

MARIANA BRANDÃO PRADO

Proteína prion como um regulador de *stemness* em células-tronco de glioblastoma: seu papel na formação e função de plataformas multiprotéicas de sinalização

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2023

MARIANA BRANDÃO PRADO

Proteína prion como um regulador de *stemness* em células-tronco de glioblastoma: seu papel na formação e função de plataformas multiprotéicas de sinalização

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia de Sistemas

Orientadora: Profa. Dra. Marilene Hohmuth Lopes

Versão Original

São Paulo
2023

RESUMO

Prado, M. B. **Proteína prion como um regulador de *stemness* em células-tronco de glioblastoma: seu papel na formação e função de plataformas multiprotéicas de sinalização.** 2023. 112 f. Tese (Doutorado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O glioblastoma multiforme (GB) é um tumor composto por células da glia, sendo o tipo de glioma mais comum e maligno, com altas taxas de recorrência e mortalidade. Adicionalmente, certos aspectos do GB dificultam a sua remoção cirúrgica completa, como o fato de crescer em regiões do cérebro de difícil acesso e seu padrão de crescimento difuso, sem bordas definidas. Estudos têm demonstrado que o GB é mantido por uma subpopulação semelhante a células-tronco denominadas células-tronco de glioblastoma (CTGs). Essas células se autorrenovam, promovem a angiogênese e a invasão e também são quimio e radorresistentes. Assim, CTGs têm potencial significativo como um alvo terapêutico para o tratamento de glioblastomas. Estudos recentes têm mostrado que a proteína prion celular (PrP^C) surge como um fator chave na manutenção do GB e CTGs. A PrP^C tem um papel importante como uma *scaffold protein* sendo capaz de interagir com várias outras proteínas de membrana e matriz extracelular, formando complexos capazes de regular diferentes funções da biologia tumoral. Nesse estudo geramos células U87 e U251 nocautes (KO) para PrP^C através do método CRISPR-Cas9, que são cultivadas em duas condições distintas, a de monocamada (2D), e a de neuroesfera (3D), a qual é enriquecida com marcadores de CTGs. Nossos estudos indicam que PrP^C é capaz de regular a expressão e localização de CD44, assim como a expressão de EGFR em células U87. Ademais, ensaios de citometria de fluxo demonstram que outras proteínas de membrana, como NOTCH1, integrina $\alpha 6$ e CD133, apresentam redução da expressão na superfície celular de células KO quando comparamos com células WT. Dados de transcriptoma de células KO aqui descritos reforçam o papel de PrP^C na modulação da biologia do GB, sendo capaz de modular genes relacionados a proliferação, *stemness* e migração celular. De fato, ensaios funcionais corroboram esses dados, demonstrando que a perda de PrP^C leva a uma diminuição na proliferação, autorrenovação e migração em GB. Sendo assim, os resultados aqui descritos reforçam o papel de PrP^C como uma proteína-chave na manutenção do GB e CTGs, e com um potencial terapêutico.

Palavras-chave: Glioblastoma. Proteína prion celular. Células-tronco de glioblastoma. Migração. Invasão.

ABSTRACT

Prado, M. B. **Prion protein as a stemness regulator in glioblastoma stem cells: its role in the formation and function of multiprotein signaling platforms.** 2023. 112 f. Thesis (Ph D. in Life Systems Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Glioblastoma multiforme (GB) is a tumor composed of glial cells, being the most common and malignant type of glioma, with high rates of recurrence and mortality. Additionally, certain aspects of GB make its complete surgical removal difficult, such as the fact that it grows in regions of the brain that are difficult to access and its diffuse growth pattern, without defined borders. Studies have shown that GB is maintained by a stem cell-like subpopulation called glioblastoma stem cells (GSCs). These cells self-renew, promote angiogenesis and invasion, and are also chemo- and radio-resistant. Thus, GSCs have significant potential as a therapeutic target for the treatment of glioblastomas. Recent studies have shown that the cellular prion protein (PrP^C) emerges as a key factor in the maintenance of GB and GSCs. PrP^C plays an important role as a scaffold protein, being able to interact with several other membrane and extracellular matrix proteins, forming complexes capable of regulating different functions in tumor biology. In this study, we generated U87 and U251 PrP^C knockout (KO) cells using the CRISPR-Cas9 method, which are cultured in two different conditions, the monolayer, which recapitulates the bulk of the tumor, and the neurosphere, which is enriched with GSCs markers. Our studies indicate that PrP^C is able to regulate CD44 expression and localization, as well as EGFR expression in U87 cells. Furthermore, flow cytometry assays demonstrate that other membrane proteins, such as NOTCH1, Integrin α 6 and CD133, show a difference in cell surface expression when comparing WT and KO cells. Transcriptome data from KO cells described here reinforce the role of PrP^C in modulating GB biology, being able to modulate genes related to cell proliferation, stemness and migration. Indeed, functional assays corroborate these data, demonstrating that the loss of PrP^C leads to a decrease in proliferation, self-renewal and migration in GB. Therefore, the results described here reinforce the role of PrP^C as a key protein in the maintenance of GB and GSCs, and with a therapeutic potential not yet studied.

Keywords: Glioblastoma. Cellular prion Protein. Glioblastoma stem cells. Migration. Invasion.

1. Introdução

1.1 Glioblastoma

O Glioblastoma (GB) é um tumor do sistema nervoso central altamente agressivo, derivado de células da glia (HANIF *et al.*, 2017). Além disso, pode ser dividido entre tumor primário (~90% dos casos), quando seu aparecimento se dá sem nenhuma evidência patológica ou histológica de uma lesão precursora, ou secundário, quando progride a partir de um astrocitoma de menor grau (OHGAKI; KLEIHUES, 2013). É importante ressaltar que a doença apresenta uma série de sintomas debilitantes, como dores de cabeça, epilepsia, déficit motor, problemas de fala, entre outros (DAVIS, 2016). A média de sobrevivência dos pacientes é de 12 a 15 meses, com menos de 5% excedendo 5 anos de vida pós diagnóstico (CHEN *et al.*, 2021). Um dos fatores que contribuem para essa alarmante realidade é a alta taxa de recorrência do tumor, que ocorre em praticamente todos os pacientes (BIRZU *et al.*, 2021). O tratamento mais utilizado atualmente, a temozolomida, foi aprovada para uso nos Estados Unidos em 1999 e, apesar de todos esses anos, ainda é considerado o padrão ouro contra essa doença, o que reforça a urgência no desenvolvimento de novas terapias (MUTTER; STUPP, 2006). Os transportadores ABC, envolvidos no transporte ativo de drogas pela membrana plasmática, também possuem um papel importante na manutenção da resistência a terapias convencionais que o GB apresenta, sendo positivamente regulados na barreira hematoencefálica (LIN *et al.*, 2014).

A agressividade do GB está associada a características como alta heterogeneidade celular, proliferação microvascular, necrose, hemorragia e padrão de crescimento difuso (AGNIHOTRI *et al.*, 2013). Enquanto que a alta heterogeneidade do tumor restringe a eficácia dos tratamentos, seu padrão de crescimento difuso impossibilita a remoção completa do tumor. De certo, apesar da recidiva tumoral ser comum em local próximo ao do sítio inicial, graças a sua alta capacidade invasiva, não é incomum que o reaparecimento do GB se dê em locais mais distantes no cérebro (JIANG *et al.*, 2020). Também é importante ressaltar a barreira hematoencefálica e os desafios de se realizar uma cirurgia em um órgão tão sensível como o cérebro como contribuintes para o pior prognóstico da doença (LÖBER-HANDWERKER *et al.*, 2022;

LUO; SHUSTA, 2020). Sendo assim, atualmente não existem terapias eficazes contra o GB.

Dado o perfil altamente heterogêneo do GB, ele também pode ser dividido em subtipos de acordo com seu perfil molecular. Entretanto, é importante ressaltar que com o avanço das técnicas de sequenciamento, a divisão do GB passou por uma série de reconsiderações. A primeira classificação mais amplamente utilizada foi proposta por Verhaak et al. em 2010 e consiste na divisão em 4 subtipos de acordo com a expressão de genes como CD44, SOX2, EGFR e TP53: proneural, neural, clássico e mesenquimal (VERHAAK *et al.*, 2010). Em 2017 Wang *et al.* revisa os subtipos propostos, e sugere que o subtipo neural se trataria de células não-tumorais presentes no microambiente tumoral (WANG *et al.*, 2017) (Tabela 1). Interessantemente, o subtipo do GB teria implicações no tratamento e sobrevida do paciente, uma vez que, enquanto Wang et al. mostrou que a sobrevida dos pacientes com o subtipo mesenquimal, clássico e proneural eram de 11.5, 14.7, e 17.0 meses, respectivamente, Teo *et al.* mostrou que o subtipo proneural respondia melhor ao tratamento por temozolomida do que radioterapia (TEO *et al.*, 2019). Em 2016 a Organização Mundial de Saúde (WHO) dividiu o GB de acordo com a expressão do gene IDH (isocitrato desidrogenase), surgindo então dois subtipos: IDH selvagem (*wild-type*) e IDH mutante (LOUIS *et al.*, 2016). Assim como na outra classificação, esses subtipos reagem de forma diferente aos tratamentos, com os tumores IDH mutantes sendo mais responsivos à temozolomida e possibilitando uma maior sobrevida do paciente (ZHANG *et al.*, 2020). A complexidade de se dividir o GB em diferentes grupos ao longo dos anos ajuda a ilustrar a grande heterogeneidade das células presentes nesse tumor.

