi apparatus, small GTPase mediated signal transduction, negative regulation of axonogenesis
O60888	cutA divalent cation tolerance homolog (E. coli)	extracellular exosome and membrane, protein localization, response to metal ion
Q14247	cortactin	extracellular exosome, cytoplasm, cell motility, dendritic spine maintenance, negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway, substrate-dependent cell migration, cell extension
UniProt	Proteínas superexpressas do cocultivo celular	Localizações e características
Q9ULV4	coronin, actin binding protein, 1C	cytoplasm, cell projection, lamellipodium, regulation of epithelial cell and fibroblast migration
P07737	profilin 1	extracellular exosome, cytoplasm, cytoskeleton, positive regulation of epithelial cell migration, actin binding
P15311	hypothetical protein LOC100129652; ezrin	extracellular exosome, positive regulation of multicellular organism growth, positive regulation of protein secretion, cell shape
P05121	serpin peptidase inhibitor, clade E/ nexin, plasminogen activator inhibitor type 1	extracellular exosome, positive regulation of angiogenesis, positive regulation of inflammatory response, negative regulation of cell migration
Q9C0K3	actin-related Arp11	extracellular exosome, Arp2/3 complex-mediated actin nucleation

O43707	actinin, alpha 4	extracellular exosome, cytoplasm, nucleous, cell junction, negative regulation of cellular component movement, regulation of apoptotic process,
P16930	fumarylacetoacetate hydrolase (fumarylacetoacetase)	extracellular exosome, cytosol, Phenylalanine catabolism, Tyrosine catabolism
P28066	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 5	extracellular exosome, cytoplasm, nucleous, negative regulation of apoptotic process, positive regulation of canonical Wnt signaling pathway
P26038	moesin	extracellular exosome and space, vesicle, leukocyte migration, movement of cell or subcellular component, positive regulation of gene expression, regulation of cell size and shape
O75368	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like	extracellular exosome and space, cytoplasm, nucleous, positive regulation of signal transduction
Q92520	family with sequence similarity 3, member C	extracellular exosome, Developmental protein
O75369	filamin B, beta (actin binding protein 278)	extracellular exosome, cytoplasm, cytoskeleton, differentiation, myogenesis
P35579	myosin, heavy chain 9, non-muscle	extracellular exosome, cytoplasm, cytoskeleton, angiogenesis, phagocytosis, engulfment, Cell adhesion, Cell shape
O60888	cutA divalent cation tolerance homolog (E. coli)	extracellular exosome and membrane, protein localization, response to metal ion
P35580	myosin, heavy chain 10, non-muscle	extracellular exosome, cell projection, cell proliferation, neuron migration, Cell adhesion, Cell shape
P13693	similar to tumor protein, translationally-controlled 1	extracellular exosome, cytoplasm, regulator negative apoptose
Q15149	similar to Plectin 1 (PLTN) (PCN) (Hemidesmosomal protein 1) (HD1)	extracellular exosome, cytoplasm, cell junction, apoptotic process
P06753	tropomyosin 3	extracellular exosome, cytoplasm, cytoskeleton, movement of cell or subcellular component, brain development, Muscle protein
Q7Z406	myosin, heavy chain 14	extracellular exosome, axon guidance, cell shape
P60900	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 6	extracellular exosome, cytoplasm, nucleous, positive and negative regulation of canonical Wnt signaling pathway, negative regulation of apoptotic process, regulation of inflammatory response
P61158	ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)	extracellular exosome, cytoplasm, cell projection, asymmetric cell division, movement of cell or subcellular component, axon guidance
P13611	versican	extracellular space, glial cell migration, cell adhesion
Q9BQ16	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 3	extracellular space, Metalloenzyme inhibitor, Metalloprotease inhibitor, Protease inhibitor

P25786	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 1	extracellular exosome, cytoplasm, nucleous, positive or negative regulation of canonical Wnt signaling pathway, regulation of apoptotic process, mitotic cell cycle
P25787	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 2	extracellular exosome, cytoplasm, nucleous, regulador negativo apoptose, positiv or negative regulation of canonical Wnt signaling pathway,
O75635	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 7	extracellular space, cytoplasm, positive regulation of transforming growth factor beta1 production, positive regulation of platelet-derived growth factor production
P27797	calreticulin	extracellular exosome, positive regulation of cell cycle,
P35609	actinin, alpha 2	extracellular exosome, cytoplasm, cell adhesion
P62158	calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta); calmodulin 2 ; calmodulin 1	extracellular exosome, cytoplasm, cytoeskeleton, synaptic transmission
P12814	actinin, alpha 1	extracellular exosome, cell junction, cell projection, regulation of apoptotic proces
P00491	nucleoside phosphorylase	extracellular exosome, cytoeskeleton, cytoplasm, immune response, positive regulation of T cell proliferation
P61160	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	extracellular exosome, cytoplasm, cell projection, Arp2/3 complex-mediated actin nucleation, asymmetric cell division, axon guidance, innate immune response, movement of cell or subcellular component
P58107	epiplakin 1	cytoplasm, cytoeskeleton
P68032	actin, alpha, cardiac muscle 1	extracellular exosome, cytoplasm, cytoeskeleton, regulador negativo apoptose
P55072	valosin-containing protein	extracellular exosome, cytoplasm, nucleous, endoplasmatic reticulum, regulation of apoptotic process,
P35749	myosin, heavy chain 11, smooth muscle	extracellular exosome, axon guidance, Motor protein, Muscle protein, Myosin
Q13219	PAPPA antisense RNA; pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1	extravellular , cell differentiation, female pregnancy, cellular protein metabolic process
Q08043	actinin, alpha 3	extracellular exosome, regulation of apoptosis, negative regulation of glycolytic process, skeletal muscle atrophy
Q01518	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	extracellular exosome, cell membrane, ameboidal-type cell migration, axon guidance
Q96D15	reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain	endoplasmatic reticulum, calcium ion binding
P35237	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 6	extracellular exosome, cytoplasm, cellular response to osmotic stress
P09238	matrix metallopeptidase 10 (stromelysin 2)	extracellular space, regulation of cell migration, proteolysis

Q9P1U1	ARP3 actin-related protein 3 homolog B (yeast)	extracellular exosome, cytoplasm, cell projection, Arp2/3 complex-mediated actin nucleation
P50395	GDP dissociation inhibitor 2	extracellular exosome, cytoplasm, membrane, vesicle-mediated transport, GTPase activation
P23284	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	extracellular exosome, endoplasmatic reticulum, positive regulation of multicellular organism growth
Q16658	fascin homolog 1, actin-bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)	extracellular exosome, cytoplas, cell projection, cell proliferation, migration, motility
Q9UNN8	protein C receptor, endothelial (EPCR)	extracellular exosome, cell membrane, immune response
P08254	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, procollagenase)	extracellular space, regulation of cell migration, positive regulation of oxidative stress-induced cell death
Q08629	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1	extracellular space, neurogenesis, neuron migration, regulation of cell growth
P68133	actin, alpha 1, skeletal muscle	extracellular exosome, cytoplasm, cell growth
P21810	biglycan	extracellular exosome, blood vessel remodeling
Q13740	hypothetical protein activated leukocyte cell adhesion molecule	extracellular exosome, cell membrane, axon guidance, cell adhesion
UniProt	Proteínas hipoexpressas do cocultivo celular	Localizações e características
P07355	annexin A2 pseudogene 3; annexin A2; annexin A2 pseudogene 1	extracellular exosome and space, angiogenesis
P17655	calpain 2, (m/II) large subunit	extracellular exosome, cytoplasm, membrane, response to hypoxia, proteolysis
P78417	glutathione S-transferase omega 1	extracellular exosome, cytoplasm, axon, cell body, L-ascorbic acid metabolic process,oxidation-reduction process
P19021	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	extracellular esomomes, cell membrane, peptide amidation
P27816	microtubule-associated protein 4	extracellular exosome, cytoplasm, cell division, mitotic spindle organization
P60709	actin, beta	extracellular exosome and space, cytoplasm, movement of cell or subcellular component, cell-cell junction organization, vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway
P08865	ribosomal protein SA pseudogene 9; 8; 58; 19; 18; 15; 61; 29; 12	extracellular exosome, cytoplasm, nucleous, cell membrane, cellular protein metabolic process, cell adhesion
P68371	tubulin, beta 2C	extracellular exosome, cytoplasm, G2/M transition of mitotic cell cycle, movement of cell or subcellular component

P61604	heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)	extracellular exosome, mitochondrial matrix, activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process, osteoblast differentiation
P16035	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	extracellular exosomes and secreted, aging, negative regulation of mitotic cell cycle, positive regulation of neuron differentiation, negative regulation of cell proliferation
P55786	hypothetical protein FLJ11822; aminopeptidase puromycin sensitive	extracellular exosomes, cytoplasm, nucleus, cellular response to hypoxia, protein polyubiquitination
Q9BYX7	POTE ankyrin domain family, member K	extracellular exosomes, cytoplasm, platelet activation
Q14194	collapsin response mediator protein 1	cytoplasm, cytoskeleton, axon guidance, nervous system development
Q99497	Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7	extracellular exosomes, cytoplasm, autophagy, cellular response to oxidative stress, inflammatory response, negative regulation of apoptotic process/of cell death/of protein ubiquitination
P14649	myosin, light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle	extracellular exosome, metabolic process
Q06830	peroxiredoxin 1	extracellular exosome, cytoplasm, cell proliferation, natural killer cell mediated cytotoxicity, response to reactive oxygen species
A5A3E0	POTE ankyrin domain family, member F	extracellular exosomes and space, cytoplasm, retina homeostasis
P68104	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha-like 7;3; 1; alpha 1	extracellular exosomes, cytoplasm, nucleus, cellular protein metabolic process
Q05639	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	microtubule organizing center, dendrite, cytoplasm, nervous system development
P04083	annexin A1	extracellular exosomes and space, cytoplasm, nucleus, cell projection, inflammatory response, cell movement, negative regulation of apoptotic process, positive regulation of G1/S transition of mitotic cell cycle
P18669	phosphoglycerate mutase 1 (brain)	extracellular exosomes, regulation of glycolytic process
P22314	ubiquitin-like modifier activating enzyme 1	extracellular exosomes, cytoplasm, nucleus, protein ubiquitination, cellular response to DNA damage stimulus, modification-dependent protein catabolic process
P60903	S100 calcium binding protein A10	extracellular exosome, extrinsic component of plasma membrane, positive regulation of GTPase activity, positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading
P68363	hypothetical gene supported by AF081484; NM_006082; tubulin, alpha 1b	extracellular exosome, cytoplasm, cell division

P80303	nucleobindin 2	extracellular exosome, secreted, DNA binding, calcium ion binding
P41250	glycyl-tRNA synthetase	extracellular exosome, secretory granule, cell projection, cytoplasm, glycyl-tRNA aminoacylation, gene expression
P41219	peripherin	extracellular exosome, intermediate filament cytoskeleton organization
Q58FF3	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 2 (pseudogene)	responde to stress, chaperone, ATP binding
P09972	aldolase C, fructose-bisphosphate	extracellular exosome, glucose metabolic process, epithelial cell differentiation
P55290	cadherin 13, H-cadherin (heart)	extracellular exosome, cell membrane, mitotic cell cycle, negative regulation of cell proliferation, positive regulation of cell migrationregulation of cell growth
P14550	aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase)	extracellular exosome, oxidoreductase
P15259	phosphoglycerate mutase 2 (muscle)	extracellular exosome, canonical glycolysis
P24534	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2 and factor 1 beta 2-like	cytosol, cytoplasm, translational elongation, cellular protein metabolic process
P46821	microtubule-associated protein 1B	cell junction, dendritic spine, axon extension, establishment of monopolar cell polarity, negative regulation of intracellular transport
P35442	thrombospondin 2	extracellular region, cell adhesion, negative regulation of angiogenesis
P02751	fibronectin 1	extracellular exosome, secreted, positive regulation of cell proliferation, angiogenesis, cell adhesion,
Q8N0Y7	phosphoglycerate mutase family member 4	extracellular exosome, glycolytic process
Q99536	vesicle amine transport protein 1 homolog (T. californica)	extracellular exosome, cytoplasm, oxidoreductase, negative regulation of mitochondrial fusion
P80723	brain abundant, membrane attached signal protein 1	extracellular exosomes, cell membrane and projections, mesenchymal to epithelial transition, negative regulation of transcription, DNA-templated
O00469	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	extracellular exosome, endoplasmatic reticulum, response to hypoxia, oxidoreductase
P04075	aldolase A, fructose-bisphosphate	extracellular exosomes and space, cytoplasm, canonical glycolysis
Q15121	phosphoprotein enriched in astrocytes 15	cytosol, microtubule associated complex, apoptotic process, activation of MAPK activity, Ras protein signal transduction, vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway

P17936	insulin-like growth factor binding protein 3	extracellular exosome and space, negative regulation of cell proliferation, positive regulation of apoptotic process, regulation of cell growth
P16152	carbonyl reductase 1	extracellular exosome, cytoplasm, oxireductase, epithelial cell differentiation
Q16352	internexin neuronal intermediate filament protein, alpha	extracellular space, cell differentiation, substantia nigra development
Q16555	dihydropyrimidinase-like 2	extracellular exosome, cytoplasm, membrane, differentiation, neurogenesis
P13667	protein disulfide isomerase family A, member 4	cell surface, endoplasmic reticulum lumen, cell redox homeostasis
Q16610	extracellular matrix protein 1	extracellular exosome and secreted, positive regulation of angiogenesis, angiogenesis, regulation of T cell migration, Angiogenesis, Biomineralization, Mineral balance, Osteogenesis
P30044	peroxiredoxin 5	extracellular exosomes and space, cytoplasm, apoptotic process, cellular response to reactive oxygen species, Antioxidant, Oxidoreductase, Peroxidase
P22392	non-metastatic cells 1, protein (NM23A)	extracellular exosome, cytoplasm, nucleus, negative regulation of apoptotic process, Nucleotide metabolism, Transcription, Transcription regulation
P14625	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	extracellular exosome, endoplasmic reticulum, negative regulation of apoptotic process, ATP-binding, Calcium, Nucleotide-binding
P08670	vimentin	extracellular exosome, cytoplasm, apoptotic process, movement of cell or subcellular component, SMAD protein signal transduction,
Q09666	AHNAK nucleoprotein	extracellular exosome, nucleus, regulation of RNA splicing
P09382	lectin, galactoside-binding, soluble, 1	extracellular exosome and secreted, regulation of apoptotic process, response to drug
P63104	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	extracellular exosome, cytoplasm, negative regulation of apoptotic process
Q5VTE0	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha-like 7; 3; alpha 1	extracellular exosome, cytoplasm, protein biosynthesis
P12110	collagen, type VI, alpha 2	extracellular exosome and secreted, cell membrane, cell adhesion, axon guidance
Q14112	nidogen 2 (osteonidogen)	extracellular exosomes and secreted, cell adhesion
P07197	neurofilament, medium polypeptide	axon, neurofilament, mitophagy in response to mitochondrial depolarization, neurofilament bundle assembly
P60660	myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	extracellular exosome, Motor protein, Muscle protein, Myosin

P07196	neurofilament, light polypeptide	axon, cytoplasm, neuromuscular process controlling balance, innate immune response, epidermal growth factor receptor signaling pathway, small GTPase mediated signal transduction
P35555	fibrillin 1	extracellular exosome and space, secreted, sequestering of TGFbeta in extracellular matrix,
Q15582	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	extracellular exosome and space, secreted, angiogenesis, cell adhesion, cell proliferation
Q9UI42	carboxypeptidase A4	extracellular region secreted, histone acetylation
Q9H853	tubulin, alpha 4b (pseudogene)	cytoplasm, microtubule, GTPase activity, microtubule-based process
P26641	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	extracellular exosome, Protein biosynthesis
O43854	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3	extracellular exosome and vesicles secreted, cell adhesion
P35754	glutaredoxin (thioltransferase)	extracellular exosome, cytoplasm, cell redox homeostasis, Electron transport, Transport
O75874	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	extracellular exosome, cytoplasm, oxidoreductase
P26022	pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	extracellular region, secreted, inflammatory response
O60664	mannose-6-phosphate receptor binding protein 1	endosome, Golgi apparatus, vesicle-mediated transport
P63261	actin, gamma 1	extracellular exosome and space, cytoplasm, cell-cell junction organization, innate immune response
Q6S8J3	POTE ankyrin domain family, member E	extracellular exosome and space, substantia nigra development, retina homeostasis
P23381	tryptophanyl-tRNA synthetase	extracellular exosome, cytoplasm, negative regulation of cell proliferation, angiogenesis

Establishment of a novel human medulloblastoma cell line characterized by highly aggressive stem-like cells

Patrícia Benites Gonçalves da Silva · Carolina Oliveira Rodini ·
Carolini Kaid · Adriana Miti Nakahata · Márcia Cristina Leite Pereira ·
Hamilton Matushita · Silvia Souza da Costa · Oswaldo Keith Okamoto

Received: 6 May 2015 / Accepted: 2 September 2015
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract Medulloblastoma is a highly aggressive brain tumor and one of the leading causes of morbidity and mortality related to childhood cancer. These tumors display differential ability to metastasize and respond to treatment, which reflects their high degree of heterogeneity at the genetic and molecular levels. Such heterogeneity of medulloblastoma brings an additional challenge to the understanding of its pathophysiology and impacts the development of new therapeutic strategies. This translational effort has been the focus of most pre-clinical studies which invariably employ

experimental models using human tumor cell lines. Nonetheless, compared to other cancers, relatively few cell lines of human medulloblastoma are available in central repositories, partly due to the rarity of these tumors and to the intrinsic difficulties in establishing continuous cell lines from pediatric brain tumors. Here, we report the establishment of a new human medulloblastoma cell line which, in comparison with the commonly used and well-established cell line Daoy, is characterized by enhanced proliferation and invasion capabilities, stem cell properties, increased chemoresistance, tumorigenicity in an orthotopic metastatic model, replication of original medulloblastoma behavior in vivo, strong chromosome structural instability and deregulation of genes involved in neural development. These features are advantageous for designing biologically relevant experimental models in clinically oriented studies, making this novel cell line, named USP-13-Med, instrumental for the study of medulloblastoma biology and treatment.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10616-015-9914-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

P. B. G. Silva · C. O. Rodini · C. Kaid ·
M. C. L. Pereira · S. S. Costa · O. K. Okamoto (✉)
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Centro
de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco,
Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua
do Matão 277, Cidade Universitária, São Paulo,
SP CEP 05508-090, Brazil
e-mail: keith.okamoto@usp.br

A. M. Nakahata
Fundação Antônio Prudente, A.C. Camargo Cancer
Center, Rua Tagua, 440,
Liberdade, São Paulo CEP 01508-010, Brazil

H. Matushita
Departamento de Neurologia, Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo,
Avenida Dr. Eneas de Carvalho Aguiar 255,
Cerqueira César, São Paulo CEP 05403-000, Brazil

Keywords Brain tumor · Cancer · Cell line ·
Medulloblastoma · Stemness

Introduction

Primary tumors in the central nervous system (CNS) are frequent in children and adolescents, who have their quality of life significantly affected due to motor, cognitive, and endocrine defects secondary to the

tumors or their treatment (Ward et al. 2014). Medulloblastoma is the most common malignant brain tumor in young children up to 4 years of age, and one of the leading causes of morbidity and mortality related to childhood cancer (Ostrom et al. 2013). It is considered by the World Health Organization (WHO) as an aggressive grade IV tumor, characterized by presence of poorly differentiated cell with high proliferative rate and ability to spread throughout the cerebrospinal axis (Louis et al. 2007).

