

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Giovana Ravizzoni Onzi

**INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
NO DESENVOLVIMENTO DAS CÉLULAS TRONCO
TUMORAIS DE GLIOMA**

**PORTO ALEGRE
2014**

AGRADECIMENTOS

À professora e minha orientadora **Márcia R. Wink**, pela grande parceria que formamos, pessoal e profissionalmente. Agradeço-te pela paciência, pela amizade, pelo carinho, pela confiança e, principalmente, por ter aberto importantes portas para o meu crescimento, aprendizado e aperfeiçoamento no caminho da profissão que escolhi. Em ti busquei conhecimento e exemplo de integridade, competência e caráter durante esses anos.

Ao professor **Guido Lenz**, pelo incentivo e ajuda e por manter as portas de seu laboratório abertas em todos os momentos que precisei.

À **Pítia**, que posso dizer que foi um dos melhores presentes que o mestrado me trouxe. Ganhei uma segunda orientadora, à qual agradeço pelas ideias, pela atenção, pelas incontáveis ajudas e discussões, pelos materiais e tempo disponibilizados pra que eu pudesse concluir esse trabalho..enfim, fostes essencial, amiga.

Ao **Eduardo**, por ser fundamental na reta final do meu mestrado, dando idéias, ensinando tudo sobre autofagia e sendo uma ótima cia de trabalho.

Ao pessoal do laboratório de Biologia Celular da UFCSPA. Em especial, meu agradecimento à **Luana** e à **Maria**, minhas ICs do lab, com as quais sempre pude contar para a conclusão dos experimentos e com as quais pude dividir muitos momentos agradáveis de aprendizado e amizade. À **Ana Santin**, com sua disposição em ajudar os outros como nunca vi igual, sempre me incentivando a trabalhar e sendo muito parceira. À **Bele**, pela amizade, pelo alto astral e pela paz que sempre me passou, destes muita força pra mim, amiga. À **Paula**, pela amizade incondicional que sempre tivemos, pelo apoio que nunca me faltou em nenhum momento desde que nos conhecemos e o mestrado foi mais uma etapa que me provou isso. Ao **Cris**, pela risada mais contagiante de todas, mesmo nos momentos mais tensos de trabalho. Ao **Giuliano**, mesmo bravo, por ter sido sempre solícito comigo, pelas conversas e conselhos, pelos almoços, pela companhia. À **Stéfanie e Amanda**, por serem ICs tão doces e agradáveis de conviver. Agradeço também ao resto do pessoal do lab, pela parceria que sempre tivemos: **Jé, Lia, Mari, Susan, Ale Allemand**.

Aos meus amigos, os velhos de sempre, os quais não importa o que eu faça ou onde eu esteja levarei sempre comigo, no lado esquerdo do peito: Nati, Rafa, Nanda, Cami, Nessa, Bel, Isa, Lu, Ganso, Mari, Enzo.

Agradeço a toda minha família, em especial a meus pais maravilhosos, Sandra e Gelson, e meu irmão, Bruno. A vocês devo simplesmente tudo.

Agradeço à FAPERGS, à CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

**“Quanto mais amor temos, tanto mais fácil fazemos a
nossa passagem pelo mundo.”**

Immanuel Kant

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	06
Lista de Figuras.....	08
Resumo.....	09
Abstract.....	11
Introdução.....	13
1. Gliomas.....	13
1.1 Aspectos clínicos e classificação.....	13
1.2 O Glioblastoma Multiforme.....	14
1.3 Etiologia.....	15
2. Células tronco tumorais.....	17
2.1 Células tronco tumorais em tumores de cérebro.....	21
3. Células tronco mesenquimais.....	24
4. Células tronco mesenquimais e os Gliomas.....	25
Referências	27
Objetivos.....	33
Artigo Científico.....	34
Abstract.....	35
Introduction.....	35
Experimental Procedures.....	36
Cell culture and characterization of hADSCs.....	36
Cell culture of tumor cell lineage U87 and characterization of the CSC population.....	37
hADSC conditioned medium (CM).....	38
Sphere formation assay.....	38
Methylthiazolyltetrazolium bromide (MTT) cell proliferation assay.....	38
RT-PCR.....	38
Real Time PCR.....	39
Analysis of CSC markers by flow cytometry.....	40
Autophagy analysis.....	40
Analysis of autophagosome formation by LC3-GFP protein.....	40

Visualization and quantification of acidic vacuolar organelles (AVOs) by AO staining.....	40
Statistical analysis.....	41
Results.....	41
hADSC characterization.....	41
Sphere forming capacity of U87 cells.....	43
hADSC CM did not alter the expression of CSC markers.....	45
Autophagy analysis.....	47
hADSC CM induces autophagosome formation in U87 glioma cells.....	47
Discussion.....	51
Conclusion.....	55
Acknowledgements.....	56
References.....	56
Apêndice A.....	60
Considerações finais.....	75
Perspectivas.....	76
ANEXO A – Cartas de Aprovação no CEP.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA – Adenosina desaminase

ADP – Adenosina di-fosfato

ADSC – Célula tronco derivada de tecido adiposo (Adipose Derived Stem Cell)

AMP – Adenosina mono-fosfato

AP – Fosfatase Alcalina (Alkaline Phosphatase)

ATCC – American Type Culture Collection

ATP - Adenosina tri-fosfato

bFGF - Fator de crescimento fibroblástico básico (basic Fibroblast Growth Factor)

CM – Meio condicionado (conditioned medium)

CSC – Célula tronco tumoral (Cancer Stem Cell)

DMSO – Dimetil sulfóxido (dimethyl sulfoxide)

DNA – ácido desoxirribonucleico

Ecto-5'-nucleotidase/e5NT/CD73 – Enzima extracelular Ecto 5'-nucleotidase

EGF – Fator de crescimento endotelial (Endothelial Growth Factor)

E-NTPDases –EctoNTPDases

E-NPPs - Ectonucleotídeopirofosfatase/fosfodiesterase

FDA – Food and Drug Administration

GBM –Glioblastoma multiforme

GFP – Green Fluorescence Protein

GPI – Glicosil Fosfatidilinositol

GSC – Célula tronco de Glioma (Glioma Stem Cell)

INCA – Instituto Nacional do Câncer

ISCMPA – Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

MC – Meio Condicionado (CM – conditioned medium)

MGMT – Metilguanina Metiltransferase

MSC – Célula tronco mesenquimal (mesenchymal stem cell)

MTT - 3-(4,5 -Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NIH –National Institutes of Health

NK – Células natural-killer

NOD-SCID – Diabético não obeso, com imunodeficiência severa (non-obesediabetic, severe combined immunodeficient)

NSC – Célula tronco neural (Neural Stem Cell)

NTPDase –Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase (NTPDase1-8)

OCT4 – *octamer 4*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR - Reação em cadeia da polimerase (Polimerase chain reaction)

RT-PCR – PCR transcriptase reversa (reverse transcriptase PCR)

SFB – Soro Fetal Bovino (FBS)

SNC – Sistema nervoso central

SVZ – Zona Subventricular (Subventricular Zone)

TMZ - Temozolamida

VGF ou VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular (Vascular Growth Factor)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação entre expectativa de vida e características histológicas nos diferentes graus de glioma. Retirado de (Maher, Furnari et al. 2001);

Figura 2. Célula de origem em gliomas. Adaptado de (Chen, Li et al. 2012);

Figura 3. Fontes de Heterogeneidade no Câncer. Retirado de (Magee, Piskounova et al. 2012);

Figura 4. Origem do tumor e desenvolvimento. Adaptado de (Vescovi, Galli et al. 2006);

Figura 5. Terapias-alvo para as CSCs. Retirado de (Reya, Morrison et al. 2001);

Figura 6. Modelo em desenvolvimento das células tronco tumorais. Retirado de (Vermeulen, de Sousa e Melo et al. 2012);

Figura 7. Interações entre as CSCs e o microambiente tumoral. Retirado de (Ye, Wu et al. 2014)

Figura 8. Critérios para a identificação de células tronco de GBM. Retirado de (Gursel, Shin et al. 2011);

Figura 9. Propriedade de diferenciação das MSCs em diferentes fenótipos celulares. Retirado de (www.rntc.org.br).

Resumo

Glioblastomas são tumores do sistema nervoso central caracterizados por possuírem altas taxas de proliferação, poder invasivo e alta recorrência. A descoberta de uma subpopulação de células altamente tumorigênicas, similares as células-tronco, dentre as células do tumor levou à hipótese das células tronco tumorais (CSCs). Essa teoria trouxe uma mudança de paradigma para a biologia e terapêutica do câncer, uma vez que as CSCs seriam as principais responsáveis pela manutenção do tecido tumoral. Com base neste contexto, a principal dedução que pode ser feita é de que as atuais terapias de combate ao câncer frequentemente falham porque são direcionadas para os tipos celulares errados. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de novas metodologias terapêuticas. Diversos estudos já demonstraram que as células tronco mesenquimais (MSCs) apresentam tropismo por gliomas, tornando-as promissoras para o uso na terapia gênica neste tipo de tumor. No entanto, os mecanismos responsáveis pelo tropismo das MSCs para o tumor ainda não são completamente compreendidos e, principalmente, pouco se sabe a respeito das interações das MSCs com as CSCs. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar se células tronco humanas derivadas de tecido adiposo (hADSCs) podem interferir sobre o desenvolvimento das CSCs de glioma. As células tronco mesenquimais foram obtidas a partir de gordura de descarte de pacientes submetidos a abdominoplastias e/ou mamoplastias redutoras no Serviço de Cirurgia Plástica da ISCMPA. A linhagem celular de glioma humano U87 foi adquirida da American Type Culture Collection. A análise da influência das hADSCs sobre as CSCs de glioma foi realizada por meio do cultivo das células U87 em meio condicionado (MC) das hADSCs. As células de glioma U87 foram tratadas com este MC (puro ou diluído) em cultura durante sete dias, e, então, foi analisada a quantidade de esferas tumorais formadas. Foi avaliada também a expressão do RNAm para marcadores de CSCs por RT-PCR e por PCR em tempo real. O MC de hADSC mostrou não ter influência na formação das esferas tumorais ($p = 0.781$), mesmo quando a mesma foi corrigida pela viabilidade celular. As expressões do RNAm para os marcadores OCT4, Nanog, SOX2 e CD133 nos grupos tratados com MC não foram estatisticamente diferentes das expressões nas células do controle. Ainda, para OCT4 e Nanog estes resultados foram confirmados por citometria de fluxo, uma vez que a percentagem de células positivas para estes marcadores foi a mesma nos grupos tratados e controle ($p = 0.988$ e $p = 0.761$, respectivamente). Por fim, foi avaliado se o MC de hADSC seria capaz de induzir autofagia em células de glioma U87 pelos métodos da proteína LC3GFP+ e coloração por laranja de acridina. Descobrimos que o MC foi capaz de induzir um forte aumento da formação de autofagossomos em células de glioma, quando comparado com o grupo controle ($p < 0.0001$). Surpreendentemente, no entanto, esta indução autofágica parece ser interrompida na formação de autolisossomos, pois apenas o grupo do controle positivo tratado com rapamicina teve um aumento na formação dos mesmos. Tomando esses resultados em conjunto, o MC de hADSC mostrou não ter influência no desenvolvimento das CSCs e, além disso, parece contribuir para a indução de autofagia nas células de glioma U87. Isso auxilia um

melhor entendimento a respeito das interações entre as MSCs e os gliomas, fazendo com que seja possível avançar no estudo das terapias celulares para o tratamento do câncer.

Palavras-chave: Glioblastoma. Células tronco adiposo derivadas. Célula tronco tumoral. Autofagia.

Abstract

Glioblastomas are the most common tumors in the central nervous system, characterized by high proliferation rates, invasive power and high recurrence. The discovery of a highly tumorigenic, stem-like cell population among cancer cells led to the hypothesis of cancer stem cells (CSCs). This concept brought a paradigm shift for biology and therapy of cancer, since it was found out that CSCs would be responsible for the maintenance of tumor tissue. Therefore, the main deduction that can be made is that current therapies to fight cancer often fail because they are directed to the wrong cell types. Thus, it is necessary the development of new therapeutic approaches. Several studies have shown that mesenchymal stem cells (MSCs) exhibit tropism for gliomas making them promising for use in gene therapy against this tumor type. Nevertheless, the mechanisms responsible for the tropism of MSCs to tumors are not yet completely understood and, mainly, little is known about the interactions between MSCs and CSCs. Furthermore, there is now overwhelming evidence that CSCs interplay closely with the tumor microenvironment, which includes MSCs, and understanding these interactions could be a paradigm shift in the treatment of cancer. Thus, the aim of the present study was to investigate if factors released by human adipose derived stem cells (hADSCs) could interfere on glioma cancer stem cells development, trying to better understand interactions between these cell types. Mesenchymal stem cells were obtained from adipose tissue of patients undergoing abdominoplasty and/or reductive mammoplasty in the Plastic Surgery ISCMPA. Human glioma cell line U87 was purchased from American Type Culture Collection. The analysis of the influence of hADSCs on glioma CSCs was performed through exposure of U87 cells to the hADSCs conditioned medium (CM). U87 glioma cells were treated with MC (pure or diluted) in culture for 7 days, and then the number of tumor spheres formed was analyzed. We also assessed the expression of mRNA in treated and control gliomas, for CSCs markers by RT-PCR, and then real-time PCR. The hADSC CM showed no influence on tumorspheres formation ($p = 0.781$), even when corrected for cell viability. For PCR analysis, the mRNA expressions of CSC markers OCT4, Nanog, SOX2 and CD133 in cells under CM treatment were not statistically different from the expressions in control cells. Further, for OCT4 and Nanog these results were confirmed by flow cytometry, as the percentage of cells that were positive for these markers was the same in treated and control groups ($p = 0.988$ and $p = 0.761$, respectively). Finally, we evaluated whether the hADSC CM would be able to induce autophagy in U87 glioma cells, by LC3GFP+ protein and staining with acridine orange methods. We have found that CM was able to highly induce autophagosome formation in glioma cells compared with the control group ($p < 0.0001$). Surprisingly, however, this autophagic flux seems to be stopped at the autolysosomes formation, since only the positive control group treated with rapamycin had an increase in autolysosome formation. Taking these results together, hADSC CM showed no influence on CSCs development and, moreover, seems to contribute in some way to induce autophagy in U87 glioma cells. This helps a better understanding about the interactions between MSCs and gliomas, making it possible to advance in the study of cellular therapies against cancer.

Key-words: Glioblastoma. Adipose derived stem cells. Cancer stem cell. Autophagy.

Introdução

1. Os Gliomas

Gliomas são tumores que surgem no sistema nervoso central (SNC), mais especificamente nas células da glia, e representam a maior parte dos tumores cerebrais. No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no ano de 2012 esperava-se um risco estimado de 5 novos casos a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres para câncer no SNC, incluindo gliomas (www.inca.gov.br).

O estudo dos gliomas atrai a atenção de pesquisadores em todo o mundo não por sua incidência, mas pela alta taxa de mortalidade causada por essa doença. O péssimo prognóstico para os pacientes faz com que os gliomas sejam um assunto de urgência na pesquisa do câncer. Além disso, a preocupação acerca desses tumores cresce conforme o aumento da expectativa de vida da população mundial, devido ao fato de a doença acometer principalmente pacientes de maior idade (Chen, Li et al. 2012; Yabroff, Harlan et al. 2012).

1.1 Aspectos Clínicos e classificação

Os gliomas possuem características morfológicas e de expressão gênica similares a células gliais e, portanto, podem ser classificados em astrocitomas, oligodendrogliomas ou ainda uma mistura de ambas as células, os oligoastrocitomas, correspondendo aos marcadores que apresentam – de astrócitos, de oligodendrócitos, e/ou de suas células precursoras.

A classificação atual dos gliomas feita pela Organização Mundial da Saúde (OMS) leva em consideração principalmente critérios histopatológicos - morfologia celular, citoarquitetura e perfil de marcadores imunohistológicos –, bem como o prognóstico da doença (Louis, Ohgaki et al. 2007; Sathornsumetee, Reardon et al. 2007; Sukhdeo, Hambardzumyan et al. 2011; Westphal and Lamszus 2011), conforme representado na Figura 1. Existem quatro diferentes graus clínicos, sendo o grau IV correspondente ao tumor de maior malignidade, denominado glioblastoma multiforme (GBM). Lesões de grau II são associadas a períodos de sobrevida de 5 a 15 anos, possuem um crescimento lento, células bem diferenciadas e menor agressividade, enquanto que em lesões de grau III a sobrevida média cai para menos de três anos e, juntamente com os de grau IV, são tumores caracterizados pela alta taxa de proliferação e atividade angiogênica (Holland 2001) (Lim, Llaguno et al. 2011; Westphal and Lamszus 2011). A maior parte dos gliomas considerados de baixo grau eventualmente evolui para gliomas de alto grau (Holland 2001; Louis 2006).

	Low-grade astrocytoma	→	Anaplastic astrocytoma	→	Glioblastoma
Survival	(5–10 years)		(2–3 years)		(9–12 months)
Proliferation	+/-		++		+++
Invasion	++		++		+++
Angiogenesis	—		—		+++
Necrosis	—		—		+++
Rx responsive	—		++		—

Figura 1. Relação entre expectativa de vida e características histológicas nos diferentes graus de glioma. Retirado de (Maher, Furnari et al. 2001).

A nível molecular existem algumas mutações encontradas em gliomas que também podem ser correlacionadas ao grau clínico (Holland 2001). De acordo com o Cancer Genome Atlas, centro de estudo do câncer vinculado ao NIH (National Institutes of Health), os tumores poderiam ser classificados em subtipos, sendo eles: “clássico”, “mesenquimal”, “proneural” e “neural”. Cada subtipo corresponde a um grupo de alterações comumente encontradas nos perfis de expressão das células do tumor, definidos pela combinação de genes que são superexpressos ou regulados negativamente (Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010; Verhaak, Hoadley et al. 2010). Essas propostas melhoram a classificação tradicional existente, pois relacionam o curso clínico da doença com um programa de diferenciação celular, permitindo o desenvolvimento de terapias para diferentes categorias de perfis de expressão gênica. Assim, as terapias tornam-se mais personalizadas e com alvos específicos, que podem servir como adjuvantes da ressecção cirúrgica da massa tumoral principal (Preusser, de Ribaupierre et al. 2011; Westphal and Lamszus 2011).

No entanto, até o presente momento, os tumores gliais de alto grau ainda apresentam alta frequência de recorrência após o tratamento e são essencialmente incuráveis. Isso se deve ao fato de que, além de estarem localizados em regiões de difícil acesso, esses tumores podem ser resistentes à radiação e à quimioterapia. Além disso, devido à capacidade de migração e invasão das células do glioma, esse tumor torna-se alvo elusivo para uma remoção cirúrgica efetiva (Wink 2003; Lefranc, Rynkowski et al. 2009). Essas células invasivas em gliomas estão além do alcance das terapias atuais, que acabam se focando na massa tumoral primária (Hoelzinger, Demuth et al. 2007).

1.2 O Glioblastoma Multiforme

Além de ser o mais agressivo, o glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo de glioma mais comum, respondendo por cerca de 60% dos tumores gliais (Hoelzinger, Demuth et al. 2007). Os pacientes com GBM vão a óbito em aproximadamente um ano, mesmo com o tratamento padrão: ressecção cirúrgica e terapia adjuvante - radioterapia mais temozolomida (TMZ), um

agente alquilante do DNA, administrada concomitantemente e após a radioterapia (Stupp, Mason et al. 2005; Lim, Llaguno et al. 2011; Chen, Li et al. 2012; Yabroff, Harlan et al. 2012).

A temozolomida é o agente quimioterapêutico mais comumente utilizado para a terapia de GBM (Stupp, Mason et al. 2005), e tem se mostrado mais eficaz contra tumores com a falta uma proteína de reparação do DNA, O6-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT), devido à expressão de um promotor MGMT metilado (Hegi, Diserens et al. 2005). Essa proteína é frequentemente expressa em altos níveis nos tumores, sendo um importante fator de risco na resistência terapêutica, pois diminui a eficácia dos agentes alquilantes (Pegg, Dolan et al. 1995).

O GBM pode ter origem de novo, GBM primário, ou ser resultado da progressão de um glioma de baixo grau, GBM secundário. Os glioblastomas de origem primária constituem a forma mais comum (95%) e surgem sem evidência clínica ou histológica de lesão anterior e costumam atingir pacientes de maior idade. Já os GBM secundários costumam ocorrer em pacientes mais jovens (idade média de 45 anos) (Ohgaki and Kleihues 2007; Lim, Llaguno et al. 2011). As características clínicas dos GBMs primários e secundários são as mesmas, independente do seu percurso clínico (Maher, Furnari et al. 2001).

1.3 Etiologia dos gliomas

A origem da formação dos gliomas é ainda desconhecida e gera muitas controvérsias. Dentre as hipóteses, acredita-se que o tumor possa ser originado tanto por uma célula cerebral madura que sofra desdiferenciação, quanto por uma célula tronco neural (NSC) ou por uma célula progenitora que sofra transformação (Figura 2) (Singh, Clarke et al. 2004; Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010; Visvader 2011).

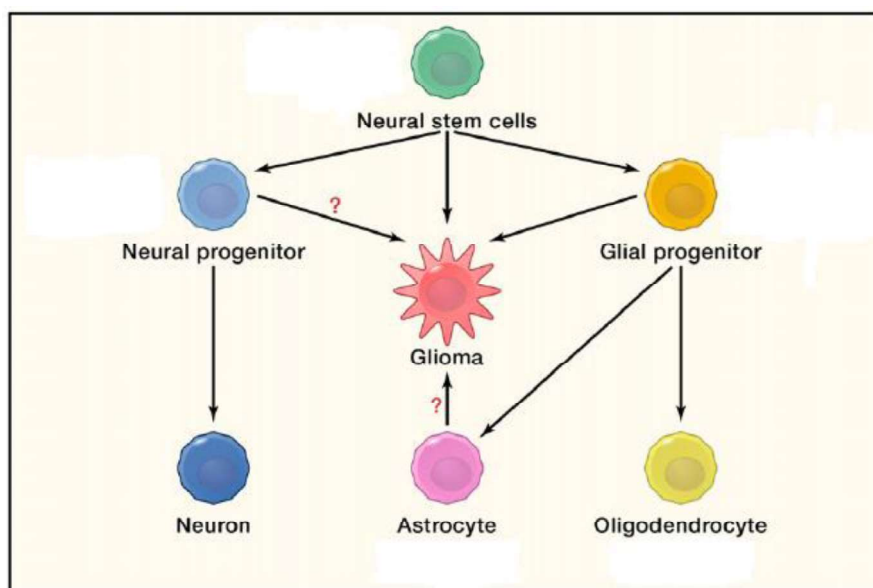


Figura 2. Célula de origem em gliomas. Diferentes tipos celulares em uma hierarquia de células tronco/progenitoras em um tecido normal podem se transformar em células tumorais.

As propriedades da célula de origem influenciam os tipos de mutações que são mais propensas de ocorrer e as propriedades do tumor resultante dessa célula. Adaptado de (Chen, Li et al. 2012).

Na primeira hipótese, o processo de transformação maligna exige que as células diferenciadas recuperem propriedades de células jovens da glia e células progenitoras. Essa capacidade de desdiferenciação celular foi confirmada pelo estudo de (Takahashi and Yamanaka 2006), o qual mostra que um determinado coquetel de fatores de transcrição pode reprogramar células terminalmente diferenciadas de volta às células-tronco embrionárias pluripotentes (Chen, Li et al. 2012).

No entanto, um bom número de evidências vão ao encontro da última hipótese. Muitos tipos de câncer, inclusive gliomas, por exemplo, apresentam expressão gênica e características fenotípicas semelhantes a células indiferenciadas. Estudos histológicos de tumores cerebrais mostram a ausência da expressão de marcadores de células diferenciadas em tumores iniciais, bem como a presença de nestina, uma proteína marcadora de células tronco do tecido neural (Singh, Clarke et al. 2004). Além disso, a heterogeneidade celular observada em tumores de cérebro também levanta a possibilidade de uma célula de origem multipotente (Singh, Clarke et al. 2004).

