

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Curso de Graduação em Biomedicina

Mariana Silva dos Santos

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO EM LINHAGEM
DE GLIOMA DE RATO (C6)**

Porto Alegre

DEZEMBRO/2013

Mariana Silva dos Santos

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO EM LINHAGEM
DE GLIOMA DE RATO (C6)**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Christianne
Gazzana Salbego

Co-Orientador: Me. Mariana Maier
Gaelzer

Porto Alegre
DEZEMBRO/2013

AGRADECIMENTOS

*À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aos excelentes professores,
pelo ensino de qualidade durante os anos de faculdade.*

*À orientadora Christianne Salbego,
pelo apoio aos alunos, pela orientação e por me receber no laboratório para a
realização do trabalho de conclusão.*

*Aos colegas de laboratório, em especial Alice, Bárbara e Mariana Maier,
pela ajuda na realização do trabalho, pela amizade e por todas as horas passadas
na sala de citometria.*

*À Ana, Clarissa, Graziela, Lauryn, Maria Eduarda, Mariana Borges, Mariana
Fösch e Michelle,
pela amizade que foi mantida apesar da distância.*

*À minha irmã, ao meu pai e à minha mãe,
pelo carinho, pelo apoio e pela paciência durante todos esses anos.*

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| I. INTRODUÇÃO | 9 |
| 1. Gliomas | 9 |
| 1.2. Glioblastoma (GB) | 10 |
| 1.2.1. Tratamento | 10 |
| 1.2.2. Etiologia | 11 |
| 1.2.2.1. Caracterização de Células Tronco Tumorais (CTT) | 12 |
| 2. Hipóxia | 13 |
| 2.1. Hipóxia e Morte Celular | 14 |
| 2.1. Sinalização de HIF | 15 |
| 2.1.1. Sinalização do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) | 16 |
| 2.2. Contribuição da Hipóxia para a Progressão Tumoral | 18 |
| II. OBJETIVOS | 21 |
| II.1. Objetivo Geral | 21 |
| II.2. Objetivos Específicos | 21 |
| III. ARTIGO CIENTÍFICO | 22 |
| 1. Introduction | 24 |
| 2. Materials and Methods | 25 |
| 2.1. Chemicals and Materials | 25 |
| 2.2. Cell Culture | 25 |
| 2.3. Experimental Groups | 26 |
| 2.4. Oxygen Deprivation (OD) | 26 |
| 2.5. Cell Death and Morphology Analysis by Microscopy | 26 |
| 2.6. Flow Cytometry Analysis | 27 |
| 2.6.1. Cell Death Analysis | 27 |
| 2.6.2. Detection of VEGF and VEGFR | 27 |
| 2.7. Statistical Analysis | 28 |
| 3. Results | 28 |
| 3.1. OD treatment induces apoptotic cell death. | 28 |
| 3.2. OD induces morphological changes in C6 cell line. | 28 |
| 3.3. OD effect on the expression of VEGF or VEGFR | 29 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 4. Discussion | 30 |
| 5. Conclusion..... | 31 |
| 6. Acknowledgements | 31 |
| 7. References | 32 |
| 8. Subtitles..... | 34 |
| 9. Figures..... | 36 |
| IV. RESULTADOS COMPLEMENTARES | 47 |
| V. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS | 49 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 51 |

RESUMO

Glioblastomas (GBs) são os tumores primários mais agressivos do SNC, possuem uma alta taxa proliferativa, são citologicamente malignos e mitoticamente ativos. Apesar da combinação de diferentes tratamentos como a radio e quimioterapia, a sobrevida média do paciente é desanimadora: em torno de 15 meses. A hipóxia é frequentemente associada a um prognóstico ruim, pois a baixa concentração de O₂ altera a expressão de genes associados com metabolismo, sobrevivência, migração e angiogênese, contribuindo para uma maior agressividade tumoral. O microambiente hipóxico é caracterizado por morte celular, pela presença de moléculas que estimulam a progressão tumoral e que selecionam as células com fenótipo mais agressivo. São as chamadas células tronco tumorais (CTT). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um dos fatores associados à angiogênese e utilizado como marcador de hipóxia, além disso, foi demonstrado que HIF induz o fenótipo indiferenciado de CTT. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da privação de oxigênio em linhagem de glioma de rato (C6), com o intuito de mimetizar o microambiente tumoral *in vitro*. Para tanto, as células foram expostas a PO por 15min, 1h e 3h em meio livre de soro e em meio suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB). Foi avaliada a morte celular, análise de mudanças morfológicas induzidas pela PO bem como a presença de marcadores de hipóxia. A morte celular por necrose/apoptose, o tamanho e granulidade celular e o aumento do número de células marcadas de VEGF e do seu receptor (FLK-1/VEGFR-2) foram avaliados através da técnica de citometria de fluxo. Alterações morfológicas foram observadas através de fotomicrografias. Mudanças na morfologia foram observados após a PO e foram proeminentes no grupo sem soro. Entretanto, a marcação de VEGF e de VEGFR não foi alterada com a PO. Nosso protocolo de PO *in vitro* foi capaz de induzir a apoptose e mudanças morfológicas em células de glioma de rato C6, recriando algumas das características presentes no microambiente hipóxico. As CTT são responsáveis pela auto-renovação após a ressecção cirúrgica, e pela químio e radiorresistencia de GBs, dessa forma, é fundamental a seleção desses tipos de células no screening de drogas mais efetivas, que atuem contra essa população mais resistente.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|--|
| ADM-1 | Adrenomedulina-1 |
| ALDA | Aldolase A |
| ARNT | Translocador Nuclear do Receptor Aril Hidrocarboneto |
| CTT | Células Tronco Tumorais |
| ET-1 | Endotelina-1 |
| GB | Glioblastoma |
| GLUT-1 | Transportador Tipo I de Glicose |
| HIF | Fator Induzível de Hipóxia |
| HREs | Elementos Responsivos à Hipóxia |
| IRES | Sítio Interno de Entrada do Ribossomo |
| O ₂ | Oxigênio Molecular |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| MDR | Multirresistência a drogas |
| MMP | Metaloproteinases de Matriz |
| Na ⁺ | Sódio |
| PAI-1 | Inibidor do Ativador de Plasminogênio |
| PDH | Piruvato Desidrogenase Mitocondrial |
| PDK1 | Piruvato Desidrogenase Quinase 1 |
| PGK1 | Fosfoglicerato Quinase 1 |
| PO | Privação de Oxigênio |
| pVHL | Proteína Supressora de Tumor Von Hippel-Lindau |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| VEGF | Fator de Crescimento Endotelial Vascular |
| VEGFR | Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular |

I. INTRODUÇÃO

1. Gliomas

Gliomas são os tumores primários mais comuns, representando 32% dos tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) e 80% dos tumores malignos (Figura 1) (Agnihotri *et al.*, 2013). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2007, os gliomas são classificados em relação a histopatologia em astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitomas ou ependimomas; em relação ao grau de malignidade de I a IV, sendo tumores de grau IV os mais malignos, caracterizados por células indiferenciadas e por rápido crescimento celular. Podem ser classificados também quanto a localização do tumor no cérebro (Louis *et al.*, 2007; Huse, Holland e Deangelis, 2013).

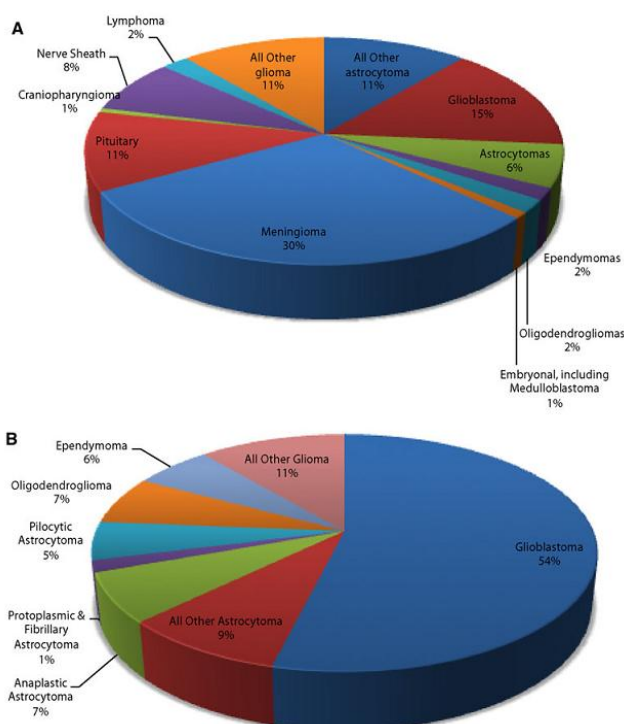


Figura 1: Distribuição de tumores primários no SNC (A) e Distribuição de gliomas nos Estados Unidos entre 2004 e 2008 (B). (Agnihotri *et al.*, 2013)

1.2. Glioblastoma (GB)

Glioblastoma (GB), antigamente denominado Glioblastoma Multiforme, corresponde ao tumor mais agressivo do SNC (Agnihotri *et al.*, 2013). A lesão é caracterizada como astrocitomas de grau IV e representa aproximadamente 54% dos tumores astrocíticos e 16% dos tumores primários cerebrais (Figura 1) (Denysenko *et al.*, 2010; Persano *et al.*, 2011; Agnihotri *et al.*, 2013; Ostrom *et al.*, 2013). A idade média dos pacientes diagnosticados com a doença é de 64 anos, sendo a doença mais comum em homens do que em mulheres (razão homem:mulher de 1.58:1) e duas vezes mais frequentes em Caucasianos em relação à Afro-Americanos (Agnihotri *et al.*, 2013; Ostrom *et al.*, 2013).

GBs são altamente infiltrativos e difusos, caracterizados por elevada celularidade, uma variedade de atipias nucleares, intensa atividade mitótica e regiões necróticas em hipóxia contrastando com áreas de angiogênese (Huse, Holland e Deangelis, 2013).

1.2.1. Tratamento

Atualmente, a terapia mais eficaz consiste inicialmente na remoção cirúrgica do tumor, seguido com o tratamento de radio e quimioterapia (Thirant *et al.*, 2012; Li P Fau - Zhou *et al.*, 2013). No entanto, apesar da combinação de diferentes tratamentos, a média de sobrevivência para pacientes com GB é em torno de 15 meses, com invasão e reincidência do tumor dentro de 7 meses após o início da radioterapia (Stupp *et al.*, 2005; Sengupta *et al.*, 2012).

A massa tumoral muitas vezes pode invadir áreas cerebrais funcionais, impossibilitando a ressecção cirúrgica sem que sejam afetadas as atividades motoras e/ou os processos cognitivos, comprometendo de forma inequívoca a qualidade de vida do paciente (Sanai e Berger, 2008). Outro problema relacionado à ressecção cirúrgica é que GBs são tumores altamente infiltrativos e multifocais, dessa forma, nem todas as células tumorais são removidas, e as células restantes são responsáveis pela recorrência do tumor.

Além disso, a resistência a quimioterápicos dificulta o tratamento pós-operatório. GBs são caracterizados por apresentarem uma variedade de

anormalidades genéticas, esta heterogeneidade constitui um desafio terapêutico, porque as células que carregam anormalidades diferentes podem responder de forma diferente à terapia. A desregulação de enzimas celulares e de proteínas transportadoras de membranas, aberrações genômicas e alterações na susceptibilidade a apoptose são responsáveis pela alta incidência de quimio-resistência pelas células tumorais (Bredel *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012).

Desse modo, a resistência às atuais formas de tratamento, aliada a uma elevada taxa de proliferação favorece a rápida progressão da doença, mesmo após a ressecção cirúrgica (Jackson *et al.*, 2001).

1.2.2. Etiologia

A supressão espontânea da apoptose e desregulação da divisão celular constituem nas propriedades mais críticas que uma célula somática adquire no decurso da sua transformação em neoplásica. Alterações genéticas são frequentes nos GBs, incluindo mutações de perda de função ou silenciamento das proteínas p53, p16, Rb e PTEN e mutações de ganho de funções como a amplificação do gene EGFR (Rasheed *et al.*, 1999; Holland, 2000; Maher *et al.*, 2001; Wechsler-Reya e Scott, 2001; Ghosh *et al.*, 2005). Isso resulta em uma desregulação de vias de sinalização intracelulares que acabam levando a um aumento da proliferação, sobrevivência, invasão e angiogênese tecidual.

A hipótese clássica para a formação tumoral é baseada no modelo estocástico (Figura 2a), que prediz que todas as células no tumor possuem potenciais tumorigênicos semelhantes e que qualquer célula teria a capacidade de agir como uma célula iniciadora de tumor (Hanahan e Weinberg, 2000; Persano *et al.*, 2013). Esse modelo considera a massa tumoral como células hiperproliferativas, que, durante a progressão adquiriram mutações, enquanto pressões do microambiente selecionam as células tumorais com diferentes fenótipos, agressividade e potencial tumorigênico (Hanahan e Weinberg, 2000; Persano *et al.*, 2013).

Uma hipótese alternativa, sustentada por evidências crescentes, suporta a ideia que tumores malignos são iniciados e mantidos por uma população de células tumorais que compartilham propriedades biológicas similares com células tronco normais, sendo chamadas de células tronco tumorais (CTT) (Persano *et al.*, 2013). O

suposto modelo hierárquico da progressão tumoral (Figura 2b) sugere que somente a pequena parcela de CTT tem a capacidade de auto-renovação e de diferenciação nos diferentes subtipos que compõem a massa tumoral (Visvader e Lindeman, 2008; Persano *et al.*, 2013). Essa hipótese postula que a população de CTT é capaz de dar origem a toda massa tumoral quando transplantada, e que as células progenitoras perdem essa capacidade (Huntly e Gilliland, 2005; Keith e Simon, 2007). Entretanto, evidências sugerem que células tumorais progenitoras e diferenciadas podem, em algumas circunstâncias, recuperar características de células tronco (Krivtsov *et al.*, 2006; Morrison e Kimble, 2006; Keith e Simon, 2007).

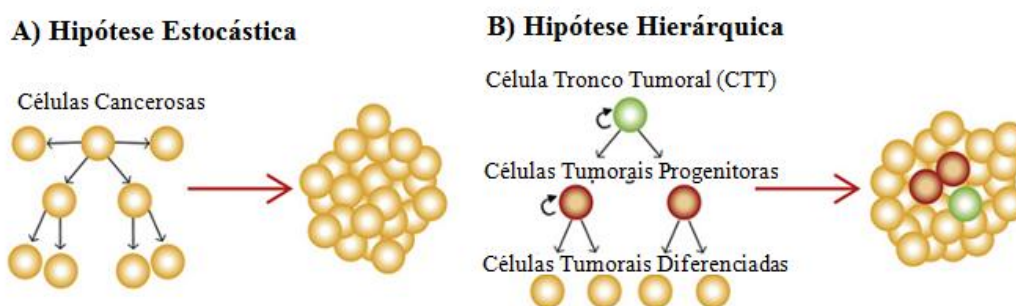


Figura 2: Modelos estocástico e hierárquico da progressão tumoral. Modelo Estocástico (A): todas as células cancerosas possuem habilidades proliferativas semelhantes. Mutações genéticas e sinais do microambiente aplicam pressões evolutivas capazes de selecionar entre células tronco com diferentes fenótipos, agressividade e potencial tumorigênico. Modelo Hierárquico (B): nesse caso, o tumor é composto de uma hierarquia de células gradualmente diferindo das CTT. Somente as CTT são capazes de autorenovação e de diferenciação em células progenitoras. As células progenitoras se proliferam mais rapidamente e podem dar origem a células tumorais diferenciadas. No entanto somente as CTT podem reiniciar a massa tumoral completa quando o tumor é transplantado. Adaptado de (Persano *et al.*, 2013).