Approximately 40 % of medulloblastoma patients already have metastasis at diagnosis, which is a predictive factor of poor prognosis (Wu et al. 2012). Other clinical parameters, such as age at diagnosis and size of residual tumor after surgical resection, are employed to stratify medulloblastoma patients according to the risk of tumor recurrence and to guide their treatment. Despite significant therapeutic improvements in recent decades (Ries et al. 1999), about 15 and 40 % of patients with either average or high risk of recurrence, respectively, do not respond properly to current treatment, displaying poor overall survival (Zeltzer et al. 1999; Pizer et al. 2011; Othman et al. 2014).

Improvements in survival rates rely on a better knowledge of the molecular and cellular biology of medulloblastoma, as well as on experimental tools to model this disease and address tumor response to new therapeutic approaches. In the past few years, a significant progress was made in the genetic characterization of medulloblastoma, revealing a high degree of tumor heterogeneity. A new classification proposes to encapsulate such heterogeneity within four medulloblastoma subgroups with distinct molecular/genetic features (Ramaswamy et al. 2011; Kool et al. 2012; Taylor et al. 2012; Northcott et al. 2012; Ramaswamy et al. 2013a; Schroeder and Gururangan 2014; Goschzik et al. 2014; Pietsch et al. 2014). Concurrently, insights into tumor development, evolution, and resistance to therapy were obtained by the seminal isolation and characterization of highly tumorigenic medulloblastoma cells exhibiting stem cell properties (Singh et al. 2003).

Pre-clinical studies are valuable to develop new drugs and treatment protocols for medulloblastoma and they invariably employ cell lines, Daoy being the most commonly used human medulloblastoma cell line (Xu et al. 2015). Compared to other types

of cancer, there are relatively few cell lines of medulloblastoma available in central repositories, in part due to intrinsic difficulties in establishing continuous cell lines from pediatric brain tumors, and also because of the significantly lower incidence of these tumors relative to other cancers (Jemal et al. 2010).

Given that medulloblastoma are highly heterogeneous at the molecular, histological, and clinical levels, novel cell lines are instrumental for studying medulloblastoma biology. Here, we report the establishment and characterization of a new cell line derived from a medulloblastoma patient with advantageous features for pre-clinical studies, namely enhanced aggressive traits, stem cell properties, increased chemoresistance, tumorigenicity in an orthotopic metastatic model, and resemblance of original medulloblastoma behavior.

Materials and methods

Cell line establishment

The USP-13-Med cell line was established from a medulloblastoma specimen of classic histological subtype, derived from a 3 year-old boy admitted for treatment in the Medical School Hospital of the University of São Paulo. The procedure was approved by the Internal Review Board (CEP-IB No. 121/2011), and informed consent was obtained from the patient's parents.

Tumor fragment was mechanically disaggregated with a scalpel, followed by a step of enzymatic disaggregation with collagenase (0.1 %) for 60 min at 37 °C to obtain a cell suspension. Patient-derived cells were cultivated with Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM, Gibco, Carlsbad, CA USA) supplemented with 10 % Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco), 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin and 250 ng/mL Fungizone® (Gibco) at 37 °C at 5 % CO₂ atmosphere. Cells were subcultivated at 80 % confluence and cryopreserved in liquid nitrogen. An immortalized clonal cell line was obtained after selection of a tumor cell colony developed in the soft agar assay described below. Downstream characterization was performed side-by-side with Daoy (ATCC, Manassas, VA, USA), a well-studied human medulloblastoma cell line.

Anchorage-independent growth of tumor cells

Patient-derived cells were subjected to the soft agar colony formation assay in order to estimate anchorage-independent growth of tumor cells, which is a proper in vitro assay for detecting transformed cells. Five hundred cells were seeded over a 0.6 % agarose solution and covered with a 0.3 % agarose solution in a well of a six-well plate. Both solutions contained supplemented media at normal concentrations (10 % FBS, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin and 250 ng/mL Fungizone®). Plates were incubated at 37 °C with 5 % CO₂ in a humidified atmosphere. Media was replaced every 3 days.

Population doubling time

In order to evaluate the proliferative profile of USP-13-Med and Daoy cells, a population doubling level (PDL) assay was performed as recommended by WHO (2010) and described by Schaffer (1990). The cumulative PDL over 60 cell generations in vitro was calculated by the formula: $PDL = \log_{10} (N/N_0) \times 3.33$ where: N = number of harvested cells after a period of growth and N₀ = number of cells seeded at every new passage. The PDT (population doubling time) was calculated each passage using the following formula recommended by ATCC: $DT = t \times \ln 2 / \ln (N/N_0)$, where t is the incubation time (ATCC 2014).

Tumorsphere formation assay

Cells were seeded onto a 96-well ultra-low attachment plate (Corning, Corning, NY, USA) in DMEM/F12 with B-27 supplement, N-2 supplement, 20 ng/mL EGF and 20 ng/mL bFGF (Gibco), at an initial density of 1.25×10^4 cells/mL. Tumorspheres over 50 µm in diameter were counted after 7 days of incubation at 37 °C with 5 % CO₂ humidified atmosphere. After 7 days of culture, the tumorspheres were enzymatic dissociated with TrypLE Select (Gibco), fixed for 1 h with 3.7 % paraformaldehyde, and permeabilized with Triton-X100 0.1 % in PBS. CD133/1 antibody conjugated with PE (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) and Nestin antibody conjugated with APC (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) were used to detect CD133⁺ and Nestin⁺ cells by flow cytometry. Data were collected with the Guava EasyCyte 5HT™ Flow Cytometer (Millipore—Guava Technologies,

Billerica, MA, USA), using GuavaSoft 2.1 and FlowJo v10 softwares. Cells that underwent all the procedures but were not stained with CD133/1 or Nestin conjugated antibody were considered negative controls. The experiment was conducted twice, in triplicate. Plots are representatives of the acquired data.

Determination of cisplatin LC₅₀

USP-13-Med and Daoy cultures were serum deprived for 24 h for synchronization. A total of 10^4 cells/mL were then seeded in a well of a 6-well microplate and allowed to attach overnight to the surface of the culture plate, prior to a 48 h-treatment with increasing doses of cisplatin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Apoptotic cells were estimated by the Guava Nexin® Annexin V Assay kit (Millipore). Staining was performed according to the manufacturer's instructions, and samples were analyzed in the Guava EasyCyte 5HT™ Flow Cytometer (Millipore—Guava Technologies), using GuavaSoft 2.1 software. Concentrations lethal to 50 % of cells (LC₅₀) were calculated from dose-response curves.

Cell migration assay

Cell migration was evaluated in vitro using Oris™ Cell Migration Assay Technology (Platypus Technologies, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's procedure. Cells were seeded in high confluence (density of 10^6 cells/mL) and allowed to attach overnight. The Oris™ cell seeding stopper was then removed, exposing the cell migration detection zone. The assay was incubated at 37 °C under a 5 % CO₂ humidified atmosphere, for 24 h, to allow cell migration. Photomicrographs were taken at times 0, 12 and 24 h and measurement was performed with ImageJ software, subtracting the migrated area after 12 or 24 h from the original area at 0 h.

3-Dimensional (3D) spheroid cell invasion assay

USP-13-Med and Daoy cell invasion capacity were evaluated in vitro using Cultrex® 3D Spheroid Cell Invasion Assay (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) following the manufacturer's recommendation. Cells were resuspended in Spheroid Formation ECM at density of 8.10^4 /mL, and added to a 96-well round bottom ultra-low attachment microplate (Corning).

Spheroids were allowed to form for 24 h before invasion matrix and medium with 10 % FBS were added. Photomicrographs were taken on days 0, 2 and 4 after addition of invasion matrix. The amount and extension of the spindle-like protrusions formed by invading cells from the tumor spheroids were considered to calculate the invaded area using ImageJ software, following the manufacturer's instructions.

Chromosomal copy number aberrations

DNA from USP-13-Med was extracted using standard chloroform/phenol protocol. aCGH was performed using 60 K whole-genome platform (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). All procedures were carried out following the manufacturer's recommendation. Microarray scanned images were processed using the Feature Extraction Software (Agilent Technologies). Copy number aberrations (CNAs) were called using the statistical algorithm ADM-2 (sensitivity threshold: 6.7) in Genomic Workbench 6.9 Software. Chromosome deletions and duplications were considered when log2 ratio of Cy3/Cy5 intensities were detected <-0.3 and >0.3 , respectively. Hybridization was gender matched.

Global gene expression analysis

Total RNA of USP-13-Med cells was extracted with the RNeasy kit (Qiagen, Venlo, Netherlands), following the manufacturer's protocol. Gene expression profiling of USP-13-Med was evaluated against two samples of non-neoplastic human cerebellum RNA (Agilent Technologies—cat# 540007; Clontech, Mountain View, CA, USA—cat# 636535), used as reference samples. Independent microarray hybridizations were carried out for each sample using Affymetrix GeneChip® Human Gene 2.0 ST whole-transcript arrays, measuring both protein coding and long intergenic non-coding RNA transcripts (lincRNA). Hybridization procedures and quality control tests were performed following the manufacturer's protocol. Microarray chips were scanned by GeneChip® Scanner 3000 7G System and a quality control was processed by Affymetrix® Expression Console Software (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Differentially expressed genes were identified with the RankProd method, with a p value cutoff of 0.05 adjusted for false discovery rate (Benjamini and

Hochberg 1995), using MeV software v.4.9. Functional Annotation of differentially expressed genes was based on an ontology term enrichment analysis using the DAVID v.6.7, as previously described (Huang et al. 2009). Statistical association between being differentially expressed and belonging to a given category was accessed by the Fisher Exact test (p value ≤ 0.05). The ontologies used were those defined by the KEGG database of metabolic pathways and by the Gene Ontology Consortium. The probe-to-GO and the probe-to-KEGG mapping were established based on the official annotation provided by the manufacturer.

Orthotopic metastatic model

Both USP-13-Med and Daoy cells were suspended at a density of 10^6 cells/5 μ L DMEM and 5 μ L of this cell suspension were injected in the right lateral ventricle of BALB/c Nude mice at a ratio of 1 μ L/min with a high-precision microsyringe (701RN; Hamilton Company, Reno, NV, USA), by stereotaxic surgery. Control animals were injected with 5 μ L of DMEM only. The coordinates used were 1 mm to the right; 0.5 mm posterior of the Bregma and 2.2 mm of depth. The scalp was closed with 2–0 silk suture and the animals were housed under standard controlled conditions (7:00 am to 7:00 pm light/dark cycle; 20–22 °C; 45–55 % humidity) with food and water ad libitum. Animals were euthanized after 50 days of inoculation or after the development of neurological deficits. This metastatic model was adapted from Studebaker et al. (2012). All efforts were made to minimize animal suffering as proposed by the International Ethical Guideline for Biomedical Research (CIOMS/OMS, 1985). The study was approved by the ethics committee for animal research of the University of São Paulo (CEUA protocol no. 132/2011). Brains were collected, formalin-fixed and paraffin-embedded. A total of 10 randomized 7- μ m tissue sections were stained with hematoxylin-eosin for histological analysis. Images were taken in a digital inverted microscope (EVOS Cell Imaging System, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Statistical analysis

Statistical analysis of cellular assays was performed with Graph Pad Prism 6 using unpaired Student's t test

and statistical significance was established at $p < 0.05$. Data are presented as the mean $\pm$ SEM.

Results

Proliferative profile of USP-13-Med cells

Establishment of an immortalized human medulloblastoma cell line, named USP-13-Med, was only feasible when screening cells based on their 3D growth properties. Previous attempts to cultivate medulloblastoma cells from fresh specimens were not successful. Cells would stop growing after a few passages under standard monolayer culture conditions. Since cells with enhanced tumorigenic capacity usually survive hostile conditions and display anchorage-independent growth, freshly harvested tumor cells were then transferred from 2D to a 3D culture model in soft-agar, which better mimics the physiological environment of tumor cells.

Under such conditions, few small cell colonies could be observed after 35 days of cell seeding. One well developed tumor cell colony was later picked at day 42 and transferred to one well of a 96-well microplate, for expansion under standard culture condition. The colony-derived cells endured clonal expansion for several generations without signs of replicative senescence (Fig. 1a). These cells had adherent properties and fibroblastoid morphology somewhat similar of that of Daoy cells (Fig. 1b, c). This cell morphology was not altered after 30 culture passages. The population doubling time for this cell line was calculated based on a PDL of over 60–70 generations. As observed in Fig. 1a, USP-13-Med cells proliferated faster than Daoy cells, displaying a PDT of 24.5 h, compared to a PDT 29.8 h observed for Daoy cells, under the same experimental conditions.

When subjected to anchorage-independent growth in soft agar, USP-13-Med cells confirmed their highly proliferative behavior, exhibiting a significantly higher efficiency of colony generation compared with Daoy cells (Fig. 1d). Additionally USP-13-Med colonies were well developed with an average diameter of 150 μ m, while Daoy colonies were relatively smaller, inferior of 50 μ m in diameter (Fig. 1e, f).

USP-13-Med cells display stem-like features in vitro

Ability to generate tumorspheres comprised by self-renewable progenitor-like cells, and increased resistance to chemotherapeutic agents are classic hallmarks of cancer stem cells. USP-13-Med cells demonstrated capacity to generate tumorspheres in vitro with efficiency significantly higher than that of Daoy cells (Fig. 2a). Under identical culture conditions, tumorspheres from USP-13-Med cells were also larger than Daoy spheres (Fig. 2b, c). Consistent with what have been reported for medulloblastoma stem cells (Singh et al. 2003), USP-13-Med tumorspheres were significantly enriched in cells expressing the neuroprogenitor cell marker CD133. Under standard monolayer culture conditions, about 50 % of USP-13-Med cells were already positive for CD133. This proportion increased to nearly 80 % when USP-13-Med cells were transferred to tumorsphere generating media. The same physiological response to environmental stimulus was not observed in cultures of Daoy cells, where the proportion of CD133⁺ cells remained unaltered despite conditioning in neural stem cell media (Fig. 2d, e). A subpopulation of cells highly expressing CD133 appeared in tumorspheres of both cell lines. It suggests that the tumorsphere culture condition also stimulates the expression of this marker. A similar result was observed for Nestin expression, which increased in tumorsphere cells (Supplementary Figure 1).

Furthermore, USP-13-Med cells were also more resistant to cisplatin, a common chemotherapeutic agent used in the clinic, than Daoy cells. Based on the amount of apoptotic cell death after 48 h of cisplatin treatment, the LC₅₀ calculated for USP-13-Med cells was 126.4 μ M, a value about 34 times higher than the LC₅₀ calculated for Daoy cells (3.7 μ M) (Fig. 3), indicating increased chemoresistance.

Another intrinsic feature of cancer stem-like cells is their high ability to invade tissues. Although USP-13-Med and Daoy cells displayed similar migration properties in a wound healing-like assay (Fig. 4a, b), when grown as tumor spheroids surrounded by a biological matrix, a condition that better reproduce tumor behavior in vivo, USP-13-Med cells exhibited a significantly higher invasion capacity than Daoy cells (Fig. 4c, d), revealing a more aggressive phenotype.

Fig. 1 Proliferative rate and colony forming efficiency of USP-13-Med cells. **a** Population doubling level of USP-13-Med and Daoy cells assayed until at least 60 generations in vitro. USP-13-Med cells did not present signs of senescence under such conditions. Cellular morphology of Daoy (**b**) and USP-13-Med (**c**) cells in cultures under 40–50 % of cell confluence. Bar size 400 μ m. **d** USP-13-Med displayed significantly higher colony forming efficiency than Daoy cells. Only colonies higher than 50 μ m in diameter were considered. $**p < 0.01$. Representative images of Daoy (**e**) and USP-13-Med (**f**) colonies developed after 15 days of anchorage-independent growth in soft agar. Bar size 1000 μ m

USP-13-Med cell behavior in vivo recapitulates main features of metastatic medulloblastoma

Besides being a fast growing tumor, medulloblastoma is also characterized by its infiltrative behavior and ability to spread. When orthotopically injected in the right lateral ventricle of nude mice, mimicking a M1 metastasis stage (cells localized in the cerebrospinal fluid), all animals of both groups developed tumor (Daoy, $n = 3$; USP-13-Med, $n = 4$). Three out of four animals injected with USP-13-Med cells developed clinical symptoms (weight loss and gait abnormalities) while, during the experimental period set, animals injected with Daoy cells did not display clinical symptoms. USP-13-Med cells were able to engraft in the brain tissue and generate M2 metastatic tumors

characterized by scattered necrotic areas intercalated by high cell density zones. Tumor mass was well developed, well vascularized, and had an irregular shape with several regions of evident intraparenchymal invasion. Although Daoy cells were also able to colonize the brain when injected in the cerebrospinal fluid, the ensuing tumors were more homogeneous, displaying well defined borders. Necrotic zones and vasculature were not evident in the tumor mass and cells had a uniform phenotype (Fig. 5).

