



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Ana Carolina dos Santos

Identificação de células-tronco de Glioblastoma Multiforme Humano pela formação de neuroesferas em gotas suspensas

Florianópolis
2024

Ana Carolina dos Santos

Identificação de células-tronco de Glioblastoma Multiforme Humano pela formação de neuroesferas em gotas suspensas

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez

Florianópolis

2024

Santos, Ana Carolina dos
Identificação de células-tronco de Glioblastoma
Multiforme Humano pela formação de neuroesferas em gotas
suspensas / Ana Carolina dos Santos ; orientadora, Cláudia
Beatriz Nedel, coorientador, Ricardo Castilho Garcez,
2024.

57 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento,
Florianópolis, 2024.

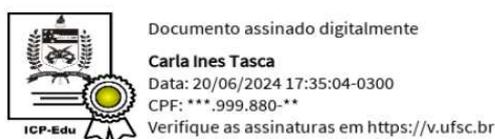
Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Biologia
Molecular. 3. Células-Tronco Cancerígenas. 4. Câncer. 5.
Glioblastoma. I. Nedel, Cláudia Beatriz. II. Garcez,
Ricardo Castilho. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
do Desenvolvimento. IV. Título.

Ana Carolina dos Santos

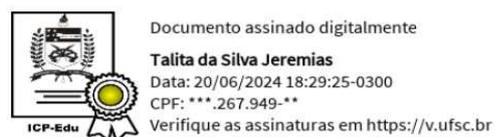
Identificação de células-tronco de Glioblastoma Multiforme Humano pela formação de neuroesferas em gotas suspensas

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 18 de junho de 2024 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:



Prof^ª. Dr^ª Carla Inês Tasca

Universidade Federal de Santa Catarina



Prof^ª. Dr^ª. Talita da Silva Jeremias

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar

Florianópolis, 2024

*Dedico este trabalho aos meus amados pais
e ao meu querido irmão*

AGRADECIMENTOS

A Deus, toda minha gratidão, por me permitir a conclusão deste trabalho, por toda a trajetória até aqui para conquistar, não apenas um título, mas a realização de um sonho.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), por todas as oportunidades que me foram abertas, pelo ensino de qualidade e público, por todo crescimento pessoal e carinho ao longo da trajetória. À CAPES, pela bolsa concedida, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento da pesquisa; ao corpo técnico-científico do LAMEB, por toda estrutura e aprendizado; ao RU, à BU e seus funcionários, sempre presentes no dia a dia; aos docentes e servidores do CCB, obrigada.

Esperarei alguns anos para dar o devido agradecimento a pessoa que me inspirou a seguir o caminho das ciências e ser pesquisadora, à minha “musa inspiradora”, Dr^a. Maria da Glória Bonecini Almeida, por me mostrar que mulheres podem fazer coisas incríveis, chegar mais longe buscando respostas, pelas suas palavras simples que me motivaram a estar aqui, serei eternamente grata por me apresentar a este mundo, muito obrigada!

À minha querida orientadora, Claudia, por me receber em seu laboratório. Por cada aprendizado, cada puxão de orelha, cada risada, cada lágrima e cada docinho que dividimos. Sou muito grata por ter me proporcionado tantas coisas boas, tantos desafios e por me mostrar seu amor pela ciência. Ao meu coorientador, Ricardo, por ter aceitado o desafio desse trabalho. Obrigada pelas ideias, pelo entusiasmo e por não se cansar das minhas milhares de perguntas, até as mais simples. Obrigada, eu amo vocês.

Aos meus colegas do LBCG, pela contribuição e parceria de todos. Agradeço especialmente ao Anderson, por me ensinar a segurar uma pipeta corretamente, e ao João por me acompanhar em cada etapa desde o começo. Obrigada pela paciência, pelo carinho, pelos aprendizados, pelas incontáveis risadas, pelos perrengues, e por me lembrarem que o caminho fica mais leve com os amigos.

À prof. Carla Tasca, por me receber no NQ4 e permitir que meus experimentos fossem realizados, assim como cada discussão e troca de conhecimentos. Aos colegas do NQ4, Bia, Tet, Gianni, Eduarda e Júlia, por tornarem a convivência e estresse do dia a dia suportáveis e divertidos, com muito mais do que ciência para levar para a vida. Aos amigos que o PPGBCD me deu, em especial ao Nerveson, Duda e Dani, por compartilharem os dias bons e ruins.

Aos colegas do LACERT, por me acolherem e dividirem a correria dos dias finais. Mais que um agradecimento à Nathali e ao Lucas, meu querido amigo desde o início, sem vocês não teria sido possível concluir este trabalho. Obrigada por cada dia ao lado de vocês ter sido

de muitos aprendizados, trocas de experiências e crescimento, pessoal e profissional. Desejo o melhor dessa vida para os dois.

Aos meus avós, Geni, Arlindo, Lúcia e Zezé (*In memoriam*), por abrir as portas e me ajudarem a construir o caminho para chegar até aqui. Por sempre terem investido seu amor e cuidado, e se fazerem presente. Por celebrar cada conquista e abraçar cada desafio que tive. Essa vitória é de vocês também. Às minhas meninas, Sofia e Sara, pelo seu amor incondicional.

Finalmente, àqueles a quem sou extremamente grata, de inúmeras formas, mas principalmente por fazerem parte da minha vida. Marie, obrigada por todas as vezes que me ouviu, inclusive por me deixar falar tantas vezes dos mesmos assuntos, por me apoiar e saber que sempre terei um lugar seguro para ir. Gui, sua amizade é tão preciosa que me faltam palavras para agradecer. Obrigada por estar tão presente, mesmo longe, e me entender quando nem eu entendo. São os melhores amigos que eu poderia ter. Artur, obrigada por acreditar em mim e “caminhar no escuro comigo”, todo seu apoio fez completamente a diferença nesse momento, sempre vou levar esse carinho. Eu amo vocês.

Aos meus queridos pais, Carlos e Érica, por serem quem são, por permitir que eu escolhesse seguir um caminho tão cheio de desafios e nunca terem desistido de mim. Mãe, espero que eu possa me tornar tão dedicada à vida como você, excelente em tudo que faz. É a minha maior inspiração. Pai(zinho), chegar até aqui é saber que você pode se orgulhar de um caminho que fizemos juntos; obrigada por não me deixar desistir de mim, e por acreditar mais do que eu. Ao meu irmão, Jonathan, por me abraçar com seu jeito único e sua força, que foram capazes de me fazer sentir em casa mesmo tão longe. Amo vocês, com todo meu amor.

Aos demais envolvidos direta e indiretamente na construção deste trabalho, obrigada.

“Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas.”

Marie Curie, 1903

RESUMO

O glioblastoma (GBM) é o tipo mais agressivo e letal de câncer cerebral, conhecido por seu rápido crescimento e resistência a tratamentos convencionais como cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Este estudo investiga as características das células de GBM em duas condições: culturas bidimensionais, que cobrem totalmente a superfície da garrafa em que foram cultivadas, e tridimensionais, com neuroesferas formadas em gota suspensa, que são usados para estudar a autorrenovação e diferenciação celular. A pesquisa foca em identificar células-tronco cancerígenas (CTCs), principais responsáveis pela recidiva do tumor, através de marcadores moleculares específicos. A formação das neuroesferas indica que podem existir CTCs na massa tumoral. Com isso, foi avaliada a proliferação celular em neuroesferas de três linhagens: GBM1, linhagem primária, A172 e U87, linhagens comerciais. As linhagens de GBM1 e A172 apresentaram níveis semelhantes de proliferação na condição de neuroesfera, enquanto U87 mostrou uma baixa proliferação celular em relação às demais linhagens. Após a formação das neuroesferas, o RNA mensageiro de GBM1 e U87 foram extraídos e dosados para identificar e comparar a expressão dos marcadores moleculares nas diferentes condições de cultivo. Foram selecionados marcadores característicos de CTCs, que incluem CDH2, MDR1, MSI2, NANOG e VIM, e são associados a funções como adesão intercelular, resistência a drogas, regulação da tradução de RNAs mensageiros, manutenção e autorrenovação de CTCs e características invasivas de células tumorais. As células em condições bidimensionais apresentaram níveis de expressão gênica menores do que as células em condições tridimensionais. Entretanto, as neuroesferas apresentam apenas um resultado preliminar, uma vez que estas não obtiveram uma dosagem de mRNA suficiente. O método de formação de neuroesferas em gotas suspensas mostrou-se relevante para compreender o comportamento celular no tumor, assim com a influência das CTCs, mas ainda há limitações, como a ausência de angiogênese. Os resultados ainda indicam a relevância do método de formação de neuroesferas, uma vez que as diferentes condições fisiológicas podem alterar o microambiente tumoral aumentando ou diminuindo a expressão de determinados marcadores que contribuem com a agressividade do GBM. O método pode se tornar um complemento nos estudos de células tumorais convencionais, indicando sua importância para pesquisas futuras.

Palavras-chave: Células-tronco cancerígenas; Gotas; Marcadores moleculares; Neuroesferas; Glioblastoma.

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is the most aggressive and lethal type of brain cancer, known for its rapid growth and resistance to conventional treatments such as surgery, radiotherapy, and chemotherapy. This study investigates the characteristics of GBM cells in two conditions: two-dimensional cells, which completely cover the surface of the bottle in which they were cultured, and neurospheres formed in a hanging drop, which are used to study cell self-renewal and differentiation. The research focuses on identifying cancer stem cells (CTCs), responsible for tumor recurrence, through specific molecular markers. The formation of neurospheres indicates that CTCs may exist in the tumor mass. With this, cell proliferation was evaluated in neurospheres of three strains: GBM1, primary strain, A172 and U87, commercial strains. The GBM1 and A172 strains showed similar levels of proliferation in the neurosphere condition, while U87 showed low cell proliferation compared to the other strains. After the formation of neurospheres, GBM1 and U87 RNA extracted and measured to identify and compare the expression of molecular markers in different culture conditions. Markers characteristic of CTCs selected, which include CDH2, MDR1, MSI2, NANOG and VIM, and are associated with functions such as intercellular adhesion, drug resistance, regulation of translation of messenger RNAs, maintenance and self-renewal of CTCs and invasive characteristics of tumor cells. Cells in two-dimensional conditions showed lower gene expression levels than cells in three-dimensional conditions. However, neurospheres only presented a preliminary result since they did not obtain a sufficient mRNA dosage. The method of neurosphere formation in hanging drops proved to be relevant for understanding cell behavior in the tumor, as well as the influence of CTCs, but there are still limitations, such as the absence of angiogenesis. The results also indicate the relevance of the neurosphere formation method, since different physiological conditions can alter the tumor microenvironment by increasing or decreasing the expression of certain markers that contribute to GBM aggressiveness. The method can become a complement in studies of conventional tumor cells, indicating its importance for future research.

Keywords: Cancer stem cells; Drops; Molecular markers; Neurospheres; Glioblastoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ressonância Magnética Intracraniana (MRI) de um paciente com GBM	18
Figura 2 - Representação esquemática das possíveis funções de CTCs	20
Figura 3 - Representação esquemática da formação de neuroesferas	28
Figura 4 - Representação da associação celular nas gotas.....	29
Figura 5 - Processo de formação de gota suspensa.....	30
Figura 6 - Formação de neuroesferas nas gotas.....	34
Figura 7 - Neuroesferas consolidadas.....	35
Figura 8 - Neuroesferas observadas ao microscópio invertido.....	36
Figura 9 - Proliferação celular de GBM1 em gotas suspensas.....	38
Figura 10 - Comparação entre grupos de GBM1 na proliferação celular.....	40
Figura 11 - Comparação entre médias das taxas de proliferação celular nas células de GBM1 em 24h.....	40
Figura 12 - Comparação entre grupos de A172 na proliferação celular.....	41
Figura 13 - Comparação entre médias das taxas de proliferação celular nas células de A172 em 24h.....	42
Figura 14 - Comparação entre grupos de U87 na proliferação celular.....	43
Figura 15 - Comparação entre médias das taxas de proliferação celular nas células de U87 em 24h.....	43
Figura 16 - Comparação entre a proliferação das médias das amostras nas linhagens de GBM1, A172 e U87.....	44
Figura 17 - Comparação entre a proliferação das médias das linhagens de GBM1, A172 e U87 em 24 h.....	45
Figura 18 - Expressão de genes de CTs em células de U87 bidimensionais.....	46
Figura 19 - Expressão de genes de CTs em células de U87 tridimensionais.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos gliomas de acordo com a OMS em 2021	16
Tabela 2 – Sequência de oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados para a detecção dos RNAs mensageiros por RT-qPCR	31
Tabela 3 - Avaliação da proliferação de células em gota de GBM1	38
Tabela 4 - Avaliação da proliferação celular em grupos de GBM1	39
Tabela 5 - Avaliação da proliferação celular em grupos de A172	41
Tabela 6 - Avaliação da proliferação celular em grupos de U87	42
Tabela 7 - Volume e concentração de RNA em cada amostra (μ l)	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A172	Linhagem Celular de Glioblastoma
BTSC	Célula Tronco de Tumor Cerebral
CDH2	Caderina-2/Caderina Neural/N-Caderina
CT	Células-tronco
CTC	Células-tronco Cancerígenas
CTG	Células-tronco de Gliomas
CTN	Células-tronco Neurais
DMEM	Meio de Cultura <i>Eagle</i> Modificado por Dulbecco
DMEM-F12	Meio de Cultura <i>Eagle F12</i> Modificado por Dulbecco
EMT	Transição Epitelial-Mesenquimal
GBM	Glioblastoma Multiforme
GPCRs	Receptores Acoplados à Proteína G
IDH	Isocitrato Desidrogenase
MDR1	<i>Multidrug Resistance Protein-1</i>
MSI2	Musashi-2
NANOG	Fator de Transcrição NANOG
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Salina Tamponada por Fosfato
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SBF	Soro Bovino Fetal
SNC	Sistema Nervoso Central
SVZ	Zona Subventricular
U87	Linhagem Celular de Glioblastoma
VIM	Vimentina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	GLIOMAS	15
1.2	GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO	17
1.3	CÉLULAS-TRONCO CANCERÍGENAS	19
1.4	MARCADORES MOLECULARES	21
1.5	NEUROESFERAS	23
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	CULTURA CELULAR PRIMÁRIA GBM1	26
3.2	MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS A172 E U87	26
3.3	FORMAÇÃO DE NEUROESFERAS EM GOTA SUSPensa	27
3.3.1	Repicagem.....	27
3.3.2	Pipetagem das neuroesferas.....	27
3.4	DESENHO DE PRIMERS.....	30
3.5	EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE RNA	31
3.6	RT-QPCR.....	33
3.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	33
4	RESULTADOS	34
4.1	FORMAÇÃO DAS NEUROESFERAS	34
4.2	AVALIAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR EM NEUROESFERAS	37
4.3	EXPRESSÃO DE MARCADORES MOLECULARES	45
5	DISCUSSÃO.....	48
6	CONCLUSÕES.....	51
7	REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gliomas

Os gliomas malignos são os tumores primários mais comuns do cérebro humano adulto e estão entre os tumores mais difíceis de tratar, com tempos de sobrevivência médios inferiores a 15 meses, a partir do momento do diagnóstico (Dietrich, Diamond e Kesari, 2010; Ignatova *et al.*, 2002). No sistema nervoso central (SNC), as células gliais são as mais abundantes: circundam, fornecem nutrientes e oxigênio para os neurônios. O termo glioma descreve os tumores neuroepiteliais que são originados das células gliais ou de suporte do SNC, sendo os tumores intracranianos primários mais comuns (Davis, 2018; Jiang e Uhrbom, 2012). Alterações relacionadas à idade da célula de origem, no microambiente cerebral, no acúmulo de mutações e na redução da vigilância imunológica podem ser possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de gliomas (Cahill e Turcan, 2018).