VERHAAK et al., 2010		Proneural	Neural	Clássico	Mesenquimal
	Assinatura gênica	PDGFRA, OLIG2, DDL3, SOX2, NKX2-2	MBP/MAL, NEFL, SLC12A5, SYT1, GABRA1	EGFR, AKT2, SMO, GAS1, GLI2, NOTCH3, JAG1, LFNG	YKL40, MET, CD44, MERTYK, TRADD, RELB, TNFRSF1A
	Genes mutados	TP53, PI3K, IDH1, PDGFRA		PTEN, CHKN2, PDGFRA	NF-κB, NF1
WANG et al., 2017		Proneural	Neural	Clássico	Mesenquimal
	Origem celular	Célula tumoral	Célula não-tumoral	Célula tumoral	Célula tumoral

Tabela 1. Classificação de subtipos de GB de acordo com Verhaak et al. e Wang et al. Adaptado de (ZHANG *et al.*, 2020).

1.2 Migração e invasão celular em glioblastoma

Como mencionado previamente, o padrão de crescimento difuso de gliomas de alto grau representa um importante obstáculo para a remissão tumoral, além de ser considerado um *hallmark* do GB (NØRØXE; POULSEN; LASSEN, 2016). Dessa forma, um maior entendimento sobre os processos envolvidos na modulação da migração em GB pode auxiliar no desenvolvimento de novas terapias. O processo de migração celular pode ser dividido em 5 etapas, sendo caracterizadas por: estabelecimento da polaridade celular; extensão da borda dianteira, levando a formação de lamelipódios; adesão da borda dianteira a matriz extracelular (MEC); contração celular; retração da borda posterior da célula mediante destacamento da MEC, com o auxílio de metaloproteinases (SEETHARAMAN; ETIENNE-MANNEVILLE, 2020). Sendo assim, a migração celular é um processo que consiste em diversas etapas intrinsecamente relacionadas com a MEC na qual a célula se encontra e, portanto, a capacidade das células de degradar e interagir com a MEC é essencial (SO; KIM; HAN, 2021).

Moléculas como ácido hialurônico, lamininas, tenascinas e seus parceiros são alguns componentes da MEC que ativamente participam do processo de migração celular (JÄRVELÄINEN *et al.*, 2009). O ácido hialurônico (HA), por exemplo, é mais

expresso no nicho tumoral do GB do que nas células do parênquima adjacente, e está correlacionado com um pior prognóstico do paciente (LIM *et al.*, 2017). Além disso, estudos indicam que o HA tem um efeito dose-dependente na migração de GB (LIM *et al.*, 2017; PIBUEL *et al.*, 2021). O receptor de membrana CD44 é um dos principais parceiros de HA, tendo um papel importante na invasão do GB ao longo dos *white matter tracts* (*corpo caloso*), enquanto as integrinas auxiliam na migração ao longo de vasos sanguíneos (Figura 1) (MAIR; AMES; LI, 2018; SEKER-POLAT *et al.*, 2022). O papel de CD44 na adesão celular em tumores é bem descrito, e diversos estudos demonstram uma correlação entre a expressão de CD44 e o potencial de adesão e invasivo do GB *in vitro* (MOONEY *et al.*, 2016). Adicionalmente, dados recentes elucidam um novo mecanismo de adesão e invasão em GB, onde há a formação de microtentáculos ricos em CD44, que auxiliam na navegação das células pela MEC rico em HA do cérebro (WOLF *et al.*, 2020). Sendo assim, CD44 vem emergindo como um potencial alvo terapêutico para o retardo da disseminação do GB no tecido cerebral, e um maior entendimento sobre modulação da expressão e localização de tal proteína no tumor é de grande valia para o desenvolvimento de novos tratamentos.

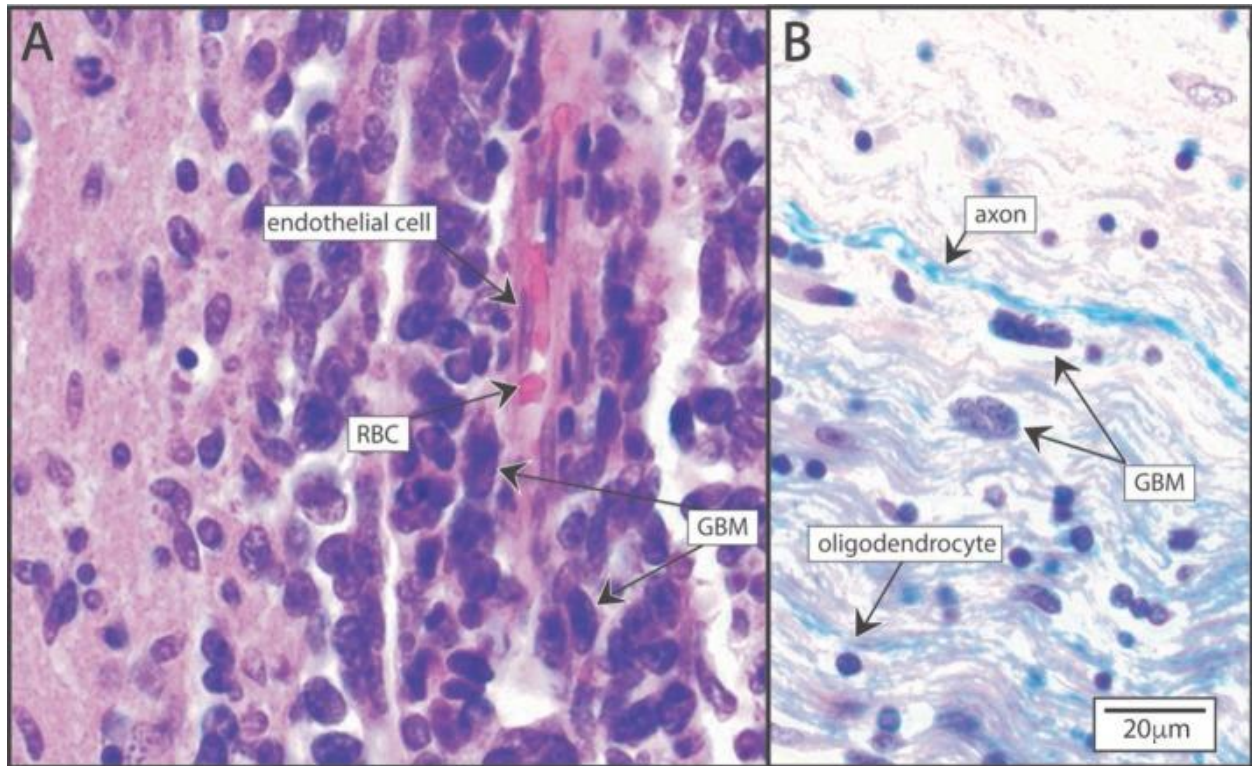


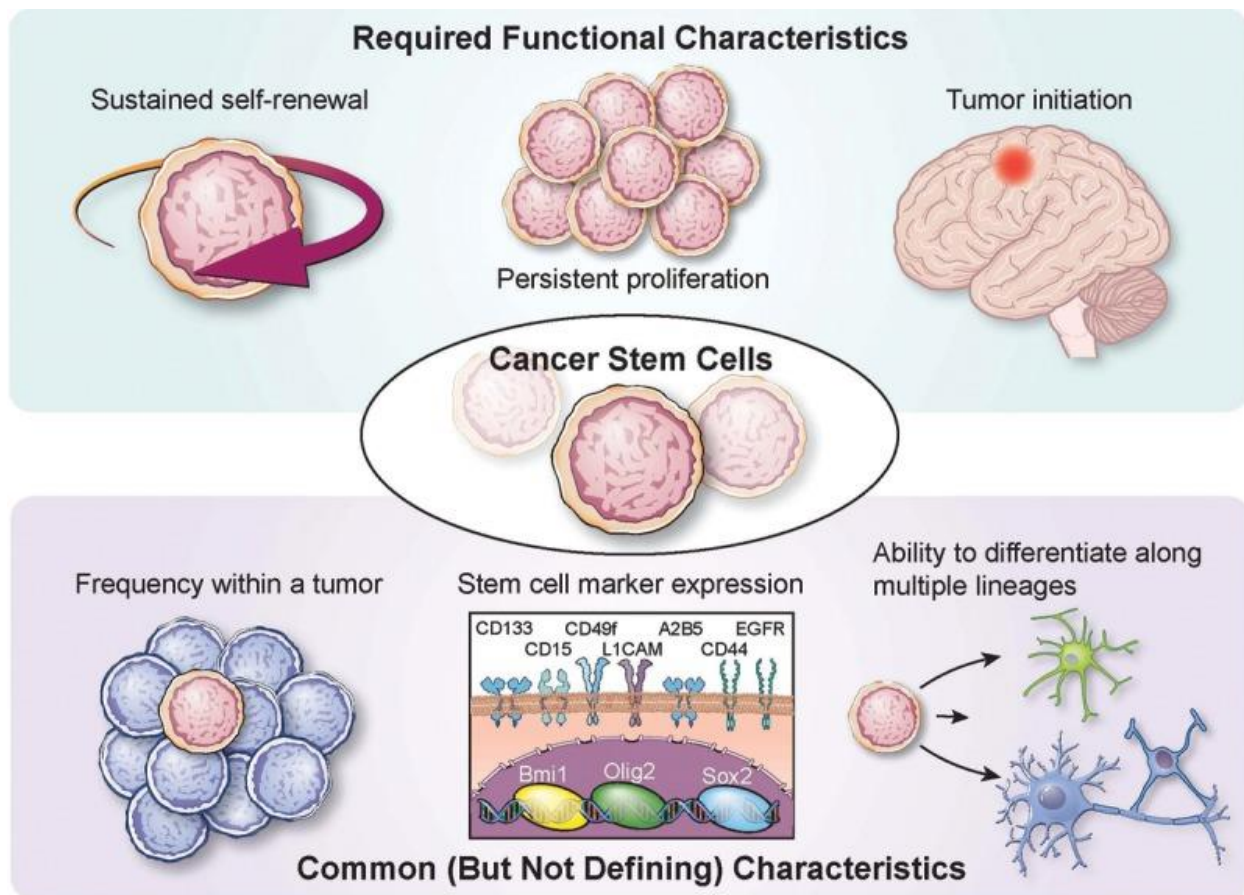
Figura 1. Corte histológico mostrando os diferentes padrões de migração do GB pelo tecido cerebral. A. Migração ao longo dos vasos sanguíneos (coloração usando hematoxilina e eosina). **B.** Infiltração de GB ao longo dos axônios. As células migrando apresentam uma morfologia mais alongada (coloração usando Luxol, hematoxilina e eosina). Imagem por Mair et al., 2018 (MAIR; AMES; LI, 2018).