1.2.2.1. Caracterização de Células Tronco Tumorais (CTT)

A presença de CTT foi primeiramente reportada em tumores humanos por Ignatova *et al.*, que isolaram precursores clonogênicos de amostras de pacientes com GB e meduloblastoma (Ignatova *et al.*, 2002; Persano *et al.*, 2013). Em seguida, as CTT foram validadas *in vivo* pelo seu potencial tumorigênico em camundongos imunodeficientes (Singh *et al.*, 2004; Persano *et al.*, 2013). As CTT originadas de

GBs expressavam tanto marcadores neuronais e astrogiais de diferenciação quanto de marcadores de células imaturas, como CD133 (também conhecida como prominina-1), Nestina e SOX2 (Ignatova *et al.*, 2002; Hemmati *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2004; Persano *et al.*, 2013).

Uma das características compartilhada com células tronco normais e utilizada para o isolamento de CTT de um pool de células cancerosas é a formação de estruturas esféricas em meio sem soro suplementado com fatores de crescimento determinados de acordo com o tipo celular. As esféricas são colônias de células que se desenvolvem em suspensão, e são resultado da perda da adesão das células com a superfície da placa.

Muitos trabalhos relatam a formação de esféricas em culturas primárias obtidas de amostras de paciente. Li P. Zou descreveu a morfologia de células CD133+ (CTT) quando aderidas na placa, sendo essas células caracterizadas pela perda de processos celulares e pela formação de colônias.

O tamanho das CTT parece estar relacionado com o tipo celular. Análises de morfologia revelaram um aumento em CTT em meduloblastoma (Srivastava e Nalbantoglu, 2008) e redução do tamanho celular em melanoma, glioma e câncer hepático (Kondo, Setoguchi e Taga, 2004; Grichnik *et al.*, 2006) em relação a células CD133⁻.

CTT com as características descritas acima são encontradas em tumores sólidos, incluindo GBs, em que trabalhos demonstram a existência de um pool maior de CTT em regiões tumorais onde há hipóxia, possivelmente resultante de uma sinalização que favorece a manutenção de um fenótipo mais indiferenciado e que induz a desdiferenciação de células tumorais maduras (Soeda *et al.*, 2009; Persano *et al.*, 2011; Li P Fau - Zhou *et al.*, 2013).

2. Hipóxia

As condições de normóxia para células humanas embrionárias ou adultas é em média 8% de Oxigênio molecular (O₂), geralmente variando entre 2,5 a 12% em tecidos cerebrais (Simon e Keith, 2008), substancialmente abaixo dos 20,8% de O₂ da atmosfera (Persano *et al.*, 2011).

Embora GBs sejam altamente vascularizados, eles também apresentam extensas áreas de necrose e hipóxia devido ao rápido crescimento das células tumorais em relação à vasculatura (Persano *et al.*, 2011; Hardee e Zagzag, 2012). Esse fenômeno é comum em tumores sólidos, onde a concentração de O₂ na massa tumoral varia de 2,5 a 5,3%, e pode chegar até abaixo de 0,1% em regiões necróticas, caracterizando um microambiente hipóxico (Ljungkvist *et al.*, 2007; Simon e Keith, 2008; Persano *et al.*, 2011).

Acredita-se que, em condições fisiológicas, nichos hipóxicos parecem ser importantes na regulação do desenvolvimento embrionário, em que gradientes de O₂ são formados por uma difusão limitada de O₂ em tecidos com rápido crescimento (Lane *et al.*, 2001; Keith e Simon, 2007). Já na vida adulta, baixas concentrações de O₂, parecem atuar na manutenção de células indiferenciadas, como na medula óssea, em que a concentração de O₂ varia de 1 a 2% (Cipolleschi, Dello Sbarba e Olivotto, 1993; Keith e Simon, 2007).

2.1. Hipóxia e Morte Celular

Em células normais, a privação de O₂ inibe a fosforilação oxidativa, e dessa forma a síntese de adenosina trifosfato (ATP) é reduzida (Saikumar *et al.*, 1998). A falta de energia resultante inativa a bomba sódio/potássio (Na⁺/K⁺ ATPase), essencial para a manutenção do volume celular, e o alto conteúdo de Na⁺ intracelular promove a entrada de água na célula, levando ao inchaço celular e a morte necrótica com liberação do conteúdo intracelular (Saikumar *et al.*, 1998).

Já células cancerosas são mais predispostas a morte por apoptose em regiões de hipóxia (Hockel e Vaupel, 2001), uma vez que o metabolismo de células tumorais depende fortemente da glicólise para a geração de ATP (Warburg, 1956), a inibição da fosforilação oxidativa tem pouco efeito sobre a síntese de ATP. O início da apoptose é caracterizado pela diminuição da célula, com progressiva condensação e fragmentação do núcleo, a célula se descola da matriz extracelular e inicia-se o processo de formação de corpos apoptóticos contendo organelas e fragmentos de DNA (Silva, 2010). Os corpos apoptóticos formados são então fagocitados e degradados pelas células vizinhas. Entretanto, quando a morte celular por apoptose atinge muitas células, a capacidade de fagocitose do tecido não é suficiente para

comportar o número de células apoptóticas, e ocorre a apoptose tardia (necrose secundária) (Silva, 2010). A apoptose tardia é caracterizada pelo inchaço do citoplasma, ruptura da membrana plasmática e liberação dos componentes intracelulares (Silva, 2010). Dessa forma, a necrose secundária é em parte responsável pelas áreas de necrose em tumores.

Os fatores induzíveis de hipóxia (HIFs) ativam a via apoptótica por meio da p53 em células normais e também em tumorais, no entanto, é comum GBs apresentarem mutações de perda de função da p53 e muitas vezes, em tumores, a apoptose induzida pela carência de O₂ é mediada de outras formas, sendo uma delas através da abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial em uma via independente da p53 (Jakubovicz, Grinstein e Klip, 1987; Lemasters *et al.*, 1997; Lemasters *et al.*, 1999).

2.1. Sinalização de HIF

HIF é um fator de transcrição formado por uma subunidade HIF- α e por uma subunidade HIF- β , também conhecida como translocador nuclear do receptor aril hidrocarboneto (ARNT) (Wang, Jiang e Semenza, 1995; Bruick, 2003).

HIF- α é sintetizado constantemente, porém, em normóxia, é rapidamente degradado (Keith e Simon, 2007). A degradação de HIF- α é desencadeada pela hidroxilação de resíduos de prolina por prolil hidroxilases, cuja atividade é regulada pela concentração de O₂ (Epstein *et al.*, 2001; Bruick, 2003; Keith e Simon, 2007). Após a hidroxilação, HIF- α se liga à proteína supressora de tumor Von Hippel-Lindau (pVHL) (Keith e Simon, 2007), que direciona HIF- α para o proteassomo 26S, onde é degradado (Keith e Simon, 2007) (Figura 3a).

A medida que os níveis de O₂ caem abaixo da faixa fisiológica, inicia-se o processo de estabilização de HIF- α . Uma vez estabilizado, HIF- α é transportado para o núcleo, onde se liga a HIF- β (Wang, Jiang e Semenza, 1995; Bruick, 2003). O complexo formado se liga a elementos responsivos à hipóxia (HREs) dentro do promotor de genes alvo, ativando a transcrição gênica (Bruick, 2003) (Figura 3b).

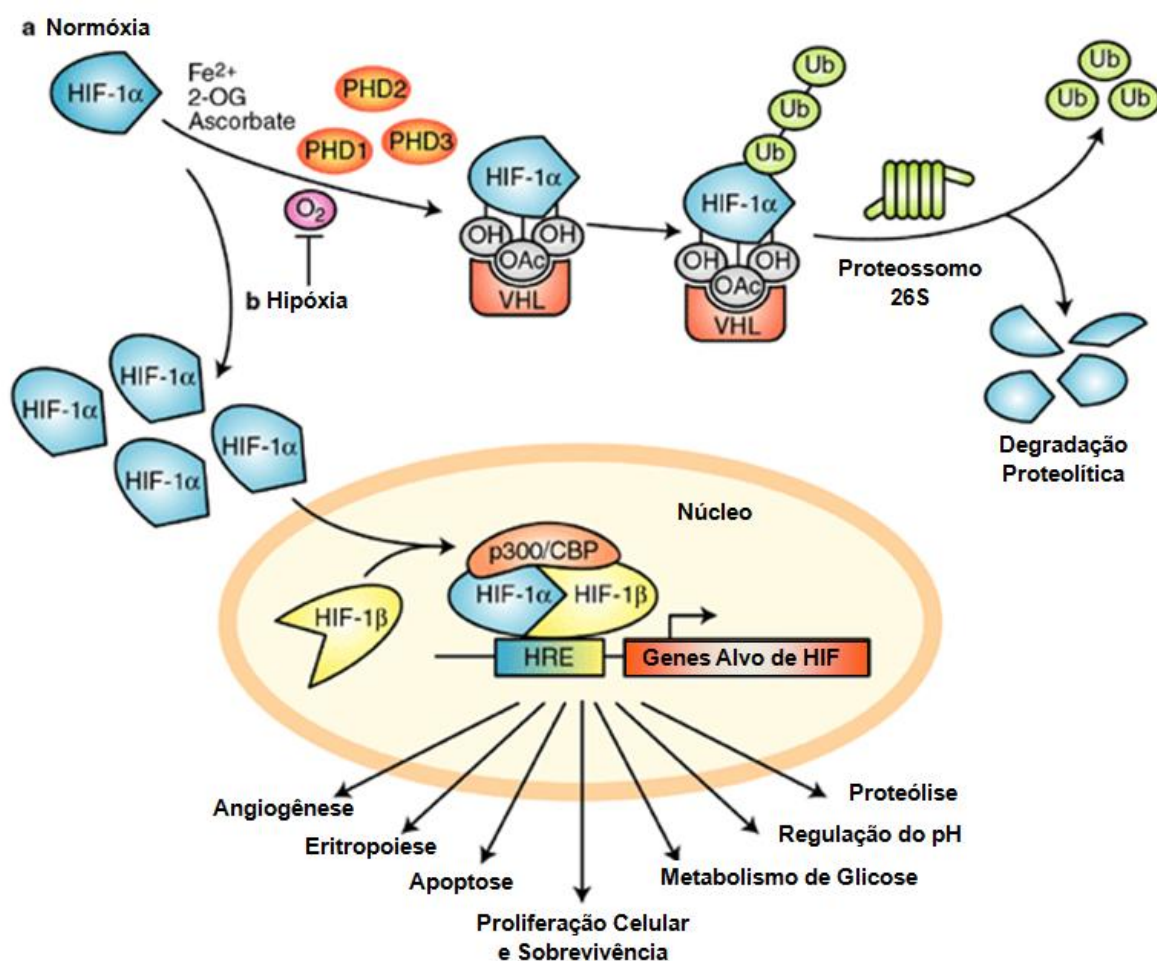


Figura 3: Esquema representativo da Via de Sinalização de HIF. Sinalização de HIF frente a Normóxia (A): A subunidade HIF- α é rapidamente hidroxilada por prolinas hidroxilases, e em seguida se liga ao pVHL. A ligação permite o reconhecimento do complexo por uma ubiquitina ligase, que encaminha HIF- α para degradação em proteossomos. Sinalização de HIF em resposta à Hipóxia (B): HIF- α é estabilizado e translocado para o núcleo, onde se liga a subunidade HIF- β . O complexo se liga a HREs e inicia o processo de transcrição gênica. Adaptado de (Carroll e Ashcroft, 2005).

2.1.1. Sinalização do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

A síntese do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) é fortemente estimulada pela hipóxia, sendo VEGF um dos principais alvos de HIF (Figura 4). O aumento de VEGF também é provocado através da estabilização do RNA mensageiro (mRNA) mediado pela proteína HuR (Levy *et al.*, 1998), e através de um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES) que garante a tradução de VEGF

mesmo em condições adversas (hipóxia) (Stein *et al.*, 1998). Além disso, VEGF é regulado através de modificações pós-transcricional por meio da pVHL, que encaminha o mRNA de VEGF para degradação (Gnarra *et al.*, 1996).

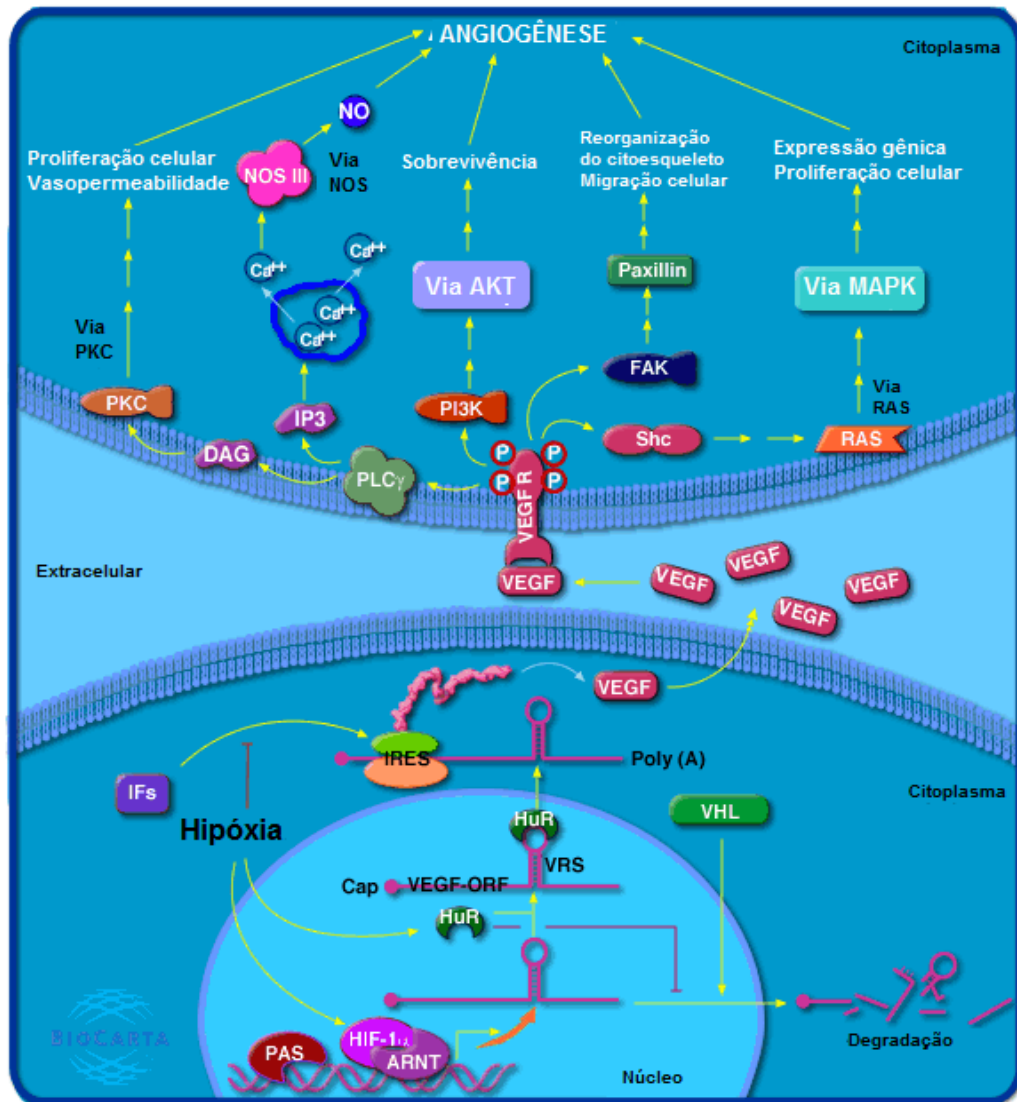


Figura 4: Esquema representativo da via de Sinalização de VEGF. O aumento de VEGF é regulado no nível transcricional (HIF), pós-transcricional (HuR e pVHL) e traducional (IRES) e sua expressão aumenta com a Hipóxia. Em células endoteliais, VEGF se liga ao receptor extracelular e promove a proliferação, migração e invasão de células endoteliais para a formação de novos vasos. Imagem adaptada de biocarta.