Devido à capacidade de auto-renovação, as células tronco frequentemente persistem por longos períodos de tempo, ao contrário de muitas células maduras em tecidos altamente proliferativos, as quais são mais labéis. Esse processo faz com que a célula tronco se torne mais vulnerável ao acúmulo de mutações do que as células diferenciadas (Reya, Morrison et al. 2001; Sukhdeo, Hambardzumyan et al. 2011). Ainda, devido às células-tronco possuírem a maquinaria de auto-renovação já ativada, manter esta ativação pode ser mais simples do que “ligá-la” de novo em uma célula mais diferenciada (Reya, Morrison et al. 2001).

Dessa maneira, o processo oncogênico pode então ser visto como as NSCs perdendo o controle sobre sua auto-renovação e sobre as propriedades de diferenciação (Chen, Li et al. 2012).

Até o momento, apesar de resultados promissores no tratamento de glioblastomas em modelo animal, nenhuma dessas terapias experimentais tem causado grande impacto a nível clínico. O desenvolvimento de um tratamento de sucesso para tumores cerebrais malignos deve, portanto, focar na habilidade de criar uma maneira de eliminar todos os reservatórios de células neoplásicas intracraniais que restarem após a ressecção da massa tumoral primária. Para isso, é importante que as pesquisas englobem fatores da biologia do tumor e também de sua relação neurobiológica – interação com células tronco e com outros componentes intrínsecos das células (como neurônios e células da glia) e as propriedades relacionadas ao microambiente cerebral (Westphal and Lamszus 2011). Apenas quando atingido esse objetivo,

obter-se-á uma estratégia de tratamento capaz de causar efeito significativo na sobrevida a longo prazo dos pacientes (Ehtesham, Stevenson et al. 2005).

2. Células tronco tumorais

A heterogeneidade entre as células tumorais em um mesmo tumor pode surgir de várias maneiras, conforme sugerido na Figura 3. Um dos mecanismos, talvez o mais bem estabelecido, envolve diferenças entre células tumorais causadas por fatores genéticos ou mudanças epigenéticas (Nowell 1976; Baylin and Jones 2011). Além disso, as diferenças entre as células tumorais também podem surgir por meio de mecanismos extracelulares, no qual o microambiente onde o tumor está situado acaba provocando mudanças fenotípicas e funcionais sobre as mesmas (Polyak, Haviv et al. 2009; Bissell and Hines 2011).

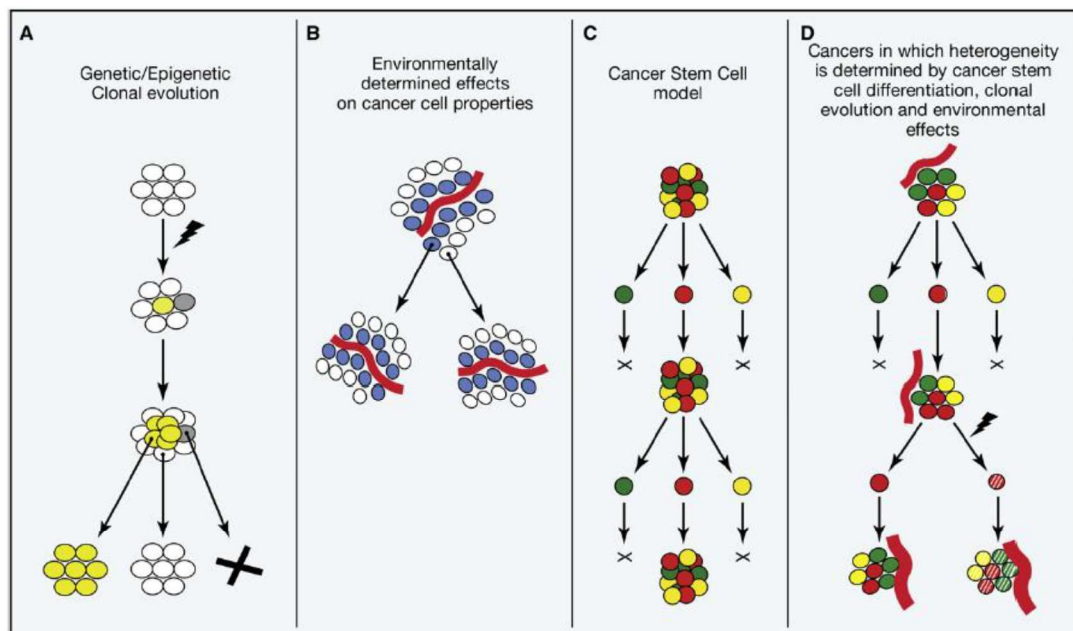


Figura 3. Fontes de heterogeneidade no câncer. (A) Fatores genéticos ou mudanças epigenéticas; (B) Fatores do microambiente tumoral; (C) Modelo de células tronco tumorais, com a hierarquia celular. Além de cada um desses fatores poder ser a causa de heterogeneidade celular no tumor, os fatores A, B e C podem atuar juntos no mesmo tumor, contribuindo para o aumento dessa heterogeneidade (D). Retirado de (Magee, Piskounova et al. 2012).

Por fim, identificou-se nas últimas décadas uma terceira e importante fonte de heterogeneidade celular dentro do tumor: uma subpopulação de células altamente tumorigênicas e similares a células tronco (Reya, Morrison et al. 2001; Dick 2008; Shackleton,

desses tumores, seja por radio ou quimioterapia, acabe provocando uma seleção de CSCs, levando a um repovoamento rápido do tumor, o que ocasiona recorrência de um tumor muito mais agressivo e resistente (Bao, Wu et al. 2006). Dessa maneira, as CSCs são um alvo extremamente atrativo para terapia, pois sem a presença dessas células existiria um limite para o crescimento do tumor. A erradicação dessas células, então, permitiria que o restante do tumor fosse eliminado por cirurgia ou erradicado por quimioterapia e radioterapia (Figura 5).

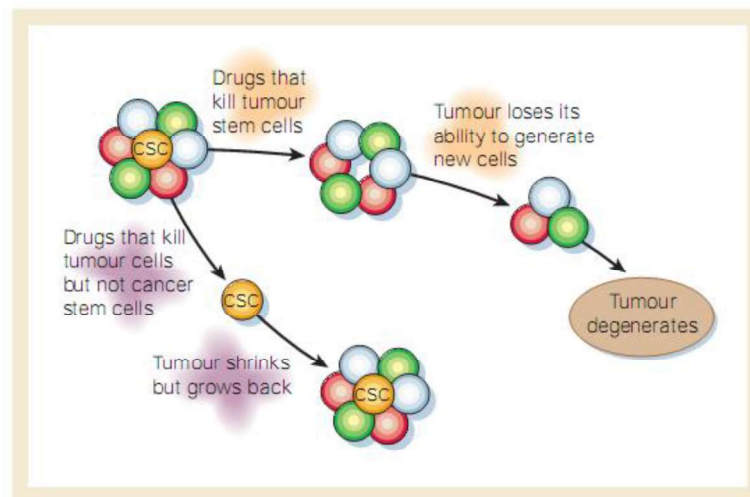


Figura 5. Terapias-alvo para as CSCs. As terapias convencionais acabam matando células com potencial de proliferação limitado. Como as CSCs são menos sensíveis a essas terapias elas acabam permanecendo viáveis após a terapia e restabelecem o tumor. Do contrário, se essas terapias tivessem como alvo as CSCs, elas matariam mais efetivamente essas células e, assim, os tumores seriam incapazes de se manterem ou de crescerem. Retirado de (Reya, Morrison et al. 2001).

No entanto, essa eliminação somente seria suficiente se as células tumorais diferenciadas perdessem a sua capacidade clonogênica e apenas as CSCs contribuíssem para a expansão e a progressão a longo prazo da doença (Vescovi, Galli et al. 2006; Vermeulen, de Sousa e Melo et al. 2012). Todavia, já se sabe que o fenótipo das CSCs é muito mais fluido do que o previsto e é fortemente regulado pelo ambiente das células tumorais. Essa visão leva a uma interpretação mais dinâmica da teoria das CSCs (Figura 6) (Vescovi, Galli et al. 2006; Vermeulen, de Sousa e Melo et al. 2012) e deve ser levada em conta na hora de se buscar terapias específicas antitumorais.

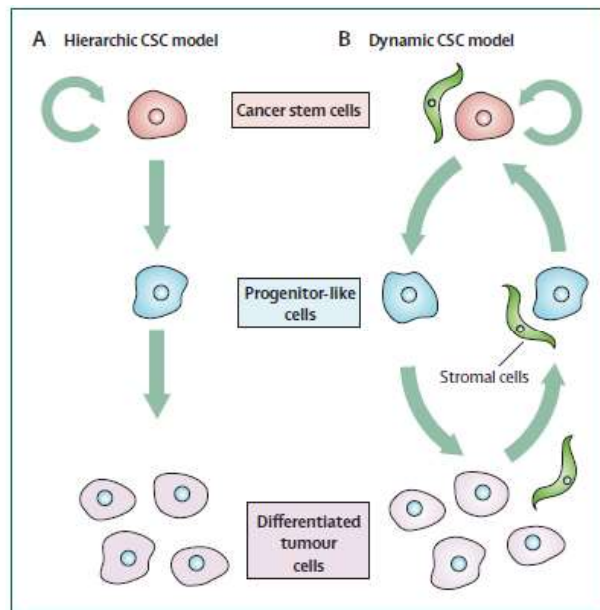


Figura 6. Modelo em desenvolvimento das células tronco tumorais. Retirado de (Vermeulen, de Sousa e Melo et al. 2012).

Levando-se em conta a dinamicidade das CSCs e a fim de tratar eficazmente o GBM e outros gliomas, o microambiente tumoral também deve ser considerado. Existem cada vez maiores evidências de que as células tronco tumorais possuem uma forte interação com o microambiente do tumor (Figura 7). Novas terapias que inibem a interação célula-microambiente do glioma são vitais em termos de eficácia clínica. A desruptura do nicho microambiental impediria a adaptação das células do glioma, o desenvolvimento das CSCs e, por consequência, poderia levar a uma melhor sobrevida do paciente a longo prazo (Heddlestone, Hitomi et al. 2011).

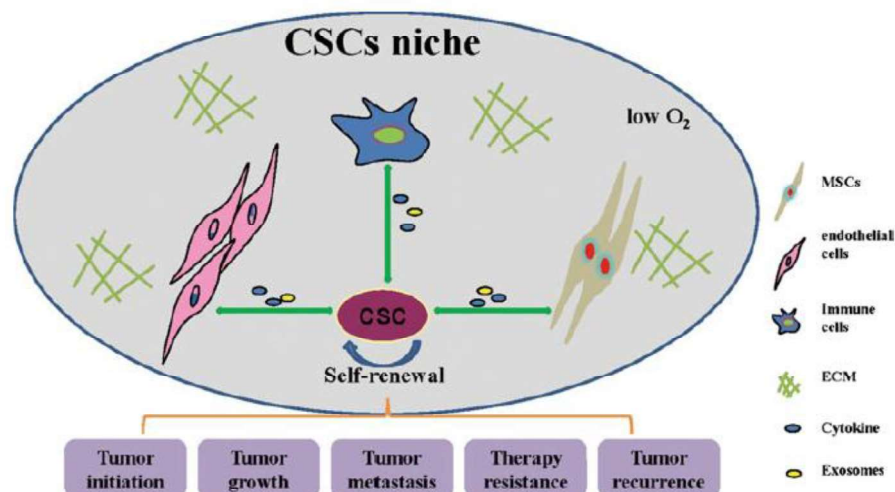


Figura 7. Interações entre as CSCs e o microambiente tumoral. A progressão tumoral requer uma interação cooperativa entre as CSCs e o seu nicho. O feedback recíproco entre as CSCs e a matrix extracelular, as células tronco mesenquimais, as citocinas e os exossomas pode influenciar a proliferação e a sobrevivência das CSCs, tendo efeito direto na malignidade do tumor. Retirado de (Ye, Wu et al. 2014).

2.1 CSCs em tumores de cérebro

Recentemente, o conceito de CSCs foi estendido para os tumores de cérebro, cujo tecido quiescente há muito se acreditava que não possuía renovação celular significativa. Sabe-se que o cérebro adulto é composto por tipos celulares altamente especializados e diferenciados. No entanto, células multipotentes e indiferenciadas, capazes de auto-renovação e caracterizadas por marcadores moleculares específicos – as células tronco neurais - estão presentes em baixo percentual no hipocampo, na zona subventricular (SVZ) e nos bulbos olfatórios, sendo as responsáveis pela neurogênese no cérebro (Dacey and Wallace 1974).

Devido à população celular tumoral ser heterogênea, as células diferem na expressão de marcadores específicos que se relacionam ao estado de diferenciação de cada uma delas. Dessa maneira, o fato de existirem progenitores neurais adultos identificados e mapeados em regiões restritas do cérebro, de estarem disponíveis proteínas e anticorpos marcadores para tipos celulares específicos do cérebro adulto, e de estarem bem estabelecidos protocolos para a cultura de progenitores neurais normais e multipotentes, faz dos tumores cerebrais um ótimo modelo de estudo para a hipótese das CSCs (Stiles and Rowitch 2008).

A descoberta de CSCs no cérebro foi e ainda é feita por um conjunto de diferentes técnicas, tais como: cultura celular, análises das NSCs em populações de células tumorais de cérebro, avaliação da capacidade de auto-renovação e identificação dos marcadores de indiferenciação e pluripotência na superfície celular das células tumorais (Figura 8).

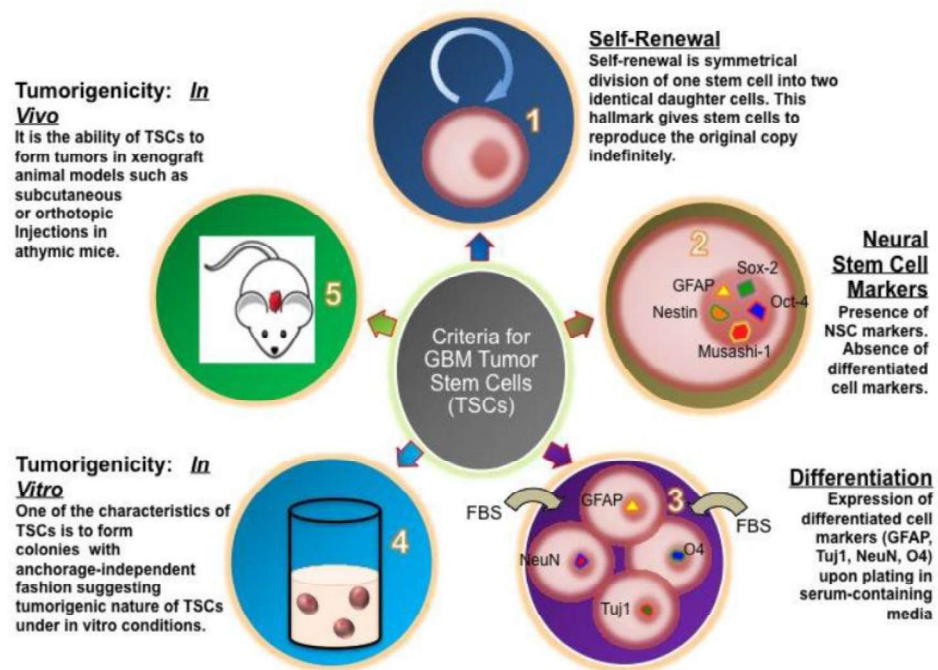


Figura 8. Critérios para identificação de células tronco de GBM. As principais características das CSC são: (1) auto-renovação; (2) expressão de marcadores de NSCs; (3) diferenciação em populações de oligodendrócitos e astrócitos; (4) reter a capacidade tumorigênica sob um microambiente *in vitro* e (5) capacidade de formar tumor em transplantes para camundongos atímicos. Retirado de (Gursel, Shin et al. 2011).

Utilizando-se meio de cultura específico para o crescimento de NSCs – sem soro fetal bovino (SFB) e com a adição de bFGF (fator de crescimento fibroblástico) e EGF (fator de crescimento endotelial) - no cultivo das CSCs de GBM, foi descoberto que aproximadamente 0,3-25% das células tumorais geraram aglomerados como neuroesferas (Singh, Clarke et al. 2003; Singh, Clarke et al. 2004; Singh, Hawkins et al. 2004). Essas neuroesferas são agrupamentos de células originados a partir de uma célula tronco que formam complexos in vitro, sendo compostas por uma mistura heterogênea de células tronco, células progenitoras e um pequeno número de células diferenciadas (Uchida, Buck et al. 2000; Diamandis, Wildenhain et al. 2007). A principal vantagem de essas células se agregarem em esferas é uma maior preservação do fenótipo, genótipo e cariótipo nativos, que não são preservadas nas células aderentes, porque elas acabam acumulando aberrações ao longo de várias passagens (Lee, Kotliarova et al. 2006). Além disso, já foi mostrado que essas esferas, quando injetadas em camundongos nude, são altamente tumorigênicas, enquanto que as demais células aderentes do tumor não apresentam a mesma capacidade (Yuan, Curtin et al. 2004).

Além das características funcionais típicas, a identificação das células tronco de glioma (GSCs) também pode ser feita por marcadores de células tronco normais, os quais elas

geralmente expressam. Ensaios de imunofenotipagem por citometria de fluxo são uma ferramenta útil para o enriquecimento dessa população. Todavia, não existe um perfil antigênico que seja representativo de todas as GSCs e os melhores marcadores para este fim ainda estão em discussão. Isso provavelmente se deve à instabilidade das células de glioma, bem como à heterogeneidade no microambiente tumoral (Heddleston, Hitomi et al. 2011). Mesmo assim, alguns marcadores têm sido utilizados com sucesso para o enriquecimento das GSCs.

As GSCs foram identificadas pela primeira vez em amostras de NSCs humanas utilizando-se uma seleção positiva para o marcador de superfície celular CD133 (Prominina1) (Uchida, Buck et al. 2000). Essa proteína também foi encontrada em CSCs, passando a ser considerada marcadora destas (Singh, Clarke et al. 2003). Células CD133+ isoladas de tumores primários de cérebro humano constituem uma população com elevada capacidade de proliferação (Yao, Zhang et al. 2009), auto-renovação e diferenciação, e são minoria na população de células tumorais. O estudo de Singh e cols em 2004 mostrou que apenas 100 células CD133+ foram necessárias para iniciar tumores que eram uma fenocópia do tumor original do paciente em cérebros de rato NOD-SCID (non-obesediabetic, severe combined immunodeficient). Inversamente, 100.000 células CD133-negativas enxertadas não foram capazes de iniciar tumores nesse mesmo modelo (Singh, Hawkins et al. 2004).

No entanto, essa noção foi desafiada quando Shmelkov e cols (2008) demonstraram que tanto células CD133+ quanto células CD133- possuem capacidade de disseminar tumor no câncer de cólon metastático, questionando a validade da CD133 como marcador. Em glioblastomas, dados mais recentes também dão suporte à existência de células CD133 negativas com propriedades tumorigênicas (Beier and Beier 2011). Portanto, é necessária uma avaliação cuidadosa para interpretar a detecção imunológica da CD133. Além disso, outros marcadores também estão sendo utilizados como marcadores eficazes de GSCs. O fator de transcrição SOX2 é um deles, pois é essencial para o desenvolvimento e manutenção de células pluripotentes normais. Foi recentemente mostrado que o gene do SOX2 está superexpresso em quase 10% dos glioblastomas e expresso em mais de 85% destes tumores (Alonso, Diez-Valle et al. 2011) e que o knock-out de SOX2 em gliomas mostrou diminuir a proliferação e a tumorigenicidade dessas células (Gangemi, Griffero et al. 2009).

Outra alternativa na identificação e enriquecimento para as GSCs é o fator de transcrição intracelular OCT4. Esse marcador é expresso em células tronco pluripotentes embrionárias, nas quais regula a auto-renovação e a diferenciação (Atlasi, Mowla et al. 2008; Chen, Hsu et al. 2008; Du, Jia et al. 2009). Um relato recente também mostrou que OCT4 foi expresso em várias células tronco adultas humanas (Tai, Chang et al. 2005). Os resultados obtidos no estudo de (Du, Jia et al. 2009) fornecem ainda provas a respeito da contribuição do OCT4 para a natureza indiferenciada de CSCs em gliomas, por meio da identificação de altos níveis desse marcador em gliomas e mostrando que a redução na expressão de OCT4 também reduziu a proliferação e a formação de colônias em células de glioma de rato C6.

Além dos marcadores supracitados, o marcador Nanog também desempenha papel chave na manutenção da auto-renovação e da pluripotência (Chambers, Colby et al. 2003). Em tumores de pâncreas e colorretal foi demonstrada a associação entre a expressão elevada de Nanog e uma piora na sobrevida (Chiou, Yu et al. 2008). O estudo de Maria Lee e cols 2012 mostrou ainda que a expressão de Nanog está associada com um prognóstico ruim em carcinomas de ovário (Lee, Nam et al. 2012).

As CSCs também mostram alta atividade em rotas de transdução que definem células tronco em diversos tecidos do corpo (Medema and Vermeulen 2011). Fan e cols. (Fan, Khaki et al. 2010) relataram resultados promissores na inibição inibidores da via Notch, demonstrando que tal inibição provocou um crescimento reduzido de esferas tumorais de glioblastomas *in vitro* e sobrevivência prolongada *in vivo*, quando injetadas em ratos nude. O bloqueio desta mesma via mostrou esgotar a população CSC de gliomas através da redução na proliferação e aumento da apoptose, bem como aumentou a sensibilidade das CSCs à morte celular induzida por radiação, reforçando a importância da via Notch na regulação da CSCs (Fan, Matsui et al. 2006; Hovinga, Shimizu et al. 2010; Wang, Wakeman et al. 2010).

CSCs, conforme anteriormente mencionado, já foram identificadas e purificadas a partir de tumores líquidos e sólidos. No entanto, a maioria destes isolamentos foi feita a partir de amostras clínicas. Recentemente, as células tronco tumorais foram identificadas também em linhagens celulares estabelecidas. Nos gliomas, estes isolamentos foram feitos na linhagem de rato C6 e nas linhagens humanas A172, U373, e U87. A identificação dessa população possibilita a investigação do processo tumorigênico no SNC e o desenvolvimento de terapias que tenham como alvo estas CSCs (Singh, Clarke et al. 2004; Diamandis, Wildenhain et al. 2007).

3. Células Tronco Mesenquimais

As células tronco mesenquimais (MSCs) foram descritas primeiramente por (Friedenstein, Gorskaja et al. 1976), que descobriram sua capacidade de adesão a placas de cultura, a semelhança com fibroblastos *in vitro* e a formação de colônias, sendo, por isso, também chamadas de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (Bittencourt, Pereira et al. 2006).

Esse tipo celular pode ser isolado da medula óssea e de outros tecidos do organismo, como: tendão, membrana sinovial, pulmão, tecido adiposo, rim, veia cava, aorta, músculo, entre outros (da Silva Meirelles, Chagastelles et al. 2006). As MSCs dão normalmente origem a vários tipos de células de origem mesodérmica (Panepucci, Siufi et al. 2004; Park, Lee et al. 2006). Todavia, já existem estudos mostrando que as MSCs também são capacitadas a diferenciar-se em células de tecidos embrionários diferentes do seu, como, por exemplo, neurônios (ectoderma) e células β do pâncreas (endoderma) (Figura 9) (Chagastelles, Nardi et al. 2010).