Subchromosomal aberrations in USP-13-Med cells

USP-13-Med cells displayed extensive chromosomal copy number aberration. Most chromosomes showed some kind of low level alteration. About 55 losses and

Fig. 2 USP-13-Med cells are capable of generating tumorspheres at high efficiency. **a** Total number of tumorspheres over 50 μm in diameter generated from USP-13-Med and Daoy cells, after 7 days of culture under low-attachment conditions. Representative images of tumorspheres generated by Daoy (**b**) and USP-13-Med (**c**) cells are shown. Bar size 400 μm . **d**,

e Population of CD133⁺ cells in USP-13-Med and Daoy tumorspheres compared with standard culture condition (adherent). The flow cytometry analysis shows an enrichment in CD133⁺ cells in USP-13-Med tumorspheres. Dashed line Negative Control; Gray Experimental condition. *** $p < 0.001$

65 gains were detected (Supplementary Table 1), reflecting a very strong chromosome structural instability.

Notably, USP-13-Med cells have focused and very high amplifications in chromosome 8, cytoband 8p11.22, harboring *ADAM5P* and *ADAM3A* pseudogenes, and in chromosome 3q26.1, in a region containing no genes. Duplications and higher copy number gains in chromosome 2, 6, 7, 11, 12 and 20

were also found. The chromosome 6p21.1 duplication harbors the *VEGFA* gene functioning in angiogenesis, while the *MSI1* gene implicated in medulloblastoma development is located in the duplicated q24.11–q24.32 region of chromosome 12. Of note, the duplicated segments of chromosome 12 also harbor several non-coding RNAs of unknown function.

Marked apparently homozygous deletions in chromosomes 1 (1p32.3), 4 (q13.2, q22.2, q34.3, q35.2), 9

Fig. 3 Increased chemoresistance of USP-13-Med cells. Dose-response curves of USP-13-Med and Daoy cells treated with cisplatin in vitro. Data are presented as viable (non-apoptotic)

cells after 48 h of treatment with increasing log-transformed concentrations of cisplatin. The estimated LC_{50} values for USP-13-Med and Daoy cells were 126.4 and 3.7 μ M, respectively

Fig. 4 Migration and invasion capabilities of USP-13-Med cells.

a Representative images from the wound healing-like migration assay with USP-13-Med and Daoy cells after 0, 12 and 24 h of assay. Bar size 500 μ m.

b Quantification of migrated area after 12 and 24 h.

c Representative images of USP-13-Med and Daoy tumor spheroids embedded in invasion matrix at days 0, 2 and 4. The spindle-like protrusions observed are formed by tumor cells invading the matrix. The higher the cell invasion, the higher the length and amount of such protrusions.

d Measurement of area invaded by USP-13-Med and Daoy cells after 2 and 4 days of assay. Bar size 500 μ m. * $p < 0.05$

(p21.3) and 12 (q21.2) are also characteristic of this cell line. Deletion of 1p32.3 results in loss of the tumor suppressor gene *CDKN2C*, while deletion of 9p21.3 implicates loss of two tumor suppressor genes, *CDKN2A* and *CDKN2B*. The deleted regions of chromosome 4 (q22.2, q34.3, q35.2) encompass both long and small non-coding RNAs of unknown function. The deleted

9p21.3 is also enriched in long non-coding RNAs (FOCAD-AS1, MIR31HG, CDKN2A-AS1, CDKN2B-AS1, LINC01239, LOC101929563), and microRNAs (miR-4473, miR-491 and miR-31). Finally, deleted 12q21.2 harbors the *NAV3* gene, which is frequently deleted in tumors. Major CNA in USP-13-Med are shown in Fig. 6 and Table 1.

Fig. 5 USP-13-Med cells generate aggressive brain tumors with an invasive and necrotic phenotype. Representative images of brain tumors developed after intracerebroventricular injection of USP-13-Med and Daoy cells in BALB/c Nude mice. **a, b** USP-13-Med cells developed a larger tumoral mass invading both brain hemispheres and characterized by an extensive necrotic area, when compared to Daoy cells. *Bar size* 2000 µm. **c, d** Several tumor cell islands (*arrow*) and/or bud-like protrusions (*asterisk*) invading the brain parenchyma were

observed in USP-13-Med tumors, while Daoy tumors tended to be more circumscribed and less developed in size. *Bar size* 1000 µm. **e, f** USP-13-Med tumors displayed a more complex histopathology, with extensive necrotic areas intercalated with areas with high cellularity typically located nearby blood vessels (*arrows*). Daoy tumors, on the other hand, displayed a homogenous morphology characterized by high cell density. *Bar size* 100 µm

No significant copy number aberrations were detected in cytoband locations relative to *TP53* (17p13.1), nor in *APC* (5q22.2), *MYC* (8q24.21), *MYCN* (2p24.3), *CTNNB1* (3p22.1), *GLI2* (2q14.2), and *CDK6* (7q21.2), which have been found in specific molecular subtypes of medulloblastoma. A deletion, possibly in mosaic, was detected in 13q14.2, encompassing *RB1*, and low copy gains were detected in

9q22.32, 12q12–q21.1, and 14q22.1–q32.33, harboring, *PTCH1*, *GLI1*, *WNT1*, and *OTX2*, respectively.

Global gene expression profiling of USP-13-Med cells

A total of 984 genes were found differentially expressed in USP-13-Med cells compared with normal

Fig. 6 Major chromosomal copy number aberration found in USP-13-Med cells. Ideograms of chromosomes displaying major alterations in copy number are shown. Homozygous deletions were found on chromosomes 1, 4, 9 and 12, while an amplification was observed in chromosome 8. Blue or red dots in the aCGH profiles of these chromosomes represent gains or losses, respectively. (Color figure online)

cerebellum, with a fold change value of at least 2. As listed in Supplementary Table 2, there were 448 upregulated genes and 536 downregulated genes. The list of upregulated genes was significantly enriched in genes functioning in cell cycle regulation, cytoskeleton, extracellular matrix, protein metabolism, and p53 signaling, whereas the list of downregulated genes was enriched in genes involved in cell adhesion, neuronal signaling, MAPK and calcium signaling pathways (Fig. 7a).

Although, in both gene lists, no significant enrichment in genes related to the WNT or SHH signaling

was detected, roughly 20 % of the downregulated genes encode proteins involved in neural system development, encompassing genes with specific functions in neurogenesis, neural differentiation, neuron migration, synaptogenesis, and other closely related functional categories, all of which being significantly overrepresented in the list of differentially expressed genes (Fig. 7b).

Additionally, classic oncogenes such as *NRAS*, *RRAS*, *MET*, and *AURKB*, as well as genes encoding proteins related with cancer stem cell properties, including the kinase *MELK*, the multidrug resistance

Table 1 Major chromosomal copy number aberration and respective affected genes found in USP-13-Med cells

Chr	Cytoband	Amplification	Deletion	Gene names
chr1	p32.3	0	−2.518147	FAF1, CDKN2C
chr4	q22.2	0	−3.07152	GRID2
chr4	q34.3	0	−3.045391	AK094945, LINC01098, LINC01099, JC172092, L13714, JC172136, DQ587130, miR-544, DQ593458
chr4	q35.2	0	−2.892707	F11-AS1, MTNR1A, DQ578736, FAT1, DQ598830, DQ587130, DQ593458, RP11-138B4.1, DQ596939, DQ601017, ZFP42, DQ591044, TRIML2, TRIML1, LINC01060, L13714
chr4	q13.2	0	−2.411487	UGT2B17
chr8	p11.22	2.882072	0	ADAM5P, ADAM3A
chr8	p11.22	4.377834	0	ADAM5P, ADAM3A
chr9	p21.3	0	−3.18852	CDKN2BAS1, DMRTA1, miR-384
chr9	p21.3	0	−2.747862	MLLT3, miR-4473, FOCAD, FOCAD-AS1, miR-491, HACD4, IFNB1, IFNW1, IFNA21, IFNA4, IFNA7, IFNA10, IFNA16, IFNA17, IFNA14, IFNA22P, IFNA5, KLHL9, IFNA6, IFNA13, IFNA2, IFNA8, IFNA1, miR-31HG, IFNE, miR-31, MTAP, CDKN2A-AS1, CDKN2A, CDKN2B-AS1, CDKN2B, DMRTA1, LINC01239, LOC01929563
chr12	q21.2	0	−3.090438	E2F7, NAV3

transporter ABCC4, the radioresistance protein EZH2, the DNA repair enzyme RAD50, and the antiapoptotic protein BIRC5, were found overexpressed in USP-13-Med cells.

Discussion

Tumor cell lines are very important tools to address fundamental questions in cancer biology and develop new therapies. In the case of pediatric brain tumors such as medulloblastoma, only a few cell lines have been more extensively used in research (Xu et al. 2012, 2015). Medulloblastoma, however, comprise a group of highly heterogeneous tumors, as revealed by recent gene expression profiling and exome sequencing studies (Kool et al. 2012; Baron 2012; Mardis 2012; Williams et al. 2013). Current molecular subtypes of medulloblastoma are differentially associated with treatment response, frequency of metastasis, and survival rate (Kool et al. 2012; Northcott et al. 2012; Ramaswamy et al. 2013b). Thus, a diversity of cell lines displaying different characteristics and molecular/genetic anomalies is required to properly cover the heterogeneity of medulloblastoma.

The USP-13-Med cell line, obtained from a 3 year old boy with classic medulloblastoma, display typical

cancer hallmarks that contribute to tumor maintenance and aggressiveness (Hanahan and Weinberg 2000, 2011). In particular, this cell line demonstrated an aggressive tumor behavior in vitro, revealed by a significantly higher cell proliferation rate compared to Daoy cells. The population doubling time of USP-13-Med (24.5 h) is also shorter than those reported for other commonly used medulloblastoma cell lines, such D283-Med (52.5 h) (Friedman et al. 1985), CHLA-259 (76 h) (Xu et al. 2012), and MHH-MED-2 (119 h) (Pietsch et al. 1994). Under selective culture conditions, USP-13-Med cells still demonstrated significantly higher capacity to form colonies in soft agar, as well as tumorspheres in neural stem cell medium, compared to Daoy cells. Notably, contrary to Daoy, USP-13-Med line was able to respond to environmental stimuli, enriching the proportion of cells expressing the neural stem cell marker CD133 under tumorsphere-generating conditions.

Some of the chromosomal abnormalities found in USP-13-Med cells are in concert with these observations. While gain in 14q22.1–q32.33, harboring the *OTX2* oncogene and deletion of the tumor suppressors *CDKN2A* and *CDKN2B* in chromosome 9p21.3, *CDKN2C* in chromosome 1p32.3, and of the cell cycle repressor *E2F7* (Di Stefano et al. 2003) in chromosome 12q21.2 would favor increased cell

Fig. 7 Enrichment and Functional Annotation Analysis of genes differentially expressed in USP-13-Med cells. **a** Main functional categories and signaling pathways significantly associated with the subset of either upregulated or downregulated genes in USP-13-Med cells, relative to normal cerebellum. **b** Biological processes significantly associated with the subset of downregulated genes in USP-13-Med, showing enrichment in genes regulating neurodevelopment. *p* values ≤ 0.05 for all comparisons, according to the Fisher Exact Test for ontology enrichment analysis

proliferation rates, additional copies of the *MSH1* gene due to gains in the 12q24.11–q24.32 would favor a more primitive, neural stem-like cell phenotype. Besides being a neural stem cell marker (Glazer et al. 2012), the *MSH1* protein also promotes cell proliferation by suppressing p21, p27 and p53 translation (Liu et al. 2014). Upregulation of *MELK*, encoding a serine/threonine kinase with critical role in cancer stem cell proliferation and survival (Ganguly et al. 2014), was also detected in USP-13-Med cells.

In brain tumor cells, both *MSH1* (Vo et al. 2012) and *MELK* (Marie et al. 2008) upregulation, as well as capacity to generate tumorspheres in vitro (Panosyan

et al. 2010), have been correlated with poor prognosis. Self-renewable CD133⁺ medulloblastoma stem cells are also known to be more efficient in initiating tumors in vivo (Singh et al. 2004). Furthermore, cancer stem cells tend to form tumors that better resemble the original anatomopathological features of the human disease, displaying aggressive features such as extensive necrotic areas, invasion to adjacent tissue, evident angiogenesis, and cellular heterogeneity (Galli et al. 2004). Consistently, when orthotopically inoculated in the lateral brain ventricle, USP-13-Med cells were able to generate large tumors characterized by presence of necrotic areas, evident vasculature, and

irregular board plenty of cells invading the brain parenchyma. This high degree of intraparenchymal invasion is supported by the significantly enhanced 3D invasion capacity observed for USP-13-Med spheroids, compared to Daoy. This is an important USP-13-Med trait, since cell motility is also implicated in tumor aggressiveness and ability to metastasize (van Zijl et al. 2011; Polyak and Weinberg 2009; Dave et al. 2012). Several small tumor islands could be observed in some brains of animals injected with USP-13-Med cells. These structures could represent either new metastatic lesions or protrusions of the main tumor. In any case, these are features indicative of more invasive and aggressive tumors.

Currently, treatment of medulloblastoma is multimodal, consisting in tumor resection followed by chemotherapy, with cisplatin being one of the main chemotherapeutic agents used (Ramaswamy et al. 2015). Radiotherapy may also be applied depending on the age of the patient, with doses varying according to clinical staging (Gerber et al. 2014; Ramaswamy et al. 2015). The 5-year disease-free survival range from about 85 % in average risk patients to 60–65 % in high risk patients (Crawford et al. 2007; Remke et al. 2013). Nonetheless, up to 40 % of patients do not respond to treatment and present tumor recurrence, which often leads to a poor survival outcome (Taylor et al. 2003; Lannering et al. 2012; Tarbell et al. 2013; Othman et al. 2014). The enhanced resistance of USP-13-Med cells to cisplatin is, therefore, another interesting trait of this cell line that could be explored to study chemoresistance and to screen new drug candidates.

This increased resistance to apoptosis induced by chemotherapy may be explained, at least in part, by some of the chromosomal abnormalities found in USP-13-Med cells. The loss of chromosome 12q21.2 encompasses *NAV3*, whose silencing was recently reported to inhibit apoptosis of breast cancer cells (Cohen-Dvashi et al. 2015). USP-13-Med cells also seem to have dysfunctional p53 signaling. Despite the native p53 status of these cells, multiple deletions affecting genes encoding upstream and downstream mediators of p53 signaling were identified. For instance, the deletion of *CDKN2A*, which encodes the tumor suppressors p14 and p16 by alternative splicing, may affect the p14-mediated accumulation of p53 and ensuing activation (Midgley et al. 2000). Noteworthy, deletion of 9p21.3 harbors the mirR-491, which was recently reported to have pro-apoptotic

activity by targeting both BCL-XL and MCL1 proteins in chemoresistant ovarian cancer cell lines (Denoyelle et al. 2014), as well as miR-31, whose genomic deletion has been correlated with defects in the p53 pathway in cancer cells (Creighton et al. 2010). Decreased miR-31 expression was also reported to enhance chemoresistance of ovarian cancer cells due to up-regulation of its target, receptor tyrosine kinase MET (Mitamura et al. 2013). Finally, gains in 12q12–q21.1 encompassing *MDM2* would favor p53 degradation (Pant and Lozano 2014), while gains in 12q24.11–q24.32, as mentioned above, would favor inhibition of p53 translation by MSI1 (Liu et al. 2014).

Interestingly, USP-13-Med cells have few genetic aberrations affecting proteins of both WNT (WNT1) and SHH (PTCH1 and GLI1) signaling pathways. Nonetheless, low copy gain of *OTX2* was also detected in USP-13-Med cells. Previous studies reported that *OTX2* copy number gain was not associated with WNT or SHH medulloblastoma subtypes (Adamson et al. 2009), but rather with either group 3 or 4 tumors (Taylor et al. 2012). The metastatic behavior USP-13-Med cells is also more coherent with groups 3 and 4, since tumors of the WNT and SHH subgroups are rarely metastatic (Taylor et al. 2012). Since neither amplification of *MYC*, typical in group 3 tumors, nor of *MYCN* were found in USP-13-Med cells, the CNA profile of these cells are more consistent with that of group 4 tumors. In agreement with the CNA status, the global gene expression profiling of USP-13-Med cells revealed enrichment in differentially expressed genes involved in neural development and other neurogenesis-related functions which, again, have been correlated with group 4 medulloblastomas (Taylor et al. 2012). Notably, genes involved in WNT or SHH pathways were not significantly overrepresented in the list of differentially expressed genes.

Compared with other subgroups, medulloblastomas categorized in group 4 are more heterogeneous and the molecular pathogenesis of such tumors is uncertain. Confirmation of this molecular classification would add another important value to USP-13-Med cell line as a biologically relevant model since, from the 15 available medulloblastoma cell lines with known molecular classification, only one (CHLA-01-MED) belongs to group 4 (Xu et al. 2015).

In summary, we established a new human medulloblastoma cell line characterized by a high

proliferative activity, high colony formation efficiency, enhanced ability to generate tumorspheres enriched in CD133⁺ cells, as well as increased invasion capacity and chemoresistance, when compared to the well-established cell line Daoy. USP-13-Med was also tumorigenic in vivo in an orthotopic metastatic model, generating well developed tumors with extensive necrosis, evident vascularization and intraparenchymal invasion, typical of aggressive tumors. Numerous chromosomal gains and losses were detected, affecting oncogenes, tumor suppressors, neurogenesis genes, microRNAs, as well as long non-coding RNAs of unknown function. Overexpression of classic oncogenes and cancer stem cell-related genes were also found. Cell behavior, chromosomal aberrations, and global gene expression profile more closely related to those of group 4 medulloblastomas were identified in this cell line. All these features are highly advantageous for pre-clinical studies aiming at improving our understanding of medulloblastoma development and testing new therapeutic strategies. The use of this novel cell line by the scientific community in future studies shall also refine its molecular classification.

