

Rodolfo Sanches Ferreira

Estudo de vírus oncolítico em modelo *in vitro* de glioblastoma desenvolvido em organoide cerebral

Study of oncolytic virus on an *in vitro* model of glioblastoma developed in brain organoid

São Paulo

2022

Rodolfo Sanches Ferreira

Estudo de vírus oncolítico em modelo *in vitro* de glioblastoma desenvolvido em organoide cerebral

Study of oncolytic virus on an *in vitro* model of glioblastoma developed in brain organoid

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Biologia Genética.

Orientador: Oswaldo Keith Okamoto
Co-orientador: Brunho H. S. Araujo Torres

São Paulo

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Sanches Ferreira, Rodolfo

Estudo de vírus oncolítico em modelo in vitro de glioblastoma desenvolvido em organoide cerebral / Rodolfo Sanches Ferreira ; orientador Oswaldo Keith Okamoto ; coorientador Bruno Henrique Silva Araujo Torres -- São Paulo, 2022.

86 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Evolutiva.

1. Câncer. 2. Célula-tronco. 3. Zika vírus. 4. Glioma. I. Keith Okamoto, Oswaldo, orient. II. Silva Araujo Torres, Bruno Henrique, coorient. III. Título.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a). Oswaldo Keith Okamoto
Orientador(a)

À minha afilhada
Aos meus pais e minha irmã
À resiliente comunidade científica brasileira

Agradecimentos

É realmente surpreendente, quase assustador, quantos eventos ocorreram entre meu ingresso no Mestrado e a conclusão desse trabalho. Recebi a ajuda de muitas pessoas nesse conturbado período, espero conseguir agradecer devidamente à todas elas.

Ao Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto, por ter gentilmente me aceitado como orientando, ter sido compreensivo durante todo esse tempo e pelos valiosos conselhos no desenvolvimento dessa pesquisa. Aprendi muito sob sua orientação.

Ao Dr. Bruno Henrique Silva Araújo Torres, meu co-orientador, pelos importantes ensinamentos da complicada metodologia de organoides, por ter feito o máximo para se fazer disponível mesmo passando por uma mudança para outro país.

A todos e todas, amigos, amigas e colegas do grupo de pesquisa “Lab Keith”, pelo acolhimento desde o dia em que cheguei ao laboratório, pelos inúmeros ensinamentos, pelos momentos de descontração, pelas amizades criadas e pelo companheirismo, serei eternamente grato por ter trabalhado com pessoas tão gentis e competentes.

A todos os companheiros e todas as companheiras do CEPID “Genoma”, em especial aos membros do grupo da Prof^a. Dr^a Mayana Zatz, pelas amizades, pela ajuda quando necessitei, pela cooperação e pelos diversos ensinamentos.

Às doutoras Patrícia Semedo Kuriki, Elisa Helena Farias Jandrey e Carolini Kaid Davila, pelos inúmeros ensinamentos, conselhos, pela ajuda e orientação. Tenho convicção de que este trabalho não teria sido executado se não fosse a colaboração de vocês. Guardo enorme satisfação e gratidão por ter trabalhado com pesquisadoras tão solícitas e competentes.

À CAPES, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - processo nº 2019/27784-8, e à FUSP pelas bolsas concedidas, sem as quais o desenvolvimento deste trabalho seria impossível.

À todas e todos funcionárias e funcionários do Instituto de Biociências da USP, por tornarem este e todos os trabalhos de pesquisa possíveis.

Aos meus pais, José Roberto e Eva Lúcia, pelo amor, pelo suporte emocional e material, por me apoiarem em todas as minhas decisões, por serem minha base em tudo que fiz, faço e farei. Tenho um orgulho imensurável por ser filho de vocês.

À minha irmã, Gabriela Sanches, ao meu cunhado e amigo, Alef Eduardo de Souza e à minha sobrinha e afilhada Clarice Sanches. Pelo amor e pela amizade, por terem me escolhido como padrinho da Clarice, pelos conselhos e pela inspiração. Não poderia pedir por uma família mais amorosa e leal.

À minha melhor amiga, companheira de vida e namorada, Thais Peron da Silva, por ser minha companhia diária, pela paciência, por estar ao meu lado nos melhores e nos piores momentos, por ser o amor da minha vida, por tantas coisas que não cabem em uma seção de Agradecimentos. Obrigado por dividir a vida comigo e dedicar seu amor a mim.

À minha gata, Iara, por ser uma agradável companhia e pelo alívio, vezes cômico, vezes ansiolítico.

Índice

1. Introdução	7
1.1 Câncer	7
1.2 Glioblastoma.....	9
1.3 Organoides e cultivo celular 3D	13
1.3.1 Organoides como plataformas para o estudo de tumores do SNC	16
1.4 Efeitos oncolíticos do ZIKV	20
2. Objetivos	25
3. Materiais e Métodos	26
3.1 Cultivo celular.....	26
3.2 Geração de linhagens tumorais expressando GFP.....	27
3.3 Caracterização da linhagem F9048	28
3.4 Geração de organoides cerebrais e co-cultivo com células tumorais GFP+.....	29
3.5 Análises imunohistoquímicas de organoides cerebrais	32
3.6 Infecção por ZIKV <i>in vitro</i>	32
3.7 PFU e RT-qPCR para detecção do ZIKV	33
3.8 Dissociação de organoides e Citometria de Fluxo	34
3.9 Análise de viabilidade celular	35
3.10 Análises estatísticas e aquisição de imagens	35
4. Resultados	38
4.1. Geração e validação dos modelos celulares	38
4.1.1 Geração de linhagens tumorais fluorescentes	38
4.1.2 Confirmação de pluripotência da linhagem de hiPSC F9048	40
4.1.3 Organoides cerebrais obtidos assemelham-se a modelos “ <i>whole brain cerebral organoids</i> ”	42
4.2 O co-cultivo celular permitiu adesão e dispersão de células tumorais GFP ⁺ em organoides cerebrais	48
4.2.1 Invasão de células tumorais em organoides cerebrais	49
4.3 Avaliação do efeito oncolítico do ZIKV em modelo de co-cultivo 3D	54
4.3.1 Viabilidade de células normais e tumorais após exposição de organoides cerebrais ao ZIKV	60
5. Discussão	62
6. Conclusões	68
Resumo	69
Abstract	70
Referências Bibliográficas	71
Biografia	85

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, tornando-se um grande problema de saúde pública e um tema de extensivo estudo em pesquisa científica. Estima-se que os diferentes tipos de cânceres foram responsáveis por cerca de 10 milhões de óbitos no mundo todo, somente em 2020 (FERLAY et al., 2020). Globalmente, uma em cada seis mortes é devida a algum tipo de câncer (WHO, 2018b). No Brasil, as doenças não transmissíveis foram responsáveis por 74% das mortes em 2016, sendo que os cânceres contabilizaram 18% dessas causas (WHO, 2018a).

A origem do termo “câncer” é datada aos tempos do médico e filósofo grego Hipócrates (460 a.C – 375 a.C), que utilizou dos termos *karkínos* e *karkinoma* para descrever tumores ulcerados e não-ulcerados, respectivamente. Ambas as palavras em grego se referem a um caranguejo, associação feita por Hipócrates devido à similaridade entre o formato de um tumor em crescimento e o corpo deste crustáceo. Após a Grécia tornar-se parte do império Romano o termo foi traduzido para *cancer*, palavra latina para caranguejo, pelo médico Romano Aulus Celsus (25 a.C. – 50 d.C) (HAJDU, 2011).

Atualmente o termo câncer se refere, no entanto, a um grupo de doenças heterogêneas que compartilham mecanismos de formação e progressão similares. A origem de células tumorais se dá pelo acúmulo progressivo de alterações genéticas que conferem, por diferentes vias, vantagens replicativas para as células afetadas. A aquisição dessas vantagens geralmente envolve mutações de ganho de função em proto-oncogenes e de perda de função em genes supressores tumorais (FUTREAL et al., 2004).

Contudo, há uma gama de fatores que influenciam a formação de um tecido neoplásico, e diferentes funcionalidades estão envolvidas na aquisição e estabelecimento do fenótipo tumoral. Foram propostas, inicialmente, seis capacidades funcionais para a transformação celular e a formação de tumores malignos, os chamados *Hallmarks of Cancer*: autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento, capacidade de evasão da apoptose, aquisição de potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e invasão e metástase tecidual (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

As capacidades funcionais são adquiridas por diferentes tipos tumorais através de mecanismos distintos e em diferentes pontos temporais durante o curso da tumorigênese. Onze anos após a publicação original dos *Hallmarks of Cancer*, os autores propuseram o conceito de *características permissivas*, definidas como consequências das condições aberrantes das neoplasias que habilitariam a aquisição dos “marcos”. As duas “*enabling characteristics*”

propostas foram a instabilidade genômica, que gera mutações aleatoriamente em células transformadas, e o estado pró-inflamatório de lesões pré-malignas, um ambiente inflamatório impulsionado por células do sistema imunológico, que pode promover a progressão tumoral de diversas formas. Também foi proposta a adição de dois marcos: o primeiro, chamado de reprogramação metabólica ou desregulação da energética celular, que envolve a reorganização do metabolismo energético celular de forma a permitir continuamente a divisão e o crescimento celular; o segundo, chamado de evasão da destruição imunológica, que envolve o escape das células tumorais dos mecanismos imunológicos de defesa (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Os marcos do câncer nada mais são do que um sumário didaticamente conceituado a fim de identificar e nomear os padrões funcionais envolvidos na formação das neoplasias. Ao passar dos anos a pesquisa oncológica vem elucidando cada vez mais fatores envolvidos nesse complexo processo. Tornou-se consenso, por exemplo, que o microambiente tumoral, ou seja, a população heterogênea de diferentes tipos de células cancerosas interagindo com uma diversidade de células parenquimais e estromais dos tecidos afetados, desempenha papéis significativos na tumorigênese e na progressão tumoral. Nesse contexto, a publicação mais recente de Hanahan sugeriu a incorporação de quatro novos *hallmarks*: (I) o desbloqueio de plasticidade fenotípica, isto é, a capacidade de desdiferenciação celular para um estado mais similar às células progenitoras que permite “burlar” a barreira proliferativa imposta pelo processo de diferenciação terminal; (II) a reprogramação epigenética não-mutacional, um mecanismo de regulação da expressão gênica independente do genoma, responsável por fatores como desenvolvimento embrionário, diferenciação e organogênese, e cuja maquinaria pode ser corrompida de forma a contribuir para a aquisição de outros *hallmarks*, como a própria plasticidade fenotípica, por exemplo; (III) microbiomas polimórficos; evidências crescentes têm demonstrado que a variabilidade entre microbiomas individuais de uma população tem profundo impacto nos fenótipos neoplásicos, uma vez que a microbiota interfere diretamente em marcos como a imunomodulação tecidual e a instabilidade genômica; (IV) células senescentes; a senescência celular é tida como um mecanismo de parada proliferativa útil para a manutenção da homeostase tecidual, porém células senescentes podem adquirir o chamado fenótipo secretor associado à senescência (SASP), o qual envolve a liberação de um repertório de proteínas bioativas, como citocinas, quimiocinas e proteases, as quais podem ser captadas por células cancerosas e, assim, contribuir para a aquisição de diferentes *hallmarks* (HANAHAN, 2022).

De maneira geral, neoplasias podem surgir em qualquer órgão humano, e uma grande variação na incidência do câncer entre diferentes tecidos é bem estabelecida. Essa diferença

pode ser explicada por características ambientais, como exposição à carcinogênicos (tabaco, álcool, radiação ultravioleta, etc), e pela composição tecidual, onde tecidos com maiores populações de células tronco e de alto potencial proliferativo apresentam risco elevado (TOMASETTI; VOGELSTEIN, 2015).

Apesar dos marcos do câncer descreverem características comuns entre as neoplasias, cada tecido apresenta particularidades que influenciam de maneira individual a origem e a progressão tumoral (TOMASETTI; VOGELSTEIN, 2015). Os tumores do sistema nervoso central (SNC), por exemplo, exigem estudos que levem em consideração suas características específicas, por serem localizados em órgãos com aspectos únicos que requerem atenção na pesquisa científica (ABOU-MRAD et al., 2021).

1.2 Glioblastoma

Os cânceres do SNC representam cerca de 2% de todas as malignidades no mundo (IARC, 2020). No Brasil, estimam-se 5.870 novos casos em homens e 5.220 novos casos em mulheres para cada ano do triênio 2020-2022 e, apenas no ano de 2018, foram contabilizadas 9.309 mortes, sendo 4.803 homens e 4.506 mulheres. Apesar de relativamente raros, tais cânceres possuem grande relevância clínica, uma vez que são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade (INCA, 2018; OSTROM et al., 2018).

Os gliomas são tumores cerebrais primários que podem ser originados de células-tronco neurais (CTNs), células neuroprogenitoras (CNPs), progenitoras gliais, astrócitos, oligodendrócitos e neurônios (SANAI; ALVAREZ-BUYLLA; BERGER, 2005). Representando cerca de 80% das neoplasias primárias do SNC, são considerados os tumores cerebrais mais comuns (OHGAKI, 2009; LOUIS et al., 2016). A classificação mais recente da Organização Mundial da Saúde (OMS) subdividiu os gliomas, tumores neuronais e glioneurais em: gliomas difusos adultos; gliomas difusos pediátricos de baixo grau; gliomas difusos pediátricos de alto grau; gliomas astrocíticos circunscritos; tumores glioneurais e neuronais; tumores ependimais (LOUIS et al., 2021). O glioma difuso adulto que apresenta pior prognóstico é o glioblastoma (GBM). Representando o glioma mais frequente, maligno e mortal, o GBM corresponde a 55,6% dos gliomas e a 46,1% de todos os tumores do SNC de adultos (OSTROM et al., 2014, 2018).

Os principais sintomas do GBM são dores de cabeça, distúrbios neurológicos e focais, confusão, perda de memória, alterações de personalidade, fala e visão, além da ocorrência de crises convulsivas (WEN; KESARI, 2008). O tratamento convencional é baseado na ressecção cirúrgica máxima, posterior ao diagnóstico por imagem, seguida de quimio e radioterapia

concomitantes. O agente alquilante Temozolamida (TMZ) é a terapia nova mais recentemente incluída no regime de tratamento. Infelizmente, a taxa de sobrevida geral dos tratados ainda é de apenas 12 a 15 meses pós-terapia, sendo que uma pequena fração (menos de 10%) sobrevive por períodos maiores (STUPP; ROILA; ESMO GUIDELINES WORKING GROUP, 2009; STUPP et al., 2014).

A classificação do GBM em primário ou secundário, de acordo com sua apresentação clínica, foi proposta no início dos anos 2000. A forma primária seria a mais comum (cerca de 90% dos casos), caracterizada por um fenótipo agressivo, de crescimento rápido ocorrendo normalmente em pacientes com 55 anos ou mais (KLEIHUES; OHGAKI, 1999; OHGAKI et al., 2004). Os GBM secundários seriam os originados de um astrocitoma com menor grau de malignidade, podendo levar entre 10 e 15 anos para se tornarem GBM (ALIFIERIS; TRAFALIS, 2015). Esse subtipo ocorre geralmente em indivíduos mais jovens, com 45 anos ou menos. Apesar de indistinguíveis morfológicamente, os dois subtipos apresentam características genéticas e moleculares distintas. O primário caracteriza-se por amplificação do gene codificante do receptor de fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) e do inibidor de p53, gene *Mouse Double Minute 2 (MDM2)*, além de mutações de *Phosphatase and tensin homolog (PTEN)* e deleções de *CDKN2A*. Em GBM secundário observa-se ativação da via do fator de crescimento derivado de plaquetas (*PDGF-A* e *PDGFR- α*), mutações de p53, Isocitrato Desidrogenase (IDH) 1 (*IDH1*) e amplificações de *MET* (KLEIHUES; OHGAKI, 1999; ALIFIERIS; TRAFALIS, 2015).

Uma classificação proposta em 2010 baseou-se na heterogeneidade molecular do GBM, onde estudos genômicos e moleculares levaram à classificação, de acordo com a expressão gênica, em GBM clássico, mesenquimal e pró-neural (VERHAAK et al., 2010). O subtipo clássico foi identificado por amplificações de *EGFR* e do cromossomo 7, deleções do cromossomo 10 e mutações no gene *PTEN*. O marcador de precursores neurais e células tronco *NES*, bem como as vias de sinalização NOTCH (*NOTCH3*, *JAG1* e *LFNG*) e *Sonic hedgehog (SMO*, *GAS1* e *GLI2*) também são altamente expressos no GBM clássico. O subtipo mesenquimal define-se por mutações de *NF1* e *PTEN*, expressão de marcadores mesenquimais (*CHI3L1* e *MET*) e astrocíticos (*CD44* e *MERTK*), menor frequência de amplificação do *EGFR* e supra-regulação de genes da via do NF- κ B (*TRADD*, *RELB*, *TNFRSF1A*), potencialmente consequentes da acentuada necrose geral e dos infiltrados inflamatórios observados na classe mesenquimal. Tal subtipo se relaciona a menores taxas de sobrevida global. O GBM pró-neural é caracterizado por amplificação de *PDGFRA*, mutações em *TP53* e *IDH1*, com alta expressão de genes do desenvolvimento de oligodendrócitos (*PDGFRA*, *NKX2-2* e *OLIG2*) e proneurais

(*SOX*, *DCS*, *DLL3*, *ASCL1* e *TCF4*). Esse subtipo apresenta-se ordinariamente em indivíduos mais jovens e é comum em GBM secundários. A ocorrência de diferentes tipos moleculares pode levar a diferentes respostas aos tratamentos, e a complementação das novas classificações dos perfis de GBM pode aumentar a personalização das terapias, direcionando a aplicação de drogas distintas para alvos específicos (ALIFIERIS; TRAFALIS, 2015).

Atualmente, a referência internacional para nomenclatura e padrões de diagnóstico dos gliomas é a classificação formulada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que considera o GBM como um tumor de grau 4 (GROCHANS et al., 2022). A classificação da OMS publicada em 2016, que leva em conta critérios histopatológicos e moleculares, classificou quatro tipos de GBM: (i) Glioblastoma, IDH-*wildtype*, representando cerca de 90% dos casos com idade média de diagnóstico de 60 anos; (ii) Glioblastoma, IDH-mutante, considerado um GBM secundário de melhor prognóstico, que geralmente se desenvolve em pacientes mais jovens portadores de gliomas de graus mais baixos (2 e 3); (iii) Glioblastoma “não especificado” (NOS, do inglês *not otherwise specified*), utilizado para denominar casos em que o status mutacional do IDH não pode ser determinado por conta da ausência de amostras histológicas e moleculares; (iv) Glioblastoma “sem outra classificação” (NEC, do inglês *not-elsewhere-classified*), esta categoria criada mais recentemente inclui os casos em que as análises para determinação dos subtipos foram feitas, porém os resultados não os incluem em nenhuma das categorias estabelecidas pela OMS (LOUIS et al., 2016).

A nova classificação publicada pela OMS em 2021 ampliou o uso da genotipagem nos critérios para diagnóstico do GBM. Tumores com IDH mutante que poderiam anteriormente ser classificados como astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico ou GBM passaram a ser considerados um tipo único de astrocitoma grau 2, 3 ou 4. Para o diagnóstico de GBM, IDH-*wildtype*, qualificam-se casos de glioma astrocítico difuso em adultos com presença de proliferação microvascular, necrose, mutação em promotor da Transcriptase Reversa da Telomerase (TERT), amplificação do gene EGFR ou mudança no número de cópias cromossômicas com ganho inteiro de cromossomo 7 combinado com deleção completa de cromossomo 10 (LOUIS et al., 2021).

O GBM possui padrão histológico altamente heterogêneo, onde ocorrem interações entre tecidos neoplásicos e estromais (AGNIHOTRI et al., 2013). O crescimento do tumor pode ser direcionado por fatores estocásticos ou hierárquicos (VESCOVI; GALLI; REYNOLDS, 2006), e estudos recentes sugerem a presença de células-tronco tumorais (CTT) com alta capacidade de auto-renovação e propagação. No GBM, especificamente, essas populações celulares são chamadas de *Glioma Stem Cells* (GSC) (HEMMATI et al., 2003; GALLI et al.,

2004; SINGH et al., 2004). As GSCs têm alta capacidade de iniciação e progressão tumoral, e tais subpopulações têm sido frequentemente referidas como causadoras de recidiva e resistência às terapias, devido a múltiplos mecanismos, incluindo aumentada capacidade de reparo do DNA (BAO et al., 2006; CATALANO et al., 2011; CHERAY et al., 2017). Por tratar-se de um câncer altamente invasivo e agressivo, somado à complexidade da realização de processos cirúrgicos no SNC, a ressecção cirúrgica máxima no GBM é muito dificultada, o que também contribui para a alta taxa de recidiva observada nesses pacientes (MALLICK et al., 2016). Estes fatores, somados à curta sobrevida dos acometidos pós-tratamento, enfatizam a necessidade da busca por novas estratégias terapêuticas no GBM.

Há uma organização hierárquica no GBM, onde as GSCs recebem sinais de manutenção de seu microambiente. As GSCs residem em nichos perivasculares onde tal proximidade facilita o acesso a nutrientes e oxigênio (CALABRESE et al., 2007), enquanto uma segunda população de GSCs reside em regiões hipóxicas distantes dos vasos (LI et al., 2009; BAR et al., 2010; SEIDEL et al., 2010). Células normais, CTT e células neoplásicas não-tronco envolvem-se em uma comunicação bidirecional, emitindo sinalizações para a manutenção do estado celular (CHARLES et al., 2010; ZHU et al., 2011; YAN et al., 2014).

Estudos recentes sugerem que células tumorais no GBM têm uma capacidade inerente de modificar e moldar seu microambiente. A adição de células estromais derivadas de GBMs de diferentes fenótipos (intermediário ou invasivo) a esferoides tumorais foi capaz de induzir ou inibir o crescimento destes, dependendo da origem das células estromais e do subtipo de esferoide GBM. As células cancerosas também causaram supra regulação de fatores angiogênicos e infra regulação de *TP53* em células endoteliais, sendo que essa interação bidirecional envolveu *TGFBI*, *THBS1*, integrinas, *FNI* e outras moléculas de matriz extracelular. Os resultados sugerem que o parênquima cerebral é “instruído” diferencialmente pelo tumor e, através de uma “conversa” molecular, pode reforçar características fenotípicas da neoplasia. Por meio de interações autócrinas e parácrinas, células neoplásicas e endoteliais parecem cooperar para criar um microambiente angiogênico e que contribua para a promoção tumoral (BOUGNAUD et al., 2016). Outro estudo mais recente demonstrou que oligodendrócitos aumentaram significativamente a capacidade de migração e invasão de duas linhagens de GBM, T98G e U251, por mecanismo dependente da via de sinalização da angiopoietina-2 (KAWASHIMA et al., 2019). Tais dados demonstram que a interação tumor-microambiente é um importante fator a ser considerado nos estudos do GBM, e deve-se dar especial atenção ao modelo experimental a ser utilizado nesses estudos.

1.3 Organoides e cultivo celular 3D

Os avanços na busca de novos tratamentos do câncer dependem, principalmente, de modelos *in vitro* fisiologicamente relevantes, a fim de detectar e priorizar novos compostos e estratégias de administração de fármacos (IVANOV et al., 2015). Experimentos laboratoriais *in vitro*, utilizando tecido primário e linhagens celulares estabelecidas, são rotineiramente empregados para testes de hipóteses biológicas e análises de estratégias para tratamento oncológico (IVANOV et al., 2016).

A escolha das condições de cultivo apropriados na pesquisa do câncer pode permitir melhor entendimento da biologia tumoral e, assim, otimizar os tratamentos radio e quimioterápicos disponíveis, além de facilitar a busca por novas estratégias terapêuticas (AGGARWAL et al., 2009). Culturas celulares podem ser mantidas em cultivos sob duas condições, de forma aderente ou em suspensão. O tipo de cultivo mais utilizado é o modelo bidimensional (2D) mas, recentemente, os métodos de cultivo tridimensionais (3D) têm ganhado ampla popularidade (PAMPALONI; REYNAUD; STELZER, 2007).

Em culturas 2D aderentes, as células crescem em monocamadas acopladas a um frasco de cultura (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013). As vantagens desse modo de cultivo estão relacionadas à simplicidade e ao baixo custo de manutenção da cultura celular, além da performance em testes funcionais. Contudo, culturas aderentes apresentam diversas desvantagens. Células em cultivo bidimensional não mimetizam a arquitetura estrutural de tecidos ou tumores, e as interações célula-célula e célula-ambiente extracelular não são representadas como seriam no microambiente tumoral (KAPAŁCZYŃSKA et al., 2018).

O isolamento do tecido e transferência para condições bidimensionais altera a morfologia tecidual e modo de divisão celular (KAPAŁCZYŃSKA et al., 2018), o acesso a nutrientes, oxigênio, metabólitos e moléculas sinalizadoras (PAMPALONI; REYNAUD; STELZER, 2007), modifica a estrutura intracelular, secreção, sinalização e função celular (DEBNATH; BRUGGE, 2005; NELSON; BISSELL, 2006), além de induzir perda de polaridade (VON DER MARK et al., 1977; PETERSEN et al., 1992; MSEKA; BAMBURG; CRAMER, 2007), alterando respostas a fenômenos como a apoptose (WEAVER et al., 2002; MEYERS; CRAIG; ODDE, 2006). No mais, o cultivo 2D altera expressão gênica, *splicing*, topologia e bioquímica celular (GÓMEZ-LECHÓN et al., 1998; BIRGERSDOTTER; SANDBERG; ERNBERG, 2005), além de, normalmente, envolver apenas um tipo celular por estudo, estando ausente a formação de um microambiente tumoral diversificado com os “nichos” celulares observados *in vivo* (ENGLER et al., 2006; FISCHBACH et al., 2007).

Frente às amplas desvantagens de trabalhos bidimensionais *in vitro*, surge a necessidade do desenvolvimento de modelos alternativos para estudo do câncer. Métodos de cultivo tridimensionais recentemente descritos recapitulam características do crescimento celular *in vivo*, viabilizando a ocorrência da auto-organização, diferenciação e heterogeneidade dentro do ambiente de cultura (LANCASTER et al., 2013; LANCASTER; KNOBLICH, 2014b; MCCRACKEN et al., 2014; SHAMIR; EWALD, 2014).

A aplicação de princípios fundamentais da biologia do desenvolvimento à diferenciação dirigida de células tronco pluripotentes humanas (hPSC) impulsionou o recente desenvolvimento de organoides humanos. Os organoides são estruturas celulares 3D derivadas de células-tronco ou progenitoras que, em menor escala, recriam aspectos importantes da anatomia tridimensional e da composição multicelular de suas respectivas contrapartes fisiológicas (ROSSI; MANFRIN; LUTOLF, 2018). Tais modelos podem recapitular *in vitro* funções básicas ao nível tecidual e, dessa forma, permitem o estudo de processos biológicos como comportamento celular, reparo tecidual e resposta a drogas ou mutações, em um ambiente que mimetiza a organogênese e a arquitetura tecidual endógena (MCCAULEY; WELLS, 2017).

De acordo com a definição proposta por Madeline A. Lancaster e Juergen A. Knoblich, organoides são “uma coleção de tipos de células órgão-específicas que se desenvolve de células-tronco ou progenitoras órgão-específicas através de seleção celular e comprometimento de linhagem espacialmente restrito de maneira semelhante a *in vivo*” (LANCASTER; KNOBLICH, 2014a).

Avanços recentes com modelos de vários sistemas de órgãos *in vitro* demonstraram a grande capacidade de auto-organização de hPSCs para formação de tecidos complexos (SATO et al., 2009; EIRAKU et al., 2011). Corpos embrioides (CEs) representativos das três camadas germinativas já foram desenvolvidos com sucesso, e atualmente já foram gerados modelos organoides de rins (TAKASATO et al., 2015), fígado (TAKEBE et al., 2013), pâncreas (BOJ et al., 2015), estômago (BARKER et al., 2010), intestino (WORKMAN et al., 2017), tireóide (SAITO et al., 2018), glândulas salivares (HOSSEINI et al., 2018), bexiga (VASYUTIN et al., 2019), próstata (CHUA et al., 2014), tubas uterinas (KESSLER et al., 2015), endométrio (TURCO et al., 2017), mama (SACHS et al., 2018), pulmões (MCCAULEY et al., 2017), retina (VÖLKNER et al., 2016) e cérebro (LANCASTER et al., 2013).

O cérebro humano, apesar de aparentemente ordinário num ponto de vista macroscópico, representa o órgão mais complexo produzido durante a embriogênese em todo reino animal. O encéfalo do *Homo sapiens* é altamente volumoso, comparado aos nossos parentes evolutivos mais próximos, se desenvolve mais vagarosamente e por mais tempo, e

apresenta configuração extraordinariamente complexa, com mais tipos neuronais e áreas cerebrais do que qualquer outra linhagem de mamíferos (GESCHWIND; RAKIC, 2013).

O desenvolvimento encefálico dos mamíferos inicia com a expansão do neuroepitélio que resulta na formação de uma camada de células altamente proliferativas, a glia radial, que habita uma região próxima ao lúmen do ventrículo cerebral, chamada de Zona Ventricular (ZV). Essa camada celular divide-se, diferencia-se e migra para formar neurônios e células progenitoras intermediárias. Essas últimas ocupam a região adjacente à ZV, chamada de Zona Subventricular (ZSV), pela qual os neurônios migram para formar camadas específicas na placa cortical (GÖTZ; HUTTNER, 2005). Em humanos as camadas progenitoras são mais complexas e elaboradas em comparação aos demais mamíferos. Após sua formação, a ZSV é marcada por uma proliferação celular contínua durante toda a gestação, e o desenvolvimento considerável do córtex cerebral de primatas é frequentemente atribuído a essa característica (ZECEVIC; CHEN; FILIPOVIC, 2005).

Tendo em vista a grande complexidade das alterações biológicas e morfológicas celulares necessárias para o desenvolvimento do cérebro maduro e funcional, é notável que protocolos *in vitro* tenham satisfatoriamente conseguido recapitular partes significativas do período neurogênico (KELAVA; LANCASTER, 2016). Os organoides cerebrais são desenvolvidos por um protocolo dependente de características auto-organizáveis intrínsecas, através da aplicação oportuna de componentes e ambientes de cultura extensamente estudados e descritos individualmente. Logo, a metodologia é um acoplamento de métodos prévios, combinados de maneira específica para alcançar dois objetivos principais: (1) o estabelecimento de identidade e diferenciação neural e (2) a recapitulação da organização estrutural 3D do tecido neuroectodérmico (LANCASTER; KNOBLICH, 2014b).

O primeiro objetivo do protocolo é alcançado devido à formulação dos meios de cultura e seus suplementos aplicados em pontos temporais específicos. O desenvolvimento de organoides cerebrais inicia com a formação de agregados celulares de hPSCs, os CEs, que possuem células das três camadas germinativas (EVANS, 2011; SHEVDE; MAEL, 2013). Os CEs são formados utilizando-se meio de cultura de hPSCs com baixa concentração de bFGF e alta concentração de inibidor de Rho quinase (ROCK *inhibitor*, ROCKi). A diferenciação do tecido neural é induzida com uma formulação de meio de cultura similar à aplicada para formação de rosetas neurais 2D (ZHANG et al., 2001; HU; ZHANG, 2010) que, aplicada aos CEs em suspensão, leva à formação uniforme de neuroectoderma em sua superfície externa. Finalmente, os organoides cerebrais são mantidos em um meio cuja formulação permite a manutenção de CNPs e de suas progênes neuronais, através do uso de reagentes como meio

Neurobasal, suplemento B27, 2-mercaptoetanol e insulina humana (LANCASTER; KNOBLICH, 2014b).