O VEGF promove o aumento da proliferação, migração e invasão de células endoteliais para a formação de novos vasos (Kaur *et al.*, 2005). Embora a secreção de

VEGF e de outros fatores pró-angiogênicos em GBs leve a uma forte resposta angiogênica, a vasculatura tumoral resultante é anormal, exibindo vazamentos devido a uma elevada permeabilidade vascular, espessamentos focais de paredes vasculares e formação de glomerulóides originados de proliferação microvascular excessiva (Brat e Van Meir, 2001; Kaur *et al.*, 2005). A vasculatura tumoral também exhibe ramificações aberrantes, "shunts" arteriovenosos, fluxo sanguíneo reduzido e pouca estabilidade estrutural. Conseqüentemente, eventos trombóticos resultantes de fluxo sanguíneo limitado e da obstrução dos vasos pela expansão tumoral contribuem ainda mais para a criação de regiões hipóxicas (Kaur *et al.*, 2005).

VEGF não só é associado com o aumento da massa e da progressão tumoral através da atuação em células endoteliais, mas também através de uma via de sinalização autócrina. Foi demonstrado que VEGF em tumores é responsável pela manutenção de um fenótipo característico de CTT (Hamerlik *et al.*, 2012), pela proliferação celular (Knizetova *et al.*, 2008), pela invasão de células tumorais (Bachelder, Wendt e Mercurio, 2002) e por aumento de resistência contra radioterapia (Knizetova *et al.*, 2008).

2.2. Contribuição da Hipóxia para a Progressão Tumoral

Frequentemente a hipóxia em tumores está associada a um prognóstico ruim através do aumento da resistência e da agressividade do câncer.

Devido ao rápido crescimento tumoral, a difusão de O₂ diminui a medida que a distancia dos capilares aumenta, criando um gradiente decrescente de O₂, que é acompanhado por aumento nos níveis de HIF- α e uma diminuição no pH extracelular.

Além de VEGF, outros fatores pró-angiogênicos contribuem para a progressão tumoral. A estabilização de HIF- α em gliomas estimula a expressão de adrenomedulina-1 (ADM-1) (Kitamuro *et al.*, 2000; Kaur *et al.*, 2005), e em outros tumores a expressão de endotelina-1 (ET-1) (Hu *et al.*, 1998) e do inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1) (Kietzmann *et al.*, 2003).

Nichos hipóxicos em tumores também promovem alterações no metabolismo glicolítico. Uma vez que a oxidação fosforilativa é reduzida pela carência de O₂,

HIF- α promove a expressão de enzimas que favorecem a via glicolítica, como o transportador de glicose do tipo 1 (GLUT-1) e a aldolase A (ALDA), além de inibir o metabolismo mitocondrial através da enzima piruvato desidrogenase quinase 1 (PDK1) (Xu *et al.*, 2005). A PDK1 fosforila e inativa o complexo piruvato desidrogenase mitocondrial (PDH), que inibe a conversão de piruvato a acetil-CoA, atenuando a função e a respiração mitocondrial (Kim e Dang, 2006).

Evidências sugerem que nas regiões tumorais onde há hipóxia, ocorre a desdiferenciação de células tumorais maduras para CTT (Soeda *et al.*, 2009; Persano *et al.*, 2011; Li P Fau - Zhou *et al.*, 2013). A atividade de HIF- α em células tumorais pode estimular a expressão ou atividade de produtos gênicos incluindo Notch, Oct4, c-Myc e SOX2 (Kehler *et al.*, 2004; Wilson e Radtke, 2006; Gordan *et al.*, 2007; Li P Fau - Zhou *et al.*, 2013), que podem promover um estado semelhante a células tronco, incluindo a capacidade de autorenovação e diferenciação celular.

Nichos hipóxicos também parecem estar relacionados com a estimulação de propriedades migratórias de células cancerosas. Foi demonstrado que HIF- α tem a capacidade de estimular a expressão de metaloproteinases de matriz (MMP) e assim como VEGF, tem a capacidade de promover receptores associados com a migração celular como CXCR4 (Cronin, Wang e Redmond, 2010; Coma, Shimizu e Klagsbrun, 2011; Persano *et al.*, 2011). As MMP são responsáveis pela digestão da matriz extracelular, e assim, facilitam a migração celular, a formação de novos vasos e, conseqüentemente, a expansão tumoral (Kaur *et al.*, 2005).

Além de serem supostamente as principais responsáveis pela reincidência da doença após a cirurgia de remoção do tumor, as CTT também são relacionadas com maior resistência a quimioterápicos. Algumas CTT expressam transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) na superfície celular, um traço compartilhado com células tronco hematopoiéticas (Comerford *et al.*, 2002; Keith e Simon, 2007). Esses transportadores são responsáveis pela multi-resistência a drogas (MDR) observada em diversas linhagens celulares, através do bombeamento de quimioterápicos para o exterior da célula.

Outro fator associado a hipóxia que contribui para um prognóstico ruim para pacientes com GB é a insensibilidade a radioterapia. A presença de O₂ aumenta a lesão ao DNA através da formação de ROS, dessa forma, a dose necessária de radiação para atingir o mesmo efeito biológico seria três vezes maior na ausência de

O₂ do que em normóxia (Spence *et al.*, 2008; Persano *et al.*, 2011). Evidências também indicam que o VEGF contribui para a radiorresistência (Knizetova *et al.*, 2008), e que mudanças no proteoma e no genoma induzidas pela hipóxia tem um impacto significativo na resistência à radioterapia, através do aumento de proteínas de choque térmico ou pelo aumento do número de células com potencial apoptótico reduzido, ambas situações correlacionadas com radiorresistência (Spence *et al.*, 2008; Persano *et al.*, 2011).

Modelos *in vitro* baseados em linhagens celulares envolvem a incubação das culturas em diferentes tempos em câmaras de hipóxia (Ghafar *et al.*, 2003; Li P Fau - Zhou *et al.*, 2013). Esses estudos demonstram um perfil similar ao *in vivo*, caracterizado pela expressão de marcadores de hipóxia HIF- α e VEGF, por células identificadas com marcadores de células imaturas, pela redução de células com marcadores de células diferenciadas (Li P Fau - Zhou *et al.*, 2013) e pela resistência a quimioterapia (Ghafar *et al.*, 2003).

Uma vez que a concentração limitada de O₂ parece ser importante na progressão tumoral e na resistência aos tratamentos atuais, a criação de estratégias antitumorais mais eficientes contra GB requer o estudo da doença leve em consideração a carência de O₂.

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo Geral

Mimetizar o microambiente tumoral *in vitro*, caracterizado pela privação de oxigênio (PO), em células de glioma de rato (C6) .

II.2. Objetivos Específicos

II.1.1. Estabelecer uma curva de tempo de privação de oxigênio *in vitro*.

II.1.2. Avaliar as mudanças morfológicas induzidas pela PO

III.1.3 Avaliar morte celular induzida pela PO

II.1.4. Avaliar marcadores de hipóxia.

III. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo a ser submetido no periódico Plos One.

EFFECT OF OXYGEN DEPRIVATION ON C6 RAT GLIOMA CELL LINE

Mariana Silva dos Santos¹, Mariana Maier Gaelzer¹, Bárbara Paranhos Coelho¹, Alice Hoffman de Quadros¹, Silvia Resende Terra¹, Guido Lenz, Christianne Gazzana Salbego¹.

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

²Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

* Corresponding author:

Mariana Silva dos Santos

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

Telephone: +55 (51) 3308.5547

Fax: +55 (51) 3308.5535

E-mail: mariana.sdossantos@gmail.com

Funding: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Conflict of interest: The *authors declare* that there are no *conflicts of interest*.

Abstract

Glioblastomas (GBs) are the most frequent and malignant tumors of the Central Nervous System. VEGF expression is induced by hypoxia and, in tumor cells, this growth factor was shown to induce cell proliferation, to stimulate cell invasion, to increase resistance against radiotherapy and to maintain cells in an undifferentiated state of supposed cancer stem cells. The aim of this study was to validate a protocol that mimics the hypoxic microenvironment in vitro, characterizing the cell death and analyzing the possible morphological changes induced by oxygen deprivation in rat C6 glioma cells. Cells were exposed to oxygen deprivation (OD) in 5% fetal bovine serum (FBS) medium or serum free medium for 15min, 1h and 3h. Cell death and morphology were evaluated by microscopy. Flow cytometry was used to evaluate size and granularity of cells, cell death, and number of cells expressing VEGF and its receptor FLK-1/VEGFR-2. For cells in 5% FBS medium, apoptosis increased at all times of OD. Cells exposed to serum free media showed increased apoptosis at 1h and 3h OD. Changes in morphology were observed after OD and were more prominent in the serum free medium group. Expression of both VEGF and its receptor (FLK-1/VEGFR-2) remained unchanged with OD exposure. Our protocol of in vitro oxygen deprivation induced apoptosis and morphological changes in C6 glioma cells, recreating some of the characteristics present in the hypoxic microenvironment. The cancer stem cells are proposed to be responsible for the tumor self-renewal after surgical resection, and for the chemo- and radio-resistance of glioblastomas. Thus, a protocol that enables the selection of these types of cells is crucial in the screening of drugs, in order to create more effective treatments against this resistant population of cancer.

Keywords: cancer, glioma, hypoxia, in vitro

1. Introduction

Glioblastomas (GBs) are the most frequent and malignant tumors of the Central Nervous System [1,2] and currently the most efficient strategy for the disease treatment consists in surgical removal of the tumor, followed by concomitant radiotherapy and chemotherapy [3,4]. However, despite combination of different treatments, the average survival for GB patients is 15 months, with tumor recurrence and invasion within 7 months after the beginning of radiotherapy [5,6]. GBs show a variety of genetic abnormalities, and this heterogeneity constitutes a therapeutic challenge, since the cancer cells can respond differently to treatment. Mutations in cellular enzymes and membrane transporters, genomic aberrations and alterations in susceptibility to apoptosis are responsible for the high incidence of chemoresistance in tumoral cells [7,8].

GBs have an elevated proliferation rate, and although they are highly vascularized, they have extensive areas of necrosis and hypoxia due to rapid cell growth in relation to vascularization [2,9]. Frequently, hypoxic tumors are associated with a poor prognosis due to increased resistance and aggressiveness of cancer cells [10].

Hypoxic niches favor tumor progression through cellular responses to low concentrations of O_2 that are regulated by transcription factors called hypoxia inducible factors (HIF). Stabilization of the HIF- α subunit alters the expression of genes related to cell survival, metabolism, angiogenesis, migration and invasion [10-12].

Vascular endothelial growth factor (VEGF), one of the main targets of HIF- α , is frequently used as a marker of hypoxia and promotes proliferation, migration and invasion of endothelial cells for the formation of new blood vessels [13]. In tumor cells, VEGF was shown to induce cell proliferation [14], to stimulate cell invasion [15], to increase resistance against radiotherapy [14] and to maintain tumor cells in an undifferentiated state of supposed cancer stem cells (CSC) [16]. The presence of CSCs was first reported in human tumors by Ignatova et al.[17] who isolated clonogenic precursors of samples from patients with GB and Meduloblastoma [18]. CSCs have the ability to originate the tumor mass when transplanted, and not only

are they related to an increase in chemotherapy resistance, but they also initiate tumor invasion and stimulate migration of differentiated cancer cells [19,20].

Therefore, the aim of this study is to validate a protocol that mimics the hypoxic microenvironment in vitro, characterizing the cell death, analyzing the possible morphological changes and hypoxic cell markers induced by oxygen deprivation in rat C6 glioma cells.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Materials

Cell culture media and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Gibco-Invitrogen (Grand Island, NY, USA). Propidium iodide (PI) was obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). All other reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) or Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals and solvents used were of analytical or pharmaceutical grade.

2.2. Cell Culture

C6 rat glioma cell line was obtained from American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, Md., USA). Cells were grown and maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplemented with 5% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, USA), containing 2.5 mg/mL of Fungizone® and 100 U/L of gentamicine (Shering do Brasil, São Paulo, SP, Brazil). Cells were incubated at a temperature of 37°C, a minimum relative humidity of a 5% CO₂ atmosphere. Experiments throughout this study were conducted either in serum-free DMEM or serum supplemented DMEM.

2.3. Experimental Groups

Experiments were carried out in two groups: the first group was composed of cells that received conventional media supplemented with 5% FBS, the second group consisted of cells that received serum free media during incubation in normoxia or in oxygen deprivation. Each group was further divided in four subgroups: Control , 15min OD, 1h OD and 3h OD.

2.4 Oxygen Deprivation (OD)

Oxygen Deprivation (OD) was achieved according to the method described by Strasser and Fischer [21] with some modifications [22]. OD was based on the substitution of O₂ with N₂. C6 glioma cells were seeded at 4.5 x 10³ cells per well in DMEM/ 5% FBS in six well plates and grown for 72 hours until they reached a confluence of 60%. Following 72h, the group that received serum during OD had its medium replaced by DMEM with 5% FBS previously bubbled with N₂ for 30 min; the group that didn't receive serum had its medium replaced by serum-free DMEM, also previously bubbled with N₂ for 30 min. Then, plates were immediately transferred to a hermetic chamber at 37°C in a N₂-enriched atmosphere for 15min, 1h or 3h. Meanwhile, control slices were maintained in an incubator with 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

2.5. Cell Death and Morphology Analysis by Microscopy

To identify cellular death and to analyze cell morphology, 5 µM propidium iodide (PI) was added to the cultures for 15 min after the OD. PI fluorescence was excited at 515-560 nm using an inverted microscope (Nikon Eclipse TE300) fitted with a standard rhodamine filter. Images were captured using a digital camera connected to the microscope and analyzed using ImageJ software (v.1.6.0).

Cellular death was also analysed by DAPI staining. After the times of OD, cell media was removed and plates were washed three times with ice-cold Phosphate Buffered Saline (PBS). Then, cells were permeabilized and fixed with 2mL ethanol

and acetic acid 3:1 for 60 min, and DAPI (5×10^{-3} mg/mL) was added to the wells. After 1h, DAPI fluorescence was detected using an inverted microscope with a standard UV/Blue Cyan filter set.

2.6. Flow Cytometry Analysis

Flow Cytometry was used to evaluate size and granularity of cells, cell death, and number of cells expressing VEGF and its receptor FLK-1/VEGFR-2. After oxygen deprivation, culture medium and cells were harvested from cell culture plates by treatment with trypsin. Cells were then evaluated for size and granularity, stained with dyes or incubated with the proper antibodies for flow cytometry analysis using a FACSCalibur (Becton Dickinson). Analysis was performed by the FCS Express 4 software (De Novo Software™). Each analysis included at least 10,000 events.