A heterogeneidade dos tumores gliais de alto grau e sua tendência à rápida progressão maligna estão associadas à capacidade das células de glioma de migrarem de uma massa tumoral para o tecido cerebral normal, onde geram múltiplos novos focos e crescimento recorrente. A classificação dos tumores do SNC tem sido baseada na combinação de características histopatológicas e moleculares (Louis *et al.*, 2021). A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os gliomas em graus, de acordo com a escala de malignidade.

Em 2021 houve a mais recente atualização desta classificação, baseados em sua histologia (Tabela 1). Os oligodendrogliomas são tumores constituídos por uma mistura de astrócitos e oligodendrócitos em números mais ou menos equilibrados, sem limites definidos. Têm uma taxa de crescimento lenta, alto grau de diferenciação celular e são propensos à progressão maligna, sendo classificados em oligodendrogliomas (grau II) e oligodendrogliomas anaplásicos (grau III). Os astrocitomas são tumores nas células gliais desenvolvidos no tecido celular conectivo chamado astrócitos, caracterizados por maior densidade celular, ampla existência de atipias e células mitóticas. São classificados em astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III), astrocitoma IDH-mutante, e GBM IDH-*wildtype* e mutação do promotor TERT (grau IV). Por sua vez, os glioblastomas (Tabela 1), são os tipos de gliomas mais agressivos apresentam as mesmas características de tumores de grau III, além de proliferações microvasculares e necrose pseudopaliçada, de grau IV (Huang, 2022; Jiang & Uhrbom, 2012; Louis *et al.*, 2016).

Os tumores de grau IV recorrem em mais de 90% dos casos, tipicamente dentro de 2 cm do local original, e 10 a 20% podem desenvolver novas lesões distantes, o que sugere uma explicação para a alta taxa de recorrência, principalmente no glioblastoma multiforme (GBM) (Ignatova *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2019).

Tabela 1: Classificação dos gliomas de acordo com a OMS em 2021.

Tipos de Tumores	Mutações Genéticas*	Histologia	Grau e Características
<i>Oligodendroglioma</i>	Oligodendroglioma, IDH -mutante e 1p/19q -codeletado	Lesões em geral infiltrativas, com atipias nucleares e baixo índice mitótico, sem proliferação endotelial ou necrose	Grau 2: malignos, com infiltração precoce nos tecidos adjacentes, bem diferenciado, crescimento lento, pode progredir para astrocitoma anaplásico, incurável por cirurgia
<i>Astrocitoma difuso</i>	Astrocitoma, IDH -mutante		
<i>Oligodendroglioma anaplásico</i>	Oligodendroglioma, IDH -mutante e 1p/19q -codeletado	Lesões infiltrativas, com atipias nucleares e alto índice mitótico.	Grau 3: altas taxas de anaplasia e proliferação, com características histológicas malignas e prognósticos desfavoráveis
<i>Astrocitoma anaplásico</i>	Astrocitoma, IDH -mutante		
<i>Astrocitoma</i>	Astrocitoma, IDH -mutante e CDKN2A/B deleção homozigótica	Lesões infiltrativas, atipias nucleares, alto índice mitótico, células gigantes multinucleadas, necrose e proliferação endotelial.	Grau 4: muitas características de malignidade, alta ocorrência de angiogênese e necrose, altamente invasivo e baixos prognósticos
<i>Astrocitoma</i>	Glioblastoma, IDH -selvagem & mutação do promotor <i>TERT</i> , amplificação <i>EGRF</i> , ou ganho/perda do cromossomo 7/10		
<i>Glioblastoma</i>	Glioblastoma, IDH -selvagem		

*As alterações genéticas essenciais à OMS estão destacadas em negrito. Adaptado de Huang, 2022; Louis et al., 2007.

De maneira geral, gliomas malignos são amplamente resistentes aos métodos convencionais de quimioterapia e radiação. As células-tronco cancerígenas (CTCs) podem estar fortemente associadas à dificuldade de eliminação completa dos tumores. Estudos em glioblastoma mostraram que estas células são criticamente importantes nos processos de iniciação tumoral, progressão tumoral, angiogênese e resistência à terapia. Identificar as vias de sinalização e mecanismos moleculares que conduzem essas células iniciadoras de tumor em

gliomas malignos pode ser um caminho para identificar novas estratégias de tratamento promissoras (Dietrich, Diamond e Kesari, 2010; Spiteri *et al.*, 2019).

1.2 Glioblastoma Multiforme Humano

O GBM (glioma grau IV pela OMS) é o tumor cerebral primário mais prevalente e letal, sendo o mais comum de todos os tumores malignos primários do SNC, de 55 a 61,5%, com uma taxa de sobrevida sombria em 5 anos de apenas 5% e uma sobrevida média de menos de 15 meses (Easwaran, Tsai e Baylin, 2014; Gimple *et al.*, 2019; Lathia *et al.*, 2015a; Louis *et al.*, 2021; Peiris-Pagès *et al.*, 2016; Pinto *et al.*, 2021). Os primeiros casos de GBM foram reconhecidos no final do século XIX, baseados em achados de autópsias. A estrutura tecidual e as células de origem não eram conhecidas, entretanto, o crescimento infiltrativo sem borda clara com o tecido cerebral saudável era evidente, sugerindo comportamento maligno (Stoyanov e Dzhankov, 2018). As apresentações clínicas do GBM são relacionadas ao aspecto funcional da área do cérebro envolvida. Em determinadas áreas causam sintomas que levam o paciente a procurar assistência médica mais rapidamente, como fraqueza persistente, dormência, perda de visão ou alteração da linguagem. Em outras áreas do cérebro, podem resultar em sintomas mais sutis, como disfunção executiva, distúrbios do humor, fadiga e distúrbios leves de memória. Estes são frequentemente centrados no lobo frontal, lobo temporal ou corpo caloso e, no momento da ressecção cirúrgica, podem ser maiores do que quando identificados via exames de imagem. As convulsões ocorrem em uma minoria de pacientes recém-diagnosticados com GBM (aproximadamente 25%) (Alexander e Cloughesy, 2017; Krishna *et al.*, 2023). O tratamento padrão inclui ressecção cirúrgica (com segurança máxima do tumor), seguido de radioterapia e quimioterapia. A taxa de sobrevida é inferior a 30% dos indivíduos acometidos com GBM, uma vez que este é um tumor heterogêneo, resistente a todas as abordagens terapêuticas, devido às múltiplas mutações subclonais (Calinescu *et al.*, 2021; Rodriguez *et al.*, 2022). Após a ressecção neurocirúrgica, quase todos os tumores têm uma taxa de reincidência dentro de 2 a 3 cm da margem cirúrgica, destacando o fato de que mesmo sendo macroscopicamente indetectáveis, as células tumorais infiltrantes permanecem e são capazes de repovoar o tumor (Dundar *et al.*, 2020). O GBM é uma doença sem cura, pois a resistência ao tratamento é em grande parte atribuída a limitações na administração e distribuição de agentes terapêuticos (Calinescu *et al.*, 2021; Hira, Aderetti e Noorden, van, 2018; Stoyanov e Dzhankov, 2018). Os principais contribuintes para o mau prognóstico de pacientes com GBM incluem a heterogeneidade e plasticidade celular intratumoral, a natureza infiltrativa (que ocupa

uma grande área do cérebro) e migratória das células, e ainda uma alta taxa de recorrência, mas que raramente metastatiza para outros órgãos (Gimple *et al.*, 2019; Lathia *et al.*, 2015b).

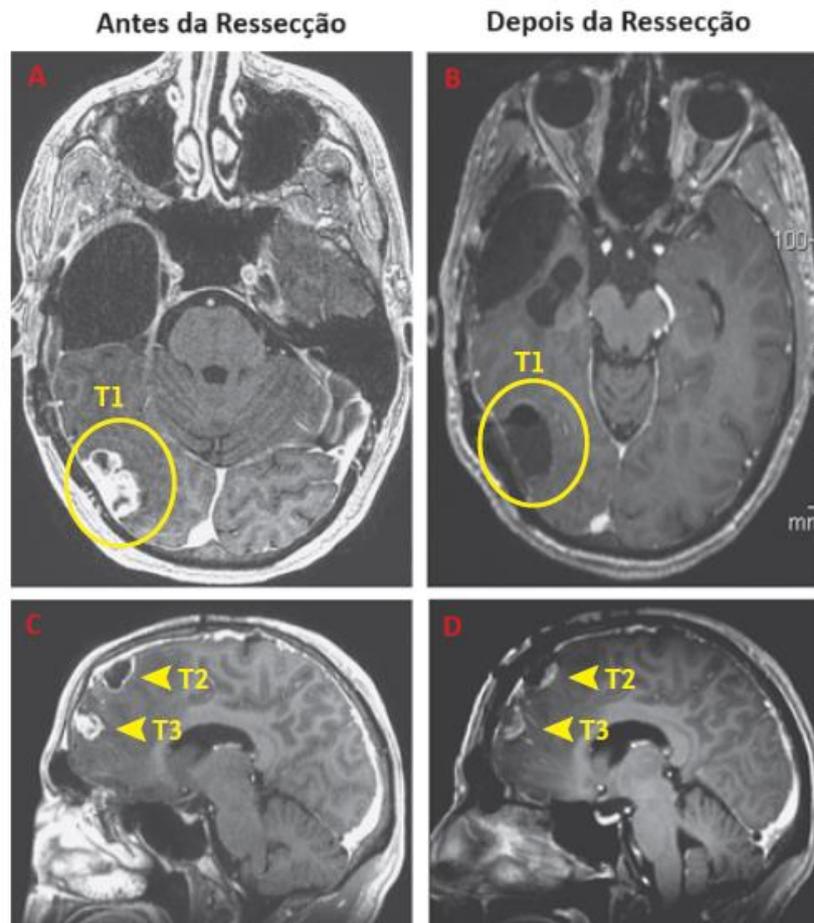


Figura 1: Ressonância Magnética Intracraniana (MRI) de um paciente com GBM. Pacientes com GBM antes e após a ressecção cirúrgica. Paciente 1, em A e B, na região temporal-occipital, destacado pelo círculo amarelo em T1; paciente 2, apresenta dois focos de massa tumoral na região do lobo frontal, indicados pelas setas amarelas em T2 e T3, antes e após ressecção cirúrgica com máxima remoção do tumor (C e D) (Adaptado de Brown *et al.*, 2016).

O GBM pode ocorrer comumente na zona subventricular (SVZ) ou em uma região mais distante da SVZ (Lathia *et al.*, 2015). A localização do tumor pode se correlacionar com subtipos, resultados clínicos e padrões de crescimento distintos, incluindo pequenas massas tumorais em mais de uma localidade no mesmo paciente – condição rara (Cahill e Turcan, 2018; Dundar *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2021). Os glioblastomas apresentam uma composição celular bastante heterogênea, conforme indicado pelo termo “multiforme”, com algumas das células tumorais apresentando capacidade migratória significativa (Galli *et al.*, 2004). Uma característica importante sobre células semelhantes a células-tronco neurais (CTN; *Neural Stem*

Cells – NSC) derivadas de tumor é o controle genético alterado, que determina o destino e a sobrevivência celular, o potencial proliferativo, em comparação com CTNs normais (Ignatova *et al.*, 2002).

1.3 Células-tronco Cancerígenas

As células-tronco (CTs) podem ser definidas como células não especializadas ou indiferenciadas que podem se autorrenovar e se diferenciar em células especializadas. A autorrenovação é o processo pelo qual as CTs geram células filhas indiferenciadas, sendo importantes na renovação e conservação de diferentes tecidos do organismo (Bongso e Fong, 2009; Sobhani *et al.*, 2017).

Há diferentes classificações para as CTs: totipotentes, têm o maior potencial de divisão e diferenciação, permite a formação de estruturas embrionárias – endoderme, mesoderme e ectoderme – e estruturas extraembrionárias; pluripotentes, formam células das camadas germinativas; multipotentes, podem se especializar em linhagens celulares específicas; oligopotentes, podem se diferenciar em vários tipos celulares, mas são restritas à linhagem; onipotentes, têm uma diferenciação mais estreita e uma propriedade especial de se dividir repetidamente e formam apenas um tipo de célula (Zakrzewski *et al.*, 2019).

O conceito de CTCs propõe que um câncer se origina de uma subpopulação menor de células malignas autorrenováveis, mas com a aquisição de mutações que conferem características de crescimento e constante proliferação (Biserova *et al.*, 2021; Bradshaw *et al.*, 2016). A expressão de marcadores moleculares de CTs confirmaram hipóteses de estudos anteriores em relação à presença de CTCs em massas tumorais heterogêneas.

Na leucemia mieloide aguda, por exemplo, as células CD34+ e CD38- são consideradas como a população de CT; da mesma forma, a expressão de CD133 está associada a CTCs do SNC, incluindo meduloblastoma (MB) e GBM (Paul, Dorsey e Fan, 2022a). Os marcadores citados são característicos de CTs, com isso, numa população heterogênea, esta expressão indica a presença de células-tronco, uma vez que é difícil separar cada célula dentro do tumor. O termo “células-tronco cancerígenas” deve ser diferenciado do conceito de “célula de origem” (Rich, 2007), pois a célula origem é aquela que inicia o tumor, mas não é, necessariamente, uma CT; no caso dos GBMs, por exemplo, a célula de origem é uma célula da glia. A caracterização do grau de malignidade do GBM fornece evidências convincentes de que a resistência ao tratamento e o tumor a progressão é, pelo menos em parte compartilham

características com as CTCs aqui citadas, e estão presentes em gliomas de graus mais baixos (Iacopino *et al.*, 2014; Nikpour *et al.*, 2013).

Embora as CTCs apresentem propriedades em comum com as CTs, elas não se originam necessariamente da transformação destas células de tecidos normais, indicando que pode haver mutações em células diferenciadas e originar uma nova, iniciadora de tumor (Visvader e Lindeman, 2012). Assim, ocorre um processo de *desdiferenciação*, o qual uma célula retorna ao seu estado indiferenciado, conferindo as características de CT (Wechsler-Reya e Scott, 2001).

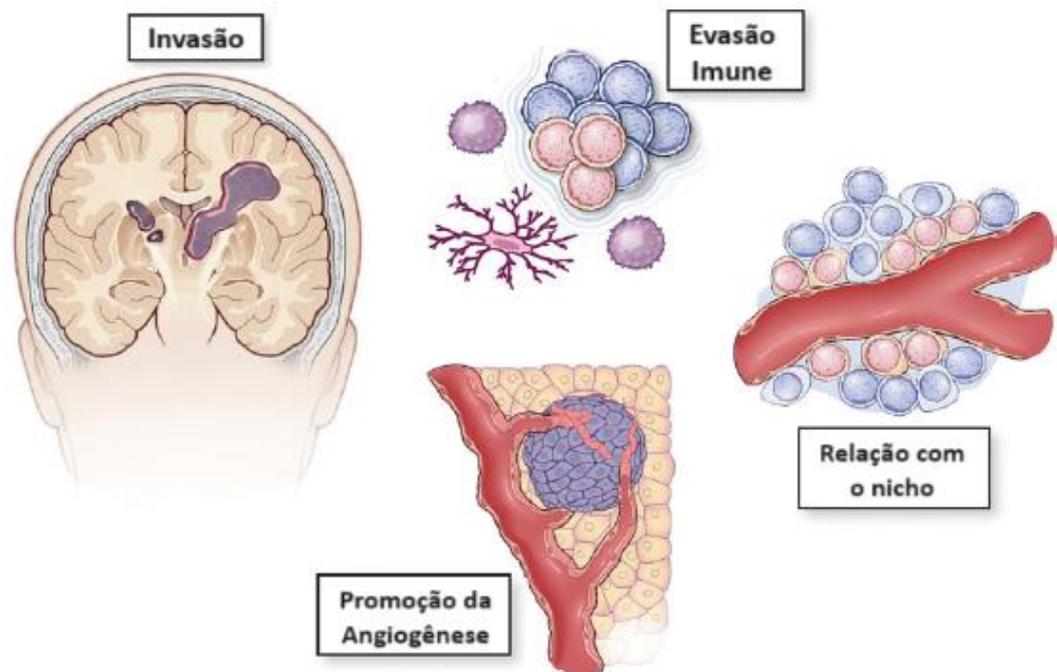


Figura 2: Representação esquemática das possíveis funções de CTCs. Adaptado de Lathia *et al.*, 2015b.