Acknowledgments The authors thank Dr. Carla Rosenberg for supervising the CNA analysis and for her helpful comments on the manuscript. This study was supported by funds from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Grants FAPESP-CEPID (2013/08028-1), FAPESP (2010/52686-5); funds from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Grants CNPq (309206/2011-1; 444722/2014-9), INCT-CETGEN (573633/2008-8); and funds from Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Grant FINEP-CTC (0108057900).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors disclose no potential conflicts of interest.

References

- Adamson DC, Shi Q, Wortham M et al (2009) OTX2 is critical for the maintenance and progression of Shh-independent medulloblastomas. *Cancer Res* 70:181–191. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2331
- ATCC (2014) ATCC® animal cell culture guide. http://www.atcc.org/guides/animal_cell_culture_guide.aspx. Accessed 16 Jul 2014
- Baron JA (2012) Screening for cancer with molecular markers: progress comes with potential problems. *Nat Rev Cancer* 12:368–371. doi:10.1038/nrc3260
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing on JSTOR. *J R Stat Soc Series B* 57:289–300. doi:10.2307/2346101
- Cohen-Dvashi H, Ben-Chetrit N, Russell R et al (2015) Navigator-3, a modulator of cell migration, may act as a suppressor of breast cancer progression. *EMBO Mol Med* 7:299–314. doi:10.15252/emmm.201404134
- Crawford JR, MacDonald TJ, Packer RJ (2007) Medulloblastoma in childhood: new biological advances. *Lancet Neurol* 6:1073–1085. doi:10.1016/S1474-4422(07)70289-2
- Creighton CJ, Fountain MD, Yu Z et al (2010) Molecular profiling uncovers a p53-associated role for microRNA-31 in inhibiting the proliferation of serous ovarian carcinomas and other cancers. *Cancer Res* 70:1906–1915. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3875
- Dave B, Mittal V, Tan NM, Chang JC (2012) Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance. *Breast Cancer Res* 14:202. doi:10.1186/bcr2938
- Denoyelle C, Lambert B, Meryet-Figuière M et al (2014) miR-491-5p-induced apoptosis in ovarian carcinoma depends on the direct inhibition of both BCL-XL and EGFR leading to BIM activation. *Cell Death Dis* 5:e1445. doi:10.1038/cddis.2014.389
- Di Stefano L, Jensen MR, Helin K (2003) E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *EMBO J* 22:6289–6298. doi:10.1093/emboj/cdg613
- Friedman HS, Burger PC, Bigner SH et al (1985) Establishment and characterization of the human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft D283 Med. *J Neuropathol Exp Neurol* 44:592–605. doi:10.1097/00005072-198511000-00005
- Galli R, Binda E, Orfanelli U et al (2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64:7011–7021. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1364
- Ganguly R, Hong CS, Smith LGF et al (2014) Maternal embryonic leucine zipper kinase: key kinase for stem cell phenotype in glioma and other cancers. *Mol Cancer Ther* 13:1393–1398. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0764
- Gerber NU, Mynarek M, von Hoff K et al (2014) Recent developments and current concepts in medulloblastoma. *Cancer Treat Rev* 40:356–365. doi:10.1016/j.ctrv.2013.11.010
- Glazer RI, Vo DT, Penalva LOF (2012) Musashi1: an RBP with versatile functions in normal and cancer stem cells. *Front Biosci* 17:54–64. doi:10.2741/3915
- Goschzik T, Zur Mühlen A, Kristiansen G et al (2014) Molecular stratification of medulloblastoma: comparison of histological and genetic methods to detect Wnt activated tumors. *Neuropathol Appl Neurobiol*. doi:10.1111/nan.12161
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4:44–57. doi:10.1038/nprot.2008.211
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E (2010) Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60:277–300. doi:10.3322/caac.20073
- Kool M, Korshunov A, Remke M et al (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol* 123:473–484. doi:10.1007/s00401-012-0958-8
- Laks DR, Masterman-Smith M, Visnys K et al (2009) Neurosphere formation is an independent predictor of clinical outcome in malignant glioma. *Stem Cells* 27:980–987. doi:10.1002/stem.15
- Lannering B, Rutkowski S, Doz F et al (2012) Hyperfractionated versus conventional radiotherapy followed by chemotherapy in standard-risk medulloblastoma: results from the randomized multicenter HIT-SIOP PNET 4 trial. *J Clin Oncol* 30:3187–3193. doi:10.1200/JCO.2011.39.8719
- Liu X, Yang W-T, Zheng P-S (2014) Msi1 promotes tumor growth and cell proliferation by targeting cell cycle checkpoint proteins p21, p27 and p53 in cervical carcinomas. *Oncotarget* 5:10870–10885
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD et al (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97–109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4
- Mardis ER (2012) Genome sequencing and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 22:245–250. doi:10.1016/j.gde.2012.03.005
- Marie SKN, Okamoto OK, Uno M et al (2008) Maternal embryonic leucine zipper kinase transcript abundance correlates with malignancy grade in human astrocytomas. *Int J Cancer* 122:807–815. doi:10.1002/ijc.23189
- Midgley CA, Destorro JM, Saville MK et al (2000) An N-terminal p14ARF peptide blocks Mdm2-dependent ubiquitination in vitro and can activate p53 in vivo. *Oncogene* 19:2312–2323. doi:10.1038/sj.onc.1203593
- Mitamura T, Watari H, Wang L et al (2013) Downregulation of miRNA-31 induces taxane resistance in ovarian cancer cells through increase of receptor tyrosine kinase MET. *Oncogenesis* 2:e40. doi:10.1038/onsis.2013.3
- Northcott PA, Korshunov A, Pfister SM, Taylor MD (2012) The clinical implications of medulloblastoma subgroups. *Nat Rev Neurol* 8:340–351. doi:10.1038/nrneurol.2012.78
- Ostrom QT, Gittleman H, Farah P et al (2013) CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006–2010. *Neuro Oncol* 15:ii1–ii56. doi:10.1093/neuonc/not151
- Othman RT, Kimishi I, Bradshaw TD et al (2014) Overcoming multiple drug resistance mechanisms in medulloblastoma. *Acta Neuropathol Commun* 2:57. doi:10.1186/2051-5960-2-57
- Panosyan EH, Laks DR, Masterman-Smith M et al (2010) Clinical outcome in pediatric glial and embryonal brain tumors correlates with in vitro multi-passageable neurosphere formation. *Pediatr Blood Cancer* 55:644–651. doi:10.1002/pbc.22627
- Pant V, Lozano G (2014) Limiting the power of p53 through the ubiquitin proteasome pathway. *Genes Dev* 28:1739–1751. doi:10.1101/gad.247452.114
- Pietsch T, Scharmann T, Fonatsch C et al (1994) Characterization of five new cell lines derived from human primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res* 54:3278–3287
- Pietsch T, Schmidt R, Remke M et al (2014) Prognostic significance of clinical, histopathological, and molecular characteristics of medulloblastomas in the prospective HIT2000 multicenter clinical trial cohort. *Acta Neuropathol* 128:137–149. doi:10.1007/s00401-014-1276-0
- Pizer B, Donachie PHJ, Robinson K et al (2011) Treatment of recurrent central nervous system primitive neuroectodermal tumours in children and adolescents: results of a Children's Cancer and Leukaemia Group study. *Eur J Cancer* 47:1389–1397. doi:10.1016/j.ejca.2011.03.004
- Polyak K, Weinberg RA (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9:265–273. doi:10.1038/nrc2620
- Ramaswamy V, Northcott PA, Taylor MD (2011) FISH and chips: the recipe for improved prognostication and outcomes for children with medulloblastoma. *Cancer Genet* 204:577–588. doi:10.1016/j.cancergen.2011.11.001
- Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E et al (2013a) Recurrence patterns across medulloblastoma subgroups: an integrated clinical and molecular analysis. *Lancet Oncol* 14:1200–1207. doi:10.1016/S1470-2045(13)70449-2
- Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E et al (2013b) Recurrence patterns across medulloblastoma subgroups: an integrated clinical and molecular analysis. *Lancet Oncol* 14:1200–1207. doi:10.1016/S1470-2045(13)70449-2
- Ramaswamy V, Remke M, Adamski J et al (2015) Medulloblastoma subgroup-specific outcomes in irradiated children: who are the true high-risk patients? *Neuro Oncol* 16:357. doi:10.1093/neuonc/nou357
- Remke M, Ramaswamy V, Taylor MD (2013) Medulloblastoma molecular dissection: the way toward targeted therapy. *Curr Opin Oncol* 25:674–681. doi:10.1097/CCO.000000000000008
- Ries LAG, Smith MA, Gurney JG et al (1999) Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975–1995. In: National Cancer Institute, SEER Program. NIH Pub. <http://seer.cancer.gov/archive/publications/childhood/childhood-monograph.pdf>. Accessed 4 Aug 2014
- Schaffer WI (1990) Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. *Vitro Cell Dev Biol* 26:97–101. doi:10.1007/BF02624162
- Schroeder K, Gururangan S (2014) Molecular variants and mutations in medulloblastoma. *Pharm Pers Med* 7:43–51. doi:10.2147/PGPM.S38698
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M et al (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63:5821–5828
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID et al (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432:396–401. doi:10.1038/nature03128
- Studebaker AW, Hutzen B, Pierson CR et al (2012) Oncolytic measles virus prolongs survival in a murine model of cerebral spinal fluid-disseminated medulloblastoma. *Neuro Oncol* 14:459–470. doi:10.1093/neuonc/nor231

- Tarbell NJ, Friedman H, Polkinghorne WR et al (2013) High-risk medulloblastoma: a pediatric oncology group randomized trial of chemotherapy before or after radiation therapy (POG 9031). *J Clin Oncol* 31:2936–2941. doi:10.1200/JCO.2012.43.9984
- Taylor RE, Bailey CC, Robinson K et al (2003) Results of a randomized study of preradiation chemotherapy versus radiotherapy alone for nonmetastatic medulloblastoma: the International Society of Paediatric Oncology/United Kingdom Children's Cancer Study Group PNET-3 Study. *J Clin Oncol* 21:1581–1591. doi:10.1200/JCO.2003.05.116
- Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A et al (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 123:465–472. doi:10.1007/s00401-011-0922-z
- Van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W (2011) Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res* 728:23–34. doi:10.1016/j.mrrev.2011.05.002
- Venugopal C, Li N, Wang X et al (2012) Bmi1 marks intermediate precursors during differentiation of human brain tumor initiating cells. *Stem Cell Res* 8:141–153. doi:10.1016/j.scr.2011.09.008
- Vo DT, Subramaniam D, Remke M et al (2012) The RNA-binding protein Musashi1 affects medulloblastoma growth via a network of cancer-related genes and is an indicator of poor prognosis. *Am J Pathol* 181:1762–1772. doi:10.1016/j.ajpath.2012.07.031
- Ward E, DeSantis C, Robbins A et al (2014) Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 64:83–103. doi:10.3322/caac.21219
- WHO (2010) Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf. Accessed 16 July 2014
- Williams SA, Anderson WC, Santaguida MT, Dylla SJ (2013) Patient-derived xenografts, the cancer stem cell paradigm, and cancer pathobiology in the 21st century. *Lab Invest* 93:970–982. doi:10.1038/labinvest.2013.92
- Wu X, Northcott PA, Dubuc A et al (2012) Clonal selection drives genetic divergence of metastatic medulloblastoma. *Nature* 482:529–533. doi:10.1038/nature10825
- Xu J, Erdreich-Epstein A, Gonzalez-Gomez I et al (2012) Novel cell lines established from pediatric brain tumors. *J Neurooncol* 107:269–280. doi:10.1007/s11060-011-0756-5
- Xu J, Margol A, Asgharzadeh S, Erdreich-Epstein A (2015) Pediatric brain tumor cell lines. *J Cell Biochem* 116:218–224. doi:10.1002/jcb.24976
- Yuan X, Curtin J, Xiong Y et al (2004) Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23:9392–9400. doi:10.1038/sj.onc.1208311
- Zeltzer PM, Boyett JM, Finlay JL et al (1999) Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study. *J Clin Oncol* 17:832

miR-367 promotes proliferation and stem-like traits in medulloblastoma cells

Carolini Kaid, Patrícia B. G. Silva, Beatriz A. Cortez, Carolina O. Rodini, Patricia Semedo-Kuriki and Oswaldo K. Okamoto

Department of Genetics and Evolutionary Biology, Human Genome and Stem Cell Research Center, Biosciences Institute, University of São Paulo, 05508-090 São Paulo, SP, Brazil

Key words

Cancer stem cell, medulloblastoma, microRNA, miR-367, pluripotency

Correspondence

Oswaldo K. Okamoto, Department of Genetics and Evolutionary Biology, Human Genome and Stem Cell Research Center, Biosciences Institute, University of São Paulo, 05508-090 São Paulo, SP, Brazil.
Tel: (55 11) 3091-7501; Fax: (55 11) 3091-7553;
E-mail: keith.okamoto@usp.br

Funding Information

This work was supported by funds from FAPESP-CEPID (2013/08028-1), FAPESP (2010/52686-5), CNPq (309206/2011-1; 444722/2014-9), INCT-CETGEN (573633/2008-8), and FINEP-CTC (0108057900). CK, PBGS, COR, and BAC were recipients of FAPESP fellowships (2013/02983-1; 2011/10001-9; 2013/17566-7; 2014/10519-6).

Received February 25, 2015; Revised June 10, 2015;
Accepted June 30, 2015

Cancer Sci 106 (2015) 1188–1195

doi: 10.1111/icas.12733

In medulloblastoma, abnormal expression of pluripotency factors such as LIN28 and OCT4 has been correlated with poor patient survival. The miR-302/367 cluster has also been shown to control self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells, but there is limited, mostly correlational, information about these pluripotency-related miRNA in cancer. We evaluated whether aberrant expression of such miRNA could affect tumor cell behavior and stem-like traits, thereby contributing to the aggressiveness of medulloblastoma cells. Basal expression of primary and mature forms of miR-367 were detected in four human medulloblastoma cell lines and expression of the latter was found to be upregulated upon enforced expression of OCT4A. Transient overexpression of miR-367 significantly enhanced tumor features typically correlated with poor prognosis; namely, cell proliferation, 3-D tumor spheroid cell invasion and the ability to generate neurosphere-like structures enriched in CD133 expressing cells. A concurrent downregulation of the miR-367 cancer-related targets *RYR3*, *ITGAV* and *RAB23*, was also detected in miR-367-overexpressing cells. Overall, these findings support the pro-oncogenic activity of miR-367 in medulloblastoma and reveal a possible mechanism contributing to tumor aggressiveness, which could be further explored to improve patient stratification and treatment of this important type of pediatric brain cancer.

Medulloblastoma is the most common malignant brain tumor in children aged 4 or younger and one of the leading causes of morbidity and mortality related to childhood cancer.^(1,2) This embryonal tumor of the cerebellum, classified by the World Health Organization (WHO) as a grade IV tumor, is highly malignant and often spreads to other brain regions as well as to the spinal cord. The current treatment consisting of surgically removing as much tumor as possible, followed by radiation and chemotherapy, is not effective in approximately one-third of patients, who eventually succumb to the disease.

Although early age and metastatic spread at diagnosis are usually associated with poor survival,⁽³⁾ predictions of prognosis and response to standardized treatments based on clinical parameters have proven difficult. Medulloblastoma cells present a high degree of phenotypic and functional heterogeneity, which may result from stochastic genetic⁽⁴⁾ and/or epigenetic changes,⁽⁵⁾ as well as from interaction between cancer cells and the tumor niche.⁽⁶⁾ Based on molecular and genetic traits, the most recent consensus classification stratifies medulloblastoma in four distinct groups, two of which relate to developmental signaling pathways.⁽⁷⁾

The existence of highly tumorigenic cancer cells displaying stem cell properties in several types of malignant tumors adds another layer of complexity in understanding the mechanisms

underlying inter-tumor and intra-tumor heterogeneity.⁽⁸⁾ Due to their self-renewal and differentiation capability, cancer stem cells may generate different progenies of cancer and stromal cells along tumor development. The continuous process of subclonal development and divergence fuels heterogenic aberrant tumor cell behavior, with important impacts on the clinical outcome of patients.⁽⁹⁾ Investigating stemness properties in cancer cells is, therefore, of great relevance to improve medulloblastoma treatment.

As in most embryonal tumors, medulloblastoma cells display primitive cell features, including aberrant function of SHH, NOTCH, WNT and TGFβ1 signaling pathways, which are involved in normal neurodevelopment.⁽¹⁰⁾ Some of these abnormalities are thought to arise from prenatal mutations more likely occurring in neural stem or progenitor-like cells, favoring an increasing genomic instability in those cells.⁽¹¹⁾ Despite the cell of origin, alterations conferring stemness to cells may increase their fitness and favor tumor development.

Certain early driver alterations may also be related to embryonic stem cell (ESC) traits, because these cells display unlimited growth potential and tumorigenicity.⁽¹²⁾ At the molecular level, cancer cells and ESC also share many similarities in their gene expression programs.^(13,14) Indeed, aberrant expression of ESC-related pluripotency factors such as LIN28⁽¹⁵⁾ and OCT4 have

been reported in medulloblastoma specimens, with OCT4 expression being significantly correlated with shorter survival in either clinically high or average risk patients.⁽¹⁶⁾ Although the underlying alteration leading to such aberrant expression of pluripotency-related genes is not clear in medulloblastoma, the very low frequency of driver mutations in these tumors⁽¹⁷⁾ and the recent association of differential DNA methylation status with *LIN28B* misexpression⁽¹⁸⁾ indicate the contribution of chromosomal and epigenetic aberrations.