2.6.1. Cell Death Analysis

Apoptotic and necrotic cell death were analyzed by flow cytometry by double staining with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated annexin V and PI for 20min in which annexin V binds to exposed phosphatidylserine in apoptotic cells (Annexin+/Pi-), while PI stains necrotic cells (Annexin-/Pi+) with membrane damage. Positive Cells for both Annexin V and PI were classified as late apoptosis (Annexin+/Pi+), while cells negative for both stains were considered viable cells (Annexin-/Pi-). Staining was performed according to the manufactures instructions (BD Pharmingen, San Diego, CA).

2.6.2. Detection of VEGF and VEGFR

After fixation with 4% paraformaldehyde (4% PBS/PFA) for 20 min, cells were permeabilized with Triton X-100 (0.1%) and incubated with the primary antibody mouse anti-VEGF (1:100, Santa Cruz) or mouse anti-FLK1 (1:100, Santa Cruz) for 30min. Then the second antibody Alexa Fluor® 488 Anti-Mouse (1:100, Invitrogen) was added to the test tubes and after 60 min of incubation cells were analyzed by flow cytometry for presence of VEGF or FLK-1/VEGFR-2.

2.7. Statistical Analysis

Data are expressed as means \pm SEM. All results are representative of at least 3 independent experiments. One-Way ANOVA was applied to the means. Post-hoc comparisons were performed by Tukey's test. Differences between mean values were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. OD treatment induces apoptotic cell death.

To characterize the type of cell death occurring in OD, cells were stained with Annexin V and PI, and flow cytometry analysis was performed (Fig 1 and 2). For cells in 5% FBS or in serum free group, apoptosis increased at 1h and 3h OD (Fig 1 and 2). Little PI staining was observed in cells exposed to OD and pyknotic nuclei was detected in all OD groups by DAPI staining (Fig 3 and 4).

3.2. OD induces morphological changes in C6 cell line.

Immediately after OD, cells were observed with an inverted microscope for morphological changes. The control group in 5% FBS displayed cells with a semi-triangular body with long and thick cellular processes, and it was observed a few cells without a clear cytoplasm and nucleus division (Fig. 5). At 15 min OD, 5% FBS cells had less processes, they appeared more round (more undifferentiated) and there was an increase in granularity. At 1h OD, 5% FBS the increase in granularity was higher, and cells had few and shorter processes, a halo was formed around the cells (indicating an incomplete detachment from the culture plate), and they had a clear cytoplasm and nucleus division. At 3h OD, there was an increase in the number of round cells and a few cells with a fibroblastic shape.

The control group in serum free medium displayed cells with reduced cytoplasm and cells with longer and thinner processes (Fig. 5). At 15 min OD, cells in serum free medium had a reduction in cell processes, had a more fibroblastic morphology, showed an increase in granularity, and there were cells initiating a

transformation from fibroblasts to a round shape (dedifferentiation process). At 1h, there was an increase in the number of round cells, with high granularity and thinner cellular processes. At 3h OD, cells remained with the same morphology as 1h OD, except the cells were less granular.

Parameters of cell size and granularity were measured by flow cytometry and plotted against markers of cell death. Cells were divided in three subpopulations based on size: small (S), medium (M) and large (L). Most viable cells in 5% FBS were medium sized, contrasting with dead cells, which were usually larger (Fig. 6). Control 5% SFB population was characterized mostly by medium sized cells, with a pool of larger cells. The size of viable cells remained unchanged with OD, except for 3h, in which the number of M viable cells significantly increased. For cells in serum free medium, in the control subgroup nearly all viable and dead cells were classified as medium sized (Fig. 7). After 3h OD, there was a decrease in S viable cells, with a concomitant increase in M size viable cells. With 1h OD, there was also a decrease in S and M viable cells and an increase in L size dead cells.

To evaluate distribution of granularity between viable and dead cells, cells were divided in two subpopulations based on flow cytometry analysis: regular granularity (G1) and increased granularity (G2). Most viable cells in 5% FBS fell in the G1 range, contrasting with dead cells, which were usually more granular, and OD did not alter the cell granularity in the flow cytometry analysis (Fig. 8). OD in serum free group, on the other hand, caused an increase in granularity of viable and dead cells at 15 min and 1h (Fig. 9).

Morphological changes occurred in both viable and dead cells. These changes in morphology were observed after OD and were more prominent in the serum free medium group. These results indicate a possible process of dedifferentiation in cells exposed to OD.

3.3. OD effect on the expression of VEGF or VEGFR

Cells were analyzed for the expression of VEGF and its receptor VEGFR using flow cytometry. Our results indicate there is no significant difference between cells exposed to OD and control cells (Fig. 10 and 11). This suggests that OD did not increase the number of cells expressing VEGF or FLK-1/VEGFR-2.

4. Discussion

The hypoxic microenvironment is characterized by the presence of cell death and by the induction of dedifferentiation of resistant cells [10-12]. Exposure of C6 glioma cells to OD caused apoptosis and induced morphological changes.

One of the key characteristics that differentiate apoptosis and necrosis is cell size: apoptotic cells usually shrink in relation to normal cells, while necrotic cells tend to dilate and burst. Our results however, indicate that most apoptotic cells are actually larger in 1h OD. This difference in cell size could be explained by a decrease in pH due to an elevated anaerobic glucose metabolism induced by low O₂, which generates lactic acid. This low pH could also be responsible for activating apoptotic signaling pathways observed in OD exposed cells [16]. Previous studies suggest that proton pumps and pH regulation play a role in apoptosis signaling [28]. Increased activity of the Na⁺ transporters, could initially cause water to flow in, resulting in cell swelling. In an attempt to maintain homeostasis, this elevated intracellular Na⁺ would be subsequently exchanged for Ca²⁺ via the Na⁺/Ca²⁺ exchanger, generating a Ca²⁺ overload. In this scenario, the mechanism by which apoptosis is activated through Ca²⁺ is by the induction of the mitochondrial permeability transition pore [17,18]. This would explain how a decrease in pH could lead to cellular swelling and apoptosis.

Studies demonstrate that in tumoral hypoxic regions there is a process of dedifferentiation from mature tumor cells to stem cells. During this process, the mature cells become more fibroblastic, with reduction of cellular processes and increase in granularity. From this fibroblastic phenotype, the cells could transform into a stem cell phenotype, characterized by cells with a round shaped body [23]. In this study, we observed morphological changes stimulated by OD that resembles a process of cell dedifferentiation of the resistant cells: increased granularity, reduction of cellular processes, and presence of round cells partially deattached from culture plates [24,25]. This could indicate a transformation from differentiated cells to cancer stem cells. CSCs are described as being smaller cells [26], although some studies have shown that these types of cells have an increase in size [27]. The flow cytometry analysis of our study revealed an increase in cell size in the serum free

group exposed to 1h and 3h OD. This could be a characteristic of glioma CSCs, since there are few studies demonstrating the size of this type of cell.

Hypoxia causes the stabilization of the HIF- α subunit, which alters the expression of genes related to cell survival, metabolism, angiogenesis, migration and invasion [10-12]. VEGF, one of HIF-target genes, is frequently used as a marker of hypoxia. VEGF in tumors is responsible for the maintenance of a phenotype characteristic of CSCs [16], for the increase of tumoral cell invasion [15] and for the increase of resistance to radiotherapy [14]. Expression of both VEGF and its receptor (FLK-1/VEGFR-2) remained unchanged with OD exposure. This could be explained by a delay in VEGF protein synthesis, since in C6 cells it was shown that induction of VEGF expression occurred only after 3h of hypoxia [28]. This could consequently have a delay in VEGFR protein synthesis, since FLK-1/VEGFR-2 expression is induced by VEGF [29].

5. Conclusion

Our protocol of in vitro oxygen deprivation induced apoptosis and morphological changes in C6 glioma cells in 1h and 3h OD. The morphological changes observed resemble a process of cell dedifferentiation and indicates a possible transformation of the differentiated cells to cancer stem cells. Although the durations of OD used in this study did not alter the protein expression of VEGF and its receptor FLK-1/VEGFR-2, our protocol was able to induce some of the characteristics present in the hypoxic microenvironment.

The cancer stem cells are supposed to be responsible for the tumor self-renewal after surgical resection, and for the chemo- and radio-resistance of glioblastomas. The screening of drugs that are effective against this resistant population requires the selection of these types of cells.

6. Acknowledgements

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

7. References

1. Denysenko T, Gennero L, Roos MA, Melcarne A, Juenemann C, et al. (2010) Glioblastoma cancer stem cells: heterogeneity, microenvironment and related therapeutic strategies. *Cell Biochem Funct* 28: 343-351.
2. Persano L, Rampazzo E, Della Puppa A, Pistollato F, Basso G (2011) The three-layer concentric model of glioblastoma: cancer stem cells, microenvironmental regulation, and therapeutic implications. *ScientificWorldJournal* 11: 1829-1841.
3. Thirant C, Galan-Moya EM, Dubois LG, Pinte S, Chafey P, et al. (2012) Differential proteomic analysis of human glioblastoma and neural stem cells reveals HDGF as a novel angiogenic secreted factor. *Stem Cells* 30: 845-853.
4. Li P, Zhou C, Xu L, Xiao H (2013) Hypoxia enhances stemness of cancer stem cells in glioblastoma: an in vitro study. *Int J Med Sci* 10: 399-407.
5. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, et al. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987-996.
6. Sengupta S, Marrinan J, Frishman C, Sampath P (2012) Impact of temozolomide on immune response during malignant glioma chemotherapy. *Clin Dev Immunol* 2012: 831090.
7. Bredel M, Scholtens DM, Yadav AK, Alvarez AA, Renfrow JJ, et al. (2011) NFKBIA deletion in glioblastomas. *N Engl J Med* 364: 627-637.
8. Yu H, Park J, Lee J, Choi K, Choi C (2012) Constitutive Expression of MAP Kinase Phosphatase-1 Confers Multi-drug Resistance in Human Glioblastoma Cells. *Cancer Res Treat* 44: 195-201.
9. Hardee ME, Zagzag D (2012) Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *Am J Pathol* 181: 1126-1141.
10. Keith B, Simon MC (2007) Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell* 129: 465-472.
11. Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 721-732.
12. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM (2006) Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441: 437-443.
13. Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ, et al. (2005) Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol* 7: 134-153.
14. Knizetova P, Ehrmann J, Hlobilkova A, Vancova I, Kalita O, et al. (2008) Autocrine regulation of glioblastoma cell cycle progression, viability and radioresistance through the VEGF-VEGFR2 (KDR) interplay. *Cell Cycle* 7: 2553-2561.
15. Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM (2002) Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res* 62: 7203-7206.
16. Hamerlik P, Lathia JD, Rasmussen R, Wu Q, Bartkova J, et al. (2012) Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth. *J Exp Med* 209: 507-520.

17. Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, et al. (2002) Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 39: 193-206.
18. Persano L, Rampazzo E, Basso G, Viola G (2013) Glioblastoma cancer stem cells: role of the microenvironment and therapeutic targeting. *Biochem Pharmacol* 85: 612-622.
19. Karamboulas C, Ailles L (2013) Developmental signaling pathways in cancer stem cells of solid tumors. *Biochim Biophys Acta* 1830: 2481-2495.
20. Swamydas M, Ricci K, Rego SL, Dreau D (2013) Mesenchymal stem cell-derived CCL-9 and CCL-5 promote mammary tumor cell invasion and the activation of matrix metalloproteinases. *Cell Adh Migr* 7: 315-324.
21. Strasser U, Fischer G (1995) Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *J Neurosci Methods* 57: 177-186.
22. Cimarosti H, Rodnight R, Tavares A, Paiva R, Valentim L, et al. (2001) An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. *Neurosci Lett* 315: 33-36.
23. Azari H, Millette S, Ansari S, Rahman M, Deleyrolle LP, et al. (2011) Isolation and expansion of human glioblastoma multiforme tumor cells using the neurosphere assay. *J Vis Exp*: e3633.
24. Balla MM, Vemuganti GK, Kannabiran C, Honavar SG, Murthy R (2009) Phenotypic characterization of retinoblastoma for the presence of putative cancer stem-like cell markers by flow cytometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: 1506-1514.
25. Li P, Fau - Zhou C, Zhou C, Fau - Xu L, Xu L, Fau - Xiao H, Xiao H (2013) Hypoxia enhances stemness of cancer stem cells in glioblastoma: an in vitro study.
26. Grichnik JM, Burch JA, Schulteis RD, Shan S, Liu J, et al. (2006) Melanoma, a tumor based on a mutant stem cell? *J Invest Dermatol* 126: 142-153.
27. Srivastava VK, Nalbantoglu J (2008) Flow cytometric characterization of the DAOY medulloblastoma cell line for the cancer stem-like phenotype. *Cytometry A* 73: 940-948.
28. Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W (1995) Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 270: 19761-19766.
29. Man XY, Yang XH, Cai SQ, Bu ZY, Wu XJ, et al. (2009) Expression and localization of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in human epidermal appendages: a comparison study by immunofluorescence. *Clin Exp Dermatol* 34: 396-401.

8. Subtitles

Figure 1: OD treatment induces apoptotic cell death in 5% FBS Media. Representative dot plot analysis from flow cytometry (A). Classification and quantification of cell death (B). Data are represented as means \pm SEM (n=6). *p<0.005 compared to respective control, one-way ANOVA followed by Turkey's test.

Figure 2: OD treatment induces apoptotic cell death in serum free media. Representative dot plot analysis from flow cytometry (A). Quantification of cell death (B). Data are represented as means \pm SEM (n=6) *p<0.005 compared to respective control, one-way ANOVA followed by Turkey's test.

Figure 3: Representative photomicrographs of cells in 5% FBS medium stained with PI and DAPI. Arrows indicate non-apoptotic nuclei and arrow-heads indicate pyknotic nuclei.

Figure 4: Representative photomicrographs of cells in serum free medium stained with PI and DAPI. Arrows indicate non-apoptotic nuclei and arrow-heads indicate pyknotic nuclei.

Figure 5: Representative photomicrographs showing morphological changes induced by OD in 5% FBS and Serum-Free medium. 1- Semitriangular body; 2-long and thick prolongaments; 3- Clear cytoplasm and nucleus division not apparent; 4- Round cells with fewer cellular processes; 5- Increase in granularity; 6 - Halo around cells; 7 - Thin cellular processes; 8 - Clear division of cytoplasm and nucleus; 9 - cells with reduced cytoplasm; 10 - long thin processes;

Figure 6: Cell size in apoptotic cells of OD in 5% SFB group. Cells were stained with Annexin IV and PI and categorized in three sizes: small [S], medium [M] and large [L]. Representative dot plot analysis from flow cytometry (A). Distribution of size in viable and dead cells in Control and OD (B). Data are represented as

means \pm SEM (n=6). *p<0.005 compared to respective control, one-way ANOVA followed by Turkey's test.

Figure 7: Cell size in apoptotic cells of OD subgroups in Serum Free group. Cells were stained with Annexin IV and PI and categorized in three sizes: small [S], medium [M] and large [L]. Representative dot plot analysis from flow cytometry (A). Distribution of size in viable and dead cells in Control and OD (B). Data are represented as means \pm SEM (n=6). *p<0.005 compared to respective control, one-way ANOVA followed by Turkey's test.