1.3 Células-tronco de glioblastoma

Muitos estudos sugerem que tumores seriam mantidos por uma pequena subpopulação de células com características similares a células-tronco, que no caso do GB são denominadas células-tronco de glioblastoma (CTGs) (LATHIA *et al.*, 2015). Dados da literatura indicam que essas células podem se originar do acúmulo de mutações em células-tronco neurais, levando a uma transformação oncogênica e formação de tumor (Esquema 1) (LOBO *et al.*, 2007; SANAI; ALVAREZ-BUYLLA; BERGER, 2005). Sendo assim, não é de se surpreender que modelos murinos e análises de estudos clínicos apontem para o surgimento do GB na região da zona subventricular (ZSV), nicho rico em precursores neurais (GOFFART; KROONEN; REGISTER, 2013).

Adicionalmente, essas células são capazes de dar início a um novo tumor quando injetadas *in vivo* (GOFFART; KROONEN; REGISTER, 2013).

Além de expressarem marcadores de células-tronco, como CD133, CD44 e SOX2, as CTGs também possuem alta capacidade de autorrenovação, diferenciação em fenótipos neuronais, e de promover angiogênese e migração celular, colaborando para a invasividade, malignidade e sobrevivência do GB (FLORIO; BARBIERI, 2012; IGLESIA *et al.*, 2017). Estudos indicam que as células-tronco tumorais possuem um fenótipo altamente invasivo quando comparadas com as células do *bulk* tumoral, provavelmente devido a um aumento na expressão de genes envolvidos na mobilidade nuclear (THOMAS *et al.*, 2016). As CTGs também são resistentes à terapia convencional, como quimio e radioterapia, sendo responsáveis pelas altas taxas de recorrência e mortalidade do tumor (PRIETO-VILA *et al.*, 2017). Em resumo, o conhecimento aprofundado da biologia de CTGs é de grande importância para auxiliar a elucidação dos mecanismos que governam a manutenção do GB, uma vez que estas células apresentam significativo potencial como alvo terapêutico.



Esquema 1. Desenhos esquemático com as características das CTGs comumente descritas na literatura. Células-tronco tumorais são capazes de se autorrenovar, dão origem a células altamente proliferativas e são capazes de dar origem ao tumor quando injetadas *in vivo*. Outras características comuns são a baixa frequência no tumor, expressão de marcadores de células-tronco e a habilidade de se diferenciar em diferentes linhagens celulares. Imagem de Lathia et al., 2015 (LATHIA *et al.*, 2015).

1.4 Proteína prion celular

Nosso grupo vem descrevendo o papel da proteína prion celular (PrP^C) na biologia de GB e CTGs (IGLESIA *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2015). PrP^C é uma proteína ancorada por GPI (glicosilfosfatidilinositol) encontrada na membrana plasmática e altamente expressa em células do sistema nervoso (LOPES *et al.*, 2015). Dada a capacidade de PrP^C de interagir com múltiplas proteínas diferentes, estudos indicam que PrP^C é capaz de agir como uma *scaffold protein*, formando plataformas multi-proteicas de sinalização na superfície celular, e assim modular diferentes vias de sinalização (LINDEN, 2017).

Além disso, o mal dobramento da proteína de PrP^C em PrP^{Sc} -proteína prion scrapie, isoforma infecciosa), leva ao desenvolvimento de encefalopatias espongiformes transmissíveis, também conhecidas como doenças por prions (TEE; LONGORIA IBARROLA; GESCHWIND, 2018). Curiosamente, o PrP^{Sc} induz o mal dobramento de PrP^C, propagando-se, e então levando ao seu acúmulo e dando origem a doenças neurodegenerativas. Estudos recentes demonstram a importância de PrP^C na autorrenovação de precursores neurais derivados de cérebro fetal (SANTOS *et al.*, 2011) e pós-natal (PRODRONIDOU *et al.*, 2014) em camundongos, uma vez que foi verificada uma menor formação de neuroesferas em células derivadas de camundongos nocaute (KO) para PrP^C. Além disso, foi demonstrado que existe uma correlação direta entre os níveis de expressão de PrP^C e a taxa de proliferação de precursores neurais na ZSV e no giro denteado (GD), principais nichos neurogênicos de encéfalo adulto murino (STEELE *et al.*, 2006).

1.5 Proteína prion celular e marcadores tumorais

Diversos dados apontam uma forte relação entre a expressão de PrP^C, a tumorigênese e a manutenção de diversos tumores (KUBOTA *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011), uma vez que PrP^C pode estar envolvida na proteção contra apoptose e drogas anti-tumorais (LI *et al.*, 2009). Além disso, PrP^C é capaz de interagir fisicamente com P-gp (proteína da família dos transportadores ABC) em câncer de mama resistente a tratamento, tendo um papel importante na proteção contra apoptose nesse tipo de tumor (LI *et al.*, 2009). Tendo em vista o papel de PrP^C como uma *scaffold protein*, estudos recentes demonstram que tal proteína é capaz de formar um complexo com o receptor de NOTCH1, receptor envolvido com diferenciação celular em células tumorais pancreáticas, sendo capaz de regular a estabilidade e estimular a ativação de Notch, aumentando a proliferação e invasividade celular *in vitro* (WANG *et al.*, 2016). Interessantemente, um estudo realizado com células neuroepiteliais murinas demonstra que a diminuição da expressão de PrP^C também diminui a ativação da via de Notch e genes relacionados e, além disso, PrP^C também é capaz de modular a via de EGFR através da via de Notch (MARTIN-LANNERÉE *et al.*, 2017). Dados do nosso grupo

corroboram dados da literatura que demonstram que CTGs com depleção parcial de PrP^C (KD) apresentam diminuição significativa na expressão de SOX2 e NANOG, marcadores característicos de células-tronco (CORSARO *et al.*, 2016; IGLESIA *et al.*, 2017). Notavelmente, existe uma maior expressão de NANOG em CTGs resistentes à radioterapia (JUN; BRONSON; CHAREST, 2014), e a diminuição da expressão de SOX2 em CTGs está relacionada com a perda da capacidade tumorigênica *in vivo* e com a diminuição do crescimento celular (GANGEMI *et al.*, 2009). Ademais, dados do nosso grupo indicam uma possível interação entre PrP^C e CD133, uma vez que essas moléculas co-localizam e são co-expressas na membrana plasmática de CTGs (IGLESIA *et al.*, 2017).

A expressão de CD133 em CTGs está relacionada com a resistência a tratamentos como a radioterapia e a temozolomida (SONG *et al.*, 2016), e com a capacidade de recapitular o tumor inicial *in vivo* (JOO *et al.*, 2008). Dados evidenciam que uma maior expressão de CD133 em GB está associada com um pior prognóstico do paciente (ZHANG *et al.*, 2016), demonstrando a importância de um maior entendimento sobre o mecanismo de regulação de CD133 em tais células. Um estudo recente conseguiu elucidar um dos possíveis papéis de CD133 na regulação de IL-1 β em GB, o que leva a um aumento na expressão de quimiocinas e um maior recrutamento de neutrófilos *in vitro* e *in vivo* (LEE *et al.*, 2017). Notavelmente, a inibição da expressão de Notch gera uma diminuição na expressão de CD133 e nestina em CTGs, fazendo com que tais células percam a capacidade de gerar colônias *in vitro* e tumores *in vivo* (FAN *et al.*, 2010). Interessantemente, dados demonstram que L1CAM, uma molécula de adesão celular neuronal, descrita previamente como potencial ligante de PrP^C (MEHRABIAN *et al.*, 2015) é requerida na manutenção do crescimento e sobrevivência de células CD133⁺ *in vitro* e *in vivo* (BAO *et al.*, 2008). Além disso, estudos demonstram que CD133 é capaz de ativar a via de MAPK/Erk em células-tronco tumorais de fígado (DING *et al.*, 2009) e GB (DONG *et al.*, 2010).

A via de MAPK/Erk está relacionada com diversas funções em células tumorais, como a proliferação em tumor de mama (LI *et al.*, 2015) e GB (RAMASWAMY; NANJIAH; BORKOTOKEY, 2019), a invasividade em tumores gástricos (CHEN *et al.*,

2014) e de pulmão (YANG *et al.*, 2015), além da capacidade de promover a angiogênese em tumores pancreáticos (LIU *et al.*, 2016) e colorretais (DING *et al.*, 2016). Recentemente, nosso grupo demonstrou que a ativação da via MAPK/Erk é essencial na proliferação de GB mediada por PrP^C e seu ligante ST11 (Stress Inducible Protein 1) (LOPES *et al.*, 2015). Adicionalmente, estudos indicam que PrP^C poderia ser capaz de recrutar localmente e ativar o receptor de EGF (EGFR, receptor do fator de crescimento epidermal), que por sua vez ativaria a via de MAPK/Erk (MONNET *et al.*, 2004). Seu ligante EGF, além de possuir um papel na ativação da via de MAPK/Erk, também está envolvido na modulação do perfil invasivo de células-tronco tumorais através da modulação da formação de protruções e da capacidade de motilidade nuclear (THOMAS *et al.*, 2016). A via de Notch também interage com EGFR, regulando a autorrenovação de células-tronco neurais adultas (AGUIRRE; RUBIO; GALLO, 2010). Observamos um aumento da expressão de PrP^C e, principalmente, de CD133 em cultura de neuroesferas tratadas com EGF (fator de crescimento epidermal) quando comparadas às células cultivadas em monocamada, indicando que tal fator possui um papel importante como mediador do aumento da expressão de CD133 na superfície celular dependente de PrP^C (IGLESIA *et al.*, 2017). Ensaios de imunoprecipitação realizados em células de tumor pancreático demonstram que CD133 é capaz de interagir fisicamente com EGFR, e que a inibição do receptor é capaz de diminuir a atividade de CD133 (WENG *et al.*, 2016).