Ainda não há uma explicação detalhada de como esse mecanismo ocorre. A maior parte da massa tumoral consiste em CTs não tumorigênicas que se diferenciaram em CTCs, levando a uma vasta heterogeneidade celular com baixa atividade mitótica, o que protege o tumor de tratamentos direcionados contra células em divisão ativa (Bradshaw *et al.*, 2016).

A presente hipótese das CTCs sugere a existência de uma subpopulação de células tumorais que compartilham características com as CTs saudáveis, com capacidades únicas de autorrenovação, sustentando assim o crescimento do tumor, enfatizando a relevância destas células na manutenção do microambiente tumoral e na capacidade de reincidência (Brown *et al.*, 2016). Além disso, em vários estudos foi demonstrado que as CTCs possuem potencial

tumorigênico além de mecanismos de resistência aprimorados. Elas apresentam propriedades de autorrenovação, crescimento ilimitado, alta taxa de migração, resistência à quimioterapia e são capazes de reconstituir toda a população de células tumorais (Galli *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2004).

Estas células fornecem um alvo para o tratamento de tumores cerebrais malignos, e a compreensão das vias de sinalização envolvidas na proliferação, incluindo receptores acoplados à proteína G (GPCRs), que está envolvida com a transdução de sinais celulares. Muitos proto-oncogenes codificam proteínas envolvidas nas vias de transdução de sinais, ativadas por hormônios e fatores de crescimento que estimulam a proliferação celular (Flores *et al.*, 2009; Sulman, Aldape e Colman, 2008; Wechsler-Reya e Scott, 2001). Compreender os mecanismos moleculares envolvidos nestas células cerebrais e na sinalização celular, pode indicar um caminho para estudar os processos envolvidos nas CTCs, e direcionar tratamentos mais específicos para elas.

A maioria dos tumores compartilha uma variabilidade entre as células cancerígenas dentro de uma única lesão neoplásica, mas elas podem ser diferenciadas umas das outras por características como tamanho, morfologia e expressão de antígenos, renovação celular, interação célula-célula, capacidade invasiva e metastática, e reação a fármacos (Michor e Polyak, 2010). Devido à sua capacidade de iniciar novos tumores, a erradicação de CTCs pode afetar a remissão estável e duradoura, que poderia potencialmente combater o câncer (Ahmed *et al.*, 2018; Peng *et al.*, 2019; Zakrzewski *et al.*, 2019).

1.4 Marcadores Moleculares

O fenótipo de CTCs varia entre os tumores e os marcadores moleculares são expressos de forma diferentes, baseados nas condições fisiológicas em que a massa tumoral se encontra. A regulação da expressão gênica pode sofrer influência do microambiente tumoral, assim como a necessidade de as células ativarem vias de sobrevivência e mecanismos de evasão aos tratamentos (Paul, Dorsey e Fan, 2022b; Visvader e Lindeman, 2012). Com isso, foram selecionados alguns marcadores que podem ser encontrados em CTCs e verificar em quais condições a expressão, apresentaria diferenças significativas.

CDH2: Caderina-2 também conhecida como caderina neural (N-caderina), é uma proteína transmembrana expressa em múltiplos tecidos e funciona para mediar a adesão célula-célula (Jiang *et al.*, 2022). Há estudos que comprovam uma expressão elevada de CDH2 em gliomas, contribuindo para a condição invasiva e, em GBM, para o aumento da malignidade e

capacidade de infiltração tumoral (Hu *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018). a alteração na expressão da N-caderina está frequentemente associada à transição epitelial-mesenquimal (EMT), um processo pelo qual células epiteliais perdem suas características e adquirem propriedades mesenquimais, aumentando a capacidade de migração e invasão celular. Pode contribuir para a invasividade e agressividade dos tumores ao promover a dissociação das junções celulares e a invasão dos tecidos circundantes (Li *et al.*, 2018; Sochirca e José Alberto Fonseca Moutinho, 2021).

MDR1 (ABCB1): *Multidrug Resistance Protein 1*, pertence à família de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*). Foi encontrada na maioria dos tumores cerebrais, incluindo GBM (Darmanis *et al.*, 2017; Schaich *et al.*, 2009). É uma bomba de efluxo que tem a capacidade de excluir várias substâncias, como medicamentos das células e está envolvida nos processos de secreção, permitindo a liberação de moléculas lipídicas, como hormônios esteroides. (Segerman *et al.*, 2016). Podem ser expressas em vários tecidos como intestino, fígado e barreira hematoencefálica, onde possui um papel protetor, reduzindo o acúmulo de moléculas xenobióticas em órgãos ou células sensíveis. Em gliomas, a expressão de MDR1 em diferentes populações do sistema imune pode ser uma vantagem, pois gera resistência à quimioterapia como descrito para células cancerosas, e, assim, limitar a imunossupressão correspondente de esses compostos. Em certos tipos de células do sistema imunológico, especialmente células progenitoras e de linhagem hematopoiética, o gene MDR1 pode ser expresso. A expressão de MDR1 permite a essas células regulação de substâncias tóxicas, resistência a drogas e manutenção do estado quiescente das células, protegendo-as de agentes tóxicos e evitando a exaustão por proliferação excessiva. (Bossennec *et al.*, 2018).

MSI2: Musashi-2 é uma proteína de ligação ao RNA que desempenham papéis críticos na regulação de células-tronco, diferenciação celular e oncogênese. Está envolvido na regulação da expressão gênica no nível pós-transcricional, influenciando o metabolismo do RNA; é conhecida por seu papel na renovação de células-tronco e atua interagindo com as regiões 3' não traduzidas (UTRs) de mRNAs-alvo, controlando seu destino, o que, por sua vez, afeta o comportamento celular (Sundar *et al.*, 2020; Sutherland *et al.*, 2015). MSI2 é altamente expresso em GBM e estimula a capacidade das células em proliferação, migração e invasão. Também participa na regulação da resistência das células GBM à quimioterapia com temozolomida (Dong *et al.*, 2021). Modificar a expressão de MSI2 ou bloquear sua atividade pode ser uma estratégia promissora no tratamento do câncer.

NANOG: É um fator de transcrição de células-tronco que está envolvido na determinação do destino celular, proliferação e apoptose (Wang *et al.*, 2017). A expressão de

NANOG é muito baixa ou é silenciada em humanos é muito baixa ou silenciada em humanos após o desenvolvimento embrionário, mas pode ser detectada em células cancerígenas que exibem propriedades semelhantes às das CTCs. É possível que seja uma das fontes de progressão do câncer e desenvolvimento de metástases (Grubelnik *et al.*, 2020).

VIM: A vimentina é uma proteína da família dos filamentos intermediários, que compõem o citoesqueleto, juntamente com microtúbulos e microfilamentos de actina (Jiang *et al.*, 2022). A rápida recorrência de gliomas é correlacionada com a presença de vimentina e contribui com a proliferação e migração de células de GBM, contribuindo com o grau de malignidade e a alta reincidência tumoral, devido à capacidade de recriar um microambiente tumoral favorável a uma nova proliferação da massa heterogênea em diferentes regiões cerebrais (Liu *et al.*, 2021).

A expressão dos marcadores moleculares nas CTCs está intimamente ligada às condições do microambiente tumoral e às necessidades adaptativas das células, como evasão de tratamentos e promoção da sobrevivência. Marcadores como CDH2, MDR1, MSI2, NANOG e VIM desempenham papéis cruciais em processos como invasividade, resistência a medicamentos e regulação de células-tronco, evidenciando a complexidade do comportamento tumoral em gliomas e outros tipos de câncer. O estudo aprofundado dessas proteínas oferece perspectivas promissoras para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que visem reduzir a malignidade e melhorar a resposta aos tratamentos.

1.5 Neuroesferas

As células-tronco neurais foram originalmente caracterizadas e identificadas pelo seu crescimento como neuroesferas em meio de cultura suplementado, contendo fatores de crescimento. Essas células têm a capacidade de se autorrenovar, produzir neuroesferas e se diferenciar em tipos celulares presentes no tumor de origem (Dymova *et al.*, 2022; Laks *et al.*, 2009). Células-tronco neurais ou precursoras oferecem capacidade de autorrenovação, migração para áreas que causam alterações patológicas no sistema nervoso e diferenciam-se na linhagem glial e na linhagem neuronal (Pilkington, 2005).

As CTCs podem proliferar para gerar uma massa tumoral diferenciada e podem gerar novas CTCs através da autorrenovação. No GBM, acredita-se que as CTCs sejam responsáveis pelo crescimento invasivo e pela recorrência do tumor devido à sua resistência aos medicamentos quimioterápicos. A cultura de neuroesferas minimiza a estimulação do microambiente tumoral, mantendo assim os CTCs em um estado indiferenciado (Hong, Chedid

e Kalkanis, 2012). Estudos de Lathia e colaboradores (2015) mostraram que tanto ensaios *in vitro* quanto *in vivo*, são capazes de avaliar a presença das características das células-tronco (autorrenovação, proliferação e capacidade de reproduzir a complexidade do tumor original) que estão contidas nas massas heterogêneas destes tumores gliais, incluindo o GBM.

O uso do sistema de cultura de neuroesferas como modelo para tumores cerebrais tem sido apoiado pela capacidade das células geradas pela neuroesfera de formar tumores preservando algumas características do tumor original (Laks *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2020). As características compartilhadas entre as CTCs proporcionam uma população estável em um tecido e, portanto, compartilham marcadores de CTs comuns. Foram descritos vários marcadores de células iniciadoras de glioma e a abundância de qualquer um desses difere fortemente entre os tumores, mas as CTCs e suas progenitoras expressam uma variedade de proteínas características, incluindo marcadores de superfície celular e fatores de transcrição, possibilitando assim sua caracterização (Paul, Dorsey e Fan, 2022; Wirsching, Galanis e Weller, 2016).

Portanto, no decorrer deste trabalho, além do modelo de formação de neuroesferas, buscou-se também identificar a presença de marcadores moleculares para confirmar os dados citados acima, reafirmando a presença das CTCs. Assim, podem ser realizadas abordagens de tratamento com foco nas CTs, uma vez que estas são responsáveis pela alta taxa de reincidência no GBM, e contribuir com o aumento da expectativa de vida dos pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer uma metodologia para avaliar a formação de neuroesferas e a expressão de marcadores de células-tronco em diferentes linhagens de glioblastoma, sendo GBM1, A172 e U87.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a capacidade das células das diferentes linhagens de formar neuroesferas em gotas suspensas (cultivo tridimensional).
- Avaliar a proliferação das células das neuroesferas das diferentes linhagens.
- Identificar marcadores moleculares de células-tronco, CDH2, MSI2, MDR1, NANOG e VIM, por PCR em tempo real (RT-qPCR).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Cultura Celular Primária GBM*

A amostra de GBM utilizada neste trabalho foi obtida através de ressecção cirúrgica, extraída de um paciente do hospital Celso Ramos, localizado em Florianópolis, Santa Catarina. O tumor foi coletado pela equipe médica responsável foi colocada em um tubo de ensaio de 15 ml contendo *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM-F12) e 10% de soro bovino fetal (SBF) e levado para a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O tecido foi dissociado mecanicamente com tripsina e auxílio de uma pipeta Pasteur; o procedimento foi realizado no fluxo laminar, no qual o fragmento de tumor foi dissecado, tendo as meninges cerebrais e vasos sanguíneos removidos.

Após serem lavadas com salina tamponada por fosfato (PBS), as células foram plaqueadas em garrafas de cultura de 25 cm², contendo o meio DMEM-F12 acrescido de glicose (0,6%), glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (0,06%) e penicilina/estreptomicina (1 U/1 µg) e suplementado com 10% SBF. Para cultivo, as células foram mantidas em estufa de atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. Os procedimentos e formulários de autorização para obtenção das amostras foram aprovados pelo comitê de ética de pesquisa com seres humanos da UFSC (CEPSH – 108.286).

3.2 *Manutenção das Linhagens A172 e U87*

As linhagens comerciais de gliomas, A-172 (A172) e U-87 MG – *Uppsala 87 Malignant Glioma* (U87), foram armazenadas em tubos criogênicos e mantidas em botijões de nitrogênio líquido a -196°C. Para o descongelamento, as células foram colocadas por alguns segundos em banho-maria a 37°C para alcançarem o estado líquido. O conteúdo do tubo foi retirado, transferido para um tubo Falcon de 15 ml, com 1 ml de meio DMEM-F12 para A172, e 1 ml de DMEM, para U87. Em seguida foram centrifugadas por 5 min em 1.500 RPM, para A172 e em 1.300 RPM, para U87.

Ao serem retiradas da centrífuga, descartou-se o sobrenadante e foram ressuspensas com 1 ml do meio correspondente a cada linhagem, conforme mencionado anteriormente. O conteúdo homogeneizado foi transferido para uma garrafa cultura de 25 cm² com 2.400 ml de meio, acrescido de 20% de SBF. Um dia após o descongelamento, os meios foram descartados e trocados, com um volume de 2.700 ml, acrescidos de 10% de SBF para A172 e 20% para

U87. Após acompanhar o crescimento, verificou-se o momento de fazer o repique e expandir a quantidade das células em novas garrafas.

3.3 Formação de Neuroesferas em Gota Suspensa

3.3.1 Repicagem

As células foram retiradas da estufa após atingirem cerca de 80 a 90% de confluência, passando pelo processo de repicagem. O meio de cultura em que foram colocadas para incubar foi retirado e descartado. As células foram lavadas com 1 ml de PBS, que foi descartado em seguida; foi acrescentado 1 ml de tripsina e a garrafa de cultura foi levada de volta para incubadora por cerca de 3 a 4 min, para as células percam sua adesão com a garrafa. O tempo na estufa variou em 1 ou 2 min dependendo da confluência de cada garrafa; mais cheia, maior o tempo de incubação.

Ao serem retiradas da incubadora, foi adicionado 1 ml de DMEM-F12 suplementado com 10% de SBF para GBM1 e A172, e DMEM acrescido de 20% de SBF para U87 e, em seguida, o conteúdo da garrafa foi homogeneizado com a tripsina, transferido para um tubo Falcon de 15 ml e levado para centrífuga por 5 min a 1.500 RPM. Terminado o tempo de centrifugação, o sobrenadante foi descartado com cuidado para que as células aglomeradas no fundo não se desprendessem. Em seguida, adicionou-se ao Falcon 1 ml de meio suplementado com SBF, o qual foi homogeneizado para ser transferido para uma nova garrafa.

3.3.2 Pipetagem das neuroesferas

O conteúdo do tubo Falcon foi homogeneizado, dos 1000 µl foram retirados 10 µl para serem diluídos com 190 µl do meio de cultura em um Eppendorf, formando um fator de diluição de 200 µl (10 µl do precipitado de células para 190 µl de corante), para as células serem contadas na câmara de Neubauer. O corante azul de Tripiano foi escolhido para realizar a contagem das células para verificar a viabilidade celular, por ser um cromóforo negativamente carregado, que não interage com as células, a menos que a membrana esteja danificada (Furukawa *et al.*, 2015). Assim, as células que excluem o corante são viáveis. Dos 200 µl no tubo, são retirados 20 µl, sendo 10 µl para

cada lado da câmara, que é levada ao microscópio invertido. No tubo Falcon, o conteúdo restante de 990 μl do meio com as células é homogeneizado novamente para formação das gotas. Foi utilizada uma tampa de placa de Petri de 90x15 mm, a qual foi retirada da base, e as gotas foram adicionadas na superfície interior da tampa da placa, voltada para cima.