Figure 8: Correlation between apoptosis and granularity in OD 5% FBS. Cells were stained with Annexin IV and PI and categorized based on their granularity: regular [G1], granular[G2]. Representative dot plot analysis from flow cytometry (A) Distribution of granularity in viable and dead cells in Control and OD (B). Data Data are represented as means \pm SEM (n=6). *p<0.005 compared to respective control, one-way ANOVA followed by Turkey's test.

Figure 9: Granularity increase in apoptotic cells of OD subgroups in Serum Free group. Cells were stained with Annexin IV and PI and categorized based on their granularity: regular [G1], granular[G2]. Representative dot plot analysis from flow cytometry (A) Distribution of granularity in viable and dead cells in Control and OD (B). Data are represented as means \pm SEM (n=6). *p<0.005 compared to respective control, one-way ANOVA followed by Turkey's test.

Figure 10: Effect of OD in VEGF expression in C6 cell line. Expression of VEGF in 5% FBS (A) Expression of VEGF in Serum-Free Media (B). Data are represented as means \pm SEM (n=3). *p<0.005 compared to respective control, one-way ANOVA followed by Turkey's test.

Figure 11: Effect of OD in VEGFR expression in C6 cell line. Expression of VEGFR in 5% FBS (A) Expression of VEGFR in Serum-Free Media (B). Data are represented as means \pm SEM (n=3). *p<0.005 compared to respective control, one-way ANOVA followed by Turkey's test.

9. Figures

Fig. 1.

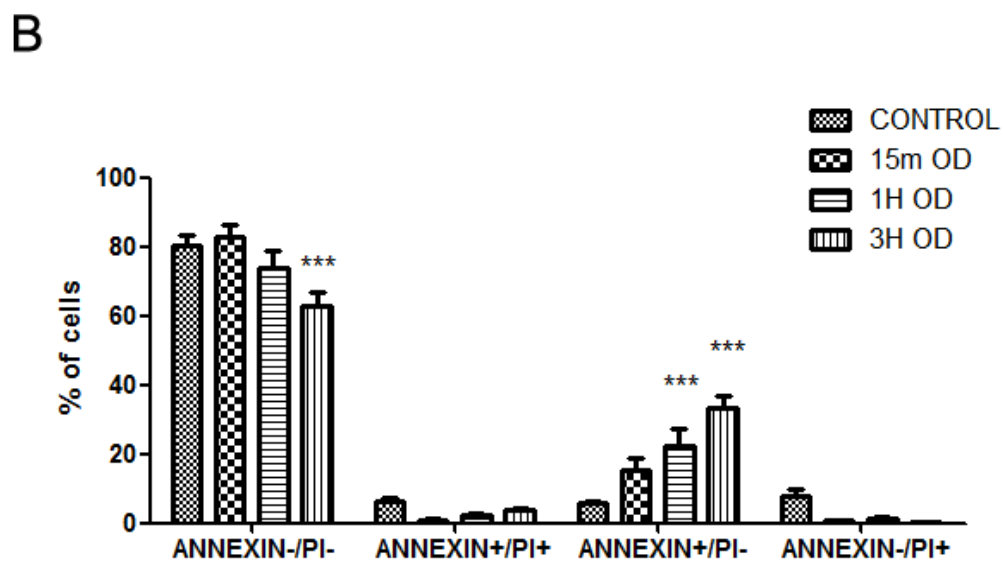
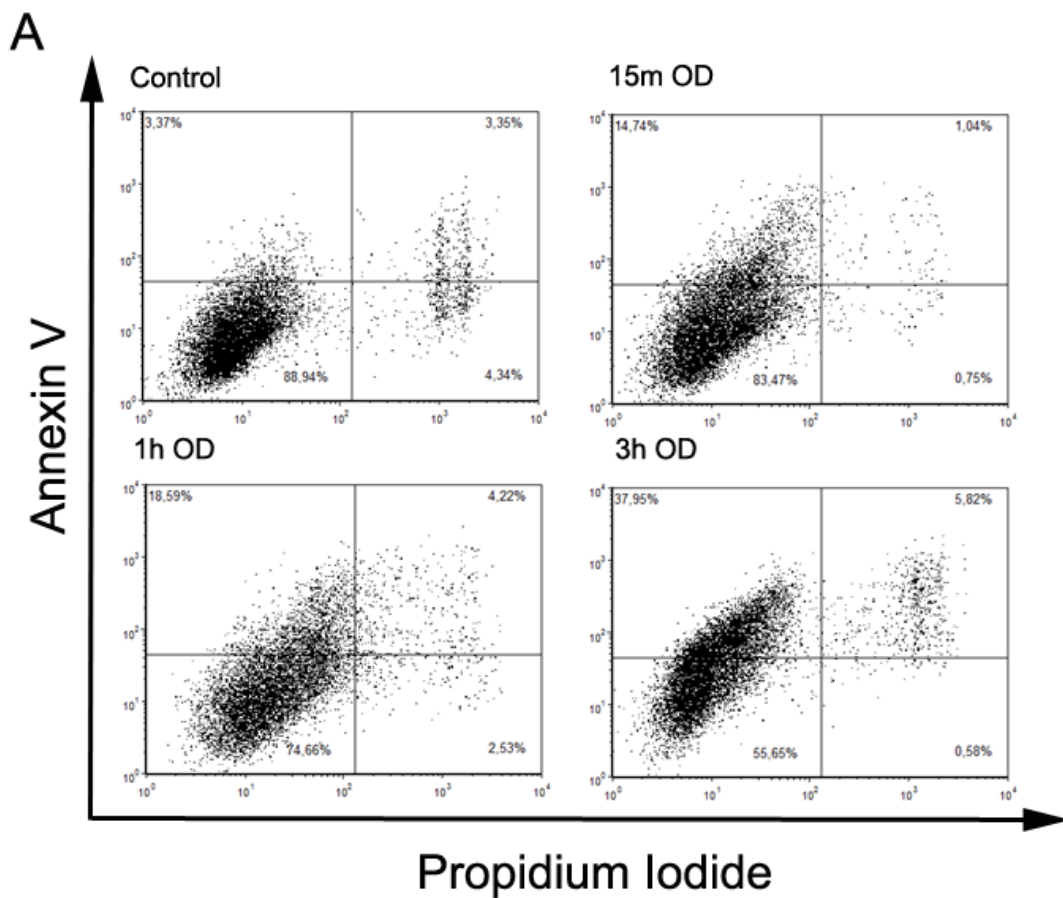
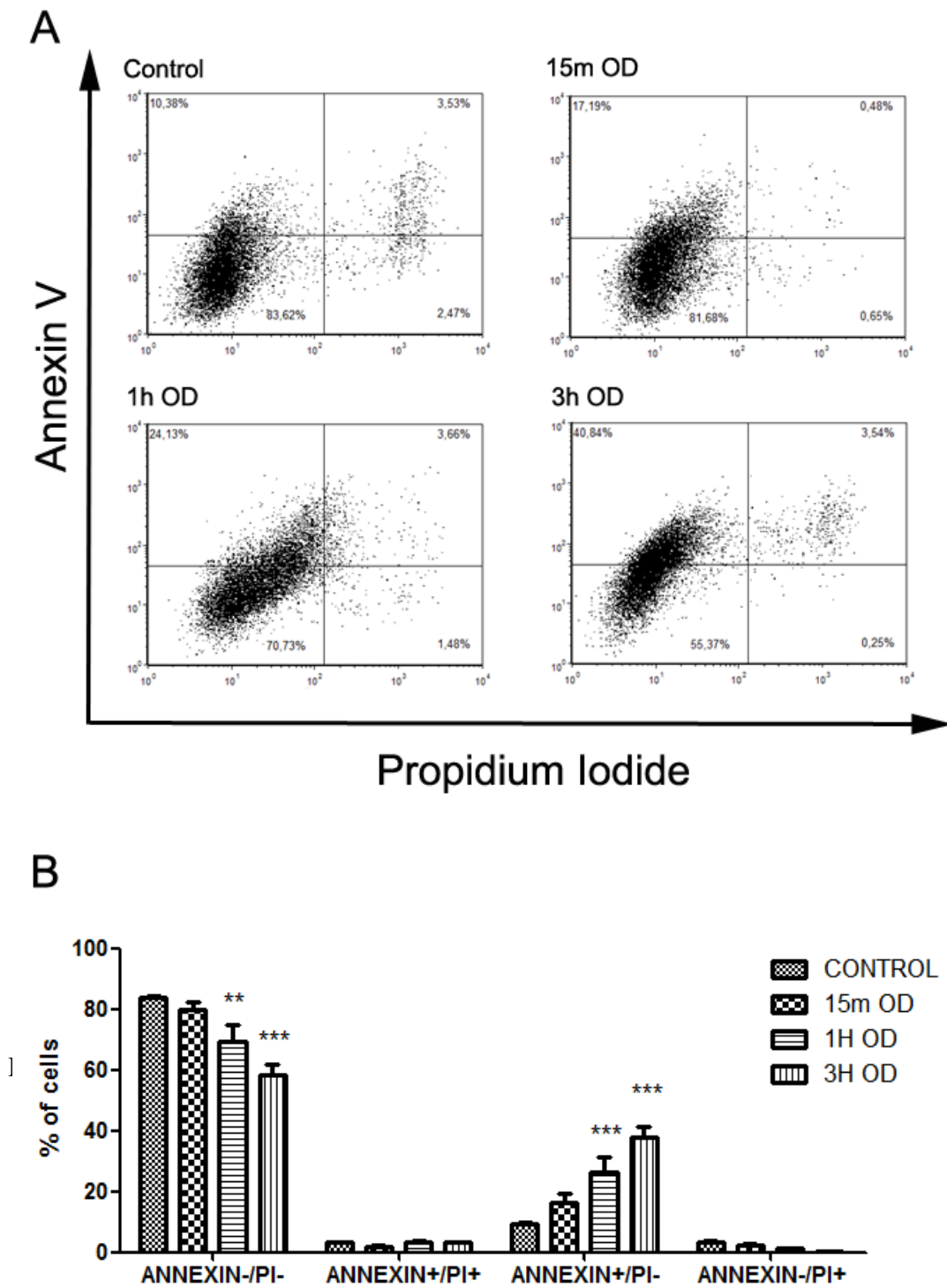


Fig. 2.



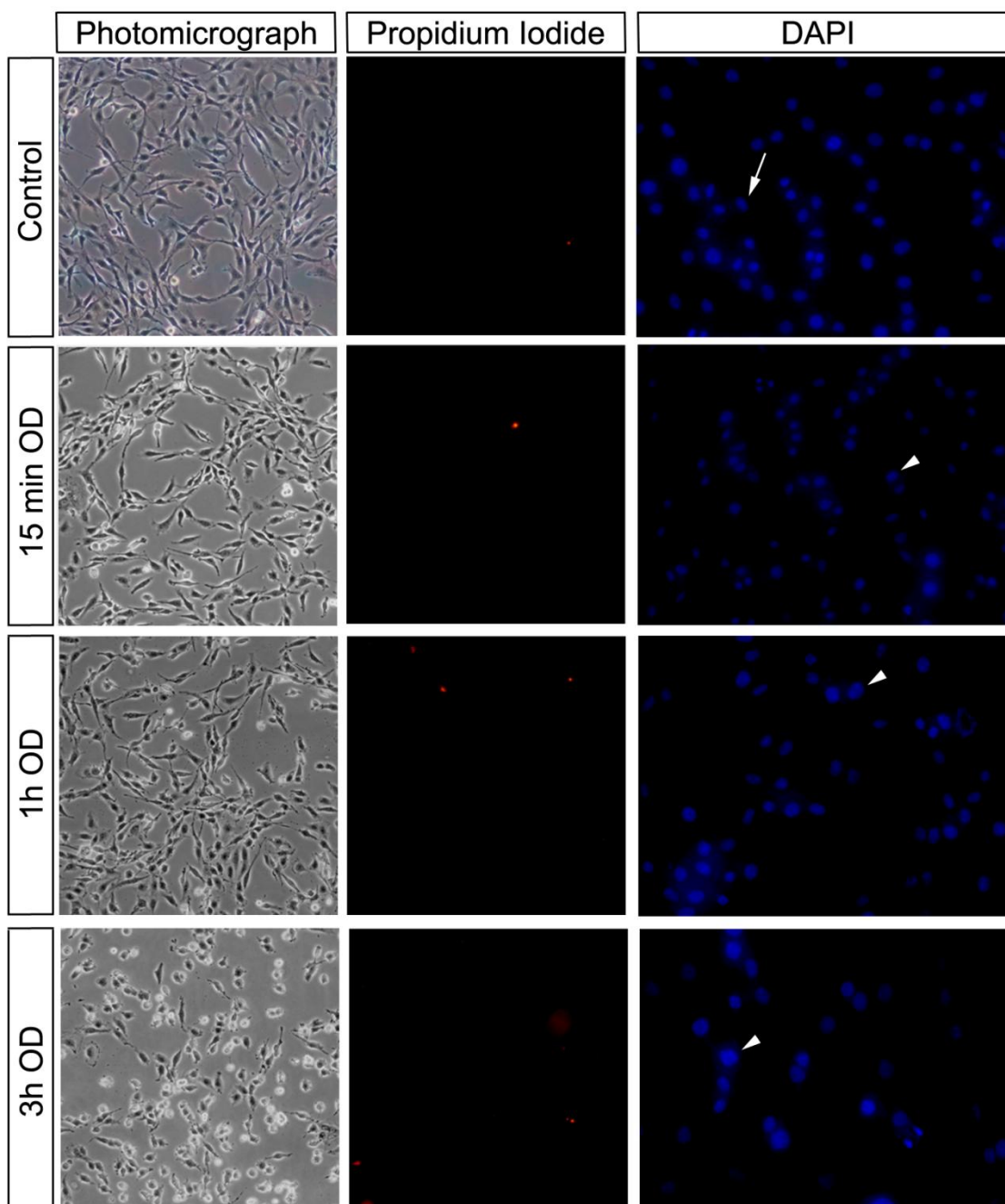


Fig. 4

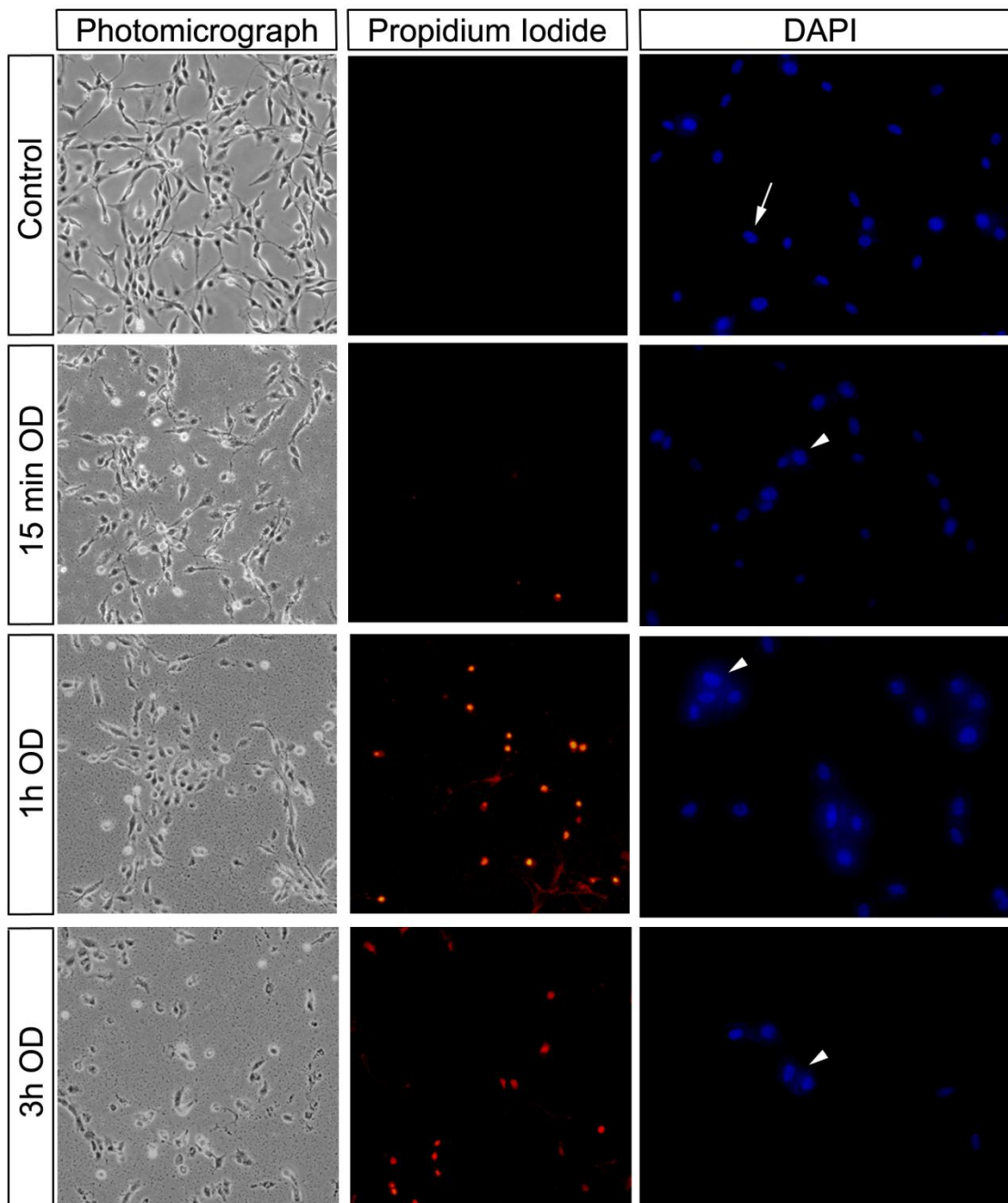


Fig. 5.