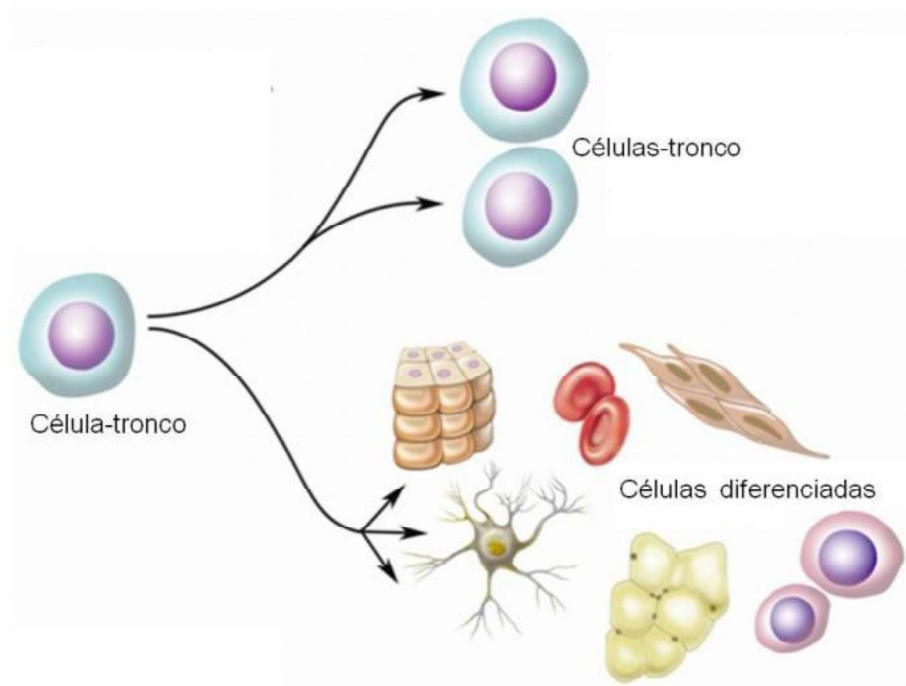


Figura 9. Propriedade de diferenciação das MSCs em diferentes fenótipos celulares. Retirado de Rede Nacional de Terapia Celular (www.rntc.org.br).

Dentre as possíveis fontes para o isolamento de MSCs, o tecido adiposo é menos invasiva, menos dispendiosa e de maior reprodutibilidade, além de apresentar um maior rendimento, uma vez que um grande número de células podem ser coletadas em apenas um isolamento (Choi, Lee et al. 2012). Estudos mostram ainda que células tronco adiposo derivadas (ADSCs) podem ser cultivadas por mais tempo antes de se tornarem senescentes do que as células tronco derivadas de medula óssea, mantendo o seu potencial de diferenciação em diversos fenótipos celulares (Kern, Eichler et al. 2006; Akimoto, Kimura et al. 2013; Dhanasekaran, Indumathi et al. 2013).

Contudo, ainda há muito a ser descoberto a respeito da biologia e do papel das MSCs in vivo. O comportamento in vivo das células tronco está intimamente relacionado ao ambiente em que essa célula se encontra e a formação desse microambiente é mediada por fatores diversos, como o contato célula-célula, os componentes da matriz extracelular e os fatores solúveis presentes (Chagastelles, Nardi et al. 2010).

4. As células tronco mesenquimais e os gliomas

MSCs humanas têm se mostrado promissoras como uma abordagem terapêutica para tumores cerebrais por apresentarem um tropismo por sítios tumorais, tanto primários, quanto metastáticos (Loebinger, Eddaoudi et al. 2009). MSCs derivadas de medula óssea foram capazes de migrar para glioma humano, em modelo animal, tanto quando injetadas intravascularmente, quanto intracranialmente, mesmo que em hemisfério oposto ao qual o glioma foi implantado (Nakamizo, Marini et al. 2005). MSCs derivadas de pele humana

migraram e impediram o desenvolvimento de gliomas por reduzir a angiogênese e a invasão, provavelmente por indução de gliose tumoral, em modelos animais de camundongo e embrião de galinha (Pisati, Belicchi et al. 2007). Ainda, células tronco humanas também derivadas de medula óssea foram capazes de suprimir o crescimento de gliomas por meio da inibição da angiogênese observada no co-cultivo dessas células (Ho, Toh et al. 2013).

As células tronco do próprio tecido neural (NSCs) migram seletivamente para gliomas malignos *in vivo* e *in vitro*, e também têm sido utilizadas como veículo de entrega de terapias citotóxicas e imunomodulatórias nos sítios alvo (Aboody, Brown et al. 2000; Yuan, Hu et al. 2006; Tyler, Ulasov et al. 2009). Em 2008, o FDA (Food and Drug Administration) aprovou que o City of Hope Medical Center (Dr. Aboody/Dr. Portnow, Duarte, CA) conduzisse o primeiro ensaio clínico de uma terapia com células tronco neurais em pacientes com glioma recorrente de alto grau (Aboody, Najbauer et al. 2008). Todavia, o potencial de translação das NSCs é limitado pelas dificuldades práticas de coleta e expansão *ex-vivo* dessas células (Lamfers, Idema et al. 2009; Pendleton, Li et al. 2013).

Dessa maneira, a possibilidade de se obter células mesenquimais de tecidos humanos de fácil obtenção unida à característica dessas células serem atraídas especificamente para as regiões tumorais e ao fato de serem hipoinmunogênicas, tem sugerido as MSCs como veículos para a entrega de genes terapêuticos para o tratamento dos tumores humanos, entre eles os do SNC (Birnbbaum, Roider et al. 2007; Kang, Jeun et al. 2008; Kim, Lim et al. 2008; Lefranc, Rynkowski et al. 2009; Loebinger, Eddaoudi et al. 2009; Akimoto, Kimura et al. 2013).

O mecanismo pelo qual as MSCs migram e atingem esses locais alvos ainda não é completamente compreendido, embora alguns estudos já tenham mostrado que essa migração é dependente de diferentes citocinas e seus respectivos receptores (Shah 2012). Sendo assim, quando essas células são manipuladas para fins terapêuticos, essa característica pode resultar em um efeito mais especificamente localizado, mesmo quando as MSCs modificadas são administradas sistemicamente. Isso contribui para que as MSCs possam entregar diretamente no tumor moléculas, proteínas ou genes terapêuticos que poderiam ser tóxicos ou inativados pelo indivíduo se administrados livremente na corrente sanguínea (Chagastelles, Nardi et al. 2010).

Na clínica, o plano atual é a utilização de MSCs geneticamente modificadas como adjuvantes após ressecção cirúrgica. Neste cenário, a maior parte da massa tumoral é removida cirurgicamente, e as MSCs modificadas são transplantadas para remover as células malignas residuais no local do tumor e para eliminar as células tumorais invasivas que tenham migrado para fora do sítio primário (Porada and Almeida-Porada 2010).

No entanto, embora existam estudos que reportam que as MSCs são capazes de suprimir o crescimento do tumor, alguns estudos também mostram que as MSCs podem promover o efeito oposto, contribuindo para a progressão e a metástase tumoral (Houghton, Stoicov et al. 2004; Karnoub, Dash et al. 2007; Klopp, Gupta et al. 2011). As contradições a cerca dessas informações podem estar relacionadas à variabilidade e à heterogeneidade nas

células tronco adultas de diferentes fontes, ou a diferenças nos métodos de isolamento e condições de cultura in vitro (Belmar-Lopez, Mendoza et al. 2013). Dentro dessa questão, um outro ponto a ser discutido ainda é o de que quando expostos ao ambiente hostil do tumor (por exemplo, produção de fatores de crescimento e citocinas aberrante, a presença de estresse oxidativo e de espécies de reativas de oxigênio capazes de provocar danos no DNA), as células tronco potencialmente possam sofrer transformação maligna, contribuindo assim para a recorrência do tumor (Liu, Zhang et al. 2012).

Dessa maneira, para que se possa utilizar com segurança as MSCs como ferramenta em terapia gênica em humanos, é imprescindível que se avance na compreensão de suas interações tanto com as células tumorais quanto com o tecido normal.

Referências

- Aboody, K. S., A. Brown, et al. (2000). "Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(23): 12846-12851.
- Aboody, K. S., J. Najbauer, et al. (2008). "Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy." *Gene Ther* 15(10): 739-752.
- Akimoto, K., K. Kimura, et al. (2013). "Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells inhibit, but adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote, glioblastoma multiforme proliferation." *Stem Cells Dev* 22(9): 1370-1386.
- Al-Hajj, M., M. W. Becker, et al. (2004). "Therapeutic implications of cancer stem cells." *Curr Opin Genet Dev* 14(1): 43-47.
- Alonso, M. M., R. Diez-Valle, et al. (2011). "Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas." *PLoS One* 6(11): e26740.
- Atlasi, Y., S. J. Mowla, et al. (2008). "OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells." *Stem Cells* 26(12): 3068-3074.
- Baker, M. (2012). "Cancer stem cells tracked." *Nature* 488(7409): 13-14.
- Bao, S., Q. Wu, et al. (2006). "Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor." *Cancer Res* 66(16): 7843-7848.
- Baylin, S. B. and P. A. Jones (2011). "A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications." *Nat Rev Cancer* 11(10): 726-734.
- Beier, C. P. and D. Beier (2011). "CD133 negative cancer stem cells in glioblastoma." *Front Biosci (Elite Ed)* 3: 701-710.
- Belmar-Lopez, C., G. Mendoza, et al. (2013). "Tissue-derived mesenchymal stromal cells used as vehicles for anti-tumor therapy exert different in vivo effects on migration capacity and tumor growth." *BMC Med* 11: 139.
- Birnbaum, T., J. Roider, et al. (2007). "Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines." *J Neurooncol* 83(3): 241-247.
- Bissell, M. J. and W. C. Hines (2011). "Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression." *Nat Med* 17(3): 320-329.

Bittencourt, R. A. d. C., H. R. Pereira, et al. (2006). "Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea." *Acta Ortopédica Brasileira* 14: 22-24.

Chagastelles, P. C., N. B. Nardi, et al. (2010). "Biology and applications of mesenchymal stem cells." *Sci Prog* 93(Pt 2): 113-127.

Chambers, I., D. Colby, et al. (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." *Cell* 113(5): 643-655.

Chen, J., Y. Li, et al. (2012). "A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy." *Nature* 488(7412): 522-526.

Chen, Y. C., H. S. Hsu, et al. (2008). "Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells." *PLoS One* 3(7): e2637.

Chiou, S. H., C. C. Yu, et al. (2008). "Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma." *Clin Cancer Res* 14(13): 4085-4095.

Choi, S. A., J. Y. Lee, et al. (2012). "Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: characteristics and therapeutic potential as cellular vehicles for prodrug gene therapy against brainstem gliomas." *Eur J Cancer* 48(1): 129-137.

da Silva Meirelles, L., P. C. Chagastelles, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues." *J Cell Sci* 119(Pt 11): 2204-2213.

Dacey, M. L. and R. B. Wallace (1974). "Postnatal neurogenesis in the feline cerebellum: a structural-functional investigation." *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 34(2): 253-263.

Dean, M., T. Fojo, et al. (2005). "Tumour stem cells and drug resistance." *Nat Rev Cancer* 5(4): 275-284.

Deleyrolle, L. P., A. Harding, et al. (2011). "Evidence for label-retaining tumour-initiating cells in human glioblastoma." *Brain* 134(Pt 5): 1331-1343.

Dhanasekaran, M., S. Indumathi, et al. (2013). "Plasticity and banking potential of cultured adipose tissue derived mesenchymal stem cells." *Cell Tissue Bank* 14(2): 303-315.

Diamandis, P., J. Wildenhain, et al. (2007). "Chemical genetics reveals a complex functional ground state of neural stem cells." *Nat Chem Biol* 3(5): 268-273.

Dick, J. E. (2008). "Stem cell concepts renew cancer research." *Blood* 112(13): 4793-4807.

Du, Z., D. Jia, et al. (2009). "Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells." *Glia* 57(7): 724-733.

Ehteshami, M., C. B. Stevenson, et al. (2005). "Stem cell therapies for malignant glioma." *Neurosurg Focus* 19(3): E5.

Fan, X., L. Khaki, et al. (2010). "NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts." *Stem Cells* 28(1): 5-16.

Fan, X., W. Matsui, et al. (2006). "Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors." *Cancer Res* 66(15): 7445-7452.

Friedenstein, A. J., J. F. Gorskaja, et al. (1976). "Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs." *Exp Hematol* 4(5): 267-274.

Gangemi, R. M., F. Griffero, et al. (2009). "SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity." *Stem Cells* 27(1): 40-48.

Gursel, D. B., B. J. Shin, et al. (2011). "Glioblastoma stem-like cells-biology and therapeutic implications." *Cancers (Basel)* 3(2): 2655-2666.

Hamburger, A. W. and S. E. Salmon (1977). "Primary bioassay of human tumor stem cells." *Science* 197(4302): 461-463.

Heddleston, J. M., M. Hitomi, et al. (2011). "Glioma stem cell maintenance: the role of the microenvironment." *Curr Pharm Des* 17(23): 2386-2401.

Hegi, M. E., A. C. Diserens, et al. (2005). "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma." *N Engl J Med* 352(10): 997-1003.

Ho, I. A., H. C. Toh, et al. (2013). "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells suppress human glioma growth through inhibition of angiogenesis." *Stem Cells* 31(1): 146-155.

Hoelzinger, D. B., T. Demuth, et al. (2007). "Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment." *J Natl Cancer Inst* 99(21): 1583-1593.

Holland, E. C. (2001). "Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models." *Nat Rev Genet* 2(2): 120-129.

Houghton, J., C. Stoicov, et al. (2004). "Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells." *Science* 306(5701): 1568-1571.

Hovinga, K. E., F. Shimizu, et al. (2010). "Inhibition of notch signaling in glioblastoma targets cancer stem cells via an endothelial cell intermediate." *Stem Cells* 28(6): 1019-1029.

Kang, S. G., S. S. Jeun, et al. (2008). "Cytotoxicity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells against human malignant glioma cells." *Childs Nerv Syst* 24(3): 293-302.

Karnoub, A. E., A. B. Dash, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis." *Nature* 449(7162): 557-563.

Kern, S., H. Eichler, et al. (2006). "Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue." *Stem Cells* 24(5): 1294-1301.

Kim, S. M., J. Y. Lim, et al. (2008). "Gene therapy using TRAIL-secreting human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells against intracranial glioma." *Cancer Res* 68(23): 9614-9623.

Klopp, A. H., A. Gupta, et al. (2011). "Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth?" *Stem Cells* 29(1): 11-19.

Lamfers, M., S. Idema, et al. (2009). "Homing properties of adipose-derived stem cells to intracerebral glioma and the effects of adenovirus infection." *Cancer Lett* 274(1): 78-87.

Lee, J., S. Kotliarova, et al. (2006). "Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines." *Cancer Cell* 9(5): 391-403.

Lee, M., E. J. Nam, et al. (2012). "Prognostic impact of the cancer stem cell-related marker NANOG in ovarian serous carcinoma." *Int J Gynecol Cancer* 22(9): 1489-1496.

Lefranc, F., M. Rynkowski, et al. (2009). "Present and potential future adjuvant issues in high-grade astrocytic glioma treatment." *Adv Tech Stand Neurosurg* 34: 3-35.

Lim, S. K., S. R. Llaguno, et al. (2011). "Glioblastoma multiforme: a perspective on recent findings in human cancer and mouse models." *BMB Rep* 44(3): 158-164.

Liu, J., Y. Zhang, et al. (2012). "Rat bone marrow mesenchymal stem cells undergo malignant transformation via indirect co-cultured with tumour cells." *Cell Biochem Funct* 30(8): 650-656.

Loebinger, M. R., A. Eddaoudi, et al. (2009). "Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer." *Cancer Res* 69(10): 4134-4142.

Louis, D. N. (2006). "Molecular pathology of malignant gliomas." *Annu Rev Pathol* 1: 97-117.

Louis, D. N., H. Ohgaki, et al. (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." *Acta Neuropathol* 114(2): 97-109.

Magee, J. A., E. Piskounova, et al. (2012). "Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty." *Cancer Cell* 21(3): 283-296.

Maher, E. A., F. B. Furnari, et al. (2001). "Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter." *Genes Dev* 15(11): 1311-1333.

Medema, J. P. and L. Vermeulen (2011). "Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer." *Nature* 474(7351): 318-326.

Nakai, E., K. Park, et al. (2009). "Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from glioblastoma." *Cancer Invest* 27(9): 901-908.

Nakamizo, A., F. Marini, et al. (2005). "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas." *Cancer Res* 65(8): 3307-3318.

Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." *Science* 194(4260): 23-28.

Ohgaki, H. and P. Kleihues (2007). "Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma." *Am J Pathol* 170(5): 1445-1453.

Panepucci, R. A., J. L. Siufi, et al. (2004). "Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells." *Stem Cells* 22(7): 1263-1278.

Park, K. S., Y. S. Lee, et al. (2006). "In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood." *J Vet Sci* 7(4): 343-348.

Pegg, A. E., M. E. Dolan, et al. (1995). "Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 51: 167-223.

Pendleton, C., Q. Li, et al. (2013). "Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue vs bone marrow: in vitro comparison of their tropism towards gliomas." *PLoS One* 8(3): e58198.

Piccirillo, S. G. and A. L. Vescovi (2007). "Brain tumour stem cells: possibilities of new therapeutic strategies." *Expert Opin Biol Ther* 7(8): 1129-1135.

Pisati, F., M. Belicchi, et al. (2007). "Effect of human skin-derived stem cells on vessel architecture, tumor growth, and tumor invasion in brain tumor animal models." *Cancer Res* 67(7): 3054-3063.

Polyak, K., I. Haviv, et al. (2009). "Co-evolution of tumor cells and their microenvironment." *Trends Genet* 25(1): 30-38.

Porada, C. D. and G. Almeida-Porada (2010). "Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery." *Adv Drug Deliv Rev* 62(12): 1156-1166.

Preusser, M., S. de Ribaupierre, et al. (2011). "Current concepts and management of glioblastoma." *Ann Neurol* 70(1): 9-21.

Reya, T., S. J. Morrison, et al. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." *Nature* 414(6859): 105-111.

Sathornsumetee, S., D. A. Reardon, et al. (2007). "Molecularly targeted therapy for malignant glioma." *Cancer* 110(1): 13-24.

Shackleton, M., E. Quintana, et al. (2009). "Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution." *Cell* 138(5): 822-829.

Shah, K. (2012). "Mesenchymal stem cells engineered for cancer therapy." *Adv Drug Deliv Rev* 64(8): 739-748.

Singh, S. K., I. D. Clarke, et al. (2004). "Cancer stem cells in nervous system tumors." *Oncogene* 23(43): 7267-7273.

Singh, S. K., I. D. Clarke, et al. (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." *Cancer Res* 63(18): 5821-5828.

Singh, S. K., C. Hawkins, et al. (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." *Nature* 432(7015): 396-401.

Stiles, C. D. and D. H. Rowitch (2008). "Glioma stem cells: a midterm exam." *Neuron* 58(6): 832-846.

Stupp, R., W. P. Mason, et al. (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." *N Engl J Med* 352(10): 987-996.

Sukhdeo, K., D. Hambardzumyan, et al. (2011). "Glioma development: where did it all go wrong?" *Cell* 146(2): 187-188.

Tai, M. H., C. C. Chang, et al. (2005). "Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis." *Carcinogenesis* 26(2): 495-502.

Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." *Cell* 126(4): 663-676.

Tyler, M. A., I. V. Ulasov, et al. (2009). "Neural stem cells target intracranial glioma to deliver an oncolytic adenovirus in vivo." *Gene Ther* 16(2): 262-278.

Uchida, N., D. W. Buck, et al. (2000). "Direct isolation of human central nervous system stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26): 14720-14725.

Van Meir, E. G., C. G. Hadjipanayis, et al. (2010). "Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma." *CA Cancer J Clin* 60(3): 166-193.

Verhaak, R. G., K. A. Hoadley, et al. (2010). "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1." *Cancer Cell* 17(1): 98-110.

Vermeulen, L., F. de Sousa e Melo, et al. (2012). "The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities." *Lancet Oncol* 13(2): e83-89.

Vescovi, A. L., R. Galli, et al. (2006). "Brain tumour stem cells." *Nat Rev Cancer* 6(6): 425-436.

Visvader, J. E. (2011). "Cells of origin in cancer." *Nature* 469(7330): 314-322.

Wang, J., T. P. Wakeman, et al. (2010). "Notch promotes radioresistance of glioma stem cells." *Stem Cells* 28(1): 17-28.

Westphal, M. and K. Lamszus (2011). "The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches." *Nat Rev Neurosci* 12(9): 495-508.

Wink, M. R. (2003). Identificação das características cinéticas, expressão e localização das ecto-nucleotidases em cultura de astrócitos e linhagens de gliomas. Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, UFRGS: 194.

www.inca.gov.br Incidência de Câncer no Brasil - Câncer do Sistema Nervoso Central.

www.rnct.org.br Potencial das células-tronco.

Yabroff, K. R., L. Harlan, et al. (2012). "Patterns of care and survival for patients with glioblastoma multiforme diagnosed during 2006." *Neuro Oncol* 14(3): 351-359.

Yao, J., T. Zhang, et al. (2009). "Effect of CD133/prominin-1 antisense oligodeoxynucleotide on in vitro growth characteristics of Huh-7 human hepatocarcinoma cells and U251 human glioma cells." *Oncol Rep* 22(4): 781-787.

Ye, J., D. Wu, et al. (2014). "The cancer stem cell niche: cross talk between cancer stem cells and their microenvironment." *Tumour Biol*.

Yuan, X., J. Curtin, et al. (2004). "Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme." *Oncogene* 23(58): 9392-9400.

Yuan, X., J. Hu, et al. (2006). "Interleukin-23-expressing bone marrow-derived neural stem-like cells exhibit antitumor activity against intracranial glioma." *Cancer Res* 66(5): 2630-2638.

Objetivos

A proposta deste trabalho foi investigar a influência do meio condicionado das células tronco mesenquimais, derivadas de tecido adiposo humano, sobre o desenvolvimento de células tronco tumorais na linhagem celular de glioma humano U87.

Entre os objetivos específicos deste estudo estão:

- 1)** Caracterizar a presença de células tronco tumorais na linhagem de glioma U87;
- 2)** Determinar a influência do meio condicionado de hADSC na formação de esferas tumorais em cultura;
- 3)** Analisar e correlacionar a influência do meio condicionado de hADSCs na expressão dos marcadores de células tronco tumorais;
- 4)** Analisar o efeito do MC de hADSCs sobre a indução de autofagia nas células de glioma U87.

ARTIGO CIENTÍFICO

**INFLUENCE OF HUMAN ADIPOSE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS
CONDITIONED MEDIUM IN THE DEVELOPMENT OF GLIOMA CANCER STEM CELL
POPULATION.**

Este artigo será submetido à revista *Neuroscience*.

G. R. ONZI¹

P. F. LEDUR²

L. D. HEINZENREDER¹

A. P. BERTONI¹

E. FILIPPI-CHIELA²

G. LENZ²

M. R. WINK^{1*}

¹Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

²Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

*Corresponding author: Rua Sarmento Leite, 245, Prédio Principal, Sala 304, UFCSPA, CEP 90050-170. Porto Alegre, RS, Brasil.

Telephone number: +55.51.33038762

Email address: marciawink@yahoo.com.br; mwink@ufcspa.edu.br

Abbreviations: CSC, cancer stem cell; MSC, mesenchymal stem cell; hADSC, human adipose derived stem cell; CM, conditioned medium; GBM, glioblastoma.

Abstract

Glioblastoma multiforme is the most aggressive tumor in the central nervous system. Furthermore, the concept of cancer stem cells (CSC) brought a paradigm shift in the biology and therapy of cancer, suggesting targeting these cells for destruction or differentiation may be the best therapeutic strategy to be followed for aggressive tumors. Therefore, the development of new specific therapeutic methodologies is necessary. Several studies have shown that mesenchymal stem cells (MSC) exhibit tropism for gliomas, making them promising for gene therapy against tumors. However, interactions between CSC and MSCs are still not completely understood. Here we evaluated if conditioned medium (CM) from adipose derived stem cells could influence U87 glioma CSCs development. We treated glioma cells in culture with CM (pure or diluted) for seven days, and analyzed tumorspheres formation in each treatment. We further evaluated CSC markers mRNA expression by RT-PCR and by real time PCR. hADSC CM did not influence tumorsphere formation ($p = 0.781$) even when corrected by cell viability. mRNA expression of OCT4, Nanog, SOX2 and CD133 markers was not statistically different from control cells. OCT4 and Nanog were also analyzed by flow cytometry and the percentage of positive cells for these markers was similar in treated and control groups ($p = 0.988$ and $p = 0.761$, respectively). Finally, we also evaluated if hADSC CM would be capable of inducing autophagy in U87 glioma cells performing LC3GFP+ protein and acridine orange staining analysis. We found that hADSC CM highly induced autophagosome formation in glioma cells when compared to control ($p < 0.0001$). Surprisingly, though, this autophagic induction seems to stop on autolysosomes formation, since just Rapamycin control group had an increased formation of autolysosomes. Taking these results together, hADSC CM showed no influence in glioma CSCs development and, furthermore seems to contribute in some way to induction of autophagy in glioma U87 cells.