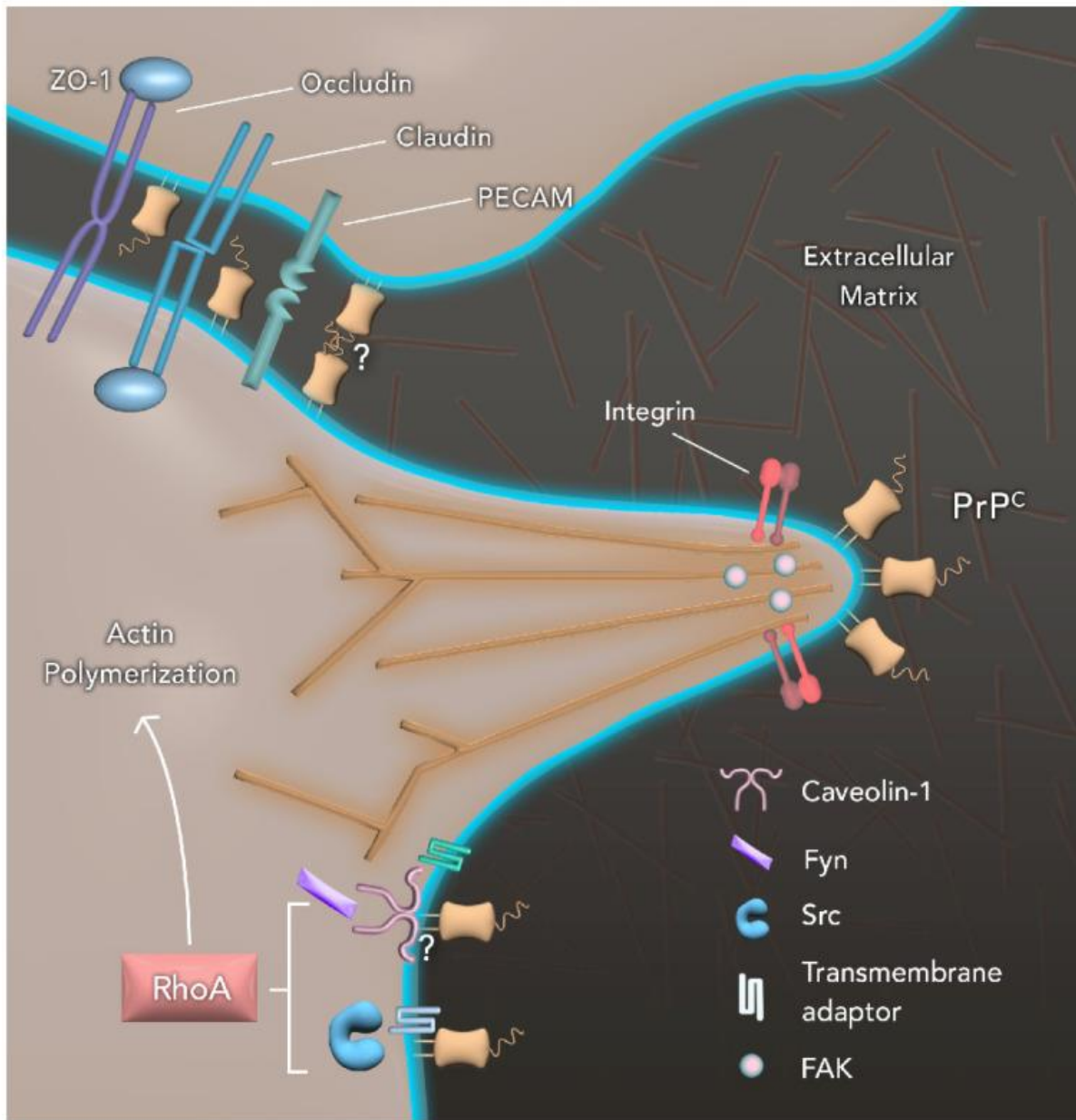
A proteína CD44, já comentada anteriormente, é uma glicoproteína envolvida em interações célula-célula, sendo um conhecido marcador de células-tronco tumorais, e sua expressão em GB promove tumorigênese através da interação com o microambiente tumoral (MOONEY *et al.*, 2016). Interessantemente, a inibição de CD44 em GB levou a uma diminuição do potencial invasivo do tumor *in vitro* (MERZAK; KOOCHECKPOUR; PILKINGTON, 1994). Estudos recentes mostram uma co-expressão e co-localização de PrP^C e CD44 em tumores de mama resistentes a tratamento (CHENG *et al.*, 2014). Adicionalmente, o mesmo estudo demonstra que a interação entre PrP^C e CD44 teria um papel importante na regulação de proteínas envolvidas com o ciclo celular, como CDK4 e CDK6. Além disso, CD44 é capaz de interagir com ácido hialurônico e promover a migração de células-tronco murinas e metástases (MATTHEOLABAKIS *et al.*, 2015), assim como PrP^C também é capaz de interagir com ácido hialurônico na matriz

extracelular (PAN *et al.*, 2002). Em tumores de mama, tanto CD44 quanto PrP^C interagem com e são clivadas pela mesma metaloproteinase, a ADAM10 (CHENG *et al.*, 2021). ADAM10 também possui um papel no endereçamento dessas proteínas para o núcleo, e sua expressão está relacionada com um pior prognóstico da doença (CHENG *et al.*, 2021). De maneira interessante, CD44, assim como PrP^C, interagem com P-gp, um transportador da família ABC, contribuindo para o potencial invasivo de células resistentes a tratamento (LI *et al.*, 2009).

1.6 Proteína prion celular e migração celular

O processo de migração celular é complexo, e requer a sincronização de diversos complexos multi-proteicos para funcionar corretamente. Sendo assim, não é de se estranhar que uma *scaffold protein* como PrP^C teria um papel importante nesse processo. Estudos demonstram que a PrP^C é capaz de modular o crescimento de neuritos e a orientação dos axônios (WULF; SENATORE; AGUZZI, 2017). Além disso, a expressão de PrP^C consegue de afetar o tamanho dos cones de crescimento de neuritos, acumulando-se nas regiões de filopódios (KOHTARO MIYAZAWA; EMMERLING; MANUELIDIS, 2014). Interessantemente, PrP^C também é capaz de acumular em microdomínio de membrana, ativando a Src-kinase Fyn e a proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), proteínas essenciais para a formação de adesões focais (Esquema 2) (PRADO *et al.*, 2020). Ademais, dados do nosso grupo indicam um importante papel de PrP^C na invasividade tumoral através da modulação de proteínas de adesão celular como E-caderina e integrina $\alpha 6$ (IGLESIA *et al.*, 2017). A depleção de PrP^C também pode interferir na localização de β -catenina, proteína envolvida no processo de adesão celular (IGLESIA *et al.*, 2017), que por sua vez é capaz de interagir com o domínio citoplasmático de CD133, tendo uma importante função no crescimento de tumores (MAK *et al.*, 2012). Adicionalmente, estudos recentes vêm demonstrando a importância da integrina $\alpha 7$ como um potencial marcador para CTGs, tendo um papel fundamental na proliferação e invasão do GB (HAAS *et al.*, 2017). Ademais, PrP^C seria capaz de modular a agregação de integrinas $\beta 1$ em células progenitoras neuroepiteliais, permitindo a neuritogênese (LOUBET *et al.*, 2012).

Como comentado anteriormente, além de ser um marcador de células-tronco tumorais, CD44 também tem um importante papel na adesão e invasão do GB. Apesar de não terem estudos se aprofundando na correlação entre CD44 e PrP^C em tumores cerebrais, dados obtidos em diferentes tipos tumorais demonstram uma interação entre ambas as proteínas. Em tumores colorretais, populações PrP^{C+}/CD44⁺ possuem um maior potencial metastático quando comparados a populações PrP^{C-}/CD44⁺ (DU *et al.*, 2013). Adicionalmente, PrP^C e CD44 são super-expressos em tumores mama multi-resistentes, e a sua interação está relacionada a uma maior malignidade das células, assim como a uma menor resposta à quimioterapia (CHENG *et al.*, 2014).



Esquema 2. Desenho esquemático do papel de PrPC nos processos relacionados a motilidade celular. PrPC é capaz de ativar Fyn e Src e, conseqüentemente, RhoA, e assim promover a polimerização de actina e a formação de protrusões de membrana (como filopódios e lamelipódios). Adicionalmente, PrPC se acumula na ponta de filopódios em cones de crescimento e regiões de adesão célula-célula. Imagem de Prado et al., 2020 (PRADO *et al.*, 2020).

Diante de todos os dados apresentados, acreditamos que o papel de PrPC como *scaffold protein*, sendo capaz de recrutar proteínas essenciais para a manutenção do

GB, é de grande importância para o desenvolvimento de novas terapias-alvo e abordagens contra esse tipo de tumor tão agressivo. Sendo assim, é interessante elucidar como a PrP^C é capaz de regular e interagir com proteínas responsáveis por sustentar o estado indiferenciado de CTGs, assim como seu possível papel na invasão tumoral.

