

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

Abordagem de diferentes aspectos do microambiente e da  
heterogeneidade tumoral e sua influência no  
comportamento de gliomas

**Giovana Ravizzoni Onzi**

Orientador: Guido Lenz

Co-orientadora: Márcia Rosângela Wink

PORTO ALEGRE

2018

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

Abordagem de diferentes aspectos do microambiente e da  
heterogeneidade tumoral e sua influência no  
comportamento de gliomas

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

**Giovana Ravizzoni Onzi**

Orientador: Guido Lenz

Co-orientadora: Márcia Rosângela Wink

PORTO ALEGRE

2018

*"Follow, follow the sun  
And which way the wind blows  
When this day is done  
Breathe, breathe in the air  
Set your intentions  
Dream with care..."*

*Follow, follow the sun  
The direction of the birds  
The direction of love  
Breathe, breathe in the air  
Cherish this moment  
Cherish this breath..."*

*Tomorrow's a new day for everyone, brand new moon, brand new sun*

*When you feel life coming down on you like a heavy weight  
When you feel this crazy society adding to the strain  
Take a stroll to the nearest water's edge, remember your place  
Many moons have risen and fallen long, long before you came..."*

*Xavier Rudd*

## AGRADECIMENTOS

### Aos que trabalharam comigo

A todos professores e funcionários do **PPG Biologia Celular e Molecular da UFRGS**; Ao CNPq, pela bolsa de doutorado, e às demais agencias financiadoras que proveram recursos para a realização da parte experimental desta tese;

A todos os colaboradores do trabalho, em especial à **Márcia** e ao **Eduardo**; aos ICs queridos **Ju** e **Luiza**, com quem tive o prazer de trabalhar diariamente; e ao meu amigo **Marcos**, maravilhoso como profissional e que se tornou uma parceria para a vida.

Aos colegas de Labsinal: **Andrew, Fran, Emilly, Mi Hutten, Mardja, Darlan, Luana, Mari Oliveira, Julietti, Lucas, Jephesson**, com os quais convivi ao longo desses quatro anos. Um especial agradecimento à **Pítia**, quem admiro muito e com quem criei uma amizade ótima; à **Alex Vigna**, um doce de pessoa que sempre trouxe mais alegria e bom gosto aos meus dias; à **Mari Brutschin**, querida amiga que conquistou a todos com a sinceridade e simplicidade.

Às amigas que fiz na UFCSPA, **Ana** e **Raquel**. Ana com o jeitinho "mãe" único de cuidar dos outros; Raquel com a alegria, a parceria e a identificação como boas geminianas.

Aos colegas do Kornblum's lab. Agradeço ao **Alvaro** pela parceria de trabalho, e especialmente à **Mineli, Deepthi, Kaleab** e **Lee** pela amizade e por tornarem a minha estadia longe de casa muito mais fácil e alegre.

### Aos que me orientaram na realização do trabalho

Ao **Guido**. Raro encontrar um profissional tão inteligente, dedicado ao trabalho e honesto como ele. Muitas vezes é difícil de acompanhar o raciocínio rápido e as incontáveis ideias que ele tem, mas isso é o que nos estimula a crescer. Aprendi tudo o que sei sobre pesquisa com ele e com a **Márcia**, e sou muito grata por esses e todos os outros ensinamentos. Tenho orgulho em ter feito parte desse grupo de pesquisa.

Ao **Harley**. Agradeço pela confiança e oportunidade de me aceitar em seu laboratório para a realização do doutorado sanduíche, por ter sido extremamente receptivo e por todos os ensinamentos adquiridos durante esse período.

### Aos que estão sempre ao meu lado

Aos meus amigos. Àqueles que me enchem de motivos para sorrir, àqueles com quem quero dividir as alegrias e tristezas, àqueles que me entendem e que, mesmo sem me entender, estão ao meu lado. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

**Rafa, Nati, Nanda, Cami, Nessa, Bel, Isa, Pauli, Bele, Gansinho, Enzzo, cunhadas (Dadá, Ju, Paula), sogros (Mônica e Sérgio), primas (Rafa e Dani), dindos (Marga e Renan).**

Ao meu amor, **Tiago**, que deixa tudo ao meu redor mais leve, que me acalma, que me mostra o lado racional das coisas e que me deixa segura. Obrigada por todo o amor e por todo o apoio para eu ir em busca dos meus objetivos.

### Aos que permitiram que tudo isso fosse possível

À minha família: **Gelson, Sandra** e **Bruno**. Só com eles a vida faz sentido. Obrigada por todas as oportunidades que vocês me proporcionaram, obrigada por me guiarem e por cuidarem tão bem de mim sempre.

## **APRESENTAÇÃO DA TESE**

A presente tese de doutorado encontra-se estruturada em capítulos, conforme o seguinte formato:

### **Capítulo I**

Introdução

Hipóteses de Trabalho

Objetivo Geral

Objetivos Específicos

### **Capítulo II**

Manuscrito I

### **Capítulo III**

Manuscrito II

### **Capítulo IV**

Manuscrito III – A parte experimental desta etapa foi realizada no laboratório do professor Dr. Harley Kornblum, na Universidade da Califórnia Los Angeles (UCLA), como parte da realização do doutorado sanduíche.

### **Capítulo V**

Discussão

Conclusões e Perspectivas

Referências

## SUMÁRIO

RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
ABREVIATURAS E SIGLAS.....	12
<b>Capítulo I .....</b>	<b>15</b>
Introdução .....	16
1. Gliomas.....	16
1.1 Glioblastoma .....	19
1.1.1 Caracterização.....	19
1.1.2 Alterações moleculares.....	21
1.1.3 Classificação em subtipos moleculares.....	24
2. O Microambiente Tumoral.....	26
3. Células-tronco.....	31
3.1 Células-tronco mesenquimais.....	32
3.1.1 Células-tronco adiposo-derivadas .....	37
4. Células-tronco mesenquimais no câncer e em gliomas.....	38
5. Autofagia.....	42
5.1 O mecanismo da autofagia.....	43
5.2. Moléculas envolvidas na execução e controle da autofagia.....	45
5.2.1 Executores do processo autofágico .....	45
5.2.2 Controle e regulação do processo autofágico .....	48
6. Autofagia e câncer .....	51
7. Heterogeneidade tumoral e as análises de células únicas .....	57
7.1 Citometria de massas .....	59
Hipóteses de Trabalho .....	65
Objetivo Geral .....	66
Objetivos Específicos.....	66
<b>Capítulo II .....</b>	<b>67</b>
Manuscrito I.....	68
<b>Capítulo III .....</b>	<b>105</b>
Manuscrito II.....	106
<b>Capítulo IV .....</b>	<b>132</b>
Manuscrito III.....	133

<b>Capítulo V .....</b>	<b>163</b>
Discussão.....	164
Conclusões e Perspectivas .....	189
Referências .....	191

## RESUMO

A heterogeneidade entre as células tumorais e o suporte a elas proporcionado pelos componentes do microambiente tumoral (TME) são os dois principais responsáveis pela progressão do câncer e por tornar essas doenças essencialmente incuráveis. Assim, identificar as principais dependências das células malignas, sejam elas internas ou advindas do meio extracelular, é fundamental para entender seu comportamento e propor terapias mais eficientes. Nesta tese, abordamos aspectos destas duas questões separadamente. Em um primeiro trabalho, investigamos as interações de células tumorais com células-tronco mesenquimais (MSCs), um dos principais componentes do TME. MSCs participam ativamente do nicho tumoral, especialmente por serem capazes de liberar uma vasta gama de moléculas que, via sinalização parácrina, podem modular as células ao seu redor. No entanto, os principais mediadores e respectivos efeitos do secretoma dessas células nos tumores ainda precisam ser melhor elucidados. Ao investigar esses efeitos em glioblastomas (GBM), um dos tumores primários mais agressivos em adultos, mostramos que o secretoma de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (hADSCs) foi capaz de bloquear a autofagia das células malignas. Nossos dados revelaram que o secretoma de hADSCs ativou a via de sinalização de mTORC1 e reduziu a translocação nuclear de TFEB, um fator de transcrição chave que regula a autofagia e a função lisossomal, nas células de GBM, impedindo que o fluxo autofágico fosse completado. Já em um segundo trabalho, no contexto da heterogeneidade celular em tumores, propusemos uma abordagem para análise de dados de células únicas focada em *outliers*. Minorias celulares com níveis anormalmente elevados, ou reduzidos, de expressão de determinados genes ou proteínas são em muitos casos responsáveis por resistir aos tratamentos e levar à recidiva da doença, ao mesmo tempo que, por serem *outliers*, são muitas vezes ignoradas ou excluídas das análises de dados. Assim, decidimos utilizar métodos estatísticos em dados de expressão de células únicas para detectar e analisar células *outliers*, comparando o seu comportamento com as demais células não-*outliers*. Denominamos essa abordagem de *Single Cell OUTlier analysis (SCOUT)* e a testamos em dados de células tumorais avaliadas por citometria de massas e por sequenciamento de RNA de células únicas (sc-RNA-seq). Como resultado, pudemos confirmar que, especialmente diante de determinados tratamentos, células *outliers* podem se comportar de maneira distinta de não-*outliers*, revelando informações potencialmente relevantes ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Por fim, desenvolvemos uma ferramenta para automatizar a detecção e seleção de *outliers* em dados de célula única a fim de facilitar o estudo dessas células em diversos aspectos na pesquisa do câncer.



**Palavras-chave:** *Glioblastoma; Microambiente tumoral; Células mesenquimais estromais; Autofagia; Heterogeneidade tumoral; Células únicas; Outliers.*

## ABSTRACT

Intratumoral heterogeneity and the support provided by components of the tumor microenvironment (TME) to malignant cells are major contributors to cancer progression, and the two main factors that make this disease essentially incurable. Thus, identifying malignant cells dependencies, either in the intra- or extracellular environment, is fundamental to understand their behavior and propose more efficient therapies. In this thesis, we approached aspects of these two issues separately. In a first work, we investigated interactions between tumors and mesenchymal stem cells (MSCs), one of the main components in the TME. MSCs actively participate in the tumor niche, especially due to their capacity of releasing a wide range of molecules that can modulate cells in their surroundings. However, little is known about the effects of MSCs-derived molecules in tumor cells behavior. In investigating these effects on glioblastomas (GBM), one of the most aggressive primary tumors in adults, we found out that the secretome of human adipose-derived stromal cells (hADSCs) was able to block autophagy in malignant cells. Our data revealed that hADSCs secretome activated mTORC1 signaling pathway and reduced nuclear translocation of TFEB, a master transcription factor that regulates autophagy and lysosomal function, in GBM cells, preventing autophagic flux from being completed. In a second work, we addressed intratumoral heterogeneity by proposing an approach to analyze outliers in single cell data. Cellular minorities with abnormally high, or low, expression levels of certain genes or proteins are in many cases responsible for resisting treatments and lead to disease relapse, while for being outliers they are also frequently ignored or excluded from data analysis. Thus, we decided to apply statistical methods on single cell expression data to detect outliers and analyze them, comparing their behavior with the remaining non-outlier cells. We called this approach Single Cell OUTlier analysis (SCOUT) and tested it on tumor cell datasets obtained from mass cytometry and single cell RNA sequencing (scRNA-seq) experiments. Using SCOUT we were able to confirm that, especially upon specific treatments, outlier cells may behave differently from non-outliers, revealing potentially relevant information to aid in the development of novel therapeutic strategies. Finally, we developed a tool to automate detection and selection of outliers in single cell data with the aim to facilitate the study of these cells under different contexts in cancer research.