Key-words: Glioblastoma. Adipose Derived Stem Cell, Cancer Stem Cell. Autophagy.

INTRODUCTION

Glioblastomas are the most common tumors in the central nervous system, characterized by high proliferation rates, invasive power and high recurrence. The median survival time of patients with this type of tumor does not exceed 15 months, even with standard

treatment (Demuth and Berens 2004). The concept of cancer stem cells brought a paradigm shift for cancer biology and therapy (Flores, Ledur et al. 2009; Lenz 2010), suggesting that targeting these cells for destruction (Vlashi, Kim et al. 2009) or differentiation (Diamandis, Wildenhain et al. 2007) may be the best therapeutic strategy to be followed in aggressive tumors. However, the CSC eradication may not be so simple, since they present fewer reactive oxygen species (Diehn, Cho et al. 2009) and are more resistant to ionizing radiation (Bao, Wu et al. 2006), vincristine (Yu, Ping et al. 2008), hypoxia and other chemotherapeutic agents (Qiang, Yang et al. 2009), when compared to non-stem tumor cells. In addition, treatment with some of these agents has increased the proportion of CSCs, which may be an explanation for more aggressive recurrences (Bao, Wu et al. 2006).

Thus, the relationship of CSCs with tumor progression and recurrence alerts to the fact that current therapies to fight cancer often fail because they are directed to the wrong cell types. Therefore, development of new therapeutic methodologies is necessary in order to win this fight completely.

Several studies have shown that mesenchymal stem cells exhibit tropism for gliomas (Nakamizo, Marini et al. 2005; Pisati, Belicchi et al. 2007; Yong, Shinojima et al. 2009). This makes them promising as a vehicle for gene or drug delivery in new therapies against these tumors (Porada and Almeida-Porada 2010). One of the best and largely used sources in the body to isolate these MSCs is the adipose tissue, since this source is less invasive, more reproducible and presents a higher yield rate than other sources (Choi, Lee et al. 2012).

The mechanisms responsible for the tropism of MSCs to tumors are not yet completely understood and, mainly, little is known about the interactions between MSCs and CSCs. Furthermore, there is now overwhelming evidences showing that CSCs interplay closely with the tumor microenvironment, which includes MSCs. The understanding of this interplay could be crucial in the treatment of cancer. This knowledge is also fundamental in order to safely use the MSCs in cancer therapy, since it was also shown that MSCs could even contribute to tumor progression and metastasis (Houghton, Stoicov et al. 2004; Karnoub, Dash et al. 2007; Klopp, Gupta et al. 2011). Thus, the aim of the present study was to investigate if factors released by human adipose derived stem cells could interfere on glioma cancer stem cells development, trying to better understand the interactions between these cell types.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

All procedures in this work were previous approved by UFCSPA's ethics committee (Protocol nº 958/12).

Cell culture and characterization of hADSCs

hADSCs were obtained from adipose tissue of patients undergoing abdominoplasty and/or reductive mammoplasty at the Plastic Surgery Service of Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA) hospital. The hADSC cultures were provided by the researcher Elisa V.

Soares in a protocol approved by UFCSPA and ISCMPA's ethics committee (n° 846/11). The hADSCs were grown as described before (Zuk, Zhu et al. 2001). Cultures were established by maintaining the adherent cells, that were used for the experiments only until the 15th passage. Cells were maintained in complete Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with low glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Campinas, SP, BR), 10,000 units penicillin/10 mg streptomycin (Sigma-Aldrich) and 25 µg amphotericin B (Sigma-Aldrich). Cells were cultured at a temperature of 37°C, humidity of 95% / 5% CO₂.

Differentiation was induced by cultivating cells in specific media for about one month, with medium changed every three days. The adipogenic differentiation was performed following protocols previously described (Kopen, Prockop et al. 1999; Meirelles Lda and Nardi 2003; da Silva Meirelles, Chagastelles et al. 2006). To induce adipogenic differentiation, culture medium was supplemented with 8-10 mol/L dexamethasone, 5 µg/mL insulin, and indomethacin 100µm (Sigma-Aldrich). Adipocytes were visualized by fixing cells with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for one hour at room temperature and staining with Oil Red O solution (3 volumes of 3.75% Oil Red O in isopropanol plus 2 volumes of distilled water) for five minutes at room temperature (Nora, Camassola et al. 2012).

Osteogenic differentiation was performed using Differentiation Single Quots™ (Lonza; Walkersville, MD, USA) plus 5 µg/mL of ascorbic acid reagents. Calcium deposition in differentiated cultures was revealed by washing once with PBS, fixing with 4% paraformaldehyde in PBS for 15–30 minutes at room temperature, and staining for five minutes at room temperature with Alizarin Red Stain (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) at pH 4.2. Chondrogenic differentiation was performed using differentiation CDM™ Basal Medium and CDM™ Differentiation Single Quots™ (Lonza). Chondrocyte cultures were analyzed by fixing with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 minutes at room temperature and staining with Alcian Blue (pH 2.5) (Vetec) in 3% acetic acid for five minutes (Nora, Camassola et al. 2012).

Furthermore, in order to complete the analysis of the stemness character of these cells, an immunofenotyping assay was performed. Cells were dissociated and washed twice in PBS. After, cells were incubated with respective stem cell conjugated markers – CD34 (CD3458101), CD14 (MHCD1404), CD45 (MHCD4504), CD44 (MHCD4401) and CD105 (MHCD10504) – 1:1000 for 30 minutes (Invitrogen, Frederick, MD, USA). Then, cells were washed again and resuspended in PBS. Analysis was performed on FACS-Calibur cytometer (BD - Biosystems). Histograms on the analysis of surface markers were created using Flowing Software Version 2.

Cell culture of tumor cell lineage U87 and characterization of the CSC population

Human glioma cell line U87 was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA). Cells were maintained in the same conditions as hADSCs. Cancer stem cells identification was performed by analysis of sphere formation capacity of these cells and presence of undifferentiation markers like OCT4, Nanog, SOX2 and CD133.

hADSC conditioned medium

This protocol was performed as an adaptation from already described protocols (Sze, de Kleijn et al. 2007; Horn, Frozza et al. 2009; Yew, Hung et al. 2011). Briefly, the culture medium was conditioned by contact with about $2,5 \times 10^5$ MSCs (75cm² culture dishes) for 48 hours. After that, the medium was filtrated in a 0.22 µm membrane (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) and stored at -80°C. For treatments, conditioned medium was added to glioma cultures, pure (CM) or diluted in unconditioned medium (DMEM+CM 1:1) during the time required for each experiment.

Sphere formation assay

Cells were detached from the culture flasks with EDTA trypsin and counted in a Neubauer chamber. $1,0 \times 10^3$ U87 cells were then plated in a 96-well plate with 200 µL/well of DMEM low glucose medium (5% FBS) and allowed to grow to confluence for seven days. In the treatment, conditioned medium from hADSC was added to the treated wells (CM and DMEM+CM groups) at day 1 and the culture medium in all groups was not changed until the end of the experiment. Spheres were counted from days 3 till 7. We considered as spheres groups of cells that presented volume of more than 60 µm and more than five cells observed in phase contrast as previously described (Ledur, Villodre et al. 2012).

Methylthiazolyltetrazolium bromide (MTT) cell proliferation assay

After seven days of treatment, culture medium in the 96-well plate used for the sphere formation assay was replaced by the methylthiazolyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich) solution diluted in DMEM low glucose (5% FBS), and the plate was incubated in the dark at 37°C for 3 hours and 30 minutes. The MTT solution was then aspirated and the formazan crystals formed were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Nuclear-CAQ, Diadema, SP, BR). Absorbance was measured in 570 nm at SpectraMax M2e (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, US) and cell growth in treated cells was expressed as the percentage of the untreated control cells (Ledur, Villodre et al. 2012).

Reverse Transcriptase-PCR

Messenger RNA was extracted from the U87 populations (cultured in DMEM, CM and DMEM+CM) using Trizol LS® reagent (Sigma-Aldrich). cDNA was synthesized with Randon primers and MMLV-RT® reverse transcriptase enzyme (Promega; Madison, WI, USA). Primers designed in our laboratory for stem marker genes Prominin-1 (CD133), OCT4, Nanog and SOX2 (undifferentiated cells) were used in the PCR reaction. Additionally, other primers were used for this reaction: Notch and MGMT. PCR reaction was performed using Fast Probe qPCR

Master Mix (Biotium, Hayward, CA, USA). The PCR cycling conditions were as follows: 1 minute at 95 °C, 1 minute at 94 °C, 1 minute at annealing temperature, and 1 minute at 72 °C. All PCR reactions were carried out for 35 cycles and included a final 10 minutes extension at 72 °C. Products were analyzed in an agarose gel (1%) stained with ethidium bromide (Ludwig, Porto Alegre, RS, BR). Primers are shown in Table 1. GAPDH was used as the internal control gene.

Quantification of gene expression by real-time PCR was performed in the presence of Syber Green and relative quantification was obtained by the comparative Ct method ($\Delta\Delta C_t$ Method).

Real time PCR

Total RNA and cDNA were generated as described in RT-PCR analysis. The samples were loaded into wells for Low Profile 96-well and the analysis was carried out in an Applied-Biosystem Step One Plus™ Real-Time PCR cycler. Reaction settings were composed of an initial enzyme activation step of 95 °C for 20 seconds, 45 cycles of denaturation at 95 °C for 0.03 seconds and annealing/extension at 60°C for 60 seconds, followed by melt analysis ramping at 60°C to 95°C, with a ramp of 0.1 °C/s to acquire data to produce the denaturing curve of the amplified products. Real-time PCRs were made in a 10 µL final volume composed of 5 µL of Fast SYBRgreen master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0,25 uL of 10uM primer pairs, 3,75 uL of water and 1uL cDNA. At the end of the PCR cycles, a melting curve was generated to identify specificity of the PCR product. For normalization, GAPDH primers were used to measure the amount of GAPDH cDNA. Samples were run in triplicate and the data were presented as ratio of target-gene/GAPDH. The primers used for real time PCR were the same used in RT-PCR analysis (Table 1).

Table 1. Cancer stem cell markers primers used in PCR reactions.

Primers	Sense	Antisense	AT
hSOX2	ACACCAATCCCATCCACACT	GCAAACCTCCTGCAAAGCTC	60°C
hProminin-1	ACCAACACCAAGAACAAGGC	GGAGCTGACTTGAATTGAGG	60°
hOCT4	AACATGTGTAAGCTGCGGC	TTGAATGCATGGGAGAGCC	61°
hNanog	TGAAGTGCAAGCGGTGGCAGA	GGTCCAGGTCTGGTCGTCCCA	60°
hMGMT	ATGGATGTTTGAGCGACACA	ATAGAGCAAGGGCAGCGTTA	60°
hNotch1	CCGCCTTTGTGCTTCTGTT	TCCTCCTCTTCCTCGCTGTT	62°

h (human); AT (annealing temperature)

Analysis of CSC markers by flow cytometry

Individual cells and spheres were obtained plating $7,0 \times 10^4$ U87 cells, in 6 wells plates, that were allowed to grown for seven days. As in the sphere formation assay, for treated groups, conditioned medium from hADSC was added to the wells pure or diluted in DMEM. Cells were then prepared for incubation with antibodies against cancer stem cell markers: OCT4, Nanog and SOX2 and CD133.

For detection of OCT4 and Nanog through flow cytometry, cells were harvested, washed twice in PBS, and fixed with formaldehyde to a final concentration of 4%. Cells were washed and permeabilized with methanol to a final concentration of 90%. For immunostaining, cells were incubated in incubation buffer (5 mg/mL BSA in PBS), and Nanog (D73G4) XP™ rabbit mAb or OCT4 Rabbit Ab primary antibodies (Cell Signaling Technology, MA, USA) were added to a final concentration of 1:200 and incubated for 2 hours. A new washing step followed, and secondary antibody anti-rabbit IgG Fab2 Alexa Fluor® 488 was added to a final concentration of 1:1,000. Cells were incubated for 30 min, washed, and resuspended in PBS for analysis. Cells were then analyzed by flow cytometry in a PCA-96 System machine (Guava Technologies, Hayward, CA, USA).

Autophagy analysis

Analysis of autophagosome formation by LC3-GFP protein

Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1-LC3 or only LC3) is a mammalian homologue of yeast Atg8p that translocates to the autophagosome membranes after lipidation (Kabeya, Mizushima et al. 2000). U87 cells transduced with the expression vector pEGFP-LC3, gently provided by Dr. Carlos F. Menck, were treated within different groups: DMEM, CM, DMEM+CM and CM+FBS (in this group, CM was supplemented with more 5% FBS). Rapamycin (100nM) was used as positive control for autophagy. Treatments were applied to the cells for 24 and 48 hours, followed by counting the percentage of cells that had at least five clear green dots in the cytosol among at least 100 cells per well (Pattingre, Tassa et al. 2005; Jiang, White et al. 2009). We considered autophagic the cells that presented more than five clear dots in the cytosol (Jiang et al 2009). Analysis was performed using Image J software.

Visualization and quantification of acidic vacuolar organelles (AVOs) by acridine orange (AO) staining

AO is a marker of AVOs that fluoresces green in the whole cell except in acidic compartments, where it fluoresces red. Development of AVOs is a typical feature of autophagy, and its formation indicates the maturation of autophagosomes and an efficient autophagic process (Klionsky, Abeliovich et al. 2008). Cells that were plated on the 24-well plates for the LC3-GFP analysis, followed by respective treatments, were then marked with AO for 15 minutes. After, cells were detached from the plates and analyzed by flow cytometry, as described previously (Jiang, White et al. 2009) in a PCA-96 System flow cytometer (Guava Technologies, Hayward, CA, USA). Non-stained cells were used as control.

Statistical Analysis

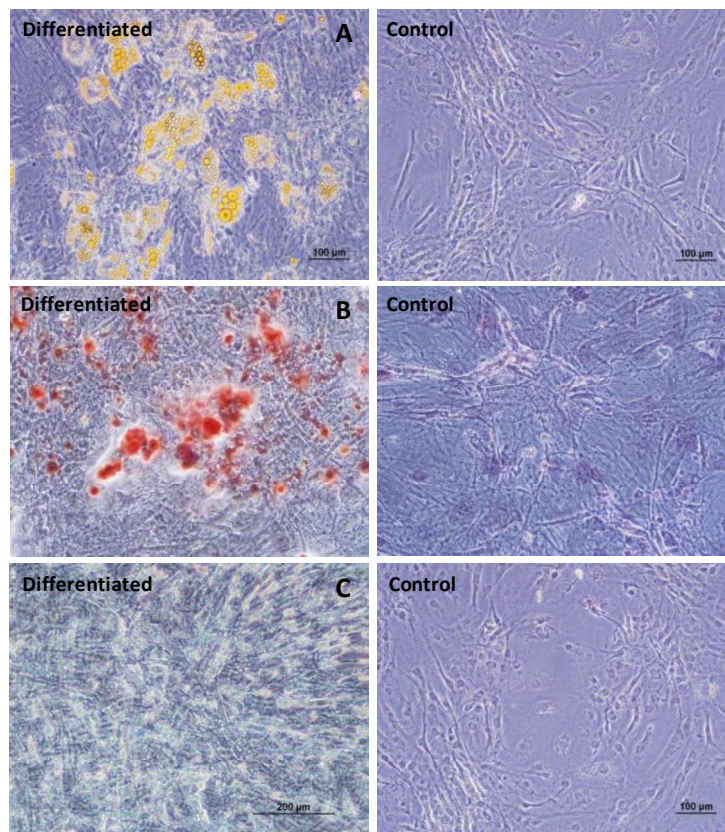
The level of significance was determined performing a comparison among groups by one-way analysis of variance (ANOVA) test (GraphPad InStat3 software), when data presented Gaussian distribution, followed by Tukey's multiple comparison pos-test. All quantitative data presented are the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). p values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

hADSC characterization

Human ADSCs exhibited the typical morphology and proliferation pattern of MSCs. The adherent cells proliferated normally and showed no signs of senescence. Based on other studies from literature, cells for experiments and to prepare the CM were used between the 6th and 15th passages (Horn, Frozza et al. 2009). The effect of prolonged cultivation on the capacity of these cells to differentiate was already determined in some types of MSCs, showing that MSC cultures with more than 32 passages are still able to maintain their stem cell capacity (da Silva Meirelles, Chagastelles et al. 2006). In accordance, we observed that cells tested until the 15th passage were able to maintain their stem cell capacity.

When cultivated with adipogenic, osteogenic or chondrogenic media, cultures readily differentiated along these lineages (Fig.1). Adipogenic differentiation was confirmed by the presence of lipidic vesicles in the cells, stained with Oil Red, after 30 days in culture with specific differentiation medium (Fig. 1A). Osteogenic differentiation was characterized by calcium deposition stained by Alizarin Red (Fig 1B). Chondrogenic differentiation was revealed by the extracellular matrix enriched with proteoglycans (glycosaminoglycans) formed over the cells. This matrix was stained with Alcian Blue dye (Fig. 1C).



D

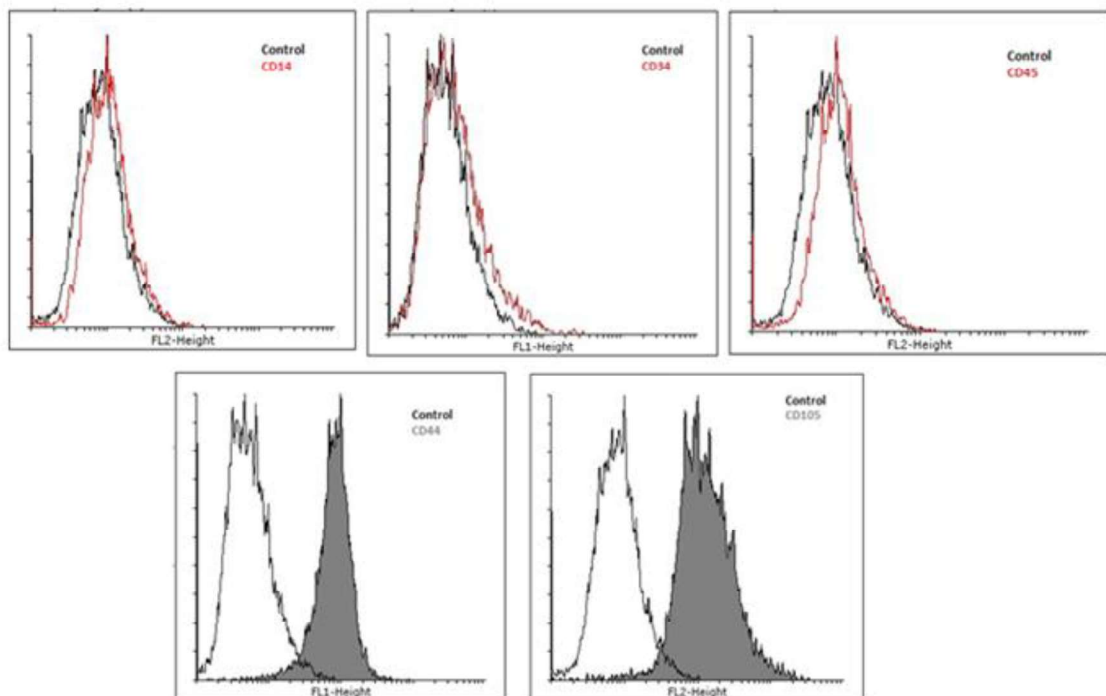


Figure 1. (A) Adipogenic; **(B)** osteogenic; and **(C)** chondrogenic differentiation of hADSCs in photomicroscopy (40x). **(D)** Histograms showing MSC profile in hADSC cells. hADSC were positive for markers CD105 and CD44 and negative for CD14, CD34 and CD45.

Immunophenotyping of hADSCS was also performed in order to confirm the presence of stem markers that mesenchymal cells are described to express. Flow cytometry analyses showed that the cultures were negative for hematopoietic markers (CD14, CD34 and CD45), and were positive for the remaining surface markers analyzed (CD44 and CD105) (Fig. 1D), according to the International Society for Cellular Therapy (ISCT) criteria for mesenchymal stem cells and in accordance with the literature (Meirelles Lda and Nardi 2009).

Sphere forming capacity of U87 cells

The U87 human glioma cells grown on high density presented two morphologically distinct populations: one that consisted of cells attached to the plate and a population that grows as spheres that resemble neurospheres (Fig. 2A). It has been shown that subsets of cells from adult human GBM also form spheres in culture. Tumorspheres, as they are called, are defined as non-adherent colonies derived from tumor stem cells (Uchida, Buck et al. 2000; Diamandis, Wildenhain et al. 2007).

In this work, spheres were readily observed even when grown in the presence of 5% FBS. Even in 10% FBS, U87 forms spheres in our hands, although reducing the amount of serum used increases the formation of spheres. Less than 5% FBS without addition of growth factors restricted our cultures.

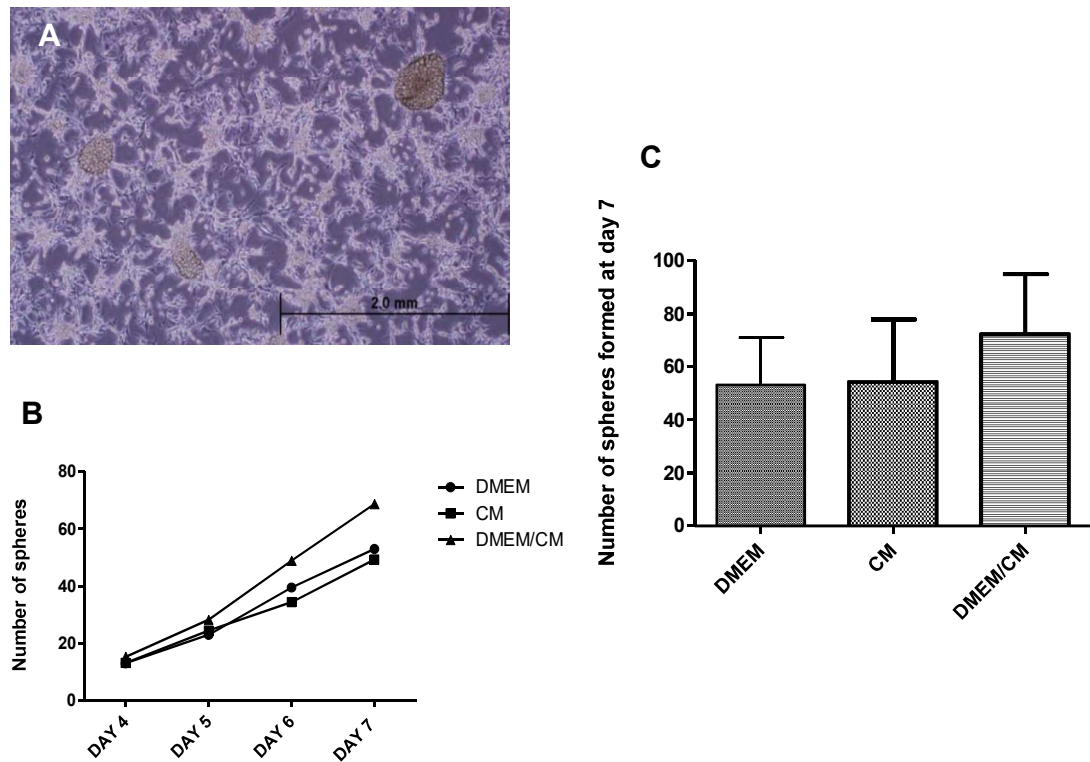


Figure 2. (A) Representative image of spheres in U87 cells cultured with 5% of FBS. **(B)** Number of spheres formed along treatment between 4th and 7th days. **(C)** Spherogenic assay showing the number of spheres formed at day 7 (last day) in control (DMEM) and treated cells. Results expressed as Mean±SEM. Statistical analysis by ANOVA (n=10). *p* values < 0.05 were considered significant. (CM: conditioned medium).