O segundo objetivo do protocolo estabelecido por Lancaster e colaboradores é alcançar uma organização espacial 3D do tecido que recapitule o desenvolvimento de regiões cerebrais. Uma vez que tecidos neurais derivados de hPSCs possuem uma capacidade intrínseca de auto-organização (EIRAKU; SASAI, 2012), o neuroectoderma em CEs pode espontaneamente adquirir uma polarização basal-apical na formação do neuroepitélio. O suporte estrutural necessário para a orientação adequada e o crescimento contínuo deste neuroepitélio é fornecido ao incorporar os organoides em um hidrogel contendo proteínas de matriz extracelular, nesse caso, o Matrigel. O componente final do protocolo é a aplicação de agitação, através do uso de biorreatores rotatórios ou *shakers* orbitais, a qual aumenta a difusão de nutrientes no tecido organoide, melhora a sobrevivência tecidual e permite maior desenvolvimento (LANCASTER; KNOBLICH, 2014b).

A expansão do tecido nos organoides cerebrais, permitida pela matriz extracelular, se dá pelo crescimento de *buds* de neuroepitélio que se expandem e se desenvolvem em diferentes regiões cerebrais. O método desenvolvido por Lancaster e colaboradores, comumente referido como *whole brain organoids*, levou à formação de modelos organoides apresentando regiões reminiscentes da retina, córtex dorsal, prosencéfalo ventral, região limítrofe mesencéfalo-rombencéfalo, plexo coróide e hipocampo (LANCASTER; KNOBLICH, 2014a).

O desenvolvimento dos organoides cerebrais permitiu o estudo de diversas doenças que afetam o SNC, principalmente a infecção pelo Zika vírus (ZIKV) e microcefalia (LANCASTER et al., 2013; CUGOLA et al., 2016; DANG et al., 2016; GARCEZ et al., 2016; QIAN et al., 2016), além de cânceres, como o glioblastoma (HUBERT et al., 2016; ZHU et al., 2017, 2020; BIAN et al., 2018; OGAWA et al., 2018; KRIEGER et al., 2019; LINKOUS et al., 2019; GORANCI-BUZHALA et al., 2020; JACOB et al., 2020).

1.3.1. Organoides como plataformas para o estudo de tumores do SNC

Apesar da existência de um protocolo estabelecido para formação de organoides cerebrais (LANCASTER et al., 2013), os trabalhos envolvendo formação de organoides para estudos do GBM variam razoavelmente entre si. Resumidamente, são descritos modelos derivados de pacientes, de indução oncogênica e de co-cultivo.

O uso de amostras tumorais humanas permitiu o desenvolvimento de protocolos para a formação de organoides tumorais de GBM (HUBERT et al., 2016; JACOBS et al., 2020). Os organoides tumorais são modelos 3D compostos unicamente por células cancerosas, incluindo

GSCs e células tumorais não-tronco. Diferentemente dos organoides cerebrais, que recapitulam aspectos da neurogênese humana, os organoides tumorais são derivados de biópsias de gliomas e preservam características importantes do tecido neoplásico primário, como alterações genéticas, perfil de expressão gênica e organização tecidual (JACOBS et al., 2020).

Os trabalhos de Hubert et. al (2016) focaram no desenvolvimento de organoides tumorais visando o potencial das GSCs. O grupo desenvolveu organoides tumorais derivados diretamente de espécimes de GBM, incluindo culturas primárias derivadas de pacientes, xenoenxertos, modelos de glioma geneticamente modificados e até amostras de metástases cerebrais. O estabelecimento de organoides viáveis foi efetivo a partir de culturas primárias usando tanto tumoresferas inteiras ou GSCs dissociadas embebidas em matriz extracelular. Uma vez formados, os modelos cresceram por meses e apresentaram heterogeneidade regional, com uma região externa de células SOX2⁺, OLIG2⁺ e TLX⁺ em torno de um núcleo hipóxico de células senescentes não-tronco e CTTs difusas. Os organoides tumorais recapitularam a invasão tumoral unicelular e a heterogeneidade regional do GBM vista *in vivo*, gerando gradientes de densidade de hipóxia e células-tronco. As GSCs mostraram-se radio resistentes, enquanto as células neoplásicas não-tronco adjacentes foram radio sensíveis. Os trabalhos do grupo demonstram que populações de células de GBM tronco e não-tronco fenotipicamente diversas podem ser simultaneamente cultivadas, para explorar aspectos de influências microambientais e a biologia de GSCs (HUBERT et al., 2016). Os organoides tumorais desenvolvidos por Jacobs e colaboradores, denominados GBOs (do inglês *glioblastoma organoids*), foram usados para o teste de células CAR-T direcionadas a antígenos tumorais específicos. Os GBOs mostraram-se promissores para análises de heterogeneidade tumoral e avaliação de estratégias terapêuticas (JACOBS et al., 2020).

O modelo estabelecido por Bian e colaboradores (2018), denominado neoCOR (*neoplastic cerebral organoid*), recapitulou a tumorigênese cerebral através da introdução de mutações oncogênicas em organoides cerebrais via transposons e CRISPR/Cas9. O trabalho permitiu a recapitulação da heterogeneidade tumoral, fornecendo um modelo adequado para investigação de aspectos como invasividade e avaliação de efeitos de drogas no contexto de aberrações específicas do DNA (BIAN et al., 2018).

Em outro estudo, publicado em 2018, Ogawa e colaboradores realizaram dois tipos de modelo para estudo de organoides tumorais: (I) o de indução oncogênica, no qual foram introduzidas mutações por CRISPR/Cas9 em organoides cerebrais normais, e (II) o modelo de co-cultivo, em que esferas tumorais de GBM derivadas dos organoides tumorais e duas linhagens celulares de GBM (derivadas de pacientes) foram co-cultivadas com organoides

cerebrais normais. No primeiro, foram injetados simultaneamente dois plasmídeos para expressão de genes repórteres fluorescentes, ambos inseridos no gene *TP53*. Duas semanas após eletroporação, pode-se observar organoides contendo células expressando essas proteínas. Os organoides foram posteriormente dissociados e quantificados por citometria de fluxo. Oito semanas pós-eletroporação, as células com marcador oncogênico compunham apenas 5,7% do organoide, em grande contraste com o resultado de 16 semanas, quando 86,8% do organoide estava composto por células tumorais. Como nos outros modelos de oncogênese, os autores observaram fenótipo invasivo, além de projeções de massa tumoral para adiante das bordas do organoide. Foi constatada expressão aumentada de *OLIG2*, *GFAP* e *SOX2* nas células tumorais, marcadores característicos de GSCs. Nos ensaios de co-cultivo, foi feita transferência tanto de tumoresferas quanto linhagens celulares derivadas de pacientes dissociadas (*single cell*) para os poços dos organoides normais. As tumoresferas aderiram e cresceram espontaneamente sobre os organoides não transformados. As células neoplásicas começaram a invadir o tecido e, no dia 24, os tumores haviam tomado 30% dos organoides. As células invasivas foram altamente proliferativas e exibiram expressão aumentada de marcadores de GSCs (*SOX2* e *GFAP*). Foram testadas duas linhagens de GBM derivadas de pacientes: SK429 e SK2176. A primeira cresceu na superfície, porém não invadiu o parênquima dos organoides. A segunda, no entanto, invadiu e proliferou prontamente dentro dos modelos. Embora ambas tenham sido altamente proliferativas, apenas SK2176 exibiu um fenótipo invasivo. Assim, os resultados obtidos demonstram a possibilidade de testar diferentes propriedades de linhagens celulares distintas, advindas de tumores humanos, em organoides cerebrais (OGAWA et al., 2018).

Krieger e colaboradores (2019) estabeleceram organoides cerebrais como um suporte para análise da invasão de células de GBM derivadas de pacientes. Após 24 dias de cultivo, os organoides cerebrais foram co-cultivados com células de GBM, expressando gene repórter fluorescente, de quatro linhagens derivadas de pacientes. As células tumorais de todas as linhagens prontamente aderiram e invadiram os organoides. Dentre as quatro linhagens analisadas, duas foram menos invasivas e as outras duas acessaram o interior do organoide, também sugerindo que o modelo *in vitro* pode reproduzir a heterogeneidade inter tumoral em relação ao comportamento invasivo. Consistentemente, viu-se que o comprimento dos microtúbulos formados pelos tumores diferiu entre as origens celulares, com linhagens de maior capacidade invasiva apresentando microtúbulos mais longos (KRIEGER et al., 2019).

Neste mesmo estudo, organoides cerebrais dissociados foram misturados com células de GBM, das 4 linhagens, e crescidos em co-cultura. Após 3 dias, os tecidos mistos foram dissociados e submetidos a scRNA-seq. As análises de expressão gênica diferenciada dos co-

cultivos revelaram centenas de genes que foram positivamente ou negativamente regulados na co-cultura com células de GBM, além de uma sobreposição de 45 genes que foram mais expressos em todas as linhagens sob co-cultivo. A análise de enriquecimento destes confirmou que os genes relacionados à regulação de crescimento, migração neuronal, secreção extracelular e resposta a estímulos foram favorecidos. Tomados em conjunto, os dados apontam que interações entre células de GBM e células normais dos organoides aumentam a expressão gênica necessária para a formação e invasão da rede tumoral (KRIEGER et al., 2019).

Em outro trabalho, modelos organoides cerebrais foram mesclados com GSCs expressando marcadores fluorescentes. Nos co-cultivos resultantes, denominados GLICOs (*cerebral organoid gliomas*), organoides portadores de tumor apresentaram massa neoplásica hipercelular com borda infiltrante de GSCs invadindo o tecido normal, recapitulando a morfologia tumoral observada em GBMs humanos. A heterogeneidade de padrões de proliferação e invasão também foi observada entre as diferentes linhagens de GSC. Os pesquisadores constataram, assim como nos estudos citados anteriormente, a formação de redes de comunicação compostas por microtúbulos, que sustentaram o crescimento tumoral nos GLICOs (LINKOUS et al., 2019).

O grupo de Goranci-Buzhala (2020) desenvolveu um estudo similar, ao estabelecer ensaios para caracterizar a invasão de GSCs em organoides cerebrais. Foram testados três ensaios: (1) geração de organoides híbridos, ao misturar GSCs expressando marcador fluorescente com as hPSCs, previamente à formação dos CEs; (2) adição de GSCs a organoides com 10 dias de idade; (3) co-cultivo de esferas de GSC (2 dias de idade) com organoides (20, 40 e 60 dias de idade), gerando um modelo de fusão nomeado *GSC organoid*. Em suma, todos os ensaios permitiram análises de invasão e distinção de padrões de invasividade, tanto de GSCs primárias quanto recorrentes. A condição do ensaio (2) assemelhou-se à observada em espécies cirúrgicas, apresentando extensivas protrusões invasivas e estruturas microtúbulo-semelhantes. Neste ensaio também foi observada a formação de hemi-sinapses entre GSC e células normais do organoide, similar ao que ocorre em tumores GBM *in vivo*. O ensaio (3) permitiu a constatação de que GSCs apresentam tropismo aumentado por organoides maduros (>40 dias), esta característica foi associada à produção de NLGN3, um mitógeno neuronal que está presente apenas em organoides maturados (YAKOUB, 2019). Resumidamente, os investigadores concluíram que o ensaio (2) recapitulou o comportamento invasivo de GSCs em amostras clínicas e que o ensaio (3) é mais apropriado para a triagem de drogas (GORANCI-BUZHALA et al., 2020).

Tomados em conjunto, esses trabalhos demonstram que é possível o estabelecimento de

modelos de cultivo celular 3D adequados para análises de proliferação, invasão, heterogeneidade tumoral e interação celular no GBM, fornecendo um microambiente *in vitro* que mimetiza a arquitetura tecidual endógena, e que permite interações tridimensionais entre células transformadas e tecido normal como *in vivo*. Contudo, são poucos os trabalhos buscando avaliar a ação de substâncias ou estratégias com potencial terapêutico no GBM em modelos organoides. Nesse contexto, a aplicação de agentes biológicos com potencial terapêutico surge como uma nova estratégia para o desenvolvimento de terapias alternativas do câncer.

1.4 Efeitos oncolíticos do ZIKV

Vírus oncolíticos (VOs) são definidos como vírus naturais ou geneticamente modificados que possuem a capacidade de infectar e causar morte de células neoplásicas (KAUFMAN; KOHLHAPP; ZLOZA, 2015). A terapia viral oncolítica utiliza de vírus que infectam e se replicam em células tumorais podendo levar à lise celular, a qual, por sua vez, libera antígenos tumorais específicos que ativam mecanismos tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa (HARRINGTON et al., 2019).

Atualmente, há somente quatro medicamentos à base de VOs aprovados para uso em humanos: o Rigvir no Leste Europeu; o Oncorine na China; o Talimogene Laherparepvec (T-VEC) nos Estados Unidos da América (EUA), Canadá e Europa (RUSSELL; PENG, 2018) e o Delytact no Japão (CAIRNS, 2021).

O Rigvir, ou Riga vírus, é um vírus Entérico Citopatogênico Humano Órfão tipo 7 (ECHO-7) não modificado que foi aprovado para tratamento de melanoma em 2004 na Letônia, em 2015 na Geórgia e em 2016 na Armênia (DONINA et al., 2015). Contudo, são limitados os dados a respeito de sua eficácia, e seu mecanismo de ação permanece elusivo (RUSSELL; PENG, 2018).

O Oncorine é um vetor adenoviral atenuado contendo uma deleção no gene E1B-55k e quatro deleções no gene E3 (RIES; KORN, 2002). Apesar de existirem hipóteses para explicar a seletividade e o efeito oncolítico de Oncorine, seu mecanismo de ação permanece incerto (CAO et al., 2020). Contudo, resultados promissores em diversos estudos abrangentes e randomizados levaram ao início dos testes clínicos e, em 2005, o medicamento foi aprovado pela *Chinese State Food and Drug Administration* para o tratamento de câncer de cabeça e pescoço em combinação com quimioterápicos (LIANG, 2018).

O T-VEC é um medicamento baseado no vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) geneticamente modificado para deleção dos genes *R1L1* e *US12*, além da inserção do gene fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) (HARRINGTON et al., 2019).

Resumidamente, as duas deleções previnem a replicação viral em células normais, estimulam a replicação em células transformadas e promovem a apresentação de antígenos virais pela maquinaria celular, enquanto a expressão induzida do gene *GM-CSF* estimula ou aumenta a resposta imune antitumoral (BOMMAREDDY et al., 2017). O uso do T-VEC foi aprovado para tratamento de melanomas avançados após a publicação de ensaio clínico de fase III que demonstrou significativa eficácia terapêutica e boa tolerabilidade do medicamento (ANDTBACKA et al., 2015).

No ano passado, o Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-Estar (MHLW, do inglês *Ministry of Health, Labour and Welfare*) do Japão aprovou condicionalmente o uso do Delytact para gliomas de grau 3 e 4. O fato consta como a primeira aprovação de um VO para tratamento de tumores cerebrais no mundo todo (CAIRNS, 2021). O Delytact, ou G47 Δ , é um vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) triplo mutado de terceira geração. O G47 Δ resulta de alterações genéticas adicionais no vírus de segunda geração G207, que possui deleção em homozigose do gene $\gamma 34.5$ e uma inserção *lacZ* inativando o gene *ICP6*. O G47 Δ foi construído pela deleção do gene $\alpha 47$ e sobreposição do promotor US11 do parental G207 (TODO et al., 2022b, 2022a). A aprovação do Delytact ocorreu baseada em dados iniciais de um estudo de fase II em pacientes com GBM. A aplicação do medicamento aumentou a taxa de sobrevivência de um ano e exibiu perfil de segurança satisfatório, causando redução tumoral via efeito oncolítico direto e aumentando a resposta imune anti-tumoral (TODO et al., 2022b).

Desde a regulamentação do uso de VOs, uma multitude de estudos envolvendo potenciais vírus oncolíticos vêm sendo desenvolvidos, incluindo diferentes tipos virais direcionados a diversos tipos de tumores. Somente para gliomas, existem estudos pré-clínicos publicados avaliando o potencial oncolítico de diferentes Herpes vírus (MCKIE et al., 1996; ANDREANSKY et al., 1998; TODO, 2008; TODO et al., 2022a), Adenovírus (ALONSO et al., 2007; VERA et al., 2016; RIVERA-MOLINA et al., 2019), Vaccinia vírus (CHEN et al., 2001; LUN et al., 2009; TANG et al., 2020), Myxoma vírus (JOSIAH et al., 2010; PISKLAKOVA et al., 2016; BURTON et al., 2018) e Parvovírus (GELETNEKY et al., 2010a, 2010b; PAGLINO; OZDUMAN; VAN DEN POL, 2012).

A avaliação do potencial de diferentes agentes virais trouxe à luz, recentemente, um promissor VO contra tumores do SNC. O ZIKV é um arbovírus, transmitido principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*, que foi isolado pela primeira vez de um macaco-reshus (*Macaca mulatta*) em 1947 na Uganda (DICK, 1952). Este flavivírus, da família *Flaviviridae*, apresenta um vírion de 50 nm de diâmetro contendo um RNA de fita única com cerca de 10,7 mil bases (kb). O ZIKV apresenta um capsídeo envolto por uma bicamada lipídica cujas

proteínas arranjam-se em simetria icosaédrica (KOSTYUCHENKO et al., 2016; SIROHI et al., 2016).

Após sua re-emergência em 2015, quando surtos de ZIKV foram relatados nas Américas, várias ilhas do Pacífico e no sudeste asiático, o patógeno foi alvo de extensivos estudos devido principalmente à sua habilidade de acessar a placenta, infectar fetos e causar severas anomalias, como a microcefalia, e até mesmo a morte fetal (BRASIL et al., 2016; DE NORONHA et al., 2018). Atualmente, sabe-se que o ZIKV possui intenso tropismo por CTNs, CNPs, astrócitos, precursores de oligodendrócitos e células microgliais (RETALLACK et al., 2016; LEE et al., 2018). Após a infecção celular, o vírus causa interrupção de processos celulares essenciais, afetando sobrevivência, proliferação e diferenciação, levando à maciça morte celular e prejudicando a neurogênese (DEVHARE et al., 2017).

Após a constatação da alta seletividade e intenso tropismo do ZIKV por CTNs (GARCEZ et al., 2016), pesquisadores buscaram avaliar se o vírus poderia também exercer esse efeito nocivo contra células de tumores do SNC.

Zhu e colaboradores (2017) testaram o efeito oncolítico das cepas africana e brasileira do ZIKV sobre três modelos de GSC, cada um com características transcricionais correspondentes a um subtipo molecular de GBM – pró-neural, clássico e mesenquimal. Apesar de detectar a infecção em células gliomais não-tronco, mais de 90% das células infectadas eram SOX2⁺. Observou-se que o ZIKV reduziu significativamente a proliferação e a capacidade de auto-renovação das GSCs, tanto em tumoresferas quanto em modelo organoide tumoral derivado de GSC (estabelecido de acordo com HUBERT et al., 2016). A detecção do marcador de apoptose Caspase 3 confirmou a morte celular causada pelos vírus. De forma interessante, o ZIKV não infectou eficientemente células diferenciadas nem células proliferativas dos organoides tumorais, contudo, foi capaz de infectar estes tipos celulares em espécies de GBM originadas de ressecção cirúrgica, novamente demonstrando uma preferência para células SOX2⁺. Nos testes *in vivo*, camundongos portadores de GBM inoculados com uma cepa de ZIKV adaptada sobreviveram substancialmente mais e com taxas maiores em comparação aos não infectados. Em relação à segurança, observou-se que o vírus demonstrou infecção, replicação e toxicidade limitadas em células neuronais normais (ZHU et al., 2017).

Logo após publicação do estudo em GBM, nossos grupos constataram que a cepa brasileira do ZIKV (ZIKV^{BR}) mata seletiva e significativamente linhagens brasileiras de tumores embrionários agressivos do SNC, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Linhagens celulares de Meduloblastoma (Med) e tumor rabdóide/teratóide atípico (AT/RT) foram infectadas, em monocamada e em modelos de tumoresferas, com diferentes quantidades de ZIKV^{BR}. A

infecção viral com 5 vezes menos vírus quando comparado ao estudo de Zhu et al. (2017) levou à extensiva morte celular acompanhada de uma alta produção de partículas virais em ambos os modelos *in vitro*. Nos experimentos *in vivo*, camundongos portadores de xenoenxertos ortotópicos de Med e AT/RT que receberam injeção de uma única dose intracerebroventricular de ZIKV^{BR} (2.000 PFU) tiveram sobrevida significativamente mais longa, redução da carga tumoral e menos metástases em comparação aos modelos não-tratados. Surpreendentemente, foi observada remissão total em alguns animais (KAID et al., 2018).

O grupo de Chen e colaboradores (2018) testou o efeito *in vivo* de uma vacina potencial feita de ZIKV atenuado (ZIKV-LAV, do inglês *live attenuated ZIKV vaccine*) sobre um modelo ortotópico de GBM humano derivado de GSCs. A aplicação reduziu significativamente o crescimento tumoral, matando seletivamente GSCs da massa neoplásica, e prolongou a sobrevivência dos animais tratados. A infecção pelo ZIKV desencadeou imunidade antiviral e inflamação, além de apoptose das CTTs. Importaneamente, a ZIKV-LAV exibiu um excelente perfil de segurança, apresentando neurovirulência mais atenuada do que a vacina licenciada do vírus da encefalite japonesa LAV 14-14-2. O equilíbrio entre a segurança e eficácia do ZIKV-LAV contra GBM humano demonstraram o potencial do Zika vírus como um candidato a terapia adjuvante no tratamento de tumores do SNC (CHEN et al., 2018).

Em novo estudo publicado em 2020, o grupo de Zhu e colaboradores identificou a infrarregulação de genes interferon da resposta antiviral e a suprarregulação do heterodímero integrina $\alpha_v\beta_5$, ambos mediados por SOX2, como mecanismos de infecção por ZIKV. A interrupção genética de ITGAV, de seu parceiro de ligação ITGB5 ou o bloqueio via anticorpo do dímero $\alpha_v\beta_5$ impediu a infecção viral em GSCs. A neutralização da subunidade ITGAV, apenas, atenuou a viabilidade e a auto-renovação de GSCs *in vitro*, enquanto esse mesmo impedimento *in vivo* levou à maior sobrevida e redução do crescimento tumoral em camundongos portando duas linhagens distintas de GSCs. Tais resultados indicam que células susceptíveis à infecção pelo ZIKV e marcadas pela expressão da integrina $\alpha_v\beta_5$ são críticas para o crescimento tumoral. Neste mesmo trabalho, os investigadores avaliaram a seletividade do ZIKV entre GSCs e células de organoide cerebral não-transformadas, através da geração de modelos denominados GBM-BCOs (*Glioblastoma - Brain Cortical Organoids*). GSCs expressando o marcador fluorescente GFP foram implantadas em organoides cerebrais crescidos por 6 meses. A infecção desses modelos por ZIKV reduziu preferencialmente GSCs-GFP⁺, infectando células $\alpha_v\beta_5^+$. Em dois modelos de GSCs derivadas de pacientes fundidas com BCOs humanos, o ZIKV mostrou um potente efeito antitumoral ao longo do tempo. Após a infecção, GSC-BCOs tiveram um aumento do número de células ZIKV-E⁺ vistas

principalmente em células GFP⁺. Em suma, os resultados confirmam a atividade oncolítica do ZIKV contra GSCs e indicaram uma possível seletividade por CTTs de GBM que parece estar associada à expressão preferencial de $\alpha_v\beta_5$ (ZHU et al., 2020).

Trabalhos avaliando o efeito oncolítico do ZIKV *in vivo* demonstraram que a infecção viral aumenta a infiltração de linfócitos T CD8⁺ no microambiente tumoral. Camundongos portando dois modelos celulares de gliomas singênicos, GL261 e CT2A, receberam 10⁵ PFU intratumoral de uma cepa viral de ZIKV murino adaptado. Os animais apresentaram maior sobrevida mediana e maior taxa de sobrevida a longo prazo em comparação aos grupos não-tratados. Após 21 dias da implantação tumoral, foi observado aumento significativo de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e CD8⁺ de memória, células NK e NKT nos tumores dos animais tratados com ZIKV em comparação aos controles. Os autores também constataram que o *clearance* tumoral neste modelo foi dependente de células T CD8⁺ (NAIR et al., 2021).

Resultados similares foram obtidos em estudo recente, que observou uma intensa resposta pró-inflamatória com aumento de infiltração intratumoral de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em modelo murino de GBM tratado com ZIKV. A infecção viral também inibiu o crescimento tumoral e prolongou a sobrevida dos animais tratados (CHEN et al., 2022). Os dados enfatizam o potencial oncolítico do ZIKV no GBM em modelos murinos *in vivo*.

Evidências contundentes enfatizam o potencial oncolítico do ZIKV contra tumores do SNC, incluindo o GBM e tumores embrionários do SNC, cânceres agressivos cujas terapias convencionais resultam em baixa sobrevida e altas taxas de recidiva. Ademais, dados publicados recentemente demonstram a aptidão dos modelos organoides cerebrais para estudos de biologia tumoral e efeito de abordagens terapêuticas oncológicas *in vitro*, em modelos compostos totalmente por células humanas. Desta forma, o presente trabalho buscou avaliar o efeito oncolítico do ZIKV^{BR} sobre diferentes linhagens de GBM, comparativamente a linhagens celulares de tumores embrionários do SNC, co-cultivadas com organoides cerebrais, testando a seletividade viral entre células cerebrais normais e transformadas. As linhagens de tumores embrionários de origem neural foram utilizadas como controle positivo do efeito oncolítico visto que nossos estudos demonstraram sua alta suscetibilidade ao ZIKV. Portanto o presente estudo avaliou a hipótese de que o ZIKV apresenta potencial terapêutico e seletividade para o GBM, além de aferir a aptidão de modelos organoides cerebrais para estudos com linhagens tumorais do SNC.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo geral estabelecer um modelo experimental de co-cultivo celular tridimensional que permita a invasão e migração de células de glioblastoma em tecido neural humano *in vitro*, em comparação a linhagens tumorais de origem neural (meduloblastoma e AT/RT), para avaliar o potencial oncolítico e a seletividade do ZIKV^{BR} entre células normais de organoide cerebral e células de diferentes linhagens tumorais.

Os objetivos específicos foram:

- I. Desenvolver e caracterizar organoides cerebrais derivados de células tronco;
- II. Desenvolver um modelo de co-cultivo 3D que permita a interação entre células de GBM e células de organoides cerebrais derivados de células tronco;
- III. Avaliar a capacidade de invasão de células de GBM em modelo de co-cultivo 3D;
- IV. Avaliar o efeito oncolítico e a seletividade do ZIKV^{BR} sobre diferentes linhagens de GBM co-cultivadas em organoides cerebrais, comparando o mesmo efeito em linhagens de tumores embrionários do SNC co-cultivadas com organoides cerebrais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo celular

A linhagem celular de hiPSC (*human inducible Pluripotent Stem Cells*) F9048 foi estabelecida e caracterizada previamente (MILLER et al., 2017), bem como a linhagem de hESC (*human Embryonic Stem Cell*) BR-6 (FONSECA et al., 2015), e ambas foram obtidas no banco de células do Centro de Estudos do Genoma Humano e Células Tronco (CEGH-CEL) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP). A linhagem de GBM humano LN-18 (CRL-2610, ATCC) foi adquirida comercialmente e a linhagem U343-MG (CVCL_S471) foi gentilmente doada pelo grupo de pesquisa do Dr. Carlos Frederico Martins Menck. A linhagem de GBM humano derivada de paciente HCB151 foi gentilmente doada pelo grupo do Prof. Dr. Rui Manuel Reis do Hospital do Câncer de Barretos. As linhagens de Meduloblastoma humano USP13 (SILVA et al., 2016) e de AT/RT USP7 (KAID et al., 2018) foram estabelecidas e caracterizadas *in house*. As células foram testadas periodicamente para contaminação com micoplasma pelo kit MYCOALERT PLUS (Lonza).

As linhagens tumorais HCB151, U343-MG, USP13 e USP7 foram cultivadas em meio DMEM “*high glucose*” (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) e 1% de Antibiótico-Antimicótico (Anti-Anti, Gibco). A linhagem LN18 foi cultivada em meio de mesma composição, porém com 5% de SFB. Ao atingirem >80% de confluência, as células foram lavadas com *phosphate buffer saline* (PBS, Gibco) e soltas com tripsina *Tryple Express* (Gibco) por 5-7 minutos a 37°C, para serem semeadas em novos frascos de cultura. O meio de cultura das linhagens tumorais foi trocado a cada 3-4 dias.

A linhagem de células HEK, utilizadas para produção de vetor retroviral contendo gene GFP, foi cultivada em meio DMEM “*high glucose*” (Gibco), suplementado com 10% de SFB (Gibco) e 1% de Anti-Anti (Gibco). Ao atingirem >80% de confluência, as células foram lavadas com PBS e soltas com *Tryple Express* por 5-7 minutos a 37°C, para serem semeadas em novos frascos de cultura. O meio das células HEK foi trocado a cada 2 dias.

A linhagem comercial de células Vero CCL-81, utilizada para os ensaios de *Plaque Forming Units* (PFU), foi cultivada em meio DMEM “*high glucose*” (Gibco), suplementado com 10% de SFB (Gibco) e 1% de Anti-Anti (Gibco). Ao atingirem >80% de confluência, as células foram lavadas com PBS e soltas com *Tryple Express* por 5-7 minutos a 37°C, para serem semeadas em novos frascos de cultura. O meio de cultura das células Vero foi trocado a cada 2-3 dias.

A linhagem Jurkat E6-1, utilizada como controle negativo para reação de RT-qPCR, foi

cultivada em suspensão em meio RPMI (Gibco) suplementado com 10% de SFB e 1% de Anti-Anti. Para subcultivo as células foram centrifugadas a 300g por 5 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em meio fresco e subcultivadas em 1/3 do volume para novas garrafas de cultura.