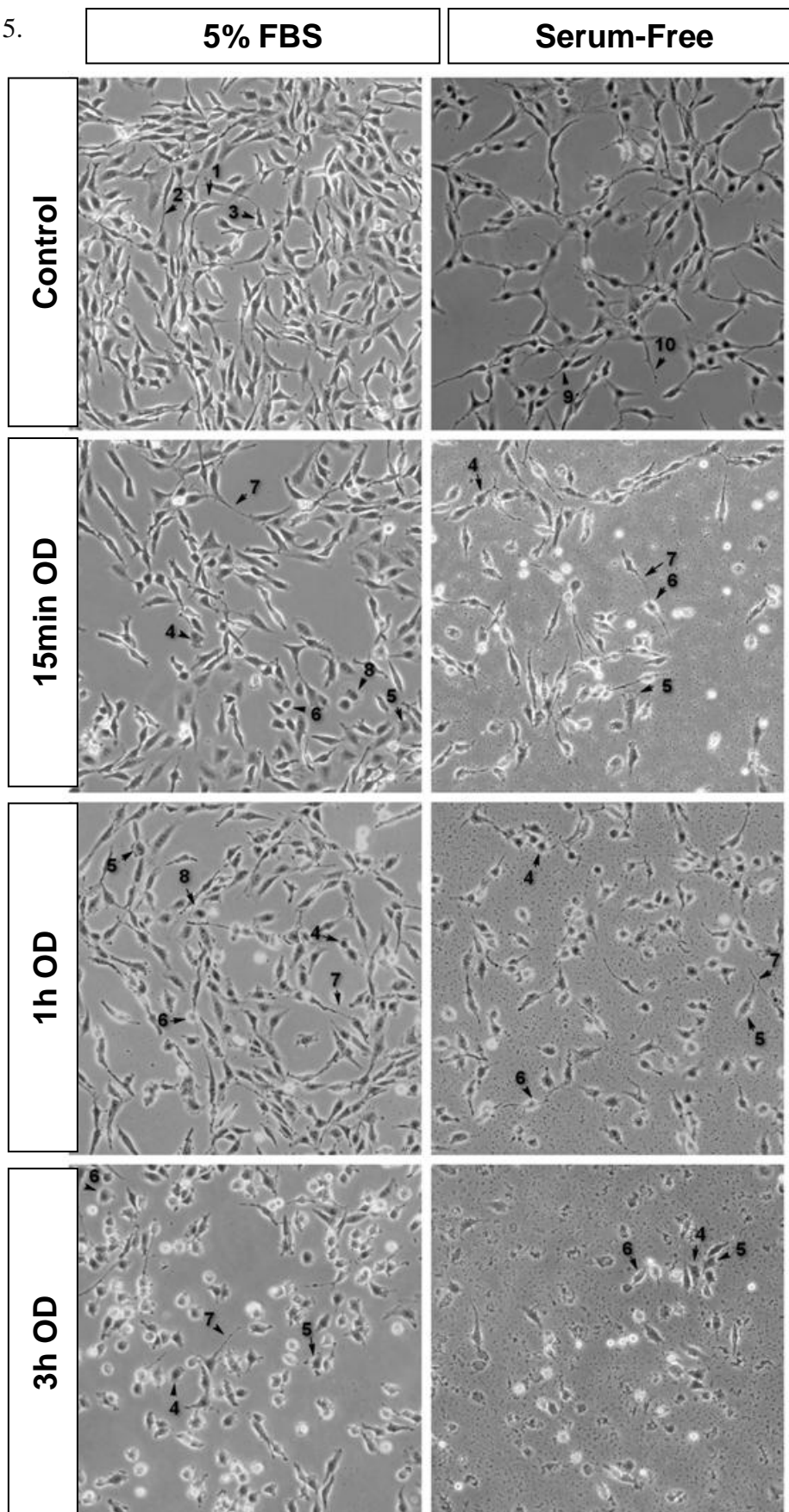


Fig. 6.

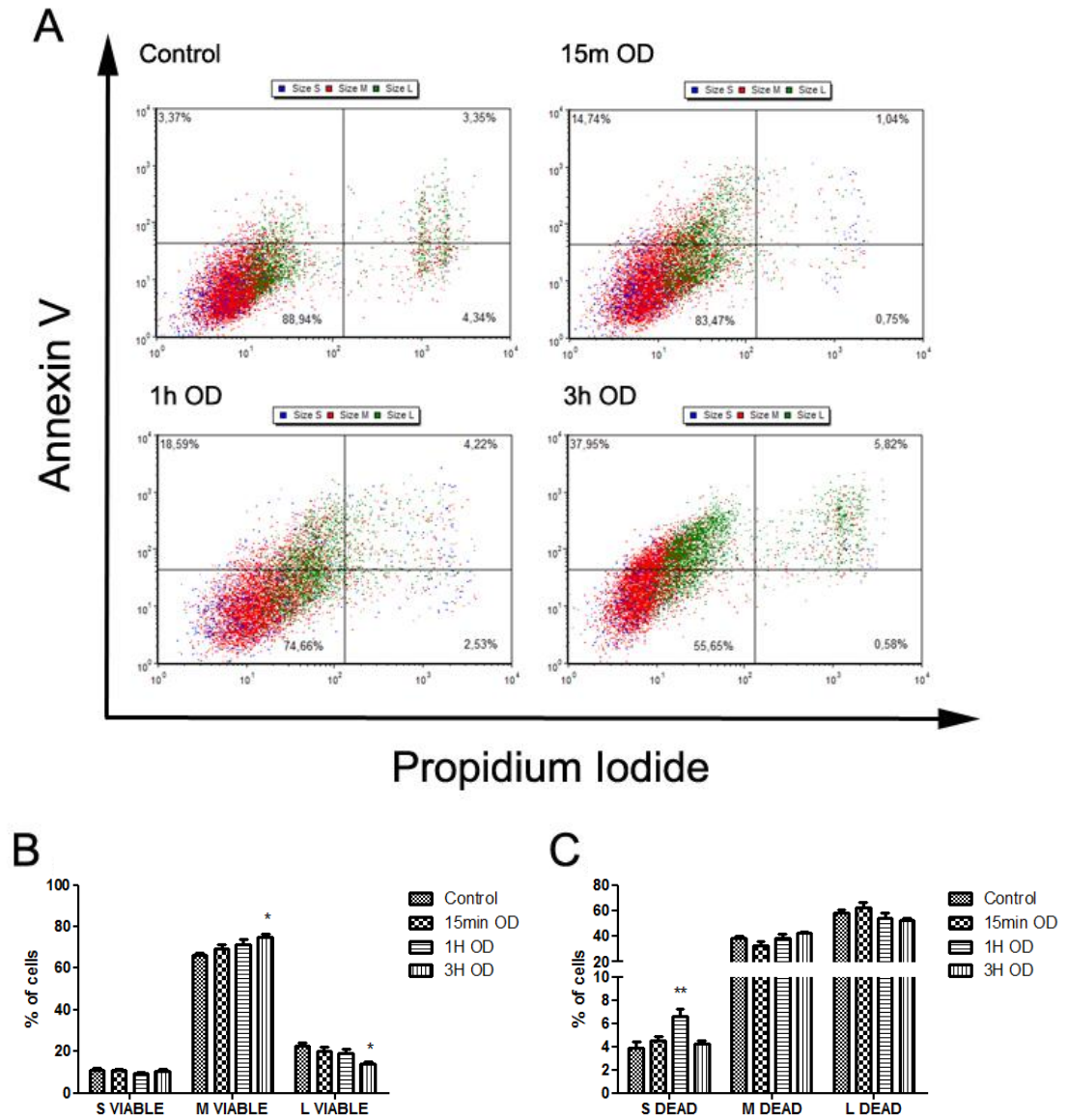


Fig. 7.