**Key-words:** *Glioblastoma; Tumor microenvironment; Mesenchymal stromal cells; Autophagy; Tumor heterogeneity; Single cell; Outliers.*

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. FREQUÊNCIA RELATIVA DE TUMORES PRIMÁRIOS DE CÉREBRO E SISTEMA NERVOSO CENTRAL. ....	17
FIGURA 2. CLASSIFICAÇÃO DE GLIOMAS BASEADA EM CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E MOLECULARES.....	19
FIGURA 3. PANORAMA DAS PRINCIPAIS ALTERAÇÕES EM VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR DE GLIOBLASTOMAS.....	24
FIGURA 4. O MICROAMBIENTE DOS TUMORES PRIMÁRIOS.....	29
FIGURA 5. CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E SUA MULTIPOTENCIALIDADE. ....	34
FIGURA 6. SECRETOMA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS. ....	36
FIGURA 7. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E OS <i>HALLMARKS</i> DO CÂNCER.....	41
FIGURA 8. A AUTOFAGIA E SEUS EXECUTORES.....	48
FIGURA 9. VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NO CONTROLE DA AUTOFAGIA. ....	51
FIGURA 10. AUTOFAGIA E A EVOLUÇÃO TUMORAL.....	55
FIGURA 11. ETAPAS DE UM EXPERIMENTO DE CITOMETRIA DE MASSAS CYTOF. ....	61
FIGURA 12. ANÁLISE COMPUTACIONAL E FERRAMENTAS DE VISUALIZAÇÃO DOS DADOS DE CITOMETRIA DE MASSAS. ....	63

## ABREVIATURAS E SIGLAS

**ADSC** – Adipose-derived Stem Cell  
**Akt** – AKT Serine/Threonine Kinase 1  
**AMBRA1** – Autophagy/beclin1 regulator  
**AMPK** – 5'AMP-activated Protein Kinase  
**ASC** – Adult Stem Cell  
**ATG** – Autophagy-related protein  
**ATM** – Ataxia Telangiectasia Mutated  
**ATP** – Adenosine Triphosphate  
**AVO** – Acidic Vesicular Organelle  
**BNIP3** – BCL2 Interacting Protein 3  
**CADH6** – Cadherin 6  
**CAF** – Cancer-associated Fibroblast  
**CCL** – C-C Motif Chemokine Ligand  
**CCR** – C-C Motif Chemokine Receptor  
**CDK** – Cyclin Dependent Kinase  
**CDKN** – Cyclin Dependent Kinase Inhibitor  
**CFU-F** – Colony Forming Units-fibroblast  
**CHI3L1** – Chitinase-3-like protein 1  
**Chk2** – Checkpoint Kinase 2  
**CLEAR** – Consensus Coordinated Lysosomal Expression And Regulation  
**CM** – Conditioned Medium  
**CMA** – Chaperone-mediated Autophagy  
**c-Met/HGFR** – Hepatocyte Growth Factor Receptor  
**CQ** – Chloroquine  
**CSC** – Cancer Stem Cell  
**CSF1** – Colony Stimulating Fator 1  
**CXCL** – C-X-C Motif Chemokine Ligand  
**CXCR** – C-X-C Motif Chemokine Receptor  
**CytoF** – Cytometry by Time of Flight  
**DAMP** – Damage-associated Molecular Pattern  
**DEPTOR** – DEP-domain-containing mTOR-interacting protein  
**ECM** – Extracellular Matrix  
**EGF** – Epidermal Growth Factor  
**EGFR** – Epidermal Growth Factor Receptor  
**EIF4E** – Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E  
**EMT** – Epithelial-Mesenchymal Transition  
**ESC** – Embryonic Stem Cell  
**EUA** – Estados Unidos da América  
**FBS** – Fetal Bovine Serum  
**FCS** – Flow Cytometry Standard  
**FDA** – Food and Drug Administration  
**FGFR** – Fibroblast Growth Factor Receptor  
**GABARAP** - GABA Type A Receptor-Associated Protein  
**GABRA1** – Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Alpha1  
**GBM** – Glioblastoma  
**GTP** – Guanosine Triphosphate  
**GTPase** – GTP Hidrolase  
**hADSC** – human Adipose Derived Stromal Cell  
**HCQ** – Hydroxychloroquine  
**HGF** – Hepatocyte Growth Factor  
**HIF** – Hypoxia-inducible Factor  
**HOPS** – Homotypic Fusion and Vacuolar Protein Sorting

**ICD** – Immunogenic Cell Death  
**ICP-MS** – Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer  
**IDG** – Isocitrate Dehydrogenase  
**IGF** - Insulin-Like Growth Factor  
**IGFR** – Insulin-Like Growth Factor Receptor  
**IL** – Interleukine  
**INCA** – Instituto Nacional do Câncer  
**iPSC** – Induced Pluripotent Stem Cell  
**IR** – Radiation Treatment  
**LIR** – LC3 interacting region  
**LKB** – Liver Kinase B  
**MAD** – Median Absolute Deviation  
**MAPK** - Mitogen-Activated Protein Kinase  
**MAP1LC3** – Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3  
**MCy** – Mass Cytometry  
**MDM** – Mouse Double Minute  
**MDSC** – Myeloid-derived Suppressor Cell  
**MERTK** – MER Receptor Tyrosine Kinase  
**MEK** – Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase  
**MGMT** – O(6)-Methylguanine-DNA Methyltransferase  
**miR** – microRNA  
**MLST8** – mTOR-associated protein, LST8 homolog  
**MSC** – Mesenchymal Stem Cell  
**mTOR** – Mammalian Target of Rapamycin  
**mTORC** – Mammalian Target of Rapamycin Complex  
**NAD** – Nicotinamide Adenine Dinucleotide  
**NBR1** – Neighbor of BRCA1 Gene 1 Protein  
**NCI** – National Cancer Institute  
**NDP52** – Nuclear Dot Protein 52 kDa  
**NES** – Nestin  
**NEFL** – Neurofilament Light  
**NF1** – Neurofibromatosis 1  
**NF- $\kappa$ B** – Nuclear Factor Kappa B  
**NIH** – National Institutes of Health  
**NK** – Natural Killer  
**NKX2-2** – NK2 homeobox 2  
**NSC** – Neural Stem Cell  
**OC** – Outliers by Control  
**OLIG2** – Oligodendrocyte Transcription Factor 2  
**OMS** – Organização Mundial da Saúde  
**OPC** – Oligodendrocyte Precursor Cell  
**OPTN** – Optineurin  
**OS** – Outliers by Sample  
**PAS** – Phagophore Assembly Site  
**PCA** – Principal Component Analysis  
**PCR** – Polymerase Chain Reaction  
**PDGF** – Platelet-derived Growth Factor  
**PDGFRA** – Platelet-derived Growth Factor Receptor Alpha  
**PDGFRB** – Platelet-derived Growth Factor Receptor Beta  
**PE** – Phosphatidylethanolamine  
**PERK** – Protein Kinase RNA-like ER kinase  
**PI3K** – Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase  
**PI3KC3/VPS34** – Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Class 3  
**PI3P** – Phosphatidylinositol 3-phosphate

**PRAS40** – Proline-Rich Akt Substrate 40 kDa  
**PTEN** – Phosphatase and Tensin Homolog  
**PUFA** – Polyunsaturated Fatty Acids  
**P62/SQSTM1** – Sequestosome 1  
**Rab7** – Ras-related protein Rab7a  
**RAF** – Rapidly Accelerated Fibrosarcoma  
**RAPTOR** – Regulatory-associated Protein of mTOR  
**RAS** – Rat Sarcoma  
**RB** – Retinoblastoma  
**RB1CC1** – RB1-inducible coiled-coil 1  
**RHEB** – Ras Homolog Enriched in Brain  
**RHOA** – Ras Homolog Family Member A  
**RTK** – Receptor Tyrosine Kinase  
**SCOUT** – Single Cell OUTlier analysis  
**SCOUTS** – Single Cell OUTlier Selector  
**scRNA-seq** – single cell RNA - sequencing  
**SDF1** – Stromal Cell-derived Factor  
**SiRNA** – small interfering RNA  
**SLC12A5** – Solute Carrier Family 12 Member 5  
**SNAP29** – Synaptosomal-associated Protein 29  
**SNARE** – Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment Receptor  
**SNC** – Sistema Nervoso Central  
**STX17** – Syntaxin 17  
**SYT1** – Synaptotagmin 1  
**S6K** – Ribosomal Protein S6 Kinase  
**TAM** – Tumor-associated Macrophage  
**TA-MSC** – Tumor-associated Mesenchymal Stem Cell  
**TCGA** – The Cancer Genome Atlas  
TF – Tukey Factor  
**TFEB** – Transcription Factor EB  
**TGFβ** – Transforming Growth Factor β  
**TME** – Tumor Microenvironment  
**TMZ** – Temozolomide  
**TNFα** – Tumor Necrosis Factor Alpha  
**TOF** – Time of Flight  
**TP53** – Tumor Protein P53  
**TSC** – Tuberous Sclerosis  
**ULK1** – unc-51-like Autophagy Activating Kinase 1  
**VAMP** – Vesicle-associated membrane protein  
**VEGF** – Vascular Endothelial Growth Factor  
**VEGFR** – Vascular Endothelial Growth Factor Receptor  
**VM** – Vascular Mimicry  
**VMP1** – Vacuole Membrane Protein 1  
**WIPI** – WD repeat Domain Phosphoinositide-interacting Protein  
**ZKSCAN3** – Zinc Finger Protein with KRAB and SCAN Domains 3