A linhagem de hiPSC F9048 e a linhagem de hESC BR-6, utilizadas respectivamente para formação de organoides cerebrais e controle positivo de reação de RT-qPCR, foram cultivadas em meio mTeSR™ 1 (StemCell Technologies) contendo Normocin (100 µg/ml) (Invivogen) em placas de Petri 60 mm (Corning) revestidas com Matrigel *hESC-qualified* (Corning) diluído em DMEM/F12 (Gibco). Ao atingirem >70% de confluência, as células foram lavadas com *phosphate buffer saline* (PBS) (Gibco), soltas com StemPro™ Accutase™ (Gibco) e subcultivadas em meio de cultura contendo 10 µM de Y-27632 ROCKi (Tocris) por 24h. O meio de cultura das hiPSCs foi trocado diariamente. Todas as linhagens utilizadas foram cultivadas a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

3.2 Geração de linhagens tumorais expressando GFP

A fim de facilitar a distinção entre células cancerosas e células dos organoides cerebrais, as linhagens tumorais utilizadas para experimentos de co-cultivo foram transduzidas com vetor retroviral pMXs-IRES-GFP (Cell Biolabs) para geração de células expressando o marcador *Green Fluorescent Protein* (GFP). Os plasmídeos pMXs-IRES-GFP (RTV-013, Cell Biolabs) contendo o gene GFP, psPAX2 (#12260, Addgene) vetor de empacotamento e pMD2.G (#12259, Addgene) vetor de envelope, todos contendo gene de resistência à ampicilina, estavam armazenados inseridos em bactérias criopreservadas do grupo do Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto. As bactérias foram descongeladas e cultivadas em meio LB Broth (Thermo Fischer Scientific) com 100 µg/mL de ampicilina. Após crescimento *overnight*, os plasmídeos foram extraídos da suspensão bacteriana utilizando o Plasmid Midi Kit (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. Os plasmídeos obtidos foram quantificados em equipamento Nanodrop™ (Thermo Fischer Scientific) e armazenados.

Para a transfecção, células HEK foram semeadas em placas de 6 poços (Corning) em confluência máxima de 70%. Foram adicionados 4 µg de pMXs-IRES-GFP, 2 µg de pPAX-2 e 1 µg de pM2DG às células para transfecção celular usando a Lipofectamina 2000 (Thermo Fischer Scientific), como sugere o fabricante. As células foram mantidas por 24h com a solução de plasmídeos e Lipofectamina em meio de cultivo celular. Após esse período, foi adicionado meio fresco e mantido por 72h, até o momento da coleta do meio contendo as partículas virais.

O meio com a suspensão viral foi filtrado com filtro de 0,45 um e armazenado a -20°C até o uso.

As linhagens U343-MG, LN18, HCB151, USP13 e USP7 foram semeadas em placas de 6 poços (Corning), em confluência de 50%, para o ensaio de transdução. Foi adicionado 1 mL do sobrenadante das HEKs contendo partículas virais gota a gota nas células de interesse. O meio foi mantido por 24h. Após o período de incubação, as células foram expandidas para realização da seleção das células GFP⁺. As populações de células fluorescentes foram selecionadas duas vezes via *fluorescence activated cell sorting* (FACS) utilizando o laser para *fluorescein isothiocyanate* (FITC) em equipamento FACSAria™ II (BD Biosciences). Após seleção, as linhagens foram avaliadas por meio de microscopia de fluorescência e novamente por citometria de fluxo (CF) para confirmar a emissão fluorescente pelas células.

3.3 Caracterização da linhagem F9048

Previamente ao início do protocolo de formação de organoides cerebrais, a linhagem F9048 foi submetida à ensaios de RT-qPCR e Imunofluorescência (IF) para confirmação do fenótipo pluripotente, além de ensaio de *Multiplex Ligation Probe Amplification* (MLPA) para avaliação de integridade genômica.

O RNA da linhagem F9048 foi extraído usando o RNeasy® Mini Kit (Qiagen) e a síntese de cDNA foi realizada utilizando-se a SuperScript™ III Reverse Transcriptase (ThermoFischer Scientific). A reação de RT-qPCR se deu pelo método de incorporação de *SYBR green* (Power SYBR® Green PCR Master Mix; ThermoFischer Scientific). Os primers utilizados para avaliação do fenótipo pluripotente estão listados na Tabela 1.

Para os ensaios de IF, as hiPSC foram semeadas em lâminas Nunc™ Lab-Tek™ *Chambered Coverglass* de 8 poços e mantidas por 48 horas. Após o estabelecimento das colônias, as células foram fixadas com Formaldeído 4% (SigmaAldrich) por 15 minutos, permeabilizadas com 0,3% Triton X-100 (Amresco) em PBS 1X (Gibco) por 15 minutos, bloqueadas por 2 a 3 horas com 5% Albumina Sérica Bovina (BSA; SigmaAldrich) em PBS 1X e em seguida incubadas com o anticorpo primário seguindo as instruções dos fabricantes e posteriormente com o anticorpo secundário, também seguindo as instruções dos fabricantes. As lâminas foram então incubadas com ProLong™ Diamong Antifade Mountant with DAPI (ThermoFischer Scientific) por 5 minutos, montadas com a lamínula e seladas com esmalte de unha comum. A análise foi feita em microscópio confocal.

Para o teste de MLPA, o DNA genômico da F9048 foi extraído usando o QIAmp® DNA

Mini Kit (Qiagen) e foi utilizado o kit *SALSA® MLPA KIT P070* (MRC-Holland).

3.4 Geração de organoides cerebrais e co-cultivo com células tumorais GFP⁺

A formação de organoides cerebrais se deu pelo método descrito por Lancaster e Knoblich (2014), com modificações. A linhagem F9048 foi semeada em placas de 96 poços *ultra low attachment round bottom* (Corning) a 10^4 células por poço em meio mTeSR 1 contendo Normocin (100 µg/ml) e 20 µM de ROCKi (dia 0). Após 24h, confirmada a formação dos corpos embrioides (CEs) (Figura 1A), foi adicionado 100 µL de meio mTeSR 1 sem ROCKi. O meio de cultura foi gradualmente trocado para meio HESC (DMEM/F12 (Gibco) + 20% *Knockout Serum Replacement* (KSR, Gibco) + 1% MEM Non-Essential Aminoacids Solution (NEAAS, Gibco) + 0,1 mM 2-mercaptoetanol (Gibco) + 1% GlutaMAX (Gibco)) contendo 10 µM de ROCKi e 4 ng/mL de bFGF (Peprotech). Foi adicionado 100 µL de meio HESC (10 µM ROCKi + 4 ng/mL bFGF) a cada dois dias até os CEs atingirem diâmetro médio de 400-600 µm.

Cada CE foi então transferido, utilizando ponteiros cortadas, para um poço em placa de 24 poços *ultra low attachment* (Corning) contendo 500 µL de meio N2 (DMEM/F12 + 1% suplemento N2 (Gibco) + 1% MEM NEAAS + 1 µg/mL Heparina (SigmaAldrich)). Foi adicionado 500 µL de meio N2 por poço a cada dois dias até a denotação de diferenciação do neuroepitélio nos CEs, caracterizada pela formação de bordas claras e bem definidas circundando um centro mais escuro, como exemplificado na Figura 1B.

Uma vez constatada a diferenciação neuroepitelial nos CEs, foi feito o emblocamento em Matrigel (Corning) em cavidades formadas em Parafilm (Bemis) da seguinte forma: usando ponteira de 200 µL cortada, coletou-se 40 µL + 1 CE e depositou-se um a um nas cavidades do Parafilm posicionado em placa de Petri 100 mm estéril (Corning). Foi retirado o excesso de meio e aplicado, utilizando ponteira resfriada, 15 µL de Matrigel sobre cada CE. Os corpos foram centralizados na gotícula de Matrigel utilizando ponteira de 10 µL resfriada. A placa de Petri contendo o Parafilm com os CEs emblocados foi incubada a 37°C por 30 minutos para promover a polimerização do Matrigel. Usando pinça estéril, o Parafilm contendo os CEs emblocados foi posicionado sobre uma placa de 6 poços *ultra low attachment* (Corning) e foram “lavadas” as gotículas para os poços usando meio ND sem Vitamina A (DMEM/F12 + Neurobasal (Gibco) + 0,5% suplemento N2 + 1% suplemento B27 sem Vitamina A (Gibco) + 0,5 % MEM NEAAS + 1% GlutaMAX + 50 µM 2-mercaptoetanol + 2,5 µg/mL Insulina Humana (Sigma Aldrich) + 100 µg/mL Normocin) a 3 mL/poço, depositando de 6 a 10

CEs/poço. As placas contendo os organoides emblocados foram mantidas a 37°C e 5% CO₂ em cultivo estacionário por quatro dias. Após esse período, constatada a formação de *buds* de expansão do neuroepitélio (Figura 1C), o meio foi trocado para meio ND com Vitamina A (DMEM/F12 + Neurobasal (Gibco) + 0,5% suplemento N2 + 1% suplemento B27 com Vitamina A (Gibco) + 0,5 % MEM NEAAS + 1% GlutaMAX + 50 μM 2-mercaptoetanol + 2,5 μg/mL Insulina Humana (Sigma Aldrich) + 100 μg/mL Normocin), também a 3 mL/poço. As placas foram então alocadas em incubadora *shaker* a 65 rpm, 37°C e 5% CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 3-4 dias. Após 40+ dias de cultura os organoides foram considerados maduros e aptos para experimentos e análises subsequentes.

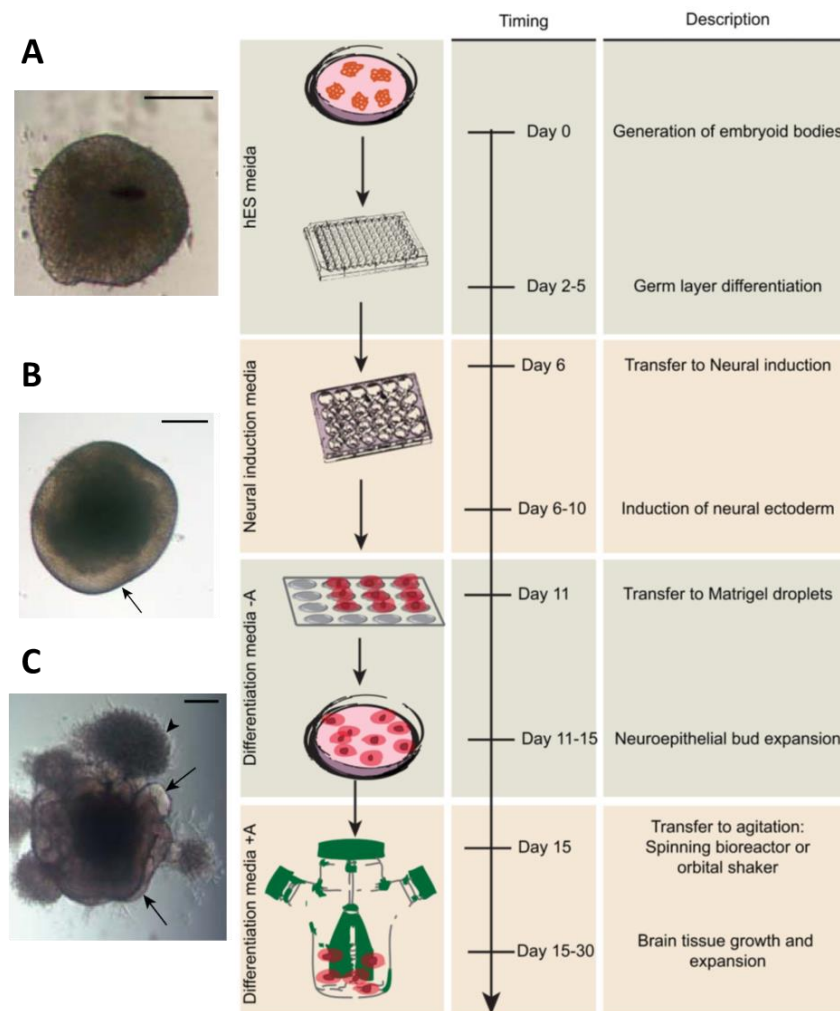


Figura 1 – Representação gráfica do protocolo de formação de organoides cerebrais. (A) Imagem ilustrativa e descrição do método de formação de CEs; (B) Denotação de diferenciação de neuroepitélio em CEs após indução de neurodiferenciação; (C) Expansão do neuroepitélio de organoides emblocados em Matrigel. Adaptado de Lancaster et al., 2014.

Para os ensaios de co-cultivo, os organoides foram individualizados, usando ponteiros asas de 1000 μL estéreis cortadas, em *ependorfs* de 1,5 mL contendo 200 μL de meio ND com Vitamina A. Os modelos foram deixados estáticos no fundo cônico dos tubos. As células tumorais foram lavadas com PBS 1X e soltas com *Tryple Express* por 5-7 minutos a 37°C. Após centrifugação a 400 g por 5 minutos, as linhagens foram ressuspensas em meio de cultura de células tumorais e contadas usando Trypan Blue (Gibco) em equipamento automatizado Cell Countess II (Thermo Fischer). Para cada linhagem tumoral foi preparada uma suspensão celular contendo 10^5 células/100 μL (10^6 células/ml). Foi adicionado 100 μl (100.000 células ou meio puro no grupo controle) sobre cada organoide individualizado nos tubos de 1,5 mL previamente identificados. Os tubos foram deixados em racks estéreis em cultivo estacionário a 37°C e 5% CO_2 por 24h, quando foi adicionado 500 μL de meio ND com Vit. A em cada tubo. Os modelos foram mantidos nos *ependorfs* por mais 24h para promover a adesão máxima de células tumorais nos organoides cerebrais. Os modelos foram então transferidos (2 dias pós co-cultivo, dpc-c) para placas de 6 poços *ultra low attachment* previamente identificadas, contendo 3 mL de meio ND com Vit. A por poço. As placas foram alocadas novamente em incubadora shaker a 65 rpm, 37°C e 5% CO_2 até o momento dos ensaios de infecção viral. A linha do tempo dos experimentos de co-cultivo está ilustrada na Figura 2.

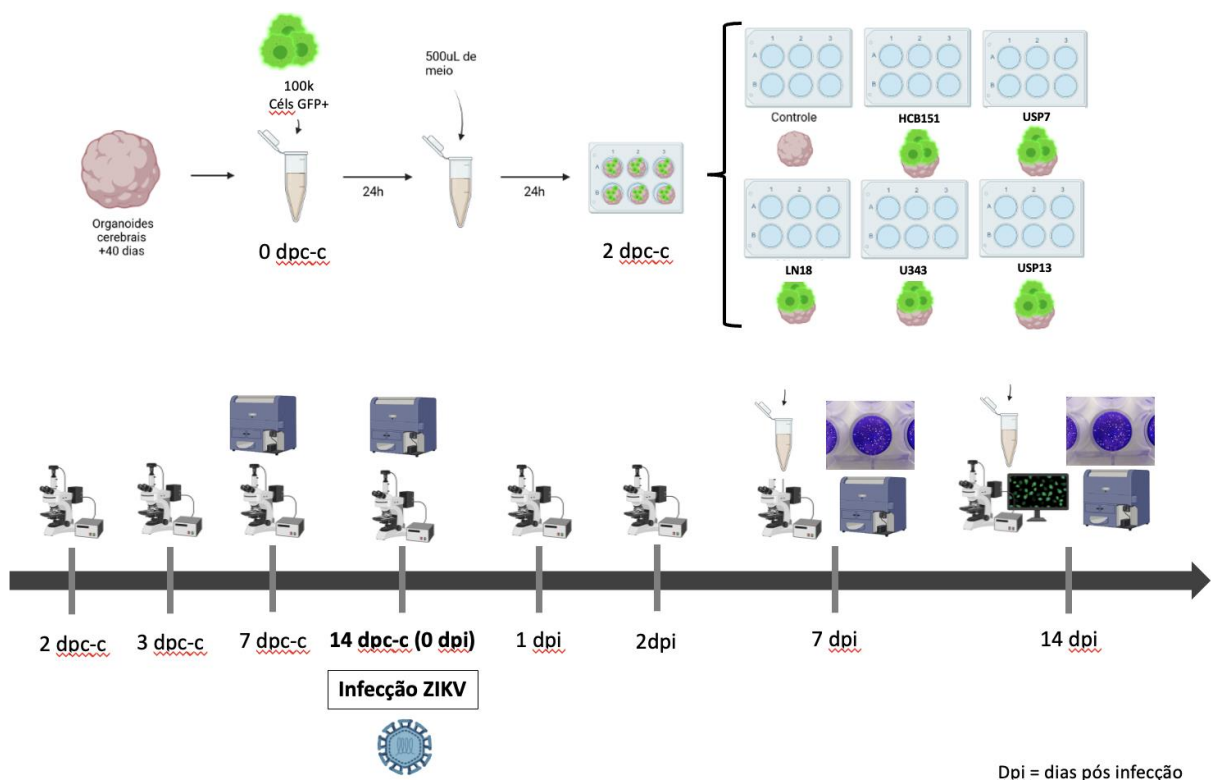


Figura 2 – Representação gráfica do método de co-cultivo e linha do tempo das análises realizadas nos organoides co-cultivados. São representados todos os grupos de co-cultivo gerados. Em 2, 3, 7 e 14 dias

pós co-cultivo (dpc-c), foram realizadas fotos em microscopia de fluorescência. Em 7 e 14 dpc-c, foi feita dissociação e análise por citometria de fluxo. Aos 14 dpc-c (0 dias pós-infecção, dpi) foi realizada a infecção por ZIKV dos co-cultivos. Foram obtidas fotos em microscopia de fluorescência em 1, 2, 7 e 14 dpi. Em 7 e 14 dpi foi feita dissociação e análise por citometria de fluxo dos organoides, além da coleta de sobrenadante para PFU e PCR. GFP = *green fluorescent protein*. h = horas. Imagem elaborada com BioRender.com.

3.5 Análises imunohistoquímicas de organoides cerebrais

Para as análises histológicas de organoides cerebrais, os modelos selecionados foram fixados com Formaldeído 4% por 24h a 4°C, crioprotetidos em solução de Sacarose 15% (4h) e 30% (24h), e subsequentemente emblocados em solução de Gelatina (Gelatin from porcine skin; SigmaAldrich) contendo 15% de sacarose. Os moldes contendo os organoides emblocados foram congelados rapidamente em banho de Etanol absoluto (Merck Millipore) com gelo seco. As amostras congeladas foram estocadas em freezer -80°C até o momento dos cortes em criostato Microm HM 505E (Microm/Zeiss). Para a secção dos organoides, os modelos foram deixados equilibrar à temperatura de corte (-24 a -28°C) por 15 a 20 minutos no equipamento criostato antes do início das secções. Foram obtidos de 6 a 10 cortes de 16-20 µm de espessura por lâmina, e ao menos 5 lâminas por organoide.

As lâminas selecionadas para marcação por IF foram submetidas ao seguinte protocolo: permeabilização por 20 minutos com 0,3% Triton X-100 em PBS1X; bloqueio por 2 a 3 horas com 5% BSA em PBS 1X; incubação com anticorpo primário diluído em buffer de diluição primário por 1h a temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C (segundo as orientações do fabricante de cada anticorpo); incubação com anticorpo secundário diluído em solução 2% BSA em PBS 1X por 1h a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS 1X entre cada etapa citada acima. Após a última lavagem, foi aplicado ProLong™ Diamong Antifade Mountant with DAPI (ThermoFischer Scientific) na lâmina, incubada por 5 minutos, aplicada a lamínula e, após secagem, a lâmina foi selada com esmalte de unha. As lâminas foram prontamente analisadas em microscópio confocal ou armazenadas a -20°C até o momento das análises.

3.6 Infecção por ZIKV *in vitro*

A cepa viral utilizada foi o ZIKV17 isolado a partir do tecido testicular de paciente humano e doado pelo Prof. Dr. Edison L. Durigon como descrito em Oliveira *et al.* (2018). Para os experimentos de infecção viral, organoides cerebrais co-cultivados e controles foram individualizados em *eppendorfs* 1,5ml estéreis previamente identificados contendo 200 µl de

meio ND. A suspensão viral foi preparada de modo a obter-se uma solução de meio ND com Vit. A contendo 20.000 PFU de ZIKV por 100 µl de meio (2×10^5 PFU/ml). O excesso de meio dos tubos contendo os organoides foi cuidadosamente removido e foram adicionados 100 µL de meio ND com Vit. A puro (grupos *mock*) ou contendo 20.000 PFU de ZIKV (grupos ZIKV). A infecção viral se deu por 2h a 37°C. Após esse período, o meio foi removido e foram adicionados 500 µL de meio ND por tubo. Os organoides foram então transferidos, usando ponteiros cortadas estéreis de 1000 µL, de volta para placas de 6 poços *ultra-low attachment* previamente identificadas contendo 3mL de meio ND com Vit. A por poço. Os grupos *mock* e ZIKV foram mantidos em incubadoras separadas, ambos em cultivo estacionário a 37°C e 5% CO₂.

3.7 PFU e RT-qPCR para detecção do ZIKV

Células Vero foram semeadas a 10^5 células/poço em placas de 24 poços (Corning) em meio DMEM “*high glucose*” (2% de SFB, 1% de Anti-Anti) 24 horas previamente ao ensaio de PFU. No dia do ensaio, os sobrenadantes das culturas infectadas e *mocks* foram diluídos (1:10) em meio DMEM “*high glucose*” puro. O meio das células Vero foi removido e os sobrenadantes foram adicionados em diluição seriada (10 em 10), em duplicata, em cada placa de 24 poços, ou seja, em cada placa foram preparados poços com diluição de 10^{-1} a 10^{-12} em duplicata para cada amostra de sobrenadante. O inóculo foi mantido por 1h a 37°C e 5% CO₂. Os inóculos foram então removidos e adicionou-se solução de Agarose (Sigma Aldrich) 0,6% diluída 1:1 em meio DMEM “*high glucose*” (2% SFB, 1% Antibiótico-Antifúngico) a 1 mL/poço (concentração final da Agarose de 0,3%). As placas foram incubadas por 4 dias a 37°C e 5% CO₂.

Passados os 4 dias, o meio com Agarose foi removido e adicionou-se 500 µL de Formaldeído 4% em cada poço para fixação das células, por 20 minutos a temperatura ambiente. A solução fixadora foi lavada com água corrente aplicada nas paredes dos poços. Após secagem por 15 minutos, as células foram reveladas com Cristal Violeta (Sigma Aldrich) por 15 minutos a temperatura ambiente. Após remoção da solução reveladora, foram selecionados poços cuja diluição permitiu a distinção e contagem do maior número de placas de lise. A concentração em PFU/mL foi determinada utilizando a seguinte fórmula, de acordo com Baer e Kehn-Hall (2014):

$$PFU/ml = \frac{\text{Média \# placas}}{D * V}$$

$$D = \text{diluição} \quad V = \text{volume de amostra diluída}$$

A presença do RNA do ZIKV nos grupos também foi avaliada via RT-qPCR. O RNA viral foi extraído dos sobrenadantes utilizando o kit QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. A reação de RT-qPCR se deu utilizando-se o TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems) com primers direcionados à uma região conservada no genoma viral, cujas sequências estão indicadas na Tabela 1. Um fragmento do genoma viral produzido sinteticamente foi utilizado como controle positivo (ZIKV gBlocks® Gene Fragments, Integrated DNA Technologies), sua sequência também está indicada na Tabela 1.

O gBlock, um bloco de DNA de fita dupla que contém a sequência do ZIKV, possui concentração viral conhecida. Dessa forma, foi gerada uma curva padrão com três concentrações (2×10^3 , 2×10^4 , 2×10^5 cópias/ul) desse oligonucleotídeo sintético. A partir do ciclo em que a curva de amplificação ultrapassa o limiar quantitativo (C_t), pode-se obter uma regressão linear dos pontos C_t contra as concentrações de RNA viral conhecidas. A linha de equação resultante permite calcular a quantidade de RNA das amostras desejadas de acordo com os seus valores de C_t . A quantificação obtida a partir da curva padrão foi corrigida levando em consideração os volumes utilizados para extração de RNA da amostra e os volumes da reação de RT-qPCR.

3.8 Dissociação de organoides e Citometria de Fluxo

Para as análises de composição celular dos modelos híbridos infectados e *mocks*, organoides co-cultivados foram dissociados mecanicamente utilizando tubos de citometria com *cell strainer* (Falcon® 5 mL *Round Bottom Polystyrene Test Tube, with Cell Strainer Snap Cap*, Corning). Resumidamente, os organoides foram transferidos individualmente, utilizando ponteiras cortadas, para as tampas dos tubos e gentilmente pressionados contra a rede *cell strainer* usando êmbolo de seringa estéril de 3 mL. A superfície foi lavada de três a cinco vezes com PBS 1X para garantir a passagem máxima de células para o interior do tubo. A suspensão celular foi centrifugada a 400 g por 5 minutos e ressuspendida em solução fixadora (formaldeído 4%) ou PBS, dependendo do ensaio. Após fixação por 15 minutos a temperatura ambiente, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em PBS. As amostras foram imediatamente analisadas por CF ou armazenadas a 4°C protegidas da luz até o momento das análises.

3.9 Análise de viabilidade celular

A viabilidade celular de organoides dissociados no último *timepoint* (14 dpi) foi avaliada utilizando o reagente 7-Amino-Actinomicina D (7AAD, BD Biosciences). Os modelos dissociados e centrifugados foram ressuspensos em 100 µL de PBS contendo 5 µL de 7AAD e incubados por 10 minutos. As amostras foram analisadas por CF para determinação da viabilidade de células GFP⁻ e GFP⁺. Os *gates* foram estabelecidos usando controles específicos preparados para as compensações adequadas.

3.10 Análises estatísticas e aquisição de imagens

As comparações entre os dados obtidos foram realizadas por teste ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey, utilizando o software GraphPad Prism (versão 7.04). As medições de diâmetro dos organoides foi realizada utilizando o software ImageJ (Fiji).

A aquisição de imagens dos organoides co-cultivados, nos diferentes *timepoints* para acompanhamento da expansão do tecido tumoral GFP⁺, foi feita em microscópio de fluorescência AXIO (Zeiss) utilizando o software ZEN Blue (Zeiss, versão 3.4). As imagens em *z-stack* de organoides inteiros e as análises de lâminas de IF foram realizadas em microscópio confocal AX 10 Observer.Z1 (Zeiss), também utilizando o software ZEN Blue.

Tabela 1 - Sequências de oligos usados nas reações de PCR.

Oligo / Primer / Alvo	Sequência Forward	Sequência Reverse
OCT4A	5'- TCGCAAGCCCTCATTTC ACCA-3'	5'- GGACTCCTCCGGGTTTT GCT-3'
NANOG	5'- CCTGAAGAAAACCTATCC ATCC-3'	5'- CCTTGTCTTCCTTTTTTG CGA-3'
C-MYC	5'- AAACACAAACTTGAAC AGCTAC-3'	5'- ATTTGAGGCAGTTTACA TTATGG-3'
GAPDH	5'- GCATCCTGGGCTACACT G-3'	5'- CCACCACCCTGTTGCTG CTGTA-3'
ZIKV 1086 (F)	5'- CCGCTGCCCAACACAAG -3'	-

ZIKV 1162c (R)	-	5'- CCACTAACGTTCTTTTG CAGACAT-3'
ZIKV <i>probe</i>	5'-FAM AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA-3' BHQ1	
ZIKV gBlocks® Gene Fragment	5'- GCATCAATATCAGACATGGCTTCGGACAGCCGCTG CCCAACACAAGGTGAAGCCTACCTTGACAAGCAAT CAGACACTCAATATGTCTGCAAAGAACGTTAGTG GACAGAGGCTGGGGAAATGG-3'	

Tabela 2 - Anticorpos utilizados para reações de imunomarcação.

Anticorpo	Hospedeiro	Catálogo	Fabricante
Nanog	Rabbit	#4903	Cell Signaling
Oct-4A	Rabbit	#2840	Cell Signaling
Sox2	Rabbit	#3579	Cell Signaling
Alexa Fluor® 488 anti-SSEA-4	Mouse	560308	BD Biosciences
Sox2	Goat	AF2018	R&D Systems
Doublecortin	Rabbit	#48-1200	Thermo Fischer Scientific
Tubulin, beta III (TUJ1)	Mouse	MAB1637	Merck
anti-Flavivirus 4G2 (clone D1-4G2-4-15)*	Mouse	-	Bio-Manguinhos
anti-Rabbit Alexa Fluor 647	Goat	#A-21245	Thermo Fischer Scientific
anti-Mouse Alexa Fluor 555	Goat	#A-21422	Thermo Fischer Scientific
anti-Rabbit Alexa Fluor 594	Goat	111-585-144	Jackson ImmunoResearch
anti-Goat Alexa Fluor Plus 488	Donkey	#A32814	Thermo Fischer Scientific
anti-Rabbit Alexa	Donkey	#A31572	Thermo Fischer

Fluor 555			Scientific
anti-Mouse Alexa Fluor 488	Goat	#A11029	Thermo Fischer Scientific

* O anticorpo 4G2 foi gentilmente cedido pelo LATIM – Laboratório de Tecnologia Imunológica da Bio-Manguinhos/Fiocruz.

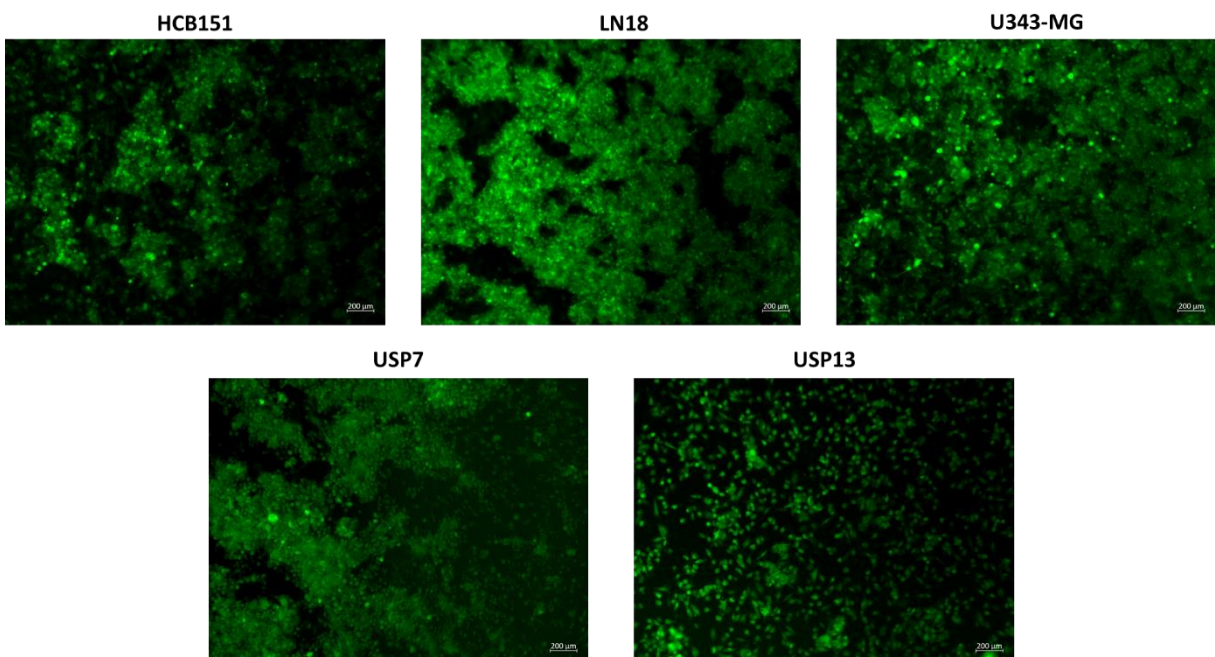
4. RESULTADOS

4.1. Geração e validação dos modelos celulares

4.1.1. Geração de linhagens tumorais fluorescentes

As linhagens derivadas de tumores do SNC U343-MG, LN18, HCB151, USP7 e USP13 posteriormente utilizadas para o co-cultivo com organoides cerebrais foram modificadas para expressão de gene repórter fluorescente GFP, a fim de permitir a distinção entre células neoplásicas e normais no modelo híbrido. Após seleção e expansão das células transduzidas, as linhagens foram observadas em microscópio de fluorescência. Constatamos visualmente uma alta taxa de positividade para fluorescência verde nas células transduzidas em todas as linhagens avaliadas (Figura 3A). Para quantificar a percentagem de células GFP⁺, submetemos as linhagens selecionadas à análise por CF previamente ao início do co-cultivo. De fato, todas as células analisadas apresentaram população >85% positivas para fluorescência verde (Figura 3B). Observamos que 95,2% das células U343-MG foram GFP⁺, em comparação a 97,7% para LN18, 98,4% para HCB151, 85,1% para USP7 e 93,5% para USP13 (Figura XB). Estes dados mostram que a modificação das linhagens celulares de tumores do SNC para expressão de fluorescência foi bem-sucedida, tornando-as aptas para os experimentos de co-cultivo subsequentes.

