

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
TESE DE DOUTORADO

**PREVALÊNCIA DE OPCs (CÉLULAS PRECURSORAS DE
OLIGODENDRÓCITOS) EM GLIOMAS É DETERMINANTE PARA O
ESTABELECIMENTO DE CONDIÇÕES AUTÊNTICAS DE CULTIVO E PARA A
IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS TERAPÊUTICOS**

PÍTIA FLORES LEDUR

PORTO ALEGRE

AGOSTO DE 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
TESE DE DOUTORADO

**PREVALÊNCIA DE OPCS (CÉLULAS PRECURSORAS DE
OLIGODENDRÓCITOS) EM GLIOMAS É DETERMINANTE PARA O
ESTABELECIMENTO DE CONDIÇÕES AUTÊNTICAS DE CULTIVO E PARA A
IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS TERAPÊUTICOS**

Tese de doutorado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular do
Centro de Biotecnologia da
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutora em
Biologia Celular e Molecular

PÍTIA FLORES LEDUR

Prof. Orientador: Guido Lenz

PORTO ALEGRE

AGOSTO DE 2015

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O conteúdo desta tese foi desenvolvido no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular do Departamento de Biofísica da UFRGS, e também no *Zong Lab*, na Universidade da Virgínia, nos Estados Unidos. A aluna Pítia Flores Ledur recebeu bolsa CAPES do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, e bolsa de doutorado sanduíche do Programa Ciência Sem Fronteiras. O projeto foi financiado com verba PROBITEC-CAPES, e também da agência de fomento americana NIH.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Guido pelos inúmeros aprendizados e desafios que me proporcionou, pelas idéias mirabolantes e pelas críticas construtivas, e pela amizade que vai muito além do que eu jamais esperaria de um orientador. O Guido é um exemplo de orientador ético e presente, e um grande exemplo de que é possível construir um grupo forte e capaz de realizar pesquisa com qualidade neste país apesar de todos os entraves financeiros e burocráticos.

Ao pessoal do laboratório de Sinalização Celular pelo auxílio em experimentos, pela companhia na hora do lanche ou café, e por tornar o nosso dia a dia mais leve e lúdico. Aqueles que já passaram e que foram modelos fundamentais na minha formação: Pati Lu, Ale Pelegrini, Ale Tamajusuku, Lauren e José. Às alunas que se tornaram também amigas, Emilly e Camila, e aos colegas de todas as horas, Fran, Gio, Alex, Mardja, Marcos, Michelle, Caca, Andrew, Eduardo e Mari. Em especial ao Darlan pelo auxílio constante em assuntos científicos e informáticos, e pelo trabalho duro lado a lado comigo nos últimos meses de doutorado.

Às minhas amigas de uma vida inteira, Mê, Lica, Hel, Laurinha e Min pelo carinho e apoio constantes, pelos encontros e jantinhas tão estimados, e pelos momentos de diversão e companheirismo.

Ao orientador Hui Zong pela oportunidade incrível de vivenciar um ambiente de pesquisa rigoroso e enriquecedor, e por acreditar em mim a ponto de financiar a extensão do meu estágio no exterior, período este fundamental para a finalização deste trabalho.

Aos colegas da UVA pelos ensinamentos, pela amizade, pelas pausas para sorvete e pelo companheirismo quando era necessário ficar no laboratório até tarde da noite, nos feriados e finais de semana.

Ao PPGBCM pelas oportunidades e ensinamentos, em especial ao Luciano e a Silvia, por sempre estarem dispostos a ajudar com muita simpatia e bom humor.

Ao meu pai por ser um grande exemplo de ética, moral e trabalho duro, e por seu total apoio e amor incondicional durante todos estes longos anos de estudo. Sem dúvida és minha maior influência e inspiração.

A minha mãe por seu carinho e disposição em ajudar sempre que necessário, e pelos mimos deliciosos.

Ao meu irmão por ser um exemplo de força e superação, e me ensinar a olhar para o futuro sempre com esperança.

A minha vó pelo amor e cuidado que sempre demonstra, e pela garra de uma lutadora de 92 anos.

Ao Juliano pela paciência, pelo amor e cuidado que tem comigo, e por ser meu maior cúmplice, meu melhor amigo, e minha diversão garantida no fim do dia.

A CAPES e ao CNPq por tornarem este doutorado possível e pelo financiamento deste início da minha carreira científica.

*"My mission in life is not merely to survive,
but to thrive;
and to do so with some passion,
some compassion,
some humor,
and some style."*

Maya Angelou

APRESENTAÇÃO

Esta tese está estruturada em formato de artigo científico, da seguinte forma:

Capítulo I

- Introdução
- Hipótese, Objetivo Geral, Objetivos Específicos

Capítulo II

- Manuscrito I

Capítulo III

- Manuscrito II

Capítulo IV

- Discussão
- Perspectivas geradas pelo trabalho
- Referências

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XI
ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
CAPÍTULO I	1
INTRODUÇÃO	2
GLIOMAS	2
O CÉREBRO	9
CÉLULA-TRONCO TUMORAL E CÉLULA DE ORIGEM TUMORAL	14
O ESTUDO DE GLIOMAS <i>IN VITRO</i>	32
HIPÓTESE	34
OBJETIVO GERAL	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
CAPÍTULO II	35
MANUSCRITO I	36
CONCLUSÕES SOBRE O MANUSCRITO I	61
CAPÍTULO III	62
MANUSCRITO II	63
CONCLUSÕES SOBRE O MANUSCRITO II	117
CAPÍTULO IV	118
DISCUSSÃO	119
RELEVÂNCIA DA IDENTIFICAÇÃO DA CÉLULA DE ORIGEM EM GLIOMAS	119
GBMs HUMANOS APRESENTAM CARACTERÍSTICAS DE OPCs	120
GBMs HUMANOS SÃO MAIS SIMILARES A OPCs DO QUE A ASTRÓCITOS OU A NEURÔNIOS	121
OPCs TUMORAIS PODEM SER CONSIDERADAS COMO CSCs	122
OPCs TUMORAIS RETÊM AS CARACTERÍSTICAS DO TUMOR QUANDO MANTIDAS EM MEIO DE OPCs, MAS TAMBÉM SE ADAPTAM AO MEIO DE NSCs	123
OPCs TUMORAIS APRESENTAM TUMORIGENICIDADE REDUZIDA QUANDO MANTIDAS EM MEIO DE NSCs	125
MEIO DE NSCs LEVA A SELEÇÃO DE FALSOS ALVOS TERAPÊUTICOS	126
GLIOMAS HUMANOS SE COMPORTAM DE MANEIRA SIMILAR ÀS OPCs TUMORAIS CRESCIDAS NAS MESMAS CONDIÇÕES	128
CONCLUSÕES	132
PERSPECTIVAS GERADAS PELO TRABALHO	133
REFERÊNCIAS	134
CURRICULUM VITAE RESUMIDO	141

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Vias de sinalização alteradas em gliomas	5
FIGURA 2 - Células Tronco Neurais (NSCs) e progênie	11
FIGURA 3 - Nichos germinais no cérebro adulto	14
FIGURA 4 - Recombinação Gênica Cre-loxP	21
FIGURA 5 - Sistema de marcação com repórteres multicoloridos MADM	24
FIGURA 6 - Célula de mutação, célula de origem e células-tronco tumorais	30

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Técnicas de marcação genética	19
TABELA 2. Modelos genéticos utilizados da origem de tumores cerebrais	29

ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT – Proteína quinase serina/treonina-específica, também conhecida como Proteína Quinase B, ou PKB.

AML – Leucemia Mielóide Aguda (*Acute Myeloid Leukemia*)

ARF – Proteína supressora tumoral em fase de leitura alternativa (*alternate reading frame*), produto do locus de CDKN2A. Também conhecida como p14^{ARF}

CAMKIIA – Proteína Quinase dependente de Cálcio/Calmodulina II, subunidade alfa (*Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II, Alpha subunit*)

CDK4 – Quinase dependente de ciclina 4 (*Cyclin-dependent kinase 4*)

CDKN2A – Inibidor de quinases dependente de Ciclinas tipo 2A (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*). Também conhecida como INK4a, p16 ou p16^{INK4a}

CNS – Sistema Nervoso Central (*Central Nervous System*)

CSCs – Células-tronco Tumerais (*Cancer Stem Cells*)

E2F – Grupo de genes que codificam uma família de fatores de transcrição

EGF – Fator de Crescimento Epidermal (*Epidermal Growth Factor*)

EGFR – Receptor de Fator de Crescimento Epidermal (*Epidermal Growth Factor Receptor*), também conhecido como ErbB1

EGFRvIII – Receptor de Fator de Crescimento Epidermal, variante III , constitutivamente ativa (*Epidermal Growth Factor Receptor, variant III*)

ER – *Estrogen Receptor*, receptor de estrógeno

ERK – ERK1 e ERK2 são as as MAP quinases clássicas (*Extracellular signal-regulated kinase*). Também conhecida como MAPK ou MAP quinase.

EYFP - *Enhanced Yellow Fluorescent Protein*, proteína fluorescente amarela intensificada

FBS – Soro Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*)

FLP – Recombinase **Flip**ase

FRT – *Flippase Recognition Target*, alvo/sítio de reconhecimento da enzima Flipase

GBM – Glioblastoma **M**ultiforme

GFAP – Proteína Ácida Fibrilar Glial (*Glial Fibrillary Acidic Protein*)

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

LOH – Perda de heterozigidade, *loss of heterozygosity*)

MADM – *Mosaic Analysis with Double Markers*, técnica de marcação genética

MDM2 – Regulador negativo de p53, *Mouse double minute 2 homolog*

MEK – Quinase que fosforila MAPK (*Mitogen/Extracellular signal-regulated Kinase*). Também conhecida como MAPKK (MAP quinase quinase)

mTOR – Quinase Alvo da Rapamicina (*Mammalian Target of Rapamycin*)

NF1 – Gene/Proteína da Neurofibromatose 1 (*Neurofibromatosis type I*)

NSCs – Células-tronco Neurais (*Neural Stem Cells*)

OLIG1 – Fator de Transcrição da linhagem de Oligodendrócitos 1 (*Oligodendrocyte Transcription Factor 1*)

OLIG2 – Fator de Transcrição da linhagem de Oligodendrócitos 2 (*Oligodendrocyte Transcription Factor 2*)

OLs – Oligodendrócitos

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPCs – Células Precursoras de Oligodendrócito (*Oligodendrocyte Precursor Cells*)

P53 – Proteína supressora tumoral p53

PDGF-A – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas, Polipeptídeo Alfa (*Platelet Derived Growth Factor A*)

PDGFRA – Receptor de Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas, Polipeptídeo Alfa (*Platelet Derived Growth Factor Receptor A*)

PDK1 – Quinase dependente de Fosfoinosítídeo tipo 1 (*Phosphoinositide-dependent kinase-1*)

PI3K – Fosfoinosítídeo 3-quinase (*Phosphoinositide 3-kinase*)

PiP3 – Fosfatilinositol (3,4,5)-trifosfato (*Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate*). É um fosfolípídeo de membrana, produto da fosforilação de PI3Ks.

PTEN – Proteína Homóloga Fosfatase/Tensina, deletada do Cromossomo 10 (*Phosphatase and Tensin Homolog*)

RAS, ou KRAS – Proteína da superfamília de pequenas GTPases (*Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog*). Também chamada de p21.

RB – Proteína Retinoblastoma (*Retinoblastoma Protein*)

RFP - *Red Fluorescent Protein*, proteína fluorescente vermelha

RGCs – Células da Glia Radial (*Radial Glia Cells*)

RTKs – Receptores Tirosina-quinases (*Receptor Tyrosin Kinase*)

SGZ – Zona subgranular (*Subgranular Zone*)

SOX10 – Sex determining region Y – box 10

SOX2 – Sex determining region Y – box 2

SVZ – Zona subventricular (*Subventricular Zone*)

TCGA – *The Cancer Genome Atlas*, rede de pesquisas financiada pelo NCI (*National Cancer Institute*) e NHGRI (*National Human Genome Research Institute*), nos Estados Unidos

TIC – Célula Iniciadora de Tumor (*Tumor Initiating Cell*)

VEGF – Fator de Crescimento Vascular Endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

VZ – Zona Ventricular (*Ventricular Zone*)

WT – *Wild Type*, tipo selvagem

YFP - *Yellow Fluorescent Protein*, proteína fluorescente amarela

RESUMO

Glioblastomas Multiformes (GBM) são tumores do Sistema Nervoso Central com altas taxas de invasibilidade e grande resistência a quimio e radioterapias, cuja origem foi inicialmente atribuída a células tronco neurais (NSCs). Mais recentemente, trabalhos de rastreamento de linhagem celular (*lineage tracing*) revelaram que a célula de origem em GBM, ao menos para certos subtipos, é na verdade a célula precursora de oligodendrócitos (OPC). A identificação da origem do tumor pode auxiliar na compreensão da doença e no desenvolvimento de terapias mais eficazes. OPCs são células com grande capacidade migratória e constituem a população de células cerebrais mais proliferativamente ativa, características compatíveis com a biologia de glioblastomas. Neste trabalho criamos uma meta-assinatura de OPCs que, quando aplicada a amostras populacionais e de células únicas de GBMs humanos, indica a presença de características de OPCs em virtualmente todos os tumores, principalmente dentre os do subtipo Proneural. Apesar disso, o cultivo de GBMs *in vitro* tem sido tradicionalmente realizado em meio próprio de NSCs, como forma de preservar as características originais do tumor. Entretanto, no caso de OPC ser a verdadeira célula de origem, o ideal seria a utilização de meio próprio para esta célula. Utilizamos meio padrão para NSCs e meio para OPCs em linhagens de camundongo bem como em biópsias humanas. Meio de NSCs provoca alterações morfológicas e em marcadores, enquanto meio de OPCs mantém as células mais similares ao tumor que lhes deu origem. Principalmente, meio de NSCs reduz o potencial tumorigênico das células *in vivo*, e faz com que alvos errôneos sejam identificados na resposta a drogas, devido à expressão de marcadores não-autênticos pra célula de origem. A análise de gliomas humanos indica que a população proliferativamente ativa expressa marcadores de OPCs, independentemente do subtipo em que o tumor foi classificado. Assim, concluímos que o papel de OPCs no desenvolvimento de GBMs é mais importante do que se imaginava, e que a utilização de meio de cultivo baseado na célula de origem é fundamental para a correta identificação de alvos terapêuticos.

ABSTRACT

Glioblastoma Multiformes (GBM) are Central Nervous System tumors that present high invasibility rates and great resistance to chemo- and radiotherapies, whose origin was initially accredited to Neural Stem Cells (NSCs). More recently, papers employing lineage tracing revealed that the cell of origin in GBM, at least for certain subtypes, is in fact an Oligodendrocyte Precursor Cell (OPC). The elucidation about the origin of a tumor can help in the disease comprehension and in the development of more efficient therapies. OPCs are naturally migratory cells and constitute the most actively proliferating cell population in the brain, characteristics that are compatible with glioblastoma biology. In this work we created an OPC meta-signature that, once applied to populational and single-cell data in GBM, reveals the presence of OPC features in virtually every tumor, mainly from the Proneural subtype. Moreover, GBM *in vitro* culture has traditionally been done in NSC media, as an attempt to preserve original characteristics from the tumor. However, if OPC is the real cell of origin, it would be better to grow GBM samples in OPC media. Here, we used NSC media and OPC media in mice lines as well as in human byopsies. NSC media induces morphological and marker changes, while OPC media maintains the cells more similar to the tumor from where they were originated. Mainly, NSC media reduces the tumorigenic potential of the cells *in vivo*, and causes false targets to be identified in response to drugs due to the expression of non-authentic markers to the cell of origin. Human glioma analysis indicates that the actively proliferating population expresses OPC markers, regardless of the subtype in which the tumor was classified. Therefore, we conclude that the role of OPCs in GBM development is more importante than originally thought, and that the employment of culture media based on cell of origin is of fundamental importance for the correct identification of therapeutical targets.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

GLIOMAS

CARACTERÍSTICAS E EPIDEMIOLOGIA

Gliomas são tumores do Sistema Nervoso Central (CNS) que podem variar em seus graus e malignidade, representando cerca de 40 a 60% de todos os tumores primários do CNS. Ocorrem mais frequentemente em adultos, apesar de também ocorrerem em crianças (www.inca.gov.br, e www.cbtrus.org). Glioblastoma multiforme (GBM) é a forma mais agressiva, e também a mais comum de tumores malignos no cérebro, compreendendo tumores incuráveis, altamente invasivos e resistentes a quimioterápicos, que apresentam mortalidade de cerca de um ano após o diagnóstico (Chen, McKay, & Parada, 2012; Verhaak et al., 2010). Suas características histológicas incluem heterogeneidade celular e morfológica, apresentando populações de células com diferentes graus de diferenciação. No Brasil, para o ano de 2014, dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimam que a ocorrência de gliomas tenha sido de 5,07 novos casos a cada 100 mil homens, e 4,05 novos casos a cada 100 mil mulheres (www.inca.gov.br).

ALTERAÇÕES MOLECULARES

Em gliomas, muitas alterações em termos de vias de sinalização já foram descritas. As alterações mais frequentemente encontradas envolvem as seguintes vias:

- **Via PI3K/AKT:** Regula processos celulares como proliferação, crescimento, apoptose, e rearranjo do citoesqueleto. Esta via envolve receptores tirosina quinase (RTKs) como EGFR, PDGFRA, VEGFR e outros. Em condições normais, os receptores da família RTK podem ser ativados por meio de sua dimerização, levando a fosforilação de um ou mais substratos, o que culmina em uma cascata de sinalização

das vias PI3K e Ras. Em gliomas, estes receptores podem frequentemente ser encontrados em um estado constitutivamente ativo por meio de amplificações ou mutações. Dentre as alterações em RTKs encontradas em GBM, a amplificação do gene do EGFR é a mais comum. A forma mais conhecida é chamada de EGFRvIII, um mutante de ativação constitutiva. Superexpressão de PDGFR também está descrita em Glioma. A superexpressão de fatores de crescimento que ativam os RTKs, como por exemplo PDGF, também são comuns em GBM (McLendon et al., 2008; Nakada et al., 2011).

PI3Ks (fosfo-inositol-3-quinases) são quinases lipídicas que exercem diversas funções. RTKs se ligam a PI3Ks, resultando em ativação de Akt (por meio de PiP3 e PDK1), o que pode afetar processos de sobrevivência celular, proliferação e motilidade. Mutações e amplificação da PI3K já foram descritas em gliomas. A proteína PTEN, uma fosfatase supressora tumoral, antagoniza a função de PI3K; assim, baixa atividade de PTEN ativa a via. Deleções homozigotas ou totais de PTEN são frequentes em gliomas, o que leva a uma ativação constitutiva da via da PI3K (McLendon et al., 2008; Nakada et al., 2011). Além disso, PI3K parece ser necessária para a transformação induzida por Ras *in vitro*.

A proteína Akt, apesar de não ter mutações oncogênicas descritas em GBM, está ativa em 80% dos gliomas, devido a alterações em RTKs e em PTEN. Conseqüentemente, mTOR, que é uma proteína *downstream* de Akt na via, também encontra-se ativada em gliomas. mTOR pode ser inibida por NF1 e p53 (McLendon et al., 2008).

Figura 1.

- **Via Arf/MDM2/p53:** A proteína p53 responde a diversos tipos de estresse na célula, regulando genes que promovam parada no ciclo celular, morte celular, diferenciação, senescência e reparo de DNA. O gene da MDM2 codifica uma proteína capaz de se ligar ao domínio N-terminal da p53, inibindo sua atividade transcricional. Este gene aumenta o potencial tumorigênico quando superexpresso, e sua transcrição é ativada pela própria p53. A proteína Arf (p14^{Arf}), parte

do complexo CDKN2A, se liga a MDM2, inibindo a degradação de p53. Sua expressão é negativamente regulada por p53. Esta via é importante na progressão de gliomas que já possuam mutação em IDH1, e sofram uma mutação adicional em p53 (McLendon et al., 2008; Nakada et al., 2011). **Figura 1.**

- **Via INK4a/RB:** Está envolvida no *checkpoint* de transição da fase G1-S do ciclo celular. O complexo ciclina D1/CDK4 fosforila a proteína RB1, que por sua vez induz a liberação do fator de transcrição E2F, responsável por ativar os genes envolvidos na transição G1-S. A proteína INK4a (p16^{INK4a}), parte do complexo CDKN2A, inibe a transição da fase G1 para a fase S por meio da ligação a CDK4. Perda de RB1, deleção homozigota de CDKN2A, e/ou amplificação de CDK4 são encontrados na maioria dos gliomas (80%). Amplificação de EGFR está também frequentemente associada a deleções de CDKN2A (Nakada et al., 2011).
- **Via da Ras/MEK/ERK:** Esta via é inibida por NF1, que encontra-se frequentemente inativado em gliomas. Ras é uma proteína controlada por RTKs. Sua forma ativa, RAS-GTP, recruta quinases RAF para a membrana. Mutações em RAF são raras em gliomas. RAF, quando ativada, é capaz de fosforilar MEK (também conhecida como MAPKK), e esta ativa MAPK (ERK1 e ERK2), que se transloca ao núcleo para promover proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Sinalização errônea nesta via pode levar à transformação celular e resistência à apoptose (McLendon et al., 2008; Nakada et al., 2011). **Figura 1.**

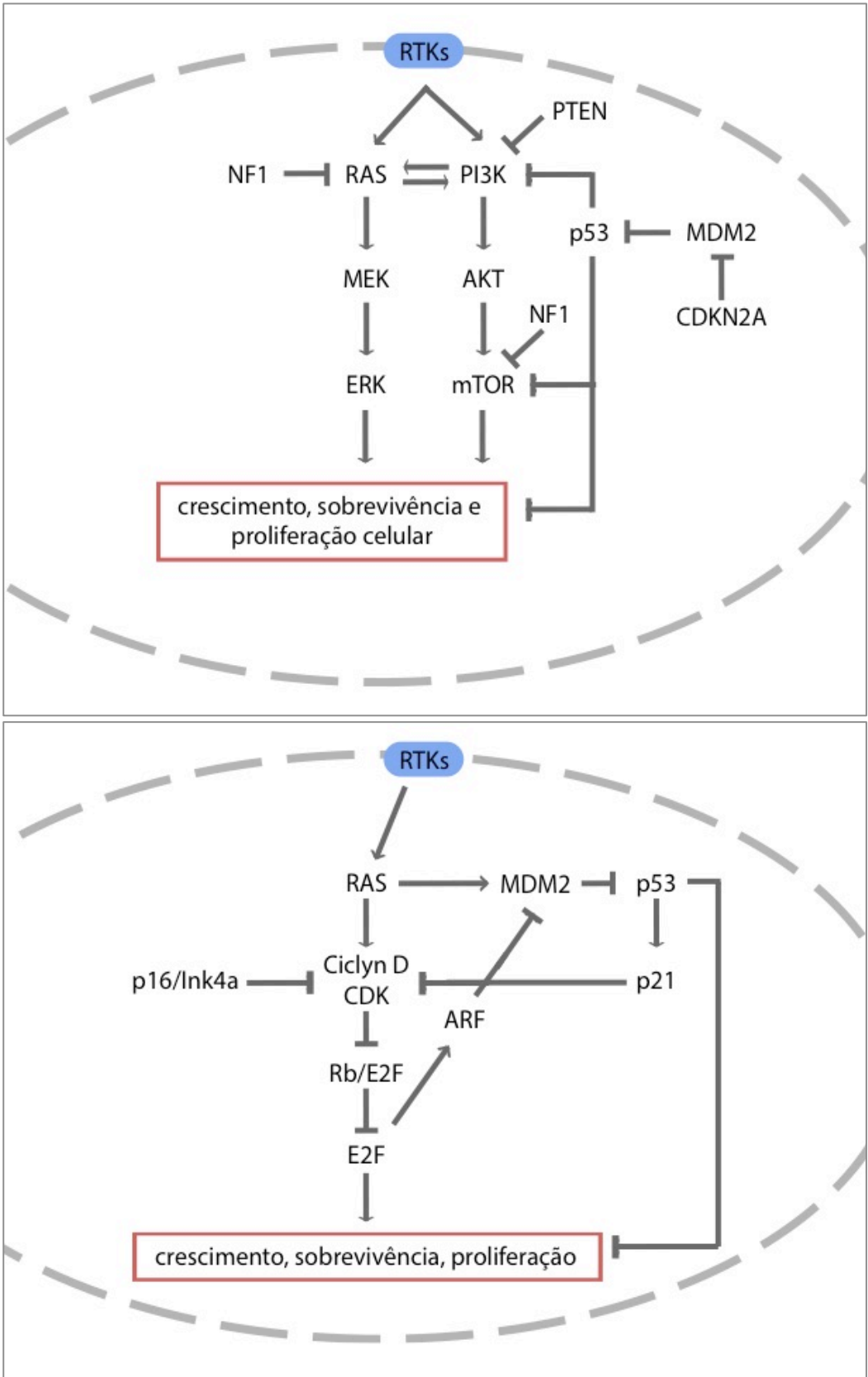


FIGURA 1: Vias de sinalização que podem ser encontradas alteradas em gliomas.

CLASSIFICAÇÃO

Gliomas podem ser classificados com base em diferentes características. A Organização Mundial da Saúde (OMS) separa os gliomas de acordo com o tipo celular ao qual a massa tumoral mais se assemelha, considerando morfologia, citogenética, e marcadores imunológicos, dividindo-os em três categorias básicas: astrocíticos, oligodendrogliais e mistos. O objetivo desta classificação, de 2007, era criar uma classificação celular que pudesse ser universalmente aplicável e que auxiliasse no prognóstico. Os tumores estão ainda classificados em graus que podem ser relacionados a sua malignidade, sendo o grau IV a forma mais agressiva, Glioblastoma Multiforme – GBM (Huse, Phillips, & Brennan, 2011; Louis et al., 2007). Segue abaixo a classificação em graus de forma mais detalhada (www.cancer.gov):

- Grau I: inclui lesões de baixo potencial proliferativo, com possibilidade de cura após ressecção cirúrgica, sem necessidade de outros tratamentos.
- Grau II: inclui lesões que são geralmente infiltrativas, com baixa atividade mitótica e maior frequência de recorrência do que tumores malignos de grau I após terapia localizada. Há uma tendência a progredirem a tumores de maior grau.
- Grau III: apresenta lesões com evidências histológicas de malignidade, com alterações (atipia) nuclear e atividade mitótica elevada, histologia anaplástica e capacidade infiltrativa. São geralmente tratados com terapia adjuvante agressiva.
- Grau IV: inclui lesões mitoticamente ativas, com tendência à necrose, associadas com progresso pré- e pós-cirúrgico bastante rápido e fatal. São geralmente tratados com terapia adjuvante agressiva.

Estudos posteriores demonstraram que gliomas primários ou secundários possuíam perfis transcricionais distintos, o que levou a classificações em subclasses com base em assinaturas transcricionais e em

alterações no número de cópias cromossômicas, que poderiam ser relacionados ao prognóstico (Huse et al., 2011). Dentre estas classificações, a mais difundida foi a criada pela Rede de Pesquisas *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), que correlaciona a assinatura gênica de diferentes tipos celulares do cérebro com os subtipos tumorais, bem como com a resposta a terapias. A TCGA é uma rede criada com o objetivo de catalogar de forma mais abrangente as anormalidades genéticas que levam à tumorigênese.

A classificação da TCGA foi criada com base em amostras de 206 pacientes, por meio da associação de dados transcricionais com alterações na sequência de DNA e número de cópias, bem como com marcadores proteômicos de vias de sinalização consideradas chave, e padrões de metilação do DNA. Os gliomas foram divididos com base no perfil molecular, em 4 subtipos: Clássico, Neural, Proneural e Mesenquimal (Verhaak et al., 2010). Resumidamente, a classificação se baseia nas seguintes prerrogativas:

- Subtipo Clássico: apresenta elevados níveis de amplificação do gene de EGFR, com deleção do gene CDKN2A, afetando a via de sinalização RB. Há ausência em mutações no gene da TP53, e alta expressão nas vias de sinalização de NES, Sonic hedgehog e Notch.
- Subtipo Neural: apresenta expressão de marcadores Neurais como NEFL, GABRA1, SYT1, e SLC12A5.
- Subtipo Proneural: marcado por alterações na via de PDGFRA e mutações pontuais em IDH1. Apresenta elevada expressão de PDGFRA, NKX2-2, e OLIG2, que reduz a expressão do supressor tumoral p21 (CDKN1A), levando a hiperproliferação. Mutações na via da TP53 e perda de heterozigossidade são eventos frequentes neste subtipo; sabe-se que a perda da funcionalidade de p53 induz instabilidade genética.
- Subtipo Mesenquimal: neste subtipo predominam deleções focais no gene NF1, e baixa expressão do mesmo. A perda de NF1 leva a aumento da sinalização de Ras, aumentando a proliferação celular. Mutações concomitantes em NF1 e PTEN foram observadas neste

subtipo, sendo que ambas apresentam intersecção com a via AKT. Marcadores mesenquimais como CHI3L1 (YKL40) e MET estão expressos, bem como os marcadores de astrócitos CD44 e MERTK, característicos de processos de transição epitélio-mesenquimal relacionados a transdiferenciação e desdiferenciação de tumores. Genes da família do TNF e da via NF- κ B também estão altamente expressos.

Apesar de a classificação do TCGA ser um avanço em termos da compreensão da biologia de gliomas, a heterogeneidade tumoral é muito mais complexa do que a classificação de um paciente em um dos quatro subtipos. Um trabalho recente demonstrou por meio de sequenciamento de RNA (RNA-seq) de células individuais da massa tumoral que um único glioma pode apresentar células de mais de um subtipo. Além disso, neste trabalho, no qual foram sequenciadas 430 células individuais de 5 gliomas primários distintos, se observou que muitas das células que compõem o tumor não poderiam ser classificadas em nenhum dos subtipos existentes. A alta heterogeneidade da massa tumoral foi ainda relacionada a um menor o tempo de sobrevivência do paciente (Patel et al., 2014). Seriam células com características distintas originadas a partir de células diferentes? Já foi demonstrado para meduloblastoma que diferentes subtipos tumorais podem estar relacionados a diferentes origens (Gibson et al., 2010). No entanto, para gliomas, evidências recentes indicam que subtipos ou populações distintas possam se originar a partir de uma mesma célula de origem que tenha sofrido diferentes mutações (Lindberg et al., 2014). Para uma definição completa acerca da célula de origem tumoral, veja ítem 3 desta introdução, “célula de origem tumoral e célula-tronco tumoral.

Independentemente da classificação conferida pelo patologista, sabe-se que as terapias são geralmente administradas com base na classificação tumoral, e que sua escolha se dá em relação a uma maioria de características histológicas observadas. Raramente são consideradas informações moleculares, mas mesmo quando isto acontece, estas também se referem ao *pool* populacional. Assim sendo, faz sentido que no trabalho de Patel e

colaboradores, em que foram analisadas células individuais, tenha sido observada uma ampla heterogeneidade, relacionada com a baixa sobrevida observada para este tipo tumoral, e que as terapias em gliomas continuem apresentando uma baixa eficácia apesar de anos de pesquisa.

O CÉREBRO

DESENVOLVIMENTO CEREBRAL NORMAL

Logo no início do desenvolvimento embrionário ocorre o processo de gastrulação, que divide o embrião em duas camadas de células, o epiblasto e o hipoblasto. As células do epiblasto irão se diferenciar em 3 linhagens primárias de células tronco que originarão todas as estruturas do organismo em desenvolvimento, enquanto o hipoblasto originará as estruturas extra-embrionárias. Dentre as linhagens primitivas de células tronco originadas pelo epiblasto estão as células tronco neurais (NSCs). As células do epiblasto começam então um processo de migração que culmina na formação de duas novas camadas embrionárias. A camada mais profunda desloca as células do hipoblasto, e forma a endoderme, que originará estruturas do trato respiratório e digestivo. As células que formam a nova camada intermediária compõem a mesoderme, que dará origem a estruturas como músculos, ossos, cartilagens e sistema vascular. As células que permanecem na camada epidermal formam a ectoderme, que formará estruturas como pele, unhas e glândulas sudoríparas, e neuroectoderme, originando o sistema nervoso (Stiles & Jernigan, 2010). O início da neurogênese em mamíferos se dá com a formação da placa neural, nome dado para a região do embrião onde estão localizadas as NSCs, que então se dobra e forma o tubo neural. Ao término da formação do tubo neural, as NSCs formam uma única camada de células, bem no centro do tubo, chamada de neuroepitélio, ou zona ventricular (VZ) (Conti & Cattaneo, 2010). No neuroepitélio propriamente dito, primeiramente ocorre a proliferação de células tronco neurais, promovendo o crescimento da estrutura que posteriormente originará o cérebro. A seguir, ocorre uma fase neurogênica, na qual são

formados neurônios corticais, e uma fase gliogênica, originando as células da glia radial (RGCs). Por fim a mielinização, a poda de axônios, a estabilização sináptica e a apoptose completam o processo de maturação do cérebro (Cayre, Canoll, & Goldman, 2009).

MIGRAÇÃO CELULAR NO CÉREBRO SADIO E NO DESENVOLVIMENTO TUMORAL

A migração celular tem um papel fundamental durante o processo de desenvolvimento cerebral. As células originadas na VZ tem que migrar para seu destino final em regiões mais distantes nas substâncias branca e cinzenta. Os processos de migração dependem de fatores quimioatrativos ou quimiorrepulsivos, substratos, sinais de parada ou de deslocamento, etc., e falhas nestes processos podem levar a doenças como epilepsia, retardo mental, e falhas no desenvolvimento motor. A migração neuronal ocorre em sua maioria antes do nascimento. Já no período pós-natal, a migração compreende principalmente progenitores gliais que vão para a substância branca, neocortex, corpo estriado e hipocampo, onde se diferenciam em astrócitos e oligodendrócitos (Cayre et al., 2009).

Em gliomas, há um grande potencial infiltrativo, e as células tumorais migram pelo tecido cerebral sadio, o que impossibilita a ressecção cirúrgica total. A migração dos gliomas, no entanto, não ocorre de forma aleatória, e segue padrões de migração similares aos percorridos por células progenitoras gliais ao longo do desenvolvimento, o que sugere que estes dois processos, o normal e o patológico, sejam regulados por mecanismos similares (Cayre et al., 2009).