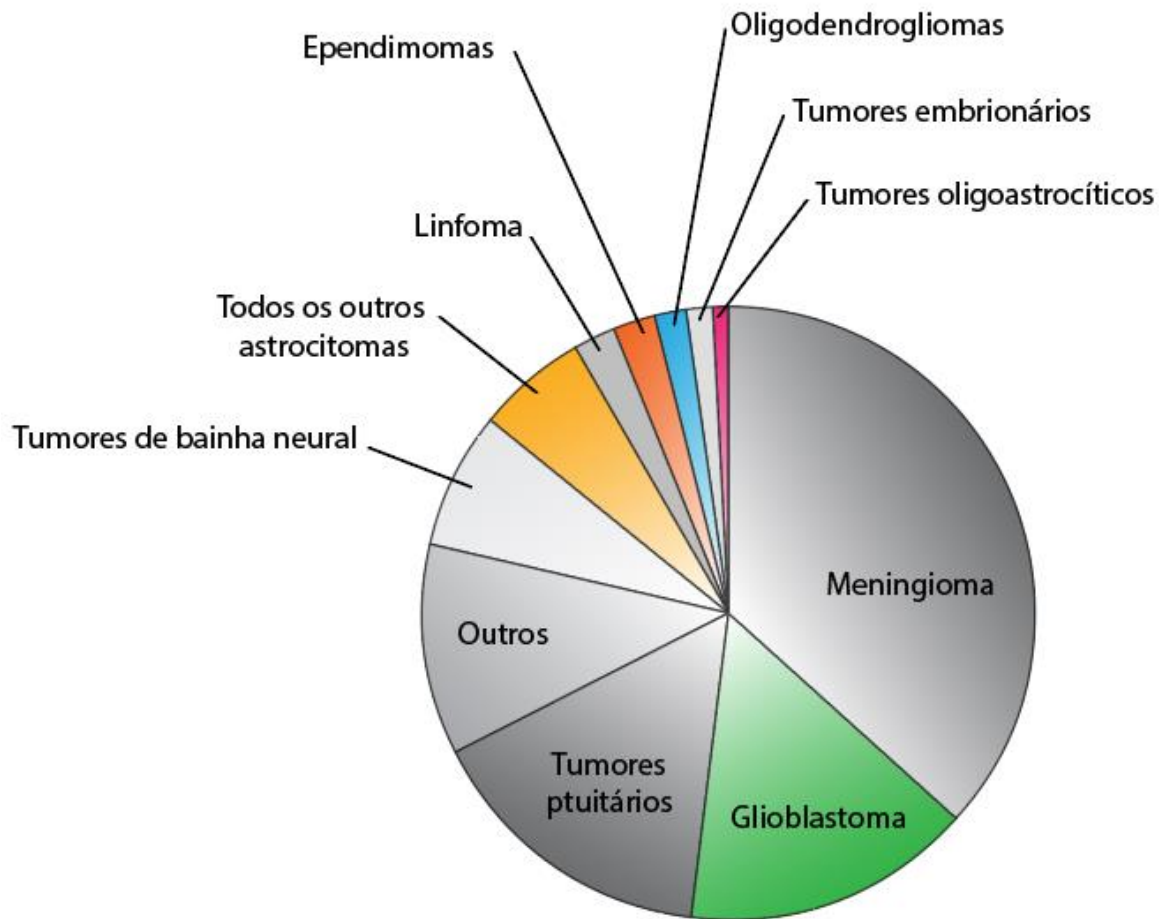
# Capítulo I

## INTRODUÇÃO

### 1. Gliomas

Gliomas são tumores do sistema nervoso central (SNC) que possuem origem em células da glia ou seus progenitores/precusores. Embora a maioria das lesões cerebrais neoplásicas sejam metástases decorrentes de cânceres originados fora do SNC - com uma frequência de 5 a 10 vezes maior que tumores cerebrais primários [1] -, dos tumores que têm origem no tecido cerebral os gliomas são os mais comuns, respondendo por cerca de 30 a 60% dos casos ([www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br); [www.cbtrus.org](http://www.cbtrus.org)) (Figura 1). Nos Estados Unidos da América (EUA), aproximadamente 30.000 pacientes são diagnosticados com glioma a cada ano [2]. 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 de homens, e 4,05 novos casos a cada 100 mil mulheres ([www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)). Embora os gliomas não estejam entre os 10 tipos de câncer de maior incidência no Brasil e no mundo, o aumento da expectativa de vida da população mundial faz com que preocupação acerca desses tumores cresça, devido ao fato de a doença acometer principalmente pacientes de idade mais avançada [3].





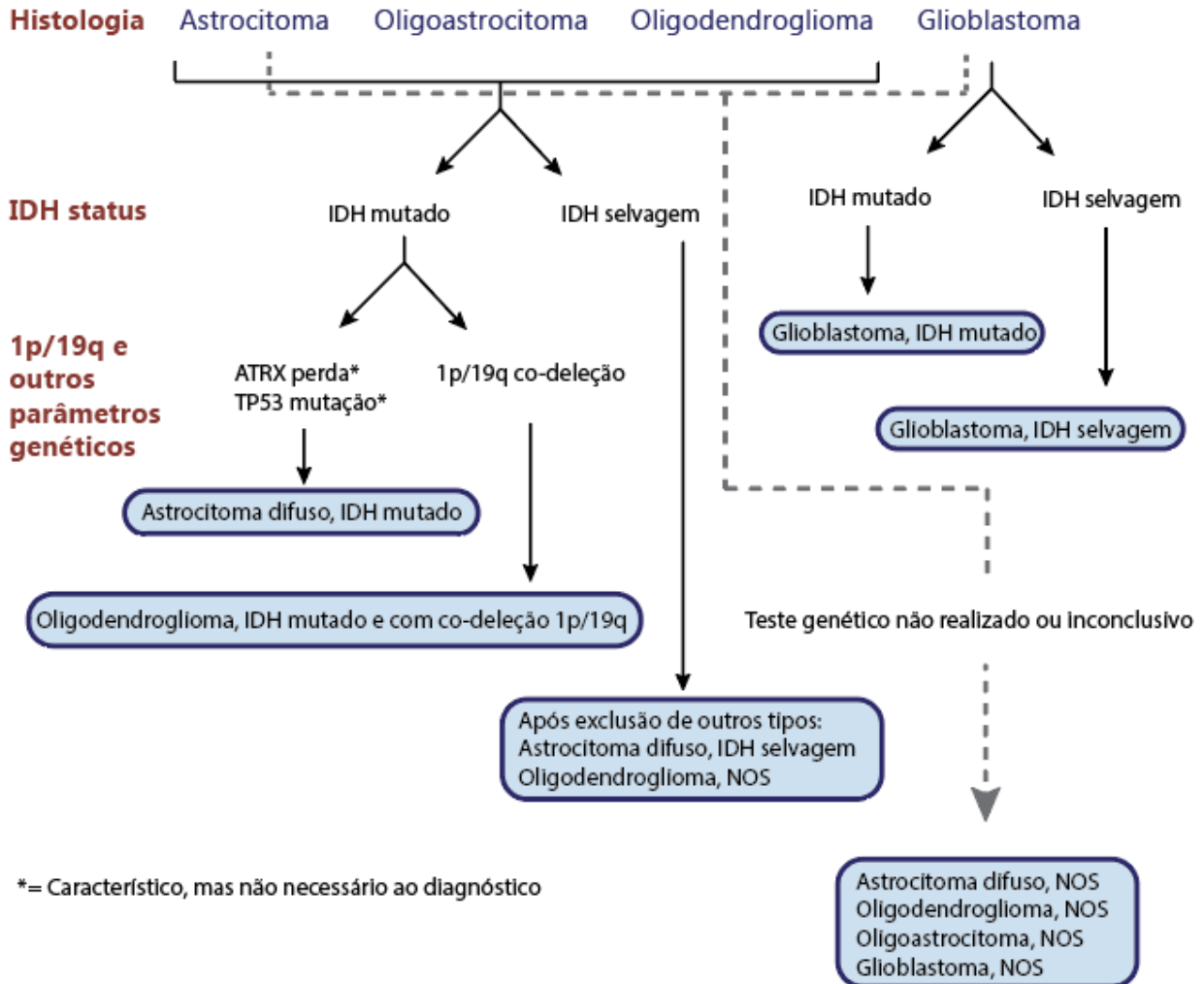
**FIGURA 1. FREQUÊNCIA RELATIVA DE TUMORES PRIMÁRIOS DE CÉREBRO E SISTEMA NERVOSO CENTRAL.** OS GLIOMAS RESPONDEM POR CERCA DE 30% DE TODOS OS TUMORES CEREBRAIS, INCLUINDO BENIGNOS E MALIGNOS (80% DOS TUMORES CEREBRAIS MALIGNOS). A FIGURA MOSTRA UMA ANÁLISE ESTATÍSTICA DO CENTRAL BRAIN TUMOR REGISTRY OF THE UNITED STATES (CBTRUS), A QUAL CLASSIFICOU OS TUMORES DO SNC DE ACORDO COM OS GRUPOS HISTOLÓGICOS - ASTROCITOMAS, EPENDIMOMAS, OLIGODENDROGLIOMAS, TUMORES OLIGOASTROCÍTICOS E GLIOBLASTOMA. (N= 343.175) FIGURA ADAPTADA DE [1].

Os gliomas podem ser classificados com base em diferentes características. A classificação clássica feita pela Organização Mundial da Saúde (OMS), até sua 4ª edição em 2007, leva em consideração principalmente critérios histopatológicos, tais como morfologia celular, citoarquitetura/citogenética e perfil de marcadores imunológicos [4–7]. De acordo com essa classificação, os gliomas podem ser divididos em astrocitomas, oligodendrogliomas, tumores mistos (gliomas oligoastrocíticos) e ependimomas. Na clínica, esses tumores são ainda divididos de acordo com seu grau de malignidade, sendo o grau I a forma menos e grau IV a forma mais agressiva. No entanto, cabe ressaltar que gliomas de baixo grau frequentemente

evoluem ou recorrem como lesões de grau mais alto [8]. Abaixo encontram-se detalhadas as características dos diferentes graus clínicos dos gliomas:

- Grau I: constituem lesões de baixo grau proliferativo, com possibilidade de cura após ressecção cirúrgica. Não são considerados malignos.
- Grau II: abrange lesões de crescimento lento, células bem diferenciadas e menor agressividade. São tumores normalmente infiltrativos com baixa atividade mitótica, porém possuem maior chance de recorrência do que os de grau I. A mediana de sobrevida é de 5 a 15 anos.
- Grau III: lesões com evidências histológicas de malignidade, atipia nuclear, alta atividade mitótica e capacidade infiltrativa. A mediana de sobrevida média dos pacientes cai para menos de três anos.
- Grau IV: são lesões caracterizadas pela alta taxa de proliferação - mitoticamente ativas - com tendência à necrose. O prognóstico é ruim, com sobrevida mediana em torno de um ano. São geralmente tratados com terapia adjuvante agressiva.