A



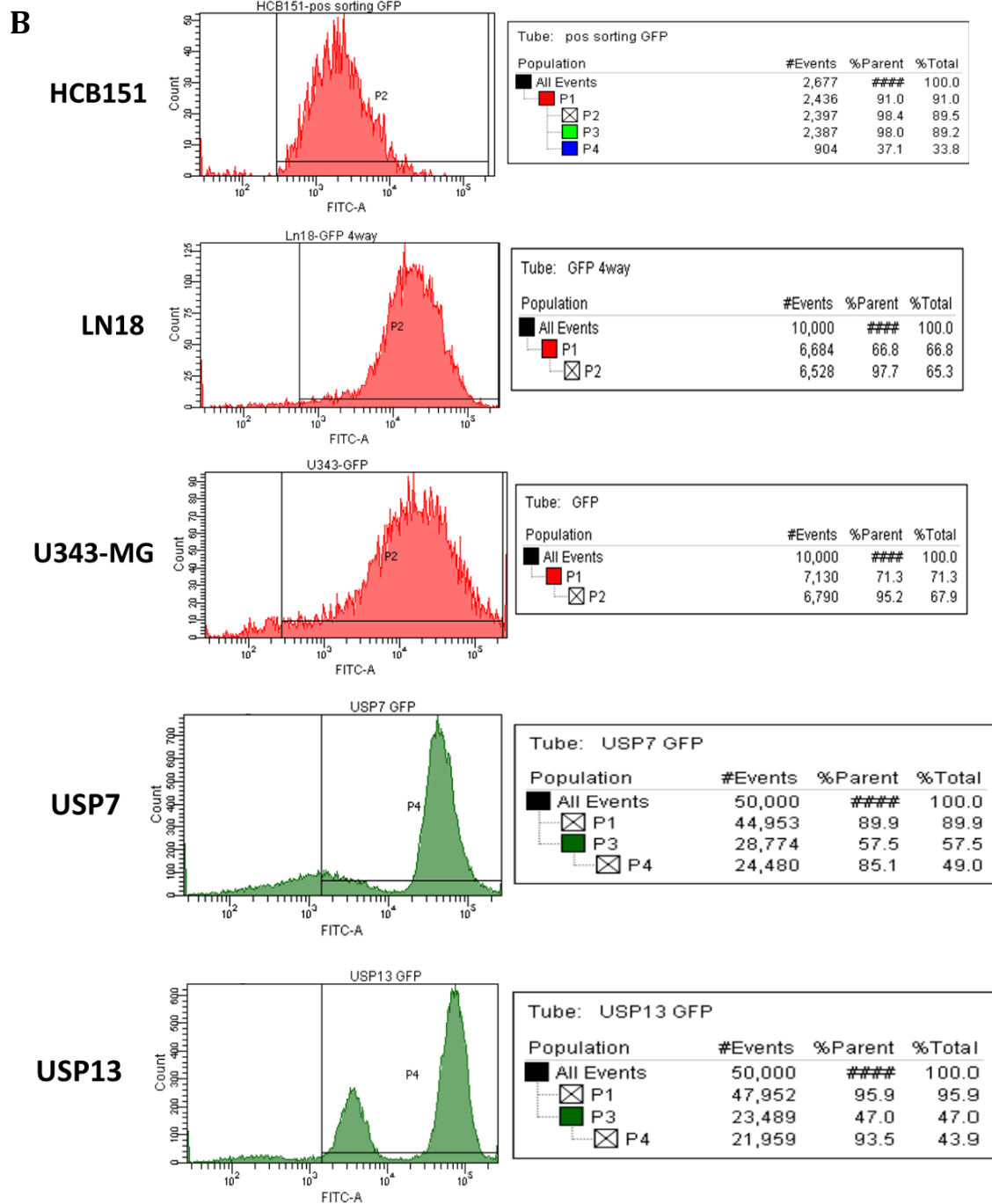


Figura 3 – Confirmação do fenótipo fluorescente das linhagens tumorais HCB151, LN18, U343-MG de GBM, USP7 e USP13 de tumores embrionários do SNC. (A) Fotos em microscopia de fluorescência das linhagens GFP⁺ cultivadas em aderência. Barra de escala = 200µm. (B) Citometria de fluxo das células tumorais modificadas para expressão do GFP.

4.1.2. Confirmação de pluripotência da linhagem de hiPSC F9048

A linhagem de hiPSC F9048, derivada de fibroblastos dermais de doador saudável (MILLER et al., 2017), foi avaliada para confirmação do fenótipo pluripotente com o intuito de validar o seu uso para o protocolo de formação dos organoides cerebrais. Para isso, os marcadores nucleares NANOG, OCT4A e SOX2, além do marcador de superfície celular SSEA-4, genes caracteristicamente expressos em células-tronco (KAMAND et al., 2020), foram avaliados por imunocitoquímica seguida pela detecção por imunofluorescência (IF). Nesta análise, observamos que as colônias de hiPSC apresentaram marcação positiva por IF para as quatro proteínas avaliadas (Figura 4A-D). A pluripotência da linhagem também foi avaliada por RT-qPCR usando primers específicos direcionados aos marcadores OCT4A, NANOG e C-MYC (Tabela 1), utilizando a linhagem de hESC BR6 e a linhagem de linfoblastos imortalizada Jurkat E6 como controles positivo e negativo, respectivamente. As hiPSC apresentaram elevada expressão de OCT4A (80%) e NANOG (110%) e expressão intermediária de C-MYC (39%) em comparação ao controle positivo BR6 (Figura 4E). Mesmo constatando uma expressão de c-Myc menor do que a esperada, considerando (1) que o *C-MYC* é um gene menos específico que os demais da família Myc na geração de hiPSCs (NAKAGAWA et al., 2010; OKITA et al., 2011) e (2) a expressão elevada de OCT4A e NANOG, considerou-se que os resultados obtidos confirmaram o fenótipo pluripotente da linhagem F9048.

A integridade genômica de hiPSCs é de suma importância na utilização dessas células (KUIJK et al., 2020). Dessa forma, além do fenótipo pluripotente, a linhagem F9048 foi avaliada para a presença de mutações genômicas estruturais via MLPA. A classificação das taxas (pico amostra/pico controle) segue o seguinte padrão: Deleção < 0.70 < Equivalência < 1.30 < Ganho. A taxa média da amostra foi de 1.17 e o desvio padrão de 0.06. Logo, o teste confirmou a ausência de alterações estruturais no genoma da F9048 (Figura 4F).

As análises confirmaram o fenótipo pluripotente e a integridade genômica da linhagem F9048, permitindo o início do protocolo de formação dos organoides cerebrais.

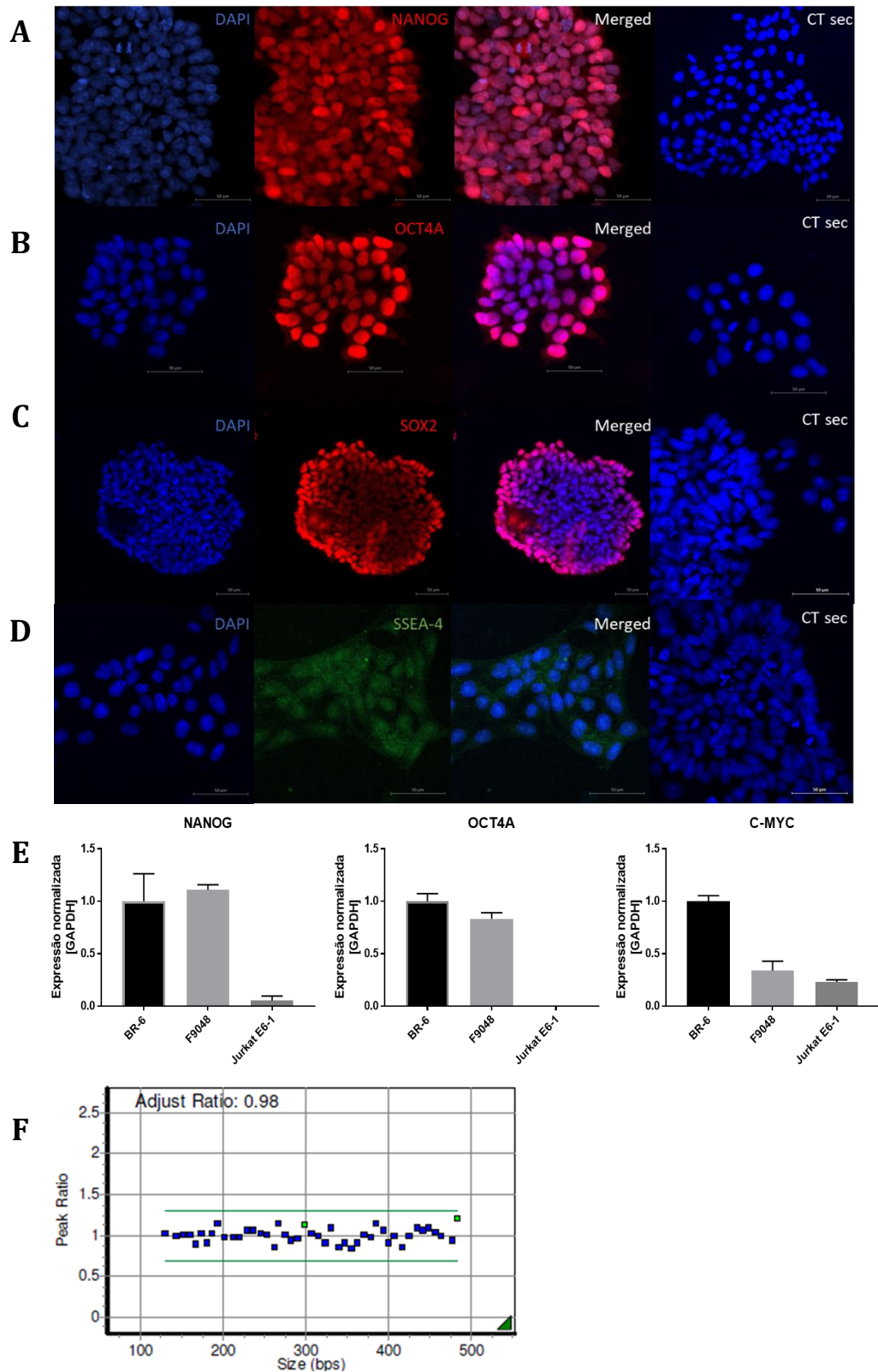


Figura 4 – Caracterização da linhagem F9048 por IF, RT-qPCR e MLPA. Marcação por imunofluorescência para os fatores de pluripotência (A) NANOG, (B) OCT4A, (C) SOX2 e (D) SSEA-4. Barra de escala: 50 μ m. CT sec = controle secundário. (E) Perfil de expressão gênica avaliado por RT-qPCR, normalizado para o GAPDH, dos fatores de pluripotência OCT4A, NANOG e C-MYC na linhagem F9048. Linhagem de hESC BR6 e de linfoblasto T imortalizada Jurkat E6 usadas como

controles positivos e negativos de expressão, respectivamente. A reação de IF foi feita em duplicata e a de RT-qPCR em triplicata. (F) Teste de MLPA indicando valor relativo ao número de cópias das regiões subteloméricas dos 44 cromossomos não-sexuais da linhagem celular F9048.

4.1.3. Organoides cerebrais obtidos assemelham-se a modelos “*whole brain cerebral organoids*”

O primeiro passo para a obtenção do modelo híbrido de co-cultivo foi o desenvolvimento e a maturação de organoides cerebrais. O protocolo utilizado nos experimentos, baseado no método de Lancaster e colaboradores (2013) com modificações, levou à formação de CEs com cerca de 400µm no primeiro dia de cultivo (Figura 5A). A indução de diferenciação neuroectodérmica nos CEs foi evidenciada pela transparência periférica nos modelos, juntamente à manutenção de um centro denso e escuro, após passagem para o meio N2 (Figura 5B). A etapa crítica na diferenciação de organoides cerebrais é o embocamento em matriz extracelular, realizada para fornecer uma estrutura equivalente à membrana basal presente *in vivo* e para permitir a expansão do neuroepitélio em desenvolvimento. Nossos modelos organoides apresentaram *buds* características de expansão de neuroepitélio após a inclusão dos CEs em Matrigel (Figura 5C). A maturação dos organoides seguiu até o dia 40 do protocolo, com modelos apresentando diâmetro médio de 2,8mm, bordas bem definidas e certa variação morfológica (Figura 5D). Como esperado, o método apresentou pequena variabilidade entre organoides de mesma leva e entre diferentes levas, uma característica intrínseca do protocolo para formação de organoides cerebrais.

A caracterização histológica dos organoides foi realizada para analisar a organização e composição tecidual dos modelos gerados. Organoides maduros (40+ dias), com pelo menos 2mm de diâmetro, foram aleatoriamente selecionados para caracterização. A análise por IF revelou a presença de neuroepitélio organizado e cavidades pseudo-ventriculares. Foi observada presença de estrutura similar à ZV populada por CNPs SOX2⁺ da glia radial interna, além de células supostamente da glia radial externa, também SOX2⁺, localizadas fora ZV (Figura 6). A marcação por Doublecortin (DCX) revelou a presença de neurônios/pré-neurônios organizados em estrutura similar a placa cortical, circundando a ZV e as estruturas pseudo-ventriculares (Figura 6). A caracterização de organoides com 90 dias de vida também demonstrou a presença de camadas semelhantes à do cérebro em desenvolvimento, apresentando neurônios TUJ1/β-Tubulina III⁺ (Figura 7), em um epitélio semelhante à placa cortical, circundada por populações de células SOX2⁺ difusas (Figura 7). A caracterização por IF revelou que nossos organoides cerebrais apresentaram organização e composição tecidual similar aos chamados *whole brain organoids* desenvolvidos em estudos prévios

(LANCASTER; KNOBLICH, 2014b; YAKOUB; SADEK, 2018). Ademais, dos 57 organoides gerados no primeiro cultivo, cinco apresentaram células pigmentadas da retina (Figura 7).

Os dados obtidos indicaram que as modificações no protocolo original não afetaram a identidade dos organoides gerados. Uma vez estabelecido o protocolo para geração de organoides cerebrais e confirmada a composição e arquitetura tecidual dos modelos, seguiu-se para o desenvolvimento de modelos destinados a experimentos de co-cultivo com células tumorais.

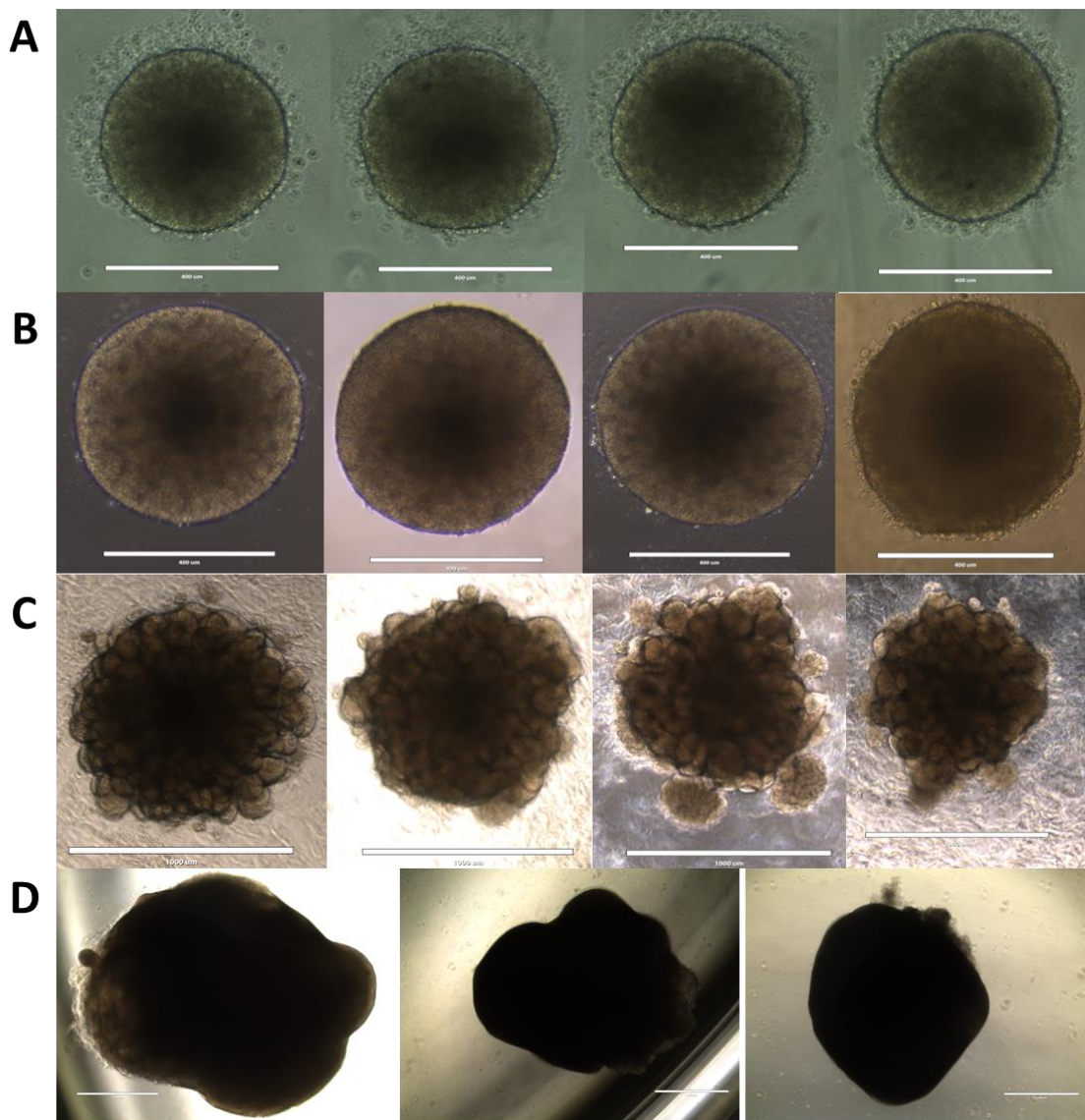
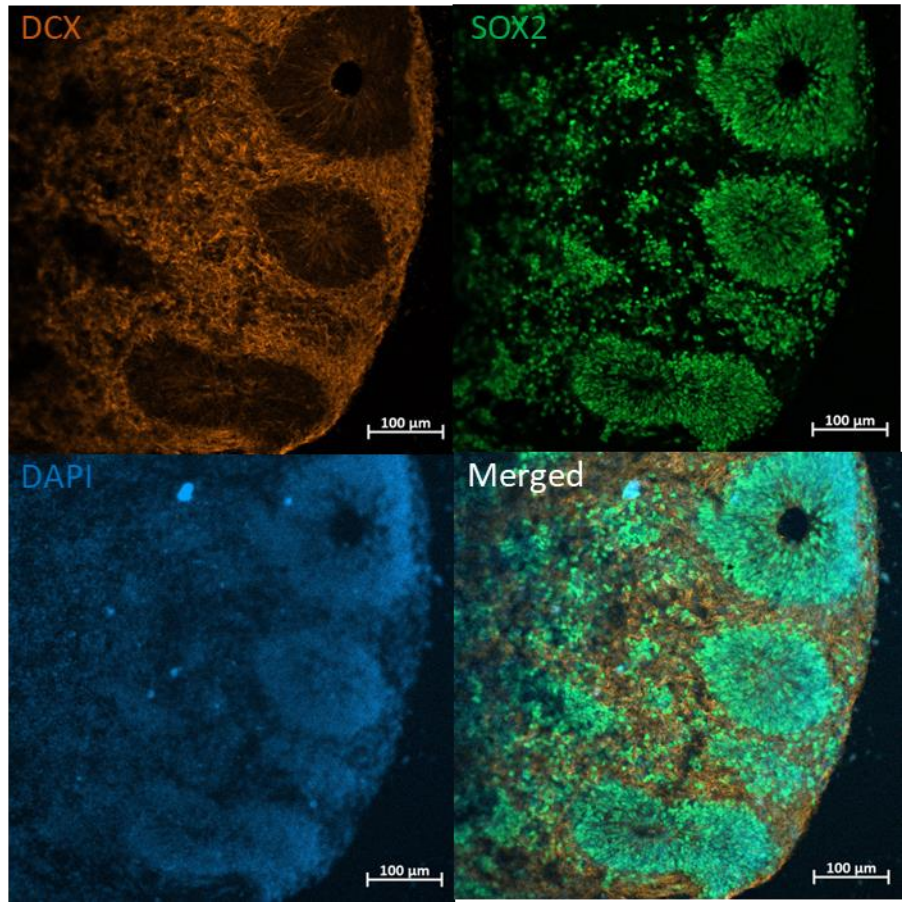
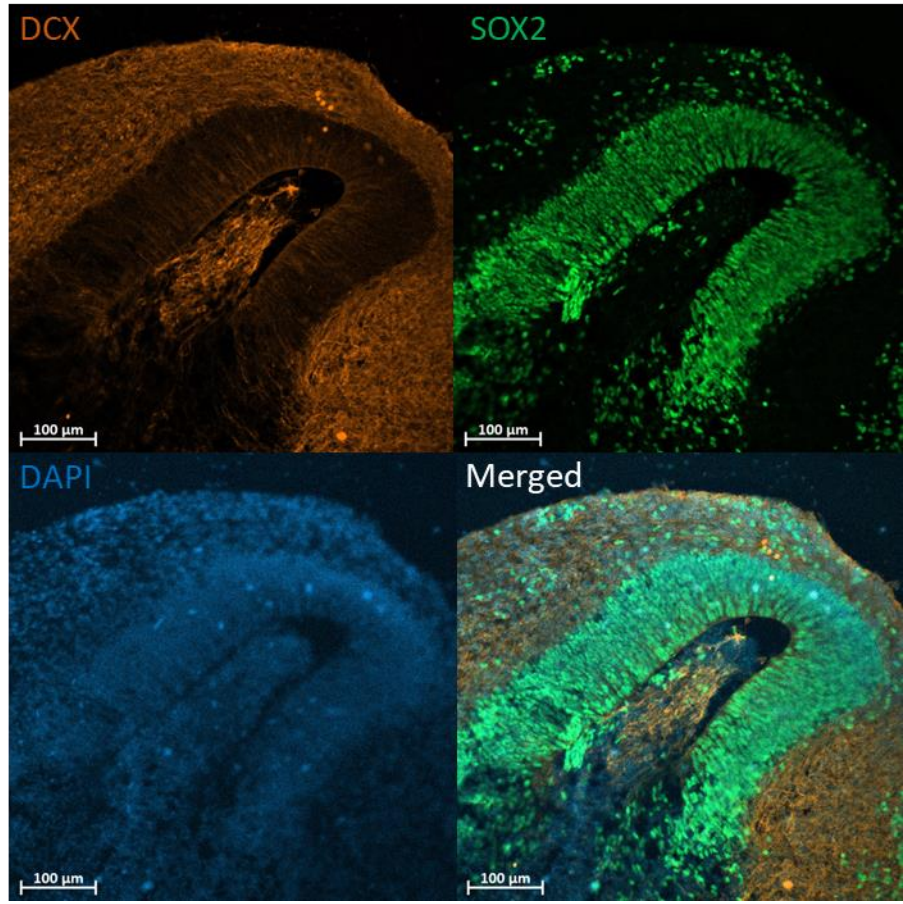


Figura 5 – Fotos em microscopia de luz branca do desenvolvimento de organoides cerebrais. **(A)** Corpos embrioides de F9048 um dia após plaqueamento. **(B)** Denotação de diferenciação neuroectodérmica em CEs após passagem para o meio de indução neural. **(C)** Organoides sob expansão do neuroepitélio após emblocamento em Matrigel. **(D)** Organoides cerebrais maduros, com 40-60 dias de vida, apresentando diâmetro médio de 2,8mm. Barras de escala: 400µm (A e B), 1000µm (C e D).



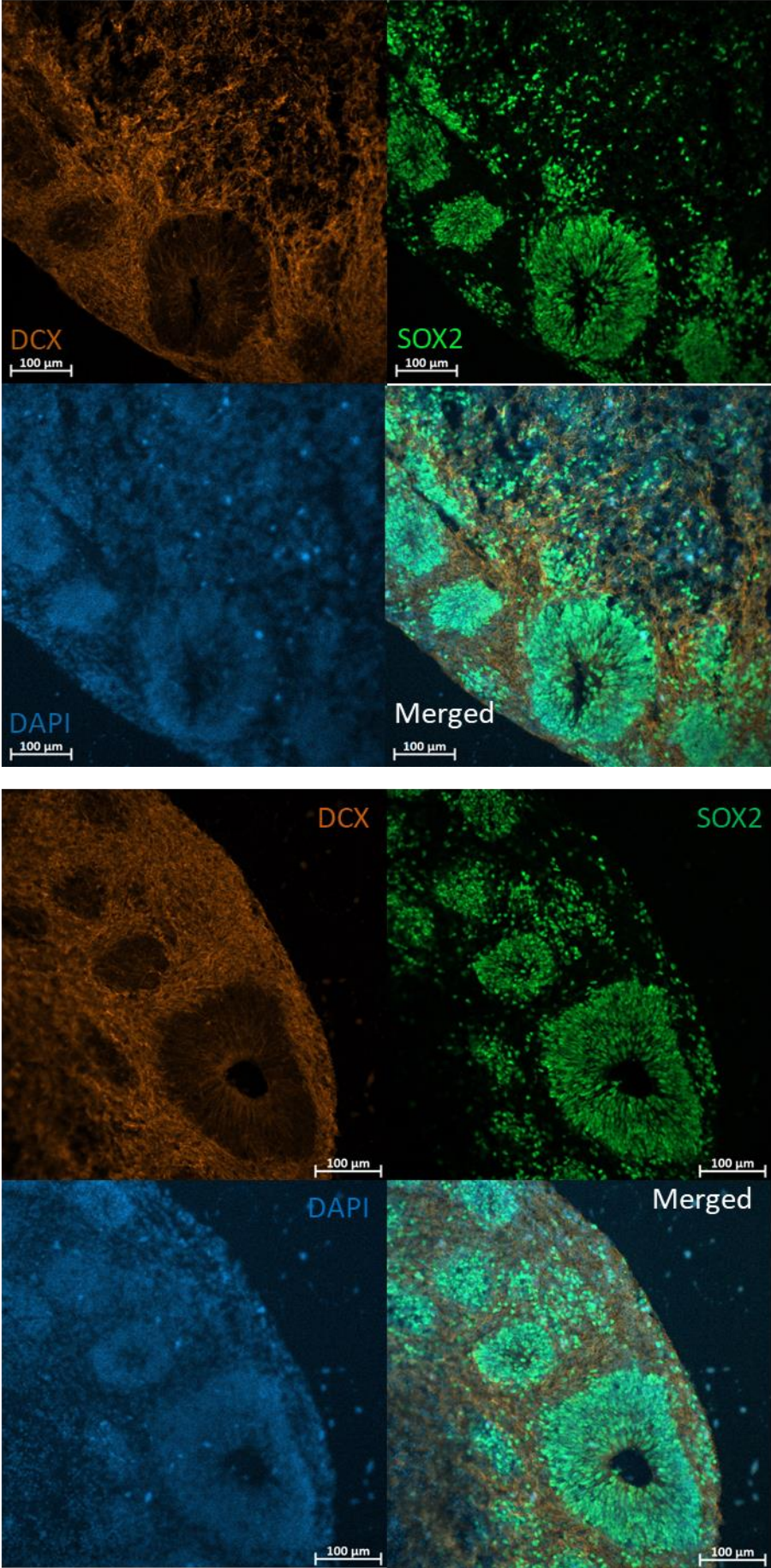
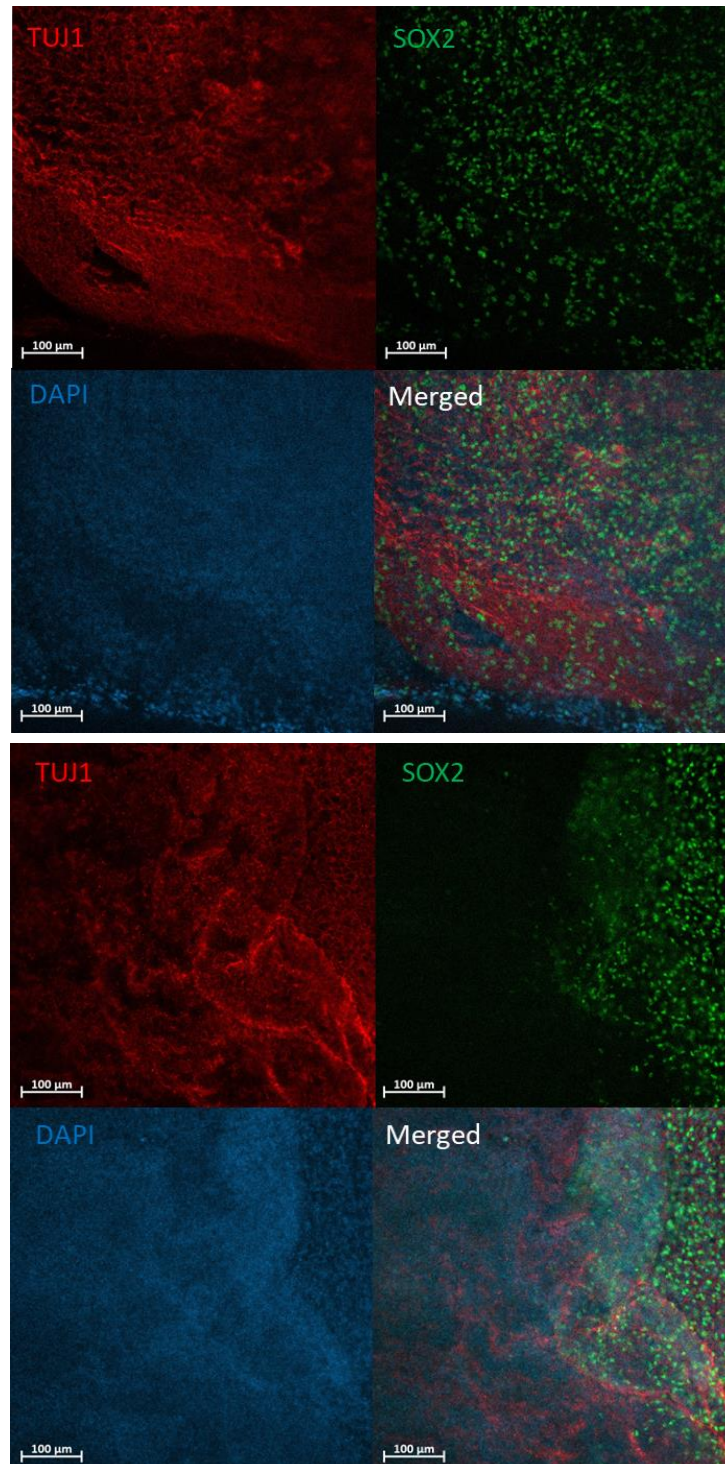


Figura 6 – Caracterização por IF de organoides cerebrais maduros. A imunomarcção de SOX2 e Doublecortin (DCX) de organoides com +40 dias revelou a presença de zonas ventriculares/subventriculares, compostas por NPCs SOX2⁺, e placas corticais compostas por neurônios/pré-neurônios DCX⁺, organizadas em torno de cavidades pseudo-ventriulares. Barras de escala: 100 μ m.