Com uma ponteira de 50 μl , retirou-se 30 μl para iniciar o processo de pipetar as gotas. Ao terminar a pipetagem das gotas, foi realizado o movimento de inversão, no qual a tampa fica com seu interior voltado para dentro da placa (seu formato “normal”), tampando-a. Dentro da placa, são adicionados 8 ml de Milli-Q e uma gaze estéril – que impede a evaporação da água –, para formar uma câmara úmida e impedir que as gotas sequem. Elas são distribuídas no centro da placa, num formato de matriz coluna X linha (ex.: 2x2, 4x3, 5x4 etc.), conforme a Figura 3. A quantidade de gotas pipetadas varia de acordo com a necessidade do experimento.

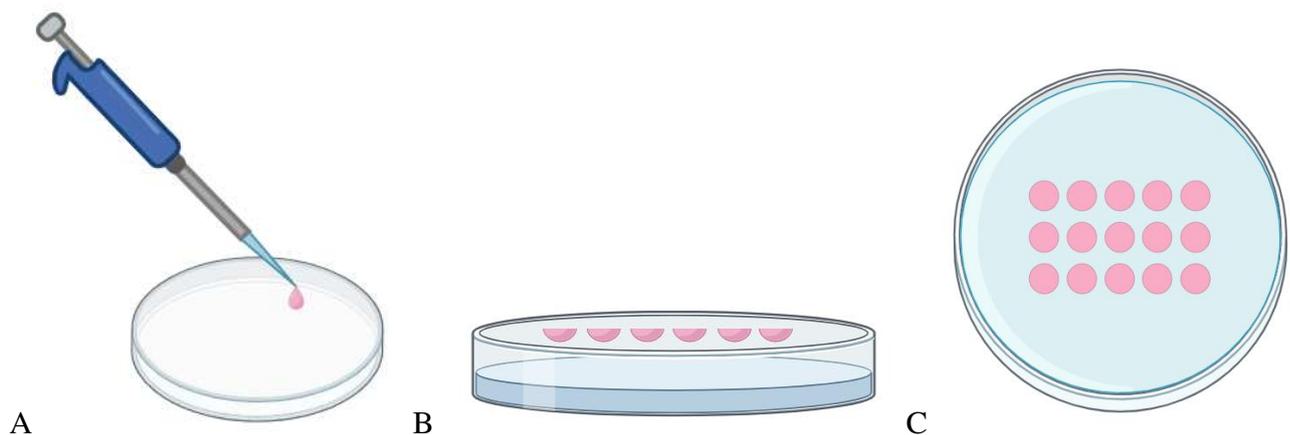


Figura 3: Representação esquemática da formação de neuroesferas. A) As gotas são pipetadas na tampa da placa de Petri, virada para cima, com auxílio uma ponteira de 50 μl ; B) Com as gotas prontas, a tampa é invertida, encaixada na base contendo água Milli-q e gaze estéril, para formar a câmara úmida e impedir o ressecamento das gotas; C) Representação das gotas vistas de cima. Elas formam um círculo com o meio e pela ação da gravidade, as células se aglomeram na base da gota, formando uma neuroesfera não aderente. Imagens elaboradas pela autora no BioRender.

Para avaliar a proliferação celular nas gotas, foram pipetadas cerca de 6 gotas por placa, com uma ponteira de 200 μl . Para que o volume coletado e a quantidade de células fossem coerentes com as contagens, todas as gotas eram ressuspensas, cerca de 180 μl . O conteúdo foi transferido para um Eppendorf de 1,5 ml e homogeneizado; em seguida foram coletados 10 μl e transferidos para outro tubo, com 190 μl de meio, DMEM para U87 e DMEM-F12 para GBM1, totalizando 200 μl do volume total. Deste tubo, eram pipetados 10 μl em cada lado da

câmara de Neubauer para realizar a contagem no microscópio; ao final, realizou-se uma regra de três simples do volume total (180 μ l), para 30 μ l. Dessa forma, foi possível avaliar a quantidade aproximada de células em cada gota. Este processo foi necessário em todas as contagens. As células conseguem se aderir umas às outras pela ação da gravidade e tensão superficial, que impede sua adesão na tampa da placa. A formação de uma neuroesfera pode ser possível a partir da presença das CTCs, que conseguem, por sinalização, unir as células que estão diferenciadas e as demais indiferenciadas para criar um microambiente tumoral e iniciar um novo processo de construção de uma massa tumoral, como ocorre na reincidência do GBM.

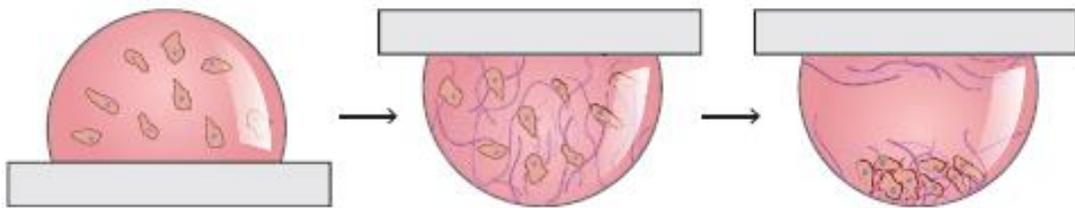


Figura 4: Representação da associação celular nas gotas. Ao serem pipetadas, o conteúdo do meio com o soro está homogeneizado, e assim, as células estão em suspensão. Ao realizar o movimento de inversão, as células aglomeram-se, por não terem uma superfície para se aderir e proliferar. Essa configuração celular pode ser possível pela presença de CTCs. Adaptado de Dundar et al., 2020.

Foi realizado um teste para observar as condições das gotas na câmara úmida, até que fossem encontradas as condições favoráveis para pipetar as gotas com células. Assim, as gotas foram pipetadas na tampa da placa de Petri, que foi invertida e encaixada na placa que contém a gaze embebida na água Milli-q, formando uma câmara úmida (Figura 5A), a qual foi mantida na incubadora a 37 °C e 5% de CO₂. As células não ficam em contato com a tampa da placa por causa do movimento de inversão (Figuras 5B e 5C). Foram realizados testes com 5 placas, contendo apenas o meio DMEM-F12 com 10% de SBF, mantidos na incubadora por 24 h para verificar a quantidade de água Milli-q necessária para não ressecarem; o volume de água variou entre 5 e 10 ml. O volume ideal, no qual nenhuma gota ressecou foi de 10 ml e metade de uma gaze estéril para manter a umidade.

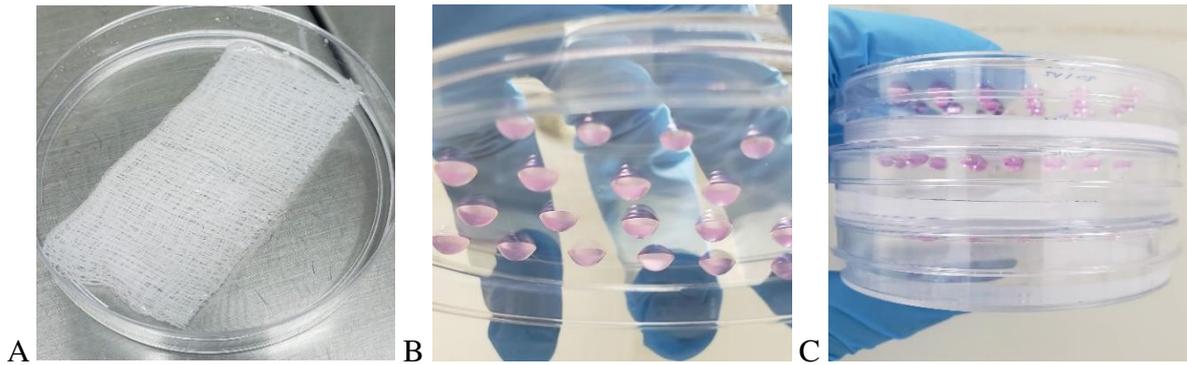


Figura 5: Processo de formação de gota suspensa. A) Fundo da placa de Petri contendo 10 ml de Água Milli-q e metade de uma gaze estéril para formar uma câmara úmida ao colocar a tampa. Esse processo evita a contaminação e o ressecamento das gotas; B) Gotas formadas no centro da tampa. Nesta imagem, a tampa já está invertida e será encaixada na base, com a água Milli-q. O processo de inversão faz com que as células não possam se aderir à tampa, pela ação da gravidade; C) Placa de Petri montada. A tampa com as gotas está encaixada na base que forma a câmara. A quantidade de água deve ser suficiente para cobrir o fundo e não encostar nas gotas acima. Fonte: elaborado pela autora.

Cada placa foi pipetada com uma quantidade de gotas diferente; a primeira e segunda com gotas distribuídas aleatoriamente, conforme a Figura 5B, alterando apenas a quantidade de água Milli-q, uma com 5 ml e outra com 10 ml. Na figura 5C, as gotas foram pipetadas de forma uniforme, formando uma matriz 8x5, com 40 gotas e 10 ml de água Milli-q; na quarta, também de maneira uniforme, em matriz 7x5, com 35 gotas, e a quinta placa foi feita numa matriz 4x5, com 20 gotas, mais centralizadas, ambas com 10 ml de água Milli-q. As placas que apresentaram as melhores condições foram a quarta e quinta, com as gotas mais centralizadas, sem apresentar ressecamento. Ao realizar os testes e verificar todas as condições, foram realizados os testes com as células de GBM1 para analisar as condições de proliferação e observar em quanto tempo as neuroesferas seriam formadas. Os detalhes da formação estão descritos nos resultados.

3.4 Desenho de primers

Os primers de GAPDH, CDH2, MDR1, MSI2 e VIM foram desenhados para reações de RT-qPCR, a partir da plataforma *Nucleotide Database* do NCBI. O primeiro passo foi procurar pelo símbolo-padrão dos genes de interesse (ex.: MDR1, VIM etc.), selecionar a espécie correspondente (*Homo sapiens*), o tipo de molécula (RNA mensageiro) e a base de

dados (Refseq). Ao obter os resultados, as sequências e suas variantes foram transcritas no formato FASTA em um único documento, e depois de estarem unificadas, foram copiadas para a base *Clustal Omega* para realizar o alinhamento global e verificar quais regiões são conservadas. Os primers foram desenhados a partir de uma dessas sequências, ou seja, uma região que estivesse presente em todas as variantes daquele gene. Em seguida, foi selecionada uma sequência de cada para cada gene, e copiada para o programa *Primer-BLAST* do NCBI. Após os primers serem gerados, foram enviados para a plataforma *Oligo Analyzer* do IDT, tiveram seus parâmetros analisados, como deltaG (ΔG) e *hairpin*.

Tabela 2: Sequência de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a detecção dos RNAs mensageiros por RT-qPCR.

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>
GAPDH	Sense: AGC CAC ATC GCT CAG ACA C Anti-sense: GCC CAA TAC GAC CAA ATC C
CDH2	Sense: TGC TAC TTT CCT TGC TTC TGA C Anti-sense: AAC ACT TGA GGG GCA TTG TC
MDR1	Sense: ACG TCA TCG CTG GTT TCG AT Anti-sense: TCC TGC TGT CTG CAT TGT GA
MSI-2	Sense: GGG GAC TGC CTT ACA CCA T Anti-sense: TCG CCA CGA AGT TGG GAT A
NANOG	Sense: AAT ACC TCA GCC TCC AGC AGA TG Anti-sense: TGC GTC ACA CCA TTG CTA TTC TTC
VIM	Sense: GCG AGG AGA GCA GGA TTT CT Anti-sense: GGG TAT CAA CCA GAG GGA GTG

Fonte: elaborado pela autora.

3.5 Extração e Dosagem de RNA

Os RNAs foram extraídos de acordo com o protocolo do TRIzol™. Uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que facilitam o isolamento de moléculas grandes ou pequenas, que manteve a integridade das amostras pela ação de RNases enquanto rompe as células e dissolve os componentes celulares durante a homogeneização (Chomczynski & Sacchi, 2006). Após a confluência atingir cerca de 90%, as amostras da garrafa tiveram o meio retirado, foram lavadas com 1 ml de PBS, que foi descartado em seguida e então, foi adicionado 1ml do reagente. O TRIzol™ foi mantido numa temperatura média de cerca de 4°

C, e foi adicionado nas amostras logo após sua retirada da geladeira. A dissociação das células foi realizada entre 3 e 5 min após a adição do reagente, com pequenos movimentos na garrafa e observado no microscópio para verificar se estavam em suspensão.

Após as gotas serem pipetadas e formarem as neuroesferas – cerca de 24 h para GBM e 30 h para U87 –, elas foram ressuspensas com uma pipeta de 200 µl, transferidas para um tubo Falcon de 15 ml e centrifugadas por 5 min a 1.500 RPM para GBM, e 1.300 RPM para U87. Ao serem retiradas da centrífuga, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 ml de TRIzol™ para ser homogeneizado com o aglomerado de células no fundo do tubo; em seguida, em ambas as condições, o conteúdo foi homogeneizado com uma ponteira de 1000 µl, transferido para um Eppendorf de 1,5 ml, identificados e armazenados no freezer a -18° C. Para a extração e dosagem do RNA o procedimento foi feito nas mesmas condições para as células bidimensionais e para as neuroesferas das duas linhagens citadas acima.

O procedimento de extração foi realizado em dois dias consecutivos. No primeiro, as amostras foram retiradas do freezer e foram adicionados 200 µl/mL de clorofórmio nos Eppendorfs com as amostras. Em seguida, foi realizada uma breve agitação manual, os tubos foram centrifugados por 15 min a 12.000 x g a 6° C. Ao serem retiradas da centrífuga, foi possível observar a solução trifásica que foi formada, sendo uma de fenol-clorofórmio vermelha, na parte inferior do tubo, uma interfase e uma fase aquosa na superior, incolor. A fase incolor, que contém o RNA, foi transferida para um novo microtubo *nuclease-free* de 1,5 ml, com uma pipeta 200 µl, adicionado 500 µl/mL de isopropanol e armazenado no freezer a -20 C por, pelo menos, 12 h.

No segundo dia, os tubos com as amostras foram centrifugados por 10 min a 12.000 x g a 4 °C para formar um pequeno precipitado de RNA. Não foi possível observar o precipitado de RNA em todas as amostras; o sobrenadante foi descartado com uma micropipeta. Em seguida, foi adicionado 1 ml de etanol 75% em cada tubo para lavar o RNA e foi realizada uma breve agitação manual; as amostras foram novamente recolocadas na centrífuga por 5 min a 7.500 x g, a 4 °C. Em cada uma, o RNA foi solubilizado com uma determinada quantidade de água RNase-Free; após acrescentar a água os tubos foram recolocados na centrífuga rapidamente para que todo conteúdo do tubo se concentrasse no fundo. As amostras foram incubadas no banho-maria seco a 60 °C por 10 min e, ao término deste processo, os RNAs foram armazenados no freezer a -80 °C.

3.6 RT-qPCR

Após a extração e dosagem dos RNAs, foram verificadas as eficiências dos primers, refere-se à capacidade de amplificar adequadamente o RNA-alvo durante a reação, com o volume final de 77 µl, contendo 57,2 µl de Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2 × (Thermo Scientific®), 8,8 µl de cada primer (4,4 µl *sense* + 4,4 µl *anti-sense*), 3 µl de cada RNA e 11 µl água *nuclease-free*. As amostras foram pipetadas em duplicatas em 5 diferentes concentrações (1 µl, 0,1 µl, 0,01 µl, 0,001 µl, e 0,0001 µl), totalizando 10 poços mais o controle negativo, sem RNA.

A RT-qPCR foi realizada com um volume final de 92 µl, contendo 67,6 µl de Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2 × (Thermo Scientific®), 10,4 µl de cada primer (5,2 µl *sense* + 5,2 *anti-sense*), 1 µl de cada RNA (diluído 1:10 ng/ µl) e 13 µl de água *nuclease-free* para cada marcador molecular. A quantidade descrita de material utilizado foi referente a cada gene, portanto a quantidade total do *kit*, com a água *nuclease-free* e o RNA foi de 552 µl. Foram pipetados 13 poços para cada gene, sendo 9 para as amostras de células bidimensionais (cada amostra foi pipetada em triplicata) e 3 para uma amostra em neuroesfera, pois as demais não obtiveram quantidade de RNA suficiente para que fosse feita a PCR, mais o controle negativo.