Em 2016, frente à evolução das técnicas moleculares, uma nova classificação para os gliomas foi proposta pela OMS de modo a atualizar a edição publicada em 2007 [9]. Pela primeira vez passam a ser utilizados parâmetros moleculares na classificação dessas doenças, unindo-os aos critérios histológicos já bem estabelecidos. Dentre as principais alterações moleculares incluídas como fatores determinantes de diagnóstico estão a presença de mutação na enzima isocitrato-desidrogenase (*IDH*) e no gene da *TP53*, e também a co-deleção dos cromossomos 1p/19q, como representado no esquema da Figura 2. Essa revisão da classificação dos tumores do SNC é considerada como um avanço conceitual e prático na área, visto que, por unir achados histopatológicos e moleculares para fins diagnósticos [1], a mesma acaba contribuindo para o conceito da oncologia de precisão.



**FIGURA 2. CLASSIFICAÇÃO DE GLIOMAS BASEADA EM CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E MOLECULARES.** NÃO NECESSARIAMENTE O FLUXO DO DIAGNÓSTICO É REALIZADO PRIMEIRO DE ACORDO COM A HISTOLOGIA E DEPOIS COM O PERFIL MOLECULAR. ASSINATURAS MOLECULARES PODEM POR VEZES TER UM PESO MAIOR NO DIAGNÓSTICO INTEGRADO. NOS: NÃO ESPECIFICADO (*NOT OTHERWISE SPECIFIED*). FIGURA ADAPTADA DE [9].

## 1.1 Glioblastoma

### 1.1.1 Caracterização

O glioblastoma (GBM) é o tipo mais comum de tumores malignos no SNC e também o mais agressivo, representando os gliomas de grau clínico IV [10]. Esses tumores podem ter origem *de novo* (GBM primário) ou serem resultado da progressão de gliomas de baixo grau (GBM secundário). Os glioblastomas de origem primária constituem a forma mais comum e costumam atingir pacientes de maior idade, surgindo sem evidência clínica ou histológica de

lesão anterior; já os tumores secundários costumam ocorrer em pacientes mais jovens (idade média de 45 anos). As características clínicas dos GBMs primários e secundários são muito similares [5].

Os pacientes com GBM vão a óbito em aproximadamente um ano, mesmo com o tratamento padrão - caracterizado por ressecção cirúrgica e terapia adjuvante com irradiação e temozolomida (TMZ) [11]. A temozolomida é um agente alquilante do DNA usado como quimioterápico padrão para o tratamento de glioblastoma, sendo normalmente administrado concomitantemente e após a radioterapia. No entanto, a eficácia desse quimioterápico está intimamente relacionada à falta de uma proteína de reparo do DNA, a O6-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT). Quando essa enzima é expressa em altos níveis, existe um importante fator de risco para o desenvolvimento de resistência terapêutica, pois ela diminui a eficácia dos agentes alquilantes [12]. Contudo, além da expressão de MGMT, vários outros fatores característicos contribuem para o prognóstico extremamente pobre dos glioblastomas. Os altos níveis de proliferação e invasão celular, por exemplo, dificultam uma remoção cirúrgica completa e acabam contribuindo para o surgimento de focos de recidiva da doença. Da mesma forma, o grau de heterogeneidade desses tumores faz com que eles sejam resistentes a diversas abordagens terapêuticas. Ainda, os glioblastomas apresentam alta vascularização em suas bordas, porém grandes áreas centrais de hipóxia (áreas necróticas). As células em ambientes hipóxicos apresentam um aumento na capacidade de resistência à irradiação, pois os radicais de oxigênio têm um papel importante no dano gerado por essa terapia, além do fato de que o fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF) altera a resposta de dano ao DNA [13]. Por fim, a presença da barreira hematoencefálica muitas vezes dificulta o acesso dos agentes terapêuticos ao sítio tumoral e é um obstáculo a mais no desenvolvimento de novas drogas.

Assim como a maioria dos cânceres, os glioblastomas se originam a partir de um processo marcado por alterações genéticas em determinadas células que culminam na transformação maligna das mesmas, posteriormente levando à formação de tumores bem estabelecidos com uma determinada carga mutacional (GBMs apresentam uma mediana de aproximadamente uma mutação por megabase [14]). No entanto, a definição da célula que dá origem ao GBM ainda é uma questão em debate; já foi descrito que ele pode surgir a partir de células-tronco neurais (NSCs), células progenitoras ou células diferenciadas, como astrócitos e oligodendrócitos [15]. Essas descrições baseiam-se em diferentes observações, tais como a similaridade de morfologia e expressão de marcadores de células de GBM às de células neurais e gliais normais; e a comprovação em ensaios *in vivo* de que quaisquer desses tipos celulares

quando mutados podem originar tumores [16–20]. Contudo, por possuírem a capacidade de se autorrenovar e persistirem por longos períodos de tempo, as células-tronco tornam-se mais vulneráveis ao acúmulo de mutações do que as células diferenciadas [7]. Estudos histológicos de tumores cerebrais também mostram a ausência da expressão de marcadores de células diferenciadas em tumores iniciais, bem como a presença de nestina, uma proteína marcadora de células-tronco do tecido neural. Além disso, a heterogeneidade celular observada em tumores de cérebro também levanta a possibilidade de uma célula de origem multipotente [21]. Devido a esses fatores, NSCs e células precursoras de oligodendrócitos (OPCs) são as origens mais bem descritas e aceitas para o GBM.

O estudo das células que originam o GBM vem recebendo cada vez mais atenção, pois foi mostrado que a identidade da origem de um tumor afeta a progressão tumoral, estando associada ao grau de malignidade e à sensibilidade a drogas [22]. Nesse contexto, também é fundamental se considerar as células de origem quando no cultivo celular *in vitro* de GBMs primários. Um estudo mostrou que quando GBMs originados de OPCs foram mantidos por múltiplas passagens em condições utilizadas para crescer NSCs, por exemplo, eles perderam as características de OPCs e passaram a apresentar características de NSCs, respondendo melhor ao tratamento com TMZ e diminuindo sua tumorigenicidade *in vivo* [23]. Do contrário, quando essas mesmas amostras foram cultivadas em condições de crescimento de OPCs as células mantiveram as características dos tumores parentais. Sendo assim, conhecer a célula de origem e adaptar as condições de cultivo às suas características é extremamente relevante para que os resultados obtidos experimentalmente possuam maior reprodutibilidade e potencial de translação clínica [23, 24], além de poder influenciar a escolha terapêutica mais adequada à cada paciente.

### **1.1.2 Alterações moleculares**

Conforme mencionado, dados moleculares gerados pelas tecnologias ômicas vêm revolucionando o estudo do câncer e fornecendo uma visão abrangente do cenário genômico dos tumores, incluindo os glioblastomas, contribuindo para o desenvolvimento de terapias mais precisas. Conjuntos de vias centrais de sinalização celular que estão comumente ativadas nos tumores vêm sendo revelados. Para os glioblastomas, as principais vias que encontram-se frequentemente alteradas são as da proteína p53, a via da proteína retinoblastoma (RB) e as vias ativadas por receptores de tirosina quinase (RTK) [25]. A proteína p53 é a grande

responsável por orquestrar respostas a estresse nas células, regulando diversos genes-alvo que induzem a interrupção do ciclo celular, a morte celular, a diferenciação celular, a senescência, o reparo do DNA e a neovascularização. Da mesma forma, a proteína Rb também é responsável pelo controle da entrada e progressão no ciclo celular. Ambas as vias atuam para frear o processo tumorigênico e por isso essas moléculas são consideradas antitumorais, frequentemente sofrendo mutações ou deleções no câncer. Já as cascatas de sinalização ativadas pelos RTKs regulam diversos processos celulares importantes para o desenvolvimento do tumor, como proliferação, crescimento, apoptose, migração e invasão celular. Por esse motivo, essas moléculas são consideradas pró-tumorais e as alterações nelas ocasionadas normalmente levam a um aumento de sua expressão/atividade. Alterações específicas nas três principais vias e sua frequência em glioblastomas são descritas abaixo:

- **Vias de RTKs:** duas principais vias de RTKs encontram-se frequentemente desreguladas em glioblastomas: PI3K / Akt / mTOR e Ras / MEK / MAPK. Ambas são desencadeadas após a ativação dos receptores de tirosina quinase - EGFR, PDGFR, VEGFR, etc - na membrana celular. Alterações no gene *EGFR* são as mais frequentes (aproximadamente 57%) em GBMs. O produto deste gene encontra-se normalmente ativado devido à amplificação gênica ou a mutações ativadoras. Dessas, a mais comum é a presença da variante *EGFRvIII*, a qual decorre de uma deleção nos éxons 2-7, e resulta em um domínio extracelular truncado que leva à ativação independente de ligante do receptor [26]. A expressão elevada de *PDGFRA* já foi observada em tumores astrocíticos, embora não seja prevalente em GBMs (~10%) [27]. Outros RTKs, como FGFR, IGFR e c-Met, podem estar anormalmente expressos nesses tumores [28].