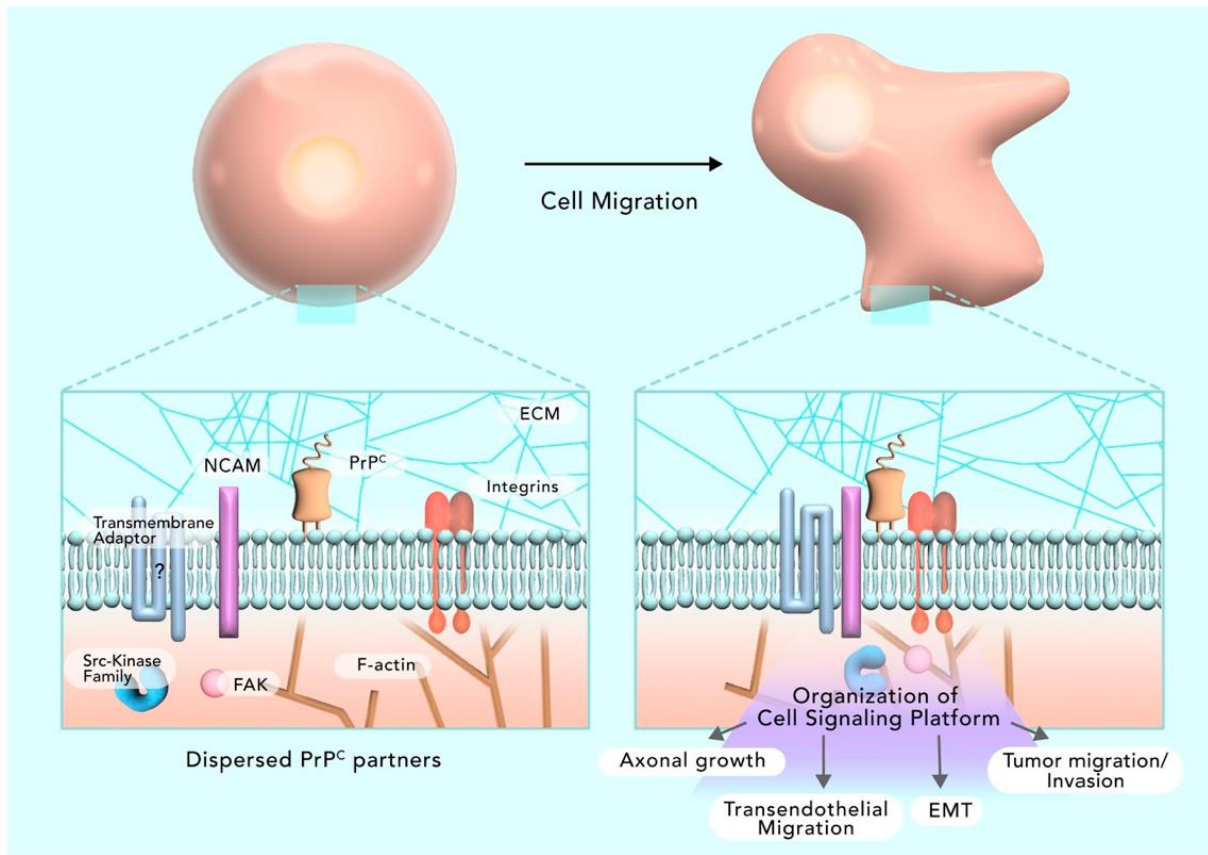
5 Conclusão

O GB é um tumor com alta taxa de mortalidade, que tem como base de sua agressividade uma subpopulação de células com características de células-tronco, assim como um padrão de crescimento invasivo. Nesse estudo olhamos para a PrP^C como um potencial alvo terapêutico capaz de agir nessas duas frentes. Nossos achados mostram que PrP^C é capaz de modular a localização e expressão de CD44, assim como os níveis transcricionais de diversos genes envolvidos na via de migração celular. Dessa forma, nossos dados complementam a literatura sobre o papel de PrP^C na modulação de processos de motilidade celular (Esquema 4), apontando CD44 como a possível proteína-chave envolvida nessa regulação. Ademais, PrP^C também é capaz de modular a expressão de EGFR, e outros genes envolvidos na modulação da proliferação celular. De fato, a super-expressão de EGFR é uma característica de diversos tipos tumorais, e a existência de uma plethora de tratamentos com essa proteína como alvo demonstra o seu grande potencial terapêutico (LI *et al.*, 2018). Quanto as proteínas responsáveis por manter o estado indiferenciado das CTGs, PrP^C é capaz de modular a expressão de SOX2, assim como a expressão na membrana plasmática de CD133, integrina $\alpha 6$, SSEA-1 e NOTCH1, e os níveis de transcritos de diversos outros genes. Uma nova vertente vem estudando o uso de terapias que visam combater especificamente as células-tronco tumorais (YANG *et al.*, 2020) e, portanto, PrP^C pode emergir como um potencial alvo terapêutico.

Esse estudo é pioneiro em mostrar a capacidade de PrP^C em modular a expressão e localização de CD44 em GB, tal como é o primeiro a observar o impacto de PrP^C na expressão de SOX2. Além disso, também demonstramos que PrP^C modula a invasão em GB. Adicionalmente, os dados de RNAseq aqui obtidos serão de grande valia não só

para os futuros projetos do grupo, como também para melhor entender o papel de PrP^C como possível alvo terapêutico.

Em vista dos dados aqui apresentados, é evidente que por PrP^C ser uma *scaffold protein* e, portanto, ser capaz de interagir com diversas moléculas, a pletera de vias que podem ser moduladas por ele é deveras abrangente. Ademais, em vista de estudos que demonstram que a perda da expressão de PrP^C não é letal (STEELE; LINDQUIST; AGUZZI, 2007), seu potencial terapêutico contra o GB e diversos outros tipos de tumores é inegável. De fato, os resultados aqui obtidos indicam que PrP^C tem um grande potencial no tratamento do GB, uma vez que é capaz de modular tanto o estado indiferenciado das CTGs, como os processos de migração e invasão em GB, dois dos grandes responsáveis pela sua alta mortalidade. Dessa forma, acreditamos ser indispensável o desenvolvimento de estudos explorando o potencial terapêutico dessa proteína, uma vez que isso pode trazer grandes benefícios para a sobrevivência dos pacientes com um tumor tão impiedoso. É importante ressaltar que os principais achados desta tese estão organizados em forma de manuscrito (Anexo 01) para submissão.



Esquema 4. Desenho esquemático mostrando papel da *scaffold protein* PrP^C na formação de uma plataforma de sinalização reguladora da motilidade celular. PrP^C é capaz de interagir com diferentes proteínas envolvidas em vias de migração, e assim regular crescimento axonal, migração transendotelial, transição epitélio mesênquima e invasão/migração tumoral. Imagem de Prado et al., 2020 (PRADO *et al.*, 2020).

REFERÊNCIAS*

AGNIHOTRI, S.; BURRELL, K. E.; WOLF, A.; JALALI, S.; HAWKINS, C.; RUTKA, J. T.; ZADEH, G. 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, 2013.

AGUIRRE, A.; RUBIO, M. E.; GALLO, V. Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. **Nature**, v. 467, n. 7313, p. 323–327, 2010.

ARIMA, T.; ENOKIDA, H.; KUBO, H.; KAGARA, I.; MATSUDA, R.; TOKI, K.; NISHIMURA, H.; CHIYOMARU, T.; TATARANO, S.; IDESAKO, T.; NISHIYAMA, K.; NAKAGAWA, M. Nuclear translocation of ADAM-10 contributes to the pathogenesis and progression of human prostate cancer. **Cancer Science**, v. 98, n. 11, p. 1720–1726, 2007.

BAO, S.; WU, Q.; LI, Z.; ... Targeting Cancer Stem Cells through L1CAM Suppresses Glioma Growth. **Cancer Res**, v. 68, n. 15, p. 6043–6048, 2008.

BENVEGNÙ, S.; RONCAGLIA, P.; AGOSTINI, F.; CASALONE, C.; CORONA, C.; GUSTINCICH, S.; LEGNAME, G. Developmental influence of the cellular prion protein on the gene expression profile in mouse hippocampus. **Physiological Genomics**, v. 43, n. 12, p. 711–725, 2011.

BIRZU, C.; FRENCH, P.; CACCESE, M.; CERRETTI, G.; IDBAIH, A.; ZAGONEL, V.; LOMBARDI, G. Recurrent glioblastoma: From molecular landscape to new treatment perspectives. **Cancers**, v. 13, n. 1, p. 1–29, 2021.

CHEN, H.; CHENG, Z. Y.; PAN, Y.; WANG, Z.; LIU, Y.; ZHANG, J. Q. RASAL1 influences the proliferation and invasion of gastric cancer cells by regulating the RAS/ERK signaling pathway. **Human Cell**, v. 27, n. 3, p. 103–110, 2014.

CHEN, W.; WANG, Y.; ZHAO, B.; LIU, P.; LIU, L.; WANG, Y.; MA, W. Optimal Therapies for Recurrent Glioblastoma: A Bayesian Network Meta-Analysis. **Frontiers in Oncology**, v. 11, n. March, p. 1–11, 2021.

CHENG, Y.; LIN, L.; LI, X.; LU, A.; HOU, C.; WU, Q.; HU, X.; ZHOU, Z.; CHEN, Z.; TANG, F. ADAM10 is involved in the oncogenic process and chemo-resistance of triple-negative breast cancer via regulating Notch1 signaling pathway, CD44 and PrPc. **Cancer Cell International**, v. 21, n. 1, p. 1–15, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12935-020-01727-5>>.