3.7 Análises Estatísticas

Foi realizado o teste One-way ANOVA para analisar a expressão gênica relativa dos marcadores moleculares das células em cultivo bidimensional. Os resultados dos experimentos descritos acima foram analisados estatisticamente pelo *software* GraphPad Prism 8.0.2, admitindo-se os valores de $p < 0,05$ considerados significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Formação das neuroesferas

Foram realizados testes com diferentes tamanhos de gota (Figura 6), entre 10 μ l e 40 μ l para que, no movimento de inversão da tampa, a gota não escorresse, mas também fosse uma quantidade suficiente para agregar as células e consolidar uma neuroesfera. A maior gota formada é de 30 μ l, a qual não escorre e não entra em contato com a água Milli-q no fundo da placa, após a inversão. Os primeiros testes foram realizados com a linhagem de GBM1 e A172; em todos os volumes testados – 10 μ l, 20 μ l, 25 μ l e 30 μ l – foram observadas neuroesferas no centro das gotas.

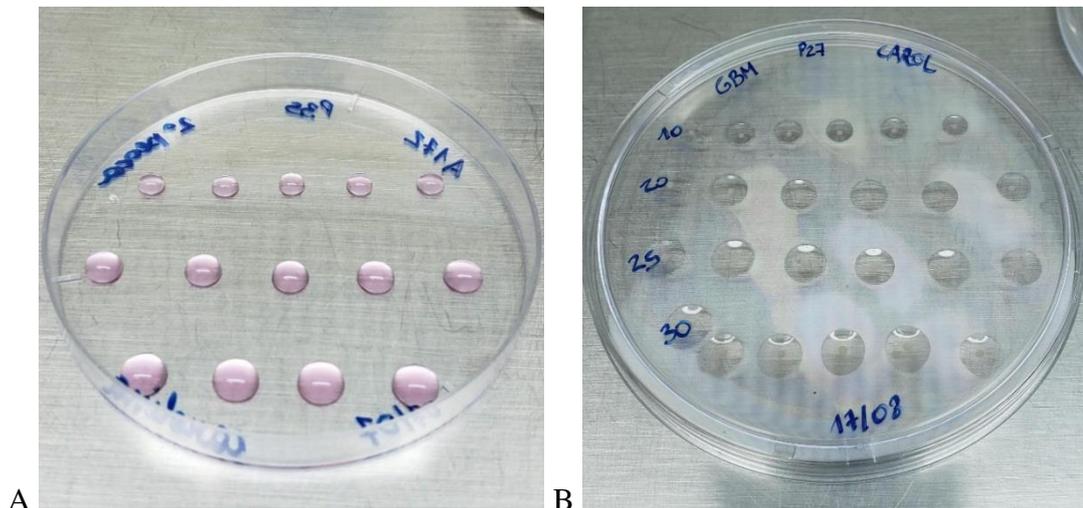


Figura 6: Formação de neuroesferas nas gotas. Após a pipetagem, as gotas permanecem com a coloração inicial do meio (A) e, durante o consumo dos nutrientes e a aglomeração das células, o meio fica mais claro, variando de um amarelado até transparente (B). Esta variação de coloração ocorre porque as células vão consumindo o meio. Fonte: elaborado pela autora.

Com 40 μ l não foi possível formar neuroesferas pois, ao inverter a tampa da placa, o volume era muito alto e a gota escorreu. Na Figura 7, é possível observar a formação das neuroesferas das três linhagens em gotas de 30 μ l. O processo de consolidação das neuroesferas de GBM1 e A172 foi muito semelhante em todos os volumes testados. As neuroesferas de U87, porém, é ligeiramente diferenciada, formando-se mais rapidamente, em relação às demais linhagens. A avaliação de proliferação indica as principais diferenças entre as linhagens.

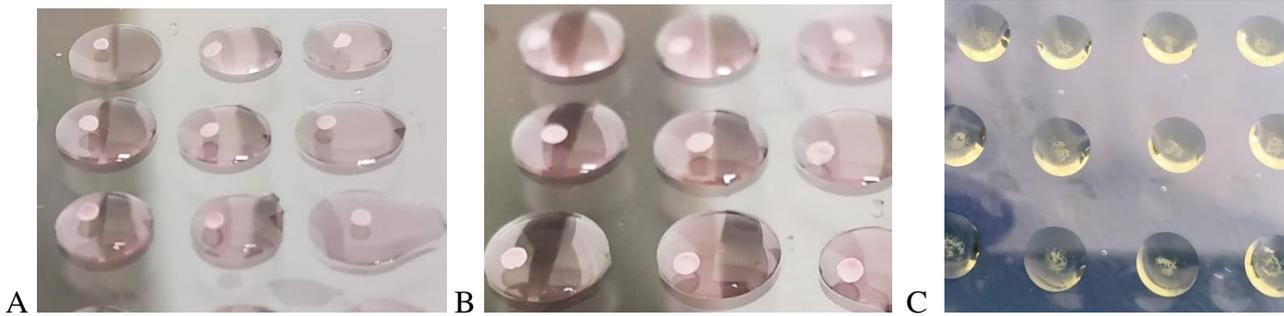


Figura 7: Neuroesferas consolidadas. A) Formação de neuroesferas de GBM após 24 h. Formou-se uma aglomeração esférica no centro da gota, de forma que, ao realizar novamente o movimento de inversão (abrir a tampa e colocá-la de com o interior voltado para fora), as neuroesferas se movimentam levemente, mas não se aderem à tampa. B) Neuroesferas de A172 após 24 h. Ambas as linhagens apresentaram um padrão de formação muito semelhante. Ao observá-las no microscópio, não é possível distingui-las. C) Neuroesferas de U87; após 24 h houve a formação de várias pequenas neuroesferas, que ficaram muito próximas, mas não chegaram a consolidar-se em uma única como nas demais linhagens. Fonte: elaborado pela autora.

As neuroesferas consolidam-se à medida que as células proliferam. A Figura 8 mostra a formação das neuroesferas em 6, 12 e 24 h, nas linhagens de GBM1, A172 e U87, respectivamente. As duas primeiras linhagens tiveram um processo de evolução parecido, o qual formou-se um aglomerado nas primeiras 6 h, um esferoide em 12 h e uma neuroesfera com as bordas completamente delineadas em 24 h. A linhagem U87 não forma apenas uma neuroesfera, e sua proliferação é mais lenta, em relação às demais. Com 6h é possível observar pequenas neuroesferas bem definidas; em 12 h algumas dessas neuroesferas menores se agrupam; com 24 h, observa-se outro agrupamento, mas não forma uma única neuroesfera como as demais linhagens. Alguns aglomerados não se unem e outros formam um semicírculo, como na imagem 8 I. A principal característica observada nesta linhagem é a rápida formação de pequenas neuroesferas que se agrupam, mas não forma uma única neuroesfera, como as linhagens de GBM e A172. As imagens foram observadas em microscópio invertido, com o auxílio das objetivas de 10x, 20x e 40x.

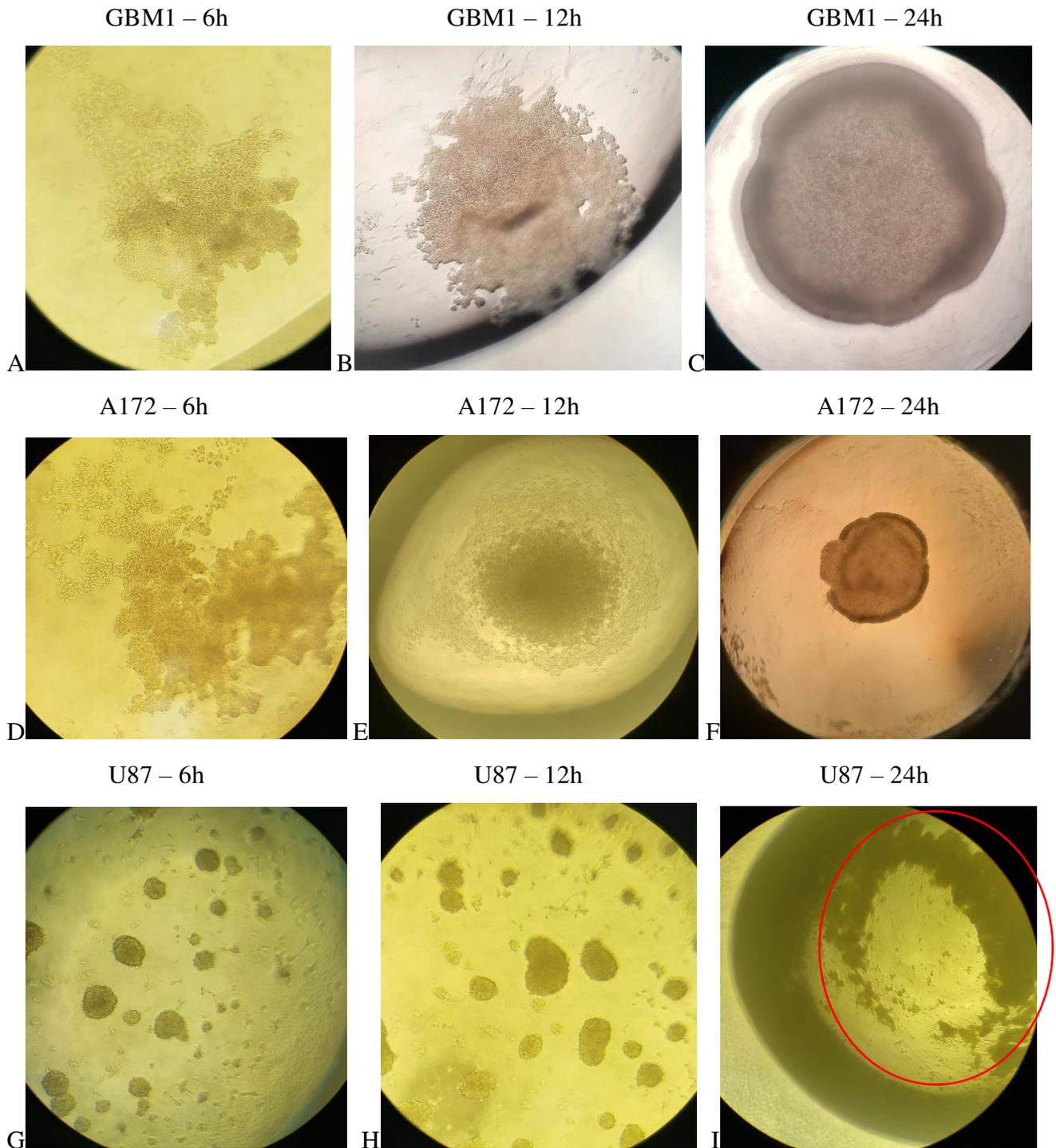


Figura 8: Neuroesferas observadas ao microscópio invertido. As neuroesferas foram fotografadas nas objetivas com aumento de 20x (E e F) e 40x (A, B, C, D, G, H e I); a tampa da placa foi aberta, com as gotas viradas para cima e posicionadas na direção da luz. Fonte: elaborado pela autora.

Em A, B e C observa-se a formação da neuroesfera de GBM1, agrupada com 12 h de formação e consolidada em 24 h. No centro, é possível ver algumas células e as bordas não

muito delineadas, podendo indicar que o processo de associação das células ainda está acontecendo, e há células se proliferando. Em D, E e F, observa-se a formação das neuroesferas de A172, com o processo muito semelhante à de GBM1. Com isso, as fotos E e F foram feitas na objetiva de 20x. É possível notar em E, as células se associando no centro da gota; em F, as bordas da neuroesferas estão mais escuras e com um formato mais consolidado. As neuroesferas de U87 são observadas em G, H e I, na objetiva de 40x, sendo que as neuroesferas aglomeradas em I, estão delimitadas pelo círculo vermelho. A borda mais escura nesta foto, é a borda da gota com o meio; as neuroesferas associadas em 6 e 12 h formaram um semicírculo.

À medida que essa neuroesfera é formada, as células continuam proliferando e vão se agregando. Para a confirmação deste dado, foi realizado um ensaio de crescimento celular, avaliado em 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h para determinar se havia proliferação celular durante a formação da neuroesfera.

4.2 Avaliação de proliferação celular em neuroesferas

Neste experimento, foram selecionadas apenas células de GBM1 para tentar compreender o processo de formação das neuroesferas. O objetivo foi avaliar se as células iriam proliferar à medida que se associam, ou seja, conforme o tempo passa, o número de células aumenta, ou se a quantidade de células aumentaria somente após a consolidação da neuroesfera. Foram selecionadas duas passagens, P25 e P35 para verificar se haveria alguma diferença entre a taxa de proliferação entre as duas. Para cada passagem foram utilizadas 3 amostras para cada passagem, divididas em dois grupos. Cada grupo continha 21 placas pipetadas: 3 amostras de P25, com uma placa para cada intervalo de contagem, na qual foram realizadas 7 contagens. Esta foi feita na câmara de Neubauer, de 2 em 2 h, sendo um intervalo maior entre 12 e 24 h, conforme mostra a Tabela 3. O gráfico da Figura 9 foi realizado considerando apenas as médias de cada grupo.

Tabela 3: Avaliação da proliferação de células em gota de GBM1

Tempo de proliferação (h)	Quantidade de células/gota (30 μ l)							
	P25 Grupo 1	P25 Grupo 2	P25 Grupo 3	Média P25	P35 Grupo 1	P35 Grupo 2	P35 Grupo 3	Média P35
0	34.500	34.400	34.600	34.500	34.350	45.200	34.500	38.000
2	72.200	71.800	71.750	71.920	72.500	83.500	72.200	76.000
4	155.000	180.000	168.500	167.840	175.500	195.000	179.900	183.470
6	235.000	215.000	195.500	215.170	200.000	255.000	240.500	231.840
8	380.550	395.000	350.500	375.350	345.000	485.000	396.500	408.840
12	761.000	790.500	750.000	767.170	700.500	810.000	725.000	745.170
24	2.305.000	2.450.000	2.140.000	2.298.300	2.550.000	2.865.000	2.300.000	2.571.670

Fonte: elaborado pela autora.

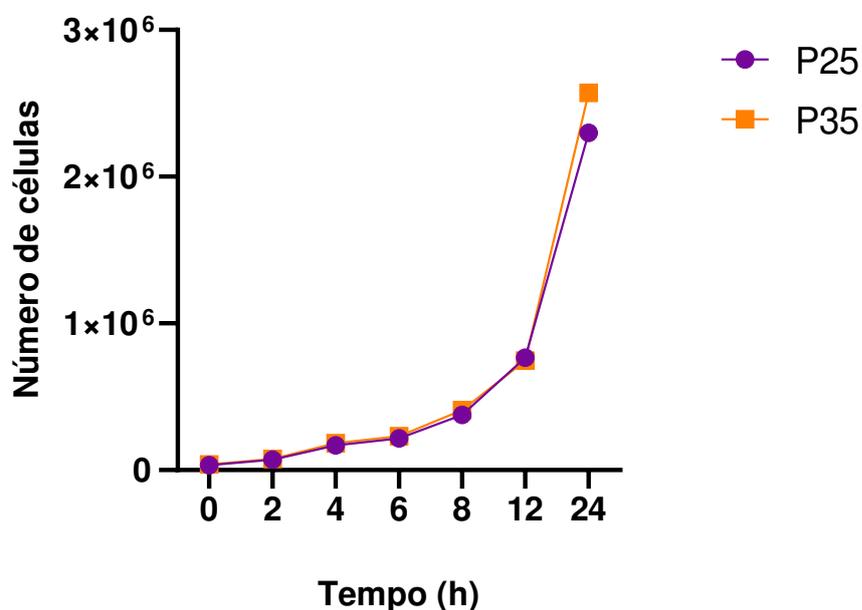
Médias de proliferação em P25 e P35

Figura 9: Proliferação celular de GBM1 em gotas suspensas. O gráfico mostra a progressão média de cada passagem em 24 h. As gotas foram coletadas com uma pipeta, homogeneizadas num microtubo com meio de cultura e contadas na câmara de Neubauer com intervalos de 2h. Fonte: elaborado pela autora.