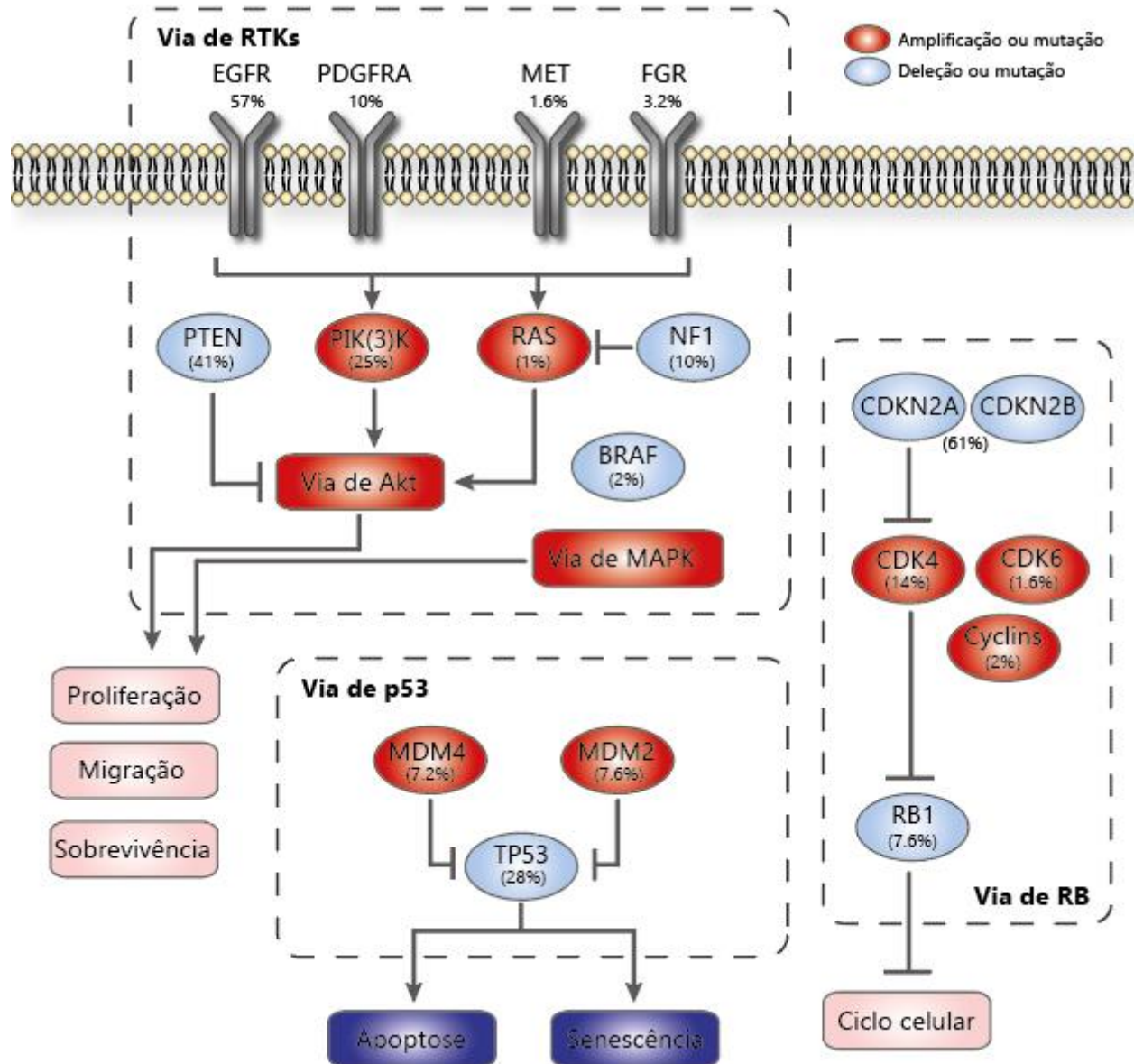
Na via de PI3K / Akt / mTOR participam principalmente as quinases PI3K, Akt e mTOR e também a proteína supressora tumoral PTEN (Phosphatase and tensin homolog). Para o complexo de PI3K, em GBMs primários as mutações e amplificação de *PIK3CA* (subunidade catalítica) são observadas em 5% e 13% dos casos [29]. Mutações oncogênicas em Akt não são normalmente encontradas, embora sua ativação seja muito comum na maioria desses tumores. A diminuição da expressão de *PTEN* devido à sua deleção homozigótica ou mutação é uma característica genética comum em GBMs (~40%) [28].

Já para a via Ras / MEK / MAPK, embora a superativação de RAS seja observada em aproximadamente 30% dos cânceres humanos [30], mutações em RAS ou RAF são raras em GBMs (em torno de 1% para RAS, de acordo com dados do TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) [31]. Portanto, a desregulação da via observada nos glioblastomas é

atribuída principalmente a seus reguladores positivos *upstream*, incluindo os receptores EGFR e PDGFR, ou pela deficiência nos seus reguladores negativos. Como exemplo deste último caso está a desregulação do gene supressor tumoral *NF1*. Mutações/deleções em *NF1* foram identificadas em cerca de 10% dos GBMs [28].

- **Via de p53:** o gene *TP53* é o mais comumente mutado na via; mutações em *TP53* ocorrem em dois terços dos GBM secundários e em aproximadamente 28% dos primários [31]. Anormalidades moleculares envolvendo outros genes da via - como *MDM2* ou *MDM4* - também já foram descritas. A amplificação de *MDM2* é observada em cerca de ~8% dos GBMs [28]. A via de ATM / Chk2 / p53 também têm recebido atenção; embora estudos prévios tenham relatado ausência ou baixa frequência de mutações de *CHK2* (aproximadamente 6%) [32], de acordo com dados do TCGA, 22% dos pacientes com glioma apresentaram perda de cópia única da região cromossômica contendo *CHK2*, sugerindo que esse gene possa atuar como um importante supressor tumoral nesses casos [31].
- **Via de Rb:** A inativação da via Rb é comumente observada em GBMs primários e secundários [33]. Perda genética de *RB1* (~8%) e de *CDKN2A* e *CDKN2B* (61%) são detectados na maioria dos GBMs. A amplificação de *CDK4* (14%) também aparece com uma certa frequência [28].

A figura 3 mostra um resumo das principais vias, e as diferentes moléculas em cada via, alteradas em glioblastomas, bem como dados de frequência de ocorrência de cada uma delas.



**FIGURA 3. PANORAMA DAS PRINCIPAIS ALTERAÇÕES EM VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR DE GLIOBLASTOMAS.** A FIGURA MOSTRA ALTERAÇÕES EM GENES PRÓ-TUMORAIS EM VERMELHO E ANTITUMORAIS EM AZUL, BEM COMO AS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS DE CADA ALTERAÇÃO EM PACIENTES COM ESSE TIPO DE TUMOR. FIGURA ADAPTADA DE [28].

### 1.1.3 Classificação em subtipos moleculares

A partir de dados moleculares que demonstraram que glioblastomas possuem perfis transcricionais distintos, sugeriu-se a divisão desses tumores em subclasses com base em assinaturas transcricionais e em alterações frequentes no número de cópias cromossômicas [28].



A subclassificação mais difundida até hoje foi a criada a partir dos dados do programa *The Cancer Genome Atlas*. O TCGA é uma rede de dados criada em 2006 por iniciativa do National Cancer Institute (NCI) e do National Institutes of Health (NIH) dos EUA com o objetivo de catalogar as anormalidades genéticas que levam à tumorigênese e à evolução tumoral em diversos tipos de câncer. A primeira subclassificação dos glioblastomas feita de acordo com o TCGA baseou-se em amostras de 206 pacientes, associando dados transcricionais, alterações na sequência de DNA e número de cópias, marcadores proteômicos de vias de sinalização celular e padrões de metilação do DNA. De acordo com essa investigação, os GBMs foram divididos em 4 perfis moleculares distintos, ou subtipos moleculares: Clássico, Neural, Proneural e Mesenquimal [34]. Algumas das principais características de cada subtipo estão descritas abaixo:

- Subtipo clássico: possuem amplificação do cromossomo 7 e perda do cromossomo 10, característica dos GBMs. Por isso, normalmente possuem elevados níveis de *EGFR* devido à amplificação do gene. Apresentam frequente deleção do gene *CDKN2A*, afetando a via de sinalização de RB. Raramente apresentam mutações no gene da *TP53*. Possuem alta expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização de *NES*, *Sonic hedgehog* e *Notch*.
- Subtipo proneural: são comuns a esse subtipo mutações pontuais em *IDH1* e alterações na via de *PDGFRA*. Apresenta altos níveis de expressão de *OLIG2* e *NKX2-2* e baixa expressão de *CDKN1A* (p21). Além disso, mutações na via da *TP53* são frequentes, o que contribui para a instabilidade genética desses tumores.
- Subtipo mesenquimal: tumores marcados por baixa expressão e/ou deleção de *NF1*, levando ao aumento da sinalização de Ras. Mutações no supressor tumoral *PTEN* também são comuns nesse subtipo. O termo "mesenquimal" relaciona-se ao fato de esses tumores expressarem marcadores comuns a células mesenquimais, tais como *MET*, *CHI3L1*, *CD44* e *MERTK*. Também se encontram altamente expressos genes relacionados à sinalização de *TNF $\alpha$*  e *NF- $\kappa$ B*. Dados na literatura apontam esse subtipo como sendo o mais agressivo e resistente à terapia.
- Subtipo neural: essa primeira subclassificação molecular caracterizou estes tumores pela expressão de marcadores neurais, tais como *NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* e *SLC12A5*, mas identificou que o mesmo não possuía diferenças específicas que o destacasse dos demais. Em um outro trabalho publicado recentemente a partir dos dados do TCGA, e considerando um maior número de tumores, confirmou-se que este subtipo estava

associado a células normais do tecido cerebral e não a células tumorais e, por isso, o mesmo passou ser desconsiderado da classificação molecular dos GBMs [35].

Todavia, apesar de a classificação feita pelo TCGA ser considerada um avanço em termos da compreensão da biologia desses tumores, a heterogeneidade dos glioblastomas é muito mais complexa do que sua classificação em um dos subtipos. Um trabalho interessante realizado por Patel e cols. mostrou, por meio do sequenciamento de RNA de células únicas (scRNA-seq) da massa tumoral, que um único GBM pode apresentar células de mais de um subtipo molecular. No mesmo trabalho também foi observado que muitas das células que compõem o tumor não poderiam ser classificadas em nenhum dos subtipos existentes [36]. Ainda, estudos têm mostrado que diferentes regiões do mesmo tumor podem apresentar predominância de subtipos moleculares diferentes. Recentemente foi descrito, por exemplo, que células do subtipo proneural são encontradas em maior quantidade nas bordas do tumor, enquanto que no centro da massa tumoral é mais comum encontrar células do subtipo mesenquimal [37]. Dessa forma, devido a características heterogêneas como as mencionadas acima, o diagnóstico de subtipo molecular para glioblastomas ainda não é amplamente utilizado na clínica para guiar a escolha de tratamentos.

## **2. O Microambiente Tumoral**

Estudos a respeito da interação de células tumorais com células na sua vizinhança tiveram início há muitos anos, desde a identificação da relação entre processos inflamatórios e a tumorigênese [38]. Contudo, a ideia da existência de um microambiente tumoral (TME) começou a ser amplamente discutida quando Stephen Paget observou que existiam sítios metastáticos preferenciais para células de câncer de mama, criando a teoria do "*seed and soil*", que posteriormente passou a ser aplicada para tumores primários [39]. A hipótese original de Paget propunha que a preferência das metástases de um tumor por um determinado órgão seria o produto de interações favoráveis entre as células tumorais (a "semente") e o seu microambiente no respectivo órgão (o "solo").