CHENG, Y.; TAO, L.; XU, J.; LI, Q.; YU, J.; JIN, Y.; CHEN, Q.; XU, Z.; ZOU, Q.; LIU, X. CD44/Cellular prion protein interact in multidrug resistant breast cancer cells and correlate with responses to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. **Molecular Carcinogenesis**,

v. 53, n. 9, p. 686–697, 2014.

CORBOY, M. J.; THOMAS, P. J.; WIGLEY, W. C. Aggresome formation. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 301, p. 305–327, 2005.

CORSARO, A.; BAJETTO, A.; THELLUNG, S.; BEGANI, G.; VILLA, V.; NIZZARI, M.; PATTAROZZI, A.; SOLARI, A.; GATTI, M.; PAGANO, A.; WÜRTH, R.; DAGA, A.; BARBIERI, F.; FLORIO, T. Cellular prion protein controls stem cell-like properties of human glioblastoma tumor-initiating cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 25, p. 38638–38657, 2016.

DAVIS, M. E. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment Mary. **Clin J Oncol Nurs.**, v. 20, n. 5, p. 33–44, 2016.

DING, C.; LI, L.; YANG, T.; FAN, X.; WU, G. Combined application of anti-VEGF and anti-EGFR attenuates the growth and angiogenesis of colorectal cancer mainly through suppressing AKT and ERK signaling in mice model. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2016.

DING, W.; MOUZAKI, M.; YOU, H.; ... CD133+ Liver Cancer Stem Cells from Methionine Adenosyl Transferase 1A–Deficient Mice Demonstrate Resistance to Transforming Growth Factor (TGF)- β –Induced Apoptosis. **Hepatology**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.

DONG, L.; QI, N.; GE, R. M.; CAO, C. L.; LAN, F.; SHEN, L. Overexpression of CD133 promotes the phosphorylation of Erk in U87MG human glioblastoma cells. **Neuroscience Letters**, v. 484, n. 3, p. 210–214, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2010.08.057>>.

DU, L.; RAO, G.; WANG, H.; LI, B.; TIAN, W.; CUI, J.; HE, L.; LAFFIN, B.; TIAN, X.; HAO, C.; LIU, H.; SUN, X.; ZHU, Y.; TANG, D. G.; MEHRPOUR, M.; LU, Y.; CHEN, Q. CD44-positive cancer stem cells expressing cellular prion protein contribute to metastatic capacity in colorectal cancer. **Cancer Research**, v. 73, n. 8, p. 2682–2694, 2013.

FAN, Q.-W.; CHENG, C.; GUSTAFSON, W. C.; ... EGFR phosphorylates tumor-derived EGFRvIII driving STAT3/5 and progression in glioblastoma. **Cancer cell**, v. 24, n. 4, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.

FAN, X.; KHAKI, L.; ZHU, T. S.; SOULES, M. E.; TALSMA, C. E.; GUL, N.; KOH, C.; ZHANG, J.; LI, Y.; MACIACZYK, J.; NIKKHAH, G.; DIMECO, F.; PICCIRILLO, S.; VESCOVI, A. L.;

EBERHART, C. G. NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. **Stem Cells**, v. 28, n. 1, p. 5–16, 2010.

FLORIO, T.; BARBIERI, F. The status of the art of human malignant glioma management: The promising role of targeting tumor-initiating cells. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 19–20, p. 1103–1110, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2012.06.001>>.

GANGEMI, R. M. R.; GRIFFERO, F.; MARUBBI, D.; PERERA, M.; CAPRA, M. C.; MALATESTA, P.; RAVETTI, G. L.; ZONA, G. L.; DAGA, A.; CORTE, G. SOX2 Silencing in Glioblastoma Tumor-Initiating Cells Causes Stop of Proliferation and Loss of Tumorigenicity . **Stem Cells**, v. 27, n. 1, p. 40–48, 2009.

GOFFART, N.; KROONEN, J.; ROGISTER, B. Glioblastoma-initiating cells: Relationship with neural stem cells and the micro-environment. **Cancers**, v. 5, n. 3, p. 1049–1071, 2013.

HAAS, T. L.; SCIUTO, M. R.; BRUNETTO, L.; VALVO, C.; SIGNORE, M.; FIORI, M. E.; DI MARTINO, S.; GIANNETTI, S.; MORGANTE, L.; BOE, A.; PATRIZII, M.; WARNKEN, U.; SCHNÖLZER, M.; CIOLFI, A.; DI STEFANO, C.; BIFFONI, M.; RICCI-VITIANI, L.; PALLINI, R.; DE MARIA, R. Integrin $\alpha 7$ Is a Functional Marker and Potential Therapeutic Target in Glioblastoma. **Cell Stem Cell**, v. 21, n. 1, p. 35- 50.e9, 2017.

HANIF, F.; MUZAFFAR, K.; PERVEEN, K.; MALHI, S. M.; SIMJEE, S. U. Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 1, p. 3–9, 2017.

IGLESIA, R. P.; PRADO, M. B.; CRUZ, L.; MARTINS, V. R.; SANTOS, T. G.; LOPES, M. H. Engagement of cellular prion protein with the co-chaperone Hsp70/90 organizing protein regulates the proliferation of glioblastoma stem-like cells. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2017.

JÄRVELÄINEN, H.; SAINIO, A.; KOULU, M.; WIGHT, T. N.; PENTTINEN, R. Extracellular matrix molecules: Potential targets in pharmacotherapy. **Pharmacological Reviews**, v. 61, n. 2, p. 198–223, 2009.

JIANG, H.; YU, K.; LI, M.; CUI, Y.; REN, X.; YANG, C.; ZHAO, X.; LIN, S. Classification of Progression Patterns in Glioblastoma: Analysis of Predictive Factors and Clinical Implications. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. November, p. 1–11, 2020.

JOO, K. M.; KIM, S. Y.; JIN, X.; SONG, S. Y.; KONG, D. S.; LEE, J. I.; JEON, J. W.; KIM, M. H.;

KANG, B. G.; JUNG, Y.; JIN, J.; HONG, S. C.; PARK, W. Y.; LEE, D. S.; KIM, H.; NAM, D. H. Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. **Laboratory Investigation**, v. 88, n. 8, p. 808–815, 2008.

JUN, H. J.; BRONSON, R. T.; CHAREST, A. Inhibition of EGFR Induces a c-MET Driven Stem Cell Population in Glioblastoma. **Stem Cells**, v. 32, n. 2, p. 617–636, 2014.

KOHTARO MIYAZAWA; EMMERLING, K.; MANUELIDIS, L. Proliferative arrest of neural cells induces prion protein synthesis, nanotube formation and cell-to-cell contacts. **J Cell Biochem.**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2014.

KUBOTA, H.; YAMAMOTO, S.; ITOH, E.; ABE, Y.; NAKAMURA, A.; IZUMI, Y.; OKADA, H.; IIDA, M.; NANJO, H.; ITOH, H.; YAMAMOTO, Y. Increased expression of co-chaperone HOP with HSP90 and HSC70 and complex formation in human colonic carcinoma. **Cell Stress and Chaperones**, v. 15, n. 6, p. 1003–1011, 2010.

LATHIA, J.; MACK, S.; MULKEARNS-HUBERT, E.; ... Cancer stem cells in glioblastoma. **GENES & DEVELOPMENT**, v. 104, n. 12, p. 1075–1079, 2015.

LEE, C. A. A.; BANERJEE, P.; WILSON, B. J.; WU, S.; GUO, Q.; BERG, G.; KARPOVA, S.; MISHRA, A.; LIAN, J. W.; TRAN, J.; EMMERICH, M.; MURPHY, G. F.; FRANK, M. H.; FRANK, N. Y. Targeting the ABC transporter ABCB5 sensitizes glioblastoma to temozolomide-induced apoptosis through a cell-cycle checkpoint regulation mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 22, p. 7774–7788, 2020.

LEE, S. Y.; KIM, J. K.; JEON, H. Y.; HAM, S. W.; KIM, H. CD133 regulates IL-1 β signaling and neutrophil recruitment in glioblastoma. **Molecules and Cells**, v. 40, n. 7, p. 515–522, 2017.

LI, H. Y.; LV, B. B.; BI, Y. H. FABP4 accelerates Glioblastoma cell growth and metastasis through Wnt10b signalling. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 22, p. 7807–7818, 2018.

LI, J.; LIANG, R.; SONG, C.; XIANG, Y.; LIU, Y. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in glioma patients. **OncoTargets and Therapy**, v. 11, p. 731–742, 2018.

LI, Q. Q.; CAO, X. X.; XU, J. D.; CHEN, Q.; WANG, W. J.; TANG, F.; CHEN, Z. Q.; LIU, X. P.; XU, Z. D. The role of P-glycoprotein/cellular prion protein interaction in multidrug-resistant breast cancer cells treated with paclitaxel. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 3, p.

504–515, 2009.

LI, Q. Q.; SUN, Y. P.; RUAN, C. P.; XU, X. Y.; GE, J. H.; HE, J.; XU, Z. De; WANG, Q.; GAO, W. C. Cellular prion protein promotes glucose uptake through the Fyn-HIF-2 α -Glut1 pathway to support colorectal cancer cell survival. **Cancer Science**, v. 102, n. 2, p. 400–406, 2011.

LI, T.; ZHANG, C.; DING, Y.; ZHAI, W.; LIU, K.; BU, F.; TU, T.; SUN, L.; ZHU, W.; ZHOU, F.; QI, W.; HU, J.; CHEN, H.; SUN, X. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells promote proliferation and migration in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells through activation of the ERK pathway. **Oncology Reports**, v. 34, n. 3, p. 1469–1477, 2015.