NICHOS GERMINAIS NO CÉREBRO ADULTO

Sabe-se que as NSCs permanecem presentes no cérebro adulto, e se localizam em nichos específicos denominados nichos germinais, onde há um ambiente especializado, propício para promover a auto-renovação e a diferenciação destas células. A manutenção, a proliferação e a diferenciação das NSCs nestes nichos depende não apenas de fatores ambientais, mas

também de programas genéticos. Estes nichos compreendem a zona subventricular (SVZ), localizada na parede do ventrículo lateral, e a zona subgranular (SGZ), no giro denteado do hipocampo (Martino & Pluchino, 2006). As NSCs do cérebro adulto possuem características muito especiais, pois podem se auto-renovar por muitas passagens, e são capazes de se diferenciar nos principais tipos celulares do cérebro, como neurônios, astrócitos, células NG2+, também conhecidas como células precursoras de oligodendrócitos (OPCs), e oligodendrócitos (OLs) (veja **Figura 2**), além de células vasculares e células ependimais. As células da microglia não são originadas a partir de NSCs, mas sim de monócitos provenientes da medula óssea durante o desenvolvimento, que se tornam células imunes residentes do CNS.

Evidências recentes mostraram que células da glia localizadas fora dos nichos germinativos também podem adquirir ou reativar o seu potencial tronco como parte de um processo de gliose reativa, gerando não apenas células gliais mas também neurônios, o que sugere a existência de outras fontes endógenas de células tronco no cérebro (Richardson, Young, Tripathi, & McKenzie, 2011; Robel, Berninger, & Götz, 2011).

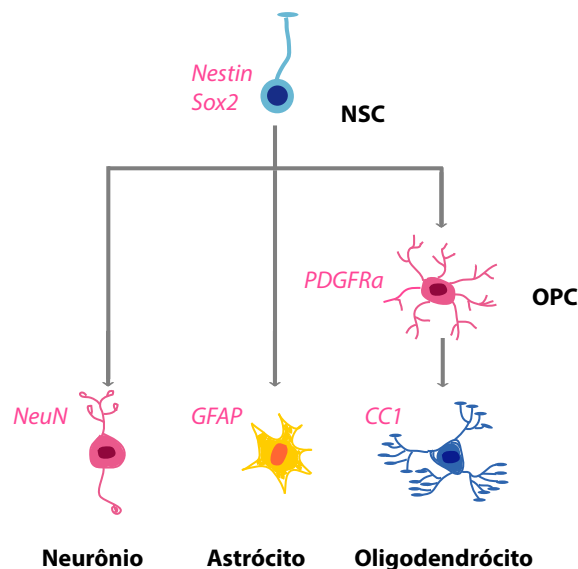


FIGURA 2: Células Tronco Neurais (NSCs) no cérebro adulto expressam os marcadores Nestina e Sox2, e podem gerar neurônios, astrócitos, e as células precursoras de oligodendrócitos, OPCs, que originarão os oligodendrócitos maduros. Adaptado de Liu *et al.*

A SVZ, um dos principais nichos germinais do cérebro adulto (**Figura 3**), é geralmente descrita como contendo 5 principais tipos celulares: as células endimais (células do tipo E), astrócitos do tipo B2, astrócitos do tipo B1, células progenitoras (células do tipo C), e neuroblastos (células do tipo A). Há ainda outros tipos celulares, como microglia e células precursoras de oligodendrócitos (OPCs):

Células endimais: também conhecidas como células do tipo E, separam o parênquima do cérebro do ventrículo lateral. Estas células são multiciliadas e ajudam a circular o fluido cérebro-espinhal através do ventrículo. As células endimais juntamente com os astrócitos do tipo B2 são importantes na regulação ambiental da SVZ (Mamber, Kozareva, Kamphuis, & Hol, 2013). **Figura 3**.

Astrócitos do tipo B2: são considerados não-neurogênicos, e não estão em contato com a camada endimal. Sua morfologia e localização permite que atuem como sensores e reguladores do nicho neurogênico, fortificando a SVZ e dando suporte à migração de neuroblastos (Mamber et al., 2013). **Figura 3**.

Astrócitos do tipo B1: ficam acima das células endimais, e são NSCs quiescentes da SVZ adulta, permanecendo em fase G1 por longos períodos. Estas células mantêm características similares a de seus precursores, as células da glia radial, que originam a maioria dos neurônios e da glia madura no embrião, e não constituem uma população homogênea de NSCs adultas, apresentando diferenças epigenéticas com base na sua localização. Estes astrócitos expressam GFAP, BLBP e GLAST, e estão em contato com o fluido cérebro-espinhal do ventrículo por meio de um cílio. Astrócitos do tipo B1 aparentam se agrupar, e às vezes estendem seus processos para entrar em contato com vasos sanguíneos, estando sempre próximos destes. Apenas uma pequena fração dos astrócitos do tipo B1 encontra-se num estado ativo se preparando para a divisão celular, para, em condições naturais, originar as células do tipo C (Lim & Alvarez-Buylla, 2014; Mamber et al., 2013). **Figura 3**.

Células do tipo C: são a progênie das células do tipo B1, e também se encontram próximas da vasculatura, porém se dividem mais

frequentemente. Originam os neuroblastos (células A), e podem também originar OPCs (Mamber et al., 2013). **Figura 3.**

Neuroblastos ou Células do tipo A: podem sofrer mitose, originando mais neuroblastos, mas rapidamente deixam a SVZ, migrando por vias de tubos gliais e se diferenciando em neurônios. Diferentes regiões da SVZ produzem diferentes tipos de neuroblastos (Mamber et al., 2013). **Figura 3.**

Microglia: são macrófagos residentes do CNS, e constituem uma população altamente estável, ao contrário dos macrófagos encontrados nas meninges e zonas perivasculares. Apresentam expressão de marcadores de macrófagos, como CD11b, e se acredita que sejam células derivadas de precursores hematopoiéticos que se estabelecem no CNS antes do nascimento, e antes mesmo da hematopoiese da medula óssea. Portanto sua origem não é ectodérmica como ocorre com as demais células do CNS, mas sim mesodérmica, visto que compreende células do sistema imune. Células da microglia dão suporte ao nicho neurogênico, provavelmente por meio da excreção de fatores solúveis. Após dano, a microglia remove as células danificadas por meio de fagocitose, promovendo neurogênese (Ginhoux, 2013). **Figura 3.**

OPCs: são encontradas, em sua maioria, fora da SVZ, mas podem ter projeções que adentram a SVZ. A progressão de astrócitos do tipo B1 para células do tipo C pode produzir OPCs, porém em baixos números (Mamber et al., 2013) - **Figura 3.** As OPCs produzidas nas zonas germinais durante o processo de desenvolvimento migram e se distribuem de forma homogênea pelo cérebro. Elas são as responsáveis por se diferenciar em oligodendrócitos, realizando processos de mielinização. Na vida adulta, mantêm sua capacidade proliferativa, e há indícios de que mantenham a sua capacidade diferenciativa em oligodendrócitos (Hughes, Kang, Fukaya, & Bergles, 2013).

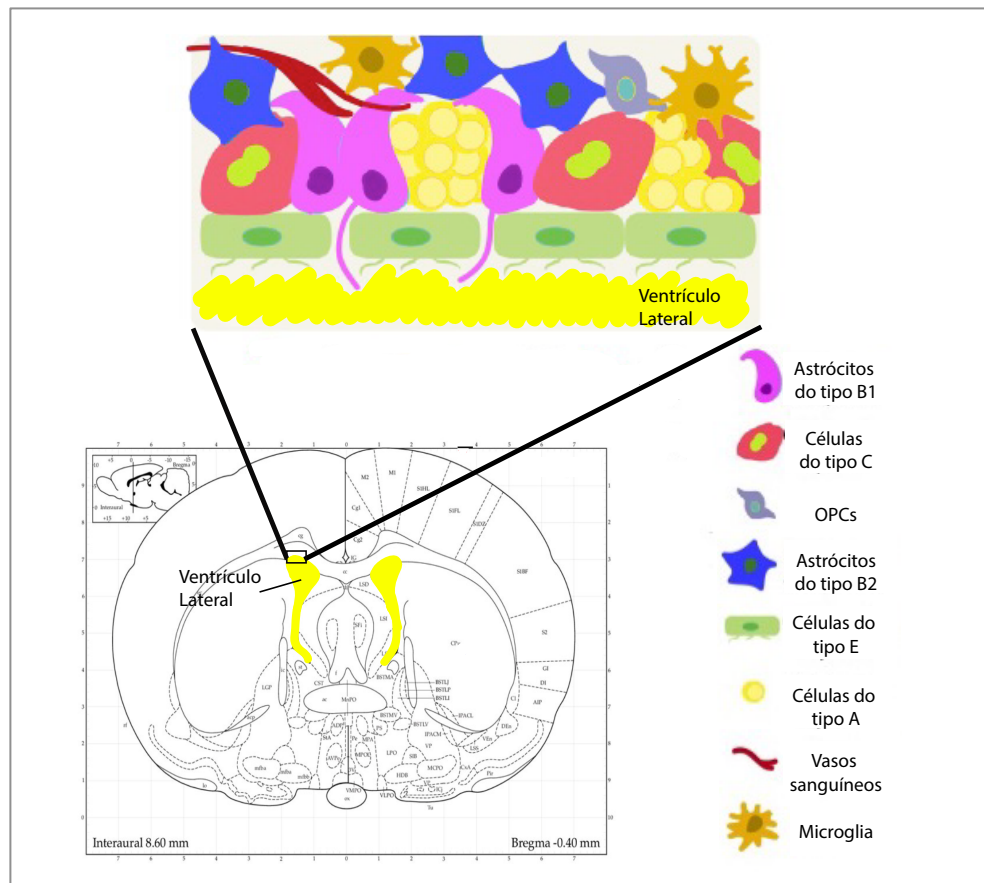


FIGURA 3: A zona subventricular (SVZ) se encontra na superfície do ventrículo lateral, e é composta por 5 tipos celulares principais: células endodimais (do tipo E), astrócitos do tipo B1, astrócitos do tipo B2, células do tipo C, e neuroblastos (células do tipo A). Astrócitos do tipo B1 são as NSCs quiescentes do cérebro adulto. Elas podem ter um cílio contatando o ventrículo lateral, preenchido por fluido cérebro-espinhal. Outros astrócitos do tipo B1 fazem contato com vasos sanguíneos na SVZ, ou com vasos sanguíneos e com o fluido cerebro-espinhal. Astrócitos do tipo B1 sofrem divisão assimétrica e originam células do tipo C. Estas células originam os neuroblastos, ou células do tipo A, que migram da SVZ e originam neurônios. Células do tipo C podem também produzir OPCs. Há ainda células da microglia na SVZ. A microglia, junto com células endodimais (do tipo E) e astrócitos do tipo B2, ajudam na regulação do ambiente no nicho germinativo da SVZ. Adaptado de Mamber e colaboradores (Mamber et al., 2013).

CÉLULA-TRONCO TUMORAL E CÉLULA DE ORIGEM TUMORAL

CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS (CSCs)

Com o estudo das populações celulares presentes na massa tumoral, certos trabalhos começaram a descrever a existência de uma sobreposição entre a biologia de células tronco e de células tumorais, particularmente devido a expressão de genes com importante papel nas células tronco e que

também passaram a ser descritos como com alta expressão em algumas células cancerosas. Isto levou à hipótese de que poderiam existir células tumorais similares à células tronco, que representariam uma pequena parcela de células capaz de iniciar o processo tumorigênico e manter a viabilidade tumoral. As primeiras evidências sobre a existência de tal população vieram a partir de estudos em leucemia mieloide aguda (AML), em que células individuais injetadas em camundongos eram capazes de iniciar a doença. Estas células individuais eram CD34+CD38+, enquanto que células CD34+CD38- não eram capazes de iniciar AML em camundongos. Observou-se ainda que havia uma certa hierarquia dentre as células tumorais, na qual uma minoria de células tronco tumorais, tumorigênicas e menos diferenciadas, era capaz de originar a maioria das células que compõem o tumor, que passam a ser diferenciadas e com potencial proliferativo limitado, apesar de herdarem as mutações oncogênicas de suas células progenitoras (Magee, Piskounova, & Morrison, 2012; Tabatabai & Weller, 2011).

A sensibilidade de uma célula tumorigênica ou não tumorigênica a uma certa droga varia com o tipo tumoral e com a terapia administrada, mas CSCs são, geralmente, mais resistentes a tratamentos do que as células mais diferenciadas do tumor, e após quimioterapia, a presença de células diferenciadas é considerada como um bom prognóstico; da mesma forma, a presença de células indiferenciadas, mesmo que compondo uma pequena população residual, é um indicativo de recidiva (Magee et al., 2012). Após a descoberta das CSCs, a indução de diferenciação passou a ser uma das estratégias terapêuticas abordadas para câncer (Diamandis et al., 2007).

CSCs EM GLIOMA

A descoberta da existência de uma população de células com características tronco tumorais dentre as células de glioma (Singh et al., 2003; 2004) surgiu como uma quebra de paradigma e foi vista como a razão por trás dos péssimos níveis de sobrevida dos pacientes diagnosticados com este tumor. De acordo com a hipótese das células tronco tumorais, a maioria dos tratamentos disponíveis seria capaz de eliminar a maior parte da massa tumoral, composta por células mais diferenciadas, sendo que a população tronco tumoral, uma minoria mais resistente, permaneceria viva e seria capaz de reestabelecer todo o tumor após o tratamento, apesar de aparente remissão (Diamandis et al., 2007; Ledur et al., 2012).

As células tronco tumorais em gliomas foram inicialmente descritas como capazes de auto-renovação e diferenciação, e por isso acreditava-se que estas células surgissem a partir de células tronco neurais (NSCs) normais do cérebro (Singh et al., 2004). Diversos autores tentaram estabelecer marcadores específicos capazes de selecionar CSCs em glioma, como CD133, Nestina, transportadores ABC, CD15, L1CAM, entre outros (Brescia, Richichi, & Pelicci, 2012; Kondo, Setoguchi, & Taga, 2004; Singh et al., 2004; Yuan et al., 2004). No entanto, enquanto alguns autores foram capazes de selecionar populações tumorigênicas e não tumorigênicas com base nestes marcadores, outros não foram capazes de distinguir potencial tumorigênico com base na expressão destas proteínas. A variação encontrada na literatura poderia ser explicada pela grande heterogeneidade tumoral em gliomas, por diferenças entre pacientes, por diferenças metodológicas, ou ainda porque muitas vezes os marcadores utilizados acabam por apresentar sobreposição funcional em diferentes populações (Magee et al., 2012). No entanto, há uma série de características comuns que uma célula deve preencher para que seja considerada como uma CSC. São elas: a) capacidade de formação de agregados (esferas) em cultura; b) capacidade de auto-renovação – células individuais dissociadas de seus agregados devem ser capazes de formar novos agregados *in vitro*; c) capacidade de diferenciação em outros tipos celulares; d) geração de

tumores *in vivo* (indicativo da organização hierárquica do tumor) (Alcantara Llaguno et al., 2009; Beier et al., 2008; Lee et al., 2006; Singh et al., 2004).

RASTREAMENTO DE LINHAGEM CELULAR

Para que possamos compreender melhor as técnicas e os modelos genéticos utilizados na investigação da célula de origem tumoral, precisamos entender como funciona o processo de rastreamento celular, também conhecido por *Cell Tracking*, ou ainda *Lineage Tracing*.

O termo “linhagem celular” surgiu por volta de 1900, quando pesquisadores se deram conta de que todas as células de um organismo eram derivadas de uma única célula pré-existente, o zigoto. Pouco depois, por volta de 1930, estudos com insetos que apresentavam mosaicismo espontâneo levaram a conclusão de que a função gênica estava associada com a diferenciação da linhagem celular (Buckingham & Meilhac, 2011) – um mosaico é um indivíduo originado a partir de um único zigoto, no qual há duas ou mais populações de células com diferentes genótipos.

O processo de rastreamento celular surgiu como uma ferramenta para a biologia do desenvolvimento clássica, pois fornece informações sobre o número de células derivadas de uma célula fundadora, sua localização no organismo e seu estado de diferenciação. Mais recentemente, o processo de rastreamento da linhagem celular passou a ser utilizado na pesquisa de células-tronco e também como forma de modelar a heterogeneidade celular no câncer (Kretzschmar & Watt, 2012). Os principais modelos genéticos utilizados para estudos de rastreamento de linhagem celular são *Drosophila*, *zebrafish* e camundongos.

Historicamente, o maior dilema do rastreamento celular envolve a capacidade de marcar as células de forma duradoura que permita analisar a sua contribuição para o embrião sem perturbar o desenvolvimento do organismo. Inicialmente, os pesquisadores da área de biologia do desenvolvimento produziam quimeras, animais obtidos a partir da fusão de ovos fertilizados distintos, em que fosse possível distinguir entre núcleos de espécies diferentes (ex.: quimeras de embriões de galinhas com embriões de

codornas). Outras técnicas muito utilizadas no passado compreendem o transplante de tecidos de um embrião para outro hospedeiro, a marcação radioativa, a injeção de corantes em partes do embrião ou ainda a microinjeção de corantes diretamente em células específicas (Buckingham & Meilhac, 2011). No entanto, nestas técnicas a marcação não apresenta uma resolução a nível de células isoladas, e pode acabar por se difundir, ou ainda se diluir após diversas rodadas de divisão celular. O que fez com que as técnicas de rastreamento celular evoluíssem foi o surgimento de marcadores genéticos, como por exemplo a proteína fluorescente verde (*GFP – Green Fluorescent Protein*) (Chalfie, Tu, Euskirchen, Ward, & Prasher, 1994; SHIMOMURA, JOHNSON, & SAIGA, 1962), que podem ser inseridos na célula por injeção direta, transfecção ou transdução viral. Estes marcadores permitem melhor resolução, e quando expressos de forma estável, são herdados pela progênie da célula marcada (Kretzschmar & Watt, 2012). Abordaremos a seguir algumas das técnicas de biologia molecular essenciais para o rastreamento celular:

1. *Marcação genética*

Proteínas marcadoras, como β -galactosidase (codificada pelo gene *LacZ* e visualizada pela exposição ao substrato X-galactose), e proteínas fluorescentes *GFP*, *RFP* (*Red Fluorescent Protein*), *YFP* (*Yellow Fluorescent Protein*), *EYFP* (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*), *tdTomato*, entre outras, apresentam diversas vantagens ao serem utilizadas na marcação celular, pois são geneticamente codificadas. Suas sequências são conhecidas como genes repórter. Estas sequências podem, por exemplo, ser fusionadas a sequências de genes de interesse, gerando **proteínas quiméricas**. Neste caso, as duas sequências encontram-se sob controle do mesmo promotor e são transcritas em uma mesma molécula de RNA mensageiro, sendo consideradas como uma construção de DNA *in tandem*. Neste caso, o gene repórter só será expresso se o seu promotor for ativado (veja a seguir). Apesar de proteínas quiméricas apresentarem vantagens em

termos de visualização, pode haver erros de conformação na proteína, por ser traduzida juntamente com a proteína repórter, e isso pode afetar a sua atividade. Além disso, as proteínas fluorescentes podem ter certa toxicidade (Chalfie et al., 1994; S. Feil, Valtcheva, & Feil, 2009). Uma outra forma de marcação genética ocorre por meio de **ensaios com promotores** específicos atuando sobre o gene repórter. Neste caso não há um gene de interesse *per se*, mas a ativação de um promotor específico promove a transcrição do gene repórter. Um exemplo de aplicação é a ativação de promotores de tipo celulares específicos, que passam a produzir proteínas marcadoras no tipo celular de interesse (Liu et al., 2011). Para uma tabela comparativa entre ensaios com promotores e proteínas quiméricas veja a **tabela 1**. Para que a proteína marcadora marque não apenas um evento biológico, mas que atue como marcadora também em suas células-filha, é necessário que sua sequência seja integrada ao genoma da célula. Um exemplo de metodologia em que a sequência exógena é integrada ao DNA da célula alvo é a transdução por retrovírus (Buckingham & Meilhac, 2011; Kretschmar & Watt, 2012). Veja a tabela a seguir com exemplos de proteínas repórter quiméricas e construções *in tandem*.

TABELA 1. Técnicas de marcação genética

Técnica	Vantagem	Desvantagem	Exemplo	Referência
Proteína quimérica /ensaios de expressão gênica	Avaliar a expressão do gene de interesse	Defeitos na estrutura da proteína alvo por ser traduzida ligada à proteína repórter	Proteína fusionada de Histona com GFP permite a análise da dinâmica de cromossomos na célula	(Kanda, Sullivan, & Wahl, 1998)
Ensaios por promotor	Especificidade	Promotor deve ser altamente específico; caso contrário pode haver <i>"leaking"</i>	EGFP sob controle do promotor NG2. Células com o promotor de NG2 ativo serão verdes	(Hughes et al., 2013)

2. Marcação Celular originada por Recombinação Gênica

A recombinação gênica é a abordagem preferida para estudos de rastreamento, visto que a enzima recombinase pode ser expressa de forma específica em células ou tecidos para ativar a expressão de um gene repórter condicional, marcando assim todas as células derivadas após o evento de recombinação. Desta forma, pode-se ter controle temporal (ao longo do processo de desenvolvimento) e/ou espacial (célula- ou tecido-específico) sobre o que se deseja marcar. Os sistemas de recombinação mais utilizados são o sistema *Cre-loxP*, adaptado do bacteriófago P1, ou *FLP-FRT*, adaptado de *Saccharomyces cerevisiae*. Em *FLP-FRT*, a recombinase flipase (*FLP*) está expressa sob controle de um promotor célula- ou tecido-específico, induzido por *heat-shock*, ou choque-térmico. Através da recombinação, o promotor α -tubulina em um cromossomo é fusionado a um gene repórter (*LacZ* ou *GFP*) no cromossomo homólogo no sítio de reconhecimento da flipase (*FRT – flippase recognition target*). A ativação do gene repórter só ocorre nas células em que o promotor esteja ativado. Este sistema tem sido muito utilizado em *Drosophila*. Já o sistema *Cre-loxP* é o preferido quando o modelo animal utilizado são camundongos. Nele, a expressão da recombinase *Cre* é controlada por um promotor célula- ou tecido-específico presente em uma linhagem particular de camundongos. Um animal desta linhagem precisa ser cruzado a uma segunda linhagem de camundongos, na qual o gene repórter esteja flanqueado por uma sequência *loxP-STOP-loxP* (também chamada sequência “*floxed*”), para que a recombinação ocorra. Os descendentes que expressarem ambos os construtos terão a *Cre* ativando o gene repórter especificamente nas células que expressarem o promotor, pois haverá uma excisão da sequência de parada (*STOP*) (Buckingham & Meilhac, 2011; S. Feil et al., 2009; Kretschmar & Watt, 2012).

Figura 4.

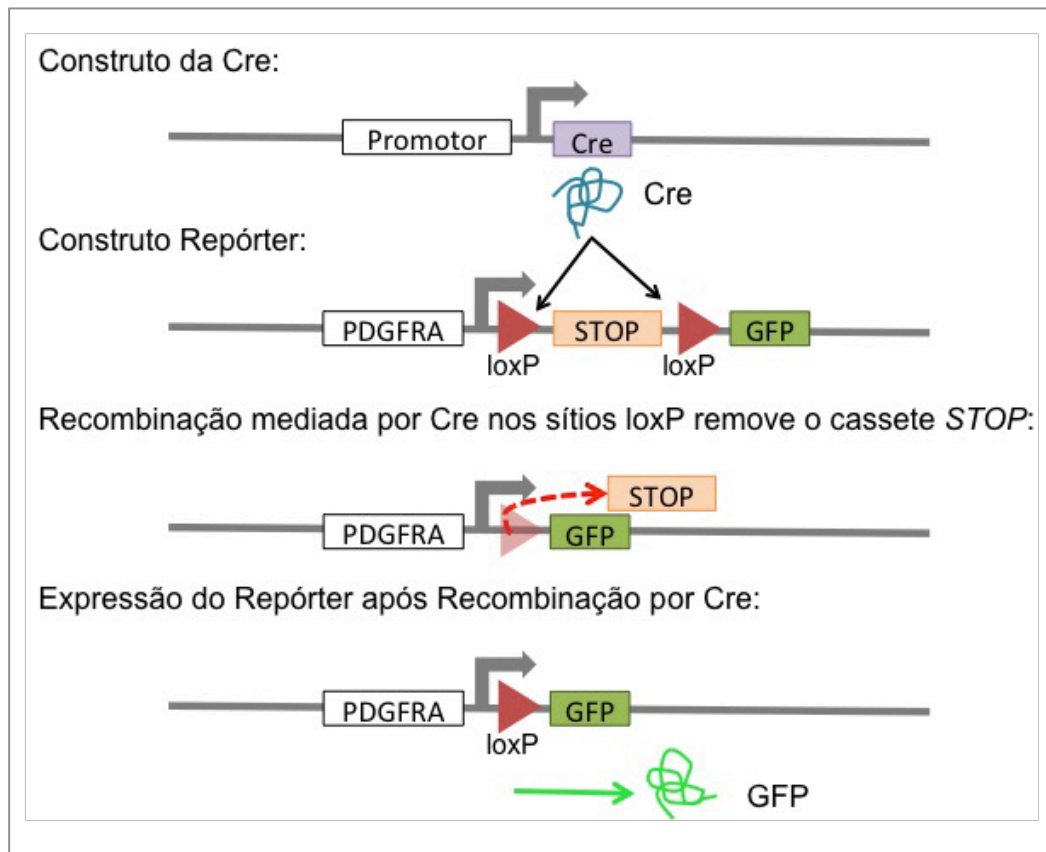


FIGURA 4: Esquema mostrando o funcionamento do sistema de Recombinação Gênica Cre-loxP. Após a recombinação, o promotor PDGFRA dirige a tradução do gene repórter GFP.

O controle temporal e espacial da atividade de *Cre* pode ser atingido por recombinação induzida. *Cre* pode estar fusionado ao receptor de estrógeno humano (*ER*). Na ausência de ligantes, como o estrógeno 17β -oestradiol, o anti-estrógeno tamoxifeno, ou seu metabólito ativo 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHT), a recombinase *Cre* fusionada a proteína *ER* (*CreER*) é mantida no citoplasma por proteínas hsp (*heat-shock proteins*). Quando um ligante está presente, ele se difunde no citoplasma e se liga a proteína *ER*, que muda de conformação e libera a proteína fusionada das hsps. A proteína *CreER* ativa é translocada para o núcleo da célula e a recombinase *Cre* recombina os sítios *loxP*. Este sistema pode apresentar *leakiness*, ou seja, expressão basal do gene repórter devido a presença de níveis endógenos de 17β -oestradiol do camundongo, que pode ativar a *Cre*. Um bom controle para este tipo de situação é a análise de outros tecidos além do tecido alvo dos ligantes,

para se determinar o grau de ativação inespecífica (Kretzschmar & Watt, 2012).

3. *Promotores*

A escolha do promotor que irá dirigir a recombinação é fundamental para que o repórter seja expresso somente nas células que se deseja atingir. Um mesmo promotor pode estar ativo em diferentes tecidos, o que pode ou não ser um problema, dependendo do objetivo do estudo. Se o promotor de interesse estiver ativo no intestino e no cérebro, mas o objetivo é estudar apenas o rastreamento celular no cérebro, isso não deve causar maiores problemas. Se, entretanto, em um mesmo tecido o promotor estiver ativo em populações celulares distintas, podemos formular uma conclusão errônea a respeito de um tipo celular e das células que derivarem deste tipo. Ao estudar a célula de origem em gliomas, por exemplo, deve-se ter clareza sobre qual célula se deseja testar em uma hipótese, e selecionar promotores o mais específicos o possível para este tipo celular.

4. *Marcação com Repórteres Multicoloridos*

A marcação simultânea de células progenitoras pode ser útil na avaliação do destino da progênie de uma dada célula, ou para avaliar as diferentes opções de uma célula após divisão assimétrica. Construtos multicoloridos também permitem analisar como diferentes tipos celulares contribuem para a manutenção e reparo de um certo tecido (Buckingham & Meilhac, 2011; Kretzschmar & Watt, 2012). Uma técnica de marcação multicolorida é o *MADM* (*Mosaic Analysis with Double Markers*), na qual recombinação intercromossômica por meio do sistema Cre-loxP gera células marcadas com diferentes proteínas fluorescentes. Esta técnica foi inicialmente utilizada na caracterização da contribuição de certos progenitores neurais (células granulares cerebrais) para diferentes camadas do córtex cerebral (Zong, Espinosa,

Su, Muzumdar, & Luo, 2005). No entanto, possui diversas outras aplicações, podendo por exemplo ser utilizada para marcar células mutantes homozigotas que surgem esporadicamente, evento que mimetiza a perda de heterozigosidade (*LOH – loss of heterozygosity*) espontânea em tumores humanos. Assim, MADM permite marcar células mutantes permanentemente com uma cor, e sua célula-irmã selvagem (*WT*) com outra cor, em um *background* de camundongo heterozigoto incolor. Cada célula *WT* atua portanto como o controle ideal da célula mutante (Liu et al., 2011) (**Figura 5**). Observe na figura que esta técnica considera diferentes tipos de segregação cromossômica. Na segregação do tipo X, cromátides que sofreram recombinação cromossômica migram para pólos opostos da célula, enquanto na segregação do tipo Z as cromátides recombinadas migram para o mesmo pólo (Chua & Jinks-Robertson, 1991). A aplicação da técnica de MADM, utilizada na investigação da célula de origem em gliomas, será discutida mais adiante. Uma outra técnica combina o sistema Cre-loxP com o sistema FLP-FRT, gerando dupla marcação (Yamamoto et al., 2009). Há ainda o sistema “Brainbow”, no qual quatro proteínas fluorescentes podem ser combinadas de forma estocástica. Com este sistema, o laboratório de Hans Clevers marcou aleatoriamente clones de células-tronco positivos para a proteína Lgr5 na cripta intestinal. Os clones inicialmente multicoloridos acabavam marcados por uma única cor à medida que a cripta era povoada por células derivadas de um único clone (Snippert et al., 2010).

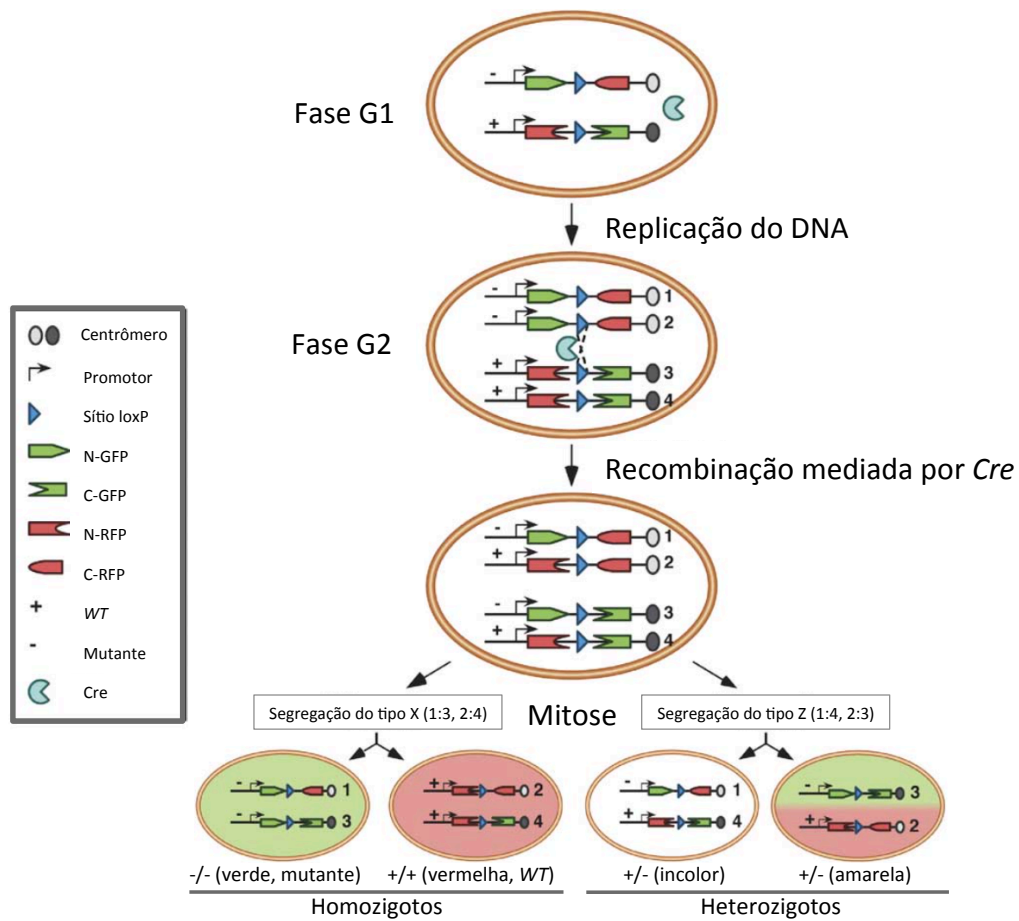


FIGURA 5: Esquema do sistema de marcação com repórteres multicoloridos MADM. Neste sistema as proteínas fluorescentes estão separadas em suas porções N e C terminais por sítios lox P, podendo se unir após recombinação. Cada cromossomo contém ainda uma cromátide selvagem (*WT*) e uma cromátide mutante de um mesmo gene (o animal é heterozigoto e incolor), e a recombinação pode originar células mutantes ou *WT* marcadas em cores diferentes.

CÉLULA DE ORIGEM TUMORAL

Técnicas modernas de biologia molecular nos permitem identificar genes mutados em tipos específicos de câncer. Esta informação, apesar de essencial para a compreensão da base genética do desenvolvimento e da progressão do câncer, não esclarece a ordem em que estas mutações foram acumuladas, e nem em qual tipo celular este acúmulo ocorreu para que o câncer fosse inicialmente formado. Recentemente, experimentos de *cell tracking* em modelos animais como camundongos têm permitido a expressão de oncogenes ou a supressão de genes supressores tumorais de

forma condicional. Assim, pode-se olhar para células-tronco tecido específicas nas quais a mutação foi gerada, e analisar toda a sua progênie. A marcação de células individuais proporcionada pela técnica de rastreamento permite analisar a contribuição de células específicas para os processos de crescimento e relapse tumoral. Certo tipo celular, seja por causa do microambiente onde se encontra, por vias específicas nele ativadas, ou ainda pelo estado de sua cromatina (epigenética), pode favorecer a hiperproliferação e a formação do tumor. Desta forma, a célula que sofre a mutação inicial não necessariamente é a célula que originará o tumor, ou seja, a célula de origem (Blanpain, 2013; Visvader, 2011).