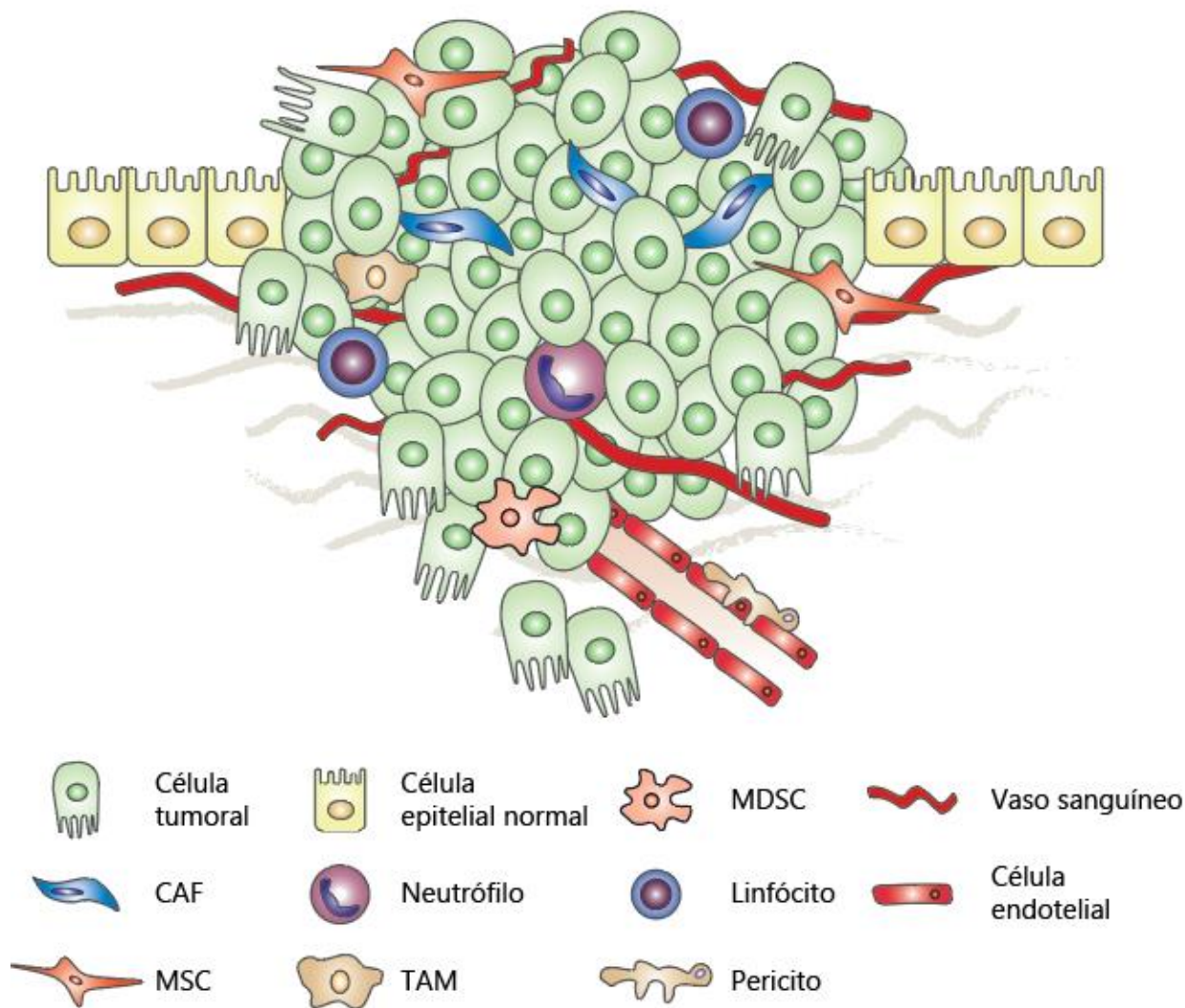
Ao longo de anos de pesquisa decorridos desde então, houve uma mudança na maneira de se pensar a respeito da evolução tumoral, na qual passou-se a entender que as células cancerígenas não manifestam a doença sozinha. Hoje, os tumores têm sido cada vez mais reconhecidos como órgãos, cuja complexidade se aproxima e até excede a dos tecidos saudáveis normais. Além da presença de uma massa heterogênea de células malignas, o nicho

tumoral forma uma complexa arquitetura composta por células não-tumorais - residentes ou recrutadas pelas próprias células do câncer -, fatores solúveis, componentes de matriz extracelular, metabólitos diversos e condições ambientais específicas - como hipóxia, baixo pH ou aumento da pressão intersticial [40]. Todos esses fatores regulam o fenótipo maligno e estão direta ou indiretamente envolvidos nos *hallmarks* do câncer e na resistência dos tumores à terapia [41, 42].

Dentre os componentes celulares que fazem parte do TME estão principalmente: células endoteliais, células do sistema linfático, fibroblastos, células do sistema imunológico e células recrutadas da medula óssea - as quais compreendem macrófagos, células supressoras de origem mielóide (MDSCs), monócitos e células-tronco mesenquimais (MSCs) Figura 4 [43]. As interações entre as células tumorais e as células do seu microambiente são intrincadas e extremamente dinâmicas. Muitas das células neste nicho podem inicialmente trabalhar para frear o desenvolvimento do câncer; no entanto, durante a progressão da doença, acabam sendo moduladas pelas células do tumor e pelo próprio microambiente e sofrem uma mudança de função, tornando-se pró-tumorais. Isso já foi demonstrado experimentalmente para vários desses tipos celulares. Fibroblastos, por exemplo, podem inibir o crescimento inicial de tumores e até reverter o processo neoplásico. Porém, processos como a inflamação crônica gerada no TME acabam reprogramando-os para um estado promotor do crescimento desses tumores [44]. Os fibroblastos de ação pró-tumoral são chamados de fibroblastos associados ao tumor (CAFs) e estão presentes em grande quantidade nos sítios tumorais, desempenhando funções como a liberação de proteínas de matriz extracelular e componentes da membrana basal, e a regulação da diferenciação de células endoteliais [45, 46]. Essas células também são capazes de induzir um estado de transição epitelial-mesenquimal nas células do câncer, contribuindo para o processo metastático [47]. Ainda, quando ativados, os CAFs liberam diversas citocinas, tais como o VEGF (*vascular endothelial growth factor*) - que estimula a angiogênese - e moléculas pró-inflamatórias que estimulam o crescimento do tumor [44].

Da mesma forma que para os fibroblastos, perfis pró- e antitumorais já foram identificados em macrófagos. Os macrófagos são células extremamente plásticas que transitam entre diferentes estados de polarização e, conseqüentemente, de função. Nos dois extremos desse continuum de estados de polarização estão os perfis chamados de M1 e M2 [48]. Os macrófagos do tipo M1 produzem citocinas inflamatórias do tipo 1 e participam na apresentação de antígenos para montar uma resposta citotóxica contra o tumor. Essas células atuam principalmente no início do processo de tumorigênese, tentando impedir o estabelecimento da doença. No entanto, durante a progressão dos tumores essas células sofrem um processo de reprogramação a perfis

predominantemente do tipo M2 e passam a atuar a favor do tumor, produzindo e liberando citocinas inflamatórias do tipo 2 [48]. Os macrófagos do tipo M2 são também conhecidos como macrófagos associados ao tumor (TAMs), e podem tanto ser residentes do próprio local onde o tumor foi formado como podem ser recrutados da medula óssea ou do baço. Dentre as ações dos TAMs estão o suporte ao crescimento e invasão celular, por meio da produção e liberação de citocinas e fatores de crescimento pró-tumorais [49, 50]. Nas bordas de tumores sólidos como os de mama e gliomas, já foi mostrado que os TAMs estimulam o fenótipo de invasão por intermédio de um loop de sinalização induzido pela liberação de EGF pelos macrófagos e de CSF1 pelas células do tumor [51, 52]. Além disso, os TAMs são uma importante fonte de proteases, enzimas que contribuem para os processos de migração e invasão por perturbar a arquitetura das células e tecidos diminuindo a adesão célula-célula [53].



**FIGURA 4. O MICROAMBIENTE DOS TUMORES PRIMÁRIOS.** A FIGURA MOSTRA OS PRINCIPAIS TIPOS CELULARES QUE COMPÕE O MICROAMBIENTE TUMORAL. ALÉM DESSAS CÉLULAS, AINDA EXISTEM AS CONTRIBUIÇÕES DE COMPONENTES DA MATRIX EXTRACELULAR, DE DIFERENTES METABÓLITOS E DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS, COMO O PH E OS NÍVEIS DE OXIGENAÇÃO DOS TECIDOS. FIGURA ADAPTADA DE [43].

As observações do TME tiveram origem principalmente no estudo dos carcinomas, nos quais as células epiteliais neoplásicas constituem um compartimento (o parênquima) que é claramente distinto das células mesenquimais que formam o estroma associado ao tumor. O estroma tumoral passou a ser comparado ao processo de cicatrização de lesões, e, devido ao estado inflamatório crônico dos tumores, os mesmos foram caracterizados por Harold Dvorak (1986) como as feridas que nunca cicatrizam ("*wounds that do not heal*") [54]. Ambos os processos de formação do estroma tumoral e de cicatrização iniciam com o extravasamento de

proteínas plasmáticas - como fibrinogênio, fibronectina e plasminogênio - que irão participar na formação de uma matriz que serve para recrutar células como os fibroblastos e os macrófagos, e para auxiliar na formação de novos vasos pelo processo de angiogênese. No entanto, em tumores, diferentemente do processo normal de cicatrização, a formação dessa matriz e os estímulos para formação e para a permeabilidade dos vasos sanguíneos perdura por longos períodos [54]. A importância da angiogênese para o câncer foi demonstrada por Judah Folkman há algumas décadas [55], e nos anos subsequentes esse processo foi amplamente estudado em diferentes tipos tumorais. Mostrou-se que diversas células no TME podem contribuir para induzir a formação dos vasos, estando as células endoteliais e os pericitos ativamente envolvidos na composição dos mesmos [56]. Foi constatado que os tumores são capazes de induzir a angiogênese e que seu crescimento é intimamente controlado por ela. Isso porque os tumores são altamente dependentes do aporte de oxigênio e nutrientes fornecido pela circulação, e também usam a corrente sanguínea no recrutamento de células específicas que irão fazer parte do TME. Por esses motivos, hoje o processo de angiogênese é considerado um dos *hallmarks* do câncer [41].