OCT4 is one of the four transcription factors capable of reprogramming somatic cells to pluripotency.⁽¹⁹⁾ More recently, overexpression of the miR-302/367 cluster has also been shown to induce pluripotency in somatic cells, without requirement of exogenous transcription factors, and with an efficiency two orders of magnitude higher than the standard OCT4/SOX2/KLF4/MYC-based methods.⁽²⁰⁾ In fact, earlier studies had reported specific miRNA highly expressed by embryonic stem cells (ESC), with a critical role in controlling pluripotency and cell differentiation.^(21,22)

Similar to what has been reported for transcription factors, aberrant expression of miRNA involved in pluripotency may also contribute to stemness traits in cancer cells. Yet, information about pluripotency-related miRNA and cancer aggressiveness is scarce in the literature and, thus far, no such studies have been reported for medulloblastoma. In this work, we found that miR-367 is upregulated by OCT4 in medulloblastoma cells and that transient overexpression of miR-367 enhanced cell proliferation, spheroid cell invasion, as well as generation of neurosphere-like structures *in vitro*, suggesting the pro-oncogenic activity of this microRNA originally related to pluripotency and ESC self-renewal.

Materials and Methods

Cell culture. Human medulloblastoma cell lines D283-Med (ATCC HTB-185), Daoy (ATCC HTB-186) and CHLA-01-Med (ATCC CRL-3021) were purchased directly from ATCC. Cell line USP-13-Med was obtained from HUG-CEL (Human Genome and Stem Cell Center, Universidade de São Paulo). CHLA-01-Med cells were maintained in DMEM-Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) with 20 ng/mL human recombinant EGF, 20 ng/mL human recombinant basic FGF and B-27 Supplement (Invitrogen, Carlsbad, CA) to a final concentration of 2%. D283-Med, Daoy and USP-13-Med were cultivated in low DMEM supplemented with 10% FBS and 1% 100 µg/mL penicillin/streptomycin solution. The H9 cell line of human ESC (hESC) was kindly provided by LANCE (Laboratório Nacional de Células-tronco Embrionárias, UFRJ) and cultivated under standard conditions, as previously described.⁽¹⁴⁾ All cell lines were maintained at 37°C, 5% CO₂.

Overexpression of miR-367. For miR-367 transient overexpression, cells at 50% confluence were transfected with mirVANA miRNA 367 mimic, inhibitor (Life Technologies, Carlsbad, CA) or an universal non-specific ncRNA control that does not target any sequence in the human transcriptome (DS-NC1; Integrated DNA Technologies, Coralville, IA), using Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies). Transfection was performed according to the manufacturer's instructions, using a final oligonucleotide concentration of 20 nM. Medium was replaced 24 h after transfection. Transient miR-367 overexpression efficiency was confirmed by analyzing the cellular levels of RYR3 and RAB23, two experimentally validated targets of miR-367.⁽²³⁾

Protein analysis. After 48 h of cellular transfection, cells were permeabilized with the FIX & PERM Cell Fixation and Cell Permeabilization Kit (Life Technologies) and incubated with anti-RYR3 antibody (NPB1-70399; Novus Biologicals, Littleton, CO). The amount of RYR3+ cells was estimated by flow cytometry in the Guava easyCyte 5HT Flow Cytometer (Millipore, Billerica, MA). RAB23 protein levels were analyzed by western blotting under standard conditions. After protein transfer, PVDF membranes (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) were blocked, incubated first with anti-RAB23 antibody (Abcam Cat. No.169491) and then with a goat anti-mouse HRP-conjugated secondary antibody. Protein bands were revealed using the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore).

miRNA and gene expression analyses. Total RNA was extracted from tumors and hESC using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. MicroRNA were purified using the mirVana miRNA Isolation kit (Life Technologies), following the manufacturer's protocol. RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm with NANO DROP (Qiagen). A total of 1 µg of RNA was reverse transcribed with the SuperScript III Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed in a 7500 Real-Time PCR System Thermal Cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Expression of miR-367 and pri-miR-367 were quantitated using individual TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems). Small nuclear RNA, C/D Box 58A (RNU58A), was used as endogenous control. Expression analysis of pluripotency-related genes was performed with Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Life Technologies), using GAPDH as endogenous control. Reaction specificity was assessed by dissociation curve analysis. Primer sequences: SOX2 for: 5'-GCT ACAGCATGATG-CAGGACCA-3', SOX2 rev: 5'-TCTGCGAG CTGGTCATGGAGTT-3', NANOG for: 5'-CCTGAAGAAAA CTATCCATCC-3', NANOG rev: 5'-CCTGTCTTCTTTTTCGCA-3', OCT4A for: 5'-TCGCAAGCCCTCATTTCACCA-3', OCT4A rev: 5'-GGACTCCTCCGGGTTTGTCT-3', GAPDH for: 5'-GCATCCTGGGCTACACTG-3', GAPDH rev: 5'-CCACCCCTGTTGCTGCTGTA-3'. RT-PCR quantification was based on linear regression analysis from standard curves with amplification efficiency ranging from 90% to 100%. Reactions were performed in triplicate. RNA from hESC was used as a positive control in all analyses.⁽²⁴⁾

Cell cycle analysis. After 48 h of transfection with miR-367 mimic or non-specific control, cells were washed twice with PBS and fixed in cold 70% ethanol at 4°C for 1 h. Cells were then incubated with Guava Cell Cycle Reagent (Millipore) for 30 min, at room temperature, shielded from light, and analyzed using the Guava easyCyte 5HT Flow Cytometer (Millipore).

Immunofluorescence and mitotic index. After 48 h of transfection with either miR-367 mimic or non-specific control, cells were fixed with 3.7% formaldehyde for 30 min. For the mitotic index, cells were stained with 1 µg/mL DAPI for 2 min, washed in PBS and mounted on slides with VectaShield. Then, 1000 cells/slide were counted on three different slides for each experimental group. For cell morphology analysis, cells were submitted to immunofluorescence. After fixation, cells were treated with PBSAT (0.1% Triton X-100, 1% BSA) for 30 min and then incubated with anti-alpha tubulin (1:200 dilution; Sigma) and anti-pericentrin (1:800 dilution; Abcam) antibodies, for 1 h at room temperature.

After washing with PBS three times, cell nuclei were stained with 1 µg/mL DAPI for 2 min and cells were mounted on slides with VectaShield.

EdU incorporation assay. Cells in the S phase of cell cycle were determined by EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) incorporation assay (Click-It EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit, Life Technologies), according to the manufacturer's protocol. EdU (10 µM) incorporation time was 30 min for Daoy cells and 45 min for CHLA-01-Med, D283-Med and USP-13-Med cells.

Neurosphere formation assay. Cells were transfected with miR-367 or non-specific control and plated 24 h later into 96-well low-attachment plates (Corning, New York, NY), at a density of 1×10^3 cells/mL in DMEM/F12 medium containing 20 ng/mL EGF, 20 ng/mL bFGF, 1×10^{-8} M B-27 and 1×10^{-8} M N2 (Invitrogen). Well-developed neurospheres (D283-Med and Daoy: ≥ 30 µm in diameter; CHLA-01-Med: ≥ 50 µm in diameter; USP-13-Med: ≥ 100 µm in diameter) were measured at day 4. D283-Med, Daoy and USP-13-Med neurospheres were dissociated with 0.05% trypsin/1 mM EDTA (Tryple, Life Technologies) and CHLA-01-Med neurospheres were dissociated with Cell Strainer Cap (Corning) to reach single cell suspension. For CHLA-01-Med, Daoy and D283-Med cells, 1×10^5 cells were labeled with CD133/1 PE antibody (AC133; Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) for 40 min at 4°C. Cells were analyzed in the flow cytometer FACS Aria II with DIVA software (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). USP-13-Med cells were labeled as described above, fixed (PFA 4% for 1 h) and permeabilized (0.1% Triton X-100 for 10 min) before analysis in the Guava easyCyte 5HT Flow Cytometer (Millipore). Cells displaying fluorescence higher than the basal fluorescence of unstained cells were deemed CD133-positive.

Apoptosis assay. CHLA-01-Med, USP-13-Med, D283-Med and Daoy cells were transfected with miR-367 or non-specific control and 24 h later treated with 9.2, 126.4, 50 and 3.7 µM of cisplatin, respectively, for 48 h. These concentrations correspond to the LD50 previously determined for each native cell line by dose-response curves. Apoptotic cells were evaluated using the Guava Nexin Annexin V Assay kit (Millipore), following the manufacturer's instructions, and samples were ana-

lyzed using the Guava easyCyte 5HT Flow Cytometer (Millipore).

Invasion assay. Tumor cell invasion activity was accessed using the Cultrex 96 Well 3-D Spheroid BME Cell Invasion Assay (Amsbio, Abingdon, UK). After 24 h of transfection with miR-367, miR-367 inhibitor or non-specific control, cells were plated into 96-well low-attachment round plate (Corning) at a density of 4×10^3 cells/mL, along with a specialized Spheroid Formation ECM to drive cell aggregation and spheroid formation. Spheroids were then embedded in an invasion matrix composed of basement membrane proteins that form a hydrogel network on which invasive cells can travel. Invading cells form spindle-like protrusions out from the spheroid core. The amount of these spindle-like protrusions and their length are proportional to the degree of cell invasion, which was visualized under a digital inverted microscope (EVOS Cell Imaging System; Life Technologies) and quantitated with the ImageJ software, according to the manufacturer's instructions. Daoy, D283-Med and CHLA-01-Med cells were not included in this analysis because they did not display intrinsic invasive properties under such experimental conditions (Suppl. Fig. S1).

Statistical analysis. All experiments were performed in triplicate and three independent experiments were carried out. Data were analyzed by ANOVA and the Bonferroni *post hoc* test. Significance was established at the $P \leq 0.05$ level. Results are expressed as mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Results

Expression of miR-367 is upregulated by OCT4A in medulloblastoma cells. All medulloblastoma cell lines displayed detectable expression of the primary and mature forms of miR-367, although at significantly lower levels when compared with hESC (Fig. 1a,b). Given the role of this microRNA in pluripotency and the aberrant *OCT4* expression reported in aggressive medulloblastoma, a possible connection between miR-367 and *OCT4* expression was evaluated. Medulloblastoma cells stably overexpressing *OCT4A*, encoding an *OCT4* isoform with a well-known role in pluripotency, were obtained, reaching tran-

Fig. 1. Expression profile of miR-367 and pluripotency factors in medulloblastoma cells. Expression of (a) pri-miR-367 and (b) mature miR-367 were detected in four human medulloblastoma cell lines by real-time PCR, using RNU58A as endogenous control. Expression levels of non-coding RNA in tumor cells were compared with the levels in native pluripotent cells (hESC). (c) Upregulation of miR-367 in medulloblastoma cells stably overexpressing *OCT4A*. Expression of genes encoding the pluripotency factors (d) *OCT4A*, (e) *SOX2* and (f) *NANOG*, 48 h post-transfection with either miR-367 mimic or non-specific control. Expression of these protein-coding genes was accessed by real-time PCR, using GAPDH as endogenous control. Significance level: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$.

script levels similar to those found in hESC (Suppl. Fig. S2). Indeed, basal expression of miR-367 was significantly upregulated in the four medulloblastoma cell lines after enforced *OCT4A* expression (Fig. 1c). Conversely, transient overexpression of miR-367 in medulloblastoma cells did not significantly increase *OCT4A* expression, nor the expression of other pluripotency-related genes encoding protein partners of *OCT4A*. Significant expression variation due to miR-367 was cell line-dependent (Fig. 1d–f).

Overexpression of miR-367 increases medulloblastoma cell proliferation. Overexpression of miR-367 significantly increased the amount of viable cells in CHLA-01-Med and USP-13-Med cell line cultures up to 48 h after transfection. A similar tendency was observed for D283-Med and Daoy cells (Suppl. Fig. S3). Accordingly, cell cycle analysis of CHLA-01-Med, USP-13-Med and D283-Med, but not Daoy cells overexpressing miR-367 indicated a higher percentage of cells at S+G2/M phases, and lower percentage of cells at G0/G1, compared with control cells (Fig. 2a).

In agreement with this result, immunofluorescence analysis of CHLA-01-Med and USP-13-Med cell populations revealed a

significant increase in the mitotic index and EdU incorporation in subsets of cells overexpressing miR-367, when compared with control cells displaying basal levels of miR-367 expression (Fig. 2b,c). Again, a corresponding similar tendency was observed for D283-Med and Daoy cells. Interestingly, the immunofluorescence analysis also revealed morphological changes in USP-13-Med cells overexpressing miR-367. Control cell cultures were mainly comprised of fusiform cells with tapered and very thin ends, displaying a maximum length of 500 μ m. After transfection with miR-367 mimic, these fusiform cells with long extensions were rarely observed, and most cells had a maximum length of 200 μ m. Morphological analysis of CHLA-01-Med cells was difficult to perform because they naturally grow in suspension, forming tight cell clusters (Fig. 2d).

In contrast, miR-367 overexpression did not significantly affect medulloblastoma cell apoptosis induced by treatment with cisplatin, except in Daoy cells (Fig. 2e). Altogether, these results support that the increment previously observed in the population of viable cells due to miR-367 overexpression is likely due to a positive effect of miR-367 on cell proliferation, rather than on resistance to apoptosis.

Fig. 2. Overexpression of miR-367 affects cell cycle and proliferation of medulloblastoma cells. (a) Cell cycle analysis of CHLA-01-Med, USP-13-Med, D283Med and Daoy cells by flow cytometry. Cell proliferation was investigated in CHLA-01-Med, USP-13-Med, D283Med and Daoy cells by the mitotic index (b) and (c) EdU incorporation. (d) Representative immunofluorescence images of tumor cells marked with antibody against microtubules (red) and DAPI DNA staining (blue). (e) Quantification of apoptotic tumor cells induced by cisplatin. Data is expressed as percentage of total cell population analyzed. Significance level: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Overexpression of miR-367 accentuates stem-like traits in medulloblastoma cells. Medulloblastoma cells overexpressing miR-367 were more capable of generating neurosphere-like structures *in vitro* than control cells. The amount of neurospheres formed after 4 days in neural stem cell media was significantly higher in all medulloblastoma cell line cultures subjected to miR-367 mimic transfection, when compared with cultures of control cells (Fig. 3a). Notably, neurospheres in cultures of CHLA-01-Med, USP-13-Med and D283-Med cells overexpressing miR-367 were not only more abundant but also more developed than their control counterparts, displaying a

mean diameter of approximately 100 μm . Control neurospheres presented an average diameter of approximately 50 μm (Fig. 3b). Despite being more numerous, neurospheres in cultures of Daoy cells overexpressing miR-367 were not oversized, displaying a general diameter comparable with that of neurospheres in control cultures. These neurospheres from all cell lines were highly enriched in cells expressing the neural stem cell marker CD133 (Fig. 3c).

Stem cells, either normal or neoplastic, also exhibit a high ability to invade tissues. When grown as cell spheroids surrounded by a biological matrix, a condition that better mimics

Fig. 3. Overexpression of miR-367 induces generation of medulloblastoma neurospheres. (a) Amount of neurospheres generated from medulloblastoma cells transfected with either miR-367 mimic or non-specific control, after 4 days of culture in neural stem cell media. (b) Representative images of CHLA-01-Med, USP-13-Med, D283-Med and Daoy neurospheres. (c) Proportion of CD133⁺ cells in medulloblastoma neurospheres, assessed by flow cytometry. CHLA-01-Med, USP-13-Med, D283-Med and Daoy neurospheres were enriched in cells expressing CD133, with 91.7%, 90.3%, 87.4% and 48.2% of CD133⁺ cells, respectively. Scale bar: 200 μm . Significance level: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

tumor behavior *in vivo*, overexpression of miR-367 significantly enhanced invasion of medulloblastoma cells. Invasive cells formed spindle-like protrusions in the invasion matrix, which were more abundant and bigger in length after miR-367 overexpression (Fig. 4a). Consequently, the overall area of these spindle-like protrusions was significantly greater in spheroids of cells overexpressing miR-367, compared with spheroids of control cells. Such enhancement on cell invasion was reversed by transfection with miR-367 inhibitor (Fig. 4b).

Overexpression of miR-367 downregulates cancer-related targets in medulloblastoma cells. The Ryanodine receptor 3 (*RYR3*) and Ras-related protein 23 (*RAB23*) transcripts are examples of experimentally validated targets of miR-367.⁽²³⁾ Other putative miR-367 targets predicted by *in silico* analysis, but not experimentally validated, include the Integrin α -V (*ITGAV*) transcript. The respective encoded proteins are known to be involved in cancer. Consistently, both *RYR3* and *RAB23* protein levels were significantly reduced in medulloblastoma cells after 48 h of initial transfection with miR-367 mimic (Fig. 5). Likewise, expression of *ITGAV* was also found significantly inhibited in medulloblastoma cells overexpressing miR-367 (Suppl. Fig. S4), reflecting a downregulation not necessarily resulting from direct miR-367 targeting.

Discussion

The miR-367 is primarily known as an ESC-specific microRNA regulating self-renewal and pluripotency.^(20,24) Some studies suggest that miR-302/367-mediated reprogramming of somatic cells to pluripotency poses minimum oncogenic risks due to self-regulating anti-tumor mechanisms.⁽²⁴⁾ In agreement with this suggestion, overexpression of the miR-302/367 cluster in two human cervical cancer cell lines inhibited cell proliferation and tumor formation.⁽²⁵⁾ Conversely, ESC-specific miRNA, including miR-302/367, have also been shown to positively regulate cell proliferation by promoting G1/S transition in ESC,^(26,27) indicating that miR-302/367 effects may vary according to the cellular context.

The fact that overexpression of miR-302, but not miR-367, is required to fully reprogram somatic cells to a competent pluripotent state⁽¹³⁾ indicates functional differences between these two related miRNA, strengthening this point. Thus far, little is known about the specific function of each individual member of this miRNA cluster.