In order to investigate if factors released by hADSC could influence the capacity of GBM U87 cells to form spheres, we performed the sphere formation assay in the presence of CM of hADSCs. The quantification of spheres was performed during four days and analyzed in each day. There was no significant difference among groups, when comparing the amount of spheres formed in the different days (Fig. 2B). We noticed that cells treated with CM still maintain the same capacity to form spheres, as control cells (Fig. 2C). When cells were treated with CM diluted in DMEM, the results showed a tendency to form more spheres, even though there was no statistic significant difference (*p* 0.781).

Since long term treatments can affect proliferation, we corrected the total amount of spheres formed by the amount of cells at the end of the treatment by performing the MTT assay. With this correction we could evaluate the real effect of hADSC CM in the sphere

formation. Nevertheless, we observed that treatment did not interfere on U87 growth (p 0.619) and even after correction the number of spheres was still similar among the groups (Table 2).

Table 2. Number of spheres formed at day 7 in control (DMEM) and treated groups (CM; DMEM/CM) corrected by MTT. Values expressed as mean $\pm$ SEM.

Treatment	Number of spheres/MTT
DMEM	0,51 $\pm$ 0,2
CM	0,41 $\pm$ 0,2
DMEM/CM	0,54 $\pm$ 0,2

hADSC CM did not alter the expression of CSC markers

Further, still in the effort to analyze the effect of CM over glioma CSC population, we measured mRNA and protein expression of undifferentiation and pluripotency markers in tumor cells, by real-time PCR and flow cytometry, respectively (Figure 3).

U87 cells cultured in DMEM 5% FBS expressed stem markers in accordance with literature (Ledur et al 2012). The mRNA quantification of CSC markers by real-time PCR was in general equivalent in cells treated with hADSC CM, even diluted, when compared to control cells. Although there was a low tendency in cells treated with pure CM to enhance the expression of some markers like SOX2 and Nanog, this difference was not statistically significant (Fig. 3A). Further, when factors from CM were diluted in DMEM this tendency backs to normality, being almost the same as control cells.

The only CSC marker that showed difference in expression among groups was CD133, but this difference was between CM and DMEM/CM groups.

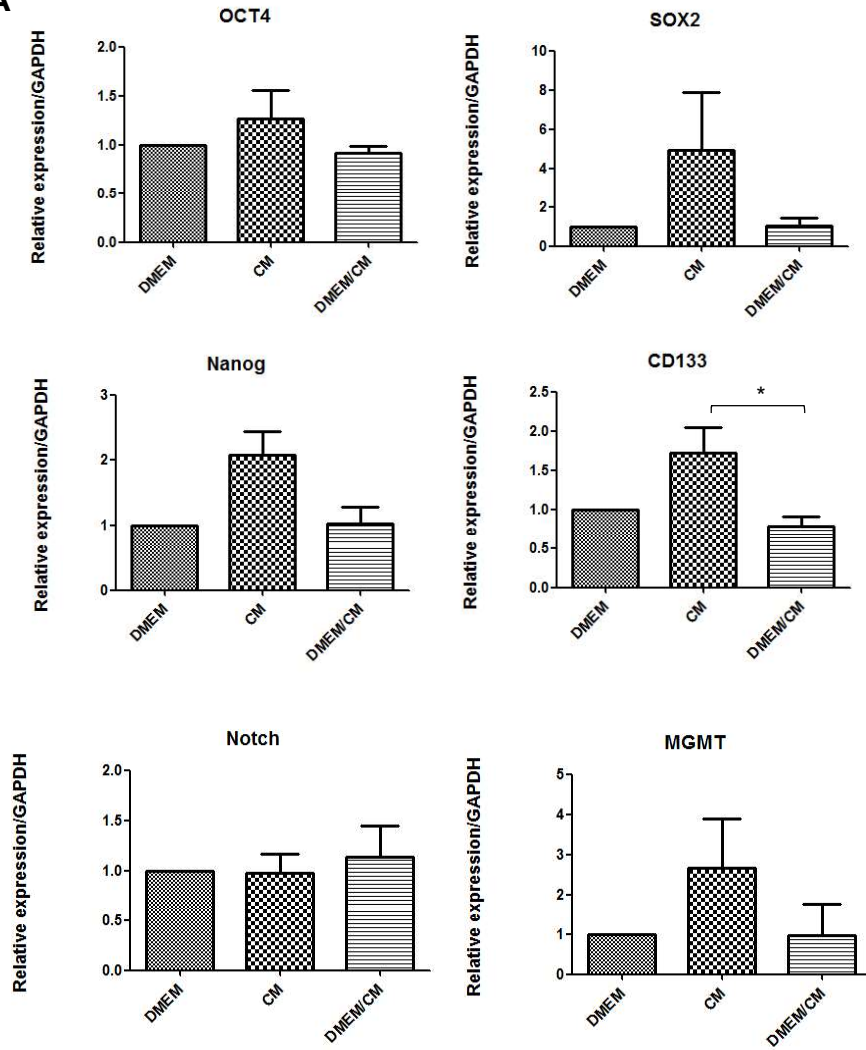
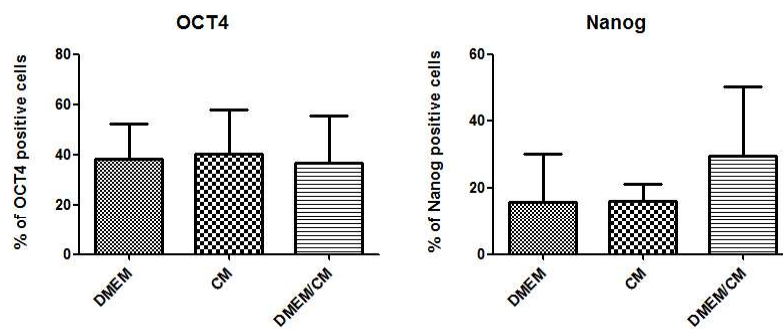
A**B**

Figure 3. (A) Relative expression of CSC markers in U87 cells in different treatments. OCT4, p 0.366; SOX2, p 0.251; Nanog, p 0.380; CD133, p 0.039; Notch, p 0.836; and MGMT, p 0.328. **(B)** OCT+ and Nanog+ cells among control and treated glioma cells. OCT4, p 0.988 and Nanog, p 0.761. Results expressed as Mean $\pm$ SEM. Statistical analysis by ANOVA (n=3). *p* values < 0.05 were considered significant. (CM: conditioned medium).

In order to confirm the data obtained by mRNA quantification of CSC markers, we performed the flow cytometry analysis of OCT4 and Nanog. These two markers were chosen among the others based on literature that describes the existence of multiple pseudogenes and isoforms for both of them (Schreiber, Kuch et al. 2013). Our results show that treatment with CM, pure or diluted in DMEM, did not contribute to alter the amount of cells that were positive for OCT and Nanog markers (Fig. 3B).

Autophagy analysis

Autophagy is a genetically programmed, evolutionarily conserved, process that leads to the degradation of organelles and proteins. It involves the formation of double-membrane vesicles, containing cellular components that merge to lysosomes, forming the autophagolysosome, where the components are degraded and the products generated are reused by the cell (Shintani, Mizushima et al. 1999; Baehrecke 2005). In this view, autophagy acts as a prosurvival mechanism, in order to protect cell against some stressful situation. However, this process has a clear self-limiting character and may lead to cell death when at high levels or duration (Levine and Yuan 2005).

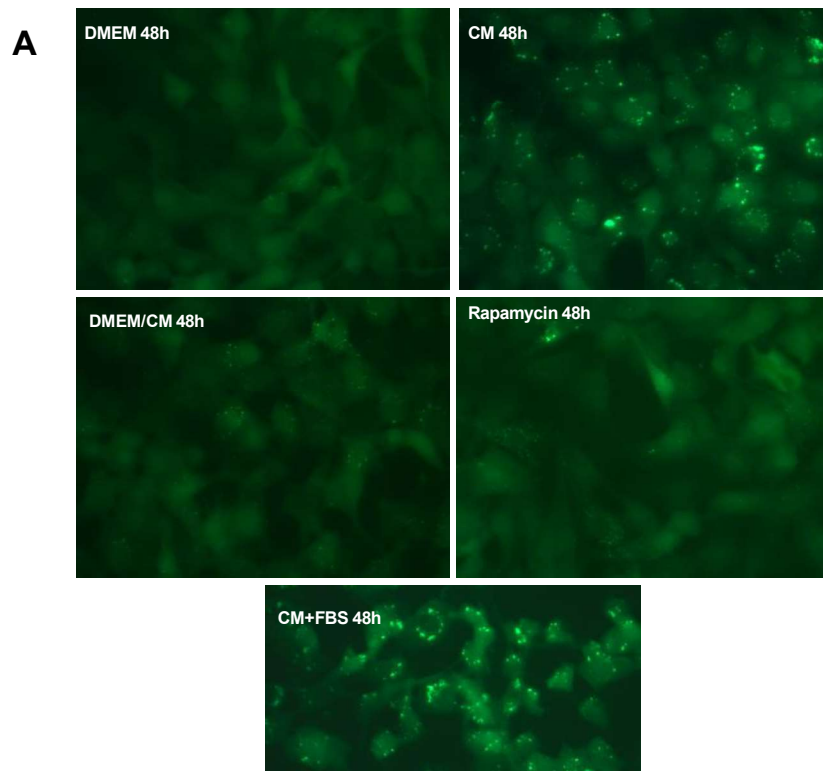
After observing that hADSC CM did not influence CSCs development in glioma U87 cells, we decided to analyze if hADSC CM would be capable to induce autophagy in U87 cells. We analyzed this parameter in two stages of the autophagic flux: autophagosome formation and autolysosome formation.

hADSC CM induces autophagosome formation in U87 glioma cells

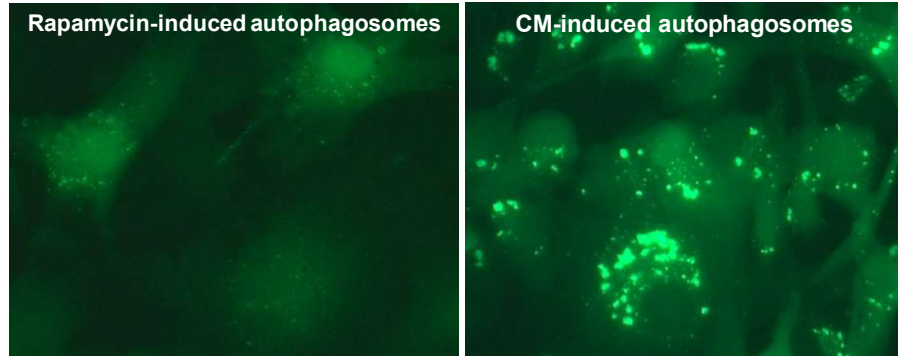
The first step of autophagy induction is the formation of autophagosomes in the cytosol. To analyze this first step, we treated U87 glioma cells in different groups, as previously described: DMEM control, CM, DMEM+CM, CM+FBS and Rapamycin positive control, for 24 and 48 hours. Then, we count cytosolic green dots formed in the cells in each treatment. As result, we observed that treatment of glioma cells with hADSC CM highly increased the percentage of cells with more than 5 LC3-GFP cytosolic dots, even when CM was diluted in DMEM (Fig. 4 A and C). Intriguingly, we also noticed that these autophagosomes induced by CM were different than those induced by Rapamycin in the positive control group. CM induced not just an increase in number of autophagosomes, but larger and more intense ones than rapamycin did (Fig 4 B),

both in 24 and 48 hours. 24 hours of treatment were enough to start inducing this autophagic effect in U87 glioma cells.

As we noticed that CM could highly induce autophagosome vesicles formation we wondered if this effect could be related with low FBS levels in this medium, instead of some other factor released by hADSCs. Thus, to eliminate this possibility we created another treatment group, CM + FBS, where cells in CM received additional 5% of FBS. The results showed that bovine serum did not contribute to the autophagy effect observed, since cells in this new group showed as many autophagosomes as cells in CM without FBS replacement (Fig. 4 A and C).



B



C

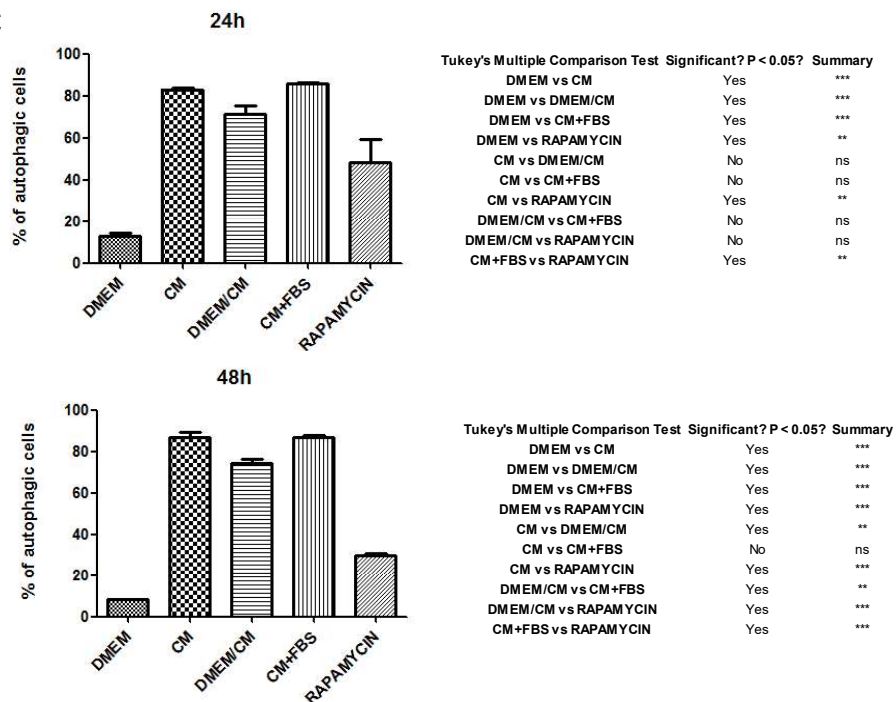


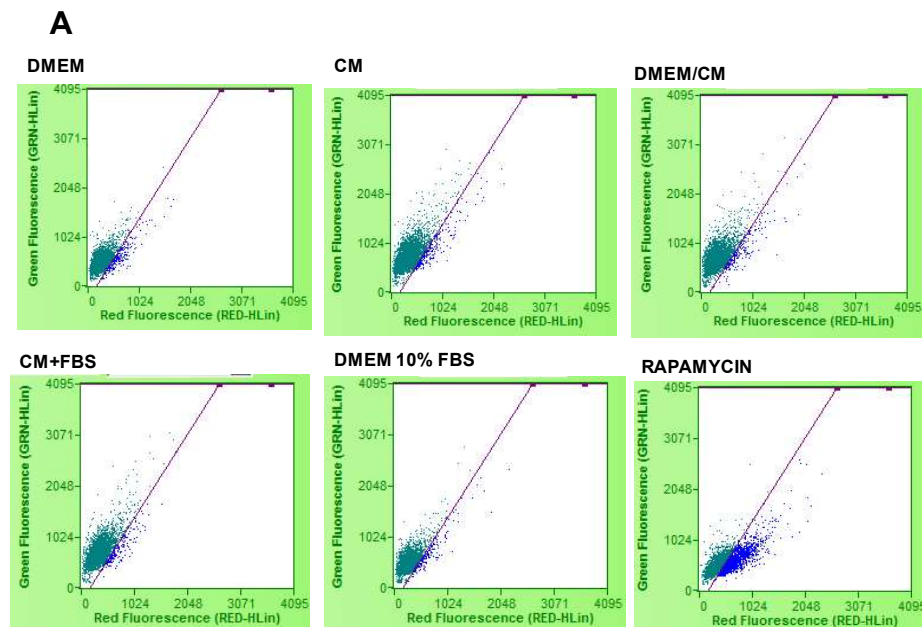
Figure 4. (A) LC3-GFP+ autophagosome vesicles in U87 glioma cells, in different treatments after 48 hours. **(B)** Different autophagosome vesicles induced by Rapamycin and hADSC CM, respectively. **(C)** Autophagic cells induced by different treatments during 24 and 48 hours. Results expressed as Mean±SEM. Statistical analysis by ANOVA (n=4). *p* values < 0.05 were considered significant. (CM: conditioned medium; FBS: fetal bovine serum; ns: non significant; ** *p* < 0.001; *** *p* < 0.0001).

As we observed, hADSC CM can induce autophagosome formation. However, when we intended to follow the autophagic flux by the analysis of autolysosome formation, we surprisingly found that autolysosomes were not increased in CM treatment through AO staining. Acidic vesicular organelles were not different in control and treated groups even in 24 and 48 hours, except for positive control group of cells treated with Rapamycin (Fig. 5). Further, CM is not responsible for cytotoxicity in 24 hours, since the number of cells was not different among groups. However, in 48 hours treatment, there were fewer cells in CM treatment than in control group DMEM (Table 3) (Fig. 5).

Table 3. Percentage of acridine orange+ U87 glioma cells in different treatments. Values expressed as mean $\pm$ SEM.

% of AO ⁺ cells + SEM		
	24h	48h
DMEM	6,2 $\pm$ 0,8	5,1 $\pm$ 0,3
CM	4,2 $\pm$ 0,5	6,9 $\pm$ 0,8
DMEM/CM	4,2 $\pm$ 0,9	3,7 $\pm$ 0,4
CM+FBS	3,7 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 0,7
RAPAMYCIN	35,9 $\pm$ 5,7 ***	43,6 $\pm$ 0,8 ***

All groups differed from Rapamycin group with a p value $< 0.0001^{***}$. Results expressed as Mean $\pm$ SEM. Statistical analysis by ANOVA (n=4). (CM: conditioned medium; FBS: fetal bovine serum; SEM: standard error of the mean).



B

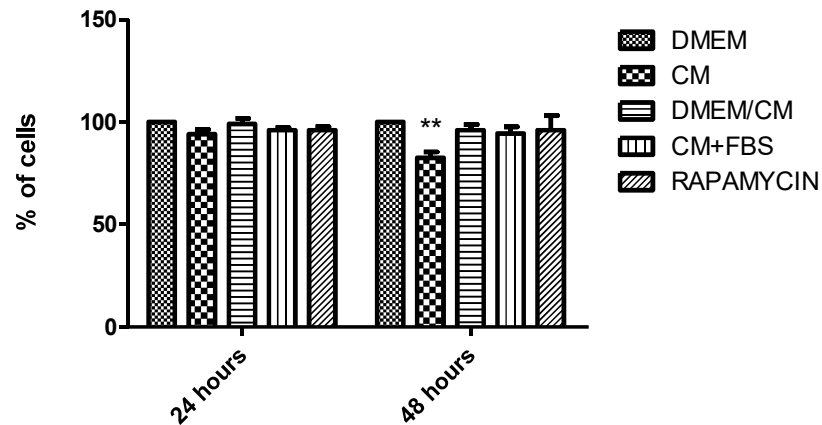


Figure 5. (A) Flow cytometry measurement of acidic vesicular organelles (AVOs) by acridine orange staining, representing autophagic activity 48 hours after exposure to respective treatments as indicated. Red fluorescence indicates autolysosome formation. **(B)** Number of cells in each treatment. 24h, p 0.150; 48h, p 0.002** (DMEM x CM). Results expressed as Mean $\pm$ SEM. Statistical analysis by ANOVA ($n=4$). p values < 0.05 were considered significant. (CM: conditioned medium; FBS: fetal bovine serum).

DISCUSSION

The MSCs home in the tumor and, together with other cells, form tumor stroma. One of the major concerns involving stem cell therapy is that it is not well known what happens with genetically modified stem cells that get to tumor site. One alternative to investigate these interactions is to analyze what happens with tumor cells exposed to stem cell released factors. So our first step in this idea was to treat glioma cells with the conditioned medium of hADSCs *in vitro*, to after starts investigating this relationship *in vivo*.

Cultures of brain tumors can be enriched for tumor cells with characteristics of stem cells by serum-free cultivation. Furthermore, the specific culture medium for CSC's growth is normally supplemented with epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor (FGF). Such factors are included in the medium to support the growth of CSCs, inhibit spontaneous differentiation and help keeping the genotypic similarity of these cells with parental primary tumors (Dirks 2008). However, the presence of strong pro-proliferative signals can eventually lead to selection of cells having high levels of receptors (such as receptor for EGF-EGFR) or abnormal sensitivity to growth factors. The need for growth factors in the culture medium of these cells has generated some concern regarding biases in culture, and how this could change data collection *in vitro*. It is not yet fully understood the long-term effect that these factors may have on GSCs in culture (Heddlestone, Hitomi et al. 2011). Therefore, in our work, all cultures were grown in the presence of 5% FBS and without addition of growth factors. Less than 5% of FBS restricted our cultures.

It was already proposed that MSCs in contact with tumor cells may generate secondary malignancies (Pike-Overzet, van der Burg et al. 2007) or in some way contribute to the tumor development (Fomchenko and Holland 2005; Sanai, Alvarez-Buylla et al. 2005; Vescovi, Galli et al. 2006). This concern is an area of heavy research in many laboratories, including ours. Following this idea, Behnan et al. (2013) recently showed that brain tumors can recruit MSCs from the host and that these recruited cells enhanced glioma cell proliferation and are related with tumor progression (Behnan, Isakson et al. 2013). Furthermore, to our surprise, this influence of MSCs in gliomas was observed even without cell-cell direct contact. Liu et al. (2012) showed that rat bone marrow mesenchymal stem cells can undergo malignant transformation, via indirect co-culture with tumor cells for 7 days, suggesting that MSCs could be highly modulated by tumor microenvironment (Liu, Zhang et al. 2012).

Among tumor cells, the CSCs population is also involved in complex mechanisms driven by their microenvironment, where the niche is one of the key players (Ye, Wu et al. 2014). In this context, we decided to analyze hADSC microenvironment effect over glioma CSC population, since it has been known their potential to maintain tumor growth. In our hands, hADSC CM did not alter CSC amount and characteristics in glioma U87 cells. Nishimura et al. observed that naïve MSCs can enhance the proportion of CSCs in tumor cell populations. They showed that co-culturing gastric cancer cell lines with MSCs caused an increase in the proportion of CD133-positive gastric cancer cells (Nishimura, Semba et al. 2012). In addition, the direct contact of gastric cancer cells and MSCs, altered the gene expression of epithelial, mesenchymal and CSC markers in tumor population. However, when they treated gastric cancer cells with conditioned medium, obtained from bone-marrow stem cells, this effect was not observed. Taken together, these results can point for different effects of stem cells direct contact or their released factors on tumor characteristics.

The sphere forming capacity of U87 glioma cells was not influenced by CM when compared to control cells, even when values were corrected by cell viability. There are some studies showing factors that can influence sphere forming capacity of tumor cells. Among these factors is the CSC marker Nanog (Zbinden, Duquet et al. 2010). Noh et al. (2012) observed that Nanog is closely related with tumor sphere formation. They showed that siNanog-treated cells proliferated more slowly and formed over 3-times fewer spheres than control group. Further, siNanog cells reduced by over 2-fold the frequency of CD133+ cells (Noh, Kim et al. 2012). However, in our analysis, neither by PCR nor by flow cytometry, we found altered expression of Nanog marker in gliomas treated with hADSC CM. Also, CD133 mRNA expression was not different among treated groups and control.

Another factor that seems to be related with sphere formation is SOX2 (Liang, Furuhashi et al. 2013). Nevertheless, our results show that mRNA of this marker was not altered by CM too. OCT4 mRNA expression was also tested via PCR and flow cytometry analysis and,

in accordance with other markers, its expression was not influenced by hADSC CM. Also, it was already suggested that aberrant activation of developmental pathways in CSCs, including Notch pathway, may also contribute to CSCs therapy resistance (Fan, Matsui et al. 2006; Shih and Holland 2006). However, in our analysis, CM did not influence Notch expression either.