CÉLULA DE ORIGEM EM GLIOMAS: MODELOS GENÉTICOS COMO AUXILIARES NA IDENTIFICAÇÃO DA ORIGEM

1. NSCs como células de origem

Após a descoberta da existência de CSCs em glioma, a hipótese mais aceita passou a ser a de que estes tumores seriam originados a partir de NSCs. Durante o desenvolvimento cerebral normal, as NSCs originam astrócitos, neurônios e oligodendrócitos maduros. Esta plasticidade das NSC parece dar suporte à hipótese de que estas células, quando mutadas, poderiam originar os gliomas, visto que estes são massas celulares heterogêneas. Trabalhos que introduziram mutações/deleções nos genes supressores tumorais p53 e Nf1 (Zhu et al., 2005), ou p53 e PTEN (Zheng et al., 2008), ou ainda que tenham superexpressado uma forma mutante de p53 especificamente em NSCs por meio de promotores de hGFAP ou Nestina (Wang et al., 2009), foram capazes de originar gliomas em camundongos. Entretanto, promotores de hGFAP encontram-se ativos não somente em NSCs mas também em astrócitos. Mutações em INK4a/Arf e EGFR-VIII induzidas em neuroesferas *in vitro* que foram então injetadas em camundongos imuno-comprometidos também geraram gliomas (Bachoo et al., 2002; Ligon et al., 2007). O problema aqui é que a cultura de neuroesferas

poderia ter outros tipos celulares, inclusive outros tipos celulares progenitores originados a partir das neuroesferas. Além disso, o trabalho de Ligon e colaboradores utilizou células precursoras/NSC purificadas de embriões com INK4a/Arf deletados, e infectou estas células com retrovírus contendo EGFR VIII, promovendo ativação constitutiva deste receptor, mas observou que somente eram formados tumores quando o gene Olig2 estava expresso (em sua forma homozigota ou heterozigota). Mais do que isso, os autores mostram que pelo menos 85% das células proliferativamente ativas (Ki67+) em biópsias de GBM humanos são também Olig2+. O trabalho mostrou que Olig2 pode atuar reprimindo p21, um supressor tumoral, e possivelmente outros alvos de p53, estimulando assim a proliferação (Ligon et al., 2007). Apesar de a argumentação neste caso ser de que Olig2 é um marcador de células progenitoras reminiscentes das células do tipo C das zonas germinativas no cérebro adulto, este é também um conhecido marcador de OPCs (Persson et al., 2010).

Injeções virais aplicadas diretamente no cérebro para inativar genes supressores tumorais em regiões específicas mostraram que a SVZ, onde residem as NSCs, é particularmente sensível à formação de gliomas, o que não ocorre em nenhuma outra região do cérebro (Friedmann-Morvinski et al., 2012). Apesar de estes modelos darem suporte a uma origem de gliomas a partir de NSCs, fica a dúvida se estas células atuam como uma origem direta, ou se o tumor poderia se originar a partir de células progenitoras derivadas de NSCs.

Para um resumo dos trabalhos que identificaram NSCs como célula de origem em glioma, veja a **Tabela 1**.

2. Células diferenciadas como células de origem

Historicamente, astrócitos foram consideradas como as células de origem em gliomas (Bachoo et al., 2002; Dufour et al., 2009). Um destes trabalhos utilizou astrócitos purificados a partir de cérebros de camundongos INK4a/Arf^{-/-} para expressar EGFR mutante (EGFR vIII,

constitutivamente ativo). Um trabalho mais recente, de 2012, também demonstrou ser possível a formação de gliomas a partir de células diferenciadas, como neurônios e astrócitos, que levariam à formação de gliomas por meio do silenciamento de NF1 e p53, causando uma desdiferenciação (**Tabela 1**). Vetores lentivirais contendo as sequências de shNF1, shp53 e GFP (proteína fluorescente verde), com o gene da RFP (proteína fluorescente vermelha) entre sítios lox, foram injetadas no cérebro de camundongos onde Cre estava sob controle dos promotores GFAP (glial), Sinapsina I ou CamKIIa (neurônios). Desta forma, as células com estes promotores ativos sofreriam silenciamento e o tumor gerado apresentaria fluorescência verde (Friedmann-Morvinski et al., 2012). No entanto, este trabalho apresenta alguns pontos controversos, como o fato de que foi utilizado Cre para modificar a cor das células que fossem transduzidas com os vetores para gerar o silenciamento, ao invés de usar Cre para diretamente induzir as alterações genéticas. Assim, diversas células, incluindo CSCs e outras células precursoras poderiam iniciar a formação tumoral. As alterações genéticas induzidas poderiam ainda ter levado à ativação dos promotores que controlam a expressão de Cre, de forma direta ou indireta, fazendo com que o câncer formado tivesse a cor gerada por esta ativação mesmo que não tenha sido gerado a partir de um astrócito ou neurônio diferenciados.

3. OPCs como células de origem

Antes de ocorrer a diferenciação final de NSCs em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos maduros, há estágios intermediários de células progenitoras mais restritas. Estas células progenitoras, no entanto, ainda retém certa plasticidade. Por meio de modelos genéticos, diversos grupos de pesquisa identificaram as células precursoras de oligodendrócitos (OPCs) como as células que originam os gliomas, ao invés de NSCs (Lei et al., 2011; Liu et al., 2011; Persson et al., 2010). Um destes trabalhos, de Persson e colaboradores, foram

selecionadas células NG2 positivas e células NG2 negativas de biópsias humanas. NG2 é um conhecido marcador de OPCs, e somente as células NG2 positivas originaram tumores (Persson et al., 2010). Em outro trabalho, de Liu e colaboradores, foi demonstrado que mutações em p53 e NF1 induzidas em NSCs por meio do promotor hGFAP, ativo em NSCs em camundongos, geravam a transformação tumoral somente após estas diferenciarem-se em OPCs, mas não em outros tipos celulares, demonstrando claramente a diferença entre célula de mutação e célula de origem. Quando as mutações eram induzidas diretamente em OPCs, por meio do promotor NG2, tumores com as mesmas características histológicas eram formados (Liu et al., 2011). Este trabalho induziu mutações perinatais, quando as OPCs estão mais proliferativas, mas o mesmo grupo também demonstrou que tumores podem ser induzidos em camundongos adultos por meio de controle temporal de Cre-ER (Galvao et al., 2014). Outros trabalhos também dão suporte para a hipótese de que OPCs sejam a célula de origem. Lei e colaboradores mostraram que a injeção de retrovírus expressando PDGF-B, um mitógeno que atua em OPCs em desenvolvimento, na massa branca do cérebro de camundongos mutantes para PTEN, ou duplo mutantes p53/PTEN é capaz de originar gliomas (Lei et al., 2011). Lindberg e colaboradores também geraram gliomas em um modelo de camundongos RCAS/tv-a ao superexpressar PDGF-B em uma população de células CNPase positiva, que pode incluir OPCs (Lindberg, Kastemar, Olofsson, Smits, & Uhrbom, 2009). Os tumores gerados expressavam Sox2 e diversos outros marcadores de OPCs. O que estes trabalhos têm em comum são as características dos tumores formados, que foram classificados como oligodendrogliomas, ou gliomas do subtipo proneural. Até muito recentemente, portanto, começou a se desenvolver um certo consenso em relação a origem de oligodendrogliomas, mas a idéia era de que os demais subtipos pudessem se originar a partir de um outro tipo celular que não OPCs. Porém, em 2014, foi demonstrado que OPCs podem atuar como célula de origem também em gliomas astrocíticos, dependendo do tipo de

mutação. Tumores induzidos por K-RAS e AKT combinados com perda de p19^{Arf} em OPCs apresentam histologia astrocítica e alta expressão de marcadores de astrócitos (Lindberg et al., 2014). Ao que tudo indica, portanto, tumores originados a partir de OPCs parecem ser mais prevalentes do que se acreditava anteriormente.

Para um resumo dos trabalhos que identificaram OPCs como a célula de origem, veja a **Tabela 2**.

TABELA 2. Modelos genéticos utilizados para elucidar as origens do desenvolvimento de tumores cerebrais

Célula de Origem	Mutações/deleções iniciadoras	Promotor/células iniciadoras
NSCs	p53 e NF1 ^{1,6}	hGFAP ^{1,2,3} ;
	p53 e PTEN ^{2,6}	Nestina ^{6,7} ;
	superexpressão de p53 mutado ³ ;	hGFAP ^{1,2,3} ;
	INK4a/Arf ^{-/-} e superexpressão de EGFR-vIII ^{4,5} ;	Cultura de NSCs purificadas de camundongos INK4a/Arf ^{-/-} transduzidas com EGFR-vIII e injetadas no cérebro de camundongo NOD-SCID ^{4,5} ;
	p53 e H-Ras-V12 ⁷	Sox2 ⁷
Células diferenciadas (astrócitos, neurônios)	p53 e NF1, e p53 e H-Ras-V12 ⁷ ;	GFAP, Sinapsina I, CamKIIa, Sox2, ou Nestina ⁷ ;
	INK4a/Arf ^{-/-} e superexpressão de EGFR-vIII ⁴	Cultura de astrócitos purificados de camundongos INK4a/Arf ^{-/-} transduzidas com EGFR-vIII e injetadas no cérebro de camundongo NOD-SCID ⁴
OPCs	p53 e NF1 ^{8,13} ;	NG2 ^{8,13} , hGFAP ⁸ ;
	PTEN ⁹ ,	PDGF-B ⁹ ;
	PTEN e p53 ⁹ ;	
	v-erbB e p53 ¹⁰ ;	S100β ¹⁰ ;
	PDGF-B ^{11,12} ;	CNPase ^{11,12}
	K-RAS, AKT ¹²	CNPase ^{11,12}

¹(Zhu et al., 2005);²(Zheng et al., 2008); ³(Wang et al., 2009);^{4*}(Bachoo et al., 2002);^{5*}(Ligon et al., 2007);⁶(Llaguno et al., 2009);⁷(Friedmann-Morvinski et al., 2012);⁸(Liu et al., 2011);⁹(Lei et al., 2011);^{10*}(Persson et al., 2010);^{11*}(Lindberg et al., 2009);^{12*}(Lindberg et al., 2014);^{13*}(Galvao et al., 2014).

*Células mutantes não foram geradas por meio do sistema Cre-Lox.

Cabe ressaltar que os conceitos de célula-tronco tumoral e célula de origem são distintos. A célula de origem é aquela que, ao sofrer mutação, promove o surgimento de câncer. Esta célula pode ter sido originada a partir de uma célula progenitora já mutada, que, no entanto, não foi capaz de originar o tumor. Há, portanto, um terceiro conceito, de célula de mutação, que não necessariamente é a célula de origem. Inclusive, a célula de mutação pode ter surgido há muitas gerações, como no caso de mutações herdadas. Já a célula-tronco tumoral representa a fração celular responsável por manter o crescimento do tumor. Ou seja, a célula de origem seria a célula iniciadora de tumor (TIC), e a célula-tronco tumoral seria a célula propagadora de tumor (Liu et al., 2011; Liu & Zong, 2012; Visvader, 2011). **Figura 6.**

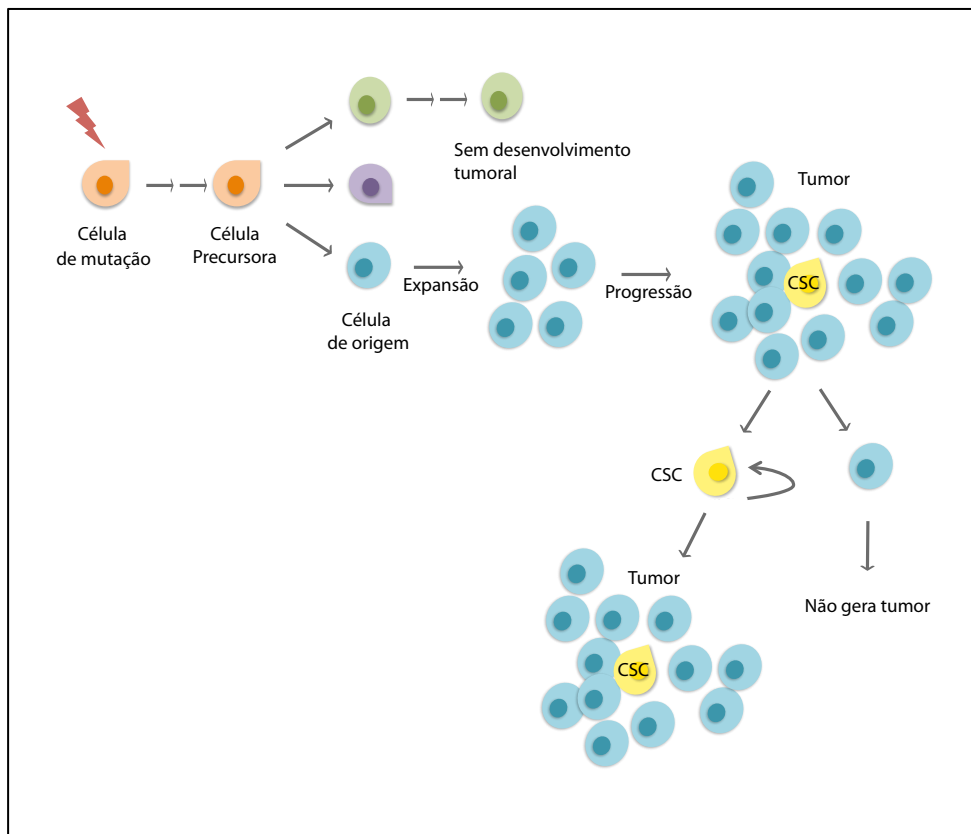


FIGURA 6: A célula de mutação é a célula que sofre o primeiro evento mutagênico. Esta célula não necessariamente será capaz de se transformar e gerar um tumor. A célula de origem é o tipo celular capaz de sofrer a transformação que levará a formação da massa tumoral. A massa tumoral é heterogênea, e dentre as células que a compõem há células-tronco tumorais (CSCs), que são células menos diferenciadas capazes de recapitular o fenótipo tumoral.

EVIDÊNCIAS SOBRE O PAPEL DAS OPCs EM GLIOMAS

O equilíbrio do processo de proliferação celular é essencial para a manutenção de tecidos e órgãos, e permite a substituição de células danificadas ou velhas. O controle da proliferação é particularmente importante no CNS, pois há limitações de espaço devido à arquitetura complexa e ao fato de o cérebro estar cercado por osso. Sabe-se que alguns tipos neuronais não são substituídos mesmo em caso de dano ou doença. Já as células da glia possuem elevada capacidade de auto-renovação, e OPCs constituem a maioria das células proliferativas do cérebro adulto. Além disso, as OPCs possuem elevada capacidade migratória, e estão constantemente se movendo através do parênquima, extendendo seus processos até que entrem na zona de outra OPC, demarcada por domínios de auto-repulsão, o que faz com que recuem e não se sobreponham. Em caso de morte ou diferenciação, ocorre uma rápida migração e proliferação de OPCs adjacentes (Hughes et al., 2013). O crescimento descontrolado destas células progenitoras pode levar ao desenvolvimento tumoral (Lei et al., 2011; Liu et al., 2011). Pode-se, inclusive, relacionar a alta capacidade migratória e proliferativa que garantem extrema agressividade aos gliomas com algumas das propriedades naturais observadas em OPCs.

Tumores sabidamente originados a partir de OPCs foram inicialmente classificados como sendo do subtipo proneural, devido às suas características oligodendrogliais (Lei et al., 2011; Liu et al., 2011; Persson et al., 2010). O subtipo proneural apresenta uma maior sobrevida, sendo considerado menos agressivo. No entanto, outros trabalhos demonstraram que gliomas mais agressivos, como por exemplo do subtipo mesenquimal, podem progredir a partir de gliomas proneurais (Bhat et al., 2013; 2011; Ozawa et al., 2014). Além disso, um trabalho de análise de células únicas por meio de sequenciamento de RNA (RNA-seq) realizou o sequenciamento de células individuais de 4 diferentes gliomas, e encontrou células do subtipo proneural em todos os tumores (Patel et al., 2014). Um trabalho recente demonstrou ainda que diferentes tipos de gliomas, tanto com características histológicas astrocíticas quanto com características

oligodendrogliais, podem ser originados a partir de OPCs, e a sinalização oncogênica na célula de origem seria determinante para o fenótipo do glioma (Lindberg et al., 2014). Isso vai contra as hipóteses anteriores de que gliomas de subtipos diferentes se originariam a partir de células de origem diferentes, e indica que as OPCs na origem de gliomas possam ser mais prevalentes do que se pensava inicialmente.

O ESTUDO DE GLIOMAS *IN VITRO*

BREVE HISTÓRIA DA CULTURA CELULAR

O cultivo de células animais *in vitro* teve início em 1907, mas foi somente após o estabelecimento da linhagem HeLa que componentes específicos como aminoácidos e sais puderam ser estabelecidos para os meios de cultivo (Masters, 2002). A principal fonte de fatores de crescimento em cultura foi, desde o início, de fluidos animais, principalmente soro fetal bovino. Por volta de 1980 o uso de FBS começou a ser questionado. Desejava-se não mais depender de componentes animais devido a variação apresentada entre lotes, a falta de conhecimento sobre a sua composição específica, e também por motivos éticos envolvidos no uso de derivados de animais (Jayme, Watanabe, & Shimada, 1997; Romijn, 1988). Apesar destes avanços, até hoje a cultura completamente livre de componentes animais é um tema difícil devido ao elevado custo e a falta de conhecimento sobre nutrientes específicos necessários para o cultivo de alguns tipos celulares.

*CRESCIMENTO DE GLIOMAS *IN VITRO**

Tumores de cérebro começaram a ser cultivados *in vitro* ao final dos anos 50 (KERSTING & LENNARTZ, 1957), e prosperaram no início de 1960 (Hoshino, Barker, & Wilson, 1975). Apesar das controvérsias que passaram a envolver o uso de FBS nas culturas a partir de 1980, soro fetal bovino

continuou a fazer parte da composição do meio de gliomas até 2003/4, quando foram descritas CSCs nestes tumores (Singh et al., 2003; 2004). Após, sugeriu-se que a melhor condição de cultivo deveria ser em meio próprio para NSCs, visto que a hipótese em voga passou a ser de que as CSCs eram originadas a partir de NSCs normais (Singh et al., 2004). Pouco depois, em 2006, foi demonstrado que culturas primárias realizadas a partir de biópsias de gliomas eram capazes de manter características mais próximas dos tumores parentais quando crescidas em meio de NSCs do que quando crescidas em meio enriquecido com FBS, no qual passavam a se assemelhar às linhagens celulares clássicas de gliomas, que haviam sido mantidas em FBS desde o seu princípio (Lee et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que o meio enriquecido com FBS leva à diferenciação de NSCs (Quiñones-Hinojosa, Sanai, Gonzalez-Perez, & Garcia-Verdugo, 2007), e também de CSCs de glioma (Lee et al., 2006). O meio de NSCs, que consiste em meio neurobasal acrescido de suplemento B27 e fatores de crescimento EGF e FGF-2 (Reynolds, Tetzlaff, & Weiss, 1992), passou então a ser considerado como o “padrão ouro” livre de fluidos animais para gliomas, e ensaios para a pesquisa de novas drogas contra tumores de cérebro passaram a ser realizados neste tipo de meio (Gal et al., 2007; Pollard et al., 2009).

HIPÓTESE

Diversas evidências apontam que a célula de origem em gliomas seja de fato uma OPC. A hipótese deste trabalho é de que: 1) gliomas apresentam características predominantes de OPCs, e que, portanto, 2) o seu meio de cultivo deve levar em conta o conhecimento sobre a célula de origem para que possa preservar, *in vitro*, as propriedades intrínsecas do tumor.

OBJETIVO GERAL

Utilizar meio próprio de OPCs para o crescimento de gliomas, tanto de modelo animal quanto de culturas primárias humanas, de forma a comparar com o meio de NSCs que vem sendo utilizado como meio padrão livre de soro, e avaliar as propriedades celulares em cada cenário.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Criar uma meta-assinatura de OPCs de forma a analisar sua predominância em gliomas humanos

II. Avaliar, em meio próprio de OPCs ou em meio próprio para NSCs, a resposta das culturas de gliomas em relação à:

- a) Manutenção de propriedades de CSCs, como capacidade de formação de esferas em cultura, auto-renovação, capacidade de diferenciação e de geração de tumores
- b) Manutenção das características das células de origem, como expressão de marcadores e morfologia
- c) Preservação da tumorigenicidade após período em cultura
- d) Resposta a quimioterápicos

CAPÍTULO II

Manuscrito I

A ser submetido para a revista *International Journal of Cancer* (IF: 5.085).

Analysis of the oligodendrocyte precursor cell (OPC) expression signature in glioblastomas supports OPC origin

Pítia Ledur^{1*}, Darlan C. Minussi^{1*}, Guido Lenz^{1,2#}

1. Department of Biophysics, 2. Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS – Brazil, 91509-900

* These authors contributed equally to this paper.

Correspondence author: Guido Lenz - lenz@ufrgs.br

Abstract

BACKGROUND: Glioblastoma (GBM) is a very aggressive brain tumor in which patient survival usually does not exceed 15 months after diagnosis. GBM origin has been attributed to different cells in the brain, including Neural Stem Cells (NSCs) and the cells that are originated from NSCs during brain development: Oligodendrocyte Precursor Cells (OPCs), astrocytes and even neurons, still being a controversial matter. Therefore we aimed to describe the similarities of mouse and human GBMs with OPCs, astrocytes and neurons. **FINDINGS:** Here, we used cell-type specific meta-signatures, and found that GBM samples from both mice and humans resemble OPCs closer than astrocytes and neurons. **MAJOR FINDINGS:** We then created a human OPC meta-signature (OPC-MS) and applied it to both populational as well as to single-cell GBM data. Most GBMs present a relatively high OPC-MS, which positively correlates with most subtypes in populational data. In single-cell data, the OPC-MS correlates stronger with Proneural subtype of GBM. **IMPLICATION:** the use of these meta-signatures indicates that GBMs have a predominant OPC characteristic rather than astrocytic or neuronal. These findings will help to understand the origin of GBMs and to a better understanding of its biology and pathology.

Introduction

Glioblastoma (GBM) is a deadly type of brain tumor, and years of research and investment have yielded little improvement in overall survival. Glioma was one of the first tumors to be analyzed by the TCGA consortium and extensive analysis of several hundred patients has led to a classification based on mRNA expression into four different subtypes, named Classical, Mesenchymal, Neural and Proneural (1). However, illustrating the challenge of classifying cancer, when this classification was applied to single cells, one tumor was shown to have cells from at least three subtypes, and a higher subgroup heterogeneity was associated with shorter survival, with cells classified as Proneural present in all five tumors analyzed (2). Although the subtype classification is well accepted and provides some information on survival, it has yet to be widely applied to guide clinically relevant decisions.

Subtype classification begs the question of cancer etiology: do different subtypes have a different origin? GBMs were described to stem from precursor cells in the brain, such as neural stem cells (NSCs) (3-8) and oligodendrocyte precursor cells (OPCs) (9-14), as well as to be originated from more differentiated cells, such as astrocytes and neurons (15-18), although in this case it is not yet possible to define the role of dedifferentiation of these cells to a more stem-like state.

The hypothesis that GBM may arise from OPCs is not new; in fact, several authors have shown that OPCs can be the cell of origin in GBM (9, 10, 12). Moreover, tumors originated from OPCs give rise not only to GBMs with oligodendrocytic characteristics, but also to tumors with astrocytic features (13). Tumors originated from a mouse model driven by an OPC specific gene were classified as Proneural subtype (10, 19). The fact that oligodendrocyte precursor cells (OPCs) also constitute the most abundant proliferating cell in the adult central nervous system (CNS) and can be found homogeneously distributed throughout the brain (20) make sense in the light of GBM invasiveness and occurrence.

Here, we created a human OPC meta-signature (OPC-MS), validated it and applied it to published GBM data, both at the populational (21-23) and at the single-cell levels (2). Our results show that OPC-MS positively correlates with Proneural-MS and, additionally, most gliomas analyzed are more OPC-like than astrocyte- or neuron-like, based on OPC-MS, astrocyte-MS and neuron-MS analysis, indicating the importance of considering OPC features in the genetic analysis of these tumors.

Results

1. Application of different cell type meta-signatures to GBM samples

GBM origin is a very controversial topic, as it has been claimed to have originated from either NSCs or cells originated by NSCs: OPCs, astrocytes, or neurons (3-6, 9, 11-13, 15, 24). To shed some light into this question, we wondered how similar GBM samples from mouse genetic models are to each of these cell types. For this, we used lists of signature genes that are enriched in brain cells from a work from Zhang and collaborators (25) as meta-signatures. A good way to identify cells is by taking the expression of a group of genes, that are not necessarily specific of one cell type, but when analyzed all together are able to identify a given cell type or, at least, provide an evidence that the gene-expression is similar to the cell type identified by the meta-signature. The work from Zhang (25) was very complete, however there was no data of enriched genes for NSCs. We looked for NSCs specific genes elsewhere in the literature, but the NSC meta-signature attempts we produced were not very specific. This could be due to one of the following reasons: 1. the isolation of NSCs for expression analysis - neurospheres from whole embryonic brains in culture - is not very specific; or 2. NSCs originate all other brain cell types; therefore they have a more promiscuous gene expression and could not identify one specific cell type.

Hence, we focus on the cells that can be originated from NSCs: OPCs, astrocytes and neurons. We performed a gene-expression meta-analysis using mouse microarray data from the same platform with the selected meta-signatures (26). So we chose wild-type (wt) astrocyte, neuron and OPC samples from Cahoy and collaborators (27), and tumor samples from three other papers (28-30). GBM samples are grouped closer to wt OPCs than to astrocytes and neurons (Figure 1A). The question that followed was if the same would happen to human samples. Here, we decided to still use the cell type meta-signatures based on the work of Zhang et al., since gene expression for those cell types is quite similar between mouse and human cells. Again, we used samples from the same microarray platform. Wt OPC and astrocyte data were retrieved from Sim and collaborators (23), and neuron data used here was obtained from (31). Tumor samples were obtained from several papers (22, 32-34). Again, wt OPCs grouped closer to GBM samples than astrocytes and neurons (Figure 1B), so we decided to create a specific human OPC meta-signature in order to further apply it to human GBM. For a list of all GSE numbers and microarray studies used in this paper see Table 1.

A. Mouse Samples

B. Human Samples

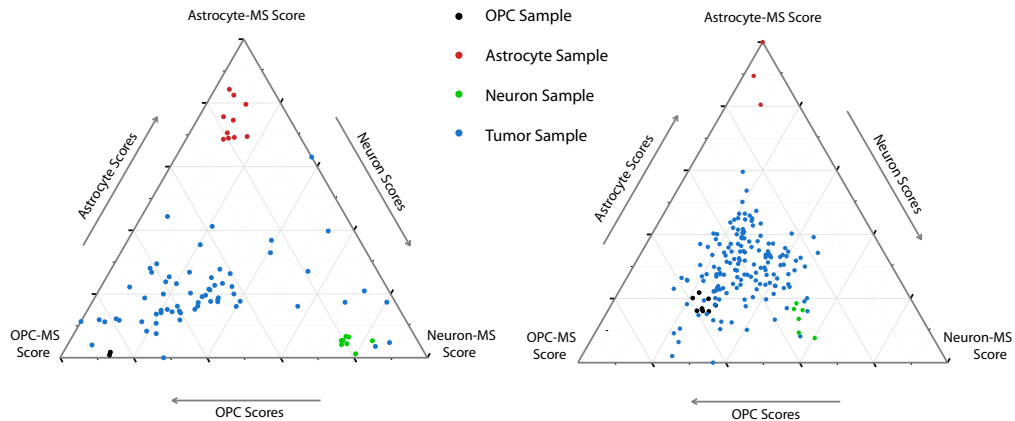


Figure 1. A. Ternary diagram in which OPC-, Astrocyte-, and Neuron-MS Scores were plotted for wild type OPC, Astrocyte and Neuron samples as well as for tumor samples in mice. B. Same as in A with human samples.

Table 1 - Gene expression studies used

First author	GEO accession number	Platform	Reference
Sim, F.J.	GSE29368	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	(38)
Zhang, Y.	GSE52564	Illumina HiSeq 2000 (Mus musculus)	(25)
Wang, J.	GSE40676	Illumina HumanHT-12 V4.0 expression beadchip	(52)
Hide, T.	GSE28091	Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array	(50)
Patel, A.P.	GSE57872	Illumina HiSeq 2500 (Homo sapiens)	(2)
Giger, T.	GSE12293	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	(53)
Grzmil, M.	GSE15824	Affymetrix	(33)

		Human Genome U133 Plus 2.0 Array	
Auvergne, R.M.	GSE29796	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	(22)
Sturm, D.	GSE36245	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	(34)
Sim, F.J.	GSE 36634	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	(23)
Reifenberger. G,	GSE53733	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	(32)
Cahoy, J.D.	GSE9566	Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array	(27)
Chow, L.M.	GSE22927	Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array	(28)
Song, Y.	GSE26002	Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array	(29)
Lei, L.	GSE29458	Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array	(30)
The Cancer Genome Atlas	Http://tcga-data.nci.nih.gov	Affymetrix Human Genome U133A Array	(21, 46, 47)

2. Generation of a human OPC-MS

The human OPC-MS was generated with microarray data from human brain cells that were isolated based on the surface marker CD140a, also known as PDGFRA, a specific OPC marker (35). Grounded on this division, we selected the top fifty most differentially expressed genes ranked by fold-change to create the OPC-MS (Figure 2A, upper right. See material

and methods for meta-signature generation). As expected, PDGFRA was located in the right upper side of the graph, together with other classical OPC markers such as SOX10 and OLIG2 (23, 27, 36), which, together, composed our OPC-MS. Supplementary Table 1 shows the complete list of genes included in the OPC-MS with the respective fold difference and P values between CD140a+ cells when compared to CD140a- cells.

To validate the human OPC-MS, we applied it to published microarray data of brain cells, and it specifically identified OPCs from mouse and human origin, differentiating OPC from NSCs, astrocytes and other non-OPC cells (CD140n), Figure 2B. Sample names are maintained as in the respective GSEs, and are further explained on Supplementary Table 2. Additionally, we compared the human OPC-MS with the mouse OPC-MS based on the work from Zhang et al., used in figure 1. Our human OPC-MS correlates with this murine OPC-MS (Supplementary Figure 1, R=0.54), despite the species difference, validating our OPC-MS and suggesting that OPC genetic signatures are conserved between mice and humans.

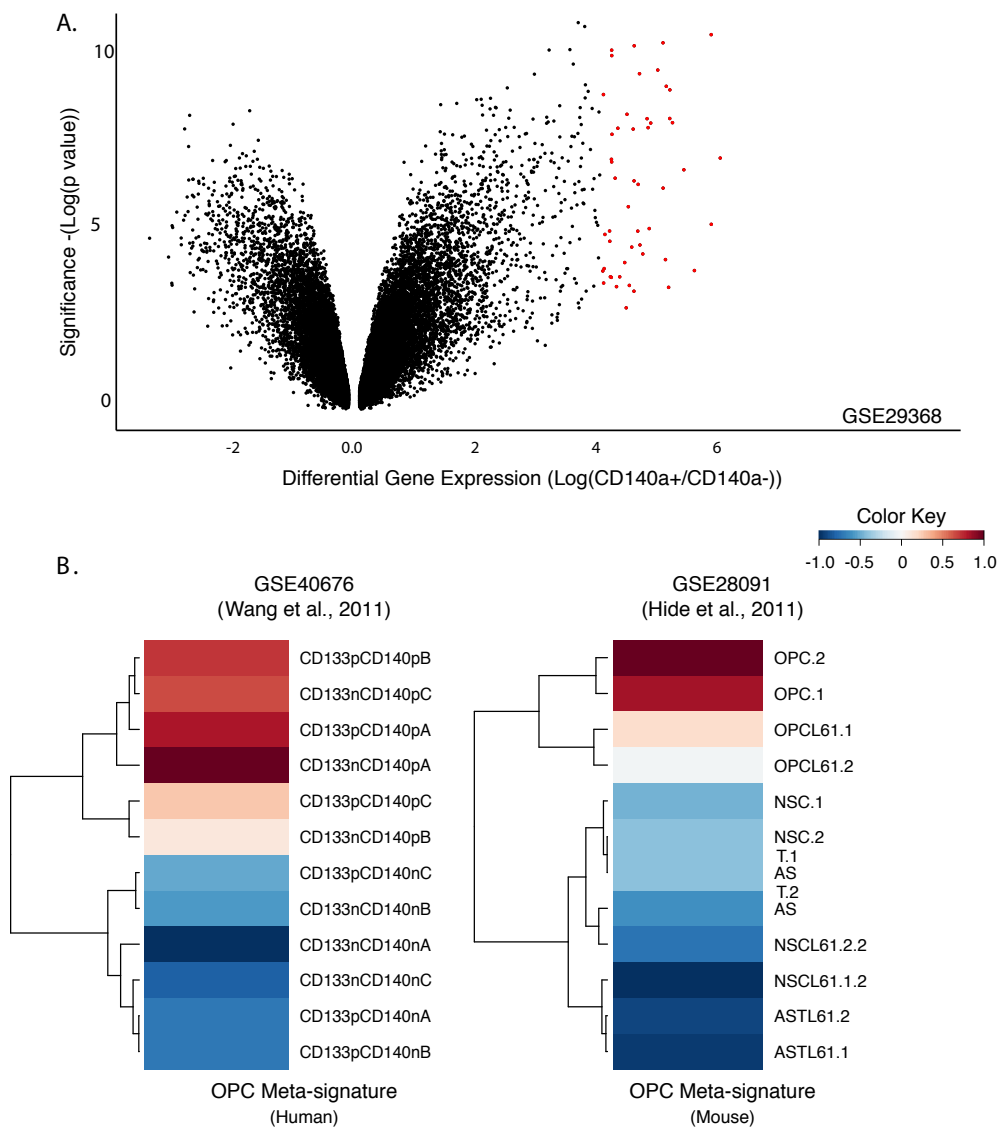


Figure 2. A. Volcano Plot of differential gene expression between CD140a negative and CD140a positive cells (35). Genes selected for the generation of our OPC meta-signature are shown as red dots in the upper right and listed on Supplementary Table 1. B. Published microarray data in which the OPC-MS was applied. Sample information in Supplementary Table 2 - from left to right references (25, 53, 54). Sample sequence in the lines is shown according to clustering analysis. Samples of each respective heatmap were kept with the original names as found on GSE files.