LI, W.; MA, H.; ZHANG, J.; ZHU, L.; WANG, C.; YANG, Y. Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-14364-2>>.

LI, W.; QIAN, L.; LIN, J.; HUANG, G.; HAO, N.; WEI, X.; WANG, W.; LIANG, J. CD44 regulates prostate cancer proliferation, invasion and migration via PDK1 and PFKFB4. **Oncotarget**, v. 8, n. 39, p. 65143–65151, 2017b.

LIM, E. J.; SUH, Y.; YOO, K. C.; LEE, J. H.; KIM, I. G.; KIM, M. J.; CHANG, J. H.; KANG, S. G.; LEE, S. J. Tumor-associated mesenchymal stem-like cells provide extracellular signaling cue for invasiveness of glioblastoma cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 1, p. 1438–1448, 2017.

LIN, F.; DE GOOIJER, M. C.; ROIG, E. M.; BUIL, L. C. M.; CHRISTNER, S. M.; BEUMER, J. H.; WEURDINGER, T.; BEIJNEN, J. H.; VAN TELLINGEN, O. ABCB1, ABCG2, and PTEN determine the response of glioblastoma to temozolomide and ABT-888 therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 10, p. 2703–2713, 2014.

LINDEN, R. The biological function of the prion protein: A cell surface scaffold of signaling modules. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. March, p. 1–19, 2017.

LIU, Y.; LI, F.; GAO, F.; XING, L.; QIN, P.; LIANG, X.; ZHANG, J.; QIAO, X.; LIN, L.; ZHAO, Q.; DU, L. Periostin promotes tumor angiogenesis in pancreatic cancer via Erk/VEGF signaling. **Oncotarget**, v. 7, n. 26, p. 40148–40148, 2016.

LLORENS, F.; CARULLA, P.; VILLA, A.; TORRES, J. M.; FORTES, P.; FERRER, I.; DEL RÍO, J. A. PrPC regulates epidermal growth factor receptor function and cell shape dynamics in Neuro2a cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 127, n. 1, p. 124–138, 2013.

LO, H. W.; HSU, S. C.; ALI-SEYED, M.; GUNDUZ, M.; XIA, W.; WEI, Y.; BARTHOLOMEUSZ,

G.; SHIH, J. Y.; HUNG, M. C. Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. **Cancer Cell**, v. 7, n. 6, p. 575–589, 2005.

LÖBER-HANDWERKER, R.; DÖRING, K.; BOCK, C.; ROHDE, V.; MALINOVA, V. Defining the impact of adjuvant treatment on the prognosis of patients with inoperable glioblastoma undergoing biopsy only: does the survival benefit outweigh the treatment effort? **Neurosurgical Review**, v. 45, n. 3, p. 2339–2347, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10143-022-01754-y>>.

LOBO, N. A.; SHIMONO, Y.; QIAN, D.; CLARKE, M. F. The biology of cancer stem cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 23, p. 675–699, 2007.

LOPES, M. H.; SANTOS, T. G.; RODRIGUES, B. R.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N.; CUNHA, I. W.; WASILEWSKA-SAMPAIO, A. P.; COSTA-SILVA, B.; MARCHI, F. A.; BLEGGI-TORRES, L. F.; SANEMATSU, P. I.; SUZUKI, S. H.; OBA-SHINJO, S. M.; MARIE, S. K. N.; TOULMIN, E.; HILL, A. F.; MARTINS, V. R. Disruption of prion protein-HOP engagement impairs glioblastoma growth and cognitive decline and improves overall survival. **Oncogene**, v. 34, n. 25, p. 3305–3314, 2015.

LOUBET, D.; DAKOWSKI, C.; PIETRI, M.; PRADINES, E.; BERNARD, S.; CALLEBERT, J.; ARDILA-OSORIO, H.; MOUILLET-RICHARD, S.; LAUNAY, J.; KELLERMANN, O.; SCHNEIDER, B. Neuritogenesis: the prion protein controls β 1 integrin signaling activity. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 2, p. 678–690, 2012.

LOUIS, D. N.; PERRY, A.; REIFENBERGER, G.; VON DEIMLING, A.; FIGARELLA-BRANGER, D.; CAVENEE, W. K.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; KLEIHUES, P.; ELLISON, D. W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, 2016.

LUO, H.; SHUSTA, E. V. Blood–brain barrier modulation to improve glioma drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 11, p. 1–12, 2020.

MACLEOD, G.; BOZEK, D. A.; RAJAKULENDRAN, N.; MONTEIRO, V.; AHMADI, M.; STEINHART, Z.; KUSHIDA, M. M.; YU, H.; COUTINHO, F. J.; CAVALLI, F. M. G.; RESTALL, I.; HAO, X.; HART, T.; LUCHMAN, H. A.; WEISS, S.; DIRKS, P. B.; ANGERS, S. Genome-Wide CRISPR-Cas9 Screens Expose Genetic Vulnerabilities and Mechanisms of Temozolomide Sensitivity in Glioblastoma Stem Cells. **Cell Reports**, v. 27, n. 3, p. 971- 986.e9, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.047>>.

MAIR, D. B.; AMES, H. M.; LI, R. Mechanisms of invasion and motility of high-grade gliomas in the brain. **Molecular Biology of the Cell**, v. 29, n. 21, p. 2509–2515, 2018.

MAK, A. B.; NIXON, A. M. L.; KITTANAKOM, S.; STEWART, J. M.; CHEN, G. I.; CURAK, J.; GINGRAS, A.; MAZITSCHKEK, R.; NEEL, G.; STAGLJAR, I.; MOFFAT, J. Regulation of CD133 by HDAC6 Promotes β -Catenin Signaling to Suppress Cancer Cell Differentiation. **Cell Rep**, v. 2, n. 4, p. 951–963, 2012.

MARTIN-LANNERÉE, S.; HALLIEZ, S.; HIRSCH, T. Z.; HERNANDEZ-RAPP, J.; PASSET, B.; TOMKIEWICZ, C.; VILLA-DIAZ, A.; TORRES, J. M.; LAUNAY, J. M.; BÉRINGUE, V.; VILOTTE, J. L.; MOUILLET-RICHARD, S. The Cellular Prion Protein Controls Notch Signaling in Neural Stem/Progenitor Cells. **Stem Cells**, v. 35, n. 3, p. 754–765, 2017.

MATTHEOLABAKIS, G.; MILANE, L.; SINGH, A.; AMIJI, M. M. Hyaluronic acid targeting of CD44 for cancer therapy: From receptor biology to nanomedicine. **Journal of Drug Targeting**, v. 23, n. 7–8, p. 605–618, 2015.

MEHRABIAN, M.; BRET HOUR, D.; WANG, H.; XI, Z.; ROGAEVA, E.; SCHMITT-ULMS, G. The prion protein controls polysialylation of neural cell adhesion molecule 1 during cellular morphogenesis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–23, 2015.

MERZAK, A.; KOOCHECKPOUR, S.; PILKINGTON. CD44 Mediates Human Glioma Cell Adhesion and Invasion in Vitro. **Cancer research**, p. 3988–3992, 1994.

MIRANDA, A.; PERICUESTA, E.; RAMÍREZ, M. Á.; GUTIERREZ-ADAN, A. Prion protein expression regulates embryonic stem cell pluripotency and differentiation. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

MONNET, C.; GAVARD, J.; MÈGE, R. M.; SOBEL, A. Clustering of cellular prion protein induces ERK1/2 and stathmin phosphorylation in GT1-7 neuronal cells. **FEBS Letters**, v. 576, n. 1–2, p. 114–118, 2004.

MOONEY, K. L.; CHOY, W.; SIDHU, S.; PELARGOS, P.; BUI, T. T.; VOTH, B.; BARNETTE, N.; YANG, I. The role of CD44 in glioblastoma multiforme. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 34, p. 1–5, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2016.05.012>>.

MUTTER, N.; STUPP, R. Temozolomide: A milestone in neuro-oncology and beyond? **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 6, n. 8, p. 1187–1204, 2006.

NØRØXE, D. S.; POULSEN, H. S.; LASSEN, U. Hallmarks of glioblastoma: A systematic

review. **ESMO Open**, v. 1, n. 6, p. 1–9, 2016.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. The definition of primary and secondary glioblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 4, p. 764–772, 2013.

PAN, T.; WONG, B. S.; LIU, T.; LI, R.; PETERSEN, R. B.; SY, M. S. Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans. **Biochemical Journal**, v. 368, n. 1, p. 81–90, 2002.

PIBUEL, M. A.; POODTS, D.; DÍAZ, M.; HAJOS, S. E.; LOMPARDÍA, S. L. The scrambled story between hyaluronan and glioblastoma. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, n. 46, p. 100549, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100549>>.

PRADO, M. B.; ESCOBAR, M. I. M.; ALVES, R. N.; COELHO, B. P.; FERNANDES, C. F. de L.; BOCCACINO, J. M.; IGLESIA, R. P.; LOPES, M. H. Prion protein at the leading edge: Its role in cell motility. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 1–18, 2020.

PRIETO-VILA, M.; TAKAHASHI, R. U.; USUBA, W.; KOHAMA, I.; OCHIYA, T. Drug resistance driven by cancer stem cells and their niche. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, 2017.

PRODRMIDOU, K.; PAPASTEFANAKI, F.; SKLAVIADIS, T.; MATSAS, R. Functional cross-talk between the cellular prion protein and the neural cell adhesion molecule is critical for neuronal differentiation of neural stem/precursor cells. **Stem Cells**, v. 32, n. 6, p. 1674–1687, 2014.

RAMASWAMY, P.; NANJIAH, N. D.; BORKOTOKEY, M. Role of MEK-ERK signaling mediated adhesion of glioma cells to extracellular matrix: Possible implication on migration and proliferation. **Annals of Neurosciences**, v. 26, n. 2, p. 52–56, 2019.