Para que um tumor consiga progredir é necessário que ele escape da defesa imposta pelo sistema imune. Por isso, dentre as células recrutadas ao sítio tumoral via circulação mais importantes estão as chamadas células supressoras imunológicas. As principais efetoras dessa resposta são as MSDCs e as células T regulatórias. As MDSCs são células mielóides imaturas que contribuem para regular o sistema imunológico e manter a homeostase frente a situações de insultos como infecções, respostas traumáticas, doenças autoimunes, e várias outras [57]. No câncer, essas células são recrutadas ao sítio tumoral e inibem a apresentação de antígenos pelas células dendríticas, a ativação de linfócitos T, a ação citotóxica de células *natural killer* (NK) e a polarização de macrófagos ao estado M1 [58]. As células T regulatórias também desempenham uma série de funções no controle da resposta imune, sendo a principal delas controlar a ativação e proliferação dos linfócitos T e B, e por consequência a elaboração de respostas citotóxicas contra o tumor [59].

Por fim, as células-tronco mesenquimais (MSCs) têm recebido grande atenção como constituintes ativas do TME que são frequentemente recrutadas pelo tumor. As MSCs são células multipotentes existentes em virtualmente todos os tecidos do organismo e que podem ser encontradas em significativo número em tumores primários [60]. Essas células liberam uma gama de fatores estimuladores dos processos de angiogênese [61], migração celular [62], e metástase [63]. Assim como os fibroblastos, já foi descrito que as MSCs contribuem também na indução do processo de transição epitelial-mesenquimal em células tumorais [64, 65]. Evidências apontam

ainda para o fato de que CAFs podem ser originados a partir da diferenciação de MSCs [66]. Por fim, as MSCs contribuem para a supressão da resposta imune antitumoral, podendo, por exemplo, modular a ação de linfócitos T e B [67, 68].

Embora alguns aspectos do estroma tumoral tenham sido apreciados há muito tempo, em particular as contribuições da angiogênese e do remodelamento da matriz extracelular (ECM) [54, 55], os maiores impactos do TME no crescimento e na progressão dos tumores vêm sendo descobertos nos últimos anos. Como consequência, inúmeros outros tratamentos visando romper a interação das células tumorais com o TME por diferentes mecanismos estão sendo desenvolvidos e testados na clínica. Algumas das estratégias de ação de agentes terapêuticos que já foram aprovados pela agência federal americana FDA (Food and Drug Administration) são: a inibição de RTKs nas células tumorais (como no caso de HER2 para câncer de mama e PDGFR para câncer colorretal e carcinoma de células renais), terapias antiangiogênicas com anticorpos anti-VEGF e anti-IL6 (interleucina 6) (aprovadas para vários tumores como glioblastoma, câncer de pulmão de não pequenas células, câncer colorretal, câncer de ovário, entre outros) e vacinas baseadas em células dendríticas para câncer de próstata [40]. Todavia, os avanços mais significativos foram os atingidos no desenvolvimento e aplicação das terapias de *checkpoint* imunológico [69].

Hoje sabe-se que além de os tumores serem extremamente heterogêneos por possuírem mutações ou alterações genéticas aberrantes, eles também são heterogêneos pela natureza dos componentes de seus microambientes. Mais do que isso, o TME muda constantemente durante a evolução tumoral, em resposta a condições ambientais e sinais oncogênicos dos tumores em crescimento. Dessa forma, é importante ressaltar que o desafio de se desenvolver tratamentos que tenham o TME como alvo não é simples. A aplicação de novas tecnologias e de protocolos mais rotineiros de biópsia informativa de tumores, por exemplo, podem permitir análises mais precisas da composição do TME dos pacientes, contribuindo para um ajuste refinado da escolha de estratégias terapêuticas com maior potencial para cada um deles. Ainda, a combinação de tratamentos com diferentes alvos pode ser crucial para impedir o desenvolvimento de resistência. Contudo, muitas questões a respeito da relação entre as células tumorais e seu microambiente ainda precisam ser elucidadas.

### **3. Células-tronco**

O termo “célula-tronco” apareceu na literatura científica ainda em meados do século XIX, nos trabalhos do biólogo alemão Ernst Haeckel. Haeckel desenhava árvores filogenéticas para

estudar a evolução dos organismos pela descendência de ancestrais comuns, e em um de seus trabalhos utilizou o termo "Stammzelle" (células-tronco, em alemão) para descrever o organismo ancestral unicelular do qual ele presumiu que todos os organismos multicelulares seriam originados. Daí em diante o termo *stem cell* passou a ser utilizado na maioria dos casos para descrever células do sistema embrionário que dariam origem às demais células especializadas do organismo, e também células hematopoiéticas que originariam todas as células sistema sanguíneo [70].

Hoje, o termo é empregado mais amplamente, e por célula-tronco entende-se uma célula com a capacidade de se autorrenovar (autorrenovação) e de dar origem a células especializadas (diferenciação). Nesse contexto, classifica-se as células-tronco em dois principais tipos: as células-tronco embrionárias (ESCs) – obtidas durante o estágio embrionário - e as células-tronco adultas ou somáticas (ASCs) – obtidas de tecidos adultos formados. Um outro tipo de células-tronco conhecido como células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) é produzido em laboratório pela reprogramação de células somáticas adultas para expressar características de ESCs.

As ESCs são células originadas da massa celular interna do blastocisto e são ditas pluripotentes por serem capazes de se diferenciar para formar células das três camadas germinativas que darão origem ao organismo adulto - endoderme, mesoderme e ectoderme [71]. Por esse motivo, as ESCs são em teoria mais versáteis para aplicação terapêutica, por exemplo. No entanto, uma série de questões éticas, somadas ao conhecimento limitado dos mecanismos que regulam a diferenciação dessas células e às propriedades tumorigênicas das mesmas, dificultam sua aplicação na pesquisa básica e clínica [72, 73].

Já as ASCs são células multipotentes encontradas em tecidos e órgãos adultos totalmente desenvolvidos. Essas células são capazes de se diferenciar em muitos tipos celulares distintos (multipotentes), mas geralmente originados a partir da camada germinativa da qual elas próprias tiveram origem. A função fisiológica dessas células é manter a integridade de órgãos e tecidos, bem como reparar possíveis danos aos mesmos, contribuindo para a manutenção da homeostase do organismo [74]. Sendo assim, as ASCs podem ser encontradas em uma ampla variedade de tecidos adultos.

### **3.1 Células-tronco mesenquimais**

As células-tronco hematopoiéticas presentes na medula óssea, as quais dão origem aos diferentes tipos de células do sangue, são as ASCs mais bem estudadas e descritas até hoje.

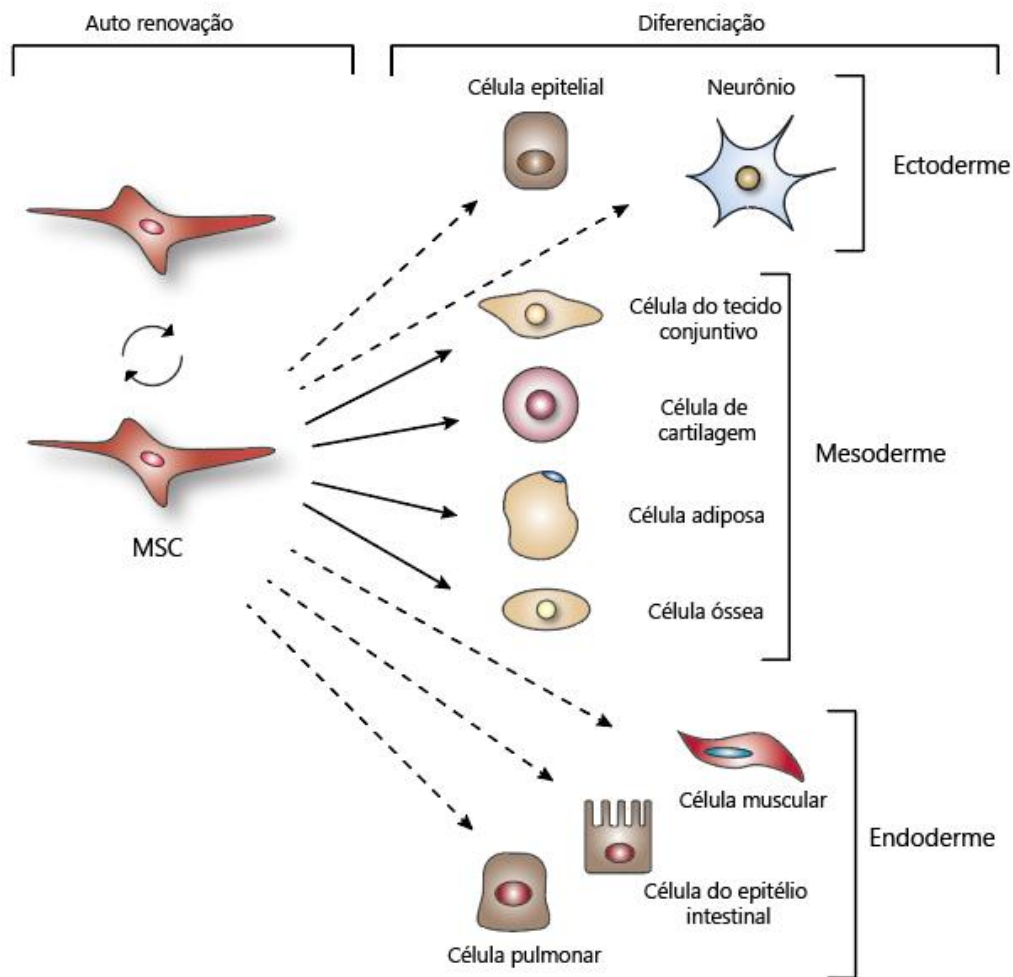


Porém pouco tempo após sua descoberta, Friedenstein e colaboradores caracterizaram um outro tipo de célula-tronco adulta multipotente presente no estroma medular. Essas supostas células, ao invés de dar origem aos componentes sanguíneos, eram capazes de se transformar em células adiposas, cartilaginosas e reticulares após transplante heterotópico em camundongos [75]. Foi posteriormente demonstrado que esses precursores eram um subgrupo de células muito semelhantes a fibroblastos (formando as chamadas unidades formadoras de colônias fibroblásticas, CFU-F), que possuía capacidade de aderência a superfícies plásticas e poderia ser expandido *in vitro*. Outros estudos também comprovaram que essas células mantinham a capacidade de proliferação em cultivo preservando seu potencial de diferenciação. Assim, por essas células possuírem características tronco clássicas, o termo “célula-tronco mesenquimal” foi então cunhado pelo pesquisador Arnold Caplan [76].