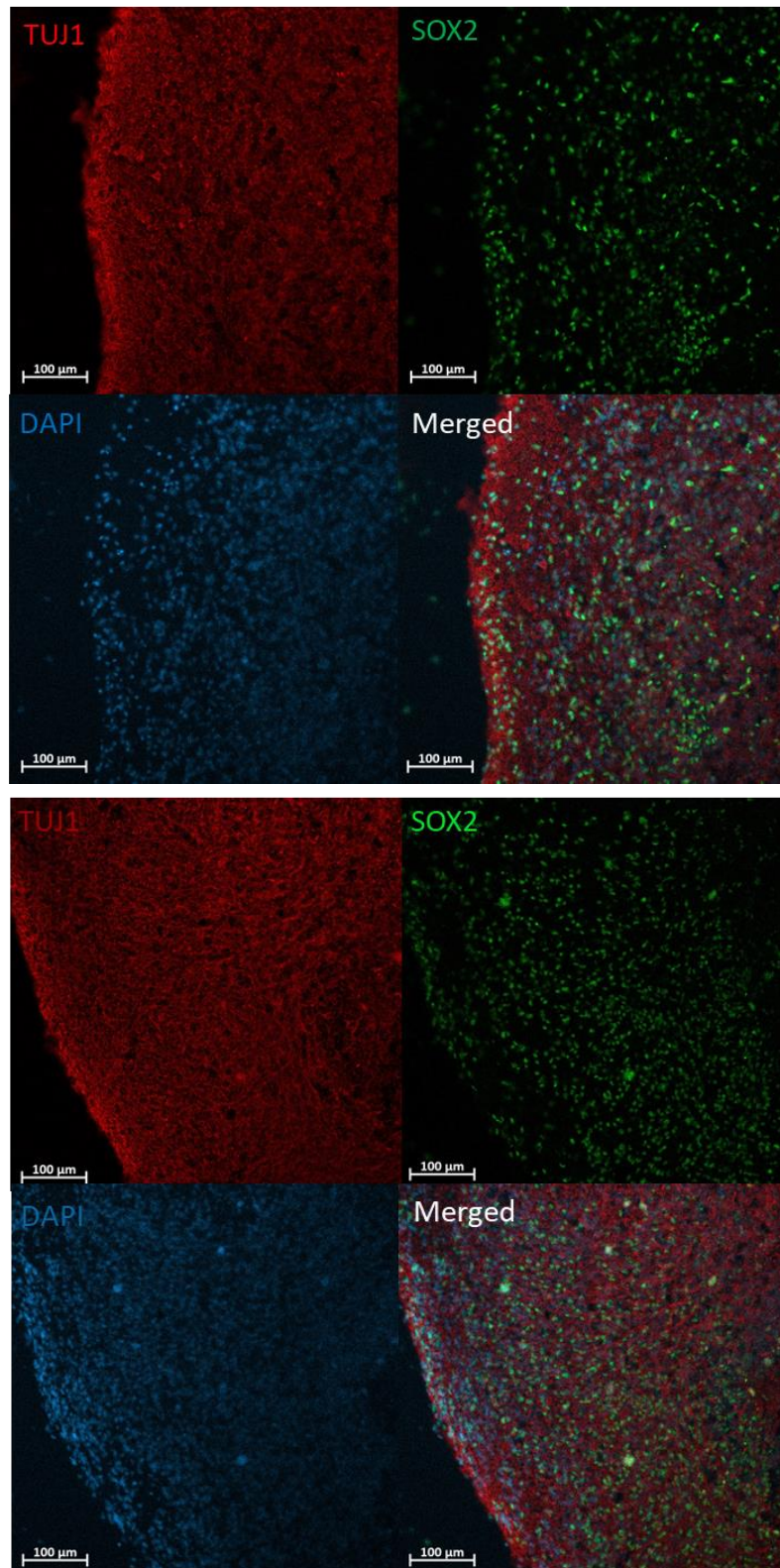


Figura 7 – Caracterização por IF de organoides cerebrais de 90 dias. A marcação com SOX2 e TUJ1/ β -Tubulina III revelou um epitélio composto de neurônios TUJ1⁺ circundado por uma população de células SOX2⁺ difusas. Barras de escala: 100 µm.

4.2 O co-cultivo celular permitiu adesão e dispersão de células tumorais GFP⁺ em organoides cerebrais

O estabelecimento do modelo híbrido organoide-tumor foi o aspecto mais desafiador do presente estudo. Inicialmente, buscamos criar um modelo de co-cultivo de tumoresferas GFP⁺ com organoides cerebrais maduros. Contudo, essa estratégia mostrou-se ineficiente devido, entre outros fatores, à baixa taxa de adesão de tumoresferas e da alta frequência de desacoplamento das esferas após manipulações rotineiras, como troca de meio de cultura (dados não mostrados). Dessa forma, optou-se pela formação de modelo de co-cultivo utilizando células tumorais individuais em suspensão.

No total, foram utilizados n=255 organoides em dois experimentos de co-cultivo independentes. No primeiro (n=108), os modelos foram divididos em 4 grupos: Controle (sem adição de células tumorais), HCB151, U343-MG e LN18 (n=27/grupo). No segundo (n=147) foram divididos em 5 grupos: Controle (n=15), LN18, U343-MG, USP7 e USP13 (n=33/grupo). Após os dados preliminares e do primeiro co-cultivo, e baseado em nossos trabalhos recentemente publicados (KAID et al., 2018; FERREIRA et al., 2021), as linhagens USP7 e USP13 foram incluídas no estudo como um “controle positivo” à suscetibilidade do efeito oncolítico do ZIKV. A linhagem HCB151 não foi incluída no segundo experimento de co-cultivo pois (1) não havia organoides suficientes para suprir todas as análises em triplicata de 6 grupos e (2) as células HCB151 possuem um crescimento mais lento em cultura, por conta disso a quantidade de células foi insuficiente no momento do ensaio de co-cultivo. Por consequência da pequena quantidade de replicatas no grupo HCB151, as análises quantitativas dessa linhagem não foram realizadas em triplicata. Por esse motivo não são apresentados resultados quantitativos relativos ao grupo de co-cultivo HCB151, apenas dados qualitativos.

Em ambos os experimentos seguiu-se a mesma linha do tempo: fotos em microscopia de fluorescência foram tiradas 48h, 72h, 7 dias e 14 dias pós co-cultivo (dpc-c), e dissociação de modelos e análise por citometria de fluxo realizadas em 7 e 14 dpc-c (Figura 2).

O primeiro aspecto observado na formação dos organoides híbridos foi a variação da quantidade de células tumorais aderidas aos modelos após as 48h iniciais. Essa variância se mostrou presente tanto entre réplicas dentro dos grupos quanto entre as diferentes linhagens tumorais co-cultivadas (Figura 8A). As imagens obtidas em 72h pós co-cultivo mostraram sinais de invasão do tecido organoide pelas células tumorais (Figura 8B). As células GFP⁺ de todas as linhagens tumorais demonstraram capacidade de dispersão após adesão aos organoides, característica evidenciada principalmente nas linhagens de tumores embrionários USP7 e USP13 e na linhagem de GBM HCB151, que já haviam ocupado boa parte da superfície dos

organoides após 72 horas de co-cultivo (Figura 8B).

Após 7 dias de co-cultivo observou-se a ocupação do tecido neural em diferentes proporções entre as linhagens co-cultivadas (Figura 8C). Essa característica se deu, possivelmente, devido a variabilidade de células iniciais aderidas, citada anteriormente, além das distintas capacidades de proliferação e migração celular entre as linhagens co-cultivadas. Foi observado o estabelecimento de estruturas tumor-semelhantes compostas por uma massa celular densa emitindo protusões invasivas no tecido organoide circundante (Figura 8C). Essa característica ficou denotada principalmente na linhagem U343-MG em 7 dpc-c. A presença de estruturas similares foi observada no grupo USP7 aos 14 dpc-c. Além disso, a linhagem USP13 apresentou notáveis sinais de dispersão celular no tecido nesse *timepoint* (Figura 8D).

A quantificação absoluta do número de células GFP⁺ revelou que apenas uma pequena parcela das 100.000 células tumorais adicionadas perdurou nos organoides em 7 dpc-c. Esse valor foi, em média, 6640 no grupo LN18, 8003 no U343-MG, 5760 no USP7 e 5170 no USP13 (Figura 9A). Aos 14 dpc-c a quantidade absoluta de células GFP⁺ nos grupos LN18, USP7 e USP13 (3401, 2834 e 4041, respectivamente) foi em média menor do que em 7 dpc-c, um dado que reflete a variabilidade inicial de células aderidas aos organoides. Contudo, a análise da composição dos modelos em 7 e 14 dpc-c mostrou aumento da proporção de células tumorais ao longo do tempo em todos os grupos (Figura 9B). O grupo LN18 apresentou a elevação mais pronunciada, partindo de uma média de 3% em 7 dpc-c para 9,1% em 14 dpc-c, seguida de USP7 (0,6% para 2,6%), USP13 (0,7% para 2,4%) e U343-MG (2,3% para 3,3%).

Os experimentos de co-cultivo levaram à obtenção de modelos híbridos com quantidades variadas de células tumorais GFP⁺ aderidas aos organoides. Apesar dessa variação e das diferentes dinâmicas de ocupação tecidual, as linhagens tumorais co-cultivadas foram capazes de elevar sua proporção sobre as células normais ao longo do tempo. Os resultados demonstram a aptidão dos modelos organoides para o estabelecimento e a progressão tumoral, permitindo o estudo de intervenções contra o GBM *in vitro*.

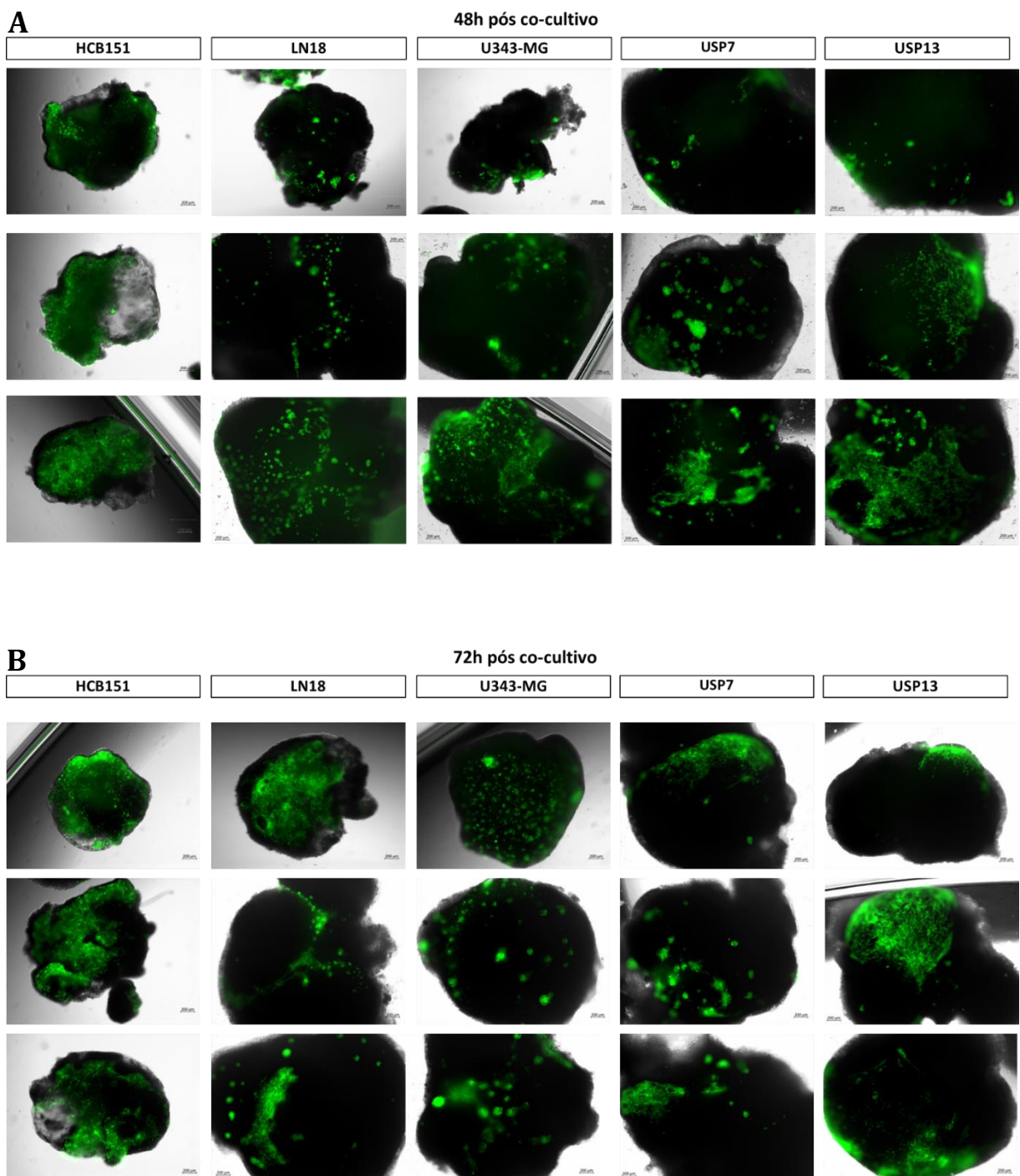
4.2.1. Invasão de células tumorais em organoides cerebrais

A fim de avaliar a ocorrência de invasão pelas células tumorais no tecido neural, os organoides co-cultivados foram incubados com DAPI e analisados em microscopia confocal pela ferramenta *z-stack*. Esse recurso permite a aquisição de imagens multidimensionais de tecidos inteiros, ao realizar fotos de segmentos sequenciais ao longo dos eixos do tecido.

As fotos em *z-stacking* foram adquiridas nos modelos aos 14 dpc-c. Ao menos 16 *slices* foram adquiridas por organoide, e imagens em *orthogonal view* do eixo central dos modelos

foram geradas. As análises permitiram a constatação de que tanto as linhagens de GBM HCB151, LN18 e U343-MG, quanto as linhagens de tumores embrionários do SNC USP7 e USP13 haviam invadido o interior dos organoides cerebrais após 14 dias de co-cultivo (Figura 10).

Os resultados obtidos demonstraram que o modelo de co-cultivo desenvolvido no presente estudo forneceu uma plataforma celular *in vitro* permissiva à invasão de organoides cerebrais por células tumorais de GBM, Meduloblastoma e AT/RT.



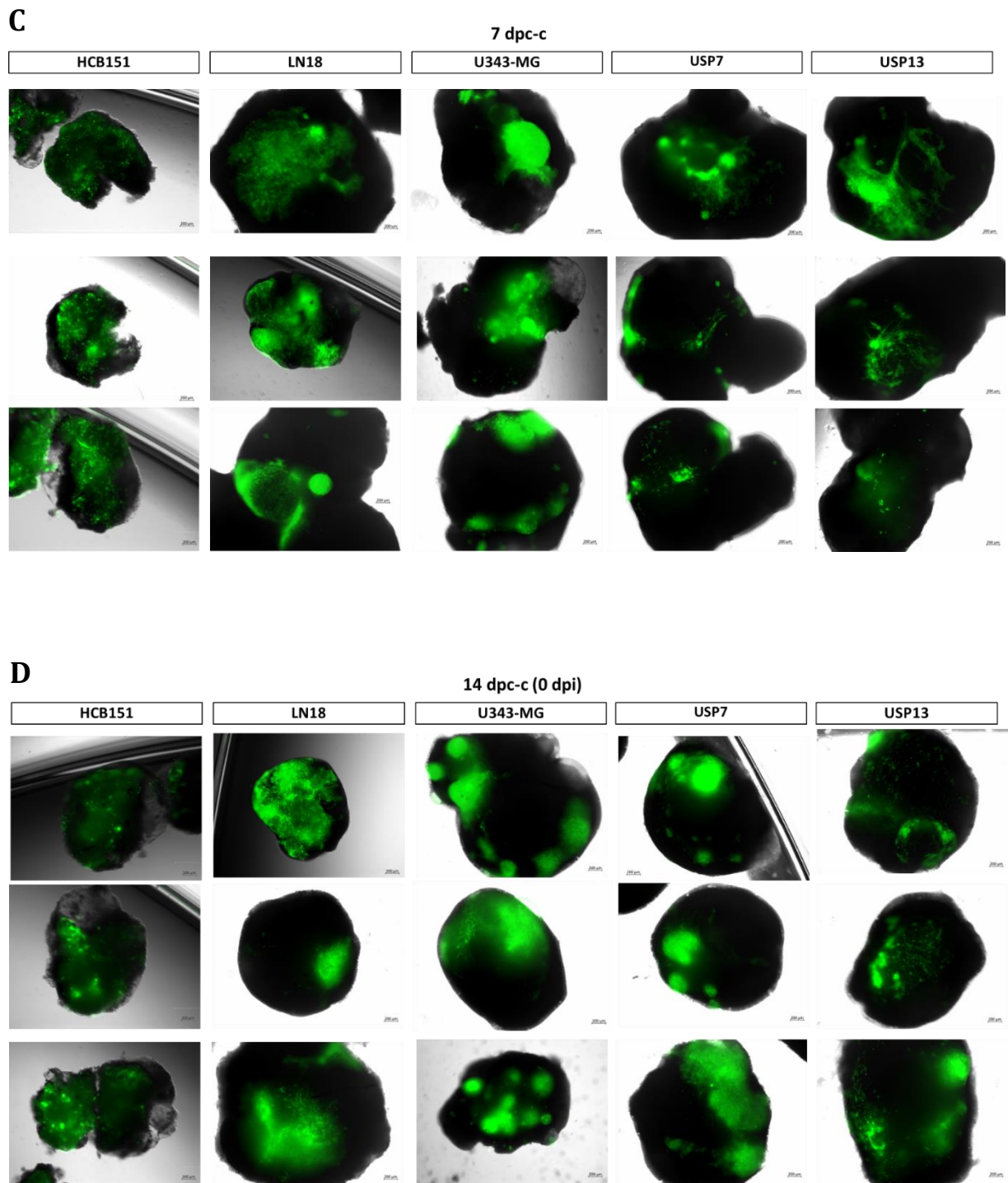


Figura 8 – Progressão tumoral das linhagens GFP⁺ co-cultivadas em organoides cerebrais maduros. Fotos em microscopia de fluorescência dos grupos de co-cultivo HCB151, LN18, U343-MG, USP7 e USP13. São mostradas imagens representativas obtidas em (A) 48 horas, (B) 72 horas, (C) 7 dias e (D) 14 dias pós co-cultivo. Barra de escala = 200µm. Dpc-c = dias pós co-cultivo.

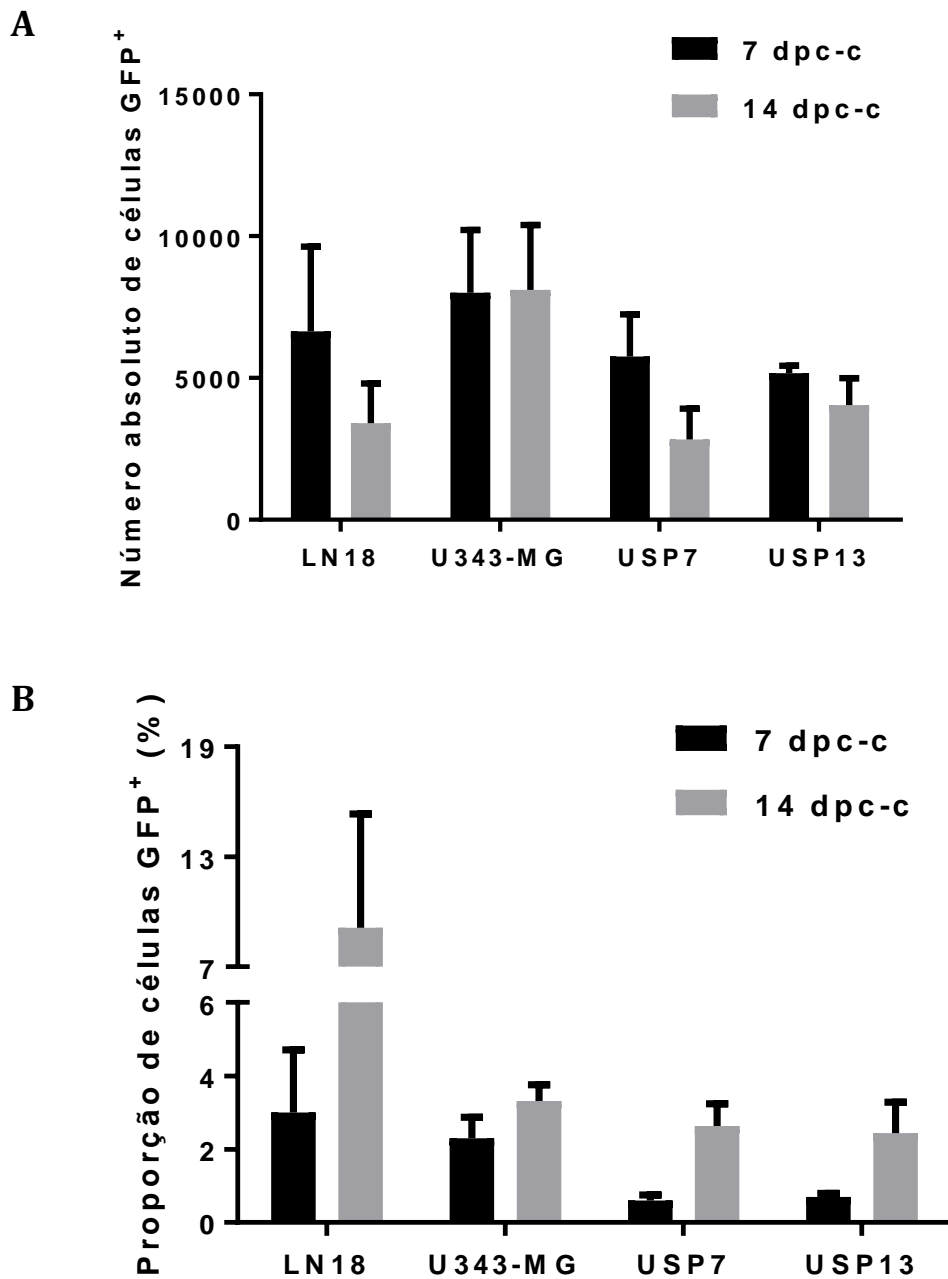


Figura 9 – Conteúdo celular de organoides co-cultivados acessado por citometria de fluxo em 7 e 14 dpc-c. **(A)** Quantificação absoluta de células GFP⁺ em organoides híbridos dos grupos LN18, U343-MG, USP7 e USP13. **(B)** Proporção de células tumorais (GFP⁺) por células normais (GFP⁻) nos grupos de organoides híbridos ao longo do período de co-cultivo. Todas as análises foram feitas em triplicata em cada ponto de tempo.

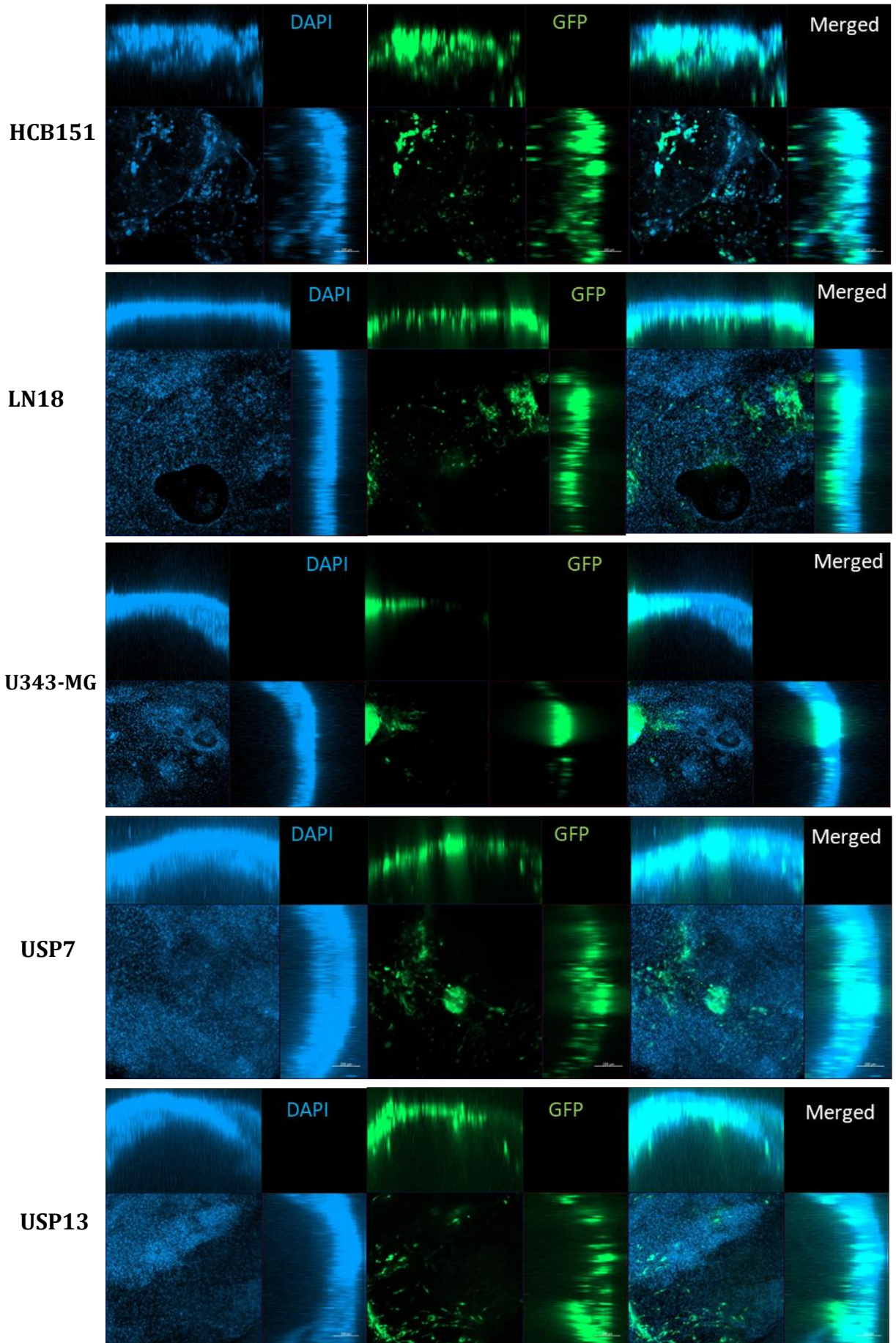


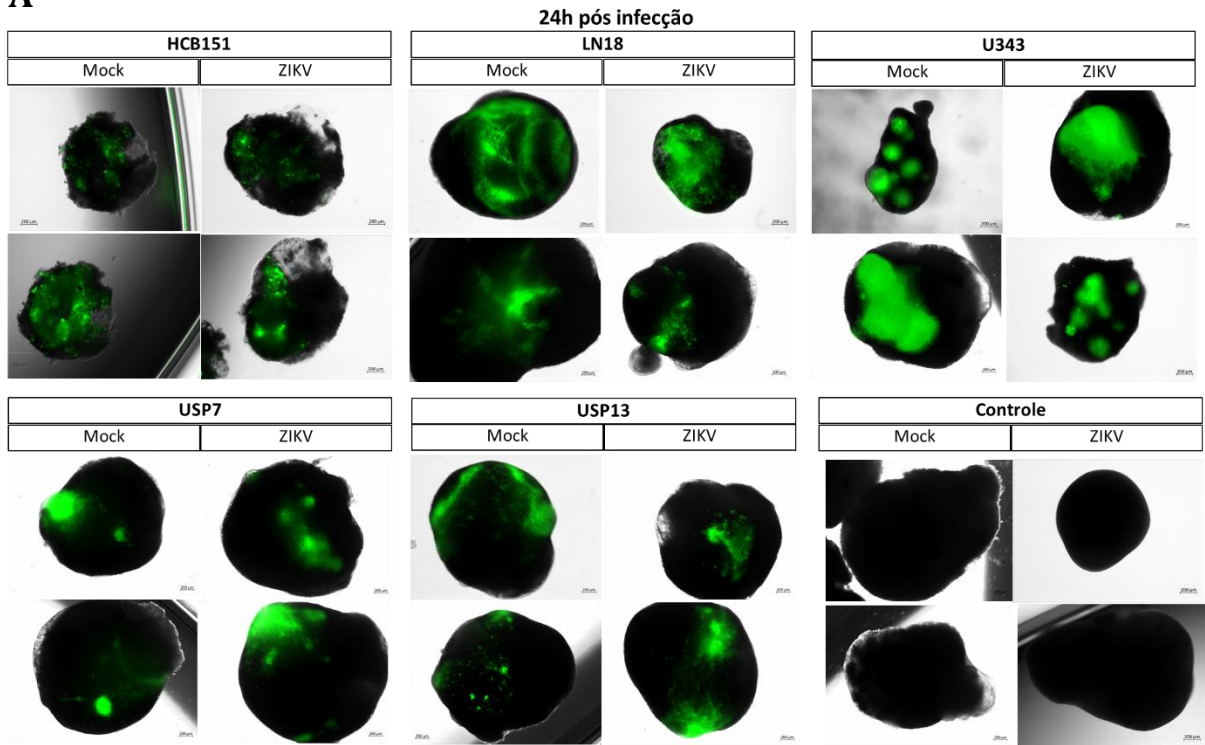
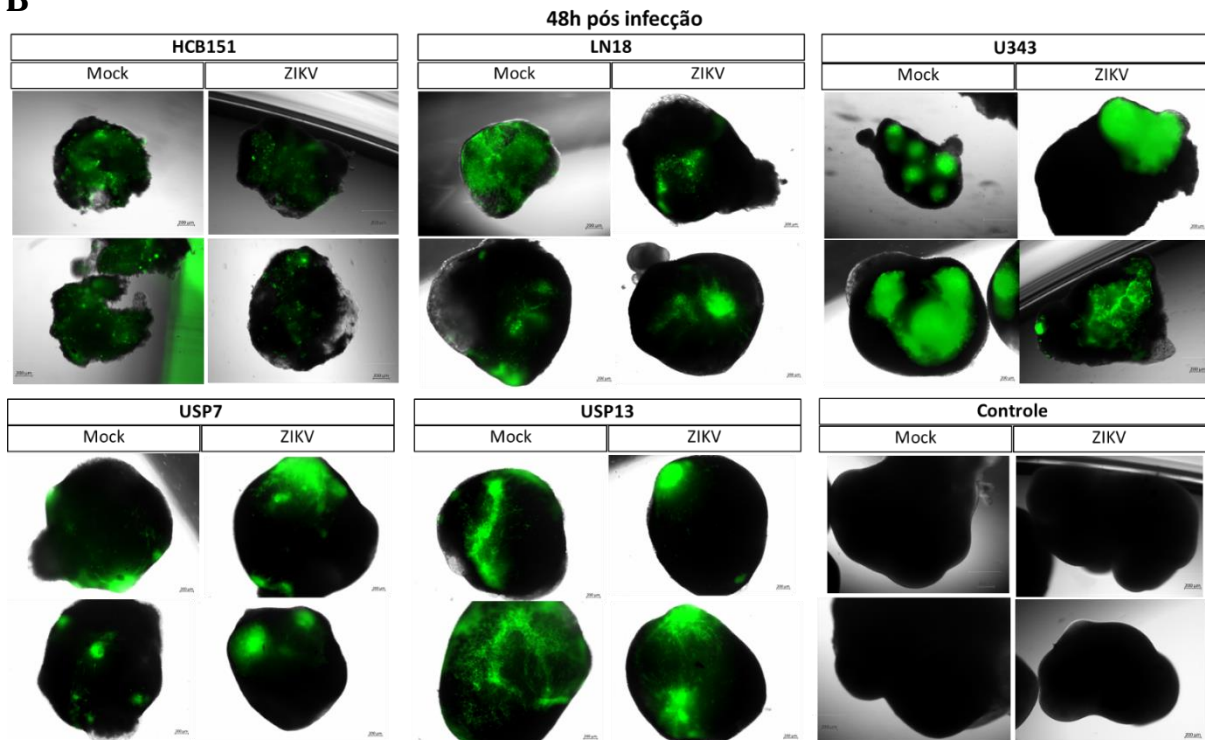
Figura 10 – Fotos em *z-stacking* de organoides inteiros co-cultivados. Imagens em *orthogonal view* da região central de organoides co-cultivados revela a presença de células tumorais no interior do tecido. As imagens foram obtidas aplicando a configuração *Maximum intensity projection* (MIP) do software Zen. Barra de escala = 200 μ m.