3. OPC meta-signature correlation with TCGA GBM Subtypes

Next we applied our OPC-MS to GBM microarray data from the TCGA consortium (529 samples, previously classified into the four molecular subtypes) (1, 37). The genes for each particular subtype according to the TCGA analysis (1) were used to create a meta-signature for each subtype, as previously done by Patel and collaborators (2). For validation of the subtype meta-signatures, we used samples that were previously subtyped by the TCGA, which confirmed our classification (Supplementary Figure 2). When each subtype meta-signature was plotted against our OPC meta-signature for a correlation analysis (Figure 3A), we observed that OPC-MS positively correlated with the Proneural-MS ($R=0.34$), Mesenchymal-MS ($R=0.2$), and Neural-MS ($R=0.28$) (Figure 3A and B). For statistical analysis of the correlation, we employed Pearson's product-moment correlation, and the p values were all statistically significant except for Classical subtype meta-signature (data not shown). Besides better correlating with the Proneural-MS, the level of the OPC-MS was also high among most GBM subtypes except for Classical (Figure 3C). Samples from all subtypes showed no significant difference from each other, except in the comparison between Classical and all other subtypes. This comparison was done by using ANOVA followed by Tukey multiple comparisons of means (Figure 3C. For p values see legend of Figure 3).

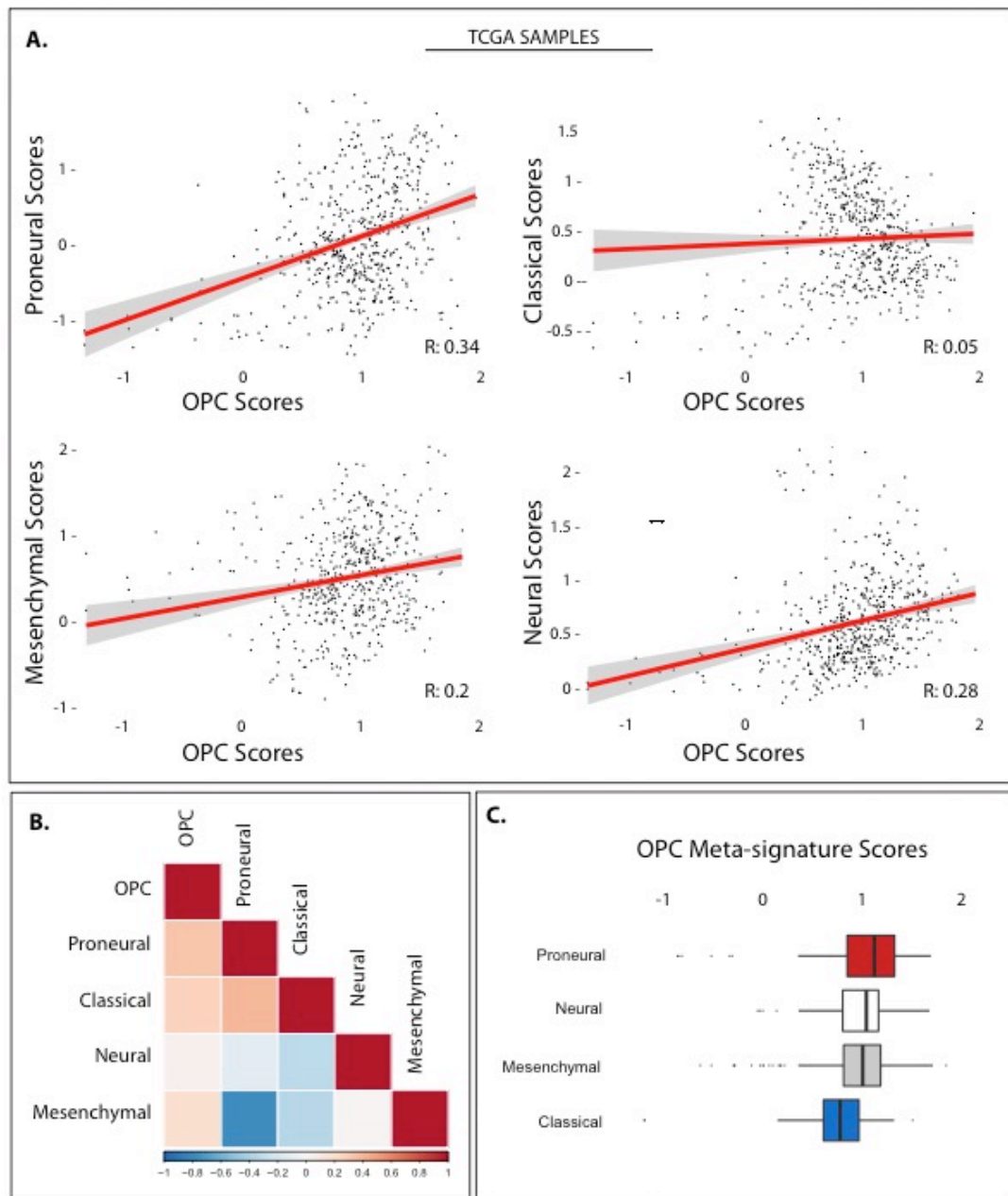


Figure 3. A. Correlation analysis of GBM subtype meta-signatures against the OPC-MS. Correlation coefficients are written in the respective graphs. B. Correlation plot showing the specificity of each meta-signature and the correlation among all meta-signatures. C. Boxplot with TCGA samples classified by subtype in which the OPC meta-signature was applied. Tukey comparison of means test was performed, and there is no difference between Proneural, Neural and Mesenchymal groups, however, when each is compared to Classic, $p < 0.0005$ for all comparisons.

4. OPC meta-signature description at the GBM single-cell level

Given the large heterogeneity of GBMs, we wanted to test how the OPC features were distributed among the cells of a given tumor. For this purpose, we used RNA-seq data of 430 cells from five different primary GBMs deposited by Patel et al. (GSE57872) (2) (Figure 4). GBM subtypes were ascribed by the authors to each sample based on bulk tumor profiles. It

is worth mentioning that, from our fifty gene meta-signature, only 17 were present in single-cell data from Patel and collaborators (for genes from our OPC-MS found in the databases from the TCGA and Patel and collaborators, see Supplementary Table 3). The OPC identity is associated to the Proneural-MS. Although OPC features are increased in the sample classified as Proneural, individual tumor cells from all subtypes show a wide range of OPC-MS values. Also, cells with a predominant OPC-MS are less frequent among cells from the tumor classified as Mesenchymal subtype, represented by two out of 5 tumors (MGH 28 and 29). The correlation of the tumors as a whole (considering all single cells analyzed) with the OPC-MS is positive for Proneural-MS and Classical-MS, and negative for the Mesenchymal-MS (Figure 4B).

We wondered if the high correlation between the Proneural-MS with the OPC-MS could be due to the fact that these signatures had 4 genes in common, so we removed those genes from our analysis, and the correlation between Proneural-MS Scores and OPC-MS Scores goes from 0.34 to 0.12 in TCGA samples. This could be happening because two of the genes that are present in both signatures are very strong OPC markers (Sox10 and Olig2). For single cell data, however, when we remove Sox10 and Olig2 the correlation changes slightly, from 0.5 to 0.48, probably because there are fewer genes from the OPC-MS that are found in data from Patel et al. (Supplementary Table 3). For the other subtype meta-signatures there were a maximum of 2 genes in common with the OPC-MS and taking these genes out did not change much the correlation observed (Mesenchymal-MS versus OPC-MS: $R=0.05$ for TCGA data, and $R=-0.3$ for Patel's data).

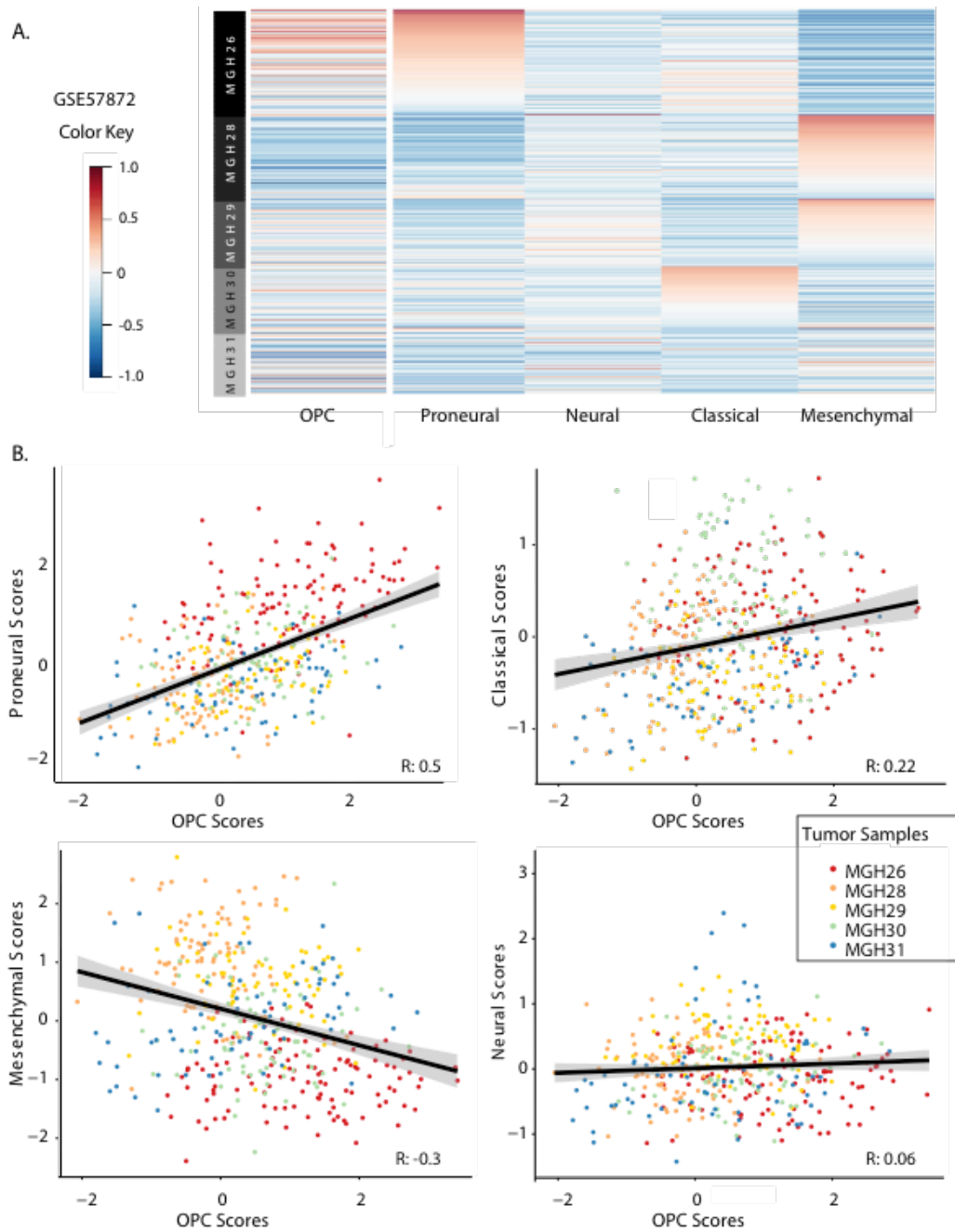


Figure 4. Subtype and OPC-MS applied to single-cell data. Samples used were deposited on GEO - GSE57872. Subtype meta-signature also corresponds to subtypes as defined on the original paper (2), as shown in supplementary figure 2A. A. Sample names are written within gray bars on the left. Glioblastoma subtype meta-signature is written at the bottom. Samples were organized in a gradient according to predominant subtype, except for tumor MGH31, which could not be classified, as already shown by Patel et al. B. Correlation plots of GBM subtype meta-signatures against the OPC-MS. Correlation coefficients are written in the respective graphs. Samples correspond to single cells and are separated by color based on the tumor from where they were originated. All correlation analysis are statistically significant ($p < 0.0001$), except for the correlation between Neural-MS and OPC-MS, where $p = 0.19$.

Discussion

OPC meta-signature in GBM confirms the strong OPC characteristics of this tumor type

Several cell types have been suggested as the origin of GBM, among them OPCs (5, 6, 9, 12, 38, 39). Our data shows through an OPC-MS that the OPC identity seems to be present in most GBMs both at population as well as at single-cell levels. The OPC-MS has a positive correlation with most GBM subtypes on populational analysis, except with Classical subtype. When we look at single-cell data, however, there is a negative correlation with the Mesenchymal-MS. This could be explained by the fact that our OPC-MS had only 17 genes that could be found in data from Patel and collaborators. It has been previously shown that the Mesenchymal subtype might be derived from the Proneural subtype (40, 41). However, if the inverse correlation is true, perhaps the changes undergone in the transition from one subtype to the other are so profound that there is a change in tumor identity, which would include a change in OPC status. Also, a study of glioma stem cells (GSCs) based on differentially expressed genes proposed the existence of 2 different GSCs subtypes, one that resembles Proneural and one that resembles Mesenchymal, whereas radiation treatment in Proneural GSCs could induce the expression of Mesenchymal markers (42).

By looking at the expression pattern of markers in CD140+ versus CD140- human brain cells (43) we were able to create an OPC meta-signature that is highly specific and can be applied to human and mouse. This OPC-MS can be used to analyze disparate gene expression data in order to identify glial progenitors, and, as seen here, it can be successfully applied to tumor samples.

Recent findings that point to OPCs as the cell of origin in GBM make sense in the light of wt OPCs being the most proliferative population in the brain, along with its great migrating ability (20) and the fact that towards their maturation into oligodendrocytes they can associate with axons, as it has been recently described that active neurons can promote high grade glioma growth and proliferation (44). The fact that gliomas localized closer to OPCs than to neurons and astrocytes indicates the relative importance of OPC genetic profiles in relation to astrocytic and neuronal profiles in GBM, supporting the importance of the OPC-like features for this kind of tumor. Whether these features remained from the cell of origin or were acquired during GBM progression remains an open question, but the presence of the OPC features in the majority of GBM samples and cells supports the data indicating that GBM can be originated from OPCs.

It is important to mention that it is not our intention to add a new subtype to a classification that is widely accepted and fully described. Our intention in creating an OPC-MS and applying it to GBM is to add an extra layer of information to such a complex and heterogeneous dataset.

Material and Methods

OPC, astrocyte, neuron and GBM meta-signature score comparison

OPC, astrocyte and neuron meta-signatures for figure 1 were created based on data from Zhang and collaborators (25). Mouse microarray data for wild type cells was retrieved from GSE9566 (27), and tumor data was obtained from GSE22927 (28), (28-30) (29), and GSE29458 (30), all of them from the same platform: Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array. Human microarray data for wild type neurons was obtained from GSE12293(31), for wt astrocytes and wt OPCs was obtained from GSE36634 (23), and data for tumor samples were obtained from GSE15824 (33), GSE29796 (22), GSE36245 (34) and GSE53733 (32), all of which used Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array. Briefly, datasets were normalized with RMA and expression from probes that mapped to the same genes was averaged (45). After, mean expression value of each gene meta-signature was subtracted from the mean expression value of all genes available on each microarray and normalized to values between 0 and 1. All analysis were done using R software (46), URL <http://www.R-project.org/>, version 3.2.1.

Human OPC meta-signature

Human Microarray data from Sim and collaborators (35) was used in order to create our OPC signature (GSE29368). We performed differential gene expression with using the limma R package version 3.24.13 (47) between CD140a positive (i.e. OPCs) and CD140a negative cells (Figure 1A). The 50 up regulated genes with higher differential expression and most statistical significance ranked by log fold change (upper right) were chosen in order to establish an OPC-specific marker list, and they are listed on Supplementary Table 1. This list of genes was then used to create the meta-signature.

Calculation of Human OPC meta-signature and other meta-signatures scores

Neuron, astrocyte, microglia, newly formed oligodendrocyte (NFO), myelinated oligodendrocyte (MO) and OPC gene signatures (for mice) were obtained from Zhang and collaborators (25);. Briefly, for each sample the mean expression value of each gene meta-signature was subtracted from the mean expression value of all genes available on each microarray. All analysis were done using R software (46), URL <http://www.R-project.org/>, version 3.2.1.

OPC meta-signature validation

In order to confirm the reliability of our OPC meta-signature, besides applying it to known OPC samples from the literature (Figure 1), we also applied it together with other meta-signatures created based on data from Zhang et al. where the most expressed genes for brain cell types are listed (25). This work was done with mouse cells, and there was no overlap between OPCs and neurons or astrocytes in terms of signature specificity. Also, newly formed oligodendrocytes and myelinated oligodendrocytes showed weak OPC features due to their common origin (data not shown).

TCGA Glioblastoma samples

Level 3 processed gene expression from The Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA) for 539 samples (<http://cancergenome.nih.gov>) (48, 49), was downloaded with the help of the UCSC Cancer Genome Browser (50, 51) and analyzed using R [R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>]. Briefly, Affymetrix platform U133a microarray data together with their respective clinical data available information were downloaded. 10 samples were removed due to their absence of gene expression subtype classification in the clinical data. Scores for each meta-signature were calculated as previously described.

Gene expression subtypes meta-signatures

Gene expression subtypes for each sample were taken from TCGA clinical data with the help of the UCSC Cancer Genome Browser (50, 51). Gene expression subtypes meta-signatures were performed as described by Patel and collaborators (2). Briefly, gene lists for molecular subtypes were obtained from the work of Verhaak and collaborators (1). For each sample, the mean expression for the selected genes was subtracted from the mean expression of all genes available. The result was validated as it can be seen in Supplementary Figure 2, where clinical data information was compared to the meta-signature scores obtained.

Correlation and scatterplots

Scatterplots were done with the help of ggplot2 R package (52). Correlation plots were done with the help of corrplot R package version 0.73 (Taiyun Wei (2013). corrplot: Visualization of a correlation matrix. R package version 0.73).

Supplementary Material

Supplementary Table 1 – OPC meta-signature specific genes

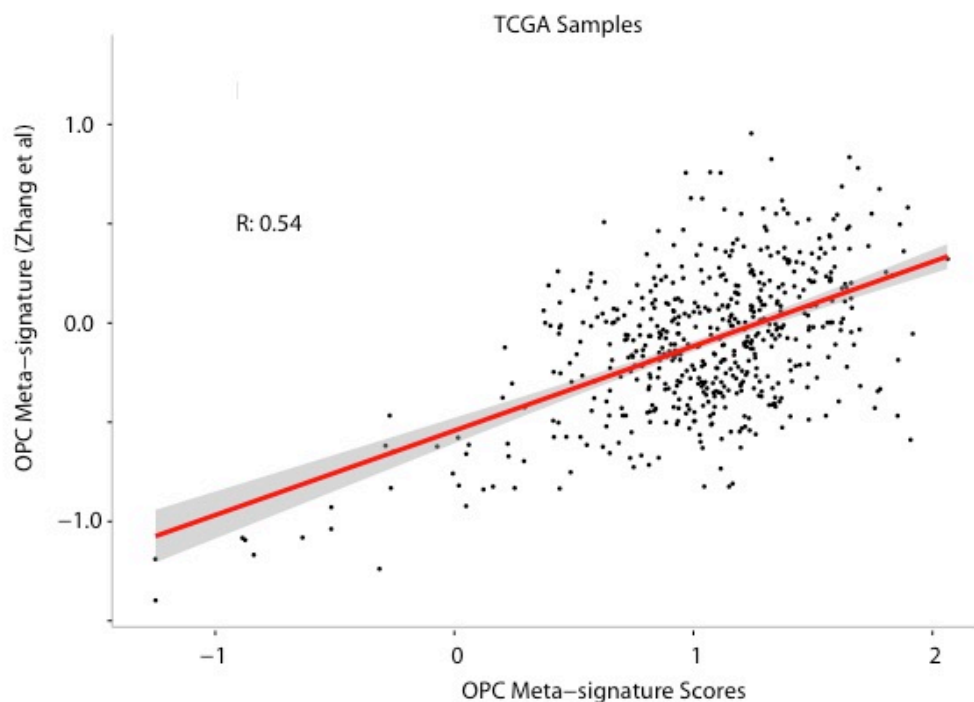
Symbol	Log Fold Change	Average Expression	P.Value	Adjusted P.Value
OLIG1	5.766797107	7.69694967	3.93E-07	0.000182278
GPNMB	5.625652487	8.587555886	1.89E-05	0.00146603
APOD	5.624056111	9.04626599	2.89E-10	4.90E-06
IL1RN	5.35989164	7.981211454	0.000282554	0.007595194
LRRK2	5.193905631	7.716851182	7.80E-07	0.000243827
NA	5.024791779	8.081417151	0.000154802	0.005236546
PDGFRA	5.014830567	7.943219102	4.98E-08	5.53E-05
SOX10	4.973504863	7.327980334	7.31E-09	2.35E-05
CNTN1	4.971557177	7.16192129	3.90E-08	4.78E-05
RGS1	4.953469442	7.23522783	0.00075515	0.014029172
PMP2	4.91704819	8.531315633	5.93E-09	2.16E-05
SLAMF7	4.90407141	5.593511654	0.000148982	0.005123004
PDGFRA	4.866967367	10.84093225	2.28E-06	0.000449984
PMP2	4.865464903	8.259149862	4.66E-10	4.90E-06
IL1RAP	4.782678439	7.879623517	2.29E-09	1.14E-05
S100B	4.671734	6.742171849	5.08E-08	5.53E-05
PIK3AP1	4.648206927	6.734081615	2.43E-05	0.001676848
TNFAIP6	4.630460707	6.643178912	6.65E-08	6.49E-05
TMEM100	4.614299547	7.405215758	3.93E-08	4.78E-05
FABP4	4.546905478	8.612777594	0.000107022	0.00412422
CD36	4.502142764	7.400181052	6.34E-05	0.003005409
B3GNT7	4.495177508	8.242447989	2.84E-09	1.23E-05
NKX2-2	4.473712782	6.256505676	1.83E-06	0.000392742
RBM47	4.467714993	6.334853346	2.82E-05	0.001838086
FIBIN	4.41211645	9.390719564	5.55E-10	4.90E-06
SH3D19	4.409341489	8.350001179	1.49E-06	0.000361358
RGS1	4.407762247	7.656821359	0.000946304	0.016290675
OLIG2	4.395741014	9.477445697	7.24E-08	6.71E-05
PLA2G7	4.372562792	6.683264567	7.18E-05	0.003231519
CD36	4.335328601	6.199051154	0.000674294	0.013064154
SCN1A	4.319578554	7.86750621	6.76E-06	0.000791738
SCRG1	4.298039128	10.23791174	3.05E-08	4.43E-05
SCIN	4.286112862	5.085699389	0.002497859	0.03024575
C5AR1	4.262410024	6.706524035	0.000176944	0.005687476
CD53	4.183368516	6.268344269	0.000407911	0.009529728
LPCAT2	4.154322449	6.314410512	6.89E-08	6.61E-05
CCL4	4.133000487	7.059932151	0.000723284	0.013678842
CHRM3	4.111588934	7.336112551	1.28E-06	0.000337495
KIAA0226L	4.061765608	6.185736801	9.83E-08	7.89E-05
B3GNT7	4.058238767	8.403058329	9.84E-10	5.98E-06
EDNRB	4.056778651	7.209510578	4.93E-07	0.000195573
BAMBI	4.056559307	8.458013014	7.17E-10	4.90E-06
P2RX7	4.053301991	9.037978328	4.23E-07	0.000188281

SSTR1	4.051484858	7.725323184	0.000420682	0.00973373
NA	4.051105663	7.619218944	7.22E-06	0.000819249
MS4A7	4.036760022	5.214348253	0.000407123	0.009516661
CLEC7A	4.027662256	6.00340027	5.11E-05	0.002658004
FCGR2A	4.023895153	6.616683244	2.80E-05	0.001830552
EDNRB	3.950724701	9.007313332	3.42E-05	0.002066661
SPP1	3.938595641	8.117669749	0.000251929	0.007098679
ITGAX	3.92995815	6.919077063	0.000586435	0.01206749

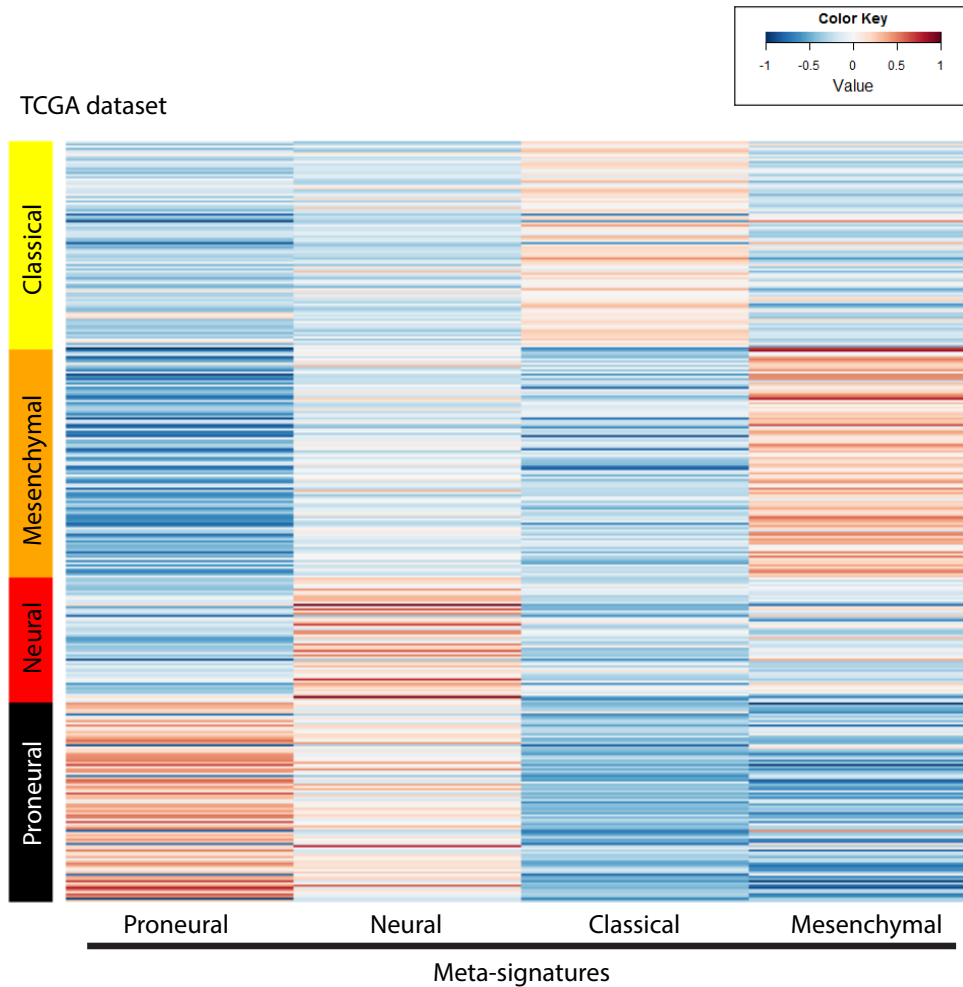
Supplementary Table 2. Sample names according to Figure 1B with description

Sample Name	Description	Reference
CD133pCD140pB	CD133 positive, CD140 positive cells, sample B. Cells were sorted based on antigen expression	Wang et al., 2011
CD133nCD140pC	CD133 negative, CD140 positive cells, sample C	GSE40676
CD133pCD140pA	CD133 positive, CD140 positive cells, sample A	(human
CD133nCD140pA	CD133 negative, CD140 positive cells, sample A	fetal
CD133pCD140pC	CD133 positive, CD140 positive cells, sample C	brains, 15-
CD133nCD140pB	CD133 negative, CD140 positive cells, sample B	22 weeks
CD133pCD140nC	CD133 positive, CD140 negative cells, sample C	of
CD133nCD140nB	CD133 negative, CD140 negative cells, sample B	gestational
CD133nCD140nA	CD133 negative, CD140 negative cells, sample A	age)
CD133nCD140nC	CD133 negative, CD140 negative cells, sample A	
CD133pCD140nA	CD133 positive, CD140 negative cells, sample A	
CD133pCD140nB	CD133 positive, CD140 negative cells, sample B	
OPC 2 – oligodendrocyte precursor cells	OPC differentiation was induced by culturing NSCs in DMEM with platelet derived growth factor AA (10 ng/mL), bFGF (2 ng/mL) and 0.25% fetal calf serum (FCS)	Hide et al., 2011 ; GSE28091 (p53-deficient mouse)
OPC 1 - oligodendrocyte precursor cells	Same as above, different sample	
OPCL61.1	OPCs transfected with HRas ^{L61} expression	

	vector – cell lines were established
OPCL61.2	Same as above, different sample
NSC.1 - Neural Stem Cells	Neural Stem Cells were prepared from embryonic day 13.5 p53-deficient mouse telencephalon
NSC.2 - Neural Stem Cells	Same as above, different sample
AST.1 - astrocytes	Astrocyte differentiation was induced in NSC culture in DMEM medium with 10% FCS for 3 weeks
AST.2 - astrocytes	Same as above, different sample
NSCL61.2.2	NSCs transfected with HRas ^{L61} expression vector – cell lines were established
NSCL61.1.2	Same as above, different sample
ASTL61.2	Astrocytes transfected with HRas ^{L61} expression vector – cell lines were established
AST61.1	Same as above, different sample



Supplementary Figure 1. TCGA glioblastoma samples (1) were analyzed based on our OPC-MS and on the meta-signature of genes enriched in OPCs as published by (25). There is a positive correlation between the two ($R = 0.54$). For detailed information on each sample of the respective GSE numbers in figure 1B see Supplementary Table 2.



Supplementary Figure 2. TCGA glioblastoma samples as classified by the consortium (colorful bars on the left) plotted on a heatmap according to the meta-signatures as determined by our method. As seen, each meta-signature corresponds to the respective subtype, validating our meta-signatures for glioblastoma subtype.

Supplementary Table 3 – Genes from the OPC-MS found on each work

TCGA	Patel et al.	Hide et al.	Wang et al.
ITGAX	APOD	APOD	APOD
OLIG2	EDNRB	B3GNT7	BAMBI
PLA2G7	FIBIN	BAMBI	C5AR1
TMEM100	PDGFRA	C5AR1	CCL4
EDNRB	GPNMB	CCL4	CD36
APOD	IL1RAP	CD36	CD53
CLEC7A	KIAA0226L	CD53	CNTN1
SCRG1	LRRK2	CHRM3	EDNRB
NKX2-2	OLIG1	CLEC7A	FABP4
TNFAIP6	P2RX7	CNTN1	FCGR2A
PMP2	PMP2	EDNRB	GPNMB
SPP1	RGS1	FABP4	IL1RN
PDGFRA	S100B	FIBIN	ITGAX

FCGR2A	SCN1A	GPNMB	LCP1
RGS1	SCRG1	IL1RAP	LRRK2
IL1RAP	SPP1	IL1RN	NKX2-2
SLAMF7	TNFAIP6	ITGAX	OLIG2
SSTR1		LCP1	PDGFRA
LCP1		LPCAT2	PIK3AP1
FABP4		LRRK2	PLA2G7
SCN1A		MDGA2	PMP2
GPNMB		MS4A7	RBM47
IL1RN		NKX2-2	RGS1
P2RX7		OLIG1	SCIN
CCL4		OLIG2	SCRG1
CNTN1		P2RX7	SH3D19
BAMBI		PDGFRA	SLAMF7
SOX10		PIK3AP1	SOX10
CD53		PLA2G7	SPP1
CD36		PMP2	TMEM100
SCIN		RBM47	
S100B		RGS1	
C5AR1		S100B	
		SCIN	
		SCN1A	
		SCRG1	
		SH3D19	
		SLAMF7	
		SOX10	
		SPP1	
		SSTR1	
		TMEM100	
		TNFAIP6	

References

1. Verhaak RGW, 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.
2. Patel AP, et al. (2014) Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 344(6190):1396–1401.
3. Zhu Y, et al. (2005) Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma. *Cancer Cell* 8(2):119–130.
4. Zheng H, et al. (2008) p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature* 455(7216):1129–1133.
5. Wang Y, et al. (2009) Expression of Mutant p53 Proteins Implicates a Lineage Relationship between Neural Stem Cells and Malignant Astrocytic Glioma in a Murine Model. *Cancer Cell* 15(6):514–526.
6. Bachoo RM, et al. (2002) Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell* 1(3):269–277.
7. Ligon KL, et al. (2007) Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron* 53(4):503–517.
8. Llaguno SA, et al. (2009) Malignant Astrocytomas Originate from Neural Stem/Progenitor Cells in a Somatic Tumor Suppressor Mouse Model. *Cancer Cell* 15(1):45–56.
9. Liu C, et al. (2011) Mosaic Analysis with Double Markers Reveals Tumor Cell of Origin in Glioma. *Cell* 146(2):209–221.
10. Lei L, et al. (2011) Glioblastoma Models Reveal the Connection between Adult Glial Progenitors and the Proneural Phenotype. *PLoS ONE* 6(5):e20041.
11. Persson AI, et al. (2010) Non-Stem Cell Origin for Oligodendroglioma. *Cancer Cell* 18(6):669–682.
12. Lindberg N, Kastemar M, Olofsson T, Smits A, Uhrbom L (2009) Oligodendrocyte progenitor cells can act as cell of origin for experimental glioma. *28(23):2266–2275*.
13. Lindberg N, et al. (2014) Oncogenic signaling is dominant to cell of

origin and dictates astrocytic or oligodendroglial tumor development from oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci* 34(44):14644–14651.