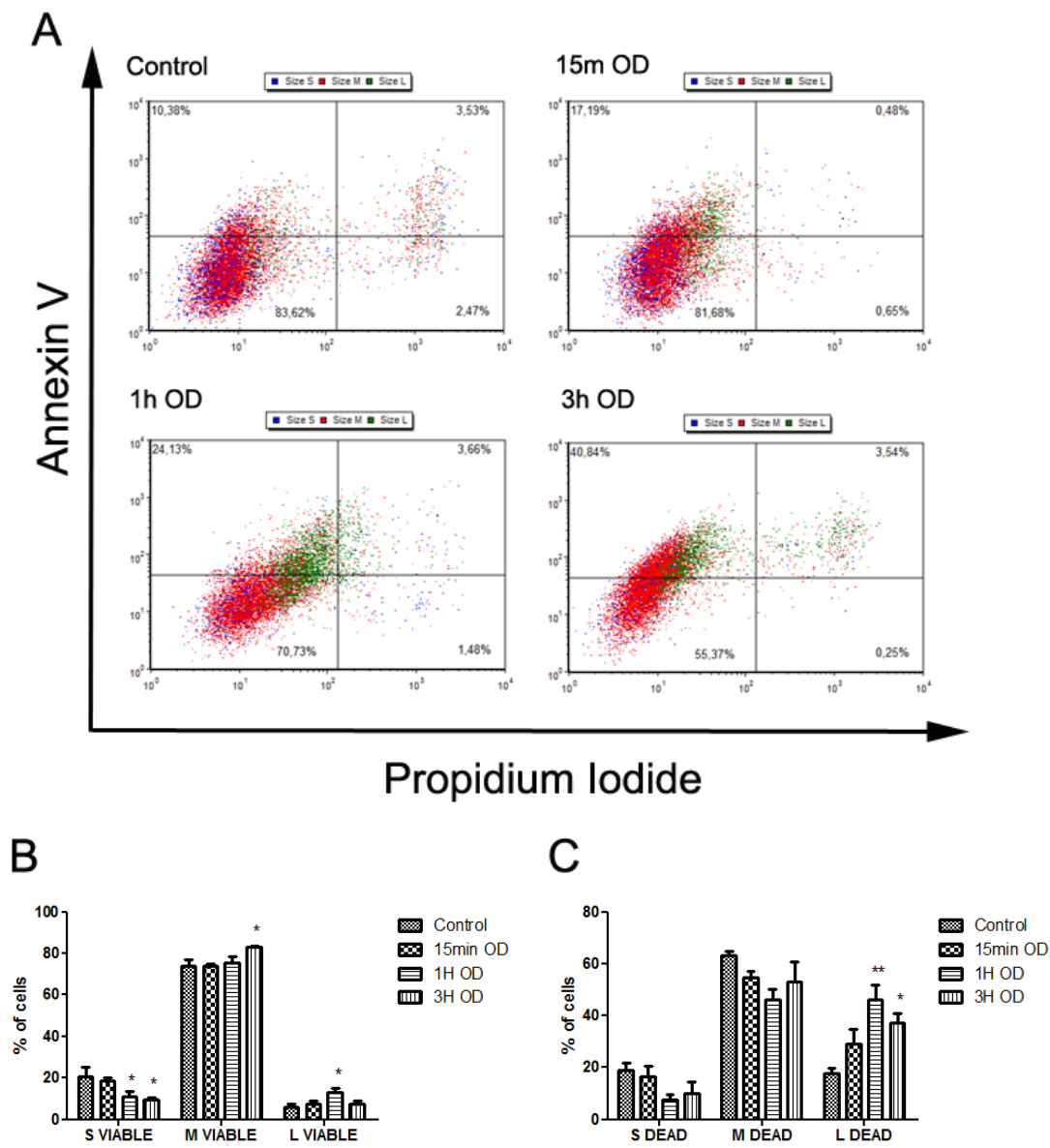


Fig. 8

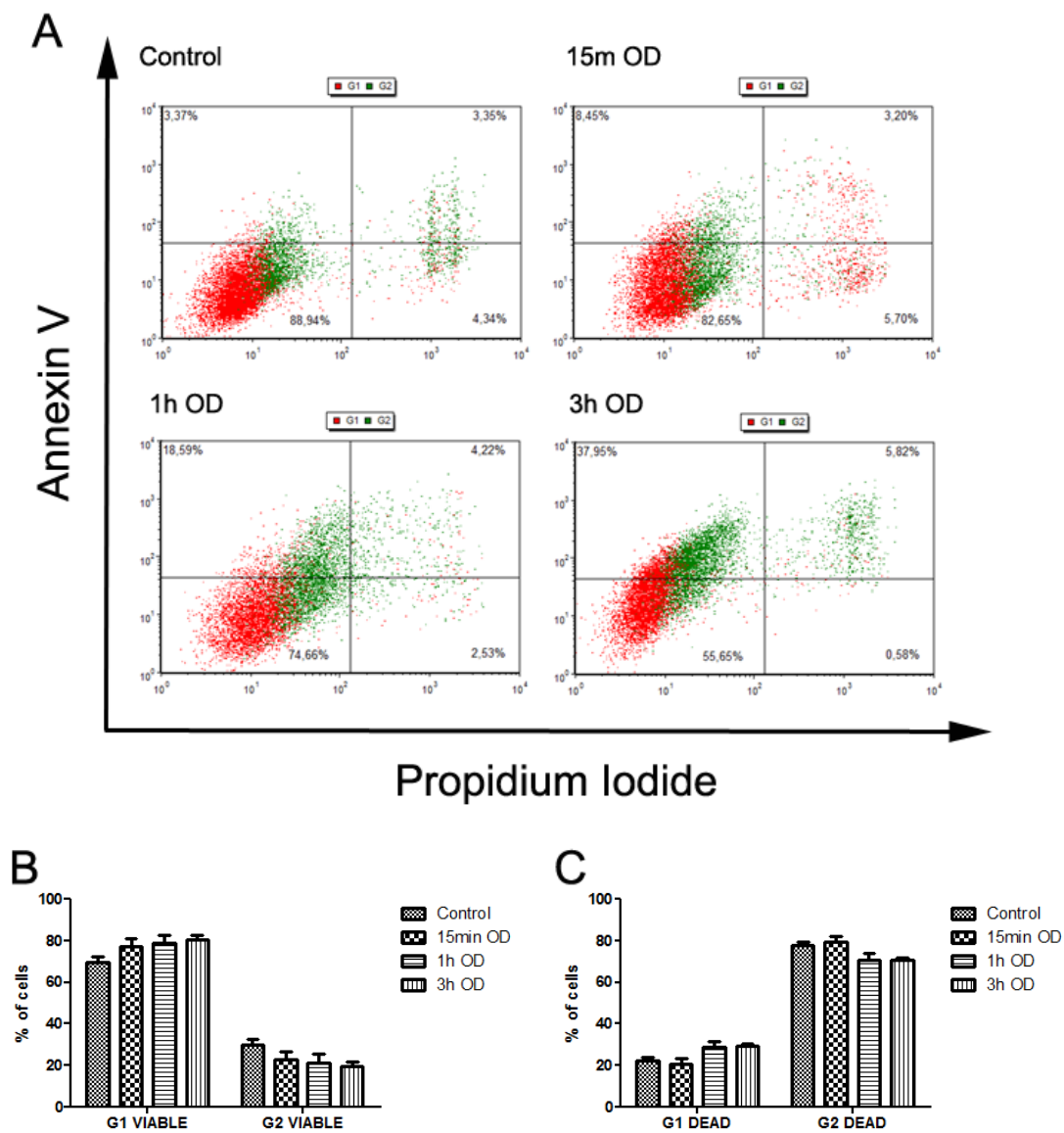


Fig. 9

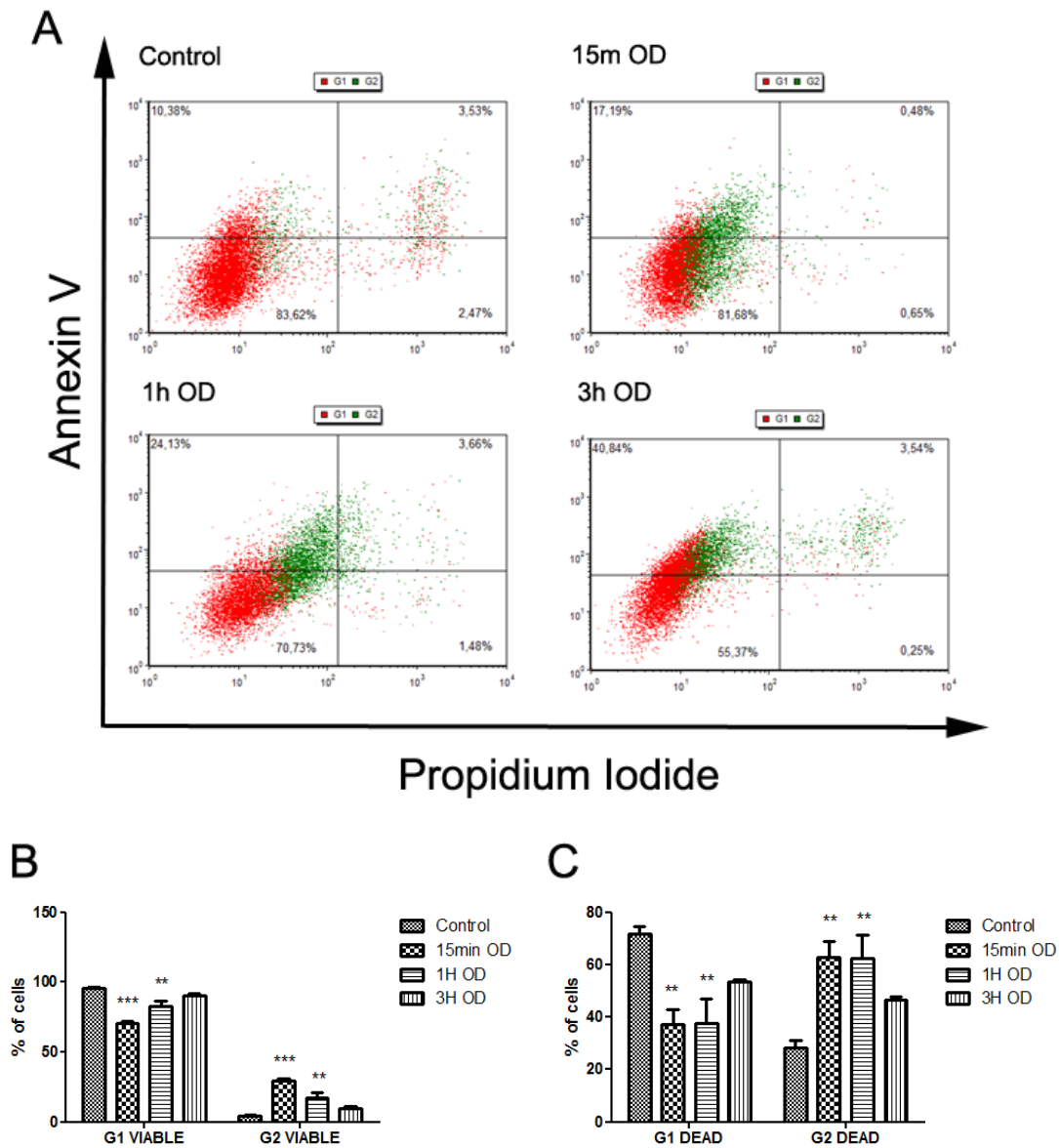
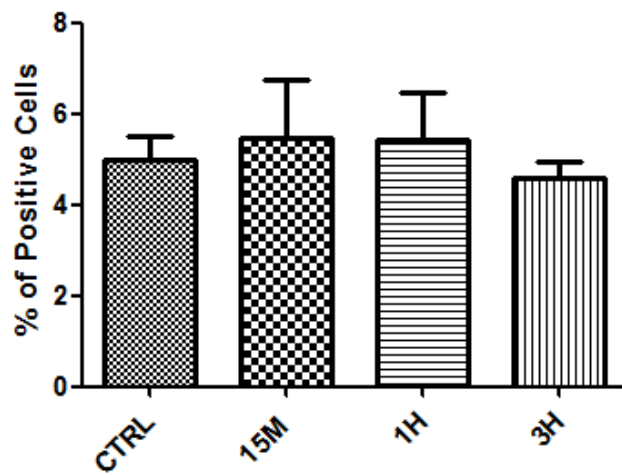


Fig. 10

A.



B.

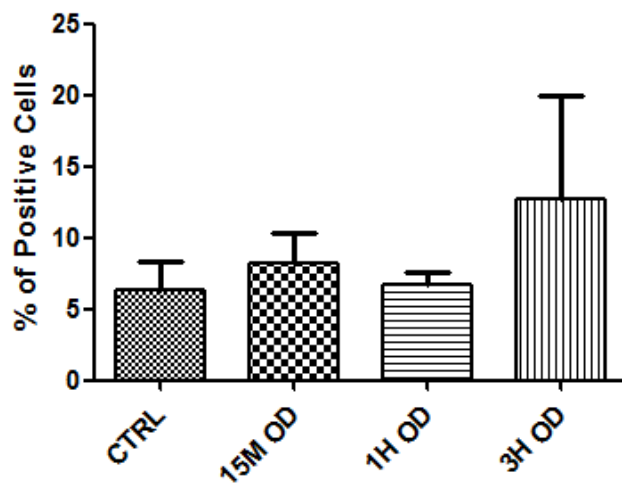
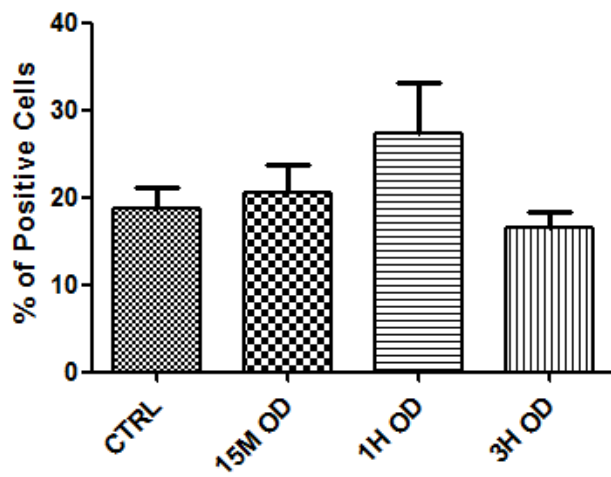
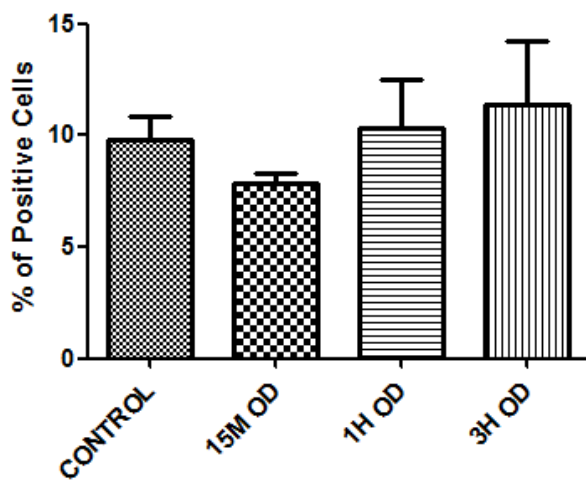


Fig. 11

A.



B.



IV. RESULTADOS COMPLEMENTARES

Após a OD, as células passaram por um período de reperfusão para acompanhar mudanças na morfologia. Para isso, após a OD, o meio das culturas foi substituído por meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), e as placas foram observadas com o auxílio de um microscópio invertido com 1h, 3h e 24h de reperfusão.

No grupo suplementado com 5% de SFB, com 60min de reperfusão, as células expostas à PO começam a se recuperar. Em 24h de reperfusão, ocorre o afinamento dos processos celulares apenas com 1h e 3h de PO.

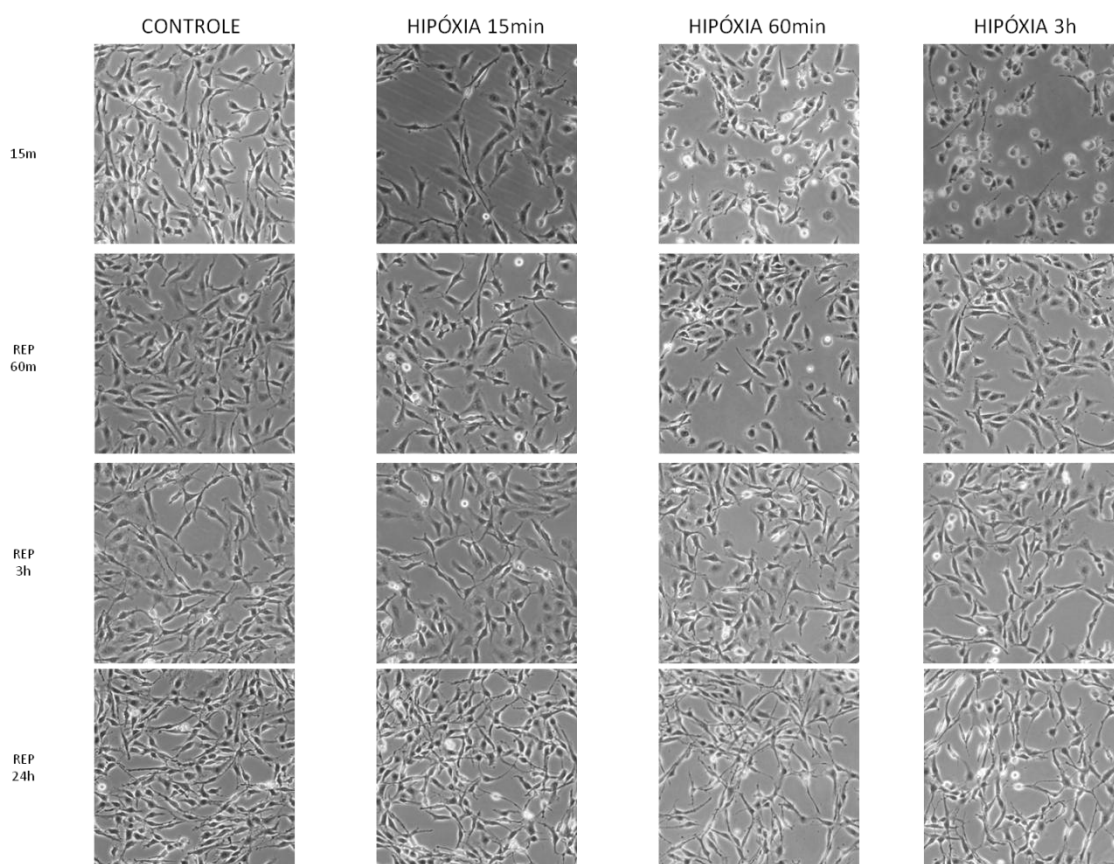


Figura 6: Microscopias representativas de diferentes tempos de reperfusão (REP) para o grupo com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB). Microscopias tiradas 15min após privação de O₂, e após 1h, 3h e 24h de reperfusão.

Com 60min de reperfusão, as placas que foram expostas a PO por 15min e 1h mostram indícios de recuperação, caracterizado por células com aspecto similar a fibroblastos. Entretanto, as células que passaram por 3h de PO iniciam o processo de recuperação somente após 3h de reperfusão (Figura 7). Após 24h de reperfusão, para

todos os tempos de hipóxia, as células se tornaram mais delgadas com um alo circundante, com processos longos e finos (Figura 7). Esses resultados complementares sugerem a presença de uma população viável que resiste à hipóxia, e que alterações promovidas pela PO são visíveis nessa população mesmo após 24h de reperfusão, através da presença de células com processo longos e finos.