À medida em que as células proliferam, o meio torna-se mais límpido nas bordas e o meio apresenta um aglomerado esbranquiçado, indicando a junção das células, até a consolidação da neuroesfera. Foi observado que as células se multiplicam de maneira semelhante apesar de estarem em passagens diferentes. Este resultado indica que pode existir a presença de CTs na massa tumoral, o que, em um tumor, poderia contribuir para reincidência e resistência do tumor. Estas células são responsáveis pela formação e manutenção do microambiente tumoral e é possível que, sem a presença delas, as neuroesferas não se formassem.

Após observar o crescimento celular em passagens diferentes, outro teste foi realizado comparando as células de GBM1 (na passagem 28) e as linhagens A172 (passagem 25) e U87 (passagem 12). Foram utilizadas 5 amostras para cada tipo celular. Conforme o experimento anterior, cada **n** foi contado num intervalo de 2 h, um intervalo de 4 h e o último de 12 h; foram pipetadas 6 placas – uma placa para cada intervalo de contagem – em cada amostra, com um total de **30 placas** para cada linhagem. A primeira contagem foi realizada **antes de pipetar a primeira placa (0 h)**. Os resultados indicaram que as células de GBM1 e A172 tiveram um crescimento muito parecido, quanto à quantidade, morfologia e formação de neuroesferas; em U87 o crescimento foi mais lento e foram observadas nas gotas várias pequenas neuroesferas, não apenas uma. Para a contagem, foi considerado o conteúdo total de cada gota.

Tabela 4: Avaliação da proliferação celular em amostras de GBM1

<i>Tempo de proliferação (h)</i>	Quantidade de células/gota (30 µl)				
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
0	35.500	34.000	34.550	32.000	36.550
2	75.000	71.500	68.000	72.000	72.500
4	150.000	145.500	138.000	148.000	149.500
6	205.000	230.000	220.500	265.000	245.000
8	320.500	345.000	298.000	330.000	365.000
12	705.000	785.000	650.500	740.500	730.000
24	2.550.000	2.360.000	2.110.000	2.450.000	2.330.000

Fonte: elaborado pela autora.

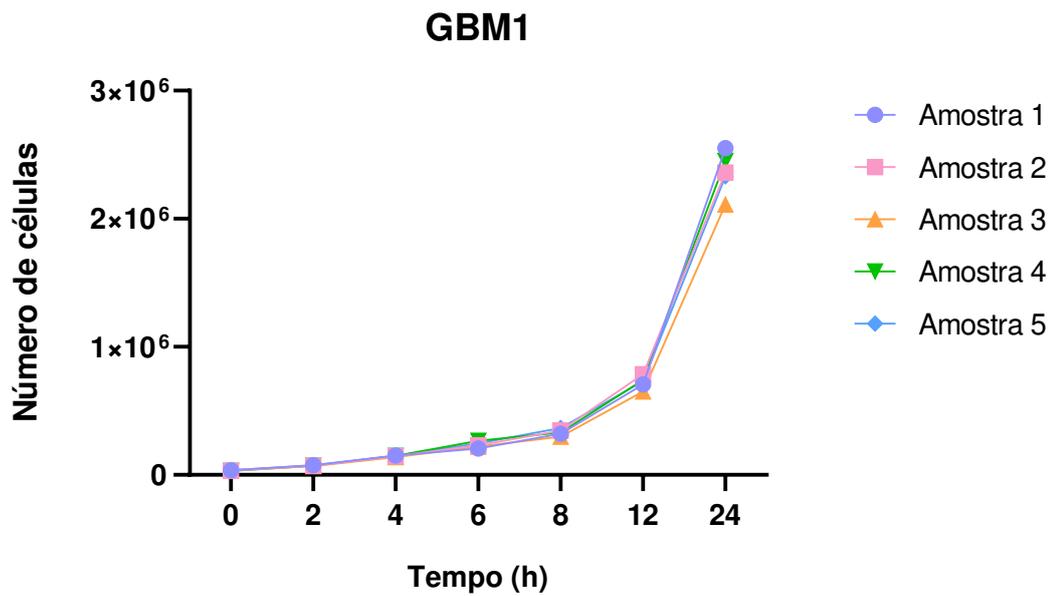


Figura 10: Comparação entre amostras de GBM1 na proliferação celular. Cada amostra foi pipetada a partir de uma garrafa, pois as células podem apresentar diferenças entre a taxa de crescimento. De cada amostra, as quais as células estavam em condições bidimensionais, foram pipetadas 6 placas, para que se formassem as neuroesferas. Fonte: elaborado pela autora.

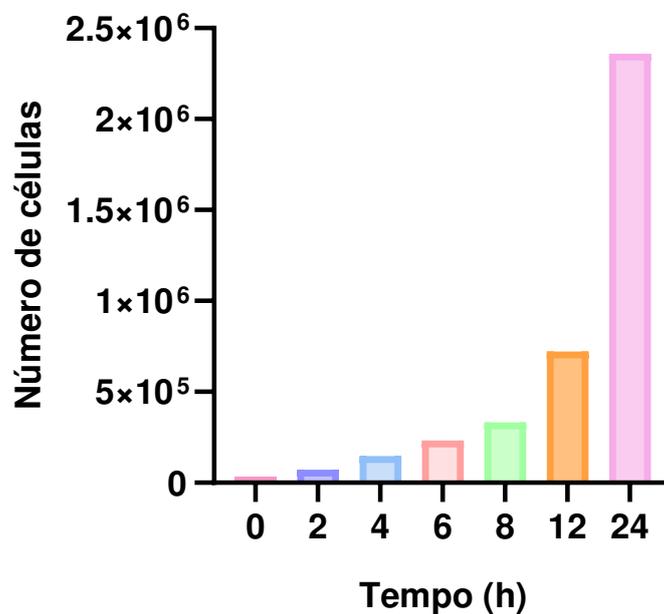


Figura 11: Comparação entre médias das taxas de proliferação celular nas células de GBM1 em 24h. Foi calculada a média das 5 amostras em 24h, para que pudesse ser avaliada a taxa de proliferação entre estas. A maior quantidade registrada foi no intervalo de 12 h para 24 h. Fonte: elaborado pela autora.

A quantidade aproximada de células na contagem final (24h) variou de acordo com cada grupo, independentemente da quantidade inicial. A amostra 5 com mais células em 0h quando a gota foi pipetada, não foi o grupo com mais células no final do experimento, foi a amostra 1. Ainda não está claro quais fatores poderiam influenciar numa proliferação mais intensa, uma vez que todos os grupos foram feitos considerando as mesmas condições, como quantidade de meio e SBF.

Tabela 5: Avaliação da proliferação celular em grupos de A172

<i>Tempo de proliferação (h)</i>	Quantidade de células/gota (30 μl)				
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
0	33.000	30.500	35.000	34.500	31.000
2	65.000	68.500	67.000	66.500	63.000
4	98.000	99.500	110.500	105.000	99.000
6	195.500	198.000	199.000	195.000	196.500
8	285.000	270.000	310.000	295.500	276.000
12	655.000	680.000	695.500	660.000	690.500
24	1.500.000	1.650.000	1.700.000	1.550.000	1.850.000

Fonte: elaborado pela autora.

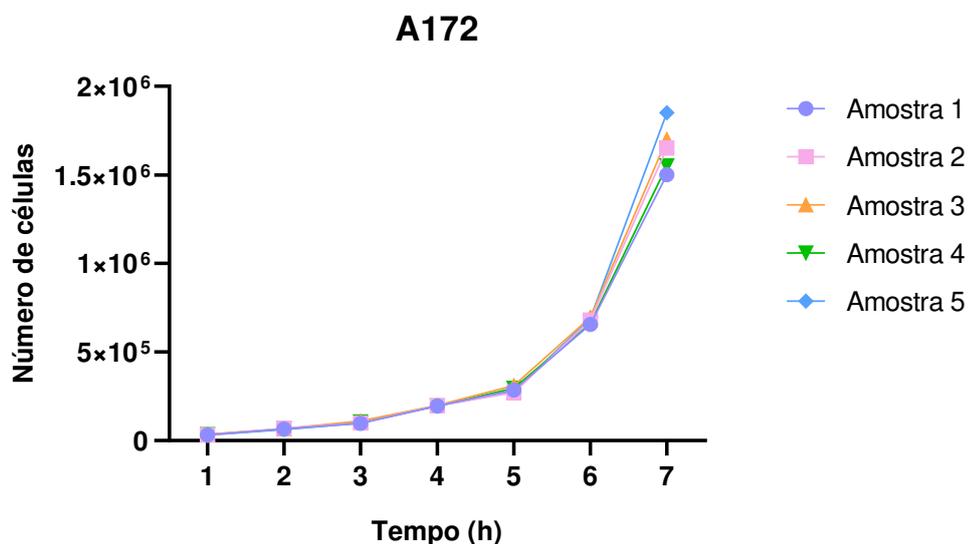


Figura 12: Comparação entre amostras de A172 na proliferação celular. Cada amostra foi pipetada a partir de uma garrafa, pois as células podem apresentar diferenças entre a taxa de crescimento. De cada amostra, as quais as células estavam em condições bidimensionais, foram pipetadas 6 placas, para que se formassem as neuroesferas. A taxa de proliferação foi semelhante à de GBM1. Fonte: elaborado pela autora.

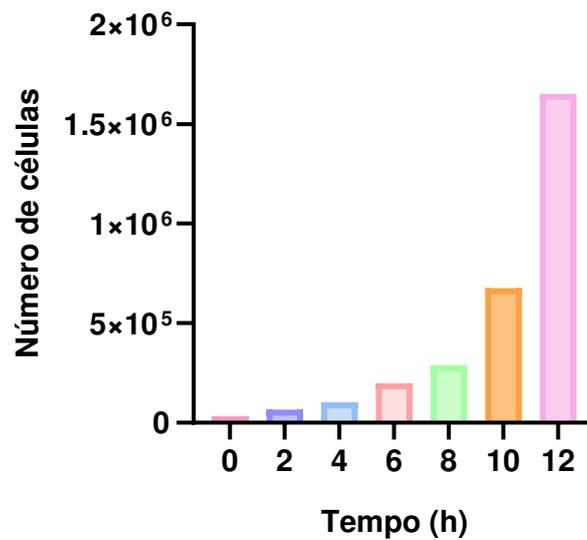


Figura 13: Comparação entre médias das taxas de proliferação celular nas células de A172 em 24h. Foi calculada a média das 5 amostras em 24h, para que pudesse ser avaliada a taxa de proliferação entre estas. A maior quantidade registrada foi no intervalo de 12 h para 24 h. Fonte: elaborado pela autora.

Os grupos que apresentaram a menor taxa de proliferação, em relação às outras linhagens, foram os de U87. Tanto em condições bidimensionais como em gota suspensa, o crescimento celular foi mais lento. As neuroesferas se associaram mais rápido, em pequenas neuroesferas e não apenas uma, como nas demais linhagens. Para a contagem, foi considerado o conteúdo do volume da gota, uma vez que não seria possível separar cada pequena esfera que se formou.

Tabela 6: Avaliação da proliferação celular em grupos de U87

<i>Tempo de proliferação (h)</i>	Quantidade de células/gota (30 µl)				
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
0	22.000	25.000	25.500	23.000	24.500
2	41.500	43.000	44.000	43.000	48.500
4	85.000	89.500	91.500	83.500	92.000
6	115.000	126.500	120.000	118.000	135.500
8	256.500	235.000	210.000	228.500	235.000
12	460.000	445.000	510.000	430.000	520.500
24	950.500	980.000	1.150.000	945.000	1.005.000

Fonte: elaborado pela autora.

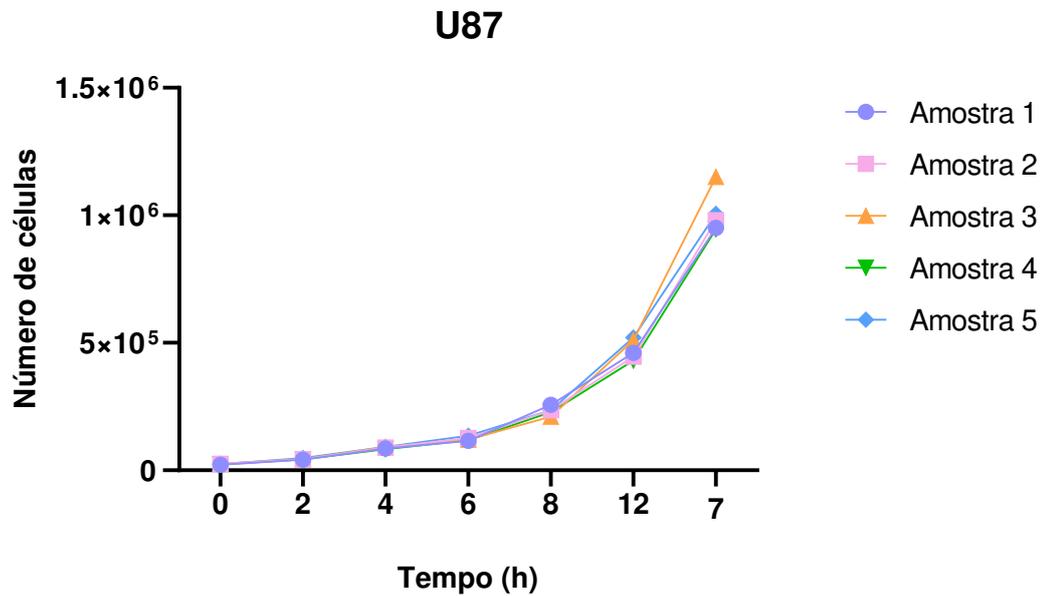


Figura 14: Comparação entre amostras de U87 na proliferação celular. Apesar de ter apresentado a menor taxa de proliferação em relação às demais linhagens, os grupos entre si apresentaram um crescimento semelhante. Fonte: elaborado pela autora.

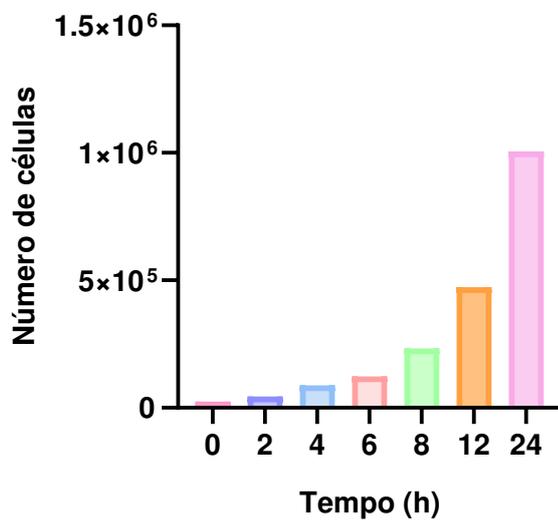


Figura 15: Comparação entre médias das taxas de proliferação celular nas células de U87 em 24h. Foi calculada a média das 5 amostras em 24h, para que pudesse ser avaliada a taxa de proliferação entre estas. A maior quantidade registrada foi no intervalo de 12 h para 24 h. Fonte: elaborado pela autora.