4.3 Avaliação do efeito oncolítico do ZIKV em modelo de co-cultivo 3D

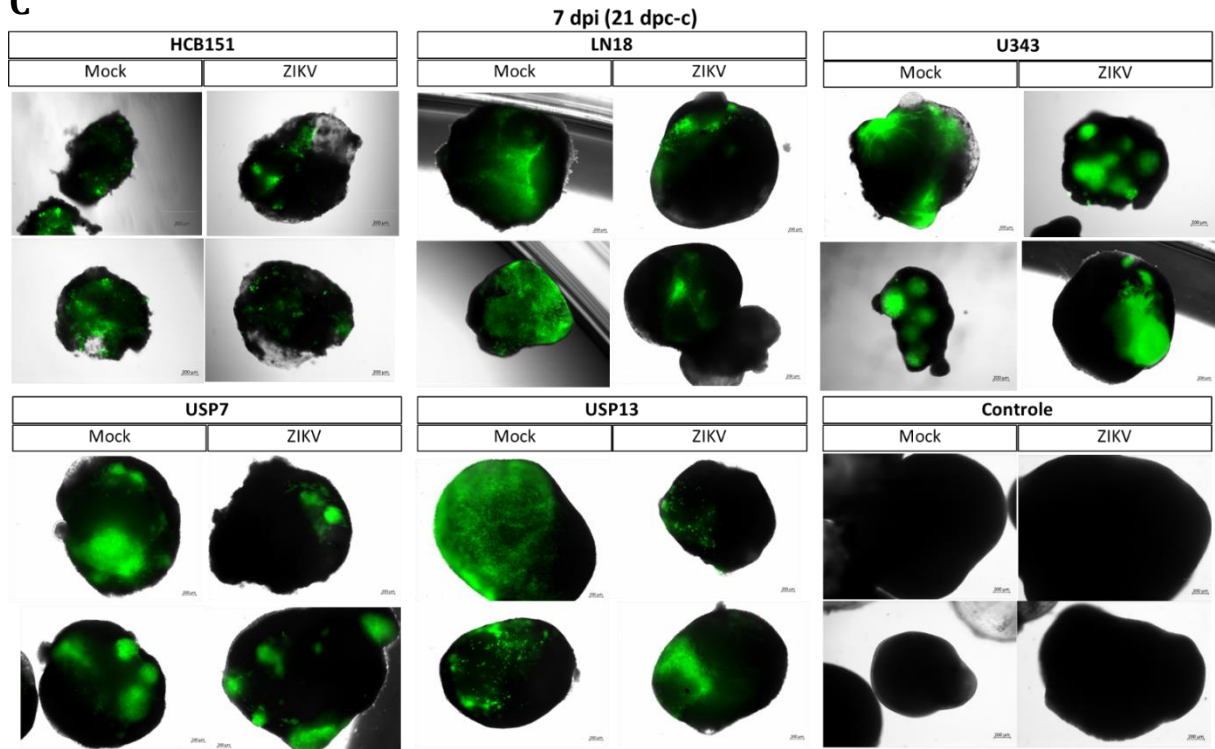
Para avaliar o potencial oncolítico do ZIKV em linhagens tumorais de GBM, após 14 dias da adição de células tumorais aos modelos organoides (14 dpc-c), os grandes grupos de co-cultivo Controle, HCB151, LN18, U343-MG, USP7 e USP13 foram divididos em subgrupos *mock* e ZIKV. Após a infecção, fotos em microscopia de fluorescência adquiridas em 24h e 48h pós-infecção (pi) não denotaram redução da massa celular GFP⁺ entre os modelos infectados em comparação aos *mocks* em nenhum dos grupos (Figura 11A-B).

Entretanto, análises quantitativas por citometria de fluxo captaram diferenças significativas. Aos 7 dpi, foi observada redução significativa ($p < 0,001$) da proporção de células tumorais no grupo LN18 ZIKV (2,3%) em comparação ao LN18 *mock* (3,96%) (Figura 12A). O grupo U343-MG ZIKV apresentou uma proporção menor de células GFP⁺ (2,53%) em comparação ao grupo U343-MG *mock* (3,16%), porém essa diferença não apresentou significância estatística (Figura 12B). Curiosamente, os grupos USP7 e USP13 infectados não apresentaram redução da porcentagem de células GFP⁺ em 7 dpi em comparação aos respectivos *mocks* (Figura 12C-D). Duas semanas após a infecção viral, todos os grupos, com exceção de USP7, apresentaram proporção menor de células GFP⁺ nos organoides infectados em comparação aos *mocks* (Figura 12). Essa diferença foi significativa nas linhagens U343-MG ($p < 0,01$) (Figura 12B) e USP13 ($p < 0,01$) (Figura 12D). Imagens representativas em microscopia de fluorescência dos grupos em todos os *timepoints* são apresentadas na Figura 11.

A fim de comparar o efeito do ZIKV entre os diferentes tipos tumorais, as proporções celulares GFP⁺ foram agrupadas em GBM (LN18 + U343) e tumores embrionários (TE, USP7 + USP13) e comparadas nos dois pontos de tempo (Figura 13). Não foi observada diferença significativa em nenhuma das comparações realizadas, indicando que o ZIKV possui um efeito semelhante na proporção de células de GBM e de tumores embrionários do SNC nos nossos modelos de co-cultivo.

A**B**

C



D

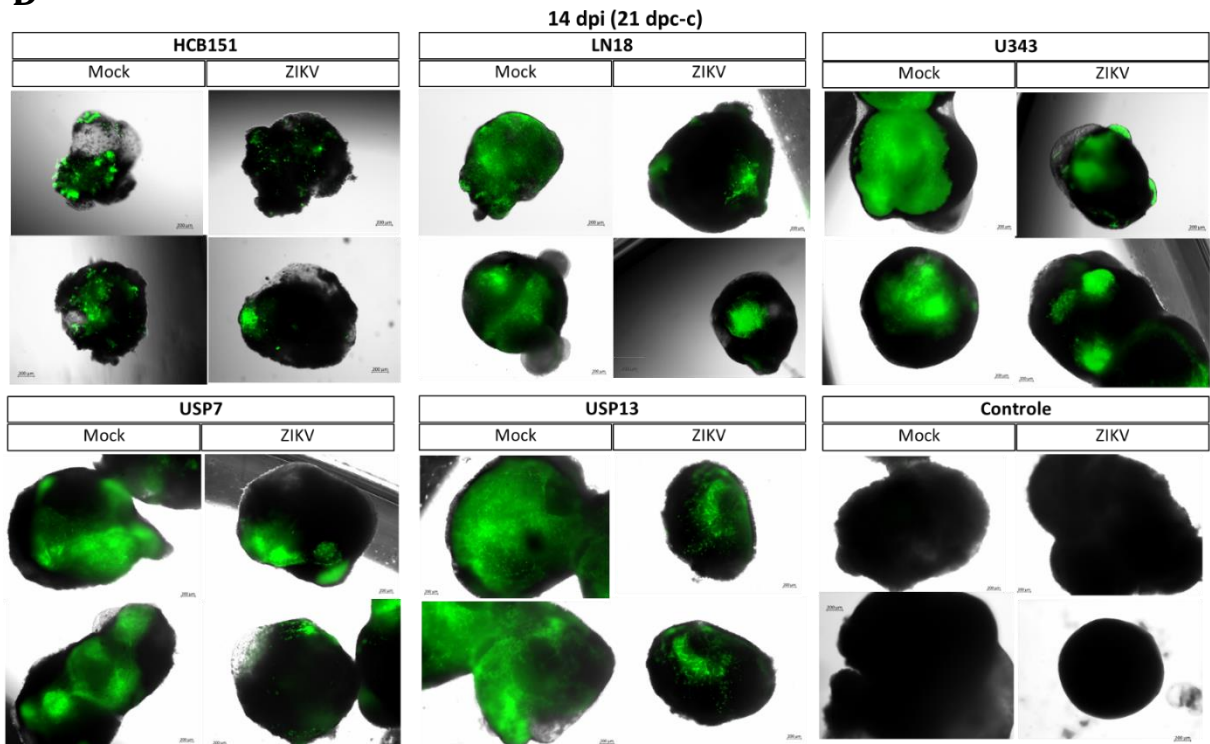


Figura 11 – Microscopia de fluorescência de organoides controles e co-cultivados, *mocks* e infectados com ZIKV, ao longo de duas semanas. São apresentadas imagens representativas dos grupos Controle, HCB151, LN18, U343-MG, USP7 e USP 13 nos pontos temporais (A) 24h pós-infecção, (B) 48 horas pós-infecção, (C) 7 dpi e (D) 14 dpi. Dpi=dias pós-infecção. Barra de escala=200µm.

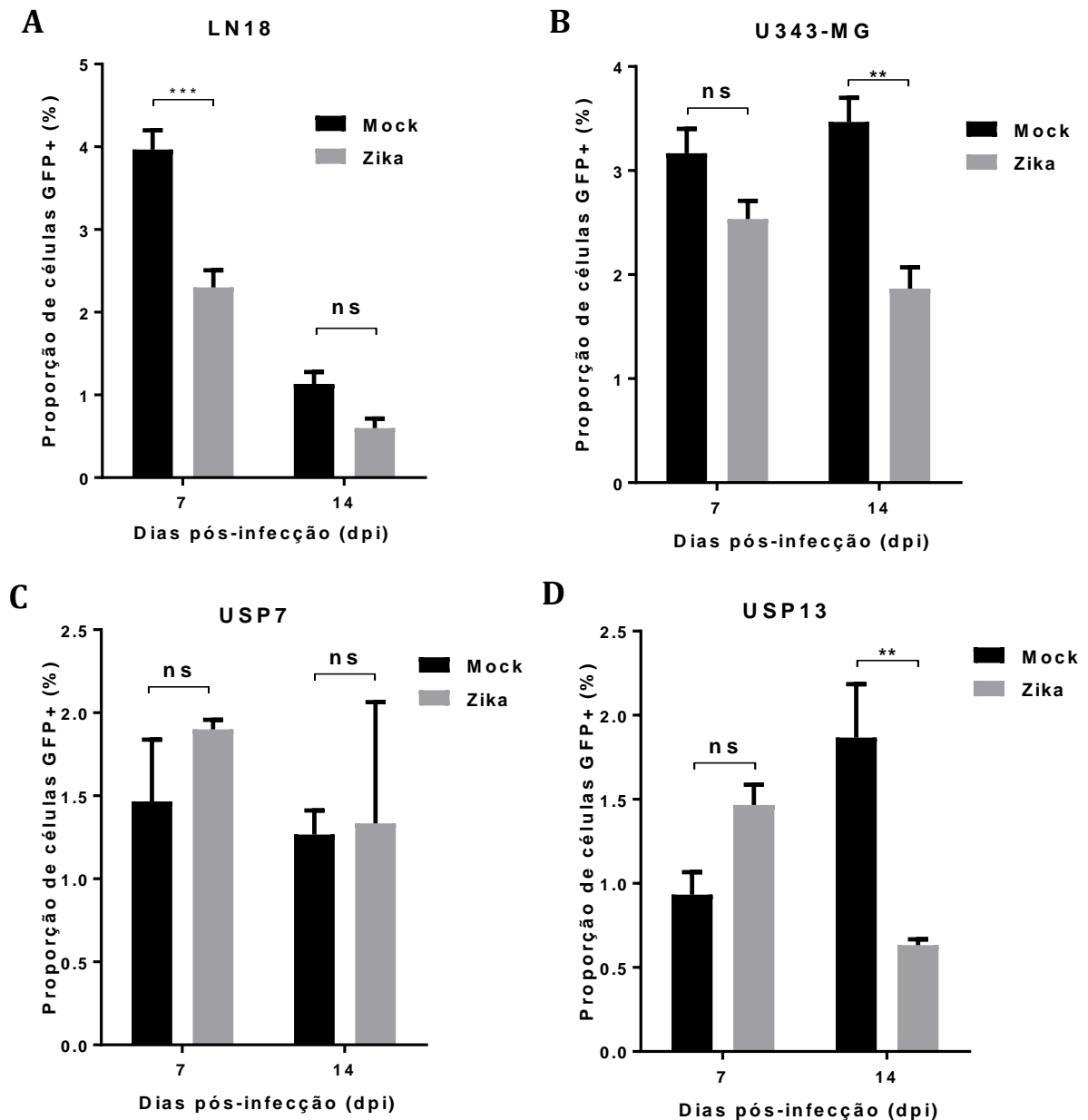


Figura 12 – Efeito da infecção por ZIKV na proporção de células tumorais em organoides co-cultivados. Foi observada redução significativa da porcentagem de células GFP⁺ nos co-cultivos de GBM infectados por ZIKV **(A)** LN18 em 7 dpi, e **(B)** U343-MG em 14 dpi. Na linhagem de AT/RT **(C)** USP7 não houve redução da proporção de células tumorais no grupo infectado. A linhagem de meduloblastoma **(D)** USP13 apresentou redução em 14 dpi no subgrupo ZIKV em comparação ao *mock*. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$. ns=não significativo.

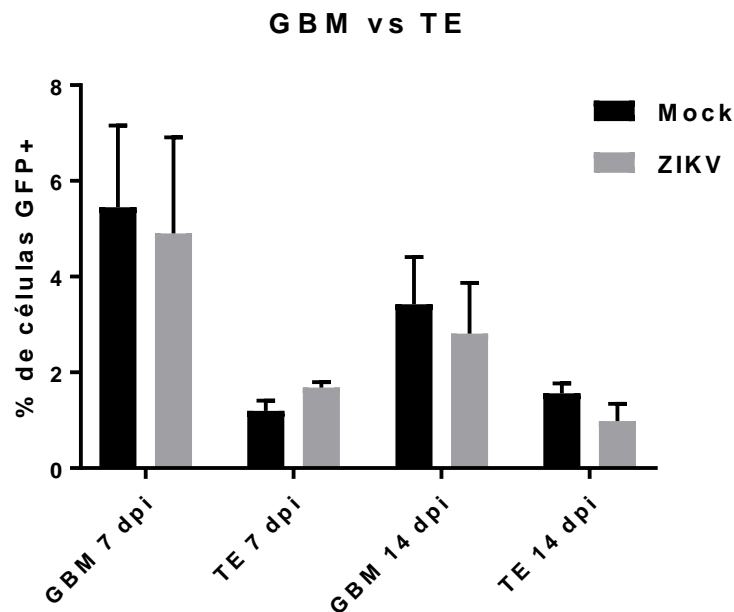


Figura 13 – Comparação das proporções de células tumorais entre os grupos GBM e Embrionários após infecção por ZIKV. Não houve diferença do efeito oncolítico viral quando foram comparadas as proporções agrupadas das linhagens de GBM e de tumores embrionários do SNC. TE=tumores embrionários. Dpi=dias pós infecção.

A presença de partículas virais infecciosas nos sobrenadantes dos grupos foi avaliada pelo ensaio de PFU (Figura 14). O grupo Controle infectado não apresentou resultados positivos no PFU de 7 dpi, diferentemente do ensaio em 14 dpi, quando foi detectada uma média de 633 PFU/mL nos sobrenadantes Controle ZIKV (Figura 14). Foi confirmada a presença de partículas virais infecciosas nos sobrenadantes de todos os grupos de co-cultivo infectados, tanto em 7 quanto em 14 dpi, sendo que essa concentração foi mais alta uma semana pós-infecção em todos os grupos (Figura 14). Curiosamente, USP7 foi o grupo que apresentou a maior carga viral infecciosa em ambos os *timepoints*, com uma média de 22766 PFU/ml em 7 dpi e 1267 PFU/ml em 14 dpi.

A concentração do material genético viral foi determinada por RT-qPCR após uma e duas semanas de infecção (Figura 15). Nessa análise, o grupo Controle ZIKV apresentou cópias virais tanto em 7 dpi (917 cópias/ μ l) quanto em 14 dpi (292 cópias/ μ l). Em todos os grupos de organoides contendo células tumorais foi detectada uma quantidade maior de cópias virais em comparação ao Controle (Figura 15). Entre os grupos de organoides híbridos, LN18 apresentou a maior concentração (38817 cópias/ μ l) e U343-MG a menor (6166 cópias/ μ l) em 7 dpi. Interessantemente, USP7 apresentou a maior concentração de cópias virais em 14 dpi, com uma média de 106667 cópias/ μ l. O grupo de co-cultivo com menor concentração neste *timepoint* foi U343-MG, com 16343 cópias/ μ l.

Com uma exceção, todos os subgrupos de co-cultivo infectados com ZIKV, nos dois pontos temporais avaliados, apresentaram concentração de cópias virais significativamente maior do que o Controle não-híbrido infectado. A exceção foi o subgrupo U343-MG ZIKV em 7 dpi, que apesar de também ter apresentado concentração mais elevada, a diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 15).

Os dados obtidos permitiram constatar que a infecção por ZIKV foi capaz de reduzir a proporção celular de duas linhagens de GBM e de uma linhagem de Meduloblastoma em organoides cerebrais no período de duas semanas. Foi observada uma capacidade limitada de multiplicação viral em modelos organoides isolados, enquanto em organoides híbridos contendo células tumorais de GBM, AT/RT e Meduloblastoma houve uma produção significativamente maior de cópias virais do ZIKV *in vitro*.

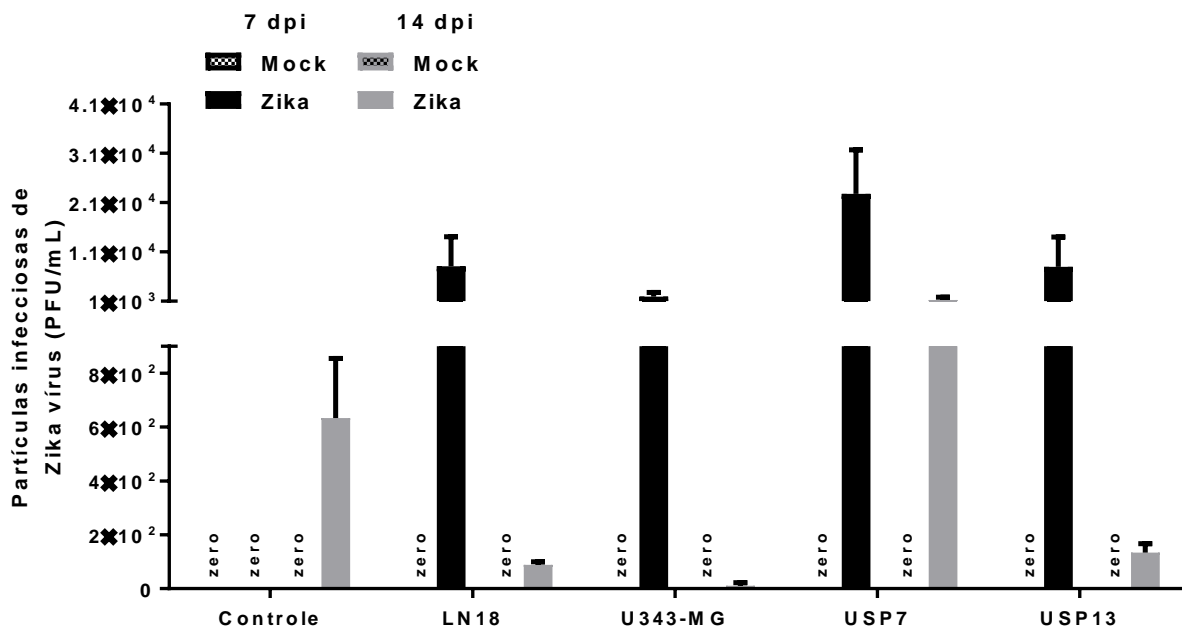


Figura 14 – Ensaio de PFU com sobrenadantes dos grupos de co-cultivo e controles. Em 7 dpi, o número de partículas virais infecciosas foi maior para todos os grupos de co-cultivo infectados, e não foram detectadas placas de lise no grupo Controle ZIKV. Aos 14 dpi, o grupo controle infectado apresentou partículas virais infecciosas, e o grupo de co-cultivo USP7 mostrou a maior concentração de PFU/ml. Não foram detectadas partículas virais nos sobrenadantes dos grupos *mocks*.

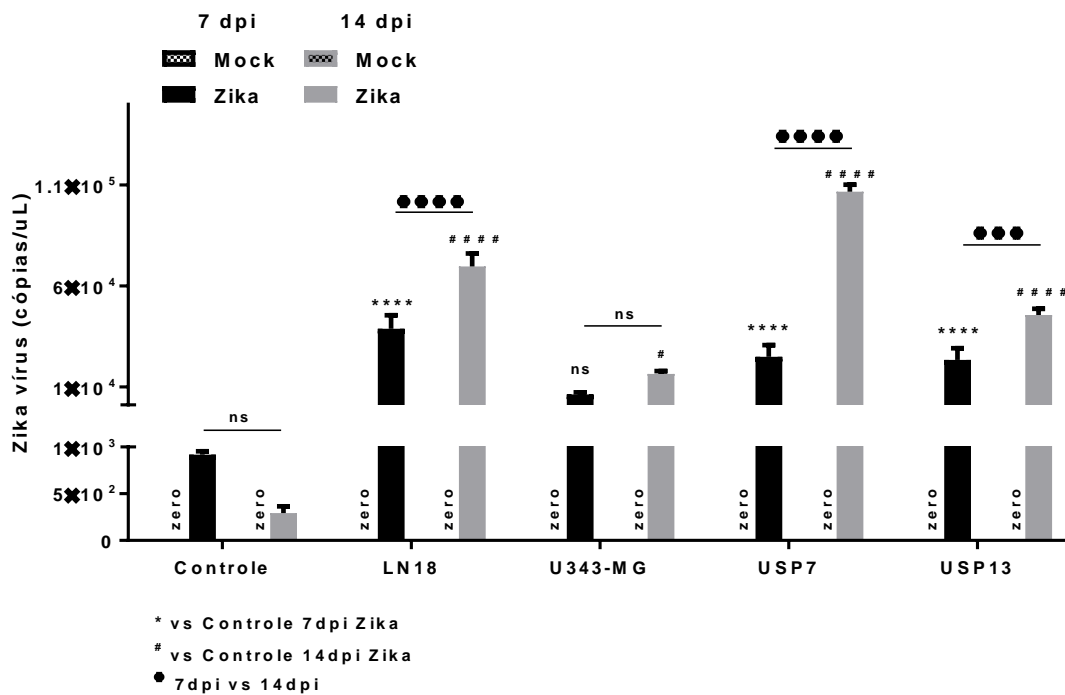


Figura 15 – Quantificação de cópias virais/ μ L avaliada por RT-qPCR nos grupos de co-cultivo e controles. Enquanto houve uma redução do número de cópias do ZIKV no grupo controle infectado ao longo do tempo, em todas as linhagens co-cultivadas a concentração do material genético viral foi maior em 14 dpi. Em ambos os pontos de tempo, a quantidade de cópias virais foi significativamente maior nos grupos contendo células tumorais em comparação aos organoides isolados, exceto U343-MG ZIKV em 7 dpi. * $p < 0,05$. *** $p < 0,001$. **** $p < 0,0001$.

4.3.1. Viabilidade de células normais e tumorais após exposição de organoides cerebrais ao ZIKV

Para questionar a seletividade do ZIKV entre células normais do organoide tumoral e células de GBM e dos tumores embrionários do SNC, os modelos de co-cultivo dissociados foram imunomarcados com anticorpo anti-flavivirus para detecção de ZIKV. No entanto, as análises feitas por CF desse ensaio apresentaram problemas que comprometeram a interpretação dos resultados. No primeiro ensaio foram detectadas proporções no limite de detecção do equipamento, com grupos *mocks* apresentando, frequentemente, valores de marcação levemente acima dos grupos infectados. Considerando que a ausência de partículas virais nos grupos *mocks* foi confirmada tanto por PCR quanto por PFU, considerou-se o ensaio inconclusivo e a marcação detectada inespecífica. No segundo ensaio, a presença apenas do anticorpo secundário levou à marcação positiva em todos os grupos avaliados, impossibilitando a distinção entre marcações positivas e inespecíficas.

Os organoides co-cultivados e controles em 14 dpi foram dissociados e submetidos à

incubação com o marcador 7AAD, a fim de avaliar a proporção de células inviáveis entre os grupos (Figura 16). As análises das células GFP⁺ marcadas com 7AAD não revelou diferença relevante entre a proporção de células dos grupos *mock* e ZIKV (Figura 16A), sendo que nos grupos LN18 ZIKV e USP13 ZIKV foi detectada uma porcentagem de células tumorais 7AAD⁺ menor do que nos respectivos *mocks*.

De maneira geral, foi detectada uma alta porcentagem média de células inviáveis em todos os subgrupos, tanto em grupos *mock* quanto infectados (Figura 16B). A proporção 7AAD⁺ mais baixa foi observada no U343-MG ZIKV (38,7%) e a mais alta no LN18 *mock* (68,7%). Esses dados devem ser interpretados cautelosamente pois alguns fatores externos podem ter influenciado nos achados, dentre eles, o fato de utilizar-se células não-fixadas que perdem viabilidade naturalmente com o tempo após a dissociação dos organoides. Idealmente, as amostras devem ser marcadas e imediatamente analisadas por CF após a dissociação. O atraso na análise das amostras, causado por limitações práticas na realização do ensaio, pode ter contribuído para a baixa viabilidade detectada. Além disso, organoides cerebrais comumente apresentam necrose tecidual quando não são cultivados em agitação (LANCASTER et al., 2013), o que também pode ter influenciado nos resultados obtidos.

Lâminas histológicas dos modelos de ambos os co-cultivos foram obtidas para marcação por IF, a fim de avaliar a presença do ZIKV em células tumorais e normais. Contudo, por um atraso na confecção das lâminas, as reações de imunohistoquímica não foram finalizadas a tempo da redação do presente estudo. Essas análises, assim como outras não citadas aqui, serão realizadas buscando a publicação dos resultados na forma de artigo científico.

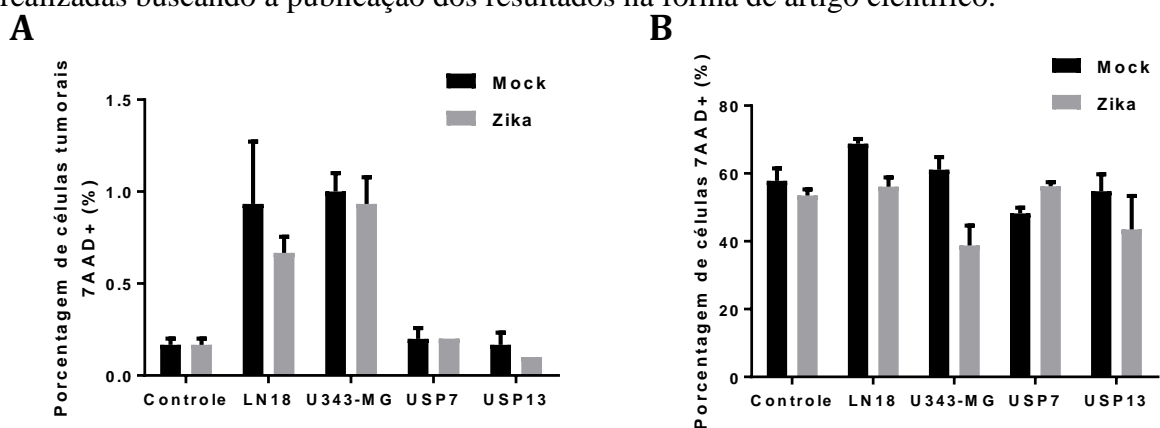


Figura 16 – Viabilidade celular de organoides dissociados analisados por CF em 14 dpi. (A) A incubação com 7AAD não revelou diferença significativa na proporção de células tumorais inviáveis entre os grupos *mock* e ZIKV. (B) A proporção de células totais (GFP⁺ e GFP⁻) 7AAD⁺ em organoides controles e co-cultivos revelou uma alta taxa de inviabilidade celular em todos os grupos.

5. DISCUSSÃO

O GBM é considerado o câncer mais agressivo do SNC (ANDREATTA et al., 2020). A biologia tumoral do GBM tem sido amplamente estudada e, apesar dos diversos ensaios clínicos desenvolvidos nos últimos 15 anos, as opções terapêuticas disponíveis permanecem limitadas, e a sobrevida média dos acometidos tratados continua praticamente inalterada há cerca de três décadas (SILVIA; DAI, 2020).

Os tumores do SNC, em particular o GBM, são sistemas complexos com propriedades influenciadas por características específicas dos indivíduos acometidos (SILVIA; DAI, 2020). A presença simultânea de diferentes tipos celulares - GSCs, CNPs e células diferenciadas -, a alta heterogeneidade intra e intertumoral e a complexidade das múltiplas interações tumor-microambiente fazem do estudo *in vitro* desses tumores um desafio considerável (ANDREATTA et al., 2020).