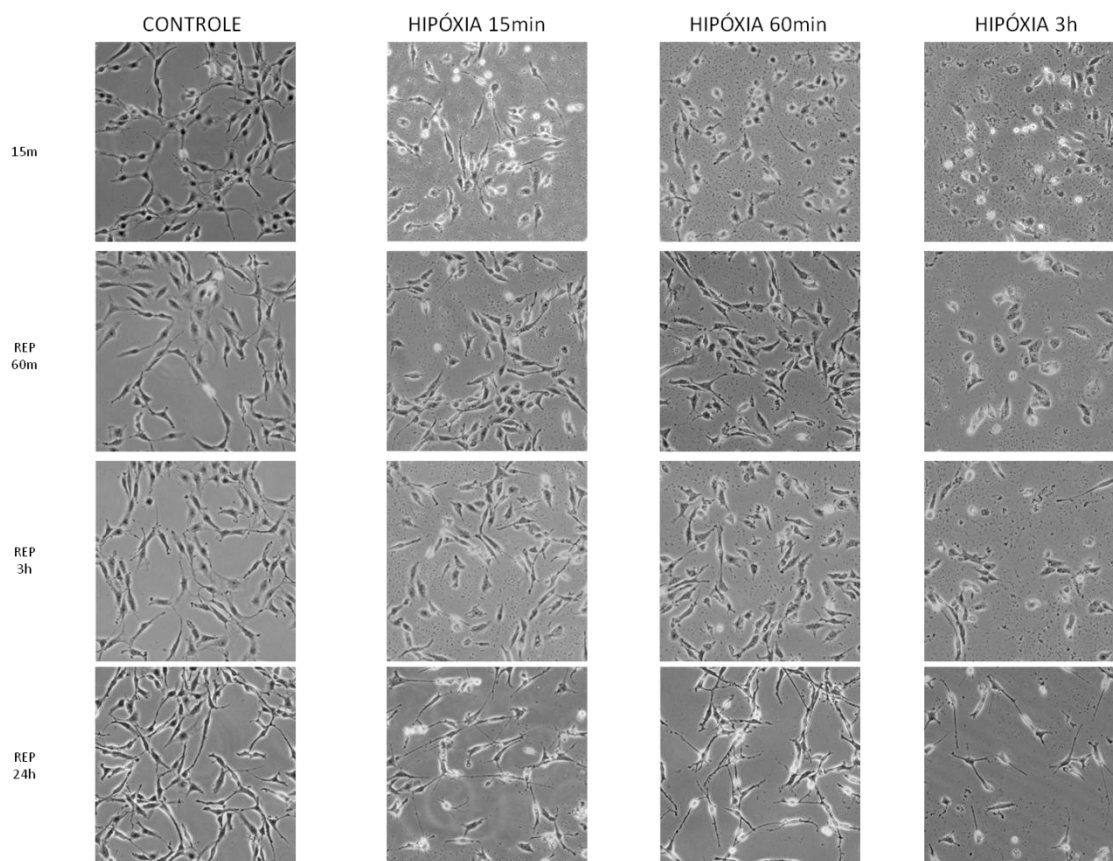


Figura 7: Microscopias representativas de diferentes tempos de reperfusão (REP) para o grupo Sem Soro. Microscopias tiradas 15min após privação de O₂, e após 1h, 3h e 24h de reperfusão.

V. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A PO foi capaz de induzir apoptose e mudanças morfológicas em células de glioma de rato C6 (Figura 8). Embora a marcação com VEGF e VEGFR tenha permanecido inalterado, o nosso protocolo foi capaz de induzir algumas características presentes no microambiente hipóxico.

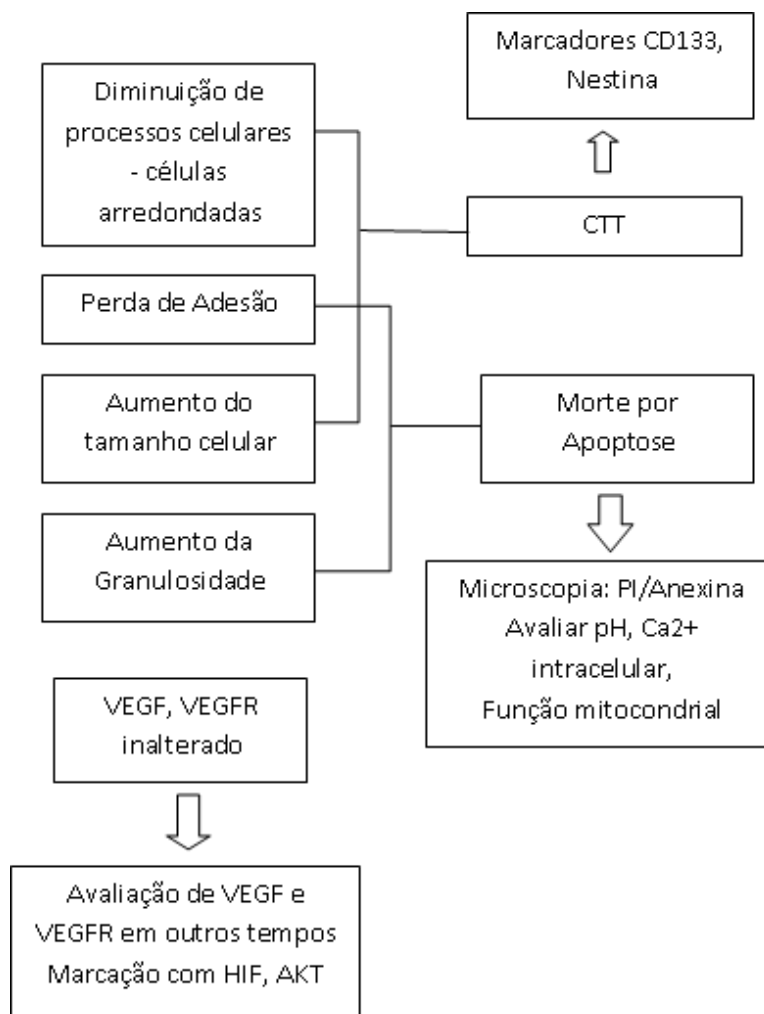


Figura 8: Efeito da PO sobre linhagem de glioma de rato C6 e perspectivas.

As mudanças morfológicas encontradas se assemelham a um processo de desdiferenciação que indica o surgimento de CTT. Dessa forma, para que se confirme o fenótipo de CTT, as células precisam ser caracterizadas com marcadores de células indiferenciadas, como CD133 e Nestina.

Em células apoptóticas foi observado um aumento do tamanho celular, e essa alteração poderia ter sido causada pela acidificação do meio pelo metabolismo glicolítico. Assim, mais experimentos são necessários para confirmar essa hipótese, e isso inclui a mensuração do pH, de níveis intracelulares de cálcio e da análise da função mitocondrial após a PO.

Para validar o protocolo PO em culturas como um modelo de hipóxia *in vitro*, avaliar a marcação de outras moléculas que fazem parte da via de sinalização de hipóxia, como HIF- α e AKT, além da detecção de VEGF e VEGFR em tempos maiores que permitam a alteração na expressão dessas moléculas.

Diante desse trabalho percebemos a importância de um estudo mais detalhado sobre as CTTs, pois são responsáveis pela auto-renovação tumoral mesmo após a ressecção cirúrgica, e pela quimio e radiorresistência de GBs. Desse modo, torna-se relevante a seleção desses tipos celulares para que possam ser utilizadas no screening de drogas antitumorais mais efetivas, e que atuem contra essa população mais resistente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, S. et al. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 61, n. 1, p. 25-41, Feb 2013. ISSN 1661-4917 (Electronic) 0004-069X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23224339> >.

BRAT, D. J.; VAN MEIR, E. G. Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF: a new world of angiogenesis research. **Am J Pathol**, v. 158, n. 3, p. 789-96, Mar 2001. ISSN 0002-9440 (Print) 0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238026> >.

BREDEL, M. et al. NFKBIA deletion in glioblastomas. **N Engl J Med**, v. 364, n. 7, p. 627-37, Feb 17 2011. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21175304> >.

BRUICK, R. K. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. **Genes Dev**, v. 17, n. 21, p. 2614-23, Nov 1 2003. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14597660> >.

CARROLL, V. A.; ASHCROFT, M. Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 7, n. 06, p. 1-16, 2005. ISSN 1462-3994. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1017/S1462399405009117> >. Acesso em: 2005.

CIPOLLESCHI, M. G.; DELLO SBARBA, P.; OLIVOTTO, M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 82, n. 7, p. 2031-7, Oct 1 1993. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8104535> >.

COMA, S.; SHIMIZU, A.; KLAGSBRUN, M. Hypoxia induces tumor and endothelial cell migration in a semaphorin 3F- and VEGF-dependent manner via transcriptional repression of their common receptor neuropilin 2. **Cell Adh Migr**, v. 5, n. 3, p. 266-75, May-Jun 2011. ISSN 1933-6926 (Electronic) 1933-6918 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21610314> >.

COMERFORD, K. M. et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. **Cancer Res**, v. 62, n. 12, p. 3387-94, Jun 15 2002. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12067980> >.

CRONIN, P. A.; WANG, J. H.; REDMOND, H. P. Hypoxia increases the metastatic ability of breast cancer cells via upregulation of CXCR4. **BMC Cancer**, v. 10, p. 225, 2010. ISSN 1471-2407 (Electronic)
 1471-2407 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20492653> >.

EPSTEIN, A. C. et al. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. **Cell**, v. 107, n. 1, p. 43-54, Oct 5 2001. ISSN 0092-8674 (Print)
 0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11595184> >.

GHAFAR, M. A. et al. Acute hypoxia increases the aggressive characteristics and survival properties of prostate cancer cells. **Prostate**, v. 54, n. 1, p. 58-67, Jan 1 2003. ISSN 0270-4137 (Print)
 0270-4137 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12481256> >.

GHOSH, M. K. et al. PI3K-AKT pathway negatively controls EGFR-dependent DNA-binding activity of Stat3 in glioblastoma multiforme cells. **Oncogene**, v. 24, n. 49, p. 7290-300, Nov 10 2005. ISSN 0950-9232 (Print)
 0950-9232 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16007122> >.

GNARRA, J. R. et al. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 20, p. 10589-94, Oct 1 1996. ISSN 0027-8424 (Print)
 0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8855222> >.

GORDAN, J. D. et al. HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. **Cancer Cell**, v. 11, n. 4, p. 335-47, Apr 2007. ISSN 1535-6108 (Print)
 1535-6108 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17418410> >.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000. ISSN 0092-8674 (Print)
 0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931> >.

HEMMATI, H. D. et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 25, p. 15178-83, Dec 9 2003. ISSN 0027-8424 (Print)
 0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14645703> >.

HOCKEL, M.; VAUPEL, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. **J Natl Cancer Inst**, v. 93, n. 4, p. 266-76, Feb 21 2001. ISSN 0027-8874 (Print)

0027-8874 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11181773> >.

HOLLAND, E. C. A mouse model for glioma: biology, pathology, and therapeutic opportunities. **Toxicol Pathol**, v. 28, n. 1, p. 171-7, Jan-Feb 2000. ISSN 0192-6233 (Print)

0192-6233 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10669005> >.

HU, J. et al. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 245, n. 3, p. 894-9, Apr 28 1998. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9588211> >.

HUNTLY, B. J.; GILLILAND, D. G. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 4, p. 311-21, Apr 2005. ISSN 1474-175X (Print)

1474-175X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15803157> >.

HUSE, J. T.; HOLLAND, E.; DEANGELIS, L. M. Glioblastoma: molecular analysis and clinical implications. **Annu Rev Med**, v. 64, p. 59-70, 2013. ISSN 1545-326X (Electronic)

0066-4219 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23043492> >.

IGNATOVA, T. N. et al. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. **Glia**, v. 39, n. 3, p. 193-206, Sep 2002. ISSN 0894-1491 (Print)

0894-1491 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12203386> >.

JACKSON, R. J. et al. Limitations of stereotactic biopsy in the initial management of gliomas. **Neuro Oncol**, v. 3, n. 3, p. 193-200, Jul 2001. ISSN 1522-8517 (Print)

1522-8517 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11465400> >.

KEHLER, J. et al. Oct4 is required for primordial germ cell survival. **EMBO Rep**, v. 5, n. 11, p. 1078-83, Nov 2004. ISSN 1469-221X (Print)

1469-221X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15486564> >.

KIETZMANN, T. et al. Hypoxia-inducible factor-1 and hypoxia response elements mediate the induction of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by

insulin in primary rat hepatocytes. **Blood**, v. 101, n. 3, p. 907-14, Feb 1 2003. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12393531> >.

KIM, J. W.; DANG, C. V. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. **Cancer Res**, v. 66, n. 18, p. 8927-30, Sep 15 2006. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16982728> >.

KITAMURO, T. et al. Induction of adrenomedullin during hypoxia in cultured human glioblastoma cells. **J Neurochem**, v. 75, n. 5, p. 1826-33, Nov 2000. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11032871> >.

KONDO, T.; SETOGUCHI, T.; TAGA, T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 3, p. 781-6, Jan 20 2004. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14711994> >.

KRIVTSOV, A. V. et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. **Nature**, v. 442, n. 7104, p. 818-22, Aug 17 2006. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16862118> >.

LANE, R. H. et al. Uteroplacental insufficiency lowers the threshold towards hypoxia-induced cerebral apoptosis in growth-retarded fetal rats. **Brain Res**, v. 895, n. 1-2, p. 186-93, Mar 23 2001. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259777> >.

MAHER, E. A. et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. **Genes Dev**, v. 15, n. 11, p. 1311-33, Jun 1 2001. ISSN 0890-9369 (Print)

0890-9369 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390353> >.

MORRISON, S. J.; KIMBLE, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1068-74, Jun 29 2006. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16810241> >.

ASHEED, B. K. et al. Molecular pathogenesis of malignant gliomas. **Curr Opin Oncol**, v. 11, n. 3, p. 162-7, May 1999. ISSN 1040-8746 (Print)

1040-8746 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10328589> >.

SAIKUMAR, P. et al. Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. **Oncogene**, v. 17, n. 25, p. 3341-9, Dec 24 1998. ISSN 0950-9232 (Print)
0950-9232 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9916996> >.

SANAI, N.; BERGER, M. S. Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. **Neurosurgery**, v. 62, n. 4, p. 753-64; discussion 264-6, Apr 2008. ISSN 1524-4040 (Electronic)
0148-396X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18496181> >.

SILVA, M. T. Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. **FEBS Lett**, v. 584, n. 22, p. 4491-9, Nov 19 2010. ISSN 1873-3468 (Electronic)
0014-5793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20974143> >.

SIMON, M. C.; KEITH, B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 4, p. 285-96, Apr 2008. ISSN 1471-0080 (Electronic)
1471-0072 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18285802> >.

SINGH, S. K. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 396-401, Nov 18 2004. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549107> >.

SOEDA, A. et al. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. **Oncogene**, v. 28, n. 45, p. 3949-59, Nov 12 2009. ISSN 1476-5594 (Electronic)
0950-9232 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19718046> >.

SPENCE, A. M. et al. Regional hypoxia in glioblastoma multiforme quantified with [18F]fluoromisonidazole positron emission tomography before radiotherapy: correlation with time to progression and survival. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 9, p. 2623-30, May 1 2008. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18451225> >.

STEIN, I. et al. Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. **Mol Cell Biol**, v. 18, n. 6, p. 3112-9, Jun 1998. ISSN 0270-7306 (Print)
0270-7306 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9584152> >.

VISVADER, J. E.; LINDEMAN, G. J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 10, p. 755-68, Oct 2008. ISSN 1474-1768 (Electronic)

1474-175X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18784658> >.

WANG, G. L.; JIANG, B. H.; SEMENZA, G. L. Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 216, n. 2, p. 669-75, Nov 13 1995. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7488163> >.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309-14, Feb 24 1956. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13298683> >.

WECHSLER-REYA, R.; SCOTT, M. P. The developmental biology of brain tumors. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 385-428, 2001. ISSN 0147-006X (Print)

0147-006X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283316> >.

WILSON, A.; RADTKE, F. Multiple functions of Notch signaling in self-renewing organs and cancer. **FEBS Lett**, v. 580, n. 12, p. 2860-8, May 22 2006. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16574107> >.

YU, H. et al. Constitutive Expression of MAP Kinase Phosphatase-1 Confers Multi-drug Resistance in Human Glioblastoma Cells. **Cancer Res Treat**, v. 44, n. 3, p. 195-201, Sep 2012. ISSN 2005-9256 (Electronic)

1598-2998 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23091446> >.