High miR-367 expression has been associated with poor prognosis of cancer patients with Wilms' tumor,⁽²⁸⁾ ependymomas⁽²⁹⁾ and non-small cell lung cancer.⁽³⁰⁾ More recently, high levels of circulating miR-367 have been reported in the serum

of patients with testicular germ cell cancers, in particular non-seminomas, with advanced local stage and metastasis.⁽³¹⁾ Despite this clinical evidence, there are few functional studies addressing the direct involvement of miR-367 in tumor aggressiveness.

The positive effects on cell proliferation and neurosphere formation found after overexpression of miR-367 in medulloblastoma cells are in agreement with the previous clinical findings and indicate a possible pro-oncogenic role for this miRNA. Noteworthy, a previous study of embryonal brain tumors, including medulloblastoma specimens, reported that the ability of cancer cells to generate neurospheres *ex vivo* was significantly correlated with poor disease-free survival and poor overall survival.⁽³²⁾ Moreover, the sphere formation assay has been validated as an alternative to xenograft models in determining brain tumor stem-like cell potency and frequency.⁽³³⁾ The enrichment of medulloblastoma cell population with self-renewal capacity and stem cell-like phenotype after miR-367 overexpression is of particular interest, because cancer cells displaying similar stem cell properties are known to be highly tumorigenic and to be directly involved in tumor progression.⁽³⁴⁾ Interestingly, a large-scale analysis of miRNA expression in human glioma specimens revealed an expression pattern resembling the miRNA expression profile of stem cells and neuroprogenitors, in which miR-367 was found upregulated.⁽³⁵⁾

The increased medulloblastoma cell invasiveness due to miR-367 overexpression is also in concert with the previous findings, because part of the stem-like cancer cell association with poor prognosis is attributed to the higher invasive growth and metastatic potential of these cells.^(36–38) Although rare in medulloblastoma, the presence of metastasis at diagnosis, particularly in the neural axis, is a classical hallmark of poor survival.⁽³⁾ However, a very recent study reported that overexpression of miR-367 in two gastric cancer cell lines, HS746T and SGC-7901, had an opposite effect, inhibiting cellular migration and invasion.⁽³⁹⁾ Nonetheless, the same study also found that miR-367 is downregulated in gastric tumor tissues, suggesting a distinct involvement of miR-367 in this particular type of cancer.

Several oncogenes have known effects on both cell proliferation and migration/invasion, which may be stimulated according to the extracellular signals predominating in the tumor microenvironment. Cell migration is highly stimulated by the extracellular matrix surrounding cells, an effect that is well known for neural crest cells during embryonic neurogenesis.⁽⁴⁰⁾ This cellular environment was mimicked in the 3-D invasion assay used in the present study. Interestingly, by-products of the extracellular matrix degradation can also stimulate prolifer-

Fig. 4. Overexpression of miR-367 in medulloblastoma cells enhances 3-D cell invasion. (a) Representative images of medulloblastoma spheroids displaying arboreal protrusions formed by cells invading the surrounding hydrogel matrix. Scale bar: 400 μm. (b) Kinetics of 3-D cell invasion of USP-13-Med spheroids overexpressing miR-367 (light grey line) and respective controls (miR-367 inhibitor and non-specific control). Significance level: *****P* < 0.0001.

Fig. 5. Downregulation of miR-367 cancer-related targets in medulloblastoma cells. (a) Relative amount of cells with positive expression of RYR3, assessed by flow cytometry 48 h post-transfection with either miR-367 mimic or non-specific control. D283-Med cells were negative for RYR3 expression. (b) RAB23 protein levels in medulloblastoma cells, assessed by western blotting 48 h post-transfection with either miR-367 mimic or non-specific control. Respective blot quantification is presented as a bar graph. Significance level: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$.

ation of progenitor cells,⁽⁴¹⁾ an effect that might contribute to metastatic colonization in the context of aggressive cancers.

We have previously reported that expression of the pluripotency factor OCT4 is correlated with poor prognosis in medulloblastoma,⁽¹⁶⁾ a phenomenon that was later reported to occur in other types of malignant tumors.^(42–46) Here, we found that ectopic OCT4 expression in medulloblastoma cells upregulates miR-367. It is known that miR-302/367 interact with specific transcription factors (OCT4, SOX2 and NANOG) leading to an auto-regulatory positive loop that induces and sustain pluripotency.^(47,48) Although upregulation of either OCT4 or SOX2 was observed after miR-367 overexpression in medulloblastoma cells, this effect was cell line-dependent, suggesting that the common effects on cell behavior towards a

more aggressive phenotype were not associated with a gain in pluripotency.

Overexpression of miR-367 in medulloblastoma cells, as expected, downregulated RYR3, which is one of the few experimentally verified targets of miR-367.⁽²³⁾ Many studies have proposed anti-tumoral effects for RyRs receptors.⁽⁴⁹⁾ Using next-generation sequencing, three independent studies identified a total of 2102 unique genes as somatically mutated in medulloblastoma patient samples. Of these, only 15 were reported as mutated in all three studies. This restricted list of commonly mutated genes includes RYR3.⁽⁵⁰⁾ RYR3 inactivation due to aberrant DNA methylation was also reported in acute lymphoblastic leukemia.⁽⁵¹⁾ In animal models of tumorigenesis, RyRs activation by caffeine inhibited breast tumor metastasis⁽⁵²⁾ as well as the appearance of UV-induced skin cancer.⁽⁵³⁾

Overexpression of miR-367 in medulloblastoma cells also resulted in decreased transcript levels of RAB23, a recently experimentally validated target of miR-367.⁽³⁹⁾ Members of the RAB family have been reported either as oncoproteins or tumor suppressors.⁽⁵⁴⁾ RAB23 overexpression enhanced migration and invasion of human breast cancer cells.⁽⁵⁵⁾ In gliomas, the RAB family was associated with poor clinical outcome.⁽⁵⁶⁾ Nevertheless, RAB23 is deregulated in many cancers and has been identified as an antagonist of the SHH pathway.⁽⁵⁷⁾ The SHH pathway is crucial during neurodevelopment and hyperactivation of this signaling pathway characterizes a particular subgroup of medulloblastoma.⁽¹⁾ Although downregulation of RYR3 and RAB23 targets supported the effects of miR-367 overexpression observed in medulloblastoma cells, the downstream mechanisms underlying these miR-367-directed events remain to be elucidated.

In sum, ectopic expression of ESC-related miR-367 in medulloblastoma cells significantly enhanced their proliferation, spheroid invasive growth and ability to generate neurospheres enriched in cells with a stem-like phenotype, consistent with oncogenic activity. Upregulation of miR-367 occurred upon activation of another ESC-related factor, OCT4A, which had been previously associated with poor survival of medulloblastoma patients. Overall, these findings reveal a possible mechanism contributing to the aggressiveness of this important type of pediatric brain cancer, which could be further explored therapeutically.

Acknowledgments

The authors thank Dr Felipe Lourenço Claro and Nikon do Brasil for helping with the immunofluorescence imaging, and Dr Marcia Santos for helping with the protein assays. This work was supported by funds from FAPESP-CEPID, CNPq, INCT-CETGEN and FINEP-CTC. CK, PBGS, COR and BAC were recipients of FAPESP.

Disclosure Statement

The authors have no conflict of interest to declare.

References

- Northcott PA, Dubuc AM, Pfister S, Taylor MD. Molecular subgroups of medulloblastoma. *Expert Rev Neurother* 2012; **12**: 871–84.
- Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005–2009. *Neuro Oncol* 2012; **14**(Suppl 5): 1–49.
- Gerber NU, Mynarek M, von Hoff K, Friedrich C, Resch A, Rutkowski S. Recent developments and current concepts in medulloblastoma. *Cancer Treat Rev* 2014; **40**: 356–65.

- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; **194**: 23–8.
- Parsons DW, Li M, Zhang X *et al*. The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma. *Science* 2011; **331**: 435–9.
- Bissell MJ, Hines WC. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med* 2011; **17**: 320–9.
- Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A *et al*. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 2012; **123**: 465–72.
- Manoranjana B, Venugopal C, McFarlane N *et al*. Medulloblastoma stem cells: modeling tumor heterogeneity. *Cancer Lett* 2013; **338**: 23–31.

- 9 Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 2012; **21**: 283–96.
- 10 Rodini CO, Suzuki DE, Nakahata AM *et al*. Aberrant signaling pathways in medulloblastomas: a stem cell connection. *Arg Neuropathol* 2010; **68**: 947–52.
- 11 Marshall GM, Carter DR, Cheung BB *et al*. The prenatal origins of cancer. *Nat Rev Cancer* 2014; **14**: 277–89.
- 12 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS *et al*. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; **282**: 1145–7.
- 13 Lee AS, Tang C, Rao MS, Weissman IL, Wu JC. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nat Med* 2013; **19**: 998–1004.
- 14 Suzuki DE, Nakahata AM, Okamoto OK. Knockdown of E2F2 inhibits tumorigenicity, but preserves stemness of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2014; **23**: 1266–74.
- 15 Picard D, Miller S, Hawkins CE *et al*. Markers of survival and metastatic potential in childhood CNS primitive neuro-ectodermal brain tumours: an integrative genomic analysis. *Lancet Oncol* 2012; **13**: 838–48.
- 16 Rodini CO, Suzuki DE, Saba-Silva N *et al*. Expression analysis of stem cell-related genes reveal OCT4 as a predictor of poor clinical outcome in medulloblastoma. *J Neurooncol* 2012; **106**: 72–9.
- 17 Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 2013; **339**: 1546–58.
- 18 Hovestadt V, Jones DTW, Picelli S *et al*. Decoding the regulatory landscape of medulloblastoma using DNA methylation sequencing. *Nature* 2014; **510**: 537–41.
- 19 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M *et al*. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; **131**: 861–72.
- 20 Anokye-Danso F, Trivedi CM, Jühr D *et al*. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2011; **8**: 376–88.
- 21 Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific microRNAs. *Dev Cell* 2003; **5**: 351–8.
- 22 Judson RL, Bahiarz JE, Venere M, Belloch R. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol* 2009; **27**: 459–61.
- 23 Zhang L, Liu Y, Song F *et al*. Functional SNP in the microRNA-367 binding site in the 3'UTR of the calcium channel ryanodine receptor gene 3 (RYR3) affects breast cancer risk and calcification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**: 13653–8.
- 24 Kuo C-H, Deng JH, Deng Q, Ying S-Y. A novel role of miR-302/367 in reprogramming. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; **417**: 11–6.
- 25 Cai N, Wang Y-D, Zheng P-S. The microRNA-302-367 cluster suppresses the proliferation of cervical carcinoma cells through the novel target AKT1. *RNA* 2013; **19**: 85–95.
- 26 Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, Bahiarz JE, Baehner L, Belloch R. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet* 2008; **40**: 1478–83.
- 27 Choi E, Choi E, Hwang K-C. MicroRNAs as novel regulators of stem cell fate. *World J Stem Cells* 2013; **5**: 172–87.
- 28 Watson JA, Bryan K, Williams R *et al*. miRNA profiles as a predictor of chemoresponsiveness in Wilms' tumor blastema. *PLoS One* 2013; **8**(1): e53417.
- 29 Costa FF, Bischof JM, Vanin EF *et al*. Identification of microRNAs as potential prognostic markers in ependymoma. *PLoS One* 2011; **6**: e25114.
- 30 Campayo M, Navarro A, Villosio N *et al*. Low miR-145 and high miR-367 are associated with unfavourable prognosis in resected non-small cell lung cancer. *Eur Respir J* 2013; **41**: 1172–8.
- 31 Syring I, Bartels J, Holderrieder S, Kristiansen G, Müller SC, Ellinger J. Circulating serum microRNA (miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p, miR-373-3p) as biomarkers for patients with testicular germ cell cancers. *J Urol* 2015; **193**: 331–7.
- 32 Panosyan EH, Laks DR, Masterman-Smith M *et al*. Clinical outcome in pediatric glial and embryonal brain tumors correlates with in vitro multipassable neurosphere formation. *Pediatr Blood Cancer* 2010; **55**: 644–51.
- 33 Venugopal C, Li N, Wang X *et al*. Bmi1 marks intermediate precursors during differentiation of human brain tumor initiating cells. *Stem Cell Res* 2012; **8**: 141–53.
- 34 Singh SK, Clarke ID, Terasaki M *et al*. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; **63**: 5821–8.
- 35 Layon I, Zrihan D, Granit A *et al*. Gliomas display a microRNA expression profile reminiscent of neural precursor cells. *Neuro Oncol* 2010; **12**: 422–33.
- 36 Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell* 2012; **10**: 717–28.
- 37 Tirino V, Desiderio V, Paino F *et al*. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J* 2013; **27**: 13–24.
- 38 Zhao Z, Lu P, Zhang H *et al*. Nestin positively regulates the Wnt/ β -catenin pathway and the proliferation, survival and invasiveness of breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res* 2014; **16**: 408.
- 39 Bin Z, Dedong H, Xiangjie F, Hongwei X, Qinghui Y. The microRNA-367 inhibits the invasion and metastasis of gastric cancer by directly repressing Rab23. *Genet Test Mol Biomarkers* 2015; **19**: 69–74.
- 40 Perris R, Perissinotto D. Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration. *Mech Dev* 2000; **95**: 3–21.
- 41 Reing JE, Zhang L, Myers-Irvin J *et al*. Degradation products of extracellular matrix affect cell migration and proliferation. *Tissue Eng Part A* 2009; **15**: 605–14.
- 42 Hayashi H, Arai T, Togashi Y *et al*. The OCT4 pseudogene POU5F1B is amplified and promotes an aggressive phenotype in gastric cancer. *Oncogene* 2013; **34**: 199–208.
- 43 Kim S-H, Singh SV. Mammary cancer chemoprevention by withaferin A is accompanied by in vivo suppression of self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 2014; **7**: 738–47.
- 44 Teicher BA. Targets in small cell lung cancer. *Biochem Pharmacol* 2014; **87**: 211–9.
- 45 Tsai L-L, Hu F-W, Lee S-S, Yu C-H, Yu C-C, Chang Y-C. Oct4 mediates tumor initiating properties in oral squamous cell carcinomas through the regulation of epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2014; **9**: e87207.
- 46 Wang K, Wu X, Wang J, Huang J. Cancer stem cell theory: therapeutic implications for nanomedicine. *Int J Nanomedicine* 2013; **8**: 899–908.
- 47 Lin S-L, Chang DC, Lin C-H, Ying S-Y, Leu D, Wu DTS. Regulation of somatic cell reprogramming through inducible miR-302 expression. *Nucleic Acids Res* 2011; **39**: 1054–65.
- 48 Anokye-Danso F, Trivedi CM, Jühr D *et al*. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2011; **8**: 376–88.
- 49 Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; **1**: 11–21.
- 50 Northcott PA, Jones DTW, Kool M *et al*. Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**: 818–34.
- 51 Nordlund J, Milani L, Lundmark A, Lönnholm G, Syvänen A-C. DNA methylation analysis of bone marrow cells at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia and at remission. *PLoS One* 2012; **7**: e34513.
- 52 Yang H, Rouse J, Lukes L *et al*. Caffeine suppresses metastasis in a transgenic mouse model: a prototype molecule for prophylaxis of metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2004; **21**: 719–35.
- 53 Lu Y-P, Lou Y-R, Xie J-G *et al*. Caffeine and caffeine sodium benzoate have a sunscreen effect, enhance UVB-induced apoptosis, and inhibit UVB-induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice. *Carcinogenesis* 2007; **28**: 199–206.
- 54 Jordens I, Marsman M, Kuijl C, Neeffjes J. Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic* 2005; **6**: 1070–7.
- 55 Zhao J, Liu Y, Jian Q, Li J, Chi S. Role of Rab23 in invasion and migration of human breast cancer Bcap-37 cells. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2013; **29**: 813–7.
- 56 Liu Q, Tang H, Liu X *et al*. miR-200b as a prognostic factor targets multiple members of RAB family in glioma. *Med Oncol (Intemet)* 2014; **31**: 859.
- 57 Eggenschwiler JT, Espinoza E, Anderson KV. Rab23 is an essential negative regulator of the mouse Sonic hedgehog signalling pathway. *Nature* 2001; **412**: 194–8.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. 3-D invasion assay with Daoy, D283-Med and CHLA-01-Med cells.

Fig. S2. Overexpression of OCT4A in medulloblastoma cell lines.

Fig. S3. Amount of viable medulloblastoma cells after miR-367 overexpression.

Fig. S4. Downregulation of ITGAV after miR-367 overexpression in medulloblastoma cells.

Embryonic Stem Cell-Related Protein L1TD1 Is Required for Cell Viability, Neurosphere Formation, and Chemoresistance in Medulloblastoma

Márcia Cristina Teixeira Santos,¹ Patrícia Benites Gonçalves Silva,¹
Carolina Oliveira Rodini,¹ Gabriela Furukawa,¹ David Santos Marco Antonio,¹
Alfeu Zanotto-Filho,² José C.F. Moreira,² and Oswaldo Keith Okamoto¹

Misexpression of stem cell-related genes may occur in some cancer cells, influencing patient's prognosis. This is the case of medulloblastoma, a common and clinically challenging malignant tumor of the central nervous system, where expression of the pluripotency factor, OCT4, is correlated with poor survival. A downstream target of OCT4, *L1TD1* (LINE-1 type transposase domain-containing protein 1 family member), encodes a novel embryonic stem cell (ESC)-related protein involved in pluripotency and self-renewal of ESCs. *L1TD1* is still poorly characterized and its expression pattern and function in cancer cells are virtually unknown. Although normally restricted to non-neoplastic undifferentiated cells and germ cells, we found that high *L1TD1* expression also occurs in medulloblastoma cells, reaching levels similar to those found in ESCs, and is correlated with poor prognosis. Conversely to what is reported during normal cell differentiation, when differentiated cells remain healthy, despite *L1TD1* downregulation, depletion of *L1TD1* protein levels by targeted gene silencing significantly reduced medulloblastoma cell viability, inhibiting cell proliferation and inducing apoptosis. More strikingly, *L1TD1* depletion downregulated expression of the neural stem cell markers, CD133 and Nestin, inhibited neurosphere generation capability, and sensitized medulloblastoma cells to temozolomide and cisplatin, two chemotherapeutic agents of clinical relevance in medulloblastoma treatment. Our findings provide insights about the contribution of pluripotency-related genes to a more aggressive tumor phenotype through their involvement in the acquisition of stem-like properties by cancer cells and point out *L1TD1* as a potential therapeutic target in malignant brain tumors.