RYSKALIN, L.; BIAGIONI, F.; BUSCETI, C. L.; GIAMBELLUCA, M. A.; MORELLI, L.; FRATI, A.; FORNAI, F. The role of cellular prion protein in promoting stemness and differentiation in cancer. **Cancers**, v. 13, n. 2, p. 1–20, 2021.

SANAI, N.; ALVAREZ-BUYLLA, A.; BERGER, M. S. Mechanisms of disease: Neural stem cells and the origin of gliomas. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 8, p. 811–822, 2005.

SANTOS, T. G.; SILVA, I. R.; COSTA-SILVA, B.; LEPIQUE, A. P.; MARTINS, V. R.; LOPES, M. H. Enhanced neural progenitor/stem cells self-renewal via the interaction of stress-inducible protein 1 with the prion protein. **Stem Cells**, v. 29, n. 7, p. 1126–1136, 2011.

SEETHARAMAN, S.; ETIENNE-MANNEVILLE, S. Cytoskeletal Crosstalk in Cell Migration. **Trends in Cell Biology**, v. 30, n. 9, p. 720–735, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.06.004>>.

SEKER-POLAT, F.; DEGIRMENCI, N. P.; SOLAROGLU, I.; BAGCI-ONDER, T. Tumor Cell Infiltration into the Brain in Glioblastoma: From Mechanisms to Clinical Perspectives. **Cancers**, v. 14, n. 2, p. 443, 2022.

SHEN, J.; ZHANG, T.; CHENG, Z.; ZHU, N.; WANG, H.; LIN, L.; WANG, Z.; YI, H.; HU, M. Lycorine inhibits glioblastoma multiforme growth through EGFR suppression. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 1, p. 1–19, 2018a.

SHEN, M. W.; ARBAB, M.; HSU, J. Y.; WORSTELL, D.; CULBERTSON, S. J.; KRABBE, O.; CASSA, C. A.; LIU, D. R.; GIFFORD, D. K.; SHERWOOD, R. I. Predictable and precise template-free CRISPR editing of pathogenic variants. **Nature**, v. 563, n. 7733, p. 646–651, 2018b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0686-x>>.

SO, J. S.; KIM, H.; HAN, K. S. Mechanisms of Invasion in Glioblastoma: Extracellular Matrix, Ca²⁺ Signaling, and Glutamate. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 15, n. June, p. 1–10, 2021.

SONG, W. S.; YANG, Y. P.; HUANG, C. S.; LU, K. H.; LIU, W. H.; WU, W. W.; LEE, Y. Y.; LO, W. L.; LEE, S. D.; CHEN, Y. W.; HUANG, P. I.; CHEN, M. T. Sox2, a stemness gene, regulates tumor-initiating and drug-resistant properties in CD133-positive glioblastoma stem cells. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 79, n. 10, p. 538–545, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcma.2016.03.010>>.

STEELE, A. D.; EMSLEY, J. G.; ÖZDINLER, P. H.; LINDQUIST, S.; MACKLIS, J. D. Prion protein (PrP^c) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 9, p. 3416–3421, 2006.

STEELE, A. D.; LINDQUIST, S.; AGUZZI, A. The prion protein knockout mouse: a phenotype under challenge. **Prion**, v. 1, n. 2, p. 83–93, 2007.

TEE, B. L.; LONGORIA IBARROLA, E. M.; GESCHWIND, M. D. Prion Diseases. **Neurologic Clinics**, v. 36, n. 4, p. 865–897, 2018.

TEO, W. Y.; SEKAR, K.; SESHACHALAM, P.; SHEN, J.; CHOW, W. Y.; LAU, C. C.; YANG, H.

K.; PARK, J.; KANG, S. G.; LI, X.; NAM, D. H.; HUI, K. M. Relevance of a TCGA-derived Glioblastoma Subtype Gene-Classifer among Patient Populations. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

THELLUNG, S.; CORSARO, A.; BOSIO, A. G.; ZAMBITO, M.; BARBIERI, F.; MAZZANTI, M.; FLORIO, T. Emerging Role of Cellular Prion Protein in the Maintenance and Expansion of Glioma Stem Cells. **Cells**, v. 8, n. 11, 2019.

THOMAS, D.; THIAGARAJAN, P. S.; RAI, V.; REIZES, O.; LATHIA, J.; EGELHOFF, T. Increased cancer stem cell invasion is mediated by myosin IIB and nuclear translocation. **Oncotarget**, v. 7, n. 30, p. 47586–47592, 2016.

TIBURCIO, P. D. B.; LOCKE, M. C.; BHASKARA, S.; CHANDRASEKHARAN, M. B.; HUANG, L. E. The neural stem-cell marker CD24 is specifically upregulated in IDH-mutant glioma. **Translational Oncology**, v. 13, n. 10, p. 100819, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100819>>.

VAN HOOFF, A.; PARKER, R. Messenger RNA degradation: Beginning at the end. **Current Biology**, v. 12, n. 8, p. 285–287, 2002.

VERHAAK, R. G. W.; HOADLEY, K. A.; PURDOM, E.; WANG, V.; QI, Y.; WILKERSON, M. D.; MILLER, C. R.; DING, L.; GOLUB, T.; MESIROV, J. P.; ALEXE, G.; LAWRENCE, M.; O'KELLY, M.; TAMAYO, P.; WEIR, B. A.; GABRIEL, S.; WINCKLER, W.; GUPTA, S.; JAKKULA, L.; FEILER, H. S.; HODGSON, J. G.; JAMES, C. D.; SARKARIA, J. N.; BRENNAN, C.; KAHN, A.; SPELLMAN, P. T.; WILSON, R. K.; SPEED, T. P.; GRAY, J. W.; MEYERSON, M.; GETZ, G.; PEROU, C. M.; HAYES, D. N. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 98–110, 2010.

WANG, Q.; HU, B.; HU, X.; KIM, H.; SQUATRITO, M.; SCARPACE, L.; DECARVALHO, A. C.; LYU, S.; LI, P.; LI, Y.; BARTHEL, F.; CHO, H. J.; LIN, Y. H.; SATANI, N.; MARTINEZ-LEDESMA, E.; ZHENG, S.; CHANG, E.; SAUVÉ, C. E. G.; OLAR, A.; LAN, Z. D.; FINOCCHIARO, G.; PHILLIPS, J. J.; BERGER, M. S.; GABRUSIEWICZ, K. R.; WANG, G.; ESKILSSON, E.; HU, J.; MIKKELSEN, T.; DEPINHO, R. A.; MULLER, F.; HEIMBERGER, A. B.; SULMAN, E. P.; NAM, D. H.; VERHAAK, R. G. W. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. **Cancer Cell**, v. 32, n. 1, p. 42–56.e6, 2017.

WANG, Y.; YU, S.; HUANG, D.; CUI, M.; HU, H.; ZHANG, L.; WANG, W.; PARAMESWARAN, N.; JACKSON, M.; OSBORNE, B.; BEDOGNI, B.; LI, C.; SY, M. S.; XIN, W.; ZHOU, L. Cellular Prion Protein Mediates Pancreatic Cancer Cell Survival and Invasion through Association with and Enhanced Signaling of Notch1. **American Journal of Pathology**, v. 186, n. 11, p. 2945–2956, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.07.010>>.

WENG, C.-C.; KUO, K.-K.; SU, H.-T.; HSIAO, P.-J.; CHEN, Y.-W.; WU, D.-C.; HUNG, W.-C.; CHENG, K.-H. Pancreatic Tumor Progression Associated With CD133 Overexpression: Involvement of Increased TERT Expression and Epidermal Growth Factor Receptor–Dependent Akt Activation. **Pancreas**, v. 45, n. 3, p. 443–457, 2016.

WOLF, K. J.; SHUKLA, P.; SPRINGER, K.; LEE, S.; COOMBES, J. D.; CHOY, C. J.; KENNY, S. J.; XU, K.; KUMAR, S. A mode of cell adhesion and migration facilitated by CD44-dependent microtentacles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 21, 2020.

WULF, M. A.; SENATORE, A.; AGUZZI, A. The biological function of the cellular prion protein: An update. **BMC Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2017.

YANG, J.; KUANG, X. ru; LV, P. tian; YAN, X. xin. Thymoquinone inhibits proliferation and invasion of human non small-cell lung cancer cells via ERK pathway. **Tumor Biology**, v. 36, n. 1, p. 259–269, 2015.

YANG, L.; SHI, P.; ZHAO, G.; XU, J.; PENG, W.; ZHANG, J.; ZHANG, G.; WANG, X.; DONG, Z.; CHEN, F.; CUI, H. **Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy**. [s.l.] Springer US, 2020. v. 5

YIN, J.; ZHANG, H.; WU, X.; ZHANG, Y.; LI, J.; SHEN, J.; ZHAO, Y.; XIAO, Z.; LU, L.; HUANG, C.; ZHANG, Z.; DU, F.; WU, Y.; KABOLI, P. J.; CHO, C. H.; YUAN, D.; LI, M. CD44 inhibition attenuates EGFR signaling and enhances cisplatin sensitivity in human EGFR wild-type non-small-cell lung cancer cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 45, n. 6, p. 1783–1792, 2020.

ZHANG, P.; XIA, Q.; LIU, L.; LI, S.; DONG, L. Current Opinion on Molecular Characterization for GBM Classification in Guiding Clinical Diagnosis, Prognosis, and Therapy. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, n. September, p. 1–13, 2020.

ZHANG, W.; CHEN, H.; LV, S.; YANG, H. High CD133 Expression Is Associated with Worse Prognosis in Patients with Glioblastoma. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 4, p. 2354–2360,

2016.