Nesse contexto, o uso dos modelos organoides cerebrais representa uma abordagem promissora. Estratégias de co-cultivo com células tumorais, especificamente, permitem uma boa representação da interação entre populações celulares que ocorre *in vivo* (GOERS; FREEMONT; POLIZZI, 2014).

A arquitetura tecidual e a composição celular adequada de organoides é um fator primordial para fornecer um ambiente neuro-semelhante às células de GBM. Os modelos por nós obtidos apresentaram identidade tecidual semelhante à de organoides cerebrais descritos previamente (LANCASTER; KNOBLICH, 2014b; YAKOUB; SADEK, 2018). A presença de diferentes camadas celulares correspondentes a diversas regiões do encéfalo em desenvolvimento é característica destes chamados “*whole brain organoids*”. Tais modelos assemelham-se à encéfalos de até 10 semanas de gestação (PASCA et al., 2015; QIAN et al., 2017). A utilização de organoides cerebrais maduros, isto é, com mais de 40 dias de vida, também se faz necessária uma vez que o GBM acomete majoritariamente cérebros adultos.

O presente trabalho utilizou de organoides cerebrais maduros derivados de células-tronco para o co-cultivo com linhagens celulares de GBM e de tumores embrionários do SNC. O modelo híbrido que geramos forneceu um ambiente celular tridimensional que permitiu a interação de células tumorais com tecido neural. A adesão e a dispersão celular foram observadas já nas 72 horas iniciais de co-cultivo em todos os grupos. Foram observadas estruturas tumor-semelhantes formadas por linhagens de GBM e de AT/RT. A formação de estruturas semelhantes já foi observada em modelos de co-cultivo de GSCs com organoides cerebrais (LINKOUS et al., 2019).

Após a aderência aos organoides, células das cinco linhagens tumorais co-cultivadas foram capazes de se dispersar e invadir o tecido ao longo de duas semanas. Estudos com modelos similares revelaram que células de GBM derivadas de pacientes possuem capacidade de invadir o interior de organoides mais jovens, acessando até 300µm abaixo da superfície, ocupando primariamente camadas neuronais (KRIEGER et al., 2019). Modelos de co-cultivo com GSCs e linhagens de GBM derivadas de pacientes permitiram a formação de estruturas compostas por microtúbulos interligando células tumorais distantes (KRIEGER et al., 2019; LINKOUS et al., 2019), similar ao que ocorre em GBM *in vivo* (OSSWALD et al., 2015).

A infecção pelo ZIKV de modelos co-cultivados levou à redução significativa da proporção de células tumorais em duas linhagens de GBM avaliadas, LN18 uma semana pós-infecção e U343-MG duas semanas pós-infecção. Nosso grupo já constatou efeito oncolítico do ZIKV sobre U343-MG cultivadas em aderência, onde a infecção com 1 e 2 MOI (*multiplicity of infection*) reduziu a quantidade de células vivas após três dias de infecção (DAVILA, 2019). Não existem trabalhos publicados avaliando o efeito do ZIKV sobre as linhagens LN18 e HCB151.

Dentre as linhagens de tumores embrionários utilizadas, a infecção viral reduziu a proporção de células tumorais apenas no grupo USP13, duas semanas após a infecção. Surpreendentemente, USP7 não apresentou redução da proporção de células tumorais frente a infecção pelo ZIKV. Esse dado corrobora com estudo publicado recentemente por nosso grupo, no qual a infecção por uma ou três doses de 2.000 PFU de ZIKV reduziu a quantidade de células tumorais de USP13 em organoides de 25 dias de idade, porém não foi observada redução significativa de células USP7 nos grupos infectados neste estudo (FERREIRA et al., 2021). Esses dados conflitam com achados de nosso grupo publicados em 2018, no qual uma injeção intratumoral de ZIKV em animais portando tumores de USP7 levou à redução de crescimento tumoral, aumentou significativamente a sobrevida dos animais tratados em comparação aos não-tratados, causou remissão metastática e até remissão completa em animais tratados. Nesse trabalho, a linhagem USP7 mostrou-se a linhagem mais suscetível ao efeito oncolítico do ZIKV tanto *in vivo* quanto *in vitro*, onde a infecção viral prejudicou a formação de tumoresferas e causou extensiva morte celular nessa linhagem (KAID et al., 2018). Análises integrativas de sequenciamento de exoma, aberrações cromossômicas e perfil de expressão gênica global indicaram que a linhagem USP7 apresenta um perfil molecular muito similar ao de CTNs, o que explicaria sua grande suscetibilidade ao efeito oncolítico viral (HO et al., 2015; KAID et al., 2018). Tais dados conflitantes demonstram a necessidade de estudos adicionais a respeito da suscetibilidade de diferentes tipos tumorais ao efeito oncolítico do ZIKV.

A produção de partículas virais infecciosas reflete a capacidade de infecção e replicação viral em células suscetíveis à infecção pelo ZIKV. Nossos achados indicaram uma presença significativamente maior de cópias virais nos grupos de co-cultivo infectados em comparação ao controle. Esse dado indica que a presença de células tumorais no modelo organoide cerebral aumentou significativamente a replicação do ZIKV, sugerindo maior seletividade desse vírus às células tumorais testadas. A infecção e replicação viral, causando morte celular de CNPs e CTNs, já foi constatada em organoides cerebrais (DANG et al., 2016; GARCEZ et al., 2016; KRENN et al., 2021), nos quais a redução do tamanho dos organoides foi correlacionada ao aumento do número de cópias virais do ZIKV (DANG et al., 2016).

A única linhagem tumoral na qual não foi detectada redução da proporção de células GFP⁺ após infecção por ZIKV, a USP7, apresentou a maior quantidade de cópias virais no sobrenadante de cultura. A alta replicação viral em USP7 pode ser explicada pela similaridade fenotípica entre células de AT/RT e CNPs, pelas quais o ZIKV apresenta intenso tropismo (DANG et al., 2016). Pode-se inferir que a ocorrência de infecção e replicação viral nas células em nosso modelo experimental não levou, necessariamente, à morte celular em proporção correspondente na linhagem de AT/RT USP7. Esse dado corrobora com o estudo publicado por nosso grupo em 2021, na qual houve produção de partículas virais infecciosas em alta quantidade, mas que não foi acompanhada da redução significativa da massa tumoral, em organoides cerebrais mais jovens co-cultivados com USP7 GFP⁺ (FERREIRA et al., 2021), mas conflita com achados do estudo de 2018 citados anteriormente, no qual USP7 também apresentou uma alta produção de partículas virais infecciosas mas que foi acompanhada de um acentuado efeito oncolítico (KAID et al., 2018). Uma possível explicação para nossos achados destoantes a respeito dessa linhagem seria o modelo experimental, no qual o meio de cultura de maturação de organoides permite a manutenção de células neurais com fenótipo tronco/progenitor bem como de neurônios (LANCASTER; KNOBLICH, 2014b). Hipoteticamente, esse ambiente celular poderia estar favorecendo o crescimento celular da linhagem em ritmo acelerado, o que estaria compensando o efeito oncolítico do ZIKV nessa configuração. Essa hipótese é suportada pelo fato do mesmo meio de cultura ter sido utilizado no trabalho publicado em 2021, no qual também não foi observada redução significativa da massa tumoral de USP7 em organoides imaturos infectados *in vitro*. Invariavelmente, estudos adicionais envolvendo o efeito do ZIKV em USP7 em diferentes ambientes de cultivo celular são necessários para a abordagem dessa hipótese.

Mesmo representando uma valiosa plataforma multicelular organizada, composta totalmente por células humanas, organoides cerebrais possuem algumas limitações para

mimetizar o tecido *in vivo*, como a ausência de vascularização e de células do sistema imunológico (ANDREATTA et al., 2020).

Sabe-se que vírus oncolíticos podem induzir uma resposta imune anti-tumoral (LIN et al., 2022; SU; SU; QIN, 2022). Recentemente foi demonstrado que o efeito oncolítico do ZIKV *in vivo* em gliomas é dependente de células imunológicas. Após observar um aumento da infiltração linfocítica em tumores de GBM infectados com ZIKV, pesquisadores induziram a depleção de linfócitos T CD8⁺ em camundongos portadores de tumor. Diferentemente dos animais controle, a infecção por ZIKV dos modelos CD8⁻ não levou à redução tumoral (NAIR et al., 2021). Em outro modelo murino de glioma, foi observada uma indução de intensa resposta inflamatória intratumoral causada pela infecção por ZIKV. A porcentagem de células T CD8⁺ e CD4⁺ expressando IFN- γ foi significativamente maior nos tumores tratados com ZIKV em comparação aos controles, indicando um fenótipo funcional dessas células frente à infecção viral. Similarmente ao estudo de Nair e colaboradores, também foi observada uma anulação do efeito antitumoral do ZIKV após depleção de células CD4⁺ e CD8⁺ (CHEN et al., 2022).

Levando em conta a importância do componente imunológico, a ausência de células do sistema imune em organoides cerebrais é um fator relevante nos estudos de avaliação do efeito oncolítico do ZIKV. Não obstante, considerando modelos *in vitro* do encéfalo humano, o protocolo utilizado no presente estudo representa o método de recapitulação do tecido cerebral com o maior grau de organização tecidual entre os modelos 3D disponíveis na literatura (LANCASTER; KNOBLICH, 2014b; SILVIA; DAI, 2020).

O ZIKV possui tropismo elevado por células com fenótipo neuroprogenitor, notadamente CTNs, CNPs e também GSCs, uma vez que essas CTTs expressam um fenótipo muito similar às CTNs (IANNOLO et al., 2008; GARCEZ et al., 2016; ZHU et al., 2017). Essa seletividade viral parece estar associada à expressão de SOX2, AXL e do heterodímero $\alpha_v\beta_5$ pelas células alvo (GARCEZ et al., 2016; ZHU et al., 2020; ZWERNIK et al., 2021). Sabendo disso, e considerando a importância das GSCs na resistência terapêutica e na recidiva tumoral, os estudos envolvendo o efeito oncolítico do ZIKV no GBM utilizam principalmente modelos de GSCs derivadas de pacientes (ZHU et al., 2017, 2020; CHEN et al., 2018; LINKOUS et al., 2019). O presente trabalho é o primeiro a avaliar o efeito do ZIKV em linhagens comerciais de GBM co-cultivadas com organoides cerebrais, onde observamos uma redução da proporção de células tumorais das linhagens LN18 e U343-MG. De acordo com os dados disponíveis na literatura, ambas as linhagens apresentam perfil mutacional e de expressão gênica correspondentes ao subtipo mesenquimal de GBM (LANE et al., 2019; GUO et al., 2020). A

U343-MG apresenta expressão elevada de FN1, SNAI2 e COL1A1 (GUO et al., 2020), e a LN18 de CD44, PTEN e c-MET (LANE et al., 2019). Curiosamente, a U343-MG apresenta expressão relativamente baixa de ITGAV, um gene associado à suscetibilidade à infecção pelo ZIKV em GSCs (ZHU et al., 2020; SERAFIM et al., 2021). Tais dados sugerem que o subtipo mesenquimal do GBM pode apresentar suscetibilidade ao efeito oncolítico do ZIKV, porém estudos adicionais são necessários para explorar essa hipótese.

A seletividade do ZIKV entre células tumorais do SNC e células normais do encéfalo humano é uma característica importante a ser considerada na aplicação desse vírus oncolítico. A maior produção de partículas virais infecciosas observada nos organoides mistos contendo células tumorais, comparativamente aos organoides sem células tumorais, indica que a presença do tumor aumentou capacidade de infecção e replicação viral. Esse achado sugere maior seletividade do ZIKV às células tumorais, comparativamente às células normais dos organoides cerebrais. Entretanto, os ensaios que almejam avaliar a morte celular induzida pela infecção com ZIKV, comparando-se células normais dos organoides e células tumorais de GBM, sofreram limitações técnicas e práticas que, infelizmente, impactaram a aquisição de dados conclusivos a esse respeito.

No trabalho publicado em 2021, nosso grupo observou uma infecção preferencial do ZIKV em células das linhagens USP7 e USP13 co-cultivadas com organoides imaturos (FERREIRA et al., 2021). Esses dados são interessantes visto que organoides cerebrais jovens possuem uma grande quantidade de células SOX2⁺ (YAKOUB; SADEK, 2018). Apesar deste claro tropismo viral, a infecção por ZIKV também já foi relatada em astrócitos, neurônios e células da glia (RETALLACK et al., 2016; MEERTENS et al., 2017).

A aplicação clínica do ZIKV é apoiada pelo fato de que, apesar dos graves efeitos no desenvolvimento fetal, casos deletérios pela infecção no cérebro adulto são escassos (ARAÚJO; SILVA; ARAÚJO, 2016; CARTEAUX et al., 2016; MÉCHARLES et al., 2016). A razão para esse fenômeno ainda não foi esclarecida, mas pode estar atribuída à quiescência das CTNs e sua pequena participação na homeostase tecidual do encéfalo adulto (CAPILLA-GONZALEZ et al., 2016). Em trabalho de revisão publicado em 2021, os autores defendem que o potencial de infecção por ZIKV de populações de CTNs endógenas, causando efeitos colaterais relacionados, é improvável. Nesse texto foi levantada a hipótese de que, devido à interação cruzada entre CTNs e GSCs na ZSV (SMITH; MEHTA; WERNICKE, 2016), o direcionamento do ZIKV às camadas neuroprogenitoras poderia até ser benéfico, uma vez que causaria depleção do repositório de GSCs (FRANCIPANE et al., 2021). Invariavelmente, dados adicionais acerca da seletividade e da segurança do ZIKV são necessários para explorar as

possíveis aplicações clínicas deste patógeno.

O vírus da Zika apresenta um forte potencial terapêutico contra cânceres do SNC, incluindo o GBM, um tumor de alta mortalidade e cujas terapias convencionais levam a baixas taxas de sobrevida. Nossos achados enfatizam a aptidão de organoides cerebrais, modelos derivados de células-tronco humanas, ao fornecerem uma plataforma multicelular 3D que permitiu a interação de células neurais com células de tumores do SNC *in vitro*. A aplicação do ZIKV nesse modelo de co-cultivo levou à infecção e replicação viral, causando um efeito oncolítico em células de GBM e Meduloblastoma. Estudos futuros em modelos humanos do GBM, preferencialmente incluindo tanto células neurais não transformadas quanto componentes do sistema imunológico, podem ajudar a elucidar a capacidade anti-tumoral do ZIKV, auxiliando no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para tumores de difícil tratamento.

6. CONCLUSÕES

- O protocolo modificado de formação de organoides cerebrais levou à geração de modelos complexos, apresentando neuroepitélios organizados e cavidades pseudo-ventriculares. A arquitetura tecidual e composição celular recapitulou regiões do encéfalo em desenvolvimento, como a ZV e a placa cortical, assemelhando nossos modelos aos chamados *whole brain organoids* descritos na literatura.
- O método de co-cultivo utilizado permitiu prontamente a adesão e dispersão das células tumorais do SNC adicionadas aos organoides. Os modelos híbridos resultantes favoreceram o crescimento e progressão tumoral, aumentando a proporção de células tumorais por células normais ao longo do tempo. Os organoides co-cultivados permitiram a interação tridimensional de células de GBM e de tumores embrionários com células neurais humanas, sendo observada a formação de estruturas semelhantes a tumores em alguns grupos.
- A plataforma multicelular tridimensional dos organoides foi suscetível à invasão tecidual pelas células tumorais co-cultivadas. Todas as linhagens tumorais analisadas foram capazes de invadir o interior do tecido organoide dentro do período de duas semanas.
- A infecção pelo ZIKV de modelos híbridos de co-cultivo levou à redução da proporção de células tumorais das linhagens LN18, U343-MG e USP13 dentro de 14 dias pós-infecção. O efeito oncolítico do vírus foi similar entre as células de GBM e as de tumores embrionários do SNC. Nesse modelo, a linhagem USP7 foi refratária ao efeito oncolítico do ZIKV.
- O ZIKV apresentou capacidade de replicação limitada em organoides cerebrais isolados, sem células tumorais, enquanto a presença de células tumorais nos organoides levou a um aumento significativo na produção de cópias virais *in vitro*.
- Resultados preliminares sobre a avaliação comparativa da viabilidade de células normais do organoide cerebral e de células tumorais co-cultivadas, em decorrência da infecção por ZIKV, não encontraram diferenças significativas e esse achado inicial pode estar relacionado às condições experimentais.

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, e os cânceres do sistema nervoso central (SNC) possuem grande relevância clínica, sendo responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade. O glioblastoma (GBM), o glioma difuso adulto de pior prognóstico, é o tumor do SNC mais comum em adultos e causa milhares de mortes anualmente. Os tratamentos utilizados atualmente resultam numa sobrevida geral média de apenas 12 a 15 meses, um dado que enfatiza a necessidade de novas estratégias terapêuticas para o GBM. Recentemente, estudos constataram que o vírus da Zika (ZIKV) possui um efeito oncolítico relevante contra tumores do SNC, incluindo o GBM, porém dados adicionais a respeito de sua eficácia e segurança são necessários. A presença simultânea de diferentes tipos celulares e as múltiplas interações tumor-microambiente no GBM enfatizam a necessidade de modelos *in vitro* adequados para o estudo dessa neoplasia. A aplicação de modelos organoides humanos no estudo do câncer tem se mostrado uma estratégia valiosa para o teste de novas abordagens terapêuticas. Nesse contexto, o presente trabalho buscou avaliar o efeito oncolítico do ZIKV sobre diferentes linhagens de GBM, comparativamente a linhagens celulares de tumores embrionários do SNC, co-cultivadas com organoides cerebrais, testando a seletividade viral entre células cerebrais normais e transformadas. Os organoides desenvolvidos apresentaram organização tecidual característica e composição celular similar a camadas do encéfalo em desenvolvimento. Os modelos de co-cultivo gerados forneceram um ambiente celular tridimensional que permitiu a interação de células tumorais com tecido neural. A adesão e a dispersão de células tumorais foram observadas nas primeiras 72 horas de co-cultivo. Todas as linhagens tumorais foram capazes de invadir o interior do tecido organoide dentro de duas semanas. A infecção pelo ZIKV de modelos co-cultivados levou à redução significativa da proporção de células tumorais em duas linhagens de GBM, LN18 uma semana pós-infecção e U343-MG duas semanas pós-infecção, e na linhagem de Meduloblastoma USP13 duas semanas após a infecção. A produção de cópias virais foi significativamente maior nos organoides contendo células tumorais em comparação aos organoides controles isolados. Nossos achados enfatizam a aptidão de organoides cerebrais para o estudo de tumores do SNC *in vitro*. A aplicação do ZIKV no modelo de co-cultivo revelou efeito oncolítico em células de GBM e Meduloblastoma. Estudos futuros em modelos *in vitro* e *in vivo* do GBM são necessários para explorar a capacidade anti-tumoral do ZIKV e auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra tumores agressivos do SNC.

ABSTRACT

Cancer is one of the main causes of death worldwide, and central nervous system (CNS) cancers have great clinical relevance since they are responsible for high rates of morbidity and mortality. Glioblastoma (GBM), the adult diffuse glioma with worst prognosis, is the most common CNS tumor in adults and causes thousands of deaths annually. The treatments currently used result in an average overall survival of only 12 to 15 months, a fact that emphasizes the need for new therapeutic strategies against GBM. Recently, studies have found that the Zika virus (ZIKV) has a relevant oncolytic effect against CNS tumors, including GBM, but additional data on its efficacy and safety are needed. The heterogeneous histological pattern, the simultaneous presence of different cell types and the multiple tumor-microenvironment interactions of CNS tumors emphasize the need for adequate GBM *in vitro* models. The application of human organoids models on cancer research has proved to be a valuable strategy for testing new therapeutic approaches. In this context, our work sought to evaluate the ZIKV oncolytic effect on different GBM cell lines, compared to embryonic CNS tumors cell lines, co-cultured with brain organoids derived from stem cells, evaluating viral selectivity between normal and transformed cells. Our organoids showed characteristic tissue organization and cellular composition similar to developing brain layers. The hybrid co-culture models provided a three-dimensional cellular environment that allowed tumor cells interaction with neural tissue. Adhesion and dispersion of tumor cells were observed within the initial 72 hours of co-culture. All tumor strains used were able to invade the interior of the organoid tissue within two weeks. ZIKV infection of co-cultured models led to a significant reduction in tumor cells proportion in two GBM strains evaluated, LN18 one-week post-infection and U343-MG two-weeks post-infection, and in the Medulloblastoma strain USP13 two weeks after infection. ZIKV quantification showed significantly higher viral copies in organoids containing tumor cells compared to isolated control organoids. Our findings emphasize brain organoids fitness for CNS tumors analysis *in vitro*. The application of ZIKV in the co-culture model led to viral infection and replication, causing an oncolytic effect in GBM and Medulloblastoma cells. Future studies with *in vitro* and *in vivo* models of GBM are needed to explore ZIKV antitumor capacity and assist in the development of new therapeutic strategies against aggressive CNS tumors.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-MRAD, Z. et al. Central Nervous System Tumors And Three-Dimensional Cell Biology: Current And Future Perspectives In Modeling. **World Journal of Stem Cells**, v. 13, n. 8, p. 971–1159, 8 ago. 2021. Disponível em: <[pmc/articles/PMC8422930/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35422930/)>. Acesso em: 30 out. 2022.
- AGGARWAL, B. B. et al. Models for prevention and treatment of cancer: Problems vs promises. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, n. 9, p. 1083–1094, nov. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295209004328>>. Acesso em: 1 ago. 2019.
- 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, 7 fev. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23224339>>. Acesso em: 15 ago. 2019.
- ALIFIERIS, C.; TRAFALIS, D. T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 152, p. 63–82, ago. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25944528>>. Acesso em: 15 ago. 2019.
- ALONSO, M. M. et al. ICOVIR-5 shows E2F1 addiction and potent antiglioma effect in vivo. **Cancer Research**, v. 67, n. 17, p. 8255–8263, 1 set. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17804740/>>. Acesso em: 28 set. 2022.
- ANDREANSKY, S. et al. Treatment of intracranial gliomas in immunocompetent mice using herpes simplex viruses that express murine interleukins. **Gene Therapy**, v. 5, n. 1, p. 121–130, 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9536273/>>. Acesso em: 28 set. 2022.
- ANDREATTA, F. et al. **The organoid era permits the development of new applications to study glioblastoma** *Cancers* MDPI AG, , 1 nov. 2020. . Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33182346/>>. Acesso em: 24 out. 2022.
- ANDTBACKA, R. H. I. et al. Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 25, p. 2780–2788, 1 set. 2015. Disponível em: <<https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2014.58.3377>>. Acesso em: 27 set. 2022.
- ARAUJO, A. Q. C.; SILVA, M. T. T.; ARAUJO, A. P. Q. C. Zika virus-associated neurological disorders: A review. **Brain**, v. 139, n. 8, p. 2122–2130, 1 ago. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27357348/>>. Acesso em: 23 out. 2022.
- BAER, A.; KEHN-HALL, K. Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. **Journal of Visualized Experiments**, n. 93, p. e52065, 4 nov. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25407402>>. Acesso em: 16 out. 2019.
- BAO, S. et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. **Nature**, v. 444, n. 7120, p. 756–760, 18 dez. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17051156>>. Acesso em: 21 ago. 2019.
- BAR, E. E. et al. Hypoxia Increases the Expression of Stem-Cell Markers and Promotes Clonogenicity in Glioblastoma Neurospheres. **The American Journal of Pathology**, v. 177, n. 3, p. 1491–1502, set. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20671264>>. Acesso em: 21 ago. 2019.
- BARKER, N. et al. Lgr5+ve Stem Cells Drive Self-Renewal in the Stomach and Build Long-Lived Gastric Units In Vitro. **Cell Stem Cell**, v. 6, n. 1, p. 25–36, 8 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20085740>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

BIAN, S. et al. Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation. **Nature Methods**, v. 15, n. 8, p. 631–639, 2018.

BIRGERSDOTTER, A.; SANDBERG, R.; ERNBERG, I. Gene expression perturbation in vitro—A growing case for three-dimensional (3D) culture systems. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, n. 5, p. 405–412, out. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16055341>>. Acesso em: 5 ago. 2019.

BOJ, S. F. et al. Organoid Models of Human and Mouse Ductal Pancreatic Cancer. **Cell**, v. 160, n. 1–2, p. 324–338, 15 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25557080>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

BOMMAREDDY, P. K. et al. Talimogene Laherparepvec (T-VEC) and Other Oncolytic Viruses for the Treatment of Melanoma. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 18, n. 1, p. 1–15, 1 fev. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27988837/>>. Acesso em: 27 set. 2022.

BOUGNAUD, S. et al. Molecular crosstalk between tumour and brain parenchyma instructs histopathological features in glioblastoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 22, p. 31955–71, 31 maio 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27049916>>. Acesso em: 28 set. 2019.

BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 15 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26943629>>. Acesso em: 3 out. 2019.

BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 5–6, p. 240–249, 1 mar. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644612003376?via%3Dihub>>. Acesso em: 1 ago. 2019.

BURTON, C. et al. Oncolytic myxoma virus synergizes with standard of care for treatment of glioblastoma multiforme. **Oncolytic Virotherapy**, v. Volume 7, p. 107–116, 19 nov. 2018. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/oncolytic-myxoma-virus-synergizes-with-standard-of-care-for-treatment-peer-reviewed-article-OV>>. Acesso em: 28 set. 2022.

CAIRNS, S. **Delytact: The world's first oncolytic virotherapy for brain cancer**. Disponível em: <<https://www.pharmaceutical-technology.com/pricing-and-market-access/delytact-the-worlds-first-oncolytic-virotherapy-for-brain-canc-html/>>. Acesso em: 30 out. 2022.

CALABRESE, C. et al. A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. **Cancer Cell**, v. 11, n. 1, p. 69–82, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17222791>>. Acesso em: 21 ago. 2019.

CAO, G. D. et al. **The Oncolytic Virus in Cancer Diagnosis and Treatment** *Frontiers in Oncology* Frontiers Media S.A., , 9 set. 2020. .

CAPILLA-GONZALEZ, V. et al. **Implications of irradiating the subventricular zone stem cell niche** *Stem Cell Research* Elsevier B.V., , 1 mar. 2016. . Disponível em: <[pmc/articles/PMC8442998/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26943629/)>. Acesso em: 23 out. 2022.

CARTEAUX, G. et al. Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1595–1596, 21 abr. 2016. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc1602964>>. Acesso em: 23 out. 2022.

CATALANO, V. et al. Colorectal Cancer Stem Cells and Cell Death. **Cancers**, v. 3, n. 2, p. 1929–1946, 11 abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24212789>>. Acesso em: 3

out. 2019.

CHARLES, N. et al. Perivascular Nitric Oxide Activates Notch Signaling and Promotes Stem-like Character in PDGF-Induced Glioma Cells. **Cell Stem Cell**, v. 6, n. 2, p. 141–152, 5 fev. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20144787>>. Acesso em: 21 ago. 2019.

CHEN, B. et al. Low-dose vaccinia virus-mediated cytokine gene therapy of glioma. **Journal of Immunotherapy**, v. 24, n. 1, p. 46–57, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11211148/>>. Acesso em: 28 set. 2022.

CHEN, L. et al. Oncolytic Zika virus promotes intratumoral T cell infiltration and improves immunotherapy efficacy in glioblastoma. **Molecular Therapy - Oncolytics**, v. 24, n. March, p. 522–534, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.omto.2022.01.011>>.

CHEN, Q. et al. Treatment of human glioblastoma with a live attenuated Zika virus vaccine candidate. **mBio**, v. 9, n. 5, p. 1–14, 2018.

CHERAY, M. et al. **Cancer Stem-Like Cells in Glioblastoma**. [s.l.] Codon Publications, 2017.

CHUA, C. W. et al. Single luminal epithelial progenitors can generate prostate organoids in culture. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 10, p. 951–961, 21 out. 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ncb3047>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 267–271, 11 jun. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature18296>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

DANG, J. et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 2, p. 258–265, 4 ago. 2016. Disponível em: <<http://pmc/articles/PMC5116380/>>. Acesso em: 23 out. 2022.

DAVILA, C. K. **Identificação de biomarcadores e avaliação pré-clínica de novas terapias para tumores embrionários do sistema nervoso central: miR-367 como alvo terapêutico e efeito oncolítico do vírus ZIKA**. 2019. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-07052019-103413/>>.

DE NORONHA, L. et al. Zika virus infection at different pregnancy stages: Anatomopathological findings, target cells and viral persistence in placental tissues. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. SEP, 25 set. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30337910/>>. Acesso em: 30 set. 2022.

DEBNATH, J.; BRUGGE, J. S. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 9, p. 675–688, set. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16148884>>. Acesso em: 5 ago. 2019.

DEVHARE, P. et al. Zika virus infection dysregulates human neural stem cell growth and inhibits differentiation into neuroprogenitor cells. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 10, p. 3106, 12 out. 2017. Disponível em: <www.nature.com/cddis>. Acesso em: 30 set. 2022.

DICK, G. W. A. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12995440/>>. Acesso em: 30 set. 2022.

DONINA, S. et al. Adapted ECHO-7 virus Rigvir immunotherapy (oncolytic virotherapy) prolongs survival in melanoma patients after surgical excision of the tumour in a retrospective study.

Melanoma Research, v. 25, n. 5, p. 421–426, 18 set. 2015. Disponível em: <<http://pmc/articles/PMC4560272/>>. Acesso em: 27 set. 2022.

EIRAKU, M. et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. **Nature**, v. 472, n. 7341, p. 51–56, 6 abr. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature09941>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

EIRAKU, M.; SASAI, Y. **Self-formation of layered neural structures in three-dimensional culture of ES cells***Current Opinion in Neurobiology*, out. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22405989/>>. Acesso em: 23 set. 2022.

ENGLER, A. J. et al. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 677–689, 25 ago. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923388>>. Acesso em: 5 ago. 2019.

EVANS, M. **Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells***Nature Reviews Molecular Cell Biology**Nat Rev Mol Cell Biol*, out. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21941277/>>. Acesso em: 23 set. 2022.

FERLAY, J. et al. **Global Cancer Observatory: Cancer Today**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2022.

FERREIRA, R. O. et al. Effect of Serial Systemic and Intratumoral Injections of Oncolytic ZIKVBR in Mice Bearing Embryonal CNS Tumors. **Viruses**, v. 13, n. 10, p. 2103, 19 out. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/13/10/2103>>. Acesso em: 24 out. 2022.

FISCHBACH, C. et al. Engineering tumors with 3D scaffolds. **Nature Methods**, v. 4, n. 10, p. 855–860, 2 out. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17767164>>. Acesso em: 5 ago. 2019.

FONSECA, S. A. S. et al. A Euploid Line of Human Embryonic Stem Cells Derived from a 43,XX,dup(9q),+12,-14,-15,-18,-21 Embryo. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0140999, 5 nov. 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0140999>>. Acesso em: 19 out. 2022.

FRANCIPANE, M. G. et al. **Zika virus: A new therapeutic candidate for glioblastoma treatment***International Journal of Molecular Sciences**MDPI*, 1 out. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34681654/>>. Acesso em: 24 out. 2022.

FUTREAL, P. A. et al. **A census of human cancer genes***Nature Reviews Cancer**Nature Publishing Group*, 2004. Disponível em: <<http://pmc/articles/PMC2665285/>>. Acesso em: 15 set. 2022.