14. Galvao RP, et al. (2014) Transformation of quiescent adult oligodendrocyte precursor cells into malignant glioma through a multistep reactivation process. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(40):E4214–23.
15. Friedmann-Morvinski D, et al. (2012) Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science* 338(6110):1080–1084.
16. Uhrbom L, et al. (2002) Ink4a-Arf loss cooperates with KRas activation in astrocytes and neural progenitors to generate glioblastomas of various morphologies depending on activated Akt. *Cancer Research* 62(19):5551–5558.
17. Moon J-H, et al. (2011) Nanog-induced dedifferentiation of p53-deficient mouse astrocytes into brain cancer stem-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi:10.1016/j.bbrc.2011.07.070.
18. Radke J, Bortolussi G, Pagenstecher A (2013) Akt and c-Myc Induce Stem-Cell Markers in Mature Primary p53^{-/-} Astrocytes and Render These Cells Gliomagenic in the Brain of Immunocompetent Mice. *PLoS ONE* 8(2):e56691–11.
19. Ozawa T, et al. (2014) Most human non-GCIMP glioblastoma subtypes evolve from a common proneural-like precursor glioma. *Cancer Cell* 26(2):288–300.
20. Hughes EG, Kang SH, Fukaya M, Bergles DE (2013) Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nature Publishing Group* 16(6):668–676.
21. Verhaak RGW, 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.
22. Auvergne RM, et al. (2013) Transcriptional Differences between Normal and Glioma-Derived Glial Progenitor Cells Identify a Core Set of Dysregulated Genes. *CellReports* 3(6):2127–2141.
23. Sim FJ, Windrem MS, Goldman SA (2009) Fate determination of adult human glial progenitor cells. *Neuron Glia Biol* 5(3-4):45–12.
24. Assanah M, et al. (2006) Glial progenitors in adult white matter are driven to form malignant gliomas by platelet-derived growth factor-

- expressing retroviruses. *J Neurosci* 26(25):6781–6790.
25. Zhang Y, et al. (2014) An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *J Neurosci* 34(36):11929–11947.
 26. Rung J, Brazma A (2013) Reuse of public genome-wide gene expression data. *Nat Rev Genet* 14(2):89–99.
 27. Cahoy JD, et al. (2008) A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function. *J Neurosci* 28(1):264–278.
 28. Chow LML, et al. (2011) Cooperativity within and among Pten, p53, and Rb Pathways Induces High-Grade Astrocytoma in Adult Brain. *Cancer Cell* 19(3):305–316.
 29. Song Y, Zhang Q, Kutlu B (2013) Evolutionary etiology of high-grade astrocytomas doi:10.1073/pnas.1317026110/-/DCSupplemental.
 30. Lei L, et al. (2011) Glioblastoma Models Reveal the Connection between Adult Glial Progenitors and the Proneural Phenotype. *PLoS ONE* 6(5):e20041–15.
 31. Dunckley T, et al. (2006) Gene expression correlates of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 27(10):1359–1371.
 32. Reifenberger G, et al. (2014) Molecular characterization of long-term survivors of glioblastoma using genome- and transcriptome-wide profiling. *Int J Cancer* 135(8):1822–1831.
 33. Grzmil M, et al. (2011) MAP Kinase-Interacting Kinase 1 Regulates SMAD2-Dependent TGF- Signaling Pathway in Human Glioblastoma. *Cancer Research* 71(6):2392–2402.
 34. Sturm D, et al. (2012) Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma. *Cancer Cell* 22(4):425–437.
 35. Sim FJ, et al. (2011) CD140a identifies a population of highly myelinogenic, migration-competent and efficiently engrafting human oligodendrocyte progenitor cells. *Nat Biotechnol* 29(10):934–941.
 36. Yang Z, Watanabe M, Nishiyama A (2005) Optimization of oligodendrocyte progenitor cell culture method for enhanced survival. *Journal of Neuroscience Methods* 149(1):50–56.
 37. McLendon R, et al. (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455(7216):1061–1068.

38. Visvader JE (2011) Cells of origin in cancer. *Nature* 469(7330):314–322.
39. Liu C, Zong H (2012) Developmental origins of brain tumors. *Current Opinion in Neurobiology* 22(5):844–849.
40. Bhat KPL, et al. (2013) Mesenchymal Differentiation Mediated by NF- κ B Promotes Radiation Resistance in Glioblastoma. *Cancer Cell* 24(3):331–346.
41. Bhat KPL, et al. (2011) The transcriptional coactivator TAZ regulates mesenchymal differentiation in malignant glioma. *Genes & Development* 25(24):2594–2609.
42. Mao P, Joshi K, Li J, Kim SH, Li P (2013) Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3 doi:10.1073/pnas.1221478110/-/DCSupplemental/pnas.201221478SI.pdf.
43. Sim FJ, et al. (2011) CD140a identifies a population of highly myelinogenic, migration-competent and efficiently engrafting human oligodendrocyte progenitor cells. *Nat Biotechnol* 29(10):934–941.
44. Venkatesh HS, et al. (2015) Neuronal Activity Promotes Glioma Growth through Neuroligin-3 Secretion. *Cell* 161(4):803–816.
45. Irizarry RA, et al. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4(2):249–264.
46. Team RC (2012) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2012.
47. Ritchie ME, et al. (2015) limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43(7):e47–e47.
48. McLendon R, et al. (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455(7216):1061–1068.
49. Brennan CW, et al. (2013) The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* 155(2):462–477.
50. Zhu J, et al. (2009) The UCSC Cancer Genomics Browser. *Nat Meth* 6(4):239–240.
51. Cline MS, et al. (2013) Exploring TCGA Pan-Cancer Data at the UCSC Cancer Genomics Browser. *Sci Rep* 3:1–6.

52. Wickham H (2009) ggplot2: elegant graphics for data analysis.
53. Hide T, et al. (2011) Combination of a Ptgs2 Inhibitor and an Epidermal Growth Factor Receptor-Signaling Inhibitor Prevents Tumorigenesis of Oligodendrocyte Lineage-Derived Glioma-Initiating Cells. *Stem Cells* 29(4):590–599.
54. Wang J, O'Bara MA, Pol SU, Sim FJ (2013) CD133/CD140a-Based Isolation of Distinct Human Multipotent Neural Progenitor Cells and Oligodendrocyte Progenitor Cells. *Stem Cells and Development* 22(15):2121–2131.

Conclusões sobre o Manuscrito I

- Características OPCs são mais frequentes entre amostras tumorais do que características de células diferenciadas como neurônios e astrócitos
- Características OPCs parecem estar presentes na maioria dos gliomas, mas estão mais correlacionadas ao subtipo Proneural

CAPÍTULO III

Manuscrito II

Aceito para publicação pela revista Neuro-Oncology (Oxford Journals, IF: 6.776).

Culture condition tailored to the cell-of-origin is critical for maintaining native properties and tumorigenicity of glioma cells

Pítia F. Ledur^{1,6*}, Chong Liu^{1,5*#}, Hua He⁷, Alexandra R. Harris¹, Darlan C. Minussi⁶, Hai-Yan Zhou⁸, Mark E. Shaffrey², Ashok Asthagiri², Maria Beatriz S. Lopes³, David Schiff^{2,4}, Yi-Cheng Lu⁷, James W. Mandell³, Guido Lenz⁶, Hui Zong^{1#}

1. Department of Microbiology, Immunology, and Cancer Biology,

2. Department of Neurological Surgery,

3. Division of Neuropathology, Department of Pathology,

4. Departments of Neurology, School of Medicine, University of Virginia,

Charlottesville, VA 22908, USA

5. Department of Pathology and Pathogenesis, Center for Cancer Research,

Zhejiang University School of Medicine, Zhejiang Diseases Proteomics Key

Laboratory, Hangzhou, 310058, China

6. Department of Biophysics and Center of Biotechnology, Federal University of

Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS – Brazil, 91509-900

7. Department of Neurosurgery, Changzheng Hospital, Second Affiliated

Hospital of Second Military Medical University, 415 Fengyang Road, Shanghai

200003, China

8. Department of Pathology, Xiang-ya Hospital, Central South University,

Changsha, Hunan, 410013, China

Running Title: Tailor culture media according to the glioma cell-of-origin

* These authors contributed equally to this paper.

Corresponding authors:

Chong Liu - chongliu77@zju.edu.cn

Hui Zong - hz9s@virginia.edu

1340 Jefferson Park Ave., Charlottesville, VA 22908-0734

Phone: 434-982-1956

FAX: 434-982-1071

Conflict of interest: The authors declare no potential conflict of interest.

Funding Statement: National Institutes of Health/National Cancer Institute (R01-CA136495 to H.Z.); National Natural Science Foundation of China (81302187 to H.H.); Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (11/2072-2 to P.L. and G.L.). P.L. received a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brazil) scholarship.

List of unpublished papers cited:

Liu, C., Goldfarb, J., Ledur, P., Minussi, D and Zong, H. (2015) q-GRATIs: A convenient and cost-effective assay to precisely determine tumor functional genes both *in vitro* and *in vivo*. (In preparation).

Word Count of this manuscript: 6,655 (including references and legends)

Total number of figures included in this manuscript: 6 (and 2 supplementary figures)

ABSTRACT

Background: Cell culture plays a pivotal role in cancer research. However, culture-induced changes in biological properties of tumor cells profoundly affect research reproducibility and translational potential. Establishing culture conditions tailored to the cancer cell-of-origin could resolve this problem. For glioma research, it was previously shown that replacing serum with defined growth factors for neural stem cells (NSCs) greatly improved the retention of gene expression profile and tumorigenicity. However, among all molecular subtypes of glioma, our laboratory and others previously showed that oligodendrocyte precursor cell (OPC), rather than NSC, serves as cell-of-origin for the proneural subtype, raising questions regarding the suitability of NSC-tailored media for culturing proneural glioma cells.

Methods: OPC-originated mouse glioma cells were cultured in conditions for normal OPCs or NSCs, respectively, for multiple passages. Gene expression profiles, morphologies, tumorigenicity, and drug responsiveness of cultured cells were examined in comparison to freshly isolated tumor cells.

Results: OPC-media cultured glioma cells maintained tumorigenicity, gene expression profiles, and morphologies similar to freshly isolated tumor cells. In contrast, NSC-media cultured glioma cells gradually lost their OPC features and most tumor-initiating ability, and acquired heightened sensitivity to temozolomide.

Conclusions: To improve experimental reproducibility and translational potential of glioma research, it is important to identify the cell-of-origin, and subsequently apply this knowledge to establish culture conditions that allow the retention of native properties of tumor cells.

KEYWORDS: Glioma, Oligodendrocyte Precursor Cell (OPC), Neural Stem Cell (NSC), Cell Culture, Research Reproducibility

INTRODUCTION

Cell culture is a cornerstone technique in biomedical research. For cancer research, tumor cell lines for almost all types of human cancer have been invaluable for the discovery of novel drug targets through mechanistic studies and high-throughput screening efforts ^[1]. However, cultured tumor cells often have phenotypic and genetic alterations that could confound research reproducibility ^[2-4] and mislead therapeutic development ^[5]. Therefore, it is imperative to improve cell culture practices based on concrete scientific rationales.

For glioma research, efforts have been devoted to keeping cultured cell lines as similar to their parental tumors as possible ^[6]. About a decade ago, cancer stem-like cells (CSLCs) were first described in GBM, ^[7,8] which behave similar to neural stem cells (NSCs) ^[9,10]. This revelation cast doubt on the usage of serum in glioma cell culture, as serum is known to induce NSC differentiation ^[11]. Furthermore, recent studies showed that serum induces differentiation of glioma CSLCs, alters gene expression patterns ^[6], and even impairs tumorigenicity ^[12]. On the contrary, culturing glioma cells in serum-free media supplemented with NSC-supporting growth factors, Epidermal Growth Factor (EGF) and basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2), preserved salient features of glioma CSLCs, such as multi-lineage differentiation and tumor initiating capacity ^[6,9]. Together, these findings suggested that the NSC culture condition should be adopted to maintain glioma CSLCs.

One recent advance in tumor pathology is using molecular profiling to define subtypes in histopathologically indistinguishable cancers, which led to the sub-division of GBMs into four subtypes: classical, mesenchymal, proneural, and neural ^[13,14]. While NSC may serve as cell-of-origin for some subtypes, our

lab and others showed that oligodendrocyte precursor cell (OPC), a glial cell progenitor, is the cell-of-origin for at least the proneural subtype ^[15-18]. Since culture conditions differ between OPCs and NSCs, it raises an important question on how to properly maintain OPC-originated proneural glioma cells, which is the main line of investigation in this paper.

MATERIALS & METHODS

This is a brief description. Please see supplemental files for detailed information, such as vendors, catalog numbers for reagents, etc.

Mouse Lines and genotyping

Mice genotype was *MADM (TG11, GT11)*, *hGFAP-Cre*, *p53KO*, NF1 flox or *MADM (TG11, GT11)*, NG2-Cre, *p53KO*, NF1 null. *p53KO*, *NF1 flox*, *p53 flox*, *hGFAP-Cre* mice were used to purify p53/NF1 double null OPCs and p53/NF1 double null NSCs ^[1]. Wild type, GFP OPCs were purified from NG2-eGFP (wt) mice ^[1]. Genotyping was performed as described ^[1]. All animal procedures were in compliance with animal care guidelines and approved by the IACUC of University of Virginia (approval #3955).

Immunopanning Procedure

OPCs and OPC-originated tumor cells were dissociated and purified through immunopanning with PDGFR α as a primary antibody.

Cell culture

Cells were maintained in Neurobasal (NB) media supplemented with either EGF/FGF-2 for NmA cells and eNSCs, or PDGF-AA for Wild-type OPCs and Oma cells. Glioma cell lines had passages between 12-17 unless otherwise stated. Human glioma samples collected by the University of Virginia Hospital were approved by the IRB under protocol IRB-HSR#17626. Tumor tissue was digested and dissociated as described ^[17]. Primary tumor cells were maintained in indicated media.

Sphere Formation assay

Cells were dissociated from mouse brains (E15.5 for NSCs or P10 for OPCs), cell number was adjusted and cells were cultured in different media in plates coated with Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) (Sigma 192066-1G) to inhibit cell adhesion.

Lentivirus production and cell infection

Lentivirus production was performed with a 3rd generation packaging system co-transfected in HEK293T cell line through a calcium phosphate method. Supernatant was collected, filtered and used to infect target cells.

Tumor cell grafting

For grafting, either MADM-model derived mouse glioma cells or human patient-derived glioma cells were grafted into the striatum of NOD-SCID mouse brains with the following coordinates, measured according to bregma: 1 mm posterior, 1 mm lateral, and 2.5 mm deep under the pia surface.

qGRATIs analysis

q-GRATIs system is a set of lentiviral vectors with unique DNA tags that can be quantitatively detected with q-PCR. After two cell lines separately infected with viral particles containing distinct DNA tags are mixed together, genomic DNA of part of cell mixture is extracted and q-PCR for those tags is used to indicate the relative abundance of each cell line initially (I). The remaining cell mixture is used for grafting. After tumor formation, genomic DNA is extracted and q-PCR for those tags is used to indicate the relative abundance of each cell line in the end (E). The E/I ratio reflects the difference in propagation rate of each cell line (**Figure 5E**). Mouse or human glioma cells infected by qGRATIs vectors were

orthografted as described ^[17]. Genomic DNA was extracted from tumors formed as template for qPCR reactions to measure abundance of individual barcoded tags.

Quantitative realtime PCR

qRT-PCR was performed in an Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System by using KAPA SYBR FAST ABI Prism qPCR Kit. Beta-actin (ActB) and/or Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) were used to normalize the expression of target genes. For details on **RNA extraction, cDNA synthesis and DNA extraction** please refer to Supplementary M&M.

MTT assay and Temozolomide treatment

Glioma^{NmA} and Glioma^{OmA} cells were plated at a density of 2×10^5 cells/well in 96-well plates and treated with variant concentration of Temozolomide (Temodar®, MERCK & CO., INC.) as indicated. MTT assay was used to assess cell viability 48 hours after treatment.

Immunofluorescence staining

Immunofluorescent staining on cell culture or frozen tissue sections was performed as described ^[17]. For antibodies refer to Supplementary M&M.

Western blotting

Cells were lysated in cold lysis buffer 17 (R&D, 895943), supplemented with protease inhibitor cocktail tablets (Roche, 11836153001) and Halt Phosphatase Inhibitor (Thermo Scientific, 1862495). Total protein was adjusted according to

concentration measured by Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, cat. # 23227). Protein samples were subjected to SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. For antibodies, see Supplementary M&M.

Tissue Microarray (TMA) analysis

TMA containing 238 glioma samples were prepared as described ^[19]. Five characteristic microscopic fields were randomly selected for quantifying data points. Images were analyzed using Image pro-plus 6.0 software (Media Cybernetics). To ensure unbiased scoring, two individuals without knowledge of clinical data blindly evaluated immunohistochemical results of TMA. This study was approved by Ethics Committee of the Xiangya Hospital of Centre-South University (IRB# 201012047).

Clustering Analysis

Gene expression values from qPCR were normalized to values between -1 and +1 for each gene. Values were used for unsupervised hierarchical clustering with R software ^[20], URL (<http://www.R-project.org/>), version 3.0.2, by gplots package ^[21], version 2.13.0. Euclidean distance was the distance metric employed.

Single cell profile analysis

We used single cell RNASeq data available at GEO provided by Patel et al (2014) ^[22] (GSE57872). Tumor identification names were kept as in the original dataset. Cell-cycle meta-signature score was reproduced as described and based on the gene list from figure 2B of the paper ^[22]. Cells with high cell-cycle (CC) meta-signature score were divided according to PDGFRA and GFAP.

Expression levels were normalized (-5 and 5) in order to compare expression of both genes.

RESULTS

OPC-like tumor cells from a mouse glioma model function as cancer stem-like cells (CSLCs)

Using a genetic mouse model in which *p53* and *neurofibromatosis 1* (*NF1*) were inactivated, we have shown that OPCs can function as cell-of-origin and directly transform into high-grade glioma ^[17,23]. After transformation, tumor cells maintained prominent OPC features, including stellate morphology and expression of OPC-specific markers such as Olig2, PDGFR α , Sox10, NG2/Cspg4, etc. ^[17,23]. Transcriptome analysis of tumor cells further revealed a gene expression profile closely resembling OPCs ^[17]. To determine whether these OPC-like glioma cells function as CSLCs, we enriched them to $\geq 95\%$ purity through an immunopanning procedure that captures cells expressing OPC-specific surface marker PDGFR α ^[17,24].

First we examined the sphere-forming capacity of immunopanned OPC-like tumor cells. We found that OPC-like tumor cells, but not cells in the supernatant fraction where tumor cells were largely depleted, efficiently formed spheres in serum-free culture media (**Figure 1A**). While the initial assays were performed in media supplemented with EGF and FGF-2, known growth factors for NSCs, we wondered if similar results could be obtained if PDGF-AA ^[25,26], the growth factor essential for normal OPC proliferation, was used. We found that spheres could form in PDGF-supplemented as well as in EGF/FGF-2 supplemented media (**Figure 1A**). Furthermore, spheres formed in both EGF/FGF-2 and PDGF-AA conditions could be further passaged for multiple generations, indicating their self-renewal capacity (**Figure 1B**). We then determined whether OPC-like glioma cells could differentiate into multiple neuroglial cell types, a hallmark of glioma CSLCs ^[7]. As shown in Figure 1C,

OPC-like glioma cells differentiated into cells expressing markers for mature neurons, astrocytes, and oligodendrocytes in presence of serum, demonstrating their multipotentiality. Finally, we confirmed that as few as 10 OPC-like cells were sufficient to initiate secondary tumors in immunocompromised mouse brains (**Figure 1D**), suggesting that most OPC-like tumor cells, if not all, carry the ability to initiate tumors. Taken together, our data support that OPC-like cells fulfill the criteria of glioma CSLCs.

OPC-like glioma cells retained salient features of their primary tumors when maintained in the media condition for normal OPC culture

Considering the OPC origin, we first expanded glioma cells in serum-free media containing PDGF-AA ^[25,26]. At the time of this manuscript, we have successfully cultured them for at least 28 passages without detectable changes in proliferative rate, morphology, and the expression of OPC markers PDGFR α , Olig2, and Sox10 (**Figure 2A, B**). To further investigate whether these cell lines resemble OPCs, we applied quantitative RT-PCR (qRT-PCR) to evaluate the expression of genes enriched in OPCs, neurons, astrocytes, or oligodendrocytes ^[27]. We also included genes that are considered highly expressed in NSCs and CSLCs, although many of them are also expressed in normal OPCs (see below and discussion) ^[28,29]. All established tumor cell lines strongly expressed OPC-oligodendrocyte lineage markers, but not astrocyte or neuron markers, and were grouped closer to wild-type OPCs by unsupervised clustering (**Figure 2C**), suggesting that these cell lines share a gene expression pattern more similar to OPCs than to other cell types. Taken together, these findings demonstrate that OPC-originated glioma cells cultured in PDGF-containing media for multiple passages could maintain salient molecular and cellular features of OPCs.

Cultured in NSC-media, OPC-like glioma cells lost the expression of OPC markers but up-regulated NSC markers

Given that OPC-like glioma cells can form spheres in EGF/FGF-2 media (**Figure 1A**), we wondered whether OPC-like glioma cells could be effectively maintained in NSC culture condition. Therefore, we split primary glioma cells from same tumors into two fractions, then maintained them in either PDGF-AA- or EGF/FGF-2-containing media to establish cell lines. Similar to cell lines maintained in PDGF-AA described in **Figure 2**, those maintained in EGF/FGF-2 could be readily established and maintained for at least 28 passages. Hereafter, we refer to cell lines established in PDGF-AA media as *OPC-media-accustomed Glioma* (Glioma^{OmA}) and those in EGF/FGF-2 media as *NSC-media-accustomed Glioma* (Glioma^{NmA}).

Glioma^{NmA} cells proliferated significantly faster than their Glioma^{OmA} counterparts (**Figure 3A**), had less elaborated processes and larger cell bodies compared to Glioma^{OmA} cells and normal OPCs (**Figure 3B**, see also **Figure 4A**). Furthermore, Glioma^{NmA} cells dramatically down-regulated the expression of many OPC-specific genes (**Figure 3B, C**) while up-regulating NSCs genes, such as Nestin and Prom1 (CD133) (**Figure 3C**). It should be noted that EGFR, reported to be expressed in active NSCs and human GBM CSLCs [30,31], was expressed in the Glioma^{NmA} line but not in the Glioma^{OmA} line or the primary OPC-like tumor cells (**Figure 3C**). While it was reported that WT NSCs could contaminate glioma culture and contribute to EGFR expression [32], we confirmed that these NmA cells were derived from glioma cells rather than from contaminating normal NSCs based on their prominent RFP expression (**Figure 3B**), the fluorescent marker specifically introduced into OPCs during tumor

development ^[17]. Finally, while Glioma^{NmA} and Glioma^{OmA} cells are different, it would be important to determine which one better matches acutely purified parental tumor cells. Unsupervised clustering based on gene expression patterns of a matched set of acute tumor-Glioma^{NmA}-Glioma^{OmA} showed that Glioma^{OmA} cells clustered with parental tumor cells and WT OPCs, while Glioma^{NmA} cells clustered with NSCs (**Supplementary Figure 1**). In summary, our data suggest that long-term exposure to EGF/FGF-2 induces mouse glioma cells to deviate from OPC-like gene expression patterns.

Glioma^{NmA} cells were gradually converted from OPC-like tumor cells when cultured in NSC media, a process that is mostly irreversible

There are two possible explanations for how Glioma^{NmA} cell lines were derived in the presence of EGF/FGF-2: gradual conversion at population level; or outgrowth from a few rare, pre-existing NSC-like glioma cells. To tease apart these possibilities, we carefully monitored glioma cells cultured in NSC media for >10 passages. We found that, during early passages, tumor cells exhibited neither detectable morphological change nor decreased cell viability (**Figure 4A**). After 4-5 passages in NSC media, morphological alterations, such as enlargement of cell body and disappearance of fine processes, became noticeable in all cells (**Figure 4A**). After seven passages, cells became morphologically indistinguishable from established Glioma^{NmA} cells (shown at P12 on **Figure 4A**). Therefore, we concluded that Glioma^{NmA} cells were converted from Glioma^{OmA} cells through gradual phenotypic alternations at the population level rather than selected from rare, pre-existing cells.

To determine whether the phenotypes of Glioma^{NmA} and Glioma^{OmA} cell lines are reversible, we performed a cross-culture experiment. While Glioma^{OmA}

cells grew well after being switched into NSC media, Glioma^{NmA} cells went through massive detachment and reduction of cell viability when switched into OPC media (**Figure 4B**). These observations suggest that the phenotypic plasticity is largely uni-directional: while Glioma^{OmA} cells could readily adapt to the new culture condition, the majority of Glioma^{NmA} cells could not re-adapt to OPC media.

The tumorigenic potential of OPC-like glioma cells was significantly reduced after long-term maintenance in NSC culture condition

To compare tumorigenic potential of glioma cells cultured in each condition, we grafted the same number of Glioma^{NmA} and Glioma^{OmA} cell lines established from the same primary tumor into NOD-SCID mouse brains, respectively. Glioma^{OmA} cells efficiently initiated secondary tumors *in vivo* even after long-term culture (**Figure 5A, top row**), and tumor cells in grafted glioma exhibited prominent expression of OPC markers (**Figure 5B, top row**). Of note, tumor latency of long-term cultured Glioma^{OmA} cells (>18 passages) was comparable to that of freshly purified ones (~4 weeks when 100,000 cells are grafted), indicating that OPC culture condition not only retained OPC properties, but also their tumorigenic potential. In stark contrast, Glioma^{NmA} cells did not generate sizable tumors (**Figure 5A, bottom row**). Surviving Glioma^{NmA} cells along the needle track of the graft exhibited low proliferative activity (**Figure 5B, bottom row**) and restored expression of OPC markers PDGFR α and Olig2 (**Figure 5D, in comparison to 5C**), further implicating that OPC-features are critical for *in vivo* propagation of tumor cells.

To quantitatively compare tumorigenicity of grafted Glioma^{NmA} and Glioma^{OmA} cells within the same mouse, we employed a method termed

quantitative-Grafting assay based on Ratio Alteration between Targeted and Internal control cells, or q-GRATIs, recently developed in our laboratory (**Figure 5E**). Glioma^{NmA} and Glioma^{OmA} cells were permanently labeled with unique DNA sequences (q-GRATIs tags, named as A and B tags respectively) via lentiviral-mediated genome integration, mixed together, then grafted into NOD-SCID mouse brains. The relative *in vivo* propagation potential between these cell lines was subsequently determined by the “End-to-Initial (E/I) ratio”, which is defined by the change in relative abundance between the two GRATIs tag-labeled cell lines before and after *in vivo* tumor expansion (**Figure 5E**). By design, a 1.0 E/I-ratio would suggest that Glioma^{OmA} and Glioma^{NmA} cells propagate equally during tumor progression, while a E/I-fold bigger than 1.0 would indicate that the former propagates more than the latter *in vivo*. Using this method, we determined that Glioma^{OmA} outgrew the Glioma^{NmA} cell line *in vivo* by more than 40-fold (**Figure 5F**). The stark contrast between *in vivo* tumorigenicity and *in vitro* proliferative rate (**Figure 3A**) cautions us not to solely base on *in vitro* growth to choose optimal culture condition for glioma cells.

The prevalence of highly proliferative OPC-like cells in human high-grade glioma

To examine the prevalence of OPC-like glioma cells in human high-grade glioma, we performed immunohistochemical analysis of Olig2 (as an OPC marker) or GFAP (as a non-OPC marker) on a set of tissue microarrays that contained 236 patient samples (see **Supplementary Table 1** for a summary of patient characteristics). Consistent with previous findings, Olig2-positive cells existed in almost all glioma samples to various extents ^[34] (**Figure 6A and 6C**). In addition to oligodendroglioma, GBMs or even pathologically well-defined

astrocytomas also harbor a significant portion of tumor cells with prominent Olig2 staining (**Figure 6A**, high Olig2 groups). This finding resonates well with a recent study in which well-differentiated astrocytoma and oligodendroglioma were shown to contain OPC-like tumor cells ^[35]. In contrast, there was no significant enrichment of GFAP-positive cells in any group of high-grade glioma. As a negative control, only marginal or no Olig2 staining was found in normal brain tissue or pathological tissues irrelevant to glioma, such as reactive gliosis and immune hyperplasia, despite detection of prominent GFAP staining signals (**Figure 6B**).

To assess the proliferative rate of Olig2+ and GFAP+ cells in the tumor mass, we further co-stained Olig2 with Ki67 or GFAP with Ki67 on 17 GBM samples. Intriguingly, despite varied percentages of Olig2+ cells in these samples, a large proportion of them were undergoing active proliferation based on Ki67 staining (**Figure 6D**, top row, and **Figure 6E**), consistent with previous reports ^[34]. In contrast, GFAP+ cells were less frequently Ki67-positive (**Figure 6D**, bottom row, and **Figure 6E**). While our attempt to co-stain Ki67 with a second OPC marker PDGFR α failed due to unreliable staining on FFPE samples, we took advantage of a recently published single cell RNASeq dataset, where 430 cells from 5 human GBMs were sequenced ^[22]. We examined the expression of PDGFR α and GFAP in cells that were considered actively cycling, according to a cell-cycle meta-signature score (**Material and Methods**). Data in **Figure 6F** show that, among proliferating cells, most of them exhibited prominent PDGFR α expression but few had GFAP expression. Notably, despite MGH28 and MGH30 being classified as Mesenchymal and Classical subtypes, respectively ^[13], the majority of proliferating cells in these GBMs were PDGFR α -positive. Taken together, our findings indicate that tumor cells resembling OPCs

could contribute more prevalently to human high-grade glioma than previously thought, and consist of the main proliferating pool in the tumor mass.

Culture conditions significantly affected cellular properties and tumorigenic potential of human glioma cells

Our mouse model studies thus far demonstrated that culture condition could have a dramatic impact on cellular behaviors and tumor-propagating capacities. To evaluate the human relevance of such notion, we directly cultured surgically resected and dissociated human GBM cells in NSC and OPC media, respectively. Two of thirteen tumor samples have been successfully established into cell lines. Notably, despite a generally suboptimal success rate, both Glioma^{NmA} and Glioma^{OmA} sub-lines could be established from these two GBM samples. Though the small amount of tumor tissues precluded us from determining their subtype via gene expression profiling, we retrospectively confirmed the existence of Olig2+ tumor cells in the primary tumors used to establish cell lines (**Supplementary Figure 2**).

Intriguingly, human GBM cell lines clearly recapitulated behaviors of mouse glioma cells. First, human Glioma^{NmA} and Glioma^{OmA} sub-lines exhibited distinct morphologies, with Glioma^{NmA} frequently growing into tumor spheres while Glioma^{OmA} having spindle morphology resembling OPCs (**Figure 6G, top row**). Second, Glioma^{NmA} cells are more proliferative *in vitro* when compared to Glioma^{OmA} cells based on EdU incorporation (**Figure 6G bottom row**). Third, qRT-PCR revealed that the Glioma^{OmA} sub-line expressed OPC markers such as PDGFR α , Olig2, Sox10, NG2, and ERBB3 at a higher level than its Glioma^{NmA} counterpart. (**Figure 6H**). In contrast, NSC marker Nestin and astrocyte marker GFAP were upregulated in the Glioma^{NmA} sub-line (**Figure 6H**). Finally,

intracranial xenografting assay using q-GRATIs approach showed that the human Glioma^{OmA} sub-line possessed significantly higher tumor-propagating activity than its Glioma^{NmA} counterpart (**Figure 6I**), despite apparently slower proliferation in culture (**Figure 6G bottom row**). Because Temozolomide (TMZ) is the most commonly used chemotherapy drug in clinics, we also tested drug responsiveness of human glioma cells cultured in each condition, and found that Glioma^{NmA} cells were significantly more sensitive to TMZ than Glioma^{OmA} cells (**Figure 6J**), suggesting that culture conditions could skew therapeutic predictions.

DISCUSSION

Cell-of-origin properties are critical for sustaining tumor-propagating activity of transformed cells

Using genetic mouse models, we and others have previously shown that OPC can function as cell-of-origin for high-grade glioma ^[15-18]. The fact that OPCs can be transformed by certain oncogenic mutations while other brain cells fail to do so suggests that the signaling context within OPC is particularly susceptible to those mutations. However, given the plasticity of tumor cells, it is unclear whether OPC properties remain important to sustain glioma after the initial transformation. Our current study demonstrated that tumor cells retaining OPC features can function as CSLCs, possessing capacity to self-renew and differentiate into multiple neuro-glial lineages *in vitro*, as well as to initiate secondary tumors when implanted into brains of immuno-compromised mice. However, after being cultured in the NSC culture condition, tumor cells lost OPC properties and had compromised capacity to form tumors *in vivo*. Therefore, the properties of cell-of-origin are not only important for tumor initiation but also critical for tumor progression.

The importance of OPC-like tumor cells in human glioma

Previously, based on an 840-gene signature, pathologically indistinguishable GBMs were stratified into four distinctive subtypes ^[13]. Our comparative transcriptome analysis assigned OPC-originated glioma mouse models to human proneural subtype ^[17,23], implicating the important role of OPCs in this subtype of human GBMs. Our current work further demonstrates that OPC-like glioma cells are critical in sustaining tumor progression. Therefore, understanding OPC biology in both normal and malignant states should provide

crucial insights for the development of effective therapeutic strategies for proneural subtype of glioma.

The proneural subtype was previously estimated to constitute ~25% of all human GBMs ^[13]. However, recent studies suggest that the prevalence of proneural signature may be under-estimated. It was found that glioma tissues from different locations within the same tumor could be classified into different subtypes, frequently including proneural ^[36]. Intriguingly, single cell RNA sequencing techniques revealed that even the same GBM can possess cells with signatures of both proneural and other subtypes ^[22]. Moreover, altering a single gene was often sufficient to convert the proneural subtype of GBMs to other subtypes, such as mesenchymal ^[37,38]. Consistent with some other studies ^[39,40], histological analyses in our work revealed that tumor cells with OPC features were detected to varying extents in almost all glioma, including astrocytomas. Finally, regardless of their pathological classification, a significant portion of proliferative tumor cells in lower and higher-grade glioma that we have examined exhibited OPC features, suggesting that OPC-like glioma cells may be a promising therapeutic target for a large subset of human glioma patients.