Introduction

SINCE THE EARLY STUDIES with embryonic teratocarcinoma cell injection into mouse blastocysts [1], stem cells and cancer cells have been shown to share common properties, linking normal development and tumorigenesis. While tumor initiating capability is a classic hallmark of non-neoplastic cells displaying pluripotency, either as a natural feature or induced by genetic reprogramming [2,3], in cancer cells, abnormal expression of genes regulating developmental processes enhances their tumorigenicity [4–6].

Expression of pluripotency factors has been reported to be associated with poor prognosis in some cancers. In germ cell tumors [7], enhanced expression of OCT4 has been associated with increased malignant potential [8]. High OCT4 expression also predicts unfavorable clinical outcome in medulloblastoma and gastric cancer [9,10]. Lin28b, an RNA-binding protein, has been implicated in the genesis of Wilms' tumor

[11] and gliomas [12], as well as recurrence of hepatocellular carcinoma [13], and aggressiveness of breast carcinoma [14]. Altogether, these and other recent studies highlight a contribution of pluripotency-related genes toward a more aggressive tumor phenotype, supporting their involvement in the acquisition of a stem-like state in cancer cells.

L1TD1 (LINE-1 type transposase domain-containing protein 1 family member) is a novel, still poorly characterized, embryonic stem cell (ESC)-related protein. It was originally identified by differential display as an ESC-associated transcript (ECAT) in mouse ESCs and preimplantation embryos [15]. In this same study, the authors characterized other ECATs that later became well-known pluripotency factors, such as *Nanog*. More recently, *L1TD1* expression was reported to be restricted to the inner cell mass in mouse blastocysts and epiblasts. The authors also found that although upregulated by the enforced expression of the Yamanaka pluripotency factors in somatic cells, *L1TD1* was dispensable

¹Human Genome and Stem Cell Research Center, Department of Genetics and Evolutionary Biology, Biosciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

²Department of Biochemistry, Oxidative Stress Research Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

for mouse induced pluripotent stem cell generation [16]. In humans, however, *L1TD1* was reported to be a target of the transcription factor circuitry comprised by Nanog, OCT4, and SOX2 and an important regulator of human embryonic stem cell (hESC) self-renewal [17,18]. Interestingly, *L1TD1* was also recently reported to be involved in proliferation of embryonal carcinoma and seminoma cell lines [17], although its role in cancer is still largely unknown.

A previous study revealed abnormal expression of stemness genes in medulloblastoma, the most common type of malignant embryonal tumor arising in the central nervous system of children under 4 years of age [9]. As a type of primitive neuroectodermal tumor, medulloblastoma is thought to arise from immature cells during early cerebellum development [19,20]. A significant proportion of medulloblastoma patients do not respond adequately to available treatments, usually consisting of surgery, followed by radiotherapy and classic chemotherapy [21]. Given that aberrantly elevated *OCT4* expression has been correlated with poor survival of medulloblastoma patients [9], it prompted us to investigate whether *L1TD1*, a downstream target of OCT4, would be relevant to the aggressiveness of this important pediatric brain tumor.

In this study, we report for the first time that *L1TD1* is highly expressed in medulloblastoma cells, where it significantly contributes to cell viability, chemotherapeutic drug resistance, and stem cell-like properties. Together, these findings suggest *L1TD1* as a potential therapeutic target for treatment of malignant brain tumors.

Materials and Methods

Cell culture

Human medulloblastoma cell lines, Daoy and D283-Med, were obtained from ATCC and maintained in DMEM or MEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 µg/mL of streptomycin and penicillin in a 5% CO₂ incubator at 37°C. The hESC line, H9, was cultured as previously described [22].

Tumor collection and data analyses

Expression analysis was performed using cDNA samples available from 31 medulloblastoma specimens. Tumor processing, respective clinical data, and cDNA preparation were previously described [9]. Correlation of clinical variables with gene expression data was determined by the Mann-Whitney test. Overall survival analysis from lifetime data according to the presence or absence of *L1TD1* expression was determined by the Kaplan-Meier product limit estimation with log-rank test ($P \leq 0.05$). Overall survival was defined as time from diagnosis to the day of death or last follow-up. These analyses were performed with the software, Statistical Package GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). For correlation of gene expression in tumors, normalized expression ($\times 10^7$) was log transformed for graphical display. Significance was established at the $P \leq 0.05$ level in all analyses.

L1TD1 transient knockdown

siRNA against *L1TD1* (Trilencer-27 siRNA Duplex; Origene, catalog No. SR310168) was transfected into Daoy or D283-Med using Lipofectamine™ RNAiMAX (Life Tech-

nologies) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the transfection solution with *L1TD1*siRNA or siControl/lipofectamine was incubated at room temperature for 20 min and cells were seeded above the transfection solution.

Quantification of gene expression by real-time polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from the cells using the RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Inc.), according to the manufacturer's instructions. Non-neoplastic human cerebellum RNA (Agilent technologies cat# 540007; Clontech cat# 636535) and human ESC (H9 cell line) RNA were used as reference samples. cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Quantitative polymerase chain reaction (PCR) was performed using TaqMan® probe-based gene expression analysis. Expression of the housekeeping gene, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), was used as endogenous control. Quantification was analyzed using the $\Delta\Delta C_t$ method.

Western blot analysis

Cells were lysed in RIPA buffer and proteins were resolved on SDS-PAGE and transferred to poly(vinylidene) difluoride (PVDF) membranes (GE Healthcare), which were blocked and incubated with anti-*L1TD1* (1:1,000), anti-LIN28 (1:1,000) (Abcam), anti-caspase-3 (1:200; Cell Signaling), or anti-OCT4 (1:200; Santa Cruz) antibodies, followed by incubation with goat anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies. The immunoblots were developed using the Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore Corporation). Uncropped western blot images are provided in Supplementary Fig. S4.

Immunofluorescence

Medulloblastoma cells were plated on culture dishes and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. Cells were stained with anti-*L1TD1* 1:250 in PBS 0.1% Triton-X 100 for 2 h. After staining with secondary fluorescent antibody (AF546), cells were incubated with 40,6-diamidino-2-phenylindole (1 µg/mL; Invitrogen). Immunofluorescence control images are provided in Supplementary Fig. S5.

Neurosphere formation

For neurosphere formation assay, cells were silenced for 12 h and dissociated; viable cells (4×10^3 per well) were cultured in the presence of DMEM/F12 supplemented with B-27, N-2, 20 ng/mL of EGF, and 20 ng/mL of bFGF. After 4 days, neurospheres were measured and counted under a light microscope.

Apoptosis analysis

Apoptosis assay was evaluated using the Guava Nexin Reagents (Millipore). *L1TD1*-silenced and control cells were dissociated, washed with PBS, and incubated in 100 µL of 1× Annexin V staining buffer, then incubated with 7-AAD and Annexin V diluted 1:40 for 15 min. After incubation, cells were washed twice with PBS and analyzed in the Guava EasyCyte 5HT™ Flow Cytometer (Millipore—Guava Technologies) using GuavaSoft 2.1 software. Caspase-3/7 activity

was measured with a Caspase-Glo assay kit (Promega), according to the manufacturer's instructions.

Migration assays

Serum-deprived DAOY cells were silenced with *LITD1* siRNA or siRNA control for 12 h, harvested, and viable cells were resuspended to 1×10^6 cells in the top well of Transwell permeable supports (Corning Transwell® 6.5 mm polycarbonate membrane inserts). The bottom well of the chamber contained supplemented medium with 10% of FBS. After 12 h of incubation, nonmigrating cells were removed with a cotton swab and migrating cells on the underside of the membrane were stained with toluidine blue. The stain was removed with 10% SDS solution and quantitated using a colorimetric microplate reader ($A_{560\text{ nm}}$).

Cell invasion assay

Medulloblastoma cell invasion assay was carried out using Transwell permeable supports (Corning Transwell 6.5 mm polycarbonate membrane inserts) containing a pre-coated Matrigel. Briefly, after transient gene transfection, serum-deprived Daoy cells were added to the upper surface of each chamber and the bottom chamber was placed in 24-well dishes containing supplemented medium. The cells were allowed to migrate to the underside of the membrane for 24 h. Noninvasive cells were then removed by wiping the upper side of the membrane, and the invaded cells were fixed with methanol and stained by toluidine blue (Sigma). Number of the invaded cells was quantified using a colorimetric microplate reader ($A_{560\text{ nm}}$).

Medulloblastoma drug sensitivity test

To test medulloblastoma drug sensitivity, cells were silenced for 24 h with 10 nM siRNA (reverse transfection) in DMEM 5% FBS and treated for an additional 72 h with DNA-damaging agents [15 or 7.5 μM Cisplatin for Daoy or D283-Med, respectively; 100 μM temozolomide (TMZ) for both cell lines]. Viability was assessed using the CellTiter-Glo system.

Statistical analysis

All experiments used triplicate samples and three independent experiments were carried out. Data were analyzed by ANOVA with Tukey as the post hoc test or Student's *t*-test. Significance was established at the $P \leq 0.05$ level.

Results

LITD1 expression in medulloblastoma correlates with poor clinical outcome

Expression of *LITD1* was found significantly correlated with overall survival of medulloblastoma patients. The median survival time of patients whose tumors had no detectable expression of *LITD1* was 200 months, while patients with *LITD1*-expressing tumors had a median survival time of 118 months ($P < 0.05$ for both Mantel-Cox and Gehan-Breslow-Wilcoxon tests) (Fig. 1A). Moreover, increased *LITD1* expression was also significantly correlated with development of metastasis ($P < 0.05$) (Fig. 1B). Since *LITD1* is a target of the

pluripotency factor OCT4, the concurrent expression of *LITD1* and *OCT4* was analyzed in tumor samples and a significant positive correlation was found ($P < 0.01$) (Fig. 1C). *LITD1* expression levels in these medulloblastoma specimens were significantly higher than the residual expression detected in normal cerebellum and, in some cases, as high as the *LITD1* expression detected in hESCs (Fig. 1D). Interestingly, an additional in silico analysis with microarray data publicly available for 74 pediatric medulloblastoma samples revealed comparable *LITD1* transcript levels in tumors of distinct molecular classification (Supplementary Fig. S1; Supplementary Data are available online at www.liebertpub.com/scd).

LITD1 is highly expressed in medulloblastoma cells and localizes in the perinuclear region

The preliminary analysis of *LITD1* expression in patient samples described above prompted us to verify *LITD1* expression in two well-known medulloblastoma cell lines, Daoy and D283-Med, for further functional studies. Real-time PCR analysis revealed that *LITD1* mRNA levels in these medulloblastoma cells are high, reaching levels comparable with those found in pluripotent cells. As shown in Fig. 2A, *LITD1* expression in D283-Med cells was as high as the expression detected in hESCs. A robust *LITD1* expression in medulloblastoma cells was also confirmed by western blot. Similar *LITD1* protein levels were found in hESCs, Daoy, and D283-Med. Despite the differences found at the transcript level, *LITD1* protein levels in Daoy and D283-Med cells were even (Fig. 2B). The subcellular localization pattern of *LITD1* in medulloblastoma cells was typical of proteins involved in mRNA translation. As indicated by immunostaining and fluorescence microscopy, *LITD1* was found predominantly localized in the cytoplasm, where it was concentrated in the perinuclear region. Although less evident, some nuclear localization of *LITD1* was also detected in both medulloblastoma cell lines (Fig. 2C).

LITD1 expression is required for medulloblastoma cell viability

To characterize the functional role of *LITD1* in medulloblastoma cells, we first transiently silenced *LITD1* expression using specific siRNAs. Knockdown efficiency evaluated by real-time PCR and western blot reached ~70% in both cell lines. Consistently, expression of the pluripotency-related genes, *LIN28* and *OCT4*, was found downregulated in *LITD1*-silenced cells compared with control cells (Fig. 2D, E). We then evaluated the effect of *LITD1* knockdown on medulloblastoma cell growth and viability. Interestingly, cell viability was dramatically affected by *LITD1* silencing in both medulloblastoma cell lines. A time course analysis revealed a prompt, progressive, and significant decrease in the amount of viable tumor cells, which decayed to about 50% of total cells 48 h post-*LITD1* silencing and further reduced to only 30% of total cells after 96 h of *LITD1* silencing (Fig. 2F, G, *t*-test, $P < 0.005$ for Daoy, and $P < 0.01$ for D283-Med). This result clearly implicates *LITD1* in medulloblastoma cell viability.

When analyzing the effects of *LITD1* silencing on the cell cycle, a significant reduction was detected in the percentage of cells in the S phase (*t*-test, $P < 0.01$), while the

FIG. 1. *L1TD1* expression correlates with poor clinical outcome in medulloblastoma. (A) Overall survival rates of patients according to *L1TD1* expression in tumors (positive or undetectable). Patients with *L1TD1*-positive tumors displayed significantly reduced survival rates ($P < 0.05$). (B) Normalized *L1TD1* expression levels in primary tumors, with respect to the presence or absence of metastasis ($P < 0.05$). (C) Significant positive correlation between *L1TD1* and *OCT4* expression in medulloblastoma specimens ($P < 0.01$). Each dot corresponds to the concurrent gene expression level in a given tumor sample. (D) Comparative *L1TD1* expression levels in medulloblastoma specimens, non-neoplastic cerebellum, and human embryonic stem cell (hESC). Significance: * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

proportion of cells in G0/G1 phases was somewhat increased (Supplementary Fig. S2A).

L1TD1 knockdown induces cell apoptosis

The significant decrease in cell viability found after *L1TD1* silencing could also result from exacerbated cell death. To test this hypothesis, we costained cells with Annexin V and 7AAD and analyzed necrotic and apoptotic cells by flow cytometry. From this analysis, we observed a significant increase in Annexin V+/7AAD- cells as well as in Annexin V+/7AAD+ cells after *L1TD1* silencing. A more dramatic increase was detected in the population of Annexin+/7AAD+ cells (Daoy: 46-fold increase; D283-Med: 35-fold increase) 96 h post-*L1TD1* silencing, indicating a significant impact on late apoptosis (Fig. 3A–D). In agreement with these results, *L1TD1*-silenced cells also displayed increased levels of active caspase-3 (Fig. 3E, F).

L1TD1 preserves stemness in medulloblastoma cells

To verify whether *L1TD1* expression would also affect stem-like features in medulloblastoma cells, we evaluated spheroid formation capacity and expression of typical neural stem cell markers in *L1TD1*-silenced cells and control cells. Reduction of ~75% and 29% was detected in the number of neurospheres formed in cultures of *L1TD1*-silenced Daoy and

L1TD1-silenced D283-Med cells, respectively (Fig. 4A). Such significant reduction in *L1TD1*-silenced cell capacity to generate neurospheres was not due to low cell viability (Supplementary Fig. S3). Expression of the neural stem cell markers, CD133 and Nestin, was also found downregulated in *L1TD1*-silenced cells compared with control cells (Fig. 4B, C).

L1TD1 affects migration and invasion of medulloblastoma cells

Although not restricted to stem cells, motility is a determinant of metastatic tumor dissemination and is a recognized property of some tumor stem cells. Unlike D283-Med cells, Daoy cells possess a broad spectrum of migration and invasion mechanisms. However, motility of Daoy cells was also found significantly inhibited by *L1TD1* silencing. After 12 h of *L1TD1* knockdown, we observed that cells had a diminished capacity to migrate and invade (Fig. 4D, E). D283-Med cells did not display a robust pattern of migration and invasion under our experimental condition.

L1TD1 knockdown sensitizes medulloblastoma cells to chemotherapeutic agents

Increased resistance to chemotherapeutic agents is another hallmark of tumor stem cells with impacts on prognosis. Therefore, we investigated a possible role of *L1TD1* in the

FIG. 2. *LITD1* is highly expressed in medulloblastoma cells and affects cell viability in vitro. (A) *LITD1* expression in hESC, Daoy, and D283-Med cells by real-time polymerase chain reaction (PCR). (B) Western blot analysis of *LITD1* protein expression in medulloblastoma cell lines. (C) *LITD1* immunostaining in Daoy and D283-Med cells—scale bar 60 μm. (D, E) Efficiency of *LITD1* knockdown in Daoy and D283-Med cells and concurrent downregulation of *LIN28* and *OCT4* expression at the transcript and protein levels. (F, G) Time course analysis of cell viability after *LITD1* knockdown, showing a dramatic decrease in viable *LITD1*-silenced cells in both medulloblastoma cell lines. Significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Color images available online at www.liebertpub.com/scd

resistance of medulloblastoma cells to clinically used chemotherapeutics. To this end, we performed cell viability assays in *LITD1*-silenced Daoy and D283-Med cells challenged with the alkylating agent, TMZ, or the alkylating-like cisplatin [cis-diamminedichloroplatinum (CDDP)] (IC_{25} – IC_{50} range). As shown in Fig. 5, *LITD1*-silenced cells were more sensitive to both TMZ and CDDP treatments, displaying significantly lower rates of viable cells compared with control cells with intact *LITD1* expression. Sensitization of medulloblastoma cells to another DNA alkylating agent, methyl methanesulfonate, also occurred after *LITD1* silencing (Supplementary Fig. S2, B).

Discussion

Although still poorly characterized, *LITD1* has been considered as a marker of undifferentiated hESCs. Biochemically, *LITD1* was recently shown to be an RNA-binding protein comprising the RHA-Lin28 complex. In hESCs, *LITD1* inter-

acts with Lin28 through RNA and both proteins are colocalized within the p-bodies [17]. Since the RHA-Lin28 complex regulates OCT4 translation in mouse ESCs [23], *LITD1* might be a novel component of the protein complex required for pluripotency maintenance in hESCs. Indeed, *LITD1* knockdown in hESCs resulted in lower OCT4 protein levels [17,18].