Moreover, there is evidence in literature showing that the expression of multidrugresistance genes is enhanced in GBM CSCs (Salmaggi, Boiardi et al. 2006). However, interestingly, Fouse et al. (2013) recently showed that primary glioblastoma cells response to therapy, depends on CSC phenotype. They showed that response to temozolomide in patients with this kind of tumor was tightly linked to the individual tumor's MGMT status (Fouse, Nakamura et al. 2014). Regarding this view, our results also showed that CM did not alter the expression of resistance gene MGMT. Therefore, this is one more argument favoring the idea of safety in the use of stem cells for anti-cancer therapies.

Thus, these results led us to observe that hADSCs released factors were not capable to influence glioma CSC development. Hall et al. pointed out that many of these studies that have shown MSCs to possess tumorigenic properties, used extensively passaged and/or genetically altered MSCs (Hall, Dembinski et al. 2007). In addition, there are other studies either suggesting that unmodified endogenous MSCs may also have a natural ability to suppress tumor growth (Benedetti, Pirola et al. 2000).

When we evaluated the effect of hADSC CM over glioma U87 cell viability by MTT method we observed no influence of CM on this parameter. However, when we count cells treated for 24 and 48 hours with CM for the AO analysis, we found that, in 48 hours treatment, CM was capable of reducing significantly cell number. This effect was not observed for the other groups, even in CM diluted group. In accordance, Suzuki et al. (2005) showed that neural stem/progenitor cells conditioned medium reduced glioma cell proliferation in vitro and in vivo and even observed that the inhibitory activity was CM concentration-dependent (Suzuki, Izumoto et al. 2005). Glass et al. (2005) also reported that coculturing precursors with GBM cells led to an abrogation of the normally rapid increase in total cell number of these tumors and strongly induced tumor cell apoptosis (Glass, Synowitz et al. 2005).

Marcucci et al. proposed that tumor cells can respond to a stressor undergoing three possibilities: acquisition of a malignant phenotype, being autophagic or undergoing cell death (Marcucci, Bellone et al. 2013). The choice of tumor cells for one of these ways will depend, among other factors, on intensity and duration of the stimulus that these cells are receiving.

Regarding this concern, we decided to analyze CM influence over autophagy in glioma U87 cells. Surprisingly, we observed that U87 cells treated with hADSC CM for 24h showed on average five fold more autophagic cells than control group. This difference reached 12 fold in 48 hours of treatment. When CM was diluted in DMEM, this difference was quite the same. For the group where FBS was added to CM, this large difference from control cells was still maintained, proving that the autophagic induction was not a result from lower levels of serum in culture medium. It is also interesting to observe that Rapamycin positive control group presented just three fold more autophagic cells than control group in 24h, and four fold in 48 hours.

What get us even more intrigued was that CM induced autophagosome vesicles that were quite different from Rapamycin-induced autophagosomes. CM induced larger and more intense vesicles than Rapamycin did. A previous study from Zhang et al. (2007) showed that cells treated with different compounds exhibited distinct characteristics in the morphology and intracellular distributions of autophagosomes as marked by the size, intensity, and distribution of LC3-GFP+ vesicles. They analyzed autophagy induction in H4 GBM cell line by different compounds, and then classified those that may have a more profound effect on the surface area and intensity of an individual LC3-GFP+ vesicle as type1 compounds (Zhang, Yu et al. 2007). However, there is no additional information about different types of autophagosome in literature.

All these results lead us to wonder which factors released by hADSCs are capable to induce autophagy and, mainly, what are the consequences that would follow this induction. Recently, Shin et al. (2014) observed that MSC can enhance autophagy in an Alzheimer disease model to protect neurons against β -amyloid peptide accumulation and toxicity (Shin, Park et al. 2014). Zhang et al. also demonstrated that hMSCs enhanced autophagy of lung carcinoma cells against apoptosis during serum deprivation (Zhang, Hu et al. 2013). Additionally, Song et al. observed that autophagy contributes to the survival of CD133+ liver CSCs in the hypoxic and nutrient-deprived tumor microenvironment. Therefore, autophagy is essential for liver CSCs maintenance (Song, Zhang et al. 2013).

This information brings out the possibility that hADSC CM presents some unknown stressor to glioma cells and that undergoing autophagy is one way to help protecting these cells from this stressor. Thus, this effect could contribute to survival of cancer cells. However, we observed in our analysis that although hADSC CM has increased autophagosome formation, this autophagic flux seems to stop in autolysosome formation. Acridine orange analysis showed that just Rapamycin group had increased autolysosome formation comparing with control and treated groups.

There are some studies showing that when the autophagic flux is impaired, cells become more sensitive to stressors and can also undergo cell death. Pennati et al. recently showed that miR-205 impairs the autophagic flux and therefore enhances cisplatin cytotoxicity in prostate cancer cells (Pennati, Lopercolo et al. 2014). Accordingly, chemoprevention of prostate cancer by D,L Sulforaphane was augmented by pharmacological inhibition of autophagy with chloroquine (Vyas, Hahm et al. 2013). Therefore, another possibility for the observed effects is that hADSC CM not only presents some stressor to glioma cells but, besides this, also presents some factor that blocks autolysosome formation. In this second possibility, the effect induced by CM would be harmful for the tumor.

In order to verify which of these two possibilities is happening with glioma cells we need to prolong treatments with CM and observe cell viability. Moreover, additional tests are necessary to assess if GFP-LC3 structures are, indeed, autophagosomes, as well as measure autophagic flux. In this sense, evaluation of LC3 I/II conversion and p62 levels may give fundamental insights to confirm CM-induced autophagy. Further, it is necessary to co-treat cells

exposed to CM with autophagy inhibitors (like 3-methyladenin or wortmannin) or activators (like rapamycin), to assess if CM-induced autophagy exerts a prosurvival or a cytotoxic role (Fig.6).

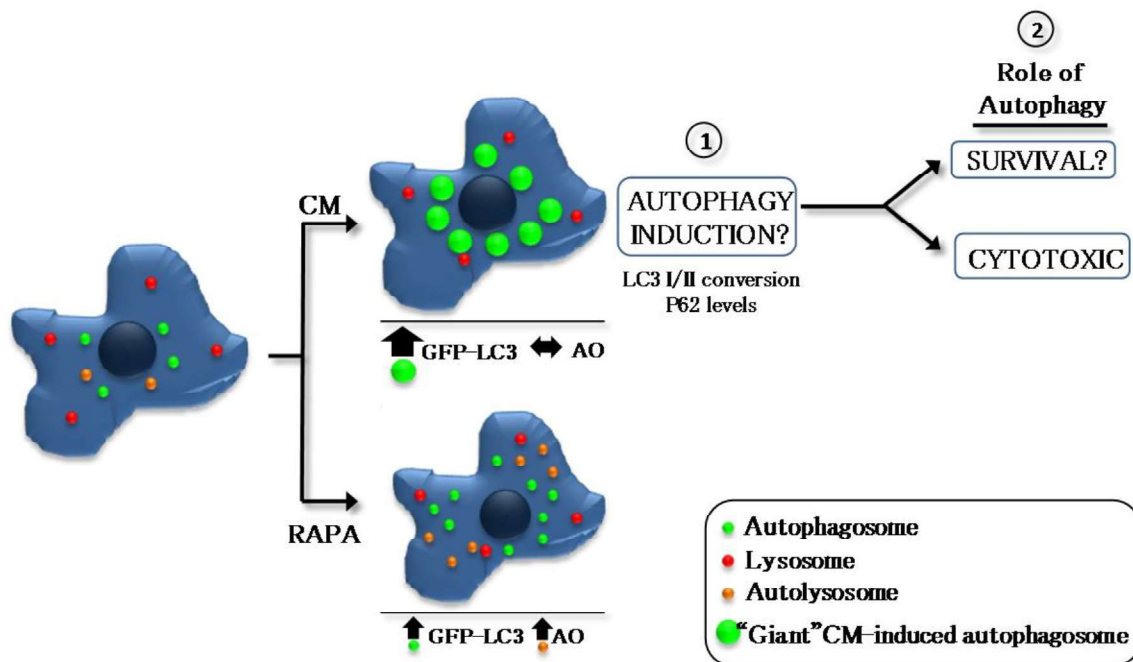


Figure 6. Illustrative scheme of hADSC CM-induced autophagy. (CM: conditioned medium; RAPA: rapamycin; AO: acridine orange).

CONCLUSION

In summary our results demonstrate that factors released by hADSCs in their conditioned medium have no apparent influence over glioma CSC development *in vitro*, as revealed by analysis of sphere forming capacity and expression of CSC markers.

However, hADSC CM has a highly capacity to induce autophagosome formation in U87 glioma cells, as verified by LC3GFP+ vesicles formed in cell cytoplasm. Nevertheless, autophagy flux seems to be interrupted by some of the factors that compound this CM. The main doubt now is whether this CM-autophagy induction has a role in cell survival or could lead glioma cells to death by cytotoxicity. As we discussed above, more analysis have to be done in order to get this answer. Nevertheless, if it is confirmed that hADSC CM is capable to induce cytotoxic autophagy in gliomas, and, furthermore, knowing that the same CM do not influence CSC development, we can propose that engineering the environment of hADSCs to develop new strategies against cancer cells may be a simple approach for improving current therapies.

These are very important results that will contribute with the understanding of how tumors and stem cells interact with one another, and how these interactions can be utilized from a therapeutic standpoint to gliomas.

ACKNOWLEDGEMENTS - Giovana Onzi was recipient of a Master fellowship from CAPES (Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior); Marcia R. Wink and Guido Lenz are recipients of research fellowship from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). This study was supported by FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul), CNPq and PROBITEC-CAPES.

REFERENCES

- Baehrecke, E. H. (2005). "Autophagy: dual roles in life and death?" Nat Rev Mol Cell Biol **6**(6): 505-510.
- Bao, S., Q. Wu, et al. (2006). "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response." Nature **444**(7120): 756-760.
- Behnan, J., P. Isakson, et al. (2013). "Recruited brain tumor-derived mesenchymal stem cells contribute to brain tumor progression." Stem Cells.
- Benedetti, S., B. Pirola, et al. (2000). "Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells." Nat Med **6**(4): 447-450.
- Choi, S. A., J. Y. Lee, et al. (2012). "Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: characteristics and therapeutic potential as cellular vehicles for prodrug gene therapy against brainstem gliomas." Eur J Cancer **48**(1): 129-137.
- da Silva Meirelles, L., P. C. Chagastelles, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues." J Cell Sci **119**(Pt 11): 2204-2213.
- Demuth, T. and M. E. Berens (2004). "Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion." J Neurooncol **70**(2): 217-228.
- Diamandis, P., J. Wildenhain, et al. (2007). "Chemical genetics reveals a complex functional ground state of neural stem cells." Nat Chem Biol **3**(5): 268-273.
- Diehn, M., R. W. Cho, et al. (2009). "Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells." Nature **458**(7239): 780-783.
- Dirks, P. B. (2008). "Brain tumor stem cells: bringing order to the chaos of brain cancer." J Clin Oncol **26**(17): 2916-2924.
- Fan, X., W. Matsui, et al. (2006). "Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors." Cancer Res **66**(15): 7445-7452.
- Flores, D. G., P. F. Ledur, et al. (2009). "Cancer stem cells and the biology of brain tumors." Curr Stem Cell Res Ther **4**(4): 306-313.
- Fomchenko, E. I. and E. C. Holland (2005). "Stem cells and brain cancer." Exp Cell Res **306**(2): 323-329.

- Fouse, S. D., J. L. Nakamura, et al. (2014). "Response of primary glioblastoma cells to therapy is patient specific and independent of cancer stem cell phenotype." Neuro Oncol **16**(3): 361-371.
- Glass, R., M. Synowitz, et al. (2005). "Glioblastoma-induced attraction of endogenous neural precursor cells is associated with improved survival." J Neurosci **25**(10): 2637-2646.
- Hall, B., J. Dembinski, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells in cancer: tumor-associated fibroblasts and cell-based delivery vehicles." Int J Hematol **86**(1): 8-16.
- Heddleston, J. M., M. Hitomi, et al. (2011). "Glioma stem cell maintenance: the role of the microenvironment." Curr Pharm Des **17**(23): 2386-2401.
- Horn, A. P., R. L. Frozza, et al. (2009). "Conditioned medium from mesenchymal stem cells induces cell death in organotypic cultures of rat hippocampus and aggravates lesion in a model of oxygen and glucose deprivation." Neurosci Res **63**(1): 35-41.
- Houghton, J., C. Stoicov, et al. (2004). "Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells." Science **306**(5701): 1568-1571.
- Jiang, H., E. J. White, et al. (2009). "Autophagy pathways in glioblastoma." Methods Enzymol **453**: 273-286.
- Kabeya, Y., N. Mizushima, et al. (2000). "LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing." EMBO J **19**(21): 5720-5728.
- Karnoub, A. E., A. B. Dash, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis." Nature **449**(7162): 557-563.
- Klionsky, D. J., H. Abeliovich, et al. (2008). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes." Autophagy **4**(2): 151-175.
- Klopp, A. H., A. Gupta, et al. (2011). "Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth?" Stem Cells **29**(1): 11-19.
- Kopen, G. C., D. J. Prockop, et al. (1999). "Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(19): 10711-10716.
- Ledur, P. F., E. S. Villodre, et al. (2012). "Extracellular ATP reduces tumor sphere growth and cancer stem cell population in glioblastoma cells." Purinergic Signal **8**(1): 39-48.
- Lenz, G. (2010). "Transient oncogenes." Med Hypotheses **75**(6): 660-662.
- Levine, B. and J. Yuan (2005). "Autophagy in cell death: an innocent convict?" J Clin Invest **115**(10): 2679-2688.
- Liang, S., M. Furuhashi, et al. (2013). "Isolation and characterization of human breast cancer cells with SOX2 promoter activity." Biochem Biophys Res Commun **437**(2): 205-211.
- Liu, J., Y. Zhang, et al. (2012). "Rat bone marrow mesenchymal stem cells undergo malignant transformation via indirect co-cultured with tumour cells." Cell Biochem Funct **30**(8): 650-656.

- Marcucci, F., M. Bellone, et al. (2013). "Pushing tumor cells towards a malignant phenotype: Stimuli from the microenvironment, intercellular communications and alternative roads." Int J Cancer.
- Meirelles Lda, S. and N. B. Nardi (2003). "Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization." Br J Haematol **123**(4): 702-711.
- Meirelles Lda, S. and N. B. Nardi (2009). "Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells." Front Biosci (Landmark Ed) **14**: 4281-4298.
- Nakamizo, A., F. Marini, et al. (2005). "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas." Cancer Res **65**(8): 3307-3318.
- Noh, K. H., B. W. Kim, et al. (2012). "Nanog signaling in cancer promotes stem-like phenotype and immune evasion." J Clin Invest **122**(11): 4077-4093.
- Nora, C. C., M. Camassola, et al. (2012). "Molecular analysis of the differentiation potential of murine mesenchymal stem cells from tissues of endodermal or mesodermal origin." Stem Cells Dev **21**(10): 1761-1768.
- Pattingre, S., A. Tassa, et al. (2005). "Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy." Cell **122**(6): 927-939.
- Pennati, M., A. Lopercolo, et al. (2014). "miR-205 impairs the autophagic flux and enhances cisplatin cytotoxicity in castration-resistant prostate cancer cells." Biochem Pharmacol **87**(4): 579-597.
- Pike-Overzet, K., M. van der Burg, et al. (2007). "New insights and unresolved issues regarding insertional mutagenesis in X-linked SCID gene therapy." Mol Ther **15**(11): 1910-1916.
- Pisati, F., M. Belicchi, et al. (2007). "Effect of human skin-derived stem cells on vessel architecture, tumor growth, and tumor invasion in brain tumor animal models." Cancer Res **67**(7): 3054-3063.
- Porada, C. D. and G. Almeida-Porada (2010). "Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery." Adv Drug Deliv Rev **62**(12): 1156-1166.
- Qiang, L., Y. Yang, et al. (2009). "Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines." Cancer Lett **279**(1): 13-21.
- Salmaggi, A., A. Boiardi, et al. (2006). "Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype." Glia **54**(8): 850-860.
- Sanaï, N., A. Alvarez-Buylla, et al. (2005). "Neural stem cells and the origin of gliomas." N Engl J Med **353**(8): 811-822.
- Schreiber, C., V. Kuch, et al. (2013). "Autochthonous mouse melanoma and mammary tumors do not express the pluripotency genes Oct4 and Nanog." PLoS One **8**(2): e57465.
- Shih, A. H. and E. C. Holland (2006). "Notch signaling enhances nestin expression in gliomas." Neoplasia **8**(12): 1072-1082.
- Shin, J. Y., H. J. Park, et al. (2014). "Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase beta-amyloid clearance in Alzheimer disease models." Autophagy **10**(1): 32-44.

- Shintani, T., N. Mizushima, et al. (1999). "Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast." EMBO J **18**(19): 5234-5241.
- Song, Y. J., S. S. Zhang, et al. (2013). "Autophagy contributes to the survival of CD133+ liver cancer stem cells in the hypoxic and nutrient-deprived tumor microenvironment." Cancer Lett **339**(1): 70-81.
- Suzuki, T., S. Izumoto, et al. (2005). "Inhibition of glioma cell proliferation by neural stem cell factor." J Neurooncol **74**(3): 233-239.
- Sze, S. K., D. P. de Kleijn, et al. (2007). "Elucidating the secretion proteome of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells." Mol Cell Proteomics **6**(10): 1680-1689.
- Uchida, N., D. W. Buck, et al. (2000). "Direct isolation of human central nervous system stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14720-14725.
- Vescovi, A. L., R. Galli, et al. (2006). "Brain tumour stem cells." Nat Rev Cancer **6**(6): 425-436.
- Vlashi, E., K. Kim, et al. (2009). "In vivo imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells." J Natl Cancer Inst **101**(5): 350-359.
- Vyas, A. R., E. R. Hahm, et al. (2013). "Chemoprevention of prostate cancer by d,l-sulforaphane is augmented by pharmacological inhibition of autophagy." Cancer Res **73**(19): 5985-5995.
- Ye, J., D. Wu, et al. (2014). "The cancer stem cell niche: cross talk between cancer stem cells and their microenvironment." Tumour Biol.
- Yew, T. L., Y. T. Hung, et al. (2011). "Enhancement of wound healing by human multipotent stromal cell conditioned medium: the paracrine factors and p38 MAPK activation." Cell Transplant **20**(5): 693-706.
- Yong, R. L., N. Shinojima, et al. (2009). "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas." Cancer Res **69**(23): 8932-8940.
- Yu, S. C., Y. F. Ping, et al. (2008). "Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87." Cancer Lett **265**(1): 124-134.
- Zbinden, M., A. Duquet, et al. (2010). "NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53." EMBO J **29**(15): 2659-2674.
- Zhang, L., J. Yu, et al. (2007). "Small molecule regulators of autophagy identified by an image-based high-throughput screen." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(48): 19023-19028.
- Zhang, M. H., Y. D. Hu, et al. (2013). "Human mesenchymal stem cells enhance autophagy of lung carcinoma cells against apoptosis during serum deprivation." Int J Oncol **42**(4): 1390-1398.
- Zuk, P. A., M. Zhu, et al. (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." Tissue Eng **7**(2): 211-228.

Apêndice A

Influência das células tronco mesenquimais na expressão de enzimas degradadoras de nucleotídeos em gliomas

Este apêndice refere-se a experimentos preliminares que estão sendo executados em paralelo em nosso laboratório. Esse trabalho trata da investigação do sistema purinérgico em gliomas, modulado pelas células tronco mesenquimais.

1. Introdução

1.1 O Sistema Purinérgico

Purinas e pirimidinas extracelulares são liberadas via exocitose ou pela lise celular. Essas moléculas são importantes agentes sinalizadores que atuam em diferentes tipos de células para mediar diversos efeitos biológicos. Entre eles, atuar em sinalizações rápidas envolvidas em neurotransmissões e, também, modulando eventos da biologia celular e tecidual como proliferação celular, diferenciação, apoptose, regeneração e reparo tecidual, câncer e envelhecimento (Burnstock 2009). Os nucleotídeos e nucleosídeos são reconhecidos pelas células quando se ligam a receptores transmembrana específicos, regulando, assim, funções fisiopatológicas em diversos tecidos do corpo. Tais receptores transmembrana são divididos em tipo P1, os quais respondem principalmente à adenosina e que são subdivididos em quatro subtipos - A1, A2a, A2b e A3 -, e receptores do tipo P2, os quais são divididos, segundo critérios funcionais, em dois grupos distintos: ionotrópicos (P2X) e metabotrópicos (P2Y) (Ralevic and Burnstock 1998; White and Burnstock 2006).

1.1.1 Ectonucleotidases

Como qualquer sistema transmissor, o sistema purinérgico possui um mecanismo de degradação e recaptação das purinas ou pirimidinas liberadas no espaço extracelular, a fim de controlar a concentração das mesmas. Os nucleotídeos são degradados até seus nucleosídeos pela ação conjunta das ectonucleotidases, ectoenzimas que estão presentes na superfície extracelular da membrana plasmática. Dentre essas ecto-enzimas encontram-se: NTPDases (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase), NPPs (ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase), ecto-fosfatase alcalina e ecto-5'-nucleotidase/CD73, cada uma com diferentes afinidades para purinas e pirimidinas (Burnstock and Williams 2000; Zimmermann 2000; Bodin and Burnstock 2001; Elizandra Braganhol 2011).

1.1.2 NTPDases

Até o momento, em mamíferos, existem pelo menos oito enzimas relacionadas e homólogas, provenientes de oito diferentes genes que codificam membros da família das NTPDases: NTPDase1 (CD39, ATPDase, ecto-apirase ou ecto-ATP difosfohidrolase), NTPDase2 (CD39L1, ecto- ATPase) , NTPDase3 (CD39L3, HB6), NTPDase4 (UDPase, LALP70) , NTPDase5 (CD39L4, ER- UDPase, PCPH), NTPDase6 (CD39L2), NTPDase7 (LALP1) e NTPDase8 (Zimmermann 2001; Robson, Seigny et al. 2006).

Dentre essas enzimas, quatro encontram-se localizadas na superfície celular com o sítio catalítico voltado para o lado extracelular (NTPDase1, 2, 3, 8). As demais (NTPDases de 4

a 7) são inteiramente intracelulares, estando ancoradas por um (NTPDase5 e 6) ou dois (NTPDase4 e 7) domínios transmembrana na superfície de organelas citoplasmáticas. As NTPDases5 e 6 estão localizadas no retículo endoplasmático e no complexo de golgi, respectivamente. Porém, acredita-se que após expressão heteróloga estas enzimas possam ser liberadas da membrana e serem então secretadas para o meio extracelular, indicando tratar-se de enzimas na forma solúvel (Kukulski, Levesque et al. 2005; Robson, Seigny et al. 2006).

As NTPDases hidrolisam uma variedade de nucleotídeos trifosfatados (ex. ATP e UTP) e difosfatados (ex. ADP e UDP), com diferenças preferenciais por substratos e exclusivamente na presença de cátions divalentes (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) na concentração de millimolar (Figura 1). Essas enzimas, no entanto, não são capazes de degradar nucleotídeos monofosfatados (Zimmermann 2000; Kukulski, Levesque et al. 2005).