The importance of culturing tumor cells in media conditions tailored for the cell-of-origin

The importance of OPC properties led us to reflect on the conditions used for primary cell culture. Previously, it was elegantly demonstrated that serum-free media commonly used for NSC culture maintained features of parental glioma cells better than serum-containing media ^[6]. Since OPC-like glioma cells exhibit some stem cell properties, we wondered whether NSC media, OPC media or both could be used to maintain these cells. To our surprise, while NSC

media could support tumor cell growth and sphere formation *in vitro*, it significantly impaired, rather than augmented, the tumorigenic potential of OPC-originated glioma cells *in vivo*. On the contrary, OPC media preserved OPC features of glioma cells *in vitro* and their tumorigenicity *in vivo*. Together, these observations highlight the fact that stem cell features may not always indicate tumorigenic potential, in line with a previous study showing that self-renewal does not correlate with tumorigenicity ^[41]. Instead, the features of cell-of-origin need to be retained with corresponding culture conditions for the maintenance of tumorigenicity.

In the context of human glioma, how might our findings impact the practice of culturing CSLCs from patient samples, in which the cell-of-origin cannot be identified prior to cell culture? We propose that multiple types of media should be used, including those tailored for NSCs, OPCs, and astrocytes, to cover all possibilities. Once sub-lines are established, gene expression profiles of each cell line and the original tumor should be examined to see which one(s) recapitulate parental tumor profile. Such practices should greatly increase the chance of obtaining *in vitro* readouts that closely reflect clinical outcomes in drug discovery processes. In the case of highly heterogeneous cellular composition in the tumor mass, compounds should be tested in all sub-lines to identify the most broadly efficacious ones as the optimal therapeutic strategy against tumor heterogeneity or plasticity.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Ben Barres, BJ Purow, Roger Abounader, John Lazo, Shwetal Mehta, Woo-Ping Ge, Kwon-Sik Park, David Kashatus, and Yuan Zhu for critical comments on the manuscript.

REFERENCES

1. Ocana A, Pandiella A, Siu LL *et al.* Preclinical development of molecular-targeted agents for cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8(4):200–9.
2. Freedman LP, Gibson MC, Ethier SP *et al.* Reproducibility: changing the policies and culture of cell line authentication. *Nat Meth.* 2015;12(6):493–7.
3. Boquest AC, Shahdadfar A, Frønsdal K. Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Molecular Biology of the Cell.* 2005;16:1131–41.
4. Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N *et al.* Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat Genet.* 2005;37(10):1099–103.
5. Deschavanne PJ, Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996;34(1):251–66.
6. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y *et al.* 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.* 2006;9(5):391–403.
7. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research.* 2003;63(18):5821–8.
8. Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer Stem Cells: Impact, Heterogeneity, and Uncertainty. *Cancer Cell.* 2012;21(3):283–96.
9. Yuan X, Curtin J, Xiong Y *et al.* Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene.* 2004;23(58):9392–400.
10. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med.* 2005;353(8):811–22.
11. Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci.*

1992;12(11):4565–74.

12. Suvà ML, Rheinbay E, Gillespie SM *et al.* Reconstructing and Reprogramming the Tumor-Propagating Potential of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cell*. 2014;157(3):580–94.

13. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E *et al.* Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010;17(1):98–110.

14. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R *et al.* Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. 2006;9(3):157–73.

15. Lindberg N, Kastemar M, Olofsson T *et al.* Oligodendrocyte progenitor cells can act as cell of origin for experimental glioma. *Oncogene*. 2009;28(23):2266–75.

16. Persson AI, Petritsch C, Swartling FJ *et al.* Non-Stem Cell Origin for Oligodendroglioma. *Cancer Cell*. 2010;18(6):669–82.

17. Liu C, Sage JC, Miller MR *et al.* Mosaic Analysis with Double Markers Reveals Tumor Cell of Origin in Glioma. *Cell*. 2011;146(2):209–21.

18. Assanah M, Lochhead R, Ogden A *et al.* Glial progenitors in adult white matter are driven to form malignant gliomas by platelet-derived growth factor-expressing retroviruses. *J Neurosci*. 2006;26(25):6781–90.

19. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays. *BioTechniques*. 2004;36(1):98–105.

20. Team RC. *R: a Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2012. 2012.

21. Warnes GR. *Gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data*. 2012.

22. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ *et al.* Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*. 2014;344(6190):1396–401.
23. Galvao RP, Kasina A, McNeill RS *et al.* Transformation of quiescent adult oligodendrocyte precursor cells into malignant glioma through a multistep reactivation process. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(40):E4214–23.
24. Dugas JC, Tai YC, Speed TP *et al.* Functional Genomic Analysis of Oligodendrocyte Differentiation. *J Neurosci*. 2006;26(43):10967–83.
25. Richardson WD, Pringle N, Mosley MJ *et al.* A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. *Cell*. 1988;53(2):309–19.
26. Raff MC, Lillien LE, Richardson WD *et al.* Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture. *Nature*. 1988;333(6173):562–5.
27. Cahoy JD, Emery B, Kaushal A *et al.* A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function. *J Neurosci*. 2008;28(1):264–78.
28. Obayashi S, Tabunoki H, Kim SU *et al.* Gene Expression Profiling of Human Neural Progenitor Cells Following the Serum-Induced Astrocyte Differentiation. *Cell Mol Neurobiol*. 2009;29(3):423–38.
29. Galli R, Binda E, Orfanelli U *et al.* Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Research*. 2004;64(19):7011–21.
30. Codega P, Silva-Vargas V, Paul A *et al.* Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche. *Neuron*. 2014;82(3):545–59.

31. Emler DR, Gupta P, Holgado-Madruga M *et al.* Targeting a Glioblastoma Cancer Stem-Cell Population Defined by EGF Receptor Variant III. *Cancer Research*. 2014;74(4):1238–49.
32. Jiang Y, Boije M, Westermark B *et al.* PDGF-B Can sustain self-renewal and tumorigenicity of experimental glioma-derived cancer-initiating cells by preventing oligodendrocyte differentiation. *Neoplasia*. 2011;13(6):492-503.
33. Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*. 2005;352(10):987–96.
34. Ligon KL, Alberta JA, Kho AT *et al.* The oligodendroglial lineage marker OLIG2 is universally expressed in diffuse gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004;63(5):499–509.
35. Lindberg N, Jiang Y, Xie Y *et al.* Oncogenic signaling is dominant to cell of origin and dictates astrocytic or oligodendroglial tumor development from oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci*. 2014;34(44):14644–51.
36. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM *et al.* Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(10):4009–14.
37. Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ *et al.* The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature*. 2010;463(7279):318–25.
38. Ozawa T, Riester M, Cheng Y-K *et al.* Most human non-GCIMP glioblastoma subtypes evolve from a common proneural-like precursor glioma. *Cancer Cell*. 2014;26(2):288–300.
39. Bhat KPL, Balasubramaniyan V, Vaillant B *et al.* Mesenchymal Differentiation Mediated by NF- κ B Promotes Radiation Resistance in Glioblastoma. *Cancer Cell*. 2013;24(3):331–46.

40. Ligon KL, Huillard E, Mehta S *et al.* Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron*. 2007;53(4):503–17.

41. Barrett LE, Granot Z, Coker C *et al.* Self-Renewal Does Not Predict Tumor Growth Potential in Mouse Models of High-Grade Glioma. *Cancer Cell*. 2012;21(1):11–24.

FIGURES

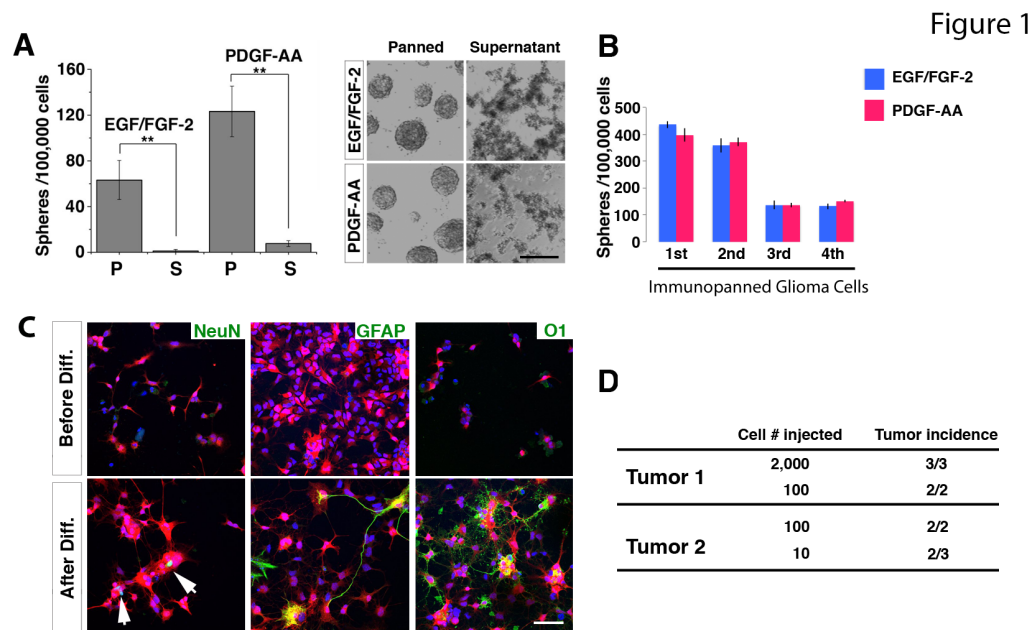


Figure 1: Tumor cells enriched with OPC-specific cell surface marker PDGFR α functioned as CSLCs.

A. Tumor cells enriched by anti-PDGFR α immunopanning, but not those from supernatant, were capable of forming tumor spheres in serum-free media supplemented with either EGF/FGF-2 or PDGF-AA. Left panel, quantification of sphere-forming capacity; Right panel, images of tumor spheres cultured in indicated conditions. Scale bar: 1 mm. P: Immunopanned fraction; S: supernatant fraction. At least 4 wells were quantified for each column. Error bars represent SEM. ** P<0.01.

B. Self-renewability of tumor spheres cultured in either EGF/FGF-2 or PDGF-AA was demonstrated for 3 continuous passages.

C. Multi-lineage differentiation of OPC-like glioma cells induced by 1% FBS and 1% NT-3. NeuN, GFAP and O1 were used to stain mature neurons, astrocytes and oligodendrocytes, respectively. RFP is a Cre reporter that labels all tumor cells^[17]. Scale bar: 100 μ m.

D. *In vivo* tumor initiating capacity of OPC-like glioma cells was examined in 2 different primary tumors after grafting into brains of 8-week old NOD/SCID mice.

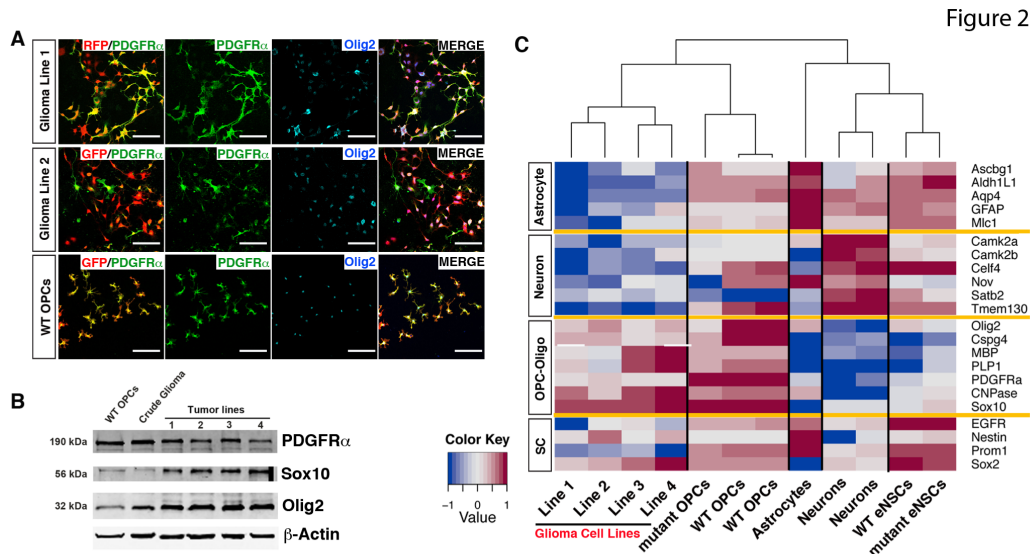


Figure 2: OPC culture condition maintained OPC features of glioma cells.

A. Immunofluorescence staining shows tumor cell lines derived from OPC-originated glioma cells expressed OPC markers PDGFR α and Olig2 under OPC culture condition. WT OPCs were used as positive control. RFP in Glioma Line 1 and GFP in Glioma Line 2 permanently express in glioma cells due to MADM model labeling of mutant cells [17]. GFP channel was pseudo-colored red in the middle row for simplification. Scale bars, 100 μ m.

B. Western Blot revealed that crude glioma tissue (acutely dissociated from mouse brains without immunopanning) and OPC-like glioma lines at passage 12 (P12) express OPC markers. Lines 1-2 were originated from NG2-Cre initiated tumors; lines 3-4 were from hGFAP-Cre initiated tumors. For full genotype see M&M.

C. Heat map of gene expression patterns of different brain cells and OPC-originated glioma lines by qRT-PCR. Representative markers for Neurons,

Astrocytes, OPC-Oligodendrocyte lineage and Stem cells were used. Samples were grouped based on unsupervised hierarchical clustering analysis. Lines 1 through 4 are the same as those used in panel B. Wild type (WT) OPCs were enriched to >95% purity (based on PDGFR α staining) from wt mice at P10 via immunopanning. Mutant OPCs were purified via immunopanning from MADM-*p53KO,NF1flox* mice at P 10, prior to tumor formation. WT embryonic NSCs (eNSCs) were purified from E15.5 WT embryonic brains. Mutant eNSCs were purified from E15.5 hGFAP *p53/NF1* double null brains.

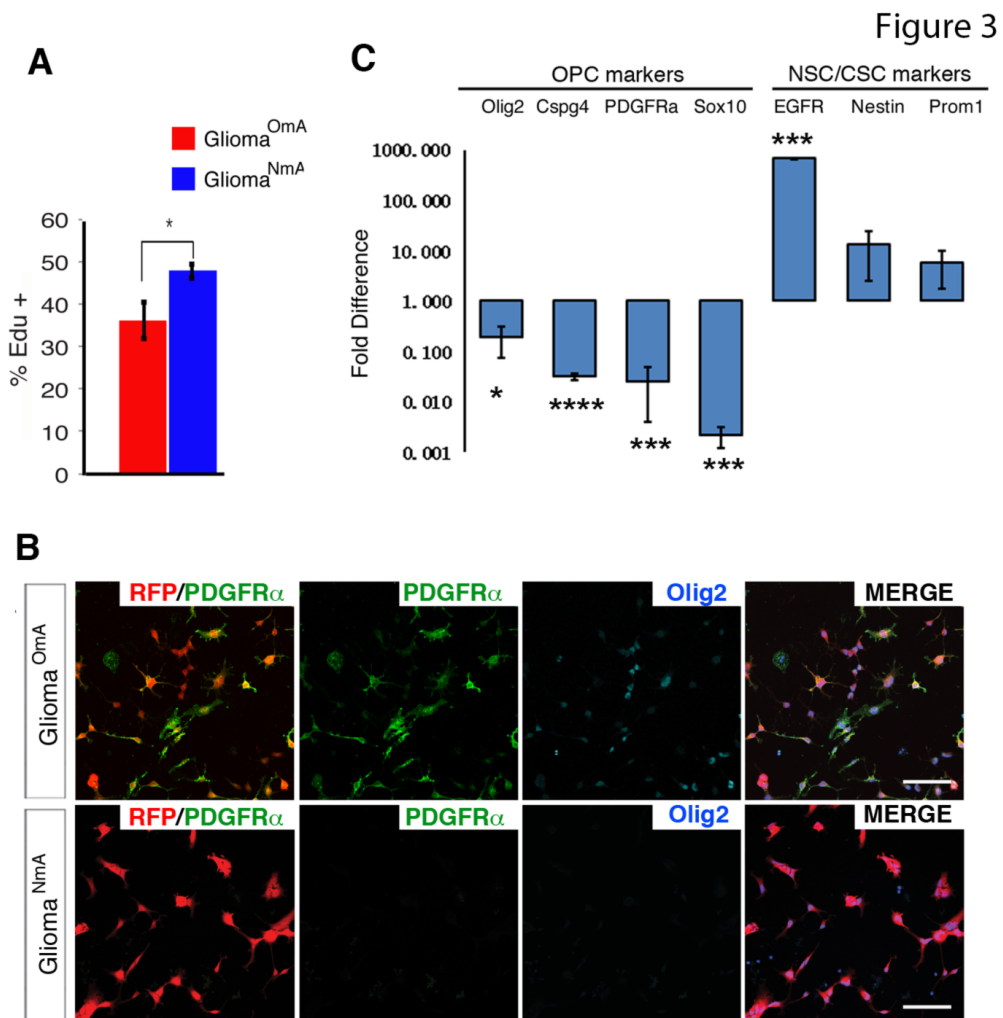


Figure 3: NSC culture condition altered proliferative rate and marker gene expression of glioma cells

A. EdU incorporation assay revealed that Glioma^{NmA} cells grow significantly faster than their Glioma^{OmA} counterpart. Graph shows quantification of 3 independent assays with one pair of cell lines. Bars represent mean +/- SEM. * $P \leq 0.05$. A similar trend was confirmed with a second pair of cell lines.

B. Tumor cell lines maintained OPC markers PDGFR α and Olig2 when cultured in OPC media (Glioma^{OmA}), but lost expression of these markers when cultured in NSC media (Glioma^{NmA}). Glioma^{OmA} and Glioma^{NmA} were established from immunopanned OPC-like tumor cells derived from the same primary tumor, established from TG11/GT11, p53, NF1; hGFAP-Cre mice. Scale bars, 100 μm . Images are representative of 3 independent experiments.

C. qRT-PCR shows that glioma cells cultured in NSC media had diminished expression of OPC markers PDGFR α , Olig2, Sox10 and NG2, but elevated expression of EGFR and Nestin when compared to their Glioma^{OmA} counterpart. Results represent an average of 3 independent experiments with same lines as in 3B. Bars represent mean +/- SEM. * $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$. Experiments in this figure were done with glioma line 1 from Figure 2, and were confirmed with glioma line 2 to ensure reproducibility.

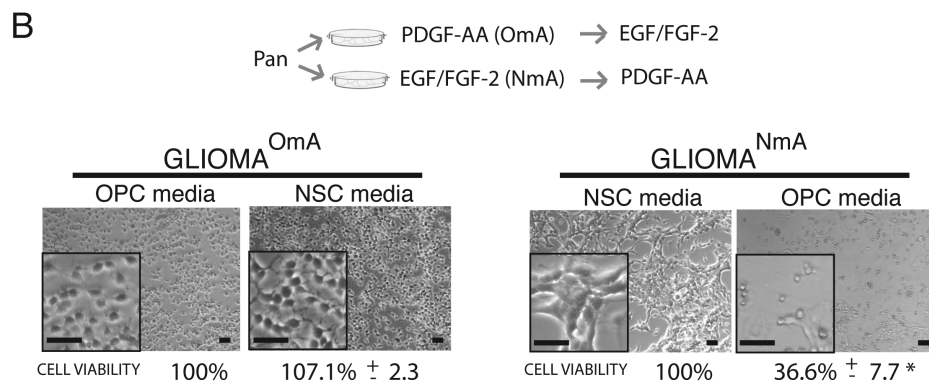
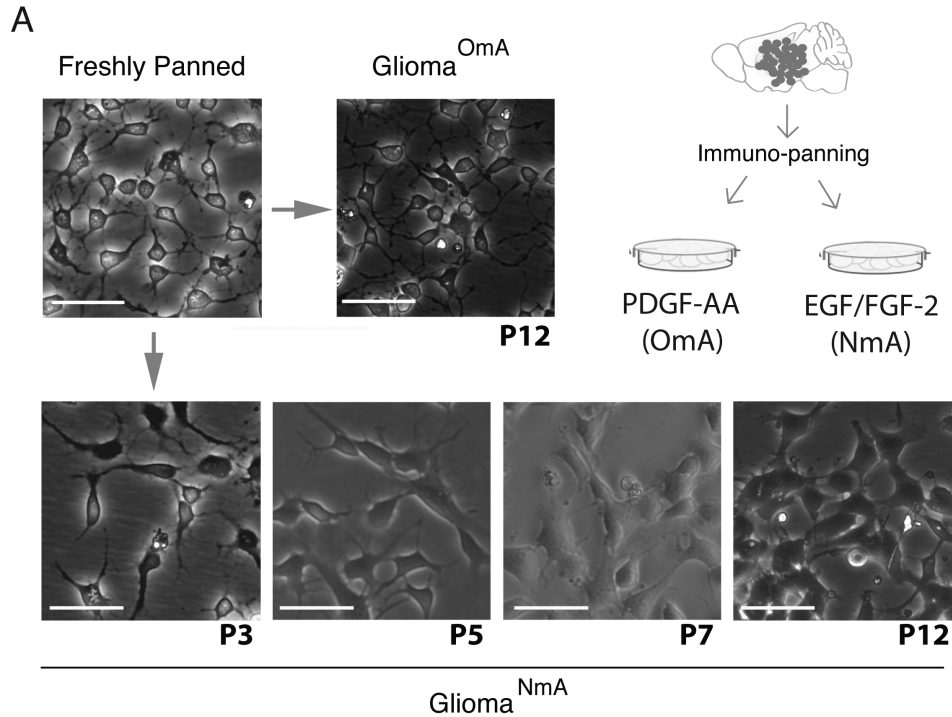


Figure 4: NSC media induced phenotypic changes happened gradually at the population level and were mostly irreversible.

A. Glioma^{OmA} cells cultured in OPC media maintain morphologies for up to 12 passages (top panel). In contrast, after being cultured in NSC media for multiple passages, glioma cells gradually changed morphologies at the population level (bottom panel). Images are representative of 3 different tumors that were freshly purified and cultured in the respective media. Scale bars, 100 μ m.

B. Switching Glioma^{OmA} cells into NSC media did not affect cell viability, in stark contrast to the less than 40% cell viability after switching Glioma^{NmA} cells into OPC media, suggesting that adaptation of glioma cells to NSC media is mostly an irreversible process. Images are representative of 3 different freshly purified tumors that were cultured in the respective media. Cell viability was accessed by MTT assay. Percentages are at the bottom of each picture, and represent an average of 3 experiments \pm SEM. * $P \leq 0.05$. Scale bars, 100 μ m.

Figure 5

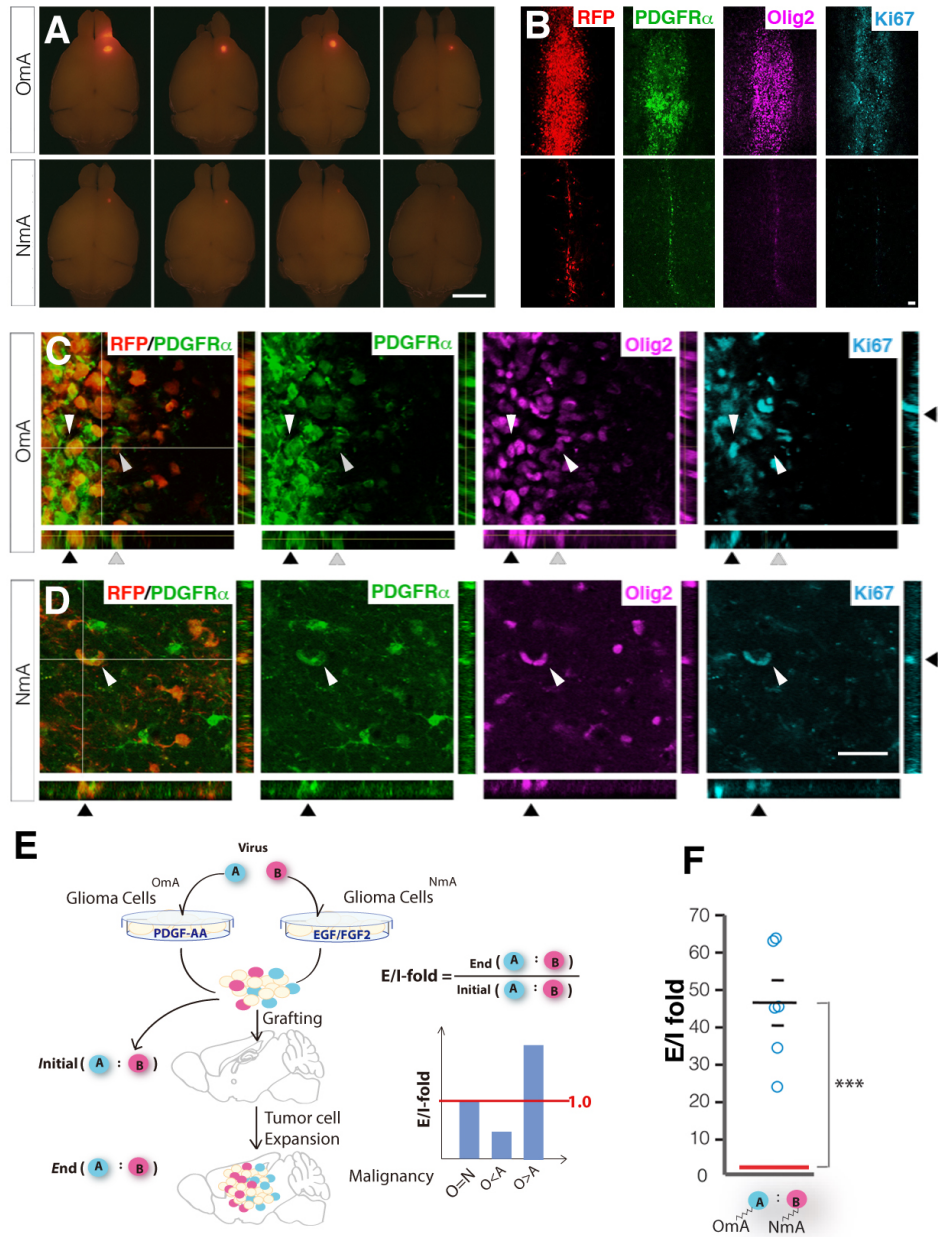


Figure 5: OPC media maintained tumorigenic potential of OPC-originated glioma cells much better than NSC media

A. Gross images of tumors generated by grafting with 100,000 cells of either Glioma^{OmA} or Glioma^{NmA} cells. Tumor cells RFP expression shows bigger tumors from Glioma^{OmA} cells than from Glioma^{NmA} cells. Images are representative of 3 grafting experiments. Scale bar: 2mm.

B. Low magnification images of sections transversing the injection tract of tumor-bearing brains shown in **(A)**. Scale bar: 200 μm .

C and D. High magnification images showing the co-localization of PDGFR α , Olig2 in Ki67+ proliferating tumor cells from both Glioma^{OmA} and Glioma^{NmA}-derived tumor cells. Arrows point to a few cells in all imaging channels, showing that tumor cells (RFP+) positive for OPC markers (PDGFR α +, Olig2+) are dividing (Ki67+). Scale bar: 100 μm .

E. Schematic demonstration on how to use q-GRATIs to compare the relative *in vivo* propagating capacity between Glioma^{OmA} and Glioma^{NmA} cells.

F. q-GRATIs analysis revealed that Glioma^{OmA} cells propagated 40-fold more than Glioma^{NmA} cells *in vivo*. Circles represent individual animals; N=6 mice; 100,000 cells were grafted per mouse. *** $P \leq 0.001$.

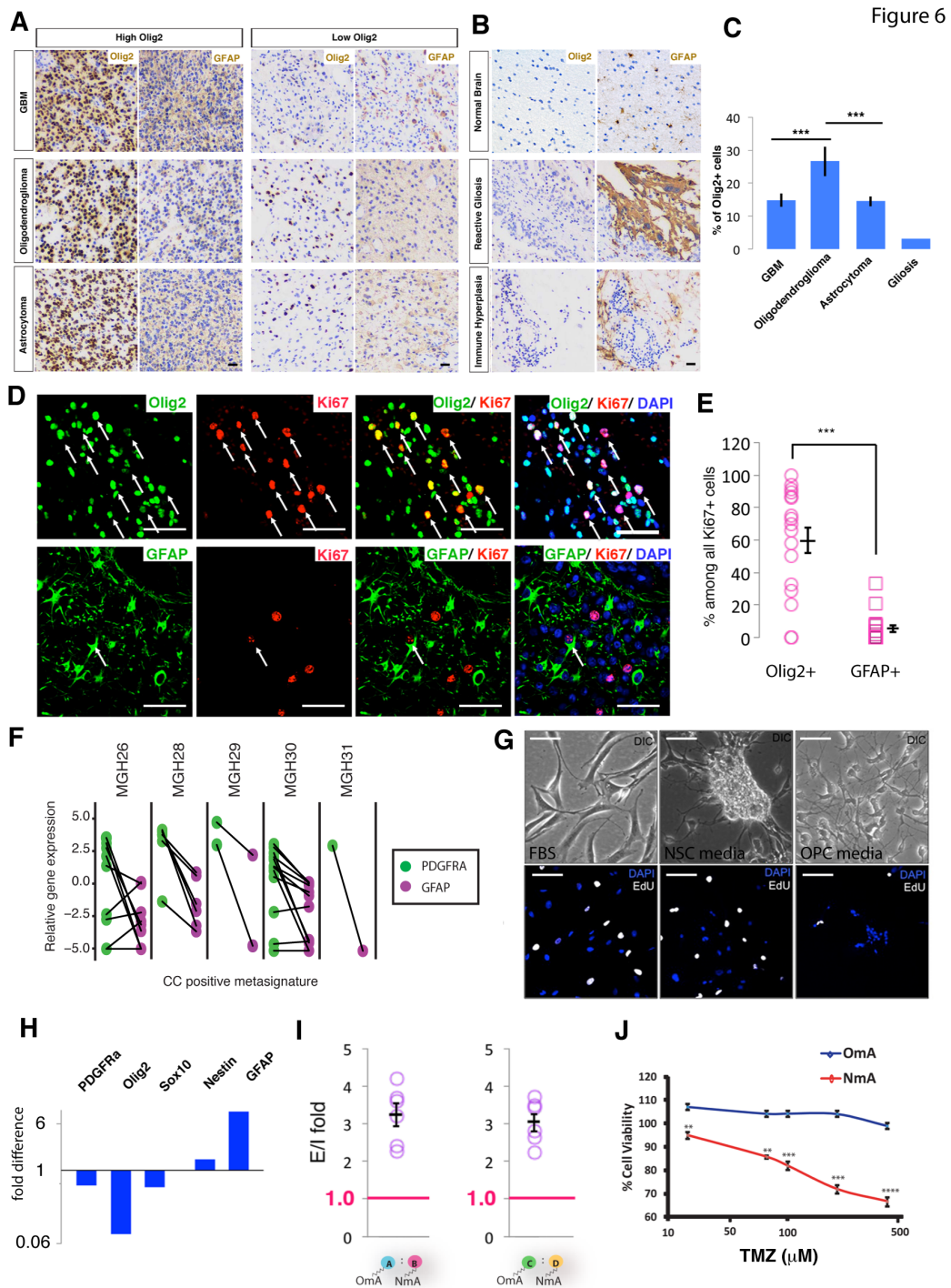


Figure 6. OPC-like glioma cells are prevalent in human gliomas and the choice of culture condition is critical to maintain them *in vitro*.

A and B. Representative IHC images of tissue microarrays showing Olig2+ staining in GBMs, astrocytomas, and oligodendrogliomas with varied abundance, but not as a significant portion in normal brains and pathological situations other than glioma. Scale bar: 100 μ m.

C. Quantification of the percentage of Olig2+ cells in GBMs (N=82), astrocytomas (N=109), and oligodendrogliomas (N=29). Gliosis tissue was used as control.

D. Representative images of immunostaining of human GBM samples co-stained with Ki67 and Olig2 (top row) or Ki67 and GFAP (bottom row). Arrows point to cells stained for both markers. Scale bar: 100 μ m.

E. Quantification of Olig2+ or GFAP+ cells among all Ki67+ proliferating tumor cells (from 17 human GBM samples, manually counted). The percentage of Olig2+ or GFAP+ cells was calculated among the Ki67+ population. Each percentage was plotted in the graph, and average \pm SEM is shown. *** $P \leq 0.001$.

F. Analysis of Patel *et al.* single cell sequencing data from human GBM cells. Cells with a positive cell-cycle metesignature had their PDGFR α or GFAP expression analyzed. Solid lines connect same cells.

G. Primary human glioma cells cultured in OPC, NSC, or serum-containing media exhibited distinct morphologies (top row) and proliferation rates revealed by EdU labeling (bottom row). Scale bar: 100 μ m.

H. NSC-media down-regulated OPC-specific marker genes but up-regulated NSC/astrocyte genes. Expression level was normalized to that from cells cultured in OPC-media.

I. q-GRATIs assay revealed that human Glioma^{OmA} cells propagated significantly more than their NmA counterparts *in vivo*. N = 7 mice. Circles represents fold difference of individual animals; SEM is also represented. *** $P \leq 0.001$.

J. Human Glioma^{OmA} cells are more resistant to TMZ than Glioma^{NmA} cells. TMZ doses used were 25, 75, 100, 200 and 400 μ M. ** $P < 0.01$

SUPPLEMENTARY MATERIAL

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CL and HZ conceived the idea for this study and designed the experiments. PFL conducted experiments in Figures 2, 3, 4, 6H and 6J, and established human GBM cell lines and conducted all grafting experiments with assistance from CL. PFL and CL performed Western blots and q-RT PCR experiments. CL generated data in Figure 1, established cell lines for Figure 2A and 2B, and designed primers for 2C. PFL and CL prepared cDNAs for 2C. CL generated the data in Figure 3C, performed histological analysis for Figure 5A-D. CL designed and constructed all q-GRATIs vectors in Figure 5E. CL conducted q-GRATIs analyses for Figures 5F and 6I with assistance from PFL. H-YZ collected more than 200 human glioma samples and HH performed TMA analyses in Figure 6A, 6B and 6C with inputs from Y-CL. ARH conducted the staining of human GBM slides in Figure 6D and 6G with inputs from PFL and CL. DCM performed the clustering analysis in Figure 2C and single cell profile analysis in Figure 6F. MS, AA, MBSL, and DS provided human GBM samples used for establishing human cell lines in Figure 6G-J. MBSL and JWM performed pathological analysis for Figure 6D and 6E. CL, HZ and PFL wrote the manuscript with inputs from ARH and GL.