Intriguingly, *LITD1* depletion in hESCs was not reported to affect cell viability and *LITD1*-deficient mouse fibroblasts were also found viable and capable of reprogramming into a pluripotent state [16,17]. Under physiological conditions, basal *LITD1* expression is rapidly downregulated along the in vitro differentiation of hESCs into embryoid bodies, without any noticeable decay in cell viability [17]. A dramatic *LITD1* downregulation, reaching nearly 99% of repression, was also detected in hESCs during induced neural differentiation [18]. Furthermore, cells of most healthy adult somatic tissues do not show expression of *LITD1*, including brain cells [16]. Yet, our study with medulloblastoma revealed a strong decay

FIG. 3. *L1TD1* knockdown induces late apoptosis. After siRNA transfection, Daoy (A) and D283-Med (B) cells were stained with Annexin V and 7AAD, and the population of apoptotic and necrotic cells analyzed by flow cytometry. The highest increment was observed in the Annexin V⁺/7AAD⁺ cell population, indicating late apoptosis after 96h of *L1TD1* knockdown. Quantification plots are presented for Daoy (C) and D283-Med (D) cells. (E) Caspase-3/7 activity was monitored by luminescence activity and (F) western blot of cleaved caspase-3. Significance: * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

in tumor cell viability due to *L1TD1* silencing, which significantly inhibited cell cycling and induced apoptotic cell death. Taken together, these findings reveal a different role of *L1TD1* in medulloblastoma cells, suggesting that *L1TD1* may be selectively relevant to tumor cell viability, while not being a determinant of viability of non-neoplastic cells.

Noteworthy, *L1TD1* expression levels and protein subcellular localization in medulloblastoma cells were comparable to those of hESCs. Thus far, expression of *L1TD1* in cancer had only been reported in embryonic carcinoma cell lines (NCRG3

and 2102Ep) and a seminoma cell line (TCam-2), which are all derived from male germinative tissue. Expression of *L1TD1* in these cell lines is not entirely surprising since a faint *L1TD1* expression is also detectable in normal human testis as well as in the ovary and placenta [16]. Additionally, NCR G3 and 2102Ep cells also express other pluripotency markers and share some functional properties with ESCs [24–26].

Conversely, *L1TD1* expression does not occur in the brain [16]. The lack of detectable *L1TD1* expression in the tissue where medulloblastoma arises added to the relevance of

L1TD1 to medulloblastoma cell viability, and expression across the four molecular subtypes of medulloblastoma makes this protein an interesting therapeutic target.

Medulloblastoma is one of the most metastatic primary malign tumors of the central nervous system, with almost 50% of cases displaying tumor dissemination along the neuroaxis [27] and about 7% of cases displaying extraneural metastasis [28]. Since metastasis at diagnosis is historically associated with poor survival, it is also clinically relevant to the fact that migration and invasion of L1TD1-depleted cells were significantly impaired.

Even more appealing is the fact that *L1TD1* silencing inhibited tumor neurosphere generation, downregulated CD133 and Nestin expression, and sensitized medulloblastoma cells to TMZ and cisplatin treatments, likely due to an additive effect. Ability to grow into neurosphere-like structures, expression of typical neural stem cell markers, and increased resistance to chemotherapeutic agents are some of the hallmarks of medulloblastoma stem-like cells [29,30], which are linked with poor prognosis. Noteworthy, the presence of cells capable of generating neurospheres in vitro is strongly associated with reduced progression-free survival and overall survival of medulloblastoma patients [31]. In the same study by Panosyan et al., neurosphere generation was attributed to a subset of highly tumorigenic and chemoresistant tumor cells, since it was more successfully obtained from a group of patients displaying increased recurrence and mortality rates, which were subjected to chemo- and/or radiotherapy before the neurosphere culturing procedures.

Stem-like tumor cells have not only been implicated in tumor initiation, metastatic dissemination, and chemoradioresistance but also in tumor heterogeneity at the cellular and molecular levels [20]. Medulloblastoma, in particular, displays a high degree of molecular heterogeneity, with a recent consensus classification identifying at least four distinct groups based on molecular and genetic traits: wingless (WNT), sonic hedgehog (SHH), group 3, and group 4. These subgroups are differentially associated with treatment response, frequency of metastasis, and survival rate. While tumors of the WNT and SHH subgroups are correlated with better prognosis, particularly in infant patients, tumors of group 3 and 4 are associated with poorer prognosis [32]. The observation that *L1TD1* is uniformly expressed in these four molecular subtypes of medulloblastoma, but its expression correlates with poor survival and presence of metastasis, suggests *L1TD1* as an independent indicator of prognosis. Therefore, a deep comprehension of the driving events underlying stemness in cancer cells is of great relevance to advance in medulloblastoma management and treatment.

Our findings, supported by other recent studies in the literature, suggest that misexpression of pluripotency-related genes such as *L1TD1* may contribute to the acquisition of some of the typical properties displayed by medulloblastoma stem-like cells. Intriguingly, driver mutations have not been reported in pluripotency-related genes in medulloblastoma. Given that (as with other pediatric tumors) medulloblastoma has a relative low frequency of somatic mutations [33], other genetic alterations or epigenetic modifications are likely influencing an aberrant expression of pluripotency-related genes. Indeed, a recent comprehensive epigenetic study with 42 medulloblastoma samples found a hypomethylation in an alternative promoter of *Lin28B* [34], which encodes an

RNA-binding protein involved with pluripotency maintenance in ESCs. Although complementary functional studies should confirm whether *Lin28B* is an epi-driver gene in medulloblastoma, such discoveries highlight a deeper involvement of pluripotency-related genes in medulloblastoma development. In sum, our study reveals a novel role of *L1TD1* in viability, motility, chemoresistance, and stem-like properties of medulloblastoma cells, which urges further preclinical studies addressing its potential as a therapeutic target.

Acknowledgments

This work was supported by grants from FAPESP-CEPID (2013/08028-1), FAPESP (2010/52686-5), CNPq (309206/2011-1; 444722/2014-9), INCT-CETGEN (573633/2008-8), and FINEP-CTC (0108057900). M.C.T.S., P.B.G.S., and C.O.R. were recipients of FAPESP fellowships (2011/51588-2; 2013/17566-7; 2011/10001-9).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Mintz B and K Illmensee. (1975). Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3585–3589.
- Takahashi K, K Tanabe, M Ohnuki, M Narita, T Ichisaka, K Tomoda and S Yamanaka. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–872.
- Yu J, MA Vodyanik, K Smuga-Otto, J Antosiewicz-Bourget, JL Frane, S Tian, J Nie, GA Jonsdottir, V Ruotti, R Stewart, II Slukvin and JA Thomson. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917–1920.
- Vazquez-Martin A, S Cufi, E Lopez-Bonet, B Corominas-Faja, E Cuyas, L Vellon, JM Iglesias, O Leis, AG Martin and JA Menendez. (2013). Reprogramming of non-genomic estrogen signaling by the stemness factor SOX2 enhances the tumor-initiating capacity of breast cancer cells. *Cell Cycle* 12:3471–3477.
- Wang XQ, RK Ng, X Ming, W Zhang, L Chen, AC Chu, R Pang, CM Lo, SW Tsao, et al. (2013). Epigenetic regulation of pluripotent genes mediates stem cell features in human hepatocellular carcinoma and cancer cell lines. *PLoS One* 8:e72435.
- Lin Y, Y Yang, W Li, Q Chen, J Li, X Pan, L Zhou, C Liu, C Chen, et al. (2012). Reciprocal regulation of Akt and Oct4 promotes the self-renewal and survival of embryonal carcinoma cells. *Mol Cell* 48:627–640.
- Cheng L, MT Sung, P Cossu-Rocca, TD Jones, GT MacLennan, J De Jong, A Lopez-Beltran, R Montironi and LH Looijenga. (2007). OCT4: biological functions and clinical applications as a marker of germ cell neoplasia. *J Pathol* 211:1–9.
- Gidekel S, G Pizov, Y Bergman and E Pikarsky. (2003). Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell* 4:361–370.
- Rodini CO, DE Suzuki, N Saba-Silva, A Cappellano, JE de Souza, S Cavalcanti, SR Toledo and OK Okamoto. (2012). Expression analysis of stem cell-related genes reveal OCT4 as a predictor of poor clinical outcome in medulloblastoma. *J Neurooncol* 106:71–79.
- Kong D, G Su, L Zha, H Zhang, J Xiang, W Xu, Y Tang and Z Wang. (2014). Coexpression of HMGA2 and Oct4

- predicts an unfavorable prognosis in human gastric cancer. *Med Oncol* 31:130.
11. Urbach A, A Yermalovich, J Zhang, CS Spina, H Zhu, AR Perez-Atayde, R Shukrun, J Charlton, N Sebire, et al. (2014). Lin28 sustains early renal progenitors and induces Wilms tumor. *Genes Dev* 28:971–982.
 12. Qin R, J Zhou, C Chen, T Xu, Y Yan, Y Ma, Z Zheng, Y Shen, Y Lu, D Fu and J Chen. (2014). LIN28 is involved in glioma carcinogenesis and predicts outcomes of glioblastoma multiforme patients. *PLoS One* 9:e86446.
 13. Cheng SW, HW Tsai, YJ Lin, PN Cheng, YC Chang, CJ Yen, HP Huang, YP Chuang, TT Chang, et al. (2013). Lin28B is an oncofetal circulating cancer stem cell-like marker associated with recurrence of hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 8:e80053.
 14. Xie R, Y Wang, W Nie, W Huang, W Song, Z Wang and X Guan. (2014). Lin28B expression correlates with aggressive clinicopathological characteristics in breast invasive ductal carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm* 29:215–220.
 15. Mitsui K, Y Tokuzawa, H Itoh, K Segawa, M Murakami, K Takahashi, M Maruyama, M Maeda and S Yamanaka. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113:631–642.
 16. Iwabuchi KA, T Yamakawa, Y Sato, T Ichisaka, K Takahashi, K Okita and S Yamanaka. (2011). ECAT11/L1td1 is enriched in ESCs and rapidly activated during iPSC generation, but it is dispensable for the maintenance and induction of pluripotency. *PLoS One* 6:e20461.
 17. Narva E, N Rahkonen, MR Emani, R Lund, JP Pursiheimo, J Nasti, R Autio, O Rasool, K Denessiouk, et al. (2012). RNA-binding protein L1TD1 interacts with LIN28 via RNA and is required for human embryonic stem cell self-renewal and cancer cell proliferation. *Stem Cells* 30:452–460.
 18. Wong RC, A Ibrahim, H Fong, N Thompson, LF Lock and PJ Donovan. (2011). L1TD1 is a marker for undifferentiated human embryonic stem cells. *PLoS One* 6:e19355.
 19. Li P, F Du, LW Yuelling, T Lin, RE Muradimova, R Tricarico, J Wang, G Enikolopov, A Bellacosa, RJ Wechsler-Reya and ZJ Yang. (2013). A population of Nestin-expressing progenitors in the cerebellum exhibits increased tumorigenicity. *Nat Neurosci* 16:1737–1744.
 20. Manoranjan B, C Venugopal, N McFarlane, BW Doble, SE Dunn, K Scheinmann and SK Singh. (2013). Medulloblastoma stem cells: modeling tumor heterogeneity. *Cancer Lett* 338:23–31.
 21. Mueller S and S Chang. (2009). Pediatric brain tumors: current treatment strategies and future therapeutic approaches. *Neurotherapeutics* 6:570–586.
 22. Suzuki DE, AM Nakahata and OK Okamoto. (2014). Knockdown of E2F2 inhibits tumorigenicity, but preserves stemness of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 23:1266–1274.
 23. Qiu C, Y Ma, J Wang, S Peng and Y Huang. (2010). Lin28-mediated post-transcriptional regulation of Oct4 expression in human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 38:1240–1248.
 24. Josephson R, CJ Oding, Y Liu, S Shin, U Lakshminpathy, A Toumadje, B Love, JD Chesnut, PW Andrews, MS Rao and JM Auerbach. (2007). Qualification of embryonal carcinoma 2102Ep as a reference for human embryonic stem cell research. *Stem Cells* 25:437–446.
 25. Sato B, YU Katagiri, K Miyado, H Akutsu, Y Miyagawa, Y Horiuchi, H Nakajima, H Okita, A Umezawa, et al. (2007). Preferential localization of SSEA-4 in interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 364:838–843.
 26. Suzuki N, T Yamada, K Matsuoka, N Hiraoka, Y Iwamaru and J Hata. (1999). Functional expressions of fms and M-CSF during trophoblast differentiation of human embryonal carcinoma cells. *Placenta* 20:203–211.
 27. Zeltzer PM, JM Boyett, JL Finlay, AL Albright, LB Ronke, JM Milstein, JC Allen, KR Stevens, P Stanley, et al. (1999). Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study. *J Clin Oncol* 17:832–845.
 28. Rochkind S, I Blatt, M Sadeh and Y Goldhammer. (1991). Extracranial metastases of medulloblastoma in adults: literature review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54:80–86.
 29. Singh SK, ID Clarke, M Terasaki, VE Bonn, C Hawkins, J Squire and PB Dirks. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63:5821–5828.
 30. Enguita-German M, P Schiapparelli, JA Rey and JS Castresana. (2010). CD133+ cells from medulloblastoma and PNET cell lines are more resistant to cyclopamine inhibition of the sonic hedgehog signaling pathway than CD133– cells. *Tumour Biol* 31:381–390.
 31. Panosyan EH, DR Laks, M Masterman-Smith, J Mottahe-deh, WH Yong, TF Cloughesy, JA Lazareff, PS Mischel, TB Moore and HI Kornblum. (2010). Clinical outcome in pediatric glial and embryonal brain tumors correlates with in vitro multi-passable neurosphere formation. *Pediatr Blood Cancer* 55:644–651.
 32. Taylor MD, PA Northcott, A Korshunov, M Remke, YJ Cho, SC Clifford, CG Eberhart, DW Parsons, S Rutkowski, et al. (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 123:465–472.
 33. Vogelstein B, N Papadopoulos, VE Velculescu, S Zhou, LA Diaz, Jr. and KW Kinzler. (2013). Cancer genome landscapes. *Science* 339:1546–1558.
 34. Hovestadt V, DT Jones, S Picelli, W Wang, M Kool, PA Northcott, M Sultan, K Stachurski, M Ryzhova, et al. (2014). Decoding the regulatory landscape of medulloblastoma using DNA methylation sequencing. *Nature* 510:537–541.
 35. Robinson G, M Parker, TA Kranenburg, C Lu, X Chen, L Ding, TN Phoenix, E Hedlund, L Wei, et al. (2012). Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. *Nature* 488:438.

Address correspondence to:
 Dr. Oswaldo Keith Okamoto
 Centro de Pesquisa sobre o Genoma
 Humano e Células-Tronco
 Departamento de Genética e Biologia Evolutiva
 Instituto de Biociências
 Universidade de São Paulo
 Rua do Matão
 277. CEP: 05508-090
 Cidade Universitária
 São Paulo
 Brasil

E-mail: keith.okamoto@usp.br

Received for publication February 6, 2015

Accepted after revision July 8, 2015

Prepublished on Liebert Instant Online July 10, 2015

BIOGRAFIA

Carolina de Oliveira Rodini é fisioterapeuta pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (2005) e Mestre em Ciências, na área de Neurologia/Neurociências, pela Universidade Federal de São Paulo (2011). Atualmente é aluna de pós-graduação (Doutorado) do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (2016). Esta tese é apresentada para obtenção de Título de Doutor em Ciências, na área de Biologia/Genética.

Publicações científicas relevantes:

Rodini, C. O., Suzuki, D. E., Nakahata, A. M., Pereira, M. C. L., Janjoppi, L., Toledo, S. R. C., & Okamoto, O. K. (2010). Aberrant signaling pathways in medulloblastomas: a stem cell connection. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 68(6), 947–952. <http://doi.org/10.1590/S0004-282X2010000600021>

Pereira, M. C. L., Secco, M., Suzuki, D. E., Janjoppi, L., Rodini, C. O., Torres, L. B., Okamoto, O. K. (2011). Contamination of Mesenchymal Stem-Cells with Fibroblasts Accelerates Neurodegeneration in an Experimental Model of Parkinson's Disease. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(4), 1006–1017. <http://doi.org/10.1007/s12015-011-9256-4>

Rodini, C. O., Suzuki, D. E., Saba-Silva, N., Cappellano, A., De Souza, J. E. S., Cavalheiro, S., ... Okamoto, O. K. (2012). Expression analysis of stem cell-related genes reveal OCT4 as a predictor of poor clinical outcome in medulloblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 106(1), 71–79. <http://doi.org/10.1007/s11060-011-0647-9>

Nakahata, A. M., Suzuki, D. E., Rodini, C. O., Fiuza, M. L., & Okamoto, O. K. (2014). RNAi-mediated knockdown of E2F2 inhibits tumorigenicity of human glioblastoma cells. *Oncology Letters*, 8(4), 1487–1491. <http://doi.org/10.3892/ol.2014.2369>

Santos, M. C. T., Silva, P. B. G., Rodini, C. O., Furukawa, G., Marco Antonio, D. S., Zanotto-Filho, A., ... Okamoto, O. K. (2015). Embryonic Stem Cell-Related Protein L1TD1 Is Required for Cell Viability, Neurosphere Formation, and Chemoresistance in Medulloblastoma. *Stem Cells and Development*, 24(22), 2700–8. <http://doi.org/10.1089/scd.2015.0052>

Kaid, C., Silva, P. B. G., Cortez, B. A., Rodini, C. O., Semedo-Kuriki, P., & Okamoto, O. K. (2015). miR-367 promotes proliferation and stem-like traits in medulloblastoma cells. *Cancer Science*, 106(9), 1188–95. <http://doi.org/10.1111/cas.12733>

Silva, P. B. G. da, Rodini, C. O., Kaid, C., Nakahata, A. M., Pereira, M. C. L., Matushita, H., ... Okamoto, O. K. (2015). Establishment of a novel human medulloblastoma cell line characterized by highly aggressive stem-like cells. *Cytotechnology*. <http://doi.org/10.1007/s10616-015-9914-5>