GALLI, R. et al. Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma. **Cancer Research**, v. 64, n. 19, p. 7011–7021, 1 out. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15466194>>. Acesso em: 21 ago. 2019.

GARCEZ, P. P. et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. **Science (New York, N.Y.)**, v. 352, n. 6287, p. 816–8, 13 maio 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27064148>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

GELETNEKY, K. et al. Improved killing of human high-grade glioma cells by combining ionizing radiation with oncolytic parvovirus H-1 infection. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20224643/>>. Acesso em: 28 set. 2022.

GELETNEKY, K. et al. Regression of advanced rat and human gliomas by local or systemic treatment

with oncolytic parvovirus H-1 in rat models. **Neuro-Oncology**, v. 12, n. 8, p. 804–814, ago. 2010b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20299703/>>. Acesso em: 28 set. 2022.

GESCHWIND, D. H.; RAKIC, P. Cortical Evolution: Judge the Brain by Its Cover. **Neuron**, v. 80, n. 3, p. 633–647, 30 out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24183016>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

GOERS, L.; FREEMONT, P.; POLIZZI, K. M. **Co-culture systems and technologies: Taking synthetic biology to the next level** *Journal of the Royal Society Interface* Royal Society, , 6 jul. 2014. . Disponível em: <<https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsif.2014.0065>>. Acesso em: 22 out. 2022.

GÓMEZ-LECHÓN, M. J. et al. Long-term expression of differentiated functions in hepatocytes cultured in three-dimensional collagen matrix. **Journal of Cellular Physiology**, v. 177, n. 4, p. 553–562, dez. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10092208>>. Acesso em: 5 ago. 2019.

GORANCI-BUZHALA, G. et al. Rapid and Efficient Invasion Assay of Glioblastoma in Human Brain Organoids. **Cell Reports**, v. 31, n. 10, p. 107738, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107738>>.

GÖTZ, M.; HUTTNER, W. B. The cell biology of neurogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 10, p. 777–788, out. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16314867>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

GROCHANS, S. et al. **Epidemiology of Glioblastoma Multiforme–Literature Review** *CancersMDPI*, , 1 maio 2022. . Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35626018/>>. Acesso em: 19 set. 2022.

GUO, M. et al. Identification of functionally distinct and interacting cancer cell subpopulations from glioblastoma with intratumoral genetic heterogeneity. **Neuro-Oncology Advances**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 1 jan. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35626018/>>. Acesso em: 24 out. 2022.

HAJDU, S. I. A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1. **Cancer**, v. 117, n. 5, p. 1097–1102, 1 mar. 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.25553>>. Acesso em: 11 set. 2022.

HANAHAN, D. **Hallmarks of Cancer: New Dimensions** *Cancer Discovery* American Association for Cancer Research Inc., , 1 jan. 2022. . Disponível em: <<http://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article-pdf/12/1/31/3052722/31.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **The Hallmarks of Cancer** *Cell*. [s.l: s.n.].

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation** *Cell* Cell Press, , 4 mar. 2011. .

HARRINGTON, K. et al. **Optimizing oncolytic virotherapy in cancer treatment** *Nature Reviews Drug Discovery* Nature Publishing Group, , 1 set. 2019. . Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31292532/>>. Acesso em: 26 set. 2022.

HEMMATI, H. D. et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 25, p. 15178–15183, 9 dez. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14645703>>. Acesso em: 21 ago. 2019.

HO, D. M. T. et al. Integrated genomics has identified a new AT/RT-like yet INI1-positive brain tumor subtype among primary pediatric embryonal tumors. **BMC Medical Genomics**, v. 8, n. 1, p. 32, 25 jun. 2015. Disponível em: <<https://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12920-015-0103-3>>. Acesso em: 31 out. 2022.

HOSSEINI, Z. F. et al. FGF2-dependent mesenchyme and laminin-111 are niche factors in salivary gland organoids. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 4, 1 fev. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30002710/>>. Acesso em: 25 set. 2022.

HU, B.-Y.; ZHANG, S.-C. Directed Differentiation of Neural-stem cells and Subtype-Specific Neurons from hESCs. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l.: s.n.]636p. 123–137.

HUBERT, C. G. et al. A three-dimensional organoid culture system derived from human glioblastomas recapitulates the hypoxic gradients and cancer stem cell heterogeneity of tumors found in vivo. **Cancer Research**, v. 76, n. 8, p. 2465–2477, 2016.

IANNOLO, G. et al. **Apoptosis in normal and cancer stem cells****Critical Reviews in Oncology/Hematology**Crit Rev Oncol Hematol, , abr. 2008. . Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18035551/>>. Acesso em: 23 out. 2022.

IARC, I. A. for R. on C. **Brain, central nervous system**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today>>.

INCA, I. N. do C. **Estimativa 2018 - Síntese de Resultados e Comentários**. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em: 14 ago. 2019.

IVANOV, D. P. et al. In vitro co-culture model of medulloblastoma and human neural stem cells for drug delivery assessment. **Journal of Biotechnology**, v. 205, p. 3–13, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.002>>.

IVANOV, D. P. et al. In vitro models of medulloblastoma: Choosing the right tool for the job. **Journal of Biotechnology**, v. 236, p. 10–25, 20 out. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165616314389#bib0845>>. Acesso em: 30 jul. 2019.

JACOB, F. et al. A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. **Cell**, v. 180, n. 1, p. 188- 204.e22, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.036>>.

JOSIAH, D. T. et al. Adipose-derived stem cells as therapeutic delivery vehicles of an oncolytic virus for glioblastoma. **Molecular Therapy**, v. 18, n. 2, p. 377–385, fev. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19904233/>>. Acesso em: 28 set. 2022.

KAID, C. et al. Zika virus selectively kills aggressive human embryonal CNS tumor cells in vitro and in vivo. **Cancer Research**, v. 78, n. 12, p. 3363–3374, 2018.

KAMAND, M. et al. Generation of human induced pluripotent stem cells (SDUKi002-A) from a 22-year-old male diagnosed with autism spectrum disorder. **Stem Cell Research**, v. 46, p. 101834, 1 jul. 2020.

KAPALCZYŃSKA, M. et al. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. **Archives of medical science : AMS**, v. 14, n. 4, p. 910–919, jun. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30002710>>. Acesso em: 5 ago. 2019.

- KAUFMAN, H. L.; KOHLHAPP, F. J.; ZLOZA, A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 9, p. 642–662, 1 set. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26323545>>. Acesso em: 4 out. 2019.
- KAWASHIMA, T. et al. Oligodendrocytes Up-regulate the Invasive Activity of Glioblastoma Cells via the Angiopoietin-2 Signaling Pathway. **Anticancer research**, v. 39, n. 2, p. 577–584, 1 fev. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30711932>>. Acesso em: 29 set. 2019.
- KELAVA, I.; LANCASTER, M. A. Stem Cell Models of Human Brain Development. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 6, p. 736–748, jun. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590916301060>>. Acesso em: 8 ago. 2019.
- KESSLER, M. et al. The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 8989, 8 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26643275>>. Acesso em: 8 ago. 2019.
- KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Primary and secondary glioblastomas: From concept to clinical diagnosis. **Neuro-Oncology**, v. 1, n. 1, p. 44–51, 1 jan. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11550301>>. Acesso em: 15 ago. 2019.
- KOSTYUCHENKO, V. A. et al. Structure of the thermally stable Zika virus. **Nature**, v. 533, n. 7603, p. 425–428, 19 abr. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.aaf5316>>. Acesso em: 30 set. 2022.
- KRENN, V. et al. Organoid modeling of Zika and herpes simplex virus 1 infections reveals virus-specific responses leading to microcephaly. **Cell Stem Cell**, v. 28, n. 8, p. 1362- 1379.e7, 5 ago. 2021.
- KRIEGER, T. G. et al. Modeling glioblastoma invasion using human brain organoids and single-cell transcriptomics. p. 1–13, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/630202>>.
- KUIJK, E. et al. The mutational impact of culturing human pluripotent and adult stem cells. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-020-16323-4>>. Acesso em: 15 out. 2022.
- LANCASTER, M. A.; KNOBLICH, J. A. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. **Science**, v. 345, n. 6194, 2014a.
- LANCASTER, M. A.; KNOBLICH, J. A. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. **Nature Protocols**, v. 9, n. 10, p. 2329–2340, 4 out. 2014b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25188634>>. Acesso em: 5 ago. 2019.
- LANCASTER, M. a et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 373–379, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature12517>>.
- LANE, R. et al. Cell-derived extracellular vesicles can be used as a biomarker reservoir for glioblastoma tumor subtyping. **Communications Biology**, v. 2, n. 1, 1 dez. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3700082/>>. Acesso em: 24 out. 2022.
- LEE, I. et al. **Probing molecular insights into Zika virus–host interactions** Viruses MDPI AG, , 2 maio 2018. . Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29724036/>>. Acesso em: 30 set. 2022.
- LI, Z. et al. Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells. **Cancer Cell**, v. 15, n. 6, p. 501–513, jun. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610809000877>>. Acesso em: 21 ago. 2019.
- LIANG, M. Oncorine, the World First Oncolytic Virus Medicine and its Update in China. **Current**

Cancer Drug Targets, v. 18, n. 2, p. 171–176, 17 jan. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29189159/>>. Acesso em: 27 set. 2022.

LIN, J. et al. Vesicular stomatitis virus sensitizes immunologically cold tumors to checkpoint blockade by inducing pyroptosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1868, n. 12, p. 166538, dez. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36096276/>>. Acesso em: 23 out. 2022.

LINKOUS, A. et al. Modeling Patient-Derived Glioblastoma with Cerebral Organoids. **Cell Reports**, v. 26, n. 12, p. 3203–3211.e5, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.063>>.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, 9 jun. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27157931>>. Acesso em: 29 jul. 2019.

LOUIS, D. N. et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. **Neuro-Oncology**, v. 23, n. 8, p. 1231–1251, 1 ago. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3528013/>>. Acesso em: 18 ago. 2022.

LUN, X. Q. et al. Efficacy of systemically administered oncolytic vaccinia virotherapy for malignant gliomas is enhanced by combination therapy with rapamycin or cyclophosphamide. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 8, p. 2777–2788, 15 abr. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19351762/>>. Acesso em: 28 set. 2022.

MALLICK, S. et al. Management of glioblastoma after recurrence: A changing paradigm. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, v. 28, n. 4, p. 199–210, 1 dez. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S111003621630036X>>. Acesso em: 30 set. 2019.

MCCAULEY, H. A.; WELLS, J. M. Pluripotent stem cell-derived organoids: using principles of developmental biology to grow human tissues in a dish. **Development**, v. 144, n. 6, p. 958–962, 15 mar. 2017. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.140731>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

MCCAULEY, K. B. et al. Efficient Derivation of Functional Human Airway Epithelium from Pluripotent Stem Cells via Temporal Regulation of Wnt Signaling. **Cell Stem Cell**, v. 20, n. 6, p. 844–857.e6, 1 jun. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590917300723>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

MCCRACKEN, K. W. et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. **Nature**, v. 516, n. 7531, p. 400–404, 29 dez. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25363776/>>. Acesso em: 5 ago. 2019.

MCKIE, E. A. et al. Selective in vitro replication of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) ICP34.5 null mutants in primary human CNS tumours- evaluation of a potentially effective clinical therapy. **British Journal of Cancer**, v. 74, n. 5, p. 745–752, 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8795577/>>. Acesso em: 28 set. 2022.

MÉCHARLES, S. et al. Acute myelitis due to Zika virus infection. **The Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1481, 2 abr. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/>>. Acesso em: 23 out. 2022.

MEERTENS, L. et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. **Cell Reports**, v. 18, n. 2, p. 324–333, 10 jan. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28076778/>>. Acesso em: 23 out. 2022.

MEYERS, J.; CRAIG, J.; ODDE, D. J. Potential for Control of Signaling Pathways via Cell Size and

Shape. **Current Biology**, v. 16, n. 17, p. 1685–1693, 5 set. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16950104>>. Acesso em: 5 ago. 2019.

MSEKA, T.; BAMBURG, J. R.; CRAMER, L. P. ADF/cofilin family proteins control formation of oriented actin-filament bundles in the cell body to trigger fibroblast polarization. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 24, p. 4332–4344, 15 dez. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042624>>. Acesso em: 5 ago. 2019.

NAIR, S. et al. Zika virus oncolytic activity requires CD8+ T cells and is boosted by immune checkpoint blockade. **JCI Insight**, v. 6, n. 1, p. 1–15, 2021.

NAKAGAWA, M. et al. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 32, p. 14152–14157, 10 ago. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20660764/>>. Acesso em: 2 out. 2022.

NELSON, C. M.; BISSELL, M. J. Of Extracellular Matrix, Scaffolds, and Signaling: Tissue Architecture Regulates Development, Homeostasis, and Cancer. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, n. 1, p. 287–309, nov. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16824016>>. Acesso em: 5 ago. 2019.

OGAWA, J. et al. Glioblastoma Model Using Human Cerebral Organoids. **Cell Reports**, v. 23, n. 4, p. 1220–1229, 2018.

OHGAKI, H. et al. Genetic Pathways to Glioblastoma. **Cancer Research**, v. 64, n. 19, p. 6892–6899, 1 out. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15466178>>. Acesso em: 15 ago. 2019.

OHGAKI, H. Epidemiology of Brain Tumors. In: [s.l.: s.n.]p. 323–342.

OKITA, K. et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. **Nature Methods**, v. 8, n. 5, p. 409–412, maio 2011.

OLIVEIRA, D. et al. Persistence and Intra-Host Genetic Evolution of Zika Virus Infection in Symptomatic Adults: A Special View in the Male Reproductive System. **Viruses**, v. 10, n. 11, p. 615, 7 nov. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/10/11/615>>. Acesso em: 10 out. 2019.

OSSWALD, M. et al. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. **Nature**, v. 528, n. 7580, p. 93–98, 3 dez. 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature16071>>. Acesso em: 22 out. 2022.

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, n. suppl 4, p. iv1–iv63, 1 out. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25304271>>. Acesso em: 14 ago. 2019.

OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. **Neuro-Oncology**, v. 20, n. suppl_4, p. iv1–iv86, 1 out. 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/20/suppl_4/iv1/5090960>. Acesso em: 14 ago. 2019.

PAGLINO, J. C.; OZDUMAN, K.; VAN DEN POL, A. N. LuIII Parvovirus Selectively and Efficiently Targets, Replicates in, and Kills Human Glioma Cells. **Journal of Virology**, v. 86, n. 13, p. 7280–7291, jul. 2012. Disponível em: <<http://pmc/articles/PMC3416325/>>. Acesso em: 28 set. 2022.

PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 839–845, out. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17684528>>. Acesso em: 1 ago. 2019.

PASCA, A. M. et al. Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. **Nature Methods**, v. 12, n. 7, p. 671–678, 30 jun. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26005811/>>. Acesso em: 22 out. 2022.

PETERSEN, O. W. et al. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 19, p. 9064–8, 1 out. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1384042>>. Acesso em: 5 ago. 2019.

PISKLAKOVA, A. et al. M011L-deficient oncolytic myxoma virus induces apoptosis in brain tumor-initiating cells and enhances survival in a novel immunocompetent mouse model of glioblastoma. **Neuro-Oncology**, v. 18, n. 8, p. 1088–1098, 1 ago. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26962017/>>. Acesso em: 28 set. 2022.

QIAN, X. et al. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1238–1254, 19 maio 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867416304676>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

QIAN, X. et al. Using brain organoids to understand Zika virus-induced microcephaly. **Development (Cambridge)**, v. 144, n. 6, p. 952–957, 15 mar. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28292840/>>. Acesso em: 22 out. 2022.

RESTALLACK, H. et al. Zika virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 50, p. 14408–14413, 13 dez. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27911847/>>. Acesso em: 30 set. 2022.

RIES, S.; KORN, W. M. ONYX-015: Mechanisms of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus. **British Journal of Cancer**, v. 86, n. 1, p. 5–11, 7 jan. 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11857003/>>. Acesso em: 27 set. 2022.

RIVERA-MOLINA, Y. et al. GITRL-armed Delta-24-RGD oncolytic adenovirus prolongs survival and induces anti-glioma immune memory. **Neuro-Oncology Advances**, v. 1, n. 1, 1 maio 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31608328/>>. Acesso em: 28 set. 2022.

ROSSI, G.; MANFRIN, A.; LUTOLF, M. P. **Progress and potential in organoid research** *Nature Reviews Genetics* Nature Publishing Group, , 1 nov. 2018. . Disponível em: <www.nature.com/nrg>. Acesso em: 24 ago. 2022.

RUSSELL, L.; PENG, K. W. **The emerging role of oncolytic virus therapy against cancer** *Chinese Clinical Oncology* AME Publishing Company, , 1 abr. 2018. . Disponível em: <<http://pmc/articles/PMC6557159/>>. Acesso em: 27 set. 2022.

SACHS, N. et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. **Cell**, v. 172, n. 1–2, p. 373–386.e10, 11 jan. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29224780>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

SAITO, Y. et al. Development of a functional thyroid model based on an organoid culture system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 497, n. 2, p. 783–789, 4 mar. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29470983/>>. Acesso em: 25 set. 2022.

SANAI, N.; ALVAREZ-BUYLLA, A.; BERGER, M. S. Neural Stem Cells and the Origin of Gliomas. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 8, p. 811–822, 25 ago. 2005.

SATO, T. et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. **Nature**, v. 459, n. 7244, p. 262–265, 29 maio 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19329995>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

SEIDEL, S. et al. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 α . **Brain**, v. 133, n. 4, p. 983–995, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20375133>>. Acesso em: 21 ago. 2019.

SERAFIM, R. B. et al. Expression Profiling of Glioblastoma Cell Lines Reveals Novel Extracellular Matrix-Receptor Genes Correlated With the Responsiveness of Glioma Patients to Ionizing Radiation. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 25 maio 2021. Disponível em: <[pmc/articles/PMC8240593/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/391240593/)>. Acesso em: 24 out. 2022.

SHAMIR, E. R.; EWALD, A. J. Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 10, p. 647–664, 17 out. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25237826>>. Acesso em: 5 ago. 2019.

SHEVDE, N. K.; MAEL, A. A. Techniques in embryoid body formation from human pluripotent stem cells. **Methods in Molecular Biology**, v. 946, p. 535–546, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23179854/>>. Acesso em: 23 set. 2022.

SILVA, P. B. G. da et al. Establishment of a novel human medulloblastoma cell line characterized by highly aggressive stem-like cells. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 1545–1560, 1 ago. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26358937/>>. Acesso em: 19 out. 2022.

SILVIA, N.; DAI, G. **Cerebral organoids as a model for glioblastoma multiforme** *Current Opinion in Biomedical Engineering* Elsevier B.V., , 1 mar. 2020. .

SINGH, S. K. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 396–401, 18 nov. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549107>>. Acesso em: 21 ago. 2019.

SIROHI, D. et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**, v. 352, n. 6284, p. 467–470, 22 abr. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27033547/>>. Acesso em: 30 set. 2022.

SMITH, A. W.; MEHTA, M. P.; WERNICKE, A. G. **Neural stem cells, the subventricular zone and radiotherapy: implications for treating glioblastoma** *Journal of Neuro-Oncology* Springer New York LLC, , 1 jun. 2016. . Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27108274/>>. Acesso em: 23 out. 2022.

STUPP, R. et al. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 25, n. suppl 3, p. iii93–iii101, 1 set. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24782454>>. Acesso em: 15 ago. 2019.

STUPP, R.; ROILA, F.; ESMO GUIDELINES WORKING GROUP. Malignant glioma: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 20, n. Supplement 4, p. iv126–iv128, 1 maio 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19454432>>. Acesso em: 15 ago. 2019.

SU, Y.; SU, C.; QIN, L. **Current landscape and perspective of oncolytic viruses and their**

combination therapies *Translational Oncology* Neoplasia Press, Inc., , 1 nov. 2022. . Disponível em: <<http://pmc/articles/PMC9472052/>>. Acesso em: 23 out. 2022.

TAKASATO, M. et al. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature*, v. 526, n. 7574, p. 564–568, 7 out. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature15695>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

TAKEBE, T. et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, v. 499, n. 7459, p. 481–484, 3 jul. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature12271>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

TANG, B. et al. Synergistic Combination of Oncolytic Virotherapy and Immunotherapy for Glioma. *Clinical Cancer Research*, v. 26, n. 9, p. 2216–2230, 1 maio 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32019860/>>. Acesso em: 28 set. 2022.

TODO, T. “Armed” oncolytic herpes simplex viruses for brain tumor therapy. *Cell adhesion & migration*, v. 2, n. 3, p. 208–213, 2008. Disponível em: <<http://pmc/articles/PMC2634086/>>. Acesso em: 28 set. 2022.

TODO, T. et al. Intratumoral oncolytic herpes virus G47 Δ for residual or recurrent glioblastoma: a phase 2 trial. *Nature Medicine*, v. 28, n. 8, p. 1630–1639, 1 ago. 2022a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41591-022-01897-x>>. Acesso em: 30 out. 2022.

TODO, T. et al. A phase I/II study of triple-mutated oncolytic herpes virus G47 Δ in patients with progressive glioblastoma. *Nature Communications*, v. 13, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2022b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-022-31262-y>>. Acesso em: 30 out. 2022.

TOMASETTI, C.; VOGELSTEIN, B. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science*, v. 347, n. 6217, p. 78–81, 2 jan. 2015. Disponível em: <<http://pmc/articles/PMC4446723/>>. Acesso em: 15 set. 2022.

TURCO, M. Y. et al. Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. *Nature Cell Biology*, v. 19, n. 5, p. 568–577, 10 maio 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28394884>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

VASYUTIN, I. et al. **Bladder organoids and spheroids: Potential tools for normal and diseased tissue modelling** *Anticancer Research* International Institute of Anticancer Research, , 1 mar. 2019. . Disponível em: <<https://ar.iijournals.org/content/39/3/1105>>. Acesso em: 25 set. 2022.

VERA, B. et al. Characterization of the Antiglioma Effect of the Oncolytic Adenovirus VCN-01. *PLOS ONE*, v. 11, n. 1, p. e0147211, 25 jan. 2016. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0147211>>. Acesso em: 28 set. 2022.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20129251>>. Acesso em: 15 ago. 2019.

VESCOVI, A. L.; GALLI, R.; REYNOLDS, B. A. Brain tumour stem cells. *Nature Reviews Cancer*, v. 6, n. 6, p. 425–436, jun. 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrc1889>>. Acesso em: 21 ago. 2019.

VÖLKNER, M. et al. Retinal Organoids from Pluripotent Stem Cells Efficiently Recapitulate Retinogenesis. *Stem Cell Reports*, v. 6, n. 4, p. 525, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4834051/>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

VON DER MARK, K. et al. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. **Nature**, v. 267, n. 5611, p. 531–532, 9 jun. 1977. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/559947>>. Acesso em: 5 ago. 2019.

WEAVER, V. M. et al. beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. **Cancer cell**, v. 2, n. 3, p. 205–16, set. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12242153>>. Acesso em: 5 ago. 2019.

WEN, P. Y.; KESARI, S. Malignant Gliomas in Adults. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 5, p. 492–507, 31 jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18669428>>. Acesso em: 15 ago. 2019.

WHO, W. H. O. **Noncommunicable Diseases (NCD) Country Profiles**. Disponível em: <https://www.who.int/nmh/countries/2018/bra_en.pdf?ua=1>. Acesso em: 14 ago. 2019a.

WHO, W. H. O. **Cancer**. 9. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 14 ago. 2019b.

WORKMAN, M. J. et al. Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. **Nature Medicine**, v. 23, n. 1, p. 49–59, 21 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27869805>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

YAKOUB, A. M. **Cerebral organoids exhibit mature neurons and astrocytes and recapitulate electrophysiological activity of the human brain** *Neural Regeneration Research* Wolters Kluwer Medknow Publications, , 1 maio 2019. . Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/375034/>?report=abstract>. Acesso em: 6 out. 2020.

YAKOUB, A. M.; SADEK, M. Development and Characterization of Human Cerebral Organoids: An Optimized Protocol. **Cell Transplantation**, v. 27, n. 3, p. 393–406, 2018.

YAN, K. et al. Glioma cancer stem cells secrete Gremlin1 to promote their maintenance within the tumor hierarchy. **Genes & Development**, v. 28, n. 10, p. 1085–1100, 15 maio 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24788093>>. Acesso em: 21 ago. 2019.

ZECEVIC, N.; CHEN, Y.; FILIPOVIC, R. Contributions of cortical subventricular zone to the development of the human cerebral cortex. **Journal of Comparative Neurology**, v. 491, n. 2, p. 109–122, 17 out. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/162628573/>>. Acesso em: 21 set. 2022.

ZHANG, S.-C. et al. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 12, p. 1129–1133, 1 dez. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731781>>. Acesso em: 13 ago. 2019.

ZHU, T. S. et al. Endothelial Cells Create a Stem Cell Niche in Glioblastoma by Providing NOTCH Ligands That Nurture Self-Renewal of Cancer Stem-Like Cells. **Cancer Research**, v. 71, n. 18, p. 6061–6072, 15 set. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21788346>>. Acesso em: 21 ago. 2019.

ZHU, Z. et al. Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 10, p. 2843–2857, 2017.

ZHU, Z. et al. Zika Virus Targets Glioblastoma Stem Cells through a SOX2-Integrin $\alpha v \beta 5$ Axis. **Cell Stem Cell**, v. 26, n. 2, p. 187–204.e10, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.11.016>>.

ZWERNIK, S. D. et al. AXL receptor is required for Zika virus strain MR-766 infection in human glioblastoma cell lines. **Molecular Therapy - Oncolytics**, v. 23, p. 447–457, 17 dez. 2021.

BIOGRAFIA

Rodolfo Sanches Ferreira

Formação acadêmica/titulação

2019 - 2022 Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Genética).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Orientador: Oswaldo Keith Okamoto
Bolsista do(a): Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo

2015 - 2018 Graduação em Biomedicina.
Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil
Título: VARIANTES GENÉTICAS NO GENE FOXP3: ASSOCIAÇÃO COM A INFECÇÃO POR HPV E DESENVOLVIMENTO DE LESÕES CERVICAIS PRÉ-MALIGNAS
Orientador: Karen Brajão de Oliveira

2012 - 2014 Ensino Médio (2o grau) .
Etec Waldyr Duron Junior, ETEC, Brasil, Ano de obtenção: 2014

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. SENA, MICHELLE MOTA; TRUGILO, KLEBER PAIVA; OKUYAMA, NÁDIA CALVO MARTINS; PEREIRA, ÉRICA ROMÃO; CEZAR-DOS-SANTOS, FERNANDO; **FERREIRA, RODOLFO SANCHES**; ESPOSITO, ALINE; PEREIRA, ANA PAULA LOMBARDI; D'OLIVEIRA COUTO-FILHO, JOSÉ; WATANABE, MARIA ANGELICA EHARA; DE OLIVEIRA, KAREN BRAJÃO
The role of NFKB1/NFKBIA genetic variants in HPV infection: A cross-sectional cohort study. EXPERIMENTAL AND MOLECULAR PATHOLOGY. , v.124, p.104716 - , 2022.
2. FERREIRA, RAIANE OLIVEIRA; GRANHA, ISABELA; **FERREIRA, RODOLFO SANCHES**; BUENO, HELOISA DE SIQUEIRA; OKAMOTO, OSWALDO KEITH; KAID, CAROLINI; ZATZ, MAYANA
Effect of Serial Systemic and Intratumoral Injections of Oncolytic ZIKVBR in Mice Bearing Embryonal CNS Tumors. Viruses-Basel. , v.13, p.2103 - , 2021.
3. CEZAR-DOS-SANTOS, FERNANDO; **FERREIRA, RODOLFO SANCHES**; OKUYAMA, NÁDIA CALVO MARTINS; TRUGILO, KLEBER PAIVA; SENA, MICHELLE MOTA; PEREIRA, ÉRICA ROMÃO; PEREIRA, ANA PAULA LOMBARDI; WATANABE, MARIA ANGELICA EHARA; DE OLIVEIRA, KAREN BRAJÃO
FOXP3 immunoregulatory gene variants are independent predictors of human papillomavirus infection and cervical cancer precursor lesions. JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND CLINICAL ONCOLOGY. , v.x, p.1 - 13, 2019.
4. OKUYAMA, NÁDIA CALVO MARTINS; CEZAR-DOS-SANTOS, FERNANDO; PEREIRA, ÉRICA ROMÃO; TRUGILO, KLEBER PAIVA; CEBINELLI, GUILHERME CESAR MARTELOSSI; SENA, MICHELLE MOTA; PEREIRA, ANA PAULA LOMBARDI; ARANOME, ADRIANO MARTIN FELIS; MANGIERI, LUIS FERNANDO LASARO; **FERREIRA, RODOLFO SANCHES**; WATANABE, MARIA ANGELICA EHARA; DE OLIVEIRA, KAREN BRAJÃO
Genetic variant in CXCL12 gene raises susceptibility to HPV infection and squamous intraepithelial lesions development: a case-control study. JOURNAL OF BIOMEDICAL SCIENCE. , v.25, p.1 - 10, 2018.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **FERREIRA, RODOLFO SANCHES**; OLIVEIRA, K. B.; TRUGILO, K. P.; OKUYAMA, N. C. M.
Prevenção da Infecção pelo HPV, 2019. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

2. FERREIRA, R. S.

Análise de polimorfismos no gene FOXP3 como possíveis biomarcadores de susceptibilidade à infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) e ao desenvolvimento de lesões cervicais pré-malignas, 2018. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

3. FERREIRA, R. S.; SANTOS, F. C.; OKUYAMA, N. C. M.; BONALDO, A. L. L.; PEREIRA, A. P. L.; QUEIROZ, M. G. C.; ESPOSITO, A.; OLIVEIRA, K. B.

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NO ÍNTRON 1 DO GENE FOXP3 COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO E AO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES CERVICAIS PRÉ-MALIGNAS, 2018. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

4. FERREIRA, RODOLFO SANCHES; SANTOS, F. C.; OLIVEIRA, K. B.

ANÁLISE DO POLIMORFISMO RS1800468 (-800G>A) DE TGFB1 EM MULHERES INFECTADAS PELO HPV, 2018. (Comunicação, Apresentação de Trabalho)

5. FERREIRA, RODOLFO SANCHES; SENA, M. M.; TRUGILO, K. P.; SANTOS, F. C.; OKUYAMA, N. C. M.; PEREIRA, A. P. L.; MARIA, G. C. Q.; ARANOME, A. M. F.; ESPOSITO, A.; BONALDO, A. L. L.; OLIVEIRA, K. B.

ANÁLISE DO POLIMORFISMO RS1800471 (74G>C) DE TGFB1 EM MULHERES INFECTADAS PELO HPV, 2018. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Prêmios e títulos

2018 Prêmio Profª Drª Eucleia Primo Betioli Contel pelo 2º lugar em apresentação oral: Variantes genéticas no gene FOXP3: associação com a detecção de HPV e desenvolvimento de lesões cervicais pré-malignas, XXIV Curso de Verão em Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

2018 2º Lugar na premiação de Destaque Acadêmico, concedida pelo Curso de Biomedicina da UEL, aos estudantes que obtiveram destaque na produção acadêmica, científica e de extensão, Colegiado de Biomedicina da Universidade Estadual de Londrina