SUPPLEMENTARY MATERIALS & METHODS

Mouse Lines and genotyping

All animal procedures were in compliance with animal care guidelines and approved by the IACUC of University of Virginia (approval #3955).

Immunopanning Procedure

Dissociated cell suspension was re-suspended in panning solution (0.02% BSA, 1mg/ml DNase in 1X DPBS, Invitrogen 14040-182) and centrifuged at 220 g for 10 min. Cells were then re-suspended in 12 ml Panning buffer and passed through a 70 mm cell strainer (Fisher 08-771-23).

Cells were added to a BSL-1 coated plate and washed 2X with PBS and 1X with DPBS. 100 ml of single cell suspension was set aside for cell number counting and cell culture. The remaining cell suspension was poured onto the first BSL-1 plate and incubated at room temperature for 15 min. During that incubation time, we counted the living cell number using the Trypan Blue method and a hemacytometer. The second BSL-1 coated plate was washed 2X with PBS and 1X with DPBS before the supernatant from the first plate was transferred to it.

The supernatant from the second BSL-1 plate was transferred to a washed primary antibody (PDGFR α) plate and incubated for 45min, and then the supernatant was transferred to the second primary antibody coated. During the second primary antibody panning plate, the first primary antibody panning plate was washed 6-8 times with DPBS to remove the non-binding cells. At the end of the last wash the plate was checked under the microscope to visualize floating cells. Additional washes were performed until there were almost zero and certainly less than 5% floating cells.

Cells were collected by incubating the first primary antibody panning plate with 2 mL pre-balanced TrypLE (Invitrogen 12605-010) in 5% CO₂ at 37 °C for 7 min.

The reaction was then stopped by the addition of 2 mL of trypsin inhibitor solution (2mg/ml Ovomucoid, 0.4% BSA in 1X DPBS). Tumor cells were dislodged from the plate surface by squirting with a 1 ml pipette tip. We collected the cells and also the supernatant from the second primary antibody plate and transferred them separately to new 15ml conical polystyrene tubes which were pre-coated with 0.4% BSA at 37 C for 1 hr to prevent adherence of cells to the tubes. After centrifugation at 220 g for 10 min, the cells were washed one time with the respective fresh medium (see [cell culture](#) section for media types) before re-suspension in the same medium for cell culture or further use.

Cell culture

Wild type and p53/NF1 double null OPCs were purified from P8 mice; OPC-like tumor cells were purified from fresh mouse glioma tissues through anti-PDGFR α -immunopanning ^[1]. WT OPCs were purified from mice at postnatal day 10 through anti-PDGFR α -immunopanning. Cultured astrocytes were prepared from whole cortex from wild type mice at the age of P1; cortexes were dissociated and cultured into DMEM containing 10% FBS. The primary culture was further passaged for three times. Primary neuron culture was performed as following: hippocampi from WT mice at the age of E14.5 was dissected and dissociated into single cells before culture in Neurobasal media supplemented with B27 at the density of 10,000 cells/ml for 10 days. The presence of hippocampal neurons was confirmed by morphology and by strong MAP2 staining. Cell culture was lysed in situ by using trizol and mRNA was extracted as described. The relative enrichment of the corresponding cell types was validated by prominent expression of a panel of markers in Figure 2C, which

were previously defined by the Barres lab [2]. For instance, *Ascbg1*, *Aldh1L1*, *Aqp4*, GFAP and *Mlc* are all astrocyte-specific markers.

Mice and human cells (OmA and NmA) were maintained in full Neurobasal media supplemented with growth factors. Full media was composed of Neurobasal media (Gibco 21103-049) supplemented with B27 (50X, Gibco 17504-044), GlutaMAX (100X, Gibco 35050-061), Penicillin/Streptomycin (100X, Gibco 15140122), plus 50 ng/mL EGF and 10 ng/mL FGF-2 (PeproTech 100-18B) for NSC media accustomed (NmA) tumor cells, and 10 ng/mL PDGF-AA (PeproTech 100-13A) for Wild-type OPCs and OPC media accustomed tumor cells (OmA).

Sphere Formation assay

Briefly, mice brains were dissociated and cell number was adjusted to 100,000 cells/mL and cultured in NSC medium or OPC medium as described in the cell culture section.

After three days of culture in 5% CO₂ at 37 °C, the primary spheres were pooled together and passaged twice as follows. Spheres were collected in a 15 mL conical polystyrene tube and let settle for 10 min before supernatant removal. Spheres were washed once with DPBS and incubated with pre-warmed 1X TrypLE for 20 min at 37 °C. TrypLE was inactivated with equal volume 2X trypsin inhibitor solution (2mg/ml Ovomuroid, 0.4% BSA in DPBS) and spheres were then dissociated into single cells by triturating 40 times with a 1 mL pipette tip. Cells were centrifuged at 220xg for 10 min. The supernatant was removed and cells were washed once with medium. Cells were passed through a cell strainer and plated onto a new plate and cultured to form secondary spheres.

Three to four days later, secondary spheres were dissociated into single cells as described above. Dissociated cells were expanded in their respective medium using 1X adherent 25cm² PDL-coated flask for 4 days and passaged one more time in 3X 25cm² PDL-coated flasks.

Lentivirus production and cell infection

HEK 293T viral packaging line was maintained in DMEM media with High Glucose (Gibco, 11995-065) with 10% fetal bovine serum (FBS - GIBCO, 16000-044), and switched to NB media supplemented with B27, GlutaMAX and Penicilin/Streptomycin (without growth factors) after lentiviral vector transfection.

Lentivirus vectors were produced by co-transfection through a calcium phosphate protocol with a 3rd generation packaging system. We employed two packaging vectors that encode for necessary viral structure proteins (pMDLg/pRRE and RSV-REV), one envelope vector expressing VSV glycoprotein, and one vector plasmid containing the inserts of interest. After transfection, HEK 293T cells were switched to full NB media as described above. After 24 hours, supernatant was collected daily for 3-4 days, and filtered through a 0.22 µM filter before it was added to the target cells. The media added to the target cells was supplemented with the respective growth factors.

q-GRATIS analysis

q-GRATIS vectors were constructed by inserting unique DNA tags into lentiviral vectors. The plasmids were subsequently packaged into lentiviral particles. After infection and genomic integration of viral DNA sequence, the abundance of DNA tags linearly correlation with the number of cells. When two cell lines are

infected with two q-GRATIS vectors with two distinct tags, q-PCR can be used to quantitatively measure the relative abundance of these cell lines. To compare tumorigenicity in vivo, each cell line was infected with distinct tagged lentivirus and then mixed together. Genomic DNA of part of cell mixture is extracted and q-PCR for those tags is used to indicate the relative abundance of each cell line initially (I). The remaining cell mixture is used for grafting. After tumor formation, genomic DNA of the tumor mass is extracted and q-PCR for those tags is used to indicate the relative abundance of each cell line in the end (E). The E/I ratio reflects the difference in propagation rate of each cell line.

Quantitative real time PCR

qPCR was performed in an Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System for 40 cycles (denaturation: 95°C, 3 seconds; annealing: 60°C, 30 seconds), followed by a default Melting Curve program. PCR amplification was performed in KAPA SYBR FAST ABI Prism qPCR Kit (KAPA Biosystems, KK4605). For normalization of gene expression, beta-actin (ActB) and/or Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) control primers were used. Ct values were averaged for triplicate reactions and measured within the geometric amplification phase.

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted by TRI Reagent®. RNA samples were treated with DNase I (New England Biolabs Inc., cat. # M0303) and cDNA was synthesized using iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad, 170-8841). RNA concentration was measured on a NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) prior to cDNA synthesis. For normal human brain samples, total RNA

from human parietal cortex was purchased from Agilent Technologies (cat. # 540143), and reverse transcribed into cDNA.

DNA extraction

For brain tissue of grafted animals, DNA extraction was performed by Proteinase K (Ambion, reference # 25530-049) digestion. Tissue was incubated at 65°C for 24 hours. After this time, additional Proteinase K was added, and another 24-hour incubation period followed.

For qGRATIS analysis, cells were boiled in 50mM NaOH solution at 95°C for 30 minutes before neutralized by 200mM Tris-HCl at pH7.4. The supernatant from boiled crude tissue was directly used as the template for the qPCR assay.

MTT assay and Temozolomide treatment

48 hours after treatment, culture medium in the 96-well plate used for the drug assays was replaced by the methylthiazolyltetrazolium bromide (MTT) solution, and the plate was incubated at 37°C for 3 h. MTT solution was then aspirated and the formazan crystals formed were dissolved in DMSO. Absorbance was read at 570 nm and cell viability was expressed as the percentage of the control cells. For temozolomide treatment, we used concentrations on both sides of physiologic TMZ doses (25 uM to 400 uM), as TMZ concentrations can reach a peak plasma concentration of 14.6 mg/L, which corresponds to about 75 uM [3].

Immunofluorescence staining

Immunofluorescence staining was performed as previously described [1]. Primary antibodies used were: PDGFR alpha (R&D, catalog # AF1062), Olig2 (Millipore, catalog # AB9610), NT-3 (Peprotech, catalog # 450-03). Secondary

antibodies were from the Alexa Fluor® family, purchased from Invitrogen. When Edu (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, Invitrogen, cat. #10044) reaction was performed, it was added to cell culture media, and incubated for 2.5-3 hours. Cells for EdU staining were fixed with 4% PFA on coverslips for 15 min at the room temperature, then washed three times with PBS. Cells were permeabilized with PBS containing 0.1% tween20 for 10 min. Cells were then incubated with the reagent for the Click-it reaction for 30 min as recommended by the merchandizer. The Click-it reagents contain 100 mM Tris-HCl, pH 8.5; 1 mM CuSO₄; 1 uM Alexa Fluor® 647 azide (Invitrogen, cat. #A10277) and 100 mM L-Ascorbate. The reaction was stopped by washing cells with PBS twice.

Western blotting

Cells were lysated in cold lysis buffer 17 (R&D, 895943), supplemented with protease inhibitor cocktail tablets (Roche, 11836153001) and Halt Phosphatase Inhibitor (Thermo Scientific, 1862495). Total protein was adjusted according to concentration measured by Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, cat. # 23227). Protein samples were subjected to SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes.

Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. Antibodies used were: Sox10 (AbCam, cat. # 27655), Olig2 (Millipore, cat. # AB9610), PDGFR alpha (R&D, catalog # AF1062) and Nestin (Millipore, cat. # MAB353) Beta-Actin antibody (Sigma, cat. # A5441) was used as internal control. Secondary antibodies were purchased from Li-Cor® (IRDye 680RD Goat anti-Rabbit, cat. # 926-68071; IRDye 800CW Goat anti-Mouse, cat. # 926-32210). Detection was performed in an Odyssey Infrared Imaging System.

Tissue Microarray (TMA) analysis

Tumor samples were collected through surgical resections by the department of Neurosurgery, Xiangya Hospital in Changsha, China between 2004 and 2013. Only subjects with a primary diagnosis of glioma and no history of other tumors were included. Eight normal brain tissues were also obtained from trauma patients through surgical resections. Characteristics of patients with glioma whose tumors were used for TMA analysis are described in Supplementary Table 1. The tissue Committee and Research Ethics Board of Second Military Medical University approved this study. Immunohistochemistry staining of TMA tissue was performed as described [4]. The tissue Committee and Research Ethics Board of Second Military Medical University approved the protocol described in this study. Permission was obtained from patients with written informed consent. Immunohistochemistry staining of TMA tissue was performed using a streptavidin peroxidase method (avidin-biotin complex method) after antigen retrieval procedure.

Single cell profile analysis

Briefly, for each cell of the 5 tumors analyzed by Patel et al. [5], the mean expression value of all cell-cycle meta-signature genes was subtracted from the mean expression of all genes available on the dataset [5]. Cell-cycle meta-signature values were then normalized (-3 and 3) and positive values were considered as actively proliferating cells (high cell cycle meta-signature score). It is important to mention that data obtained from this method was similar to what Patel et al. found in their paper when compared to their supplementary table 2,

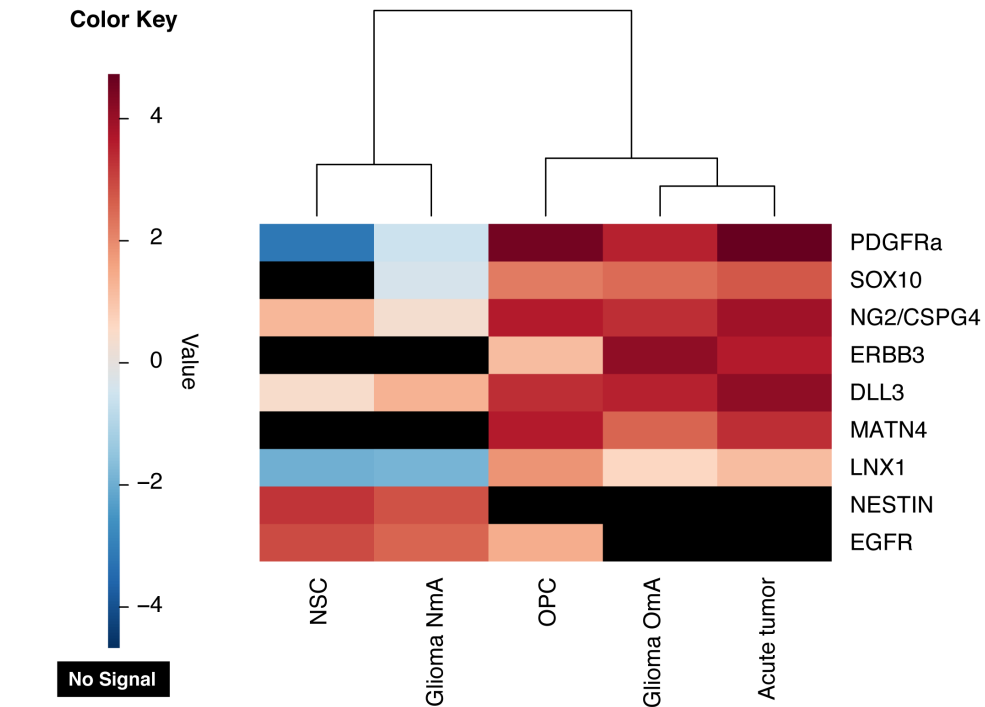
but not equal, as the list of genes provided in their figure 2B and used in this study probably does not comprehend the whole list of genes used in their study.

REFERENCES

1. Liu C, Sage JC, Miller MR *et al.* Mosaic Analysis with Double Markers Reveals Tumor Cell of Origin in Glioma. *Cell* 2011;146(2):209–21.
2. Cahoy JD, Emery B, Kaushal A *et al.* A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 2008;28(1):264–78.
3. Darkes MJM, Plosker GL, Jarvis B. Temozolomide. *Am J Cancer* 2002;1(1):55–80.
4. Robertson D, Savage K, Reis-Filho JS *et al.* Multiple immunofluorescence labelling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. *BMC Cell Biol* 2008;9(1):13.
5. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ *et al.* Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 2014;344(6190):1396–401.

SUPPLEMENTARY FIGURES AND LEGENDS

Supplementary Figure 1

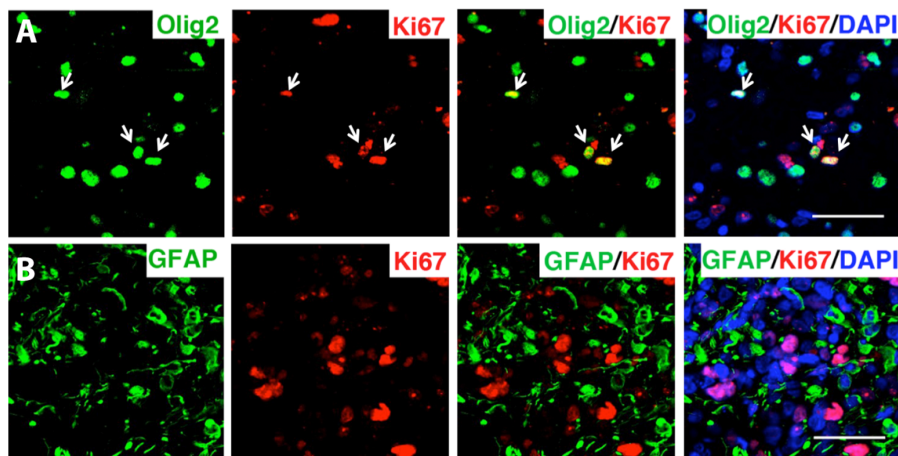


		Acute tumor	Glioma OmA	Glioma NmA	OPC	NSC
OPC markers	PDGFRa	4.7	3.5	-0.6	4.5	-3.2
	SOX10	2.7	2.4	-0.4	2.2	NO SIGNAL
	NG2/CSPG4	3.9	3.3	0.3	3.6	1.2
	ERBB3	3.6	4.1	NO SIGNAL	1.1	NO SIGNAL
	DLL3	4.1	3.5	1.3	3.3	0.4
	MATN4	3.3	2.5	NO SIGNAL	3.6	NO SIGNAL
	LNx1	1.1	0.6	-1.9	1.8	-2.1
NSC markers	NESTIN	NO SIGNAL	NO SIGNAL	2.8	NO SIGNAL	3.2
	EGFR	NO SIGNAL	NO SIGNAL	2.5	1.4	2.9

Supplementary Figure 1. Unsupervised hierarchical clustering analysis suggested that OPC media cultured tumor cells maintained gene expression patterns of the parental tumor, but the NSC media cultured

tumor cells did not. A single tumor was dissociated and analyzed by Agilent Microarray in all three conditions: acute tumor (not cultured), OPC media cultured and NSC media cultured. OPC-specific genes expressed by the acute tumor were maintained OPC media cultured tumor cells but were turned off/down in NSC media cultured tumor cells. In contrast, NSC-specific genes that were absent in the acute tumor and OPC media cultured tumor cells were elevated in NSC media cultured cells. OPC and NSC samples were also analyzed for comparison. Numbers represent log2 in comparison to normal brain sample.

Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2. Characterization of the primary GBMs used to establish the human glioma cell lines in Figure 6.

A and B. Immunofluorescent staining revealed that both Olig2 and GFAP+ cells existed in the primary tumor tissue, but most dividing cells are Olig2+ (arrows in A). Scale bars, 50 μ m.

Supplementary Table 1. Characteristics of patients with Glioma

Characteristics	Number of cases (%)
Gender	
Male	142 (60.2)
Female	94 (39.8)
Age (years)	
<60	190 (80.5)
≥60	46 (19.5)
Differentiation	
Grade 1	5
Grade 2	62 (26.3)
Grade 2 (oligodendroglioma)	27
Grade 3	51 (21.6)
Grade 3 (oligodendroglioma)	3
Grade 4	88 (37.3)

Conclusões sobre o Manuscrito II

- A informação sobre a célula de origem é de fundamental importância para o correto manejo *in vitro* de um dado tumor
- Quando cultivado de acordo com a sua biologia original, o tumor mantém as suas características mais próximas do que ocorre *in vivo*
- O cultivo de um tipo tumoral sem levar em consideração a sua origem pode levar a alterações morfológicas das células e na sua tumorigenicidade
- Principalmente, a utilização de condições de cultivo sem levar em consideração a célula de origem pode levar à identificação de alvos terapêuticos errôneos.

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO

RELEVÂNCIA DA IDENTIFICAÇÃO DA CÉLULA DE ORIGEM EM GLIOMAS

Em 2011, um trabalho publicado na revista *Cell* demonstrou que OPCs atuam como célula de origem em gliomas induzidos por meio de mutações nos genes p53 e NF1. Neste trabalho, o promotor inicialmente escolhido foi hGFAP, por ser expresso tanto em células-tronco neurais embrionárias quanto em células-tronco neurais adultas de camundongos, consideradas como as células de origem em gliomas até então (Liu et al., 2011). Trabalhos anteriores já haviam demonstrado que mutações e/ou inativações dos mesmos genes em NSCs levavam à formação deste tipo de tumor (Llaguno et al., 2009; Zhu et al., 2005). O diferencial da publicação de 2011 foi que, ao utilizar recombinação com dupla marcação pelo sistema MADM, os autores puderam comparar a proporção de células selvagens (vermelhas) em relação às células mutantes (verdes) juntamente com diferentes marcadores para tipos celulares específicos (NSCs, astrócitos, neurônios, oligodendrócitos e OPCs) por meio de imunohistoquímica. Assim, os autores puderam demonstrar que, mesmo que a mutação inicial seja induzida em NSCs, a população que sofre transformação e origina o glioma é principalmente composta de OPCs (Liu et al., 2011). Outros trabalhos também corroboram a hipótese de que OPCs atuem como célula de origem em gliomas (Galvao et al., 2014; Lei et al., 2011; Lindberg et al., 2009; 2014; Persson et al., 2010).

A identificação da célula de origem é importante para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no surgimento e na progressão tumoral, o que pode ajudar na identificação de alvos terapêuticos para um dado tumor. A identidade da célula de origem pode também auxiliar na prevenção ou na identificação do tumor ainda em estágio inicial (Visvader, 2011). O principal legado do trabalho de Liu e colaboradores talvez seja a clareza na diferenciação entre os conceitos de célula de mutação (neste caso, NSCs) e célula de origem (as OPCs) (Liu et al., 2011). A elucidação da célula de origem pode auxiliar na compreensão da fisiologia do tumor como um

todo, e na identificação de marcadores específicos para a população responsável pelo início da patologia. A origem de um neoplasma não é necessariamente relacionada ao seu componente celular mais comum (Sanai & Alvarez-Buylla, 2005), portanto a identificação da célula de origem é importante para que se identifiquem os fatores de crescimento e as condições ideais para o cultivo *in vitro* desta população específica, etapa fundamental para o estudo e compreensão da biologia do tumor.

GBMs HUMANOS APRESENTAM CARACTERÍSTICAS DE OPCs

Dentre as classificações de gliomas já propostas, a classificação com base na expressão gênica, realizada pelo TCGA, tem sido a mais aceita. Ela divide gliomas em quatro subtipos: Neural, Clássico, Mesenquimal e Proneural (Verhaak et al., 2010). Dentre estes, o subtipo Proneural tem sido um dos mais estudados, e há indícios de que seja originado a partir de progenitores gliais (Lei et al., 2011; Ozawa et al., 2014). Além disso, de acordo com Verhaak e colaboradores, o subtipo Proneural corresponderia à aproximadamente 25% dos gliomas. Trabalhos que demonstram que OPCs podem atuar como célula de origem de gliomas já foram discutidos aqui; além destes, há trabalhos que mostram que outros subtipos de gliomas poderiam ser derivados a partir do subtipo Proneural (Bhat et al., 2011; 2013; Ozawa et al., 2014). Em um trabalho de 2014 no qual foi realizado o sequenciamento de células únicas de 5 gliomas distintos, células que se encaixavam em um perfil Proneural foram encontradas em todos os tumores analisados, independentemente do subtipo em que o tumor como um todo havia sido classificado (Patel et al., 2014).

Ao pensarmos sobre a heterogeneidade vista entre gliomas, principalmente entre tumores de grau IV (GBM), resolvemos analisar gliomas humanos em relação ao seu grau de “OPCidade”. Utilizando técnicas de bioinformática e dados de microarranjo disponíveis na literatura, criamos uma meta-assinatura própria de OPCs humanas, que também pode ser aplicada a OPCs murinas (Manuscrito I).

Ao aplicarmos a meta-assinatura de OPCs em dados populacionais das amostras do TCGA (529 amostras) (Verhaak et al., 2010), pudemos observar que esta assinatura é bastante forte em quase todos os tumores. A mesma meta-assinatura, quando aplicada a dados de células únicas (Patel et al., 2014), é mais correlacionada ao tumor classificado como Proneural, apesar de estar presente em praticamente todos os tumores em diferentes graus, sendo menos frequente dentre células do tumor classificado como Mesenquimal, o que é intrigante, visto que este subtipo específico já foi descrito como derivado a partir de tumores do subtipo Proneural {Bhat:2013hk, Bhat:2011jq}. Além disso, este achado vai contra o que observamos em dados populacionais. Neste caso específico, dentre os genes utilizados na meta-assinatura de OPCs (50 genes), apenas 17 foram encontrados nas análises feitas por Patel e colaboradores, o que poderia explicar esta diferença.

GBMs HUMANOS SÃO MAIS SIMILARES A OPCs DO QUE A ASTRÓCITOS OU A NEURÔNIOS

Ao analisarmos a similaridade de GBMs humanos com OPCs, tentamos criar uma meta-assinatura de NSCs para fins comparativos. Entretanto, trabalhos com NSCs não as purificam com base em marcadores específicos, sendo estas células geralmente isoladas a partir de cérebros embrionários inteiros que, após dissociados, são cultivados em meio próprio de NSCs (com EGF e FGF-2 como fatores suplementados). Desta forma, células que formam esferas, ou neuro-esferas, são consideradas NSCs e utilizadas para experimentos como microarranjo. Ao tentarmos utilizar estes dados para produzir uma meta-assinatura de NSCs não houve especificidade com nenhum tipo celular, estando a assinatura presente em praticamente todas as células do cérebro. Isso pode ter acontecido por que o método de purificação das células não é eficiente, ou ainda porque as NSCs, devido a sua plasticidade, podem apresentar genes em comum com todos os outros tipos celulares. Desta forma, optamos por criar meta-assinaturas de tipos celulares derivados de NSCs, como astrócitos, neurônios e OPCs, com

base nos genes mais expressos por cada tipo celular de acordo com dados de Zhang e colaboradores (Zhang et al., 2014). Ao plotarmos em um mesmo gráfico diversas amostras de biópsias de GBMs, tanto humanas quanto murinas, juntamente com dados de OPCs, neurônios e astrócitos, vemos que há uma maior proximidade entre GBMs humanos e OPCs, o que não acontece com astrócitos, que foram historicamente considerados como a célula de origem em gliomas (Bachoo et al., 2002; Dufour et al., 2009).

OPCs TUMORAIS PODEM SER CONSIDERADAS COMO CSCs

A descoberta de uma população de CSCs em gliomas fez com que estas células se tornassem o principal foco de estudos dentre a população tumoral heterogênea, pois, apesar de constituírem uma minoria de células tumorais, elas seriam as responsáveis pela resistência a tratamentos e relapso. Como as CSCs também são capazes de auto-renovação e diferenciação em outros tipos celulares do cérebro, imaginou-se que seriam originadas a partir de NSCs (Flores et al., 2009; Singh et al., 2003; 2004). Para que se pudesse estudar especificamente esta população, enriquecendo-a *in vitro*, passou-se a manter as células de gliomas em meio próprio de NSCs no qual os fatores de crescimento suplementados são EGF e FGF-2, visto que o soro fetal bovino, padrão para o cultivo até então, pode fazer com que as células se distanciem das células parentais, ficando mais diferenciadas e até mesmo reduzindo seu potencial tumorigênico (Lee et al., 2006; Suvà et al., 2014). Em meio de NSCs, as células de glioma formam aglomerados/esferas, se auto-renovam e são capazes de se diferenciar em outros tipos celulares, além de manterem a tumorigenicidade, preenchendo os requisitos para que sejam consideradas CSCs (Hemmati et al., 2003; Singh et al., 2004; Son, Woolard, Nam, Lee, & Fine, 2009; Yuan et al., 2004). Portanto, a escolha do meio próprio de NSCs fazia sentido à luz da hipótese em voga.

Neste trabalho (Manuscrito II), partindo-se do princípio que OPCs são as células de origem em gliomas, purificamos as OPCs tumorais de um modelo animal em que o tumor é induzido por p53 e NF1 (camundongos MADM, hGFAP-Cre, P53KO e NF1 flox, ou ainda MADM, NG2-Cre, p53KO, NF1 null) (Liu et al., 2011). As células foram isoladas com base na expressão

do receptor PDGFRA (também conhecido como CD140a), marcador clássico de OPCs, pelo processo de *immunopanning* (Chan et al., 2004; Liu et al., 2011). Ao cultivá-las, observamos que as OPCs tumorais também são capazes de formar esferas, manter a auto-renovação, se diferenciar em outros tipos celulares do cérebro e gerar tumores quando injetadas em animais, podendo, portanto, ser consideradas como CSCs. É interessante ressaltar que, em análise transcriptômica, as células tumorais do modelo utilizado apresentam expressão gênica muito próxima de OPCs selvagens, apesar de alguns genes considerados marcadores de NSCs também estarem presentes. As OPCs tumorais geram esferas tanto em meio próprio de OPCs (Raff, Lillien, Richardson, & Burne, 1988; Richardson, Pringle, Mosley, & Westermarck, 1988) quanto em meio de NSCs, podendo ser passadas, enquanto as NSCs selvagens só geram esferas em meio de NSCs, e as OPCs selvagens geram esferas em ambos os meios, mas com baixa eficiência, sendo que estas não podem ser passadas, indicando que não apresentariam potencial de auto-renovação. Assim, as OPCs tumorais apresentam características híbridas entre OPCs e NSCs.

Apesar de célula de mutação e célula de origem serem conceitos distintos, a célula na qual a mutação foi originada pode acabar atuando como a célula que se transforma e inicia o tumor. Da mesma forma, a célula-tronco tumoral constitui uma pequena parcela da população tumoral, capaz de auto-renovação e manutenção do tumor como um todo (ver Figura 6 da introdução), e geralmente é distinta da célula de origem. Entretanto a célula de origem também pode atuar como CSC, o que parece estar acontecendo no modelo utilizado neste trabalho.

OPCs TUMORAIS RETÊM AS CARACTERÍSTICAS DO TUMOR QUANDO MANTIDAS EM MEIO DE OPCs, MAS TAMBÉM SE ADAPTAM AO MEIO DE NSCs

Quando as OPCs tumorais são mantidas em meio próprio de OPCs, onde PDGF-AA é o fator de crescimento adicionado, as células mantêm algumas das características típicas de OPCs selvagens, como a morfologia

estrelada e a expressão dos marcadores PDGFRA, Olig2 e Sox10. O tumor cru (não purificado por meio de *immunopanning*) também apresenta altos níveis de expressão destes marcadores. Quando as mesmas células são mantidas em meio de NSCs, elas apresentam uma taxa de proliferação significativamente maior do que as células em meio de OPCs, e sofrem alterações morfológicas graduais de acordo com o tempo de exposição ao meio, além de apresentarem redução na expressão de marcadores de OPCs. Há ainda uma maior expressão de Nestina, EGFR e Prominina-1 (CD133) em células mantidas em meio de NSCs. Isso parece indicar que a condição de cultivo em meio próprio para OPCs seja mais favorável do que o cultivo em meio de NSCs, e até mesmo o fato de as células apresentarem crescimento mais lento condiz melhor com o cenário *in vivo*.

Quando olhamos para os níveis de expressão do mRNA durante a adaptação das células ao meio de NSCs, logo após o processo de *immunopanning*, há redução em marcadores de OPCs e aumento na expressão de marcadores de CSC/NSCs após apenas uma passagem, e que se mantêm ao longo do tempo, mesmo que as alterações na expressão de proteínas só sejam observadas mais tarde, ao redor da quarta passagem. Somadas a estes dados as observações de que as alterações morfológicas são graduais, nos leva a crer que estas mudanças sejam devido a um processo de adaptação, e não de seleção. Se estivéssemos observando um evento de seleção de uma minoria de células dentre as OPCs tumorais purificadas, esperaríamos altas taxas de morte celular logo após a adição de meio de NSCs, o que não foi observado. Além disso, uma pequena parcela da população deveria apresentar a morfologia que observamos após diversas passagens em meio de NSCs, o que não parece ser verdade, visto que ocorre perda de processos celulares e aumento do corpo celular de forma lenta e gradual ao longo do tempo em cultura.

Após acostumadas ao meio de OPCs, as OPCs tumorais podem ser colocadas em meio de NSCs sem alterações visíveis após 48 horas. Quando, no entanto, fazemos o contrário, colocando as células adaptadas ao meio de NSCs em meio de OPCs, cerca de 60% das células se soltam e morrem. Isso indica que as células mantidas em meio de OPCs apresentam uma maior

plasticidade e capacidade de adaptação, sendo que em meio de NSCs as células parecem ficar viciadas aos fatores de crescimento do meio (EGF/FGF-2), morrendo em sua ausência. Os 40% de células que sobrevivem após estas 48 horas em meio de OPCs provavelmente possuem mais características tipo-OPC, ou maior plasticidade e/ou resistência. Fica em aberto a questão de se estas células retomariam o fenótipo e a expressão gênica das OPCs tumorais *in vitro* com o passar do tempo em meio de OPCs, questão que pode ser parcialmente respondida pelo experimento *in vivo* (ver adiante). Caso o meio de NSCs estivesse promovendo algum tipo de seleção de células tronco tumorais, ou até mesmo algum processo de desdiferenciação, esperaríamos justamente o contrário, que quando houvesse troca de meio para meio de OPCs, as células, que deveriam portanto ser mais “maleáveis”, se adaptassem/diferenciassem rapidamente.

OPCs TUMORAIS APRESENTAM TUMORIGENICIDADE REDUZIDA QUANDO MANTIDAS EM MEIO DE NSCs

Apesar das diferenças morfológicas e na expressão de marcadores entre as OPCs tumorais crescidas em meio de OPCs e em meio de NSCs, a relevância deste achado seria de mínima importância se não houvesse alteração no potencial tumorigênico nas duas condições, pois indicaria que a população tronco-tumoral estaria preservada nas duas situações, podendo prontamente recapitular o tumor. Entretanto, apesar de o meio de NSCs ser tratado como favorável para a manutenção de CSCs, observamos que a formação de tumor foi cerca de 40 vezes maior quando injetamos células mantidas em meio de OPCs, em comparação com células mantidas em meio de NSCs. Apesar da diferença em tamanho, houve formação de tumor nas células crescidas em meio de NSCs, e ao examinarmos os cortes histológicos pudemos observar que a população ativamente proliferativa apresentava os marcadores de OPCs PDGFRA e Olig2. Isso indica que, mesmo que a população pareça morfológicamente homogênea em meio de NSCs, há um percentual de células capaz de manter as características de OPCs, ou de recapitulá-las. As células que mantiveram o potencial tumorigênico são

possivelmente representativas dos 40% de células que sobreviveram quando trocamos o meio de NSCs, ao qual as células já estavam acostumadas, por meio de OPCs, mesmo que não possamos correlacionar o percentual de células vivas *in vitro* após 48 horas com as células que originaram o tumor *in vivo*. Neste caso provavelmente o mecanismo evolutivo tumoral responsável pela sobrevivência de uma minoria de células tenha sido a seleção.