As células-tronco mesenquimais normalmente diferenciam-se em células de origem mesenquimal, ou mesodérmica [77]; todavia, também existem estudos mostrando sua capacidade de diferenciação em células de tecidos embrionários diferentes do seu, como, por exemplo, neurônios (ectoderma) [78], células epiteliais [79] e células  $\beta$  do pâncreas (endoderma) [80] (Figura 5). MSCs podem ser isoladas de virtualmente todos os tecidos do organismo, tendo o seu isolamento já sido demonstrado a partir de medula óssea, tendão, membrana sinovial, pulmão, tecido adiposo, rim, veia cava, aorta, músculo, entre outros [81]. Essa característica ubíqua levou pesquisadores da área inclusive a descrever o principal nicho das MSCs no organismo como sendo nichos perivasculares, presentes em diversos tecidos, onde essas células estariam atuando como pericitos [82].

Contudo, é importante ressaltar que diferentes populações de MSCs não são biologicamente e funcionalmente iguais [83–85]. A natureza heterogênea das MSCs, principalmente devido a diferenças na capacidade de proliferação e de plasticidade celular, além das variações impostas pelas diversas metodologias empregadas na obtenção dessas células entre laboratórios, dificulta a comparação de achados experimentais. Divergências na nomenclatura dessas células também começaram a surgir, pois alguns critérios tronco importantes não estavam sendo experimentalmente comprovados para MSCs. Diante desses conflitos, a sociedade internacional de terapia celular (ISCT) propôs que essas células passassem a ser chamadas de células mesenquimais estromais (mesenchymal stromal cells), preservando a sigla MSC, porém evitando o uso da denominação “tronco” para os casos de células não autenticamente multipotentes. Além disso, a ISCT estabeleceu um conjunto mínimo de critérios para se classificar MSCs humanas. Esses critérios incluem: 1) capacidade de

aderência ao plástico em condições padrões de cultura; 2) expressão dos marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90 e ausência de expressão dos antígenos de superfície hematopoiéticos CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a, CD19 e HLA classe II; 3) capacidade de diferenciação, sob condições específicas, em osteoblastos, condrócitos e adipócitos [86].

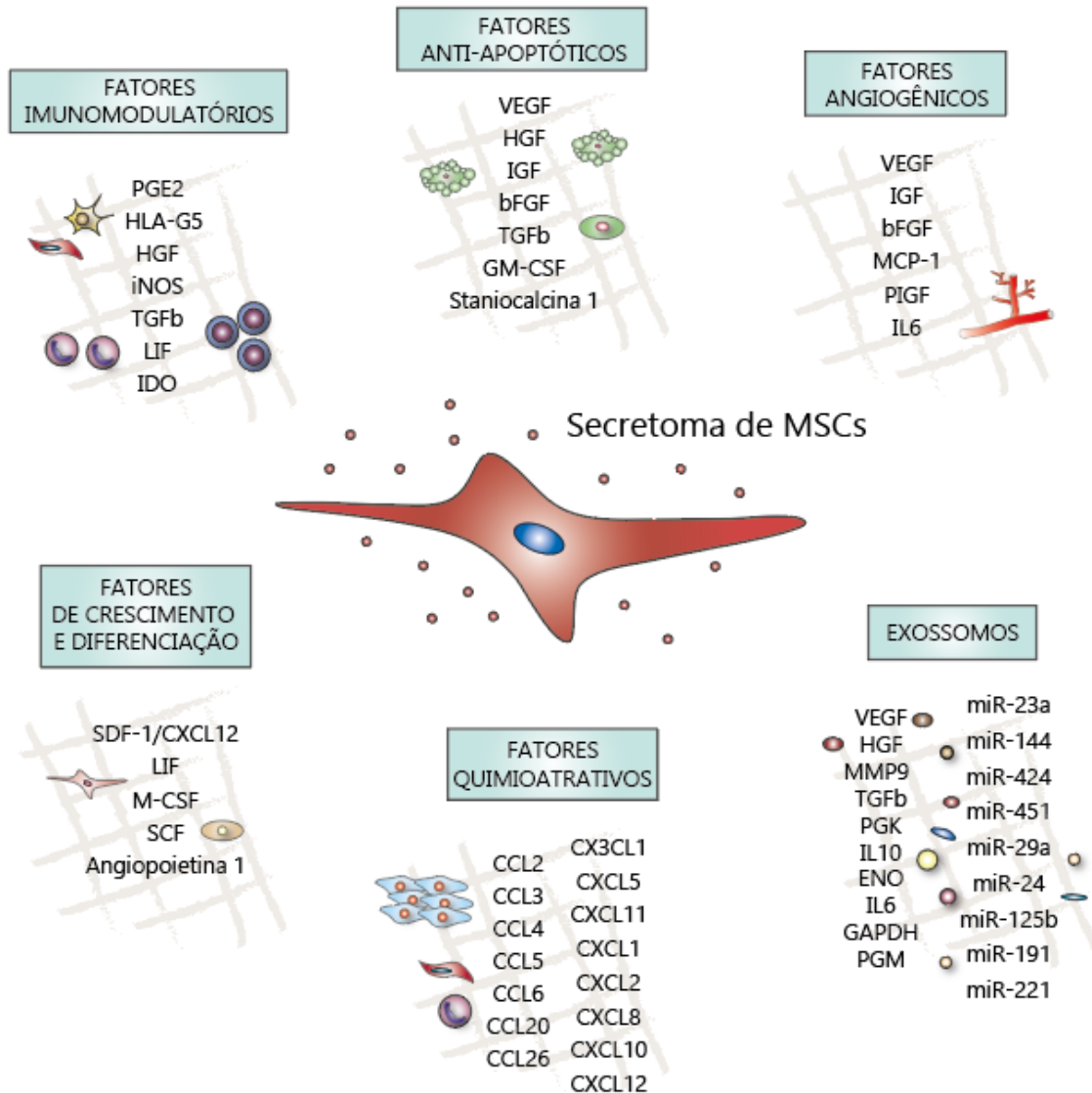


**FIGURA 5. CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E SUA MULTIPOTENCIALIDADE.** A FIGURA ILUSTRA A CAPACIDADE DE DIFERENCIAÇÃO DAS MSCs EM DIFERENTES TIPOS CELULARES. ESSAS CÉLULAS DÃO ORIGEM PRINCIPALMENTE A CÉLULAS DO MESMO FOLHETO EMBRIONÁRIO, OU SEJA, CÉLULAS DA MESODERME. NO ENTANTO, SUA POTENCIAL DIFERENCIAÇÃO A CÉLULAS DE OUTROS FOLHETOS TAMBÉM JÁ FOI MOSTRADA EM ESTUDOS NA LITERATURA. FIGURA ADAPTADA DE [87].

Além do potencial de expansão em cultura, do alto grau de plasticidade e da facilidade de isolamento já relatados, as MSCs possuem propriedades biológicas importantes que estão relacionadas à sua comunicação com as células na sua vizinhança, principalmente via sinalização parácrina. Dentre elas, as de maior destaque são a sua capacidade de migrar para sítios de lesão e de modular o sistema imunológico [88]. Já foi mostrado, por exemplo, que MSCs

possuem receptores para diversas citocinas e quimiocinas, tais como os receptores CXCR4, CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5 e CCR3, que as tornam capazes de responder a moléculas liberadas pelas células localizadas nos tecidos lesados [82]. Esta gama de moléculas inclui CCL25, CXCL1, fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento derivado de hepatócito (HGF), interleucina 8 (IL8), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator-1 derivado de células estromais (SDF1/CXCL12), fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF $\beta$ ), VEGF, e muitos outros [89].

Por sua vez, MSCs também são capazes de liberar uma infinidade de fatores que podem ter ação imunorregulatória, quimioatrativa e também trófica. Alguns desses fatores participam principalmente da modulação do sistema imune, como prostaglandina E2, óxido nítrico e enzimas do metabolismo de triptofano [82]; no entanto, a maioria pode atuar em múltiplos mecanismos biológicos. Dentre as moléculas mais frequentemente encontradas no secretoma das MSCs estão: SDF-1/CXCL12, VEGF, CCL2, CCL-5 (RANTES), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), EGF, interleucinas - IL-10, IL8, IL6 -, HGF e TGF $\beta$  [90]. Ainda, essas células também secretam vesículas para o espaço extracelular que podem entrar nas células vizinhas e alterar o seu comportamento. Exossomos – microvesículas geradas dentro da célula nos corpos multivesiculares - são liberados pelas MSCs e carregam conteúdo rico em proteínas e material genético, incluindo microRNAs que podem atuar no controle da expressão gênica das células que os recebem [91]. Enzimas envolvidas na síntese de ATP da via glicolítica, por exemplo, já foram caracterizadas a partir de exossomos liberados por MSCs [92]. Fatores de crescimento, metaloproteinases, fatores de transcrição e citocinas também já foram identificados nessas vesículas [93, 94]. Dentre os microRNAs mais abundantes estão miR-23a, miR-144, miR-424, miR-451, miR-29a, miR-24, miR-125b, miR-191, miR-221, entre outros, atuando em processos como angiogênese, crescimento celular e modulação do sistema imune [95]. A figura 6 ilustra algumas das principais moléculas do secretoma das MSCs.



**FIGURA 6. SECRETOMA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.** A FIGURA ILUSTRA PARTE DOS FATORES LIBERADOS PELAS MSCs JÁ DESCRITOS NA LITERATURA. PARA FINS DIDÁTICOS, OS FATORES ENCONTRAM-SE AGRUPADOS DE ACORDO COM A ATIVIDADE QUE DESEMPENHAM, PORÉM É VALIDO RESSALTAR QUE A MAIORIA DELES ATUA EM MÚLTIPLAS FUNÇÕES. FIGURA ADAPTADA DE [90].

Diante desse cenário, o potencial terapêutico a ser explorado nas MSCs e seu secretoma é enorme. De acordo com dados de ensaios clínicos coletados pela agência de pesquisa em saúde americana NIH, mais de 800 ensaios clínicos com MSCs já foram realizados ou estão em andamento (busca realizada no site <http://clinicaltrials.gov>, no dia 12/07/2018, com as palavras-chave “mesenchymal stem cells” e sem aplicação de filtros). A maior parte desses estudos ainda é de fase I e II, demonstrando a segurança e aplicabilidade das MSCs com mínimos efeitos adversos. No entanto, informações conclusivas a respeito dos efeitos das MSCs em diversas

condições fisiopatológicas ainda não são evidentes. É interessante observar que dentre todos os ensaios clínicos que constam nessa plataforma, apenas 19 já estão em fase III. Desses, 10 foram concluídos e apenas 3 apresentam resultados para serem analisados [96]. Por