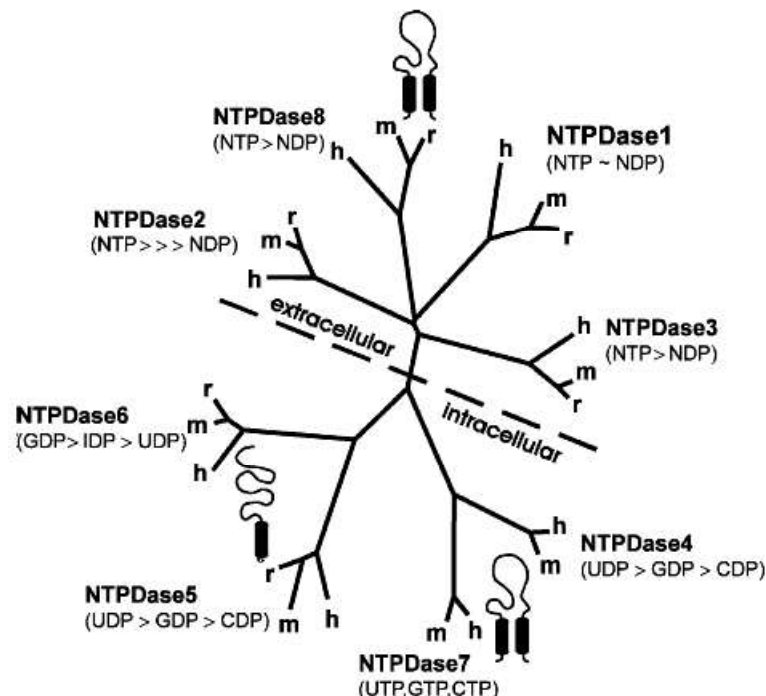


Figura 1. Árvore filogenética hipotética dos membros da família das NTPDases, presentes em rato (r), humanos (h) e camundongos (m), segundo a sequência gênica de aminoácidos de cada uma. O comprimento da linha indica a diferença entre as sequências de aminoácidos. Ainda, o esquema diferencia as NTPDases localizadas na superfície celular e no meio intracelular. Por fim, ainda é demonstrada a preferência de substrato de cada uma das enzimas e se as mesmas apresentam um ou dois domínios transmembrana. Adaptado de (Robson, Seigny et al. 2006).

1.1.3 NPPs

Os membros da família Ecto-NPP possuem uma ampla distribuição tecidual e incluem as enzimas NPP1, NPP2 e NPP3. Todos os membros são ligados à membrana por um único domínio transmembrana e apresentam um domínio para clivagem proteolítica, sugerindo que possam ocorrer como enzimas solúveis (Zimmermann 1999; Zimmermann 2001). Essas enzimas apresentam atividade de fosfodiesterase alcalina bem como atividade nucleotídeo pirofosfatase, hidrolisando uma grande variedade de substratos, entre eles purinas e pirimidinas.

Essas enzimas têm uma ampla especificidade ao substrato, o que pode refletir no seu papel em vários processos fisiológicos e bioquímicos (Goding, Grobbs et al. 2003). O desenvolvimento do camundongo deficiente em NPP1 sugere que pela produção de Ppi a enzima desempenhe um papel essencial no controle da mineralização óssea. A NPP2 é abundantemente expressa em cérebro e uma forma de splice é expressa em oligodendrócitos, podendo ser envolvida na produção de mielina ou na diferenciação do oligodendrócito. Possui também uma atividade estimulante de motilidade em diversas linhagens tumorais (Lee, Clair et al. 1996). NPP3 é expressa em um conjunto de células gliais imaturas e sua superexpressão induz o aparecimento dos marcadores de astrócitos (Andoh, Piao et al. 1999).

1.1.4 Ecto-5'nucleotidase/CD73

A hidrólise de nucleotídeos é encerrada pela ação da ecto-5'-nucleotidase/CD73, a qual hidrolisa nucleosídeos monofosfato extracelulares aos seus respectivos nucleosídeos, sendo que o AMP é considerado o principal substrato fisiológico dessa enzima. A ecto-5'-nucleotidase/CD73 encontra-se amplamente distribuída, ancorada à superfície externa da membrana plasmática através de uma ligação glicosilfosfatidilinositol (GPI), tendo seu sítio catalítico voltado para o espaço extracelular (Bavaresco, Bernardi et al. 2008). O ancoramento da enzima pode ser clivado por uma fosfolipase C específica para GPI, dando origem às formas solúveis da enzima.

Estudos recentes também têm mostrado o papel da CD73 no controle de diversas respostas fisiológicas do organismo, incluindo o transporte de fluido e eletrólitos, injúrias teciduais, função plaquetária, hipóxia, entre outros (Zhang 2010).

A adenosina gerada a partir da desfosforilação do AMP, por sua vez, pode ser recaptada por transportadores, sendo esse processo caracterizado como a principal fonte enzimática de adenosina extracelular (Baldwin, Mackey et al. 1999). Além da ecto-5'-nucleotidase/CD73, a adenosina deaminase (ADA), a qual converte adenosina em inosina, também é uma enzima fundamental no controle da concentração de adenosina presente no meio extracelular (Robson, Sevigny et al. 2006).

1.2 O Sistema Purinérgico e os Gliomas

Entre as alterações patológicas que tornam as células tumorais potencialmente invasivas, a sinalização purinérgica tem emergido como um componente importante. Em estudos prévios do nosso grupo, foi demonstrado que linhagens de gliomas humano e de rato apresentam um catabolismo extracelular de ATP e ADP diminuído, quando comparado com astrócitos (Wink, Braganhol et al. 2003; Wink, Lenz et al. 2003), potencialmente levando ao acúmulo de ATP na superfície tumoral. Por sua vez, a exposição crônica de células de glioma C6 ao ATP, por exemplo, já mostrou aumentar a liberação de fatores pró-inflamatórios e de fator de crescimento endotelial vascular (Stagg and Smyth 2010).

Além disso, o ATP pode induzir a proliferação de gliomas (Morrone, Jacques-Silva et al. 2003) e, ao contrário do tecido neuronal, a maioria dos gliomas são resistentes à morte induzida por concentrações citotóxicas de ATP. Desta forma, certas concentrações de ATP são capazes de matar o tecido sadio em contato com o tumor e estimular o crescimento das células do glioma (Morrone, Horn et al. 2005). Estes resultados se confirmam em trabalho posterior, no qual a injeção de apirase, uma enzima que hidrolisa ATP e ADP, reduz o tamanho tumoral em modelos experimentais de glioma C6 de rato (Morrone, Oliveira et al. 2006). Nesse estudo, análises patológicas demonstraram a falta de algumas características tumorais importantes, típicas de glioblastomas, nos tumores coinjetados com apirase. Dentre essas alterações estavam a redução do índice mitótico e a expressão de VEGF, indicando que o ATP tem um papel importante na proliferação e angiogênese do glioma in vivo (Elizandra Braganhol 2011).

A continuidade da investigação do envolvimento da sinalização purinérgica no crescimento dos gliomas, mostrou que a superexpressão da NTPDase2, em células de glioma de rato C6, promoveu um grande aumento no crescimento tumoral e nas características malignas do tumor in vivo. O ADP, derivado da atividade da NTPDase2, estimulou a migração de plaquetas para a área do tumor. Assim, a NTPDase2, através da regulação da angiogênese e inflamação, parece desempenhar papel importante na progressão tumoral (Braganhol, Huppés et al. 2009).

Os resultados contraditórios obtidos utilizando-se as NTPDases 1 e 2 revelam de certa forma, a complexidade existente nas interações entre tumor, células do sistema imunológico e sistema purinérgico. Tal complexidade também se evidencia em outro estudo, que mostra que as ações do ATP no tumor podem variar de acordo com a sua concentração no meio extracelular e que o tratamento de glioma U87 com ATP pode reduzir o número de esferas de células tronco tumorais, fundamentais para a manutenção do tumor (Ledur, Villodre et al. 2012).

O ATP extracelular pode ser degradado em ADP, AMP e finalmente em adenosina. Essa adenosina acumulada no líquido extracelular dos tumores pode, então, ligar-se aos seus respectivos receptores, desencadeando diferentes respostas celulares. A adenosina é considerada uma substância promotora de tumores, sendo descrita por estimular a proliferação dessas células, aumentar a angiogênese tumoral, inibir a síntese de citocinas e dificultar a

função das células-T, macrófagos e células NK (Rathbone, Middlemiss et al. 1992; Morrone, Jacques-Silva et al. 2003; Stagg and Smyth 2010). Além disso, recentemente, Quezada e cols. (2013) mostraram que o receptor de adenosina do subtipo A3 está envolvido no fenótipo de resistência à quimioterapia em glioblastomas, o qual é sustentado pelo aumento da expressão e da atividade de CD73 para disparar a sinalização de adenosina nesses receptores (Quezada, Garrido et al. 2013).

Assim, a expressão da CD73 é de grande importância no desenvolvimento dos tumores cerebrais por diferentes razões: (1) como fonte extracelular de adenosina; (2) como um rastreador do AMP extracelular; e (3) como uma molécula de adesão (Bavaresco, Bernardi et al. 2008). Quanto à última característica, estudos recentes mostraram que essa enzima pode modular a adesão das células de glioma, bem como a interação entre célula e matriz extracelular nesse tumor (Cappellari, Vasques et al. 2012).

A baixa expressão das NTPDases juntamente com a alta expressão da e5NT/CD73 parecem favorecer o acúmulo de ATP e adenosina no microambiente extracelular dos gliomas. Essas alterações podem ter consequências importantes na ativação dos receptores purinérgicos e modular eventos relacionados ao desenvolvimento tumoral, sendo de grande importância na patologia dessa doença (Elizandra Braganhol 2011).

Esse conjunto de resultados reforça a hipótese do envolvimento da sinalização purinérgica na biologia tumoral. Isso reforça também a modulação farmacológica dos receptores purinérgicos/ectonucleotidasas, como uma nova modalidade terapêutica para o tratamento de tumores no futuro, incluindo os cerebrais. Entretanto, dadas as diferenças e peculiaridades observadas em cada um dos tipos de interação do sistema purinérgico com os gliomas, apontadas em diversos estudos, torna-se evidente a necessidade de maiores informações, a respeito da ação desse sistema no câncer, para que essas possíveis novas terapias sejam utilizadas com especificidade e segurança.

Tendo-se em vista que um dos tratamentos mais promissores para tumores cerebrais inclui as células tronco mesenquimais (CTM), como veículo de entrega de moléculas terapêuticas para o sítio tumoral, o nosso grupo de pesquisa tem estudado se e de que maneira as CTMs podem modular o sistema purinérgico em gliomas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi analisar se a expressão das enzimas degradadoras de nucleotídeos poderia ser alterada, mediante a exposição dos gliomas, aos fatores liberados pelas células tronco mesenquimais, derivadas de tecido adiposo humano (hADSC).

2. Objetivo

Analisar e correlacionar a influência do meio condicionado (MC) de hADSCs na expressão das enzimas degradadoras de nucleotídeos na linhagem de glioma humano U87.

3. Métodos

Os métodos não descritos abaixo foram executados de forma exatamente idêntica à já relatada no artigo dessa dissertação e, portanto, não serão repetidos neste apêndice. Os itens relacionados ao cultivo celular, preparo do MC de hADSCs e os tratamentos aplicados às células de glioma U87 mantiveram-se iguais (DMEM, MC e DMEM + MC (1:1)). Além disso, as células hADSCs utilizadas tiveram o seu potencial tronco confirmado da mesma maneira que as utilizadas nos demais experimentos dessa dissertação (Vide resultados da diferenciação e imunofenotipagem nos resultados do artigo).

3.1 RT-PCR

O RNA mensageiro foi extraído a partir das populações de U87 (cultivadas em DMEM, MC e DMEM + MC) utilizando-se o reagente Trizol® LS (Sigma - Aldrich). O cDNA foi sintetizado com primer Randômero e enzima transcriptase reversa MMLV - RT® (Promega ; Madison , WI , EUA). Para a reação de PCR foram utilizados primers desenhados em nosso laboratório para os genes das ectonucleotidases NTPDases (1, 2 , 3, 5 , 6 e 8), ectonucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterases (ENPPs 1, 2 e 3) e CD73. A reação de PCR foi realizada utilizando-se Fast Probe qPCR Master Mix (Biotium, Hayward, CA, EUA). As condições dos ciclos de PCR foram como a descrita a seguir: 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 94 °C, 1 minuto à temperatura de anelamento (60°C), e 1 minuto a 72 °C. Todas as reações foram efetuadas durante 35 ciclos e incluída uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Os produtos foram analisados em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio (Ludwig, Porto Alegre, RS, BR). Os primers são mostrados na Tabela 1. GAPDH foi usado como o gene de controle interno.

A quantificação da expressão de genes foi realizada por PCR em tempo real na presença de Syber Green.

3.2 PCR em tempo real

O RNA total e cDNA foram gerados como descrito para a análise de RT-PCR. As amostras foram colocadas em placas de poços de baixo perfil de 96 poços e a análise foi efetuada no termociclador para PCR em tempo real Applied Biosystems Passo - One Plus™. As configurações da reação foram compostas de um passo de ativação inicial da enzima a 95 °C durante 20 segundos, 45 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 0,03s e anelamento/extensão a 60 °C durante 60 segundos, seguido da análise de melt de 60 °C a 95 °C, com uma rampa de 0,1 °C/s para a aquisição de dados para produzir a curva de desnaturação dos produtos amplificados. Os PCRs em tempo real foram efetuados num volume final de 10uL composto de 5uL de Fast SYBRgreen master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 0,25 uL de pares de primers 10uM, 3,75 uL de água e 1uL de cDNA . No final dos ciclos de PCR, uma curva de melt foi gerada para identificar a especificidade do produto de PCR. Para a normalização, primers de GAPDH foram utilizados a fim de medir a quantidade de cDNA para

GAPDH. As amostras foram corridas em triplicata e os dados foram apresentados como a relação enzimas/GAPDH. Os primers utilizados foram os mesmos usados na análise de RT-PCR (Tabela 1).

Tabela 1. Primers das enzimas do sistema purinérgico utilizadas nas reações de PCR.

Primers	Sense	Antisense	AT
hNPP1	CCAAGGACCCCAACACCTATAAA	AACTTCTTTGGCACAGCTTGG	60 ° C
hNPP2	GCTCGTTCCAGTCGTGTCA	GGTCCAGGGGGAGTCTGATA	60 ° C
hNPP3	TGTGGATCAACAGTGGCTGG	GGGTCCATGTGCCAGAAAGA	60 ° C
hNTPD1	CCTCTCTCACGGAGACGGA	TCTTGGAGCAAATGTCTTCACG	60 ° C
hNTPD2	CTCCTACTGCTGTGCGTCC	TGTCGTTCTCCTTGTCTGCC	60 ° C
hNTPD3	GCTAGTCGCCTTCTCCGAAT	GCAAGACCACCAAGGCAATG	60 ° C
hNTPD5	GGAGTGTCTTGGCTGAATCCT	CACACCTGCAGAGGCAATTT	60 ° C
hNTPD6	TCGCCTTTCCTTGTAGGGGA	GCTCCCTCCTGGAGTTTTCA	60 ° C
hNTPD8	GCGGACACAGAAGCGTCTAA	CCAAGAAGACCTGCTCCTTCC	60 ° C
hCD73	GAAGGCCTTTGAGCATAGCG	CGACACTTGGTGCAAAGAACA	60 ° C

h (human); AT (annealing temperature)

4. Resultados e discussão

Primeiramente, foi analisada a presença mRNA das nucleotidases nas culturas de U87 sem tratamento, a fim de se obter o perfil de expressão nessa linhagem celular. A análise por RT-PCR mostrou que, dentre o grupo de enzimas que compõe as NTPDases, as células U87 expressaram as enzimas 3, 5 e 6 e que não houve expressão para as NTPDases 1, 2 e 8. Além disso, houve expressão para as NPPs 1 e 2 e também para a enzima CD73, não sendo expressa a NPP3 (Figura 2).



Figura 2. Expressão do mRNA das nucleotidases do sistema purinérgico na linhagem U87. Reação de RT-PCR revelada em gel de agarose, com marcador de 100 pares de base (bp).

Estes resultados corroboram resultados prévios do nosso grupo, os quais mostram ausência na expressão das NTPDases 1 e 2 em linhagem de glioma humano, comprovado também por imunocitoquímica, e confirmam a expressão das NTPDases 3, 5 e 6 (dados não publicados) (Wink 2003).

Considerando-se que o ATP é reconhecido como um fator mitogênico que induz a proliferação em células de gliomas (Rathbone, Middlemiss et al. 1992; Morrone, Jacques-Silva et al. 2003), a baixa hidrólise de ATP e ADP observadas em gliomas (Wink, Lenz et al. 2003) pode ser decorrente da falta de expressão das NTPDases 1 e 2, as quais são as principais enzimas degradadoras de nucleosídeos tri-fosfatados e, conseqüentemente, isso pode representar um importante mecanismo associado com a transformação maligna desse tipo de tumor. Recentemente também foi mostrado que tumores de pâncreas humano apresentam uma expressão diminuída de NTPDase1 quando comparados ao tecido sadio (Kittel, Garrido et al. 2002). Ao encontro dessa ideia, estudos prévios do nosso grupo mostraram também que a coinjeção de NTPDase1 em células de glioma resultou na diminuição do tamanho do tumor (Morrone, Oliveira et al. 2006). Ainda, o acúmulo de nucleotídeos extracelulares resultante da deleção da NTPDase1 também promoveu o desenvolvimento de câncer de fígado autóctone em ratos (Sun, Han et al. 2013).

A enzima NPP3 já foi mostrada sendo altamente expressa em pacientes com carcinoma de cólon (Yano, Hayashi et al. 2003). Nesse mesmo estudo foi mostrado que a enzima não é somente expressa na região apical, mas também na região basolateral da membrana das células desse tipo de tumor. No entanto, não houve uma correlação entre o grau de malignidade tumoral e a expressão da NPP3. Isso poderia ser uma justificativa para que nem todos os tumores apresentem expressão semelhante da enzima, visto que a mesma parece não ser fator imprescindível para o seu desenvolvimento.

A não expressão da NTPDase8 também está de acordo com dados já mostrados na literatura, uma vez que a mesma não é expressa no cérebro (Bigonnesse, Levesque et al. 2004). As NTPDases 4 e 7 não foram analisadas neste estudo pois são proteínas de localização exclusivamente intracelular e, portanto, não são responsáveis pela degradação de nucleotídeos na superfície celular dos gliomas (Biederbick, Kosan et al. 2000; Shi, Kukar et al. 2001).

Analisando-se a média da expressão das enzimas corrigidas pelo gene constitutivo GAPDH, a maior expressão encontrada foi a da ecto-5-NT/CD73, seguida pela NPP2,

NTPDase 6, NPP1, NTPD5 e NTPD3, em sequência (Figura 3). Em dados não publicados do grupo houve concordância com esses resultados, mostrando que em linhagem de glioma humano a expressão da NTPDase 3 foi mais baixa e a expressão das NTPDases 5 e 6 foi alta (dados não publicados) (Wink 2003).

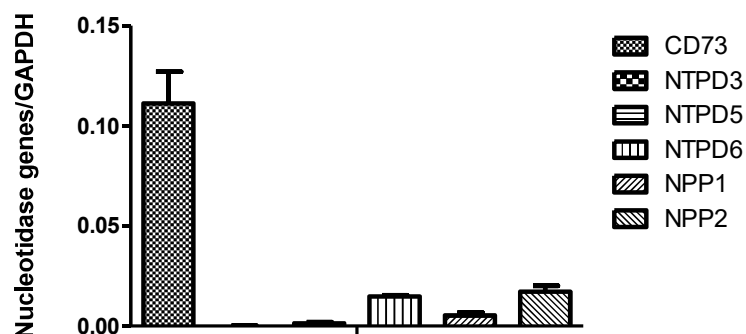


Figura 3. Expressão dos genes das nucleotidases nas células de glioma U87 sem tratamento.

Depois de concluída essa análise sem nenhum tratamento avaliou-se, então, se essas nucleotidases seriam diferencialmente expressas quando as células de glioma fossem expostas ao cultivo com o MC de hADSC. Para isso, foi quantificada a expressão das mesmas enzimas, nas amostras dos três grupos já citados (DMEM, MC e DMEM + MC), por PCR em tempo real. Assim como na reação de RT-PCR, quatro enzimas não foram expressas: NTPDases 1, 2 e 8 e NPP3. Os demais genes foram expressos nas amostras dos três grupos, tratados e controle (Figura 4). No entanto, para nenhuma das enzimas expressas houve diferença estatisticamente significativa quando comparada a expressão entre os grupos.

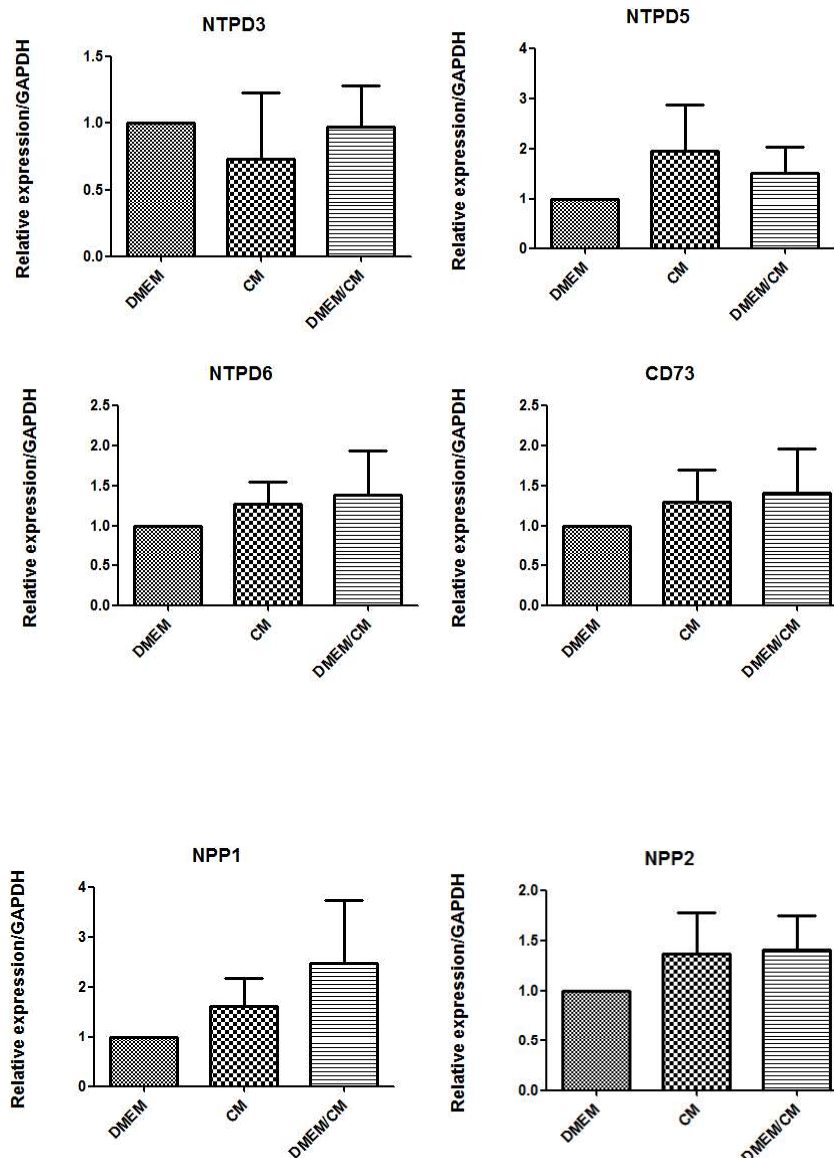


Figura 4. Expressão relativa das nucleotidases em gliomas U87 tratadas com MC puro (CM) ou diluído (CM+DMEM), comparadas ao controle (DMEM). NTPDase3, p 0.830; NTPDase5, p 0.563; NTPDase6, p 0.741; CD73, p 0.758; NPP1, p 0.455; e NPP2, p 0.593.

Dentre as enzimas expressas, a maioria tem ação já descrita na literatura como possuindo atividade pró-tumoral. Diferentes estudos mostram o envolvimento dessas enzimas em algum aspecto da biologia tumoral que acaba auxiliando no seu desenvolvimento e crescimento. A recente identificação e caracterização bioquímica não permitiram ainda o completo entendimento da função fisiológica da NTPD5 no câncer. Todavia, sabe-se que essa enzima é um proto-oncogene (PCPH). No câncer, Villar e cols. (Villar, Arenas et al. 2007) mostraram que a NTPDase 5 está envolvida no aumento da invasão celular de carcinomas de próstata. Em 2008, o mesmo grupo mostrou também que a expressão da NTPDase 5 confere resistência às células do câncer de próstata à apoptose induzida por cisplatina. Em glioblastomas (GBM),

pacientes com alta expressão de NTPDase5 mostraram taxas reduzidas de sobrevivência, em comparação a pacientes com baixa expressão dessa enzima (Zadran, Amighi et al. 2012). Além disso, esse mesmo estudo mostrou que o knockdown da NTPDase5 foi acompanhado de um aumento na autofagia em linhagem de glioma humano U87, encontrando-se um maior número de vacúolos autofágicos no citoplasma dessas células.