MEIO DE NSCs LEVA A SELEÇÃO DE FALSOS ALVOS TERAPÊUTICOS

Observamos que dentre os genes que passam a ser expressos nas OPCs tumorais quanto cultivadas em meio de NSCs está o receptor de EGF. EGFR atua em processos como proliferação celular, sobrevivência e diferenciação, e encontra-se frequentemente ativado de forma anômala em diversos tumores, sendo um potencial candidato como alvo terapêutico (Mellinghoff, Schultz, Mischel, & Cloughesy, 2011; Yewale, Baradia, Vhora, Patil, & Misra, 2013). Em gliomas, alterações em EGFR estão entre as alterações oncogênicas mais comuns, descritas em cerca de 45% dos tumores, sendo que há superexpressão em cerca de 60% dos GBMs. Apesar disso, a eficácia de inibidores de EGFR no tratamento de gliomas em *trials* clínicos é desanimadora (Hegi et al., 2011). As OPCs tumorais purificadas de nosso modelo animal, quando cultivadas em meio de OPCs, não apresentam expressão de EGFR. Entretanto, quando as mesmas células são cultivadas em meio de NSCs, EGFR não só está presente como encontra-se fosforilado, o que indica que esteja ativo. A presença de EGFR nas OPCs tumorais parece ser um artefato de cultura, e por isso testamos a resposta das mesmas células tumorais acostumadas por mais de 10 passagens em meio próprio de OPCs ou em meio próprio de NSCs a diferentes inibidores deste receptor tirosina-quinase. Um problema com inibidores de receptores tirosina-quinase é que muitas vezes estas drogas atuam sobre mais de um receptor, por isso escolhemos AG-1478, que é altamente específico e supostamente não exerce nenhum efeito sobre PDGFR (<http://www.selleckchem.com>). Além deste, utilizamos Gefitinib, que atua inibindo todos os sítios de fosforilação de tirosina (<http://www.selleckchem.com>). Como era esperado,

as linhagens acostumadas a meio de NSCs (Glioma^{NmA}) responderam aos dois inibidores de maneira dose-específica, enquanto as células acostumadas a meio de OPCs (Glioma^{OmA}) foram insensíveis às drogas. Os mesmos resultados foram validados com sequências de shRNA para silenciamento de EGFR, visto que os inibidores farmacológicos podem deixar dúvidas a respeito da especificidade. Nossos resultados nos fazem questionar os dados da literatura produzidos em meio de NSCs. Em um trabalho de um grupo italiano, por exemplo, foram utilizadas 7 biópsias de gliomas humanos, todas crescidas em meio no qual EGF/FGF-2 eram os fatores de crescimento utilizados, e dentre estas, 5 responderam aos inibidores de EGFR Erlotinib e Gefitinib *in vitro* (Griffero et al., 2009). Seriam estes dados fidedignos ao tumor parental, ou apenas um artefato devido ao meio de cultura utilizado, como observamos?

Da mesma forma que EGFR foi escolhido como alvo para as células crescidas em meio de NSCs, produzindo resultados falso-positivos, buscamos um alvo legítimo para atuar sobre a população de OPCs tumorais originais. Um dos alvos cogitados foi PDGFR, presente nas OPCs tumorais em meio de OPCs e praticamente ausente nas células cultivadas em meio de NSCs. Dentre seus inibidores farmacológicos, o mais utilizado é Imatinib, comercializado como Gleevec (Druker et al., 1996). Porém, este inibidor não é específico, pois inibe, além de PDGFR, v-Abl e c-Kit. Foram produzidas então 3 sequências diferentes de silenciamento (shRNA) contra PDGFR, mas nenhuma atuou significativamente na redução da proliferação *in vitro*, apesar de que parecem funcionar *in vivo* (comunicação pessoal - Chong Liu). Outro candidato que parece ser importante para a proliferação das OPCs tumorais *in vivo* é o receptor IGF1R (*Insulin-like Growth Fator 1 Receptor*) (artigo a ser submetido por Chong Liu), expresso tanto nas células de Glioma^{OmA} quanto nas de Glioma^{NmA}. Novamente o inibidor farmacológico disponível não é específico, então optamos por um ensaio de shRNA, o qual atua significativamente sobre a população Glioma^{OmA}, mas não afeta a população Glioma^{NmA}.

Ainda hoje, ensaios de drogas e opções terapêuticas passam, obrigatoriamente, por uma etapa *in vitro* (Ocana, Pandiella, Siu, & Tannock,

2010), e o estabelecimento de condições de cultivo voltadas para a célula de origem pode favorecer a identificação de mecanismos de resistência, colaborando para o surgimento de drogas mais eficazes. O meio de cultura poderia estar por trás da baixa eficácia terapêutica em gliomas, visto que observamos que células cultivadas em meio não-autêntico respondem a drogas às quais a população original não responderia (manuscrito II). Neste caso, uma droga selecionada em um ensaio de *high throughput drug screening* possivelmente não apresentaria o mesmo efeito na clínica. O conhecimento a respeito da célula de origem é proveitoso não apenas para o estudo e pesquisa de gliomas, mas possivelmente para todos os tipos tumorais.

GLIOMAS HUMANOS SE COMPORTAM DE MANEIRA SIMILAR ÀS OPCs TUMORAIS CRESCIDAS NAS MESMAS CONDIÇÕES

O modelo animal que utilizamos na maioria do nosso trabalho forma gliomas com características moleculares similares ao subtipo Proneural (Liu et al., 2011; Verhaak et al., 2010). Modelos animais permitem a geração de mutações específicas em loci determinados. Apesar disso, pode-se argumentar que modelos são geralmente criados com base em apenas uma ou poucas alterações genéticas, o que pode não corresponder a complexidade da doença em humanos. O fenótipo de determinadas alterações genéticas em camundongos pode ainda ser diferente da doença humana homóloga (Strachan & Read, 2004). Nossos dados obtidos com o modelo MADM em camundongos se baseiam em apenas um tipo de célula de origem, mas se sabe que gliomas humanos apresentam populações heterogêneas, e possibilidade de origens distintas (Patel et al., 2014; Sottoriva et al., 2013). Assim, buscamos validar os nossos resultados também em biópsias de gliomas humanos. Após a dissociação do tumor, as células foram colocadas em meio de NSCs e em meio de OPCs. As culturas primárias foram ainda mantidas em meio com FBS, considerado mais “genérico” em termos de composição de fatores de crescimento, caso não conseguíssemos cultivar as células nos meios mais restritos. Apesar destes

cuidados, de sete biópsias recebidas apenas duas cresceram por mais de 3 passagens *in vitro*, e todas as células que cresceram em um meio cresceram também nos outros, para nossa surpresa. O sucesso do cultivo de gliomas humanos descrito na literatura é de cerca de 50% (Galli et al., 2004; Günther et al., 2007), e nosso baixo percentual ($\cong 30\%$) pode estar relacionado ao pequeno número total de biópsias recebidas. Dentre os gliomas que puderam ser cultivados, as células que foram mantidas em meio de OPCs apresentam expressão de PDGFRA e Olig2, sendo que estes marcadores não estão presentes nas células mantidas em meio de NSCs ou em FBS. Culturas primárias humanas mantidas em meio de NSCs também proliferam mais do que as mantidas em meio de OPCs, assim como observado em células murinas.

Para avaliar a tumorigenicidade dos tumores cultivados após estarem acostumados ao meio de cultivo, injetamos Glioma^{NmA} e Glioma^{OmA} no cérebro de camundongos NOD-SCID, e observamos que as células mantidas em meio de NSCs se tornam menos tumorigênicas do que as células que foram mantidas em meio de OPCs, apesar de esta diferença não ter sido tão acentuada quando nas células de camundongos (cerca de 3 vezes menos). Gunther e colaboradores cultivaram 9 biópsias de gliomas em condições próprias para NSCs, originando 2 clusters distintos, sendo um deles tumorigênico *in vivo*, enquanto o outro apresentou tumorigenicidade reduzida. Além disso, os clusters apresentavam diferentes níveis de expressão de marcadores (Günther et al., 2007). Esta diferença em tumorigenicidade e expressão poderia ser atribuída ao meio de cultura utilizado? Seriam estes tumores originados a partir de diferentes células de origem? Estas questões permanecem inconclusivas.

Células humanas mantidas em meio de NSCs também respondem significativamente melhor do que células de Glioma^{OmA} ao tratamento com o inibidor de EGFR Gefitinib. O tratamento padrão para pacientes diagnosticados com glioma, entretanto, é feito com Temozolomida {Stupp:2005kc}, e as células mantidas em meio de NSCs respondem melhor à droga. Estes dados são particularmente preocupantes quando consideramos que ensaios de descoberta de drogas (*drug discovery*) para

gliomas tem sido realizados em meio de NSCs (Griffero et al., 2009; Pollard et al., 2009; Visnyei et al., 2011). Um trabalho anterior chegou inclusive a argumentar que Temozolomida fosse capaz de matar seletivamente a população tronco tumoral em gliomas crescidos em meio enriquecido com EGF e FGF-2 (Beier et al., 2008). Em um glioma humano sabidamente heterogêneo, portanto, a utilização de meios que considerem mais de uma população de origem pode propiciar resultados *in vitro* complementares, buscando o desenvolvimento de drogas eficazes nas duas condições, ou que sejam mais eficazes para uma ou outra condição e possam vir a ser combinadas como forma de otimizar os tratamentos.

Para investigar a importância das OPCs em gliomas humanos como um todo, realizamos análises de imunofluorescência em lâminas com amostras de pacientes de classificações distintas (GBM, oligodendroglioma e astrocitoma, por exemplo), co-detectando o marcador de proliferação Ki67 com o marcador de OPCs Olig2 ou com o marcador de astrócitos/NSCs GFAP. Cerca de 60% das células proliferativamente ativas em nossas amostras são também Olig2 positivas, enquanto apenas cerca de 10% das células proliferativamente ativas são simultaneamente GFAP positivas, indicando que OPCs sejam a principal população proliferativa nestes tumores. Em nossos experimentos com OPCs tumorais murinas utilizamos principalmente PDGFRA como marcador de OPCs, mas sua marcação não pode ser realizada nas lâminas de gliomas humanos, pois estes tecidos são conservados em parafina, como é de praxe para espécies patológicas humanas, e o receptor PDGFRA, por estar localizado na membrana plasmática, acaba frequentemente danificado no processo de fixação e desidratação das amostras. Para contornar este problema, analisamos dados de sequenciamento de células únicas disponibilizados online na plataforma GEO (número de acesso GSE57872) por Patel e colaboradores (Patel et al., 2014), e correlacionamos a meta-assinatura positiva para ciclo celular (correspondente à marcação de Ki67), com a expressão de PDGFRA ou GFAP em 5 tumores distintos. A maioria das células positivas para ciclo celular é também positiva para expressão de PDGFRA, mas poucas células são positivas para GFAP.

O conjunto dos nossos dados indicam que as OPCs parecem ter um papel muito importante não apenas em gliomas murinos, mas também em gliomas humanos, e que o meio de cultivo pode afetar a tumorigenicidade e também a resposta a drogas em culturas primárias humanas.

CONCLUSÕES

- OPCs parecem ser mais similares a gliomas do que células com características astrocíticas ou neuronais.
- Meio de cultivo que não leve em consideração a célula de origem de um tumor pode levar a alterações na tumorigenicidade .
- Meio de cultivo que não leve em consideração a célula de origem pode levar a identificação de falsos alvos terapêuticos.
- A maioria das células proliferativamente ativas (Ki67+) em gliomas, expressam marcadores de OPCs.
- Gliomas murinos e humanos parecem se comportar da mesma maneira em meio de NSCs, apesar de a origem em humanos ser mais difícil de ser identificada.

PERSPECTIVAS GERADAS PELO TRABALHO

- Obter um maior número de biópsias para estabelecer culturas primárias de gliomas humanos e avaliar a sua viabilidade em meio de NSCs, OPCs e meio com FBS em diferentes concentrações.
- Avaliar o subtipo de cada tumor de acordo com os marcadores descritos pelo TCGA (Verhaak et al., 2010) e relacionar com o sucesso de cultivo em cada tipo de meio, de forma a tentar estabelecer uma ligação entre subtipo tumoral – condição de cultivo.
- Tratar culturas primárias em diferentes meios com drogas já utilizadas no tratamento de pacientes diagnosticados com GBM, selecionando os melhores resultados em cada meio para possíveis combinações.
- Injetar as culturas primárias das biópsias no cérebro de camundongos NOD-SCID, e tratá-los com as drogas escolhidas como candidatas em cada condição *in vitro*, correlacionando os resultados *in vitro* e *in vivo*.
- Expandir o conceito e consequentemente a utilização de meio de cultivo autêntico com base no conhecimento da célula de origem para outros tipos tumorais

REFERÊNCIAS

- Alcantara Llaguno, S., Chen, J., Kwon, C.-H., Jackson, E. L., Li, Y., Burns, D. K., et al. (2009). Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell*, *15*(1), 45–56. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.12.006>
- Bachoo, R. M., Maher, E. A., Ligon, K. L., Sharpless, N. E., Chan, S. S., You, M. J., et al. (2002). Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell*, *1*(3), 269–277.
- Beier, D., Röhrli, S., Pillai, D. R., Schwarz, S., Kunz-Schughart, L. A., Leukel, P., et al. (2008). Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Research*, *68*(14), 5706–5715. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6878>
- Bhat, K. P. L., Balasubramaniyan, V., Vaillant, B., Ezhilarasan, R., Hummelink, K., Hollingsworth, F., et al. (2013). Mesenchymal Differentiation Mediated by NF- κ B Promotes Radiation Resistance in Glioblastoma. *Cancer Cell*, *24*(3), 331–346. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.001>
- Bhat, K. P. L., Salazar, K. L., Balasubramaniyan, V., Wani, K., Heathcock, L., Hollingsworth, F., et al. (2011). The transcriptional coactivator TAZ regulates mesenchymal differentiation in malignant glioma. *Genes & Development*, *25*(24), 2594–2609. <http://doi.org/10.1101/gad.176800.111>
- Blanpain, C. (2013). Tracing the cellular origin of cancer, 1–9. <http://doi.org/10.1038/ncb2657>
- Brescia, P., Richichi, C., & Pelicci, G. (2012). Current Strategies for Identification of Glioma Stem Cells: Adequate or Unsatisfactory? *Journal of Oncology*, *2012*(7), 1–10. <http://doi.org/10.1155/2012/376894>
- Buckingham, M. E., & Meilhac, S. M. (2011). Tracing Cells for Tracking Cell Lineage and Clonal Behavior. *Developmental Cell*, *21*(3), 394–409. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.019>
- Cayre, M., Canoll, P., & Goldman, J. E. (2009). Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Progress in Neurobiology*, *88*(1), 41–63. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.02.001>
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, *263*(5148), 802–805.
- Chan, J. R., Watkins, T. A., Cosgaya, J. M., Zhang, C., Chen, L., Reichardt, L. F., et al. (2004). NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes. *Neuron*, *43*(2), 183–191. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.024>
- Chen, J., McKay, R. M., & Parada, L. F. (2012). Malignant Glioma: Lessons from Genomics, Mouse Models, and Stem Cells. *Cell*, *149*(1), 36–47. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.009>
- Chua, P., & Jinks-Robertson, S. (1991). Segregation of recombinant chromatids following mitotic crossing over in yeast. *Genetics*.

- Conti, L., & Cattaneo, E. (2010). Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *Nature Reviews Neuroscience*. <http://doi.org/10.1038/nrn2761>
- Diamandis, P., Wildenhain, J., Clarke, I. D., Sacher, A. G., Graham, J., Bellows, D. S., et al. (2007). Chemical genetics reveals a complex functional ground state of neural stem cells. *Nature Chemical Biology*, 3(5), 268–273. <http://doi.org/10.1038/nchembio873>
- Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., et al. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature Medicine*, 2(5), 561–566.
- Dufour, C., Cadusseau, J., Varlet, P., Surena, A. L., de Faria, G. P., Dias Morais, A., et al. (2009). Astrocytes Reverted to a Neural Progenitor-like State with Transforming Growth Factor Alpha Are Sensitized to Cancerous Transformation. *Stem Cells*, 27(10), 2373–2382. <http://doi.org/10.1002/stem.155>
- Feil, S., Valtcheva, N., & Feil, R. (2009). Inducible Cre mice. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 530(Chapter 18), 343–363. http://doi.org/10.1007/978-1-59745-471-1_18
- Filippi-Chiela, E. C., Thom, M. P., Silva, M. M. B. E., Pelegrini, A. L. Z., Ledur, P. F., Garicochea, B., et al. (2013). Resveratrol abrogates the Temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the Temozolomide-induced senescence in glioma cells. *BMC Cancer*, 13(1), 1–1. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-13-147>
- Flores, D. G., Ledur, P. F., Abujamra, A. L., Brunetto, A. L., Schwartzmann, G., Lenz, G., & Roesler, R. (2009). Cancer stem cells and the biology of brain tumors. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 4(4), 306–313.
- Friedmann-Morvinski, D., Bushong, E. A., Ke, E., Soda, Y., Marumoto, T., Singer, O., et al. (2012). Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science*, 338(6110), 1080–1084. <http://doi.org/10.1126/science.1226929>
- Gal, H., Makovitzki, A., Amariglio, N., Rechavi, G., Ram, Z., & Givol, D. (2007). A rapid assay for drug sensitivity of glioblastoma stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(3), 908–913. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.020>
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., et al. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Research*, 64(19), 7011–7021. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1364>
- Galvao, R. P., Kasina, A., McNeill, R. S., Harbin, J. E., Foreman, O., Verhaak, R. G. W., et al. (2014). Transformation of quiescent adult oligodendrocyte precursor cells into malignant glioma through a multistep reactivation process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(40), E4214–23. <http://doi.org/10.1073/pnas.1414389111>
- Gibson, P., Tong, Y., Robinson, G., Thompson, M. C., Currle, D. S., Eden, C., et al. (2010). Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature*, 468(7327), 1095–1099. <http://doi.org/10.1038/nature09587>
- Ginhoux, F. (2013). Origin and differentiation of microglia, 1–14.

- <http://doi.org/10.3389/fncel.2013.00045/abstract>
- Griffero, F., Daga, A., Marubbi, D., Capra, M. C., Melotti, A., Pattarozzi, A., et al. (2009). Different response of human glioma tumor-initiating cells to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 284(11), 7138–7148. <http://doi.org/10.1074/jbc.M807111200>
- Günther, H. S., Schmidt, N. O., Phillips, H. S., Kemming, D., Kharbanda, S., Soriano, R., et al. (2007). Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene*, 27(20), 2897–2909. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1210949>
- Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Bady, P., Kamoshima, Y., Kouwenhoven, M. C. M., Delorenzi, M., et al. (2011). Pathway analysis of glioblastoma tissue after preoperative treatment with the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib--a phase II trial. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(6), 1102–1112. <http://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0048>
- Hemmati, H. D., Nakano, I., Lazareff, J. A., Masterman-Smith, M., Geschwind, D. H., Bronner-Fraser, M., & Kornblum, H. I. (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), 15178–15183. <http://doi.org/10.1073/pnas.2036535100>
- Hoshino, T., Barker, M., & Wilson, C. B. (1975). The kinetics of cultured human glioma cells. *Acta Neuropathologica*, 32(3), 235–244. <http://doi.org/10.1007/BF00696572>
- Hughes, E. G., Kang, S. H., Fukaya, M., & Bergles, D. E. (2013). Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nature Publishing Group*, 16(6), 668–676. <http://doi.org/10.1038/nn.3390>
- Huse, J. T., Phillips, H. S., & Brennan, C. W. (2011). Molecular subclassification of diffuse gliomas: Seeing order in the chaos. *Glia*, 59(8), 1190–1199. <http://doi.org/10.1002/glia.21165>
- Jayme, D., Watanabe, T., & Shimada, T. (1997). Basal medium development for serum-free culture: a historical perspective. *Cytotechnology*, 23(1-3), 95–101. <http://doi.org/10.1023/A:1007967602484>
- Kanda, T., Sullivan, K. F., & Wahl, G. M. (1998). Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Current Biology : CB*, 8(7), 377–385.
- KERSTING, G., & LENNARTZ, H. (1957). TISSUE CULTURING OF BRAIN TUMOURS. DEUTSCHE ...
- Kondo, T., Setoguchi, T., & Taga, T. (2004). Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(3), 781–786. <http://doi.org/10.1073/pnas.0307618100>
- Kretschmar, K., & Watt, F. M. (2012). Lineage Tracing. *Cell*, 148(1-2), 33–45. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.002>
- Ledur, P. F., Villodre, E. S., Paulus, R., Cruz, L. A., Flores, D. G., & Lenz, G. (2012). Extracellular ATP reduces tumor sphere growth and cancer stem cell population in glioblastoma cells. *Purinergic Signalling*, 8(1), 39–48. <http://doi.org/10.1007/s11302-011-9252-9>

- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N. M., 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. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.030>
- Lei, L., Sonabend, A. M., Guarnieri, P., Soderquist, C., Ludwig, T., Rosenfeld, S., et al. (2011). Glioblastoma Models Reveal the Connection between Adult Glial Progenitors and the Proneural Phenotype. *PLoS ONE*, 6(5), e20041. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0020041>
- Ligon, K. L., Huillard, E., Mehta, S., Kesari, S., Liu, H., Alberta, J. A., et al. (2007). Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron*, 53(4), 503–517. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.009>
- Lim, D. A., & Alvarez-Buylla, A. (2014). Adult neural stem cells stake their ground. *Trends in Neurosciences*, 37(10), 563–571. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2014.08.006>
- Lindberg, N., Jiang, Y., Xie, Y., Bolouri, H., Kastemar, M., Olofsson, T., et al. (2014). Oncogenic signaling is dominant to cell of origin and dictates astrocytic or oligodendroglial tumor development from oligodendrocyte precursor cells. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(44), 14644–14651. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2977-14.2014>
- Lindberg, N., Kastemar, M., Olofsson, T., Smits, A., & Uhrbom, L. (2009). Oligodendrocyte progenitor cells can act as cell of origin for experimental glioma. *Journal of Clinical Investigation*, 119(12), 2266–2275. <http://doi.org/10.1038/nci.2009.76>
- Liu, C., & Zong, H. (2012). Developmental origins of brain tumors. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(5), 844–849. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2012.04.012>
- Liu, C., Sage, J. C., Miller, M. R., Verhaak, R. G. W., Hippenmeyer, S., Vogel, H., et al. (2011). Mosaic Analysis with Double Markers Reveals Tumor Cell of Origin in Glioma. *Cell*, 146(2), 209–221. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.014>
- Llaguno, S. A., Chen, J., Kwon, C.-H., Jackson, E. L., Li, Y., Burns, D. K., et al. (2009). Malignant Astrocytomas Originate from Neural Stem/Progenitor Cells in a Somatic Tumor Suppressor Mouse Model. *Cancer Cell*, 15(1), 45–56. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.12.006>
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., et al. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97–109. <http://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>
- Magee, J. A., Piskounova, E., & Morrison, S. J. (2012). Cancer Stem Cells: Impact, Heterogeneity, and Uncertainty. *Cancer Cell*, 21(3), 283–296. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.003>
- Mamber, C., Kozareva, D. A., Kamphuis, W., & Hol, E. M. (2013). Shades of gray: The delineation of marker expression within the adult rodent subventricular zone. *Progress in Neurobiology*, 111, 1–16. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.07.003>
- Martino, G., & Pluchino, S. (2006). The therapeutic potential of neural stem

- cells. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(5), 395–406. <http://doi.org/10.1038/nrn1908>
- Masters, J. R. (2002). HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews. Cancer*, 2(4), 315–319. <http://doi.org/10.1038/nrc775>
- McLendon, R., Friedman, A., Bigner, D., Van Meir, E. G., Brat, D. J., M Mastrogianakis, G., et al. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455(7216), 1061–1068. <http://doi.org/10.1038/nature07385>
- Mellinghoff, I. K., Schultz, N., Mischel, P. S., & Cloughesy, T. F. (2011). Will Kinase Inhibitors Make it as Glioblastoma Drugs? In I. K. Mellinghoff & C. L. Sawyers, *Therapeutic Kinase Inhibitors* (Vol. 355, pp. 135–169). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/82_2011_178
- Nakada, M., Kita, D., Watanabe, T., Hayashi, Y., Teng, L., Pyko, I. V., & Hamada, J.-I. (2011). Aberrant Signaling Pathways in Glioma. *Cancers*, 3(4), 3242–3278. <http://doi.org/10.3390/cancers3033242>
- Ocana, A., Pandiella, A., Siu, L. L., & Tannock, I. F. (2010). Preclinical development of molecular- targeted agents for cancer. *Nature Publishing Group*, 8(4), 200–209. <http://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.194>
- Ozawa, T., Riester, M., Cheng, Y.-K., Huse, J. T., Squatrito, M., Helmy, K., et al. (2014). Most human non-GCIMP glioblastoma subtypes evolve from a common proneural-like precursor glioma. *Cancer Cell*, 26(2), 288–300. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.06.005>
- Patel, A. P., Tirosh, I., Trombetta, J. J., Shalek, A. K., Gillespie, S. M., Wakimoto, H., et al. (2014). Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*, 344(6190), 1396–1401. <http://doi.org/10.1126/science.1254257>
- Persson, A. I., Petritsch, C., Swartling, F. J., Itsara, M., Sim, F. J., Auvergne, R., et al. (2010). Non-Stem Cell Origin for Oligodendroglioma. *Cancer Cell*, 18(6), 669–682. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.10.033>
- Pollard, S. M., Yoshikawa, K., Clarke, I. D., Danovi, D., Stricker, S., Russell, R., et al. (2009). Glioma Stem Cell Lines Expanded in Adherent Culture Have Tumor-Specific Phenotypes and Are Suitable for Chemical and Genetic Screens. *Stem Cell*, 4(6), 568–580. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2009.03.014>
- Quiñones-Hinojosa, A., Sanai, N., Gonzalez-Perez, O., & Garcia-Verdugo, J. M. (2007). The human brain subventricular zone: stem cells in this niche and its organization. *Neurosurgery Clinics of North America*, 18(1), 15–20–vii. <http://doi.org/10.1016/j.nec.2006.10.013>
- Raff, M. C., Lillien, L. E., Richardson, W. D., & Burne, J. F. (1988). Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture. *Nature*, 333(6173), 562–565. <http://doi.org/10.1038/333562a0>
- Reynolds, B. A., Tetzlaff, W., & Weiss, S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 12(11), 4565–4574.
- Richardson, W. D., Pringle, N., Mosley, M. J., & Westermarck, B. (1988). A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. *Cell*, 53(2), 309–319. <http://doi.org/10.1016/0092->

8674(88)90392-3

- Richardson, W. D., Young, K. M., Tripathi, R. B., & McKenzie, I. (2011). NG2-glia as Multipotent Neural Stem Cells: Fact or Fantasy? *Neuron*, *70*(4), 661–673. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.013>
- Robel, S., Berninger, B., & Götz, M. (2011). The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nature Reviews Neuroscience*, *12*(2), 88–104. <http://doi.org/10.1038/nrn2978>
- Romijn, H. J. (1988). Development and advantages of serum-free, chemically defined nutrient media for culturing of nerve tissue. *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, *63*(3), 263–268.
- Sanai, N., & Alvarez-Buylla, A. (2005). Neural stem cells and the origin of gliomas. *New England Journal of ...*
- SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H., & SAIGA, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, *59*, 223–239.
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research*, *63*(18), 5821–5828.
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., et al. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, *432*(7015), 396–401. <http://doi.org/10.1038/nature03128>
- Snippert, H. J., van der Flier, L. G., Sato, T., van Es, J. H., van den Born, M., Kroon-Veenboer, C., et al. (2010). Intestinal Crypt Homeostasis Results from Neutral Competition between Symmetrically Dividing Lgr5 Stem Cells. *Cell*, *143*(1), 134–144. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.016>
- Son, M. J., Woolard, K., Nam, D.-H., Lee, J., & Fine, H. A. (2009). SSEA-1 Is an Enrichment Marker for Tumor-Initiating Cells in Human Glioblastoma. *Stem Cell*, *4*(5), 440–452. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2009.03.003>
- Sottoriva, A., Spiteri, I., Piccirillo, S. G. M., Touloumis, A., Collins, V. P., Marioni, J. C., et al. (2013). Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(10), 4009–4014. <http://doi.org/10.1073/pnas.1219747110>
- Stiles, J., & Jernigan, T. L. (2010). The basics of brain development. *Neuropsychology Review*, *20*(4), 327–348. <http://doi.org/10.1007/s11065-010-9148-4>
- Strachan, T., & Read, A. P. (2004). *Human Molecular Genetics 3*. Garland Science.
- Suvà, M. L., Rheinbay, E., Gillespie, S. M., Patel, A. P., Wakimoto, H., Rabkin, S. D., et al. (2014). Reconstructing and Reprogramming the Tumor-Propagating Potential of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cell*, *157*(3), 580–594. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.030>
- Tabatabai, G., & Weller, M. (2011). Glioblastoma stem cells. *Cell and Tissue Research*, *343*(3), 459–465. <http://doi.org/10.1007/s00441-010-1123-0>
- Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., 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. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
- Visnyei, K., Onodera, H., Damoiseaux, R., Saigusa, K., Petrosyan, S., De Vries, D., et al. (2011). A Molecular Screening Approach to Identify and Characterize Inhibitors of Glioblastoma Stem Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(10), 1818–1828. <http://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0268>
- Visvader, J. E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature*, 469(7330), 314–322. <http://doi.org/10.1038/nature09781>
- Wang, Y., Yang, J., Zheng, H., Tomasek, G. J., Zhang, P., McKeever, P. E., et al. (2009). Expression of Mutant p53 Proteins Implicates a Lineage Relationship between Neural Stem Cells and Malignant Astrocytic Glioma in a Murine Model. *Cancer Cell*, 15(6), 514–526. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.04.001>
- Yamamoto, M., Shook, N. A., Kanisicak, O., Yamamoto, S., Wosczyzna, M. N., Camp, J. R., & Goldhamer, D. J. (2009). A multifunctional reporter mouse line for Cre- and FLP-dependent lineage analysis. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 47(2), 107–114. <http://doi.org/10.1002/dvg.20474>
- Yewale, C., Baradia, D., Vhora, I., Patil, S., & Misra, A. (2013). Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: A review of trends and strategies. *Biomaterials*, 34(34), 8690–8707. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.100>
- Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Farkas, D. L., et al. (2004). Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene*, 23(58), 9392–9400. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1208311>
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., O'Keefe, S., et al. (2014). An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 34(36), 11929–11947. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014>
- Zheng, H., Ying, H., Yan, H., Kimmelman, A. C., Hiller, D. J., Chen, A.-J., et al. (2008). p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature*, 455(7216), 1129–1133. <http://doi.org/10.1038/nature07443>
- Zhu, Y., Guignard, F., Zhao, D., Liu, L., Burns, D. K., Mason, R. P., et al. (2005). Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma. *Cancer Cell*, 8(2), 119–130. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.07.004>
- Zong, H., Espinosa, J. S., Su, H. H., Muzumdar, M. D., & Luo, L. (2005). Mosaic Analysis with Double Markers in Mice. *Cell*, 121(3), 479–492. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.012>

CURRICULUM VITAE resumido

LEDUR, P.F.

1. DADOS PESSOAIS

Nome:

Pítia Flores Ledur

Local e data de Nascimento:

Porto Alegre/RS, Brasil - 30 de Setembro de 1984.

E-mail: [pitialedur@gmail.com](mailto:pitalialedur@gmail.com)

2. FORMAÇÃO

Graduação:

Bacharelado em Ciências Biológicas, UFRGS (2003-2007)

Pós-graduação *stricto senso*:

Mestre em Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, UFRGS (2007-2009)

3. ESTÁGIOS

Iniciação Científica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004-2006.

Estágio Curricular, Instituto Geral de Perícias (IGP-RS), 2006.

4. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

Pesquisadora Associada, FK Biotecnologia (2009-2010)

5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

Ledur, P. F., Villodre, E. S., Paulus, R., Cruz, L. A., Flores, D. G., & Lenz, G. (2012). Extracellular ATP reduces tumor sphere growth and cancer stem cell population in glioblastoma cells. *Purinergic Signalling*, 8(1), 39–48. <http://doi.org/10.1007/s11302-011-9252-9>

Pelegri, A. L., Moura, D. J., Brenner, B. L., **Ledur, P. F.**, Maques, G. P., Henriques, J. A. P., et al. (2010). Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage-induced cell cycle arrest. *Mutagenesis*, 25(5), 447–454. <http://doi.org/10.1093/mutage/geq026>

Filippi-Chiela, E. C., Thom, M. P., Silva, M. M. B. E., Pelegri, A. L. Z., **Ledur, P. F.**, Garicochea, B., et al. (2013). Resveratrol abrogates the Temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the Temozolomide-induced senescence in glioma cells. *BMC Cancer*, 13(1), 1–1. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-13-147>

Flores, D. G., **Ledur, P. F.**, Abujamra, A. L., Brunetto, A. L., Schwartzmann, G., Lenz, G., & Roesler, R. (2009). Cancer stem cells and the biology of brain tumors. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 4(4), 306–313.

6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

LEDUR, P. F., LIU, C., HARRIS, A. R., MINUSSI, D. C., MANDELL, J. W., LOPES, M. B. S., SCHIFF, D., ASHTAGIRI, A., Lenz, Guido, ZONG, H.

Authentic Culture Condition in Glioma based on cancer cell of origin In: Miami 2015 Winter Symposium, 2015, Miami. **Towards Personalized Cancer Medicine.**, 2015.

LEDUR, P. F., LIU, C., LENZ, G., ZONG, H.

The Importance of authentic culture condition based on cancer cell of origin for drug discovery In: Mechanisms & Models of Cancer, 2014, Cold Spring Harbor Laboratory. **Mechanisms & Models of Cancer.** Cold Spring Harbor

Laboratory Press, 2014.

LEDUR, P. F., VILLODRE, E. S., Lenz, Guido

EXTRACELLULAR ATP REDUCES TUMORS PHERE GROWTH AND CANCER STEM CELL POPULATION IN GLIOBLASTOMA CELLS In: Clube Brasileiro de Purinas - 2o encontro, 2011, Rio de Janeiro.
SEGUNDO ENCONTRO DO CLUBE BRASILEIRO DAS PURINAS, 2011. v.2. p.63 - 63