As células em pequenas neuroesferas foram homogeneizadas e contadas da mesma maneira que as demais linhagens, contudo, o crescimento foi mais lento e, ao final de 24 h a quantidade de células aumentou consideravelmente. Os mecanismos pelos quais a proliferação acentuada das células enquanto formavam as neuroesferas ainda não foi totalmente compreendido. Houve diferença significativa entre todos os grupos, em relação ao total de células contadas no tempo final, como indica a figura 16. Apesar da diferença entre as linhagens, os grupos entre si tiveram um comportamento de agrupamento e proliferação levemente semelhante, o que pode indicar uma característica da fisiologia das células de GBM, contudo são necessárias maiores investigações para afirmar quais são estas características. Todas as linhagens apresentaram alta taxa mitótica e, ao final de 12 h foi possível observar neuroesferas formadas no centro das gotas. A proliferação média em GBM1 e A172 foi maior, e as células apresentaram um padrão de crescimento maior, em relação à linhagem U87 expressou um crescimento mais lento.

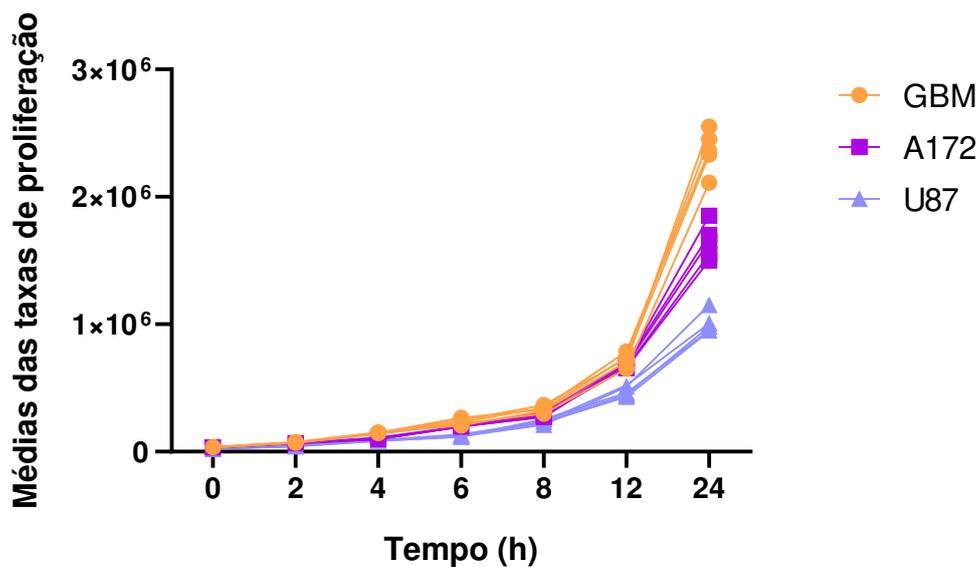


Figura 16: Comparação entre a proliferação das médias das amostras nas linhagens de GBM1, A172 e U87 em 24 h. A média das taxas de proliferação entre os grupos foi calculada em relação às horas as quais foram contadas. Houve um aumento expressivo na contagem final, em 24 h, como observado acima. Fonte: elaborado pela autora

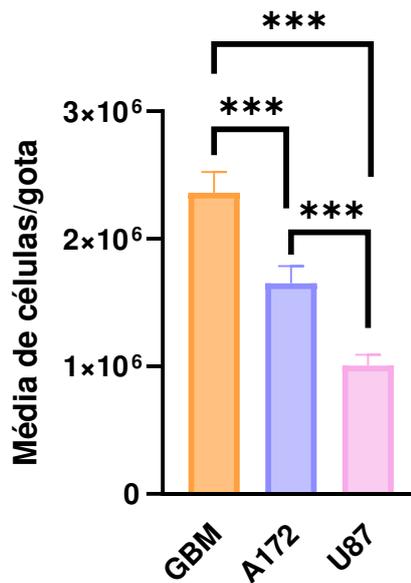


Figura 17: Comparação entre a proliferação das médias das linhagens de GBM1, A172 e U87 em 24 h. Foi realizado um teste *One-way* ANOVA, com o valor de $p < 0,05$ significativo, indicado com “***”. Houve diferenças significativas entre todas as linhagens, destacando-se a taxa de proliferação mais acentuada em GBM1 e a menor em U87. Fonte: elaborado pela autora.

4.3 Expressão de Marcadores Moleculares

A RT-qPCR foi realizada nas células de GBM1 e em U87. Foram selecionadas duas linhagens para realizar uma comparação entre a expressão nas células primárias de GBM1, comparando com apenas uma linhagem comercial e, com isso, não foram utilizadas as células da linhagem A172 para estes experimentos.

Após a extração, o RNA das amostras foi dosado nas condições bidimensionais e em neuroesferas, de acordo com a Tabela 7. As células da linhagem U87 foram as únicas que apresentaram as condições favoráveis para que fosse realizada a RT-qPCR; as células de GBM1 não alcançaram o resultado esperado com o gene de referência (GAPDH), e futuramente serão realizados outros testes para alcançar o resultado esperado e comparar com outras linhagens. As neuroesferas de U87 não apresentaram quantidade de RNA suficiente nas três amostras, com isso, a PCR foi realizada na amostra que apresentou a quantidade de RNA suficiente, apresentado um resultado preliminar sobre as condições fisiológicas destas células, e a expressão dos marcadores de CTs.

Tabela 7: volume e concentração de RNA em cada amostra (μl)

Linagem	Condição de Cultura	Volume de RNA (μl)	Concentração ($\text{ng}/\mu\text{l}$)
GBM1	Bidimensional	20	240,0
GBM1	Bidimensional	20	954,0
GBM1	Bidimensional	30	414,0
GBM1	Neuroesfera	20	65,0
GBM1	Neuroesfera	20	32,8
GBM1	Neuroesfera	20	10,6
U87	Bidimensional	30	1160,0
U87	Bidimensional	20	102,0
U87	Bidimensional	20	53,8
U87	Neuroesfera	20	11,0
U87	Neuroesfera	20	<i>Muito baixo</i>
U87	Neuroesfera	20	<i>Muito baixo</i>

Fonte: elaborado pela autora.

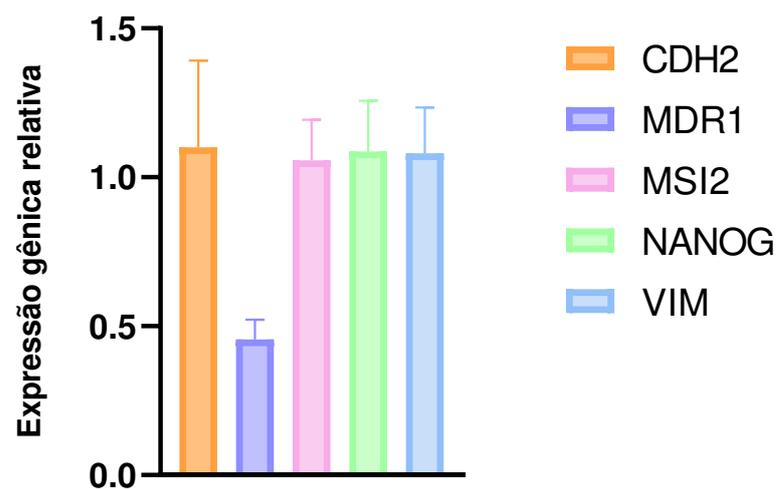


Figura 18: Expressão de genes de CTs em células de U87 bidimensionais. O gráfico apresenta a média da expressão gênica relativa das 3 amostras em cultivo bidimensional. Foi realizado um teste *One-way* ANOVA, considerando o valor de $p < 0,05$ como não significativo. Fonte: elaborado pela autora.

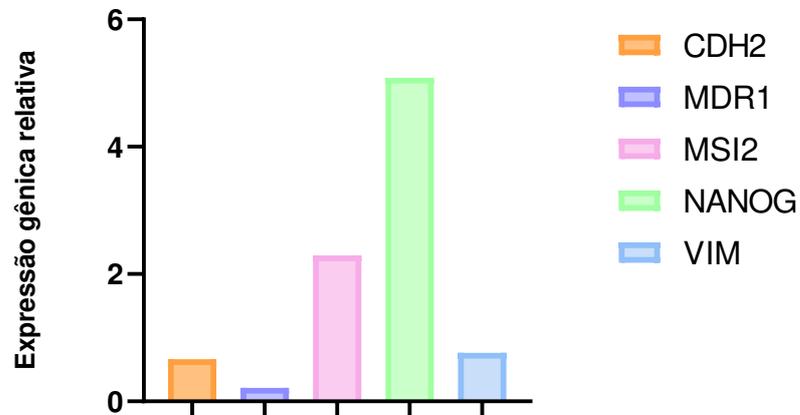


Figura 19: Expressão de genes de CTs em células de U87 tridimensionais. O gráfico apresenta a média da expressão gênica relativa dos marcadores das amostras em neuroesferas. Resultado preliminar. Fonte: elaborado pela autora.

As figuras 14 e 15 confirmam a expressão dos marcadores moleculares em diferentes condições de cultivo das células de U87. Os resultados da expressão dos marcadores em neuroesferas de U87 são preliminares, devido ao baixo número de amostras, indicando que mais testes serão necessários para confirmar a presença de CTCs nestas condições.

As avaliações de proliferação nas 3 linhagens apresentaram taxas de proliferação acentuada, sendo que a linhagem U87 foi menor em relação às outras duas. Na extração de RNA, as células de GBM1 apresentaram uma quantidade maior em condições de cultivo bidimensionais do que em neuroesferas. Ainda não está claro quais são os mecanismos responsáveis por esta diferença. A linhagem U87 foi escolhida para realizar a comparação com GBM1, mas das 3 amostras em neuroesferas apenas uma apresentou quantidade de RNA suficiente para realizar a qPCR.

Apesar da baixa quantidade de amostras, os testes indicam que há CTCs em neuroesferas, mostrando a heterogeneidade tumoral e o método de formação das amostras tridimensionais oferece a possibilidade de aprofundar a compreensão dos mecanismos, condições fisiológicas e sinalizações envolvidas nas células de GBM.

5 DISCUSSÃO

A comparação entre dois modelos de cultivo de células de GBM, sendo bidimensional e em neuroesferas, é fundamental para uma compreensão abrangente desse tipo de tumor. Enquanto as culturas bidimensionais são importantes para estudos de interações célula-célula e testes de drogas em um ambiente bidimensional, as neuroesferas são críticas para investigar as propriedades de CTCs e a heterogeneidade celular em um contexto tridimensional. Compreender a fisiologia em ambas as condições proporciona uma visão mais completa das características tumorais e das respostas terapêuticas. A integração dos achados de ambos os modelos pode levar ao desenvolvimento de terapias mais precisas e eficazes, afetando tanto a massa principal do tumor quanto as CTCs responsáveis pela recidiva e resistência ao tratamento.

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho apresentam a possibilidade de haver CTCs nas populações tumorais cultivadas em diferentes condições. Em 2D, baseado na literatura (Lee et al., 2018; Zottel et al., 2023), e, ao formar as primeiras gotas com as neuroesferas, derivadas das células aderentes, foi possível confirmar a presença de CTCs na massa tumoral. A condição de formação de neuroesferas em gotas suspensas, influencia as células a remodelarem a formação da matriz extracelular (Kahlert *et al.*, 2015; Pratt, Roy e Annabi, 2012) e do citoesqueleto (Pratt *et al.*, 2016), para que a capacidade de sobrevivência tumoral seja possível na ausência de um tecido de suporte e sem a possibilidade de formação de vasos.

A progressão acentuada de células de GBM em condições de neuroesferas pode ser atribuída a vários fatores que mimetizam mais de perto o ambiente tumoral *in vivo* em comparação com as condições bidimensionais. Esses fatores incluem interações celulares mais realistas, presença de um microambiente tridimensional, gradientes de nutrientes e oxigênio, e sinalização celular. Apesar das linhagens de GBM1 e A172 apresentarem uma alta taxa de proliferação, as células de GBM1 em neuroesferas que tiveram o RNA dosado, apresentaram uma quantidade menor do que em condições bidimensionais. Estudos preliminares em condições tridimensionais indicam que pode existir um nicho hipóxico. Esta é uma característica comum do microambiente tumoral e é replicada de forma mais fiel em culturas 3D. A hipóxia pode levar à resistência ao tratamento e à proliferação celular aumentada através da indução de respostas adaptativas (Dahlrot *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2020). São necessários experimentos mais específicos para tentar compreender como funcionaria um nicho hipóxico das neuroesferas, e quanto tempo as células permanecem viáveis dentro deste modelo.

Outros ensaios, apontaram que a formação de neuroesferas em outras condições de meio de cultura é uma característica comum observada em gliomas (Laks *et al.*, 2009). Como modelo de estudo, foram relatadas modificações na expressão de RNAs mensageiros (Dymova *et al.*, 2022). As linhagens de GBM1 e A172 apresentaram um comportamento semelhante; a proliferação era mais rápida e as neuroesferas se consolidavam em cerca de 24 h, enquanto as de U87 tiveram condições mais restritas e demandavam mais manutenção, como o aumento da quantidade de SBF. Também é válido comparar as vantagens e desvantagens de cada condição de cultura. As culturas bidimensionais são relativamente fáceis de estabelecer e manter, permitindo experimentos rápidos e reprodutíveis além de promover interações célula-célula (Wang *et al.*, 2020). No entanto, há limitações, como a redução da heterogeneidade, o que não representa a diversidade celular encontrada em um tumor real, e a perda de algumas propriedades das CTCs, importantes na progressão e recidiva do câncer.

As neuroesferas proporcionam um microambiente tridimensional que é mais representativo da arquitetura tumoral *in vivo*. Este modelo é eficaz na manutenção das propriedades de CTCs, permitindo o estudo de suas características e resistência a terapias. Além disso, elas podem conter uma maior variedade de subtipos celulares, refletindo a complexidade do tumor original. As limitações incluem a complexidade técnica, já que o cultivo e a manutenção de neuroesferas são mais desafiadores e requerem condições específicas de cultura e manipulação cuidadosa, e a formação destas pode ser inconsistente, levando à variabilidade nos resultados experimentais.

Outra questão a ser considerada é a ausência de angiogênese, que não leva em conta o fluxo sanguíneo adequado e a malformação vascular encontrado em GBMs humanos (Dundar *et al.*, 2020). O ensaio de neuroesferas rapidamente se tornou o método de escolha e desde então se tornou uma ferramenta valiosa para isolar e compreender a biologia de animais embrionários e adultos CTs do SNC e em CTCs, e durante a formação das neuroesferas, as culturas celulares aderentes passam por uma série de alterações no transcriptoma, metaboloma, proteoma, que devem ser levadas em consideração ao interpretar os dados do estudo correspondente (Lee *et al.*, 2018; Vasileva *et al.*, 2022). Embora não haja dados comparativos com as culturas bidimensionais, é importante destacar que as neuroesferas podem ampliar as formas de estudo de GBMs antes de serem adotados modelos *in vivo*. Por isso, entender as limitações que este método oferece, pode direcionar melhor as formas de utilização e os objetivos propostos para ele. A expressão de genes, por exemplo, se mostrou bastante eficaz, embora alguns resultados ainda sejam preliminares, indicando que é possível prosseguir com esta metodologia.

Estudar marcadores moleculares de CTs em condições bidimensionais e compará-los com neuroesferas formadas em gota suspensa é importante porque abrangem aspectos como mecanismos de diferenciação e sinalização celular. As células bidimensionais crescem em um ambiente onde as células podem interagir mais intensamente e isso pode levar à ativação de diferentes vias de sinalização e à expressão de diferentes marcadores moleculares, como uma expressão mais elevada de CDH2 e VIM, uma vez que aderentes, elas têm maior contato do que em condições tridimensionais. As neuroesferas formadas em gota suspensa crescem em um ambiente livre de contato com superfícies sólidas, o que pode mimetizar melhor o ambiente natural do desenvolvimento neural.