Já dentre as NPPs, a NPP2 está relacionada ao aumento da motilidade e invasão tumorais (Goding, Grobбен et al. 2003). A presença de uma E- NPPase na membrana plasmática de glioma de rato C6 foi demonstrada e estudada por Grobбен e colaboradores (1999). Com base nestes estudos foi proposto que a E-NPPase tem um efeito modulatório na sinalização mediada por receptores purinérgicos em células desse tipo de tumor (Grobбен, Anciaux et al. 1999).

A ecto-5-NT/CD73 está envolvida em diversos processos da biologia tumoral, como imunossupressão, angiogênese, invasão, metástase e resistência a drogas (Spychala 2000; Wang, Zhou et al. 2008; Zhang 2012). Além dessas, também foi mostrado que essa enzima é capaz de modular adesão celular e interações das células do tumor com a matriz extracelular em células de glioma U138MG (Cappellari, Vasques et al. 2012).

No entanto, para a NTPDase3, Rockenbach e colaboradores recentemente mostraram que existe uma diminuição na expressão dessa enzima durante a progressão do câncer de bexiga in vivo (Rockenbach, Braganhol et al. 2014). O mesmo grupo já mostrou também que para duas linhagens diferentes de câncer de bexiga, a linhagem menos maligna expressou NTPDase3 e ecto-5'-NT/CD73, enquanto a linhagem mais maligna, somente expressou a ecto-5'-NT/CD73, deixando de expressar a NTPDase3 (Stella, Bavaresco et al. 2010). Embora pouco se saiba sobre o papel de NTPDase3 no câncer, estes resultados levam a suspeitar que a diminuição na expressão da NTPDase3 possa estar envolvida de alguma forma na progressão tumoral. Por fim, quanto à NTPDase6, sabe-se que a mesma não é expressa em alguns tipos de tumor, como por exemplo em diferentes linhagens de câncer de bexiga (Stella, Bavaresco et al. 2010). Existem relatos de que essa enzima possa funcionar como supressora tumoral, sendo capaz também de influenciar a resistência ao tratamento com cisplatina em câncer testicular (Tada, Yokomizo et al. 2011). Contudo, ainda são poucos os estudos na literatura a respeito do seu envolvimento nos tumores.

Até o momento da realização desse trabalho, não existiam relatos prévios que abordassem a influência de células tronco mesenquimais na modulação do sistema purinérgico em gliomas. Sendo assim, os dados encontrados são provavelmente o início da investigação dessa relação. Encontramos como resultado preliminar que nenhuma das enzimas degradadoras de nucleotídeos aqui analisadas teve sua expressão alterada pela exposição aos fatores liberados pela hADSC em seu MC. Isso nos leva a propor que os mecanismos pró e mesmo anti-tumorais supracitados, quando dependentes da ação dessas essas enzimas, não se encontrarão alterados quando a célula do glioma for exposta ao microambiente gerado pela célula tronco. Contudo, esta seria apenas uma das maneiras de se confirmar a segurança no uso de hADSCs para terapias anti-tumorais. Levando-se em consideração que o câncer é um

processo patológico extremamente complexo, no qual diversas vias, e não apenas uma, estão envolvidas numa mesma resposta celular, outros estudos e análises são necessários para que se possa chegar mais próximo do entendimento da relação das células tronco com o ambiente tumoral.

5. Perspectivas

Este trabalho é também apenas o início da investigação a respeito da modulação do sistema purinérgico do câncer pelas células tronco mesenquimais. Os dados deste trabalho farão parte de um estudo envolvendo outras análises do sistema purinérgico em gliomas, tratados com meio condicionado de células tronco mesenquimais adiposo derivadas. Para este fim, já estão sendo feitas em nosso laboratório as análises da expressão das enzimas do sistema purinérgico em células de glioma de rato C6, tratadas ou não com MC de células tronco adiposo-derivadas. Além disso, já foi realizada a análise da expressão dos receptores purinérgicos, sob as mesmas condições de tratamento, bem como, a medida das atividades enzimáticas de degradação do ATP, ADP e AMP em gliomas tratados e não tratados.

6. Referências

- Andoh, K., J. H. Piao, et al. (1999). "Genomic structure and promoter analysis of the ecto-phosphodiesterase I gene (PDNP3) expressed in glial cells." *Biochim Biophys Acta* 1446(3): 213-224.
- Baldwin, S. A., J. R. Mackey, et al. (1999). "Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development." *Mol Med Today* 5(5): 216-224.
- Bavaresco, L., A. Bernardi, et al. (2008). "The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation." *Mol Cell Biochem* 319(1-2): 61-68.
- Biederbick, A., C. Kosan, et al. (2000). "First apyrase splice variants have different enzymatic properties." *J Biol Chem* 275(25): 19018-19024.
- Bigonnesse, F., S. A. Levesque, et al. (2004). "Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8." *Biochemistry* 43(18): 5511-5519.
- Bodin, P. and G. Burnstock (2001). "Purinergic signalling: ATP release." *Neurochem Res* 26(8-9): 959-969.
- Braganhol, E., D. Huppes, et al. (2009). "A comparative study of ectonucleotidase and P2 receptor mRNA profiles in C6 cell line cultures and C6 ex vivo glioma model." *Cell Tissue Res* 335(2): 331-340.

- Burnstock, G. (2009). "Purinergic signalling: past, present and future." *Braz J Med Biol Res* 42(1): 3-8.
- Burnstock, G. and M. Williams (2000). "P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential." *J Pharmacol Exp Ther* 295(3): 862-869.
- Cappellari, A. R., G. J. Vasques, et al. (2012). "Involvement of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in U138MG glioma cell adhesion." *Mol Cell Biochem* 359(1-2): 315-322.
- Elizandra Braganhol, A. B., Angélica R. Cappellari, Márcia R. Wink, and Ana M.O. Battastini (2011). *The Role of Ectonucleotidases in Glioma Cell Proliferation. Tumors of the Central Nervous System. M. A. Hayat. Porto Alegre. Volume 1.*
- Goding, J. W., B. Grobбен, et al. (2003). "Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family." *Biochim Biophys Acta* 1638(1): 1-19.
- Grobбен, B., K. Anciaux, et al. (1999). "An ecto-nucleotide pyrophosphatase is one of the main enzymes involved in the extracellular metabolism of ATP in rat C6 glioma." *J Neurochem* 72(2): 826-834.
- Kittel, A., M. Garrido, et al. (2002). "Localization of NTPDase1/CD39 in normal and transformed human pancreas." *J Histochem Cytochem* 50(4): 549-556.
- Kukulski, F., S. A. Levesque, et al. (2005). "Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8." *Purinergic Signal* 1(2): 193-204.
- Ledur, P. F., E. S. Villodre, et al. (2012). "Extracellular ATP reduces tumor sphere growth and cancer stem cell population in glioblastoma cells." *Purinergic Signal* 8(1): 39-48.
- Lee, H. Y., T. Clair, et al. (1996). "Stimulation of tumor cell motility linked to phosphodiesterase catalytic site of autotaxin." *J Biol Chem* 271(40): 24408-24412.
- Morrone, F. B., A. P. Horn, et al. (2005). "Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity." *J Neurooncol* 71(2): 135-140.
- Morrone, F. B., M. C. Jacques-Silva, et al. (2003). "Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines." *J Neurooncol* 64(3): 211-218.
- Morrone, F. B., D. L. Oliveira, et al. (2006). "In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model." *BMC Cancer* 6: 226.
- Quezada, C., W. Garrido, et al. (2013). "5'-ectonucleotidase mediates multiple-drug resistance in glioblastoma multiforme cells." *J Cell Physiol* 228(3): 602-608.

Ralevic, V. and G. Burnstock (1998). "Receptors for purines and pyrimidines." *Pharmacol Rev* 50(3): 413-492.

Rathbone, M. P., P. J. Middlemiss, et al. (1992). "Purine nucleosides and nucleotides stimulate proliferation of a wide range of cell types." *In Vitro Cell Dev Biol* 28A(7-8): 529-536.

Robson, S. C., J. Seigny, et al. (2006). "The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance." *Purinergic Signal* 2(2): 409-430.

Rockenbach, L., E. Braganhol, et al. (2014). "NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 are differentially expressed during mouse bladder cancer progression." *Purinergic Signal*.

Shi, J. D., T. Kukar, et al. (2001). "Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1)." *J Biol Chem* 276(20): 17474-17478.

Spychala, J. (2000). "Tumor-promoting functions of adenosine." *Pharmacol Ther* 87(2-3): 161-173.

Stagg, J. and M. J. Smyth (2010). "Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer." *Oncogene* 29(39): 5346-5358.

Stella, J., L. Bavaresco, et al. (2010). "Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines." *Urol Oncol* 28(3): 260-267.

Sun, X., L. Han, et al. (2013). "Disordered purinergic signaling and abnormal cellular metabolism are associated with development of liver cancer in Cd39/ENTPD1 null mice." *Hepatology* 57(1): 205-216.

Tada, Y., A. Yokomizo, et al. (2011). "Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 expression in testis and testicular cancer and its implication in cisplatin resistance." *Oncol Rep* 26(1): 161-167.

Villar, J., M. I. Arenas, et al. (2007). "PCPH/ENTPD5 expression enhances the invasiveness of human prostate cancer cells by a protein kinase C delta-dependent mechanism." *Cancer Res* 67(22): 10859-10868.

Wang, L., X. Zhou, et al. (2008). "Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells." *J Cancer Res Clin Oncol* 134(3): 365-372.

White, N. and G. Burnstock (2006). "P2 receptors and cancer." *Trends Pharmacol Sci* 27(4): 211-217.

Wink, M. R. (2003). Identificação das características cinéticas, expressão e localização das ecto-nucleotidases em cultura de astrócitos e linhagens de gliomas. Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, UFRGS: 194.

- Wink, M. R., E. Braganhol, et al. (2003). "Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions." *Neurochem Int* 43(7): 621-628.
- Wink, M. R., G. Lenz, et al. (2003). "Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines." *Cancer Lett* 198(2): 211-218.
- Yano, Y., Y. Hayashi, et al. (2003). "Expression and localization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I-3 (E-NPP3/CD203c/PD-I beta/B10/gp130RB13-6) in human colon carcinoma." *Int J Mol Med* 12(5): 763-766.
- Zadran, S., A. Amighi, et al. (2012). "ENTPD5-mediated modulation of ATP results in altered metabolism and decreased survival in gliomablastoma multiforme." *Tumour Biol* 33(6): 2411-2421.
- Zhang, B. (2010). "CD73: a novel target for cancer immunotherapy." *Cancer Res* 70(16): 6407-6411.
- Zhang, B. (2012). "CD73 promotes tumor growth and metastasis." *Oncoimmunology* 1(1): 67-70.
- Zimmermann, H. (1999). "Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function." *Trends Pharmacol Sci* 20(6): 231-236.
- Zimmermann, H. (2000). "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides." *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362(4-5): 299-309.
- Zimmermann, H. (2001). "Ectonucleotidases: Some Recent Developments and a Note on Nomenclature." *DRUG DEVELOPMENT RESEARCH* 52: 44-56.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As MSCs podem apresentar funções extremamente diferentes em microambientes distintos, pois várias vias de sinalização podem ser ativadas nessas células. Em consequência disso, resultados muito controversos já foram relatados ao abordar-se o papel das MSCs no desenvolvimento tumoral. Portanto, é muito importante examinar como as MSCs em diferentes estados afetam tumores.

Os resultados deste trabalho demonstram que fatores liberados pelo hADSCs em seu meio condicionado parecem não ter influência sobre glioma desenvolvimento CSC *in vitro*, de acordo com os resultados observados na análise da capacidade de formação de esferas e pela expressão de marcadores de CSC nas células de glioma U87.

No entanto, o MC de hADSCs apresentou capacidade de induzir fortemente a formação de autofagossomos nas células de glioma, como verificado pelas vesículas LC3GFP+ formadas no citoplasma das células. No entanto, o fluxo autofágico parece ser interrompido por alguns

dos fatores que compõem este MC. A principal dúvida a ser investigada agora é saber se esta indução de autofagia pelo MC tem um papel pró-sobrevivência na célula ou se pode levar as células de glioma à morte por citotoxicidade. Como discutimos acima, mais análises ainda devem ser feitas a fim de se obter essa resposta. No entanto, se for confirmado que o MC de hADSC é capaz de induzir a citotoxicidade em gliomas, e, além disso, sabendo que o mesmo MC não influencia o desenvolvimento CSC, seria possível propor as células mesenquimais como alvo de estudos para a terapia anti-tumoral, mesmo sem serem modificadas geneticamente.

Além disso, estudamos em nosso laboratório outras maneiras pelas quais as células tronco mesenquimais podem se relacionar com os gliomas, sendo uma delas o sistema purinérgico. Existem na literatura diversos trabalhos, incluindo os do nosso grupo de pesquisa, mostrando a relação desse sistema com o câncer. No entanto, é necessária ainda a realização de estudos que busquem maneiras eficazes para modular o sistema purinérgico em favor de uma ação anti-tumoral.

Nós acreditamos que, em poucos anos, avanços significativos serão feitos no entendimento de como os tumores e as células-tronco interagem umas com as outras, e como estas interações podem ser utilizadas a partir de um ponto de vista terapêutico para os gliomas. Futuras terapias com células tronco serão, provavelmente, muito mais eficazes em rastrear as células tumorais, controlar o crescimento do tumor, amplificar a resposta imune anti-tumoral e limitar a invasão das células de glioma no tecido sadio.

PERSPECTIVAS

- Realizar análise protéica por western blot para os diferentes marcadores de CSC investigados;
- Realizar as mesmas análises feitas para o tratamento com meio condicionado no cocultivo de hADSCs e células de glioma U87. Dessa maneira, será possível confirmar se no contato célula-célula existe ou não a indução do crescimento da população de CSCs;
- Confirmar indução de autofagia do MC por meio da realização de western blot para as proteínas LC3 I/II e p62. Se confirmada, testar inibidores e ativadores de autofagia nessas células, a fim de verificar se a resposta à indução autofágica é pró-sobrevivência ou se levará à morte das células de glioma por citotoxicidade;
- Seguir com a análise do meio condicionado sobre a autofagia dos gliomas U87, a fim de se descobrir que possíveis fatores são responsáveis pelo efeito observado. Além disso, pré-tratar as células do glioma com o MC e, após isso, tratá-las com temozolamida. Assim, avaliar se a pré-exposição do glioma ao MC tem alguma influência na resposta do tumor à temozolamida;
- Dar sequencia à investigação da modulação das MSCs sobre o sistema purinérgico das células de glioma.

ANEXO

Anexo A – Cartas de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Influência das Células-tronco Mesenquimais no Desenvolvimento das Células-tronco Tumorais de Gliomas.																															
Pesquisador Responsável : Marcia Rosângela Wink	Parecer 1768/12																														
Data da Versão	Cadastrado 558/12																														
Data do Parecer 11/07/2012																															
Grupo e Área Temática	Classificação utilizada pela CONEP																														
Objetivos do Projeto Geral:: Investigação da influência das CTMs sobre as células-tronco tumorais de glioma, bem como sobre a expressão das enzimas ecto NTPDases nessas células.																															
Sumário do Projeto																															
<table border="1"> <tr> <td>Item Metodológico e Ético</td> <td>Situação</td> </tr> <tr> <td>Título</td> <td>Adequado</td> </tr> <tr> <td>Autores</td> <td>Adequados</td> </tr> <tr> <td>Local de Origem na Instituição</td> <td>Adequado</td> </tr> <tr> <td>Projeto elaborado por patrocinador</td> <td>Não</td> </tr> <tr> <td>Aprovação no país de origem</td> <td>Não necessita</td> </tr> <tr> <td>Local de Realização</td> <td>Outra localizar no comentário</td> </tr> <tr> <td>Outras instituições envolvidas</td> <td>Não</td> </tr> <tr> <td>Condições para realização</td> <td>Adequadas</td> </tr> </table>		Item Metodológico e Ético	Situação	Título	Adequado	Autores	Adequados	Local de Origem na Instituição	Adequado	Projeto elaborado por patrocinador	Não	Aprovação no país de origem	Não necessita	Local de Realização	Outra localizar no comentário	Outras instituições envolvidas	Não	Condições para realização	Adequadas												
Item Metodológico e Ético	Situação																														
Título	Adequado																														
Autores	Adequados																														
Local de Origem na Instituição	Adequado																														
Projeto elaborado por patrocinador	Não																														
Aprovação no país de origem	Não necessita																														
Local de Realização	Outra localizar no comentário																														
Outras instituições envolvidas	Não																														
Condições para realização	Adequadas																														
Comentário sobre os itens de identificação: Pesquisa realizada na Ufopa - Laboratório de Biologia Celular e Serviço de Cirurgia Plástica de IACMPA.																															
Introdução	Adequada																														
Comentário sobre a Introdução																															
Objetivos	Adequados																														
Comentário sobre os Objetivos																															
<table border="1"> <tr> <td colspan="2">Pacientes e Métodos</td> </tr> <tr> <td>Delimitação</td> <td>Adequado</td> </tr> <tr> <td>Tamanho da amostra</td> <td>Total Local</td> </tr> <tr> <td>Cálculo do tamanho da amostra</td> <td>Adequado</td> </tr> <tr> <td>Participantes pertencentes a grupos especiais</td> <td>Não</td> </tr> <tr> <td>Seleção equitativa dos indivíduos participantes</td> <td>Não se aplica</td> </tr> <tr> <td>Critérios de inclusão e exclusão</td> <td>Adequados</td> </tr> <tr> <td>Relação risco-benefício</td> <td>Não se aplica</td> </tr> <tr> <td>Uso de placebo</td> <td>Não utiliza</td> </tr> <tr> <td>Período de suspensão de uso de drogas (wash out)</td> <td>Não utiliza</td> </tr> <tr> <td>Monitoramento da segurança e dados</td> <td>Adequado</td> </tr> <tr> <td>Armazenamento dos dados</td> <td>Adequado - quantitativa</td> </tr> <tr> <td>Privacidade e confidencialidade</td> <td>Adequada</td> </tr> <tr> <td>Termo de Consentimento</td> <td>Não se aplica</td> </tr> <tr> <td>Adequação às Normas e Diretrizes</td> <td>Não</td> </tr> </table>		Pacientes e Métodos		Delimitação	Adequado	Tamanho da amostra	Total Local	Cálculo do tamanho da amostra	Adequado	Participantes pertencentes a grupos especiais	Não	Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Não se aplica	Critérios de inclusão e exclusão	Adequados	Relação risco-benefício	Não se aplica	Uso de placebo	Não utiliza	Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza	Monitoramento da segurança e dados	Adequado	Armazenamento dos dados	Adequado - quantitativa	Privacidade e confidencialidade	Adequada	Termo de Consentimento	Não se aplica	Adequação às Normas e Diretrizes	Não
Pacientes e Métodos																															
Delimitação	Adequado																														
Tamanho da amostra	Total Local																														
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado																														
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não																														
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Não se aplica																														
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados																														
Relação risco-benefício	Não se aplica																														
Uso de placebo	Não utiliza																														
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza																														
Monitoramento da segurança e dados	Adequado																														
Armazenamento dos dados	Adequado - quantitativa																														
Privacidade e confidencialidade	Adequada																														
Termo de Consentimento	Não se aplica																														
Adequação às Normas e Diretrizes	Não																														
Comentário sobre os itens de Pacientes e Métodos																															
Cronograma	Adequado																														
Data de início prevista																															
Data de término prevista																															
Orçamento	Adequado																														
Fonte de financiamento externa	Agência de fomento																														
Comentário sobre o Cronograma e o Orçamento																															
Referências Bibliográficas	Adequadas																														
Comentário sobre as Referências Bibliográficas																															
Recomendação Aprovar																															
Comentário CEP sobre o Projeto																															
Após a reanálise do projeto acima descrito, recomenda-se aprovar. A pesquisa atende as exigências, em seus aspectos éticos e metodológicos, das Diretrizes e Normas, especialmente as Resoluções 196/96, 251/97, 292/99, 346/05, 347/05 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.																															



Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Rua Prof. Amos Dias, 293 - Telefone: (51) 3214-8080 - Fax: (51) 3214-8585
CEP 90020-090 - Porto Alegre - Rio Grande do Sul - CNPJ: 02815060/0001-68
Site: www.santacasa.org.br - E-mail: marketing@santacasa.org.br



PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer Complementar nº 436/11

Protocolo nº 3650/11

Título: "Análise do crescimento e viabilidade de queratinócitos: influência do co-cultivo com células tronco mesenquimais".

Pesquisador Responsável: Eduardo Mainieri Chen

Instituição onde se realizará - Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

Data de Entrada: 13/10/2011

II - Objetivos: Analisar a influência das ADSCs ou de seu meio condicionado no crescimento e viabilidade dos queratinócitos. Esse objetivo será alcançado através das seguintes metas:
-Meta 1.1 - Analisar a taxa de proliferação e adesão dos queratinócitos da linhagem HACAT na presença ou ausência das ADSCs humanas ou do seu meio condicionado;
-Meta 1.2 - Analisar a taxa de reparação, através da migração, na presença ou ausência de ADSCs humanas ou do seu meio condicionado em queratinócitos da linhagem Hacat submetidos a um modelo de lesão *in vitro*.

III - Sumário do Projeto

Descrição e caracterização da amostra: Para o cumprimento de cada meta específica, será utilizado tecido proveniente de 5 pacientes submetidos à lipos aspiração, abdominoplastias e/ou mamoplastias redutoras no Serviço de Cirurgia Plástica da ISCMPA. O tecido coletado deverá conter pele de espessura total (derme e epiderme), bem como gordura. No total, será utilizado tecido proveniente de 15 pacientes, que demonstraram interesse em colaborar com a pesquisa assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Critérios de inclusão e exclusão: Serão incluídos pacientes com indicação de lipos aspiração, abdominoplastia e/ou mamoplastia redutora que procurarem o Serviço de Cirurgia Plástica da ISCMPA que aceitem doar tecido adiposo subcutâneo e/ou pele para o estudo através de Consentimento Informado Livre e Esclarecido. Esses tecidos serão normalmente descartados após o procedimento.

Adequação das condições - Hospital escola com infra-estrutura adequada para a realização do estudo descrito

IV - Comentários:

- Justificativa do uso de placebo - Não se aplica.
- Análise de riscos e benefícios - Adequado.

Comitê de Ética em Pesquisa - CENEPE/ISCMPA Fone/Fax (51) 3214-8571 - e-mail: comiteetica@iscmpa.org.br
Reconhecido: Conselho Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP / Ministério da Saúde
PSE - Institutional Review Board (part of U.S. Department of Health and Human Services (DHHS))
Office for Human Research Protections (OHRP), 4005 15th Avenue, NW, Washington, DC 20004
FHA - Federalwide Assurance (FHA) number - FWA0000204



Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Rua Prof. Amos Dias, 295 - Telefone: (51) 3214.8080 - Fax: (51) 3214.8585
CEP 90020-090 - Porto Alegre - Rio Grande do Sul - CNPJ: 92815000/0001-68
Site: www.santacasa.org.br - E-mail: marketing@santacasa.iche.br



- Adequação do termo de consentimento e forma de obtê-lo - Adequado.
- Informação adequada quanto ao financiamento - Adequado.
- Outros centros no caso de estudos multicêntricos - Não se aplica.

V - Parecer do Relator — "Após reavaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer".

VI - Data da Reunião: 01/11/2011.

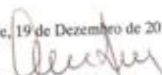
VII - Data da Reavaliação: 19/12/2011.

"Projeto e Termo de Consentimento, Aprovados".

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA, Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 - Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

Porto Alegre, 19 de Dezembro de 2011.


Prof. Dr. Cláudio Teloken
Coordenador do CEP/ISCMPA

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/ISCMPA
Instituição: 02602780/050

Fone/Fax (51) 3214-4571 - e-mail: cep@santacasa.iche.br
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP / Ministério da Saúde
(RQ - Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)
Office for Human Research Protections (OHRP) sob número - IRB00002908
PWA - Fazeretide Assurances sob número - PWA00000949

Parecer 436/11