A organização esférica indica que as células na periferia da neuroesfera têm melhor acesso ao oxigênio e aos nutrientes fornecidos pelo meio de cultura, enquanto as células localizadas mais no interior têm menos acesso (Boyd *et al.*, 2020; Wicks e Semenza, 2022). À medida que a esfera cresce, a difusão de oxigênio do meio de cultura para o centro da neuroesfera torna-se limitada, o que pode explicar a diferença de expressão do MDR1, que é uma bomba de efluxo de drogas, e contribui para a sobrevivência das células da periferia da esfera, mas não necessariamente as do centro. Os resultados preliminares da amostra de neuroesfera de U87 indicaram que a expressão elevada dos genes MSI2 e NANOG podem contribuir para a manutenção do estado de CT na massa tumoral

A manutenção do comportamento de CTCs em GBM é vital para a sua persistência e agressividade. Através de vias de sinalização, como Notch, Hedgehog e Wnt (Hu *et al.*, 2016; Huang e Zhang, 2019; Macharia *et al.*, 2021), que são vias cruciais para a autorrenovação e interações com o microambiente tumoral, garantem a autorrenovação e a resistência ao tratamento, além de remodelar o microambiente para favorecer o crescimento tumoral. A integração dos resultados obtidos a partir de ambos os modelos é crucial para um entendimento abrangente. Enquanto as células bidimensionais fornecem um ambiente controlado e simplificado para estudos preliminares e análises rápidas, as neuroesferas oferecem um sistema mais complexo que imita melhor as condições fisiológicas reais. O uso combinado destas técnicas permite a identificação de características específicas das CTCs e a avaliação de como estas células interagem com o microambiente tumoral. A comparação entre a expressão gênica e a resposta a drogas em ambos os modelos pode revelar diferenças críticas que influenciam a recidiva e a resistência ao tratamento, possibilitando o desenvolvimento de terapias mais eficazes para este e outros tipos de tumor.

6 CONCLUSÕES

Cultivar células em neuroesferas pode auxiliar a compreensão de diferenças fisiológicas quando comparadas com o modelo bidimensional, pois oferece uma visão abrangente dos comportamentos celulares nos diferentes contextos. O modelo tridimensional mantém CTCs, que são cruciais para a progressão e resistência dos tumores. Assim, são necessários meios complementares aos convencionais – cultivo bidimensional.

O método apresentado neste trabalho propõe uma contribuição nos estudos de células de GBM, para alcançar maiores resultados em relação à morfologia e proliferação celular. Com isso, é possível utilizar o modelo tridimensional para comparar com diferentes cultivos bidimensionais que já são bem estabelecidos na literatura, além de trazer uma nova perspectiva para o entendimento dos gliomas. As descobertas podem auxiliar em novas formas de tratamento, e proporcionar melhores resultados em conjunto com as terapias já existentes.

7 REFERÊNCIAS

AHMED, N. *et al.* **Tumour microenvironment and metabolic plasticity in cancer and cancer stem cells: Perspectives on metabolic and immune regulatory signatures in chemoresistant ovarian cancer stem cells** *Seminars in Cancer Biology* Academic Press, 1 dez. 2018.

ALEXANDER, B. M.; CLOUGHESY, T. F. Adult Glioblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 21, p. 2402–2409, 2017.

BISEROVA, K. *et al.* **Cancer stem cells: Significance in origin, pathogenesis and treatment of glioblastoma** *Cells* MDPI, 1 mar. 2021.

BONGSO, A.; FONG, C. Y. Human embryonic stem cells: Their nature, properties, and uses. *Em: Trends in Stem Cell Biology and Technology*. [s.l.] Humana Press, 2009. v. 2p. 1–17.

BOSENNEC, M. *et al.* MDR1 in immunity: friend or foe? **OncoImmunology**, v. 7, n. 12, p. 1–11, 2 dez. 2018.

BOYD, N. H. *et al.* **Glioma stem cells and their roles within the hypoxic tumor microenvironment** *Theranostics* Ivyspring International Publisher, 2020.

BRADSHAW, A. *et al.* Cancer Stem Cells in Glioblastoma Multiforme. **Frontiers in Surgery**, v. 48, n. 3, 26 ago. 2016.

BROWN, C. E. *et al.* Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 26, p. 2561–2569, 29 dez. 2016.

CAHILL, D.; TURCAN, S. Origin of Gliomas. **Seminars in Neurology**, v. 38, n. 1, p. 5–10, 1 fev. 2018.

CALINESCU, A. A. *et al.* Stem cells for the treatment of glioblastoma: A 20-year perspective. **CNS Oncology**, v. 10, n. 2, 1 jun. 2021.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 581–585, jul. 2006.

DAHLROT, R. H. *et al.* **What is the clinical value of cancer stem cell markers in gliomas?** *Int J Clin Exp Pathol*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.ijcep.com/>.

DARMANIS, S. *et al.* Single-Cell RNA-Seq Analysis of Infiltrating Neoplastic Cells at the Migrating Front of Human Glioblastoma. **Cell Reports**, v. 21, n. 5, p. 1399–1410, 31 out. 2017.

DAVIS, M. E. **Epidemiology and Overview of Gliomas Seminars in Oncology Nursing** W.B. Saunders, 1 dez. 2018.

DIETRICH, J.; DIAMOND, E. L.; KESARI, S. **Glioma stem cell signaling: Therapeutic opportunities and challenges** *Expert Review of Anticancer Therapy*, maio 2010.

DONG, W. *et al.* Glioma glycolipid metabolism: MSI2–SNORD12B–FIP1L1–ZBTB4 feedback loop as a potential treatment target. **Clinical and Translational Medicine**, v. 11, n. 5, 1 maio 2021.

DUNDAR, B. *et al.* **Methods for in vitro modeling of glioma invasion: Choosing tools to meet the need** *GLIA* John Wiley and Sons Inc., 1 nov. 2020.

DYMOVA, M. A. *et al.* MicroRNA and mRNA Expression Changes in Glioblastoma Cells Cultivated under Conditions of Neurosphere Formation. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 44, n. 11, p. 5294–5311, 1 nov. 2022.

EASWARAN, H.; TSAI, H. C.; BAYLIN, S. B. **Cancer Epigenetics: Tumor Heterogeneity, Plasticity of Stem-like States, and Drug Resistance** *Molecular Cell*, Cell Press, 5 jun. 2014.

FLORES, D. G. *et al.* Cancer Stem Cells and the Biology of Brain Tumors. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 4, p. 306–313, 2009.

FURUKAWA, J. I. *et al.* Comprehensive glycomics of a multistep human brain tumor model reveals specific glycosylation patterns related to malignancy. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, 1 jul. 2015.

GALLI, R. *et al.* **Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma** *CANCER RESEARCH*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/64/19/7011/2518418/zch01904007011.pdf>>.

GIMPLE, R. C. *et al.* Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. **Gene & Development**, v. 33, n. 1, p. 591–609, 2019.

GRUBELNIK, G. *et al.* NANOG expression in human development and cancerogenesis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 245, n. 5, p. 456–464, 1 mar. 2020.

HIRA, V. V. V.; ADERETTI, D. A.; NOORDEN, C. J. F. VAN. **Glioma Stem Cell Niches in Human Glioblastoma Are Periarteriolar** *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* SAGE Publications Ltd, 1 maio 2018.

HONG, X.; CHEDID, K.; KALKANIS, S. N. Glioblastoma cell line-derived spheres in serum-containing medium versus serum-free medium: A comparison of cancer stem cell properties. **International Journal of Oncology**, v. 41, n. 5, p. 1693–1700, nov. 2012.

HU, B. *et al.* Epigenetic Activation of WNT5A Drives Glioblastoma Stem Cell Differentiation and Invasive Growth. **Cell**, v. 167, n. 5, p. 1281- 1295.e18, 17 nov. 2016.

HUANG, L. E. Impact of CDKN2A/B Homozygous Deletion on the Prognosis and Biology of IDH-Mutant Glioma. **Biomedicines**, v. 10, n. 2, 1 fev. 2022.

HUANG, L.; ZHANG, L. **Neural stem cell therapies and hypoxic-ischemic brain injury Progress in Neurobiology** Elsevier Ltd, 1 fev. 2019.

HUANG, T. *et al.* **Stem cell programs in cancer initiation, progression, and therapy resistance Theranostics** Ivyspring International Publisher, 2020.

IACOPINO, F. *et al.* Isolation of cancer stem cells from three human glioblastoma cell lines: Characterization of two selected clones. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 14 ago. 2014.

IGNATOVA, T. N. *et al.* Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. **GLIA**, v. 39, n. 3, p. 193–206, set. 2002.

JIANG, Y. *et al.* CircLRFN5 inhibits the progression of glioblastoma via PRRX2/GCH1 mediated ferroptosis. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 41, n. 1, 1 dez. 2022.

JIANG, Y.; UHRBOM, L. On the origin of glioma. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 117, n. 2, p. 113–121, maio 2012.

KAHLERT, U. D. *et al.* The effect of neurosphere culture conditions on the cellular metabolism of glioma cells. **Folia Neuropathologica**, v. 53, n. 3, p. 219–225, 2015.

KRISHNA, S. *et al.* Glioblastoma remodelling of human neural circuits decreases survival. **Nature**, v. 617, n. 7961, p. 599–607, 18 maio 2023.

LAKS, D. R. *et al.* Neurosphere formation is an independent predictor of clinical outcome in malignant glioma. **Stem Cells**, v. 27, n. 4, p. 980–987, abr. 2009.

LATHIA, J. D. *et al.* Cancer stem cells in glioblastoma. 2015a.
Cancer stem cells in glioblastoma. 2015b.

LEE, E. *et al.* **Comparison of glioblastoma (GBM) molecular classification methods Seminars in Cancer Biology** Academic Press, 1 dez. 2018.

LI, J. *et al.* Targeting the Notch1 oncogene by miR-139-5p inhibits glioma metastasis and epithelial-mesenchymal transition (EMT). **BMC Neurology**, v. 18, n. 1, 31 ago. 2018.

LIU, F. *et al.* Rapid tumor recurrence in a novel murine GBM surgical model is associated with Akt/PD-L1/vimentin signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 569, p. 1–9, 10 set. 2021.

LOUIS, D. N. *et al.* **The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system, Acta Neuropathologica**, ago. 2007.

The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, 1 jun. 2016.

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.

MACHARIA, L. W. *et al.* The genotypic and phenotypic impact of hypoxia microenvironment on glioblastoma cell lines. **BMC Cancer**, v. 21, n. 1, 1 dez. 2021.

MICHOR, F.; POLYAK, K. The origins and implications of intratumor heterogeneity. **Cancer Prevention Research**, v. 3, n. 11, p. 1361–1364, nov. 2010.

NIKPOUR, P. *et al.* The stem cell self-renewal gene, Musashi 1, is highly expressed in tumor and non-tumor samples of human bladder. **Indian Journal of Cancer**, v. 50, n. 3, p. 214–218, 2013.

PAUL, R.; DORSEY, J. F.; FAN, Y. **Cell plasticity, senescence, and quiescence in cancer stem cells: Biological and therapeutic implications Pharmacology and Therapeutics** Elsevier Inc., 1 mar. 2022a.

____. Cell plasticity, senescence, and quiescence in cancer stem cells: Biological and therapeutic implications. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 231, 1 mar. 2022b.

PEIRIS-PAGÈS, M. *et al.* **Cancer stem cell metabolism Breast Cancer Research** BioMed Central Ltd., 24 maio 2016.

PENG, L. *et al.* Distribution of cancer stem cells in two human brain gliomas. **Oncology Letters**, v. 17, n. 2, p. 2123–2130, 1 fev. 2019.

PILKINGTON, G. J. **Cancer stem cells in the mammalian central nervous system Cell Proliferation**, dez. 2005.

PINTO, G. *et al.* Patient-derived glioblastoma stem cells transfer mitochondria through tunneling nanotubes in tumor organoids. **Biochemical Journal**, v. 478, n. 1, p. 21–39, 1 jan. 2021.

PRATT, J. *et al.* Evidence of MTCBP-1 interaction with the cytoplasmic domain of MT1-MMP: Implications in the autophagy cell index of high-grade glioblastoma. **Molecular Carcinogenesis**, v. 55, n. 2, p. 148–160, 1 fev. 2016.

PRATT, J.; ROY, R.; ANNABI, B. Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells. **Glycobiology**, v. 22, n. 9, p. 1245–1255, set. 2012.

RICH, J. N. Cancer stem cells in radiation resistance. **Cancer Research**, v. 67, n. 19, p. 8980–8984, 1 out. 2007.

RODRIGUEZ, S. M. B. *et al.* Glioblastoma Stem Cells - Useful Tools in the Battle against Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 2–19, 1 maio 2022.

SCHAICH, M. *et al.* A MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in glioblastoma patients. **Annals of Oncology**, v. 20, n. 1, p. 175–181, 2009.

SEGERMAN, A. *et al.* Clonal Variation in Drug and Radiation Response among Glioma-Initiating Cells Is Linked to Proneural-Mesenchymal Transition. **Cell Reports**, v. 17, n. 11, p. 2994–3009, 13 dez. 2016.

SHEN, Q. *et al.* Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. **Science**, v. 304, n. 5675, p. 1338–1340, 28 maio 2004.

SOBHANI, A. *et al.* Multipotent Stem Cell and Current Application. **Acta Med Iran**, v. 55, n. 1, p. 6–23, 2017.

SOCHIRCA, E.; JOSÉ ALBERTO FONSECA MOUTINHO, D. **Hipóxia tumoral: contribuição para a progressão do cancro e o papel terapêutico de pró-fármacos ativados pela hipóxia.** [s.l: s.n.].

SPITERI, I. *et al.* Evolutionary dynamics of residual disease in human glioblastoma. **Annals of Oncology**, v. 30, n. 3, p. 456–463, 1 mar. 2019.

STOYANOV, G. S.; DZHENKOV, D. L. On the Concepts and History of Glioblastoma Multiforme - Morphology, Genetics and Epigenetics. **Folia medica**, v. 60, n. 1, p. 48–66, 1 mar. 2018.

SULMAN, E.; ALDAPE, K.; COLMAN, H. Brain Tumor Stem Cells. **Current Problems in Cancer**, v. 32, n. 3, p. 124–142, maio 2008.

SUNDAR, J. *et al.* The Musashi proteins MSI1 and MSI2 are required for photoreceptor morphogenesis and vision in mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, 2020.

SUTHERLAND, J. M. *et al.* Knockout of RNA binding protein msi2 impairs follicle development in the mouse ovary: Characterization of msi1 and msi2 during folliculogenesis. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1228–1244, 7 jul. 2015.

VASILEVA, N. S. *et al.* Transcriptome Changes in Glioma Cells Cultivated under Conditions of Neurosphere Formation. **Cells**, v. 11, n. 19, 1 out. 2022.

VISVADER, J. E.; LINDEMAN, G. J. Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 6, p. 717–728, jun. 2012.

WANG, Q. *et al.* 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, 10 jul. 2017.

WANG, Z. *et al.* Cell Lineage-Based Stratification for Glioblastoma. **Cancer Cell**, v. 38, n. 3, p. 366- 379.e8, 14 set. 2020.

WECHSLER-REYA, R.; SCOTT, M. P. **THE DEVELOPMENTAL BIOLOGY OF BRAIN TUMORS**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.annualreviews.org>.

WICKS, E. E.; SEMENZA, G. L. **Hypoxia-inducible factors: cancer progression and clinical translation** **Journal of Clinical Investigation** American Society for Clinical Investigation, 1 jun. 2022.

YUAN, M. *et al.* Conditional reprogramming culture conditions facilitate growth of lower-grade glioma models. **Neuro-Oncology**, v. 23, n. 5, p. 770–782, 1 maio 2021.

ZAKRZEWSKI, W. *et al.* Stem cells: Past, present, and future. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 10, n. 1, p. 2–22, 26 fev. 2019.

ZOTTEL, A.; JOVČEVSKA, I.; ŠAMEC, N. **Non-animal glioblastoma models for personalized treatment** **Heliyon** Elsevier Ltd, 1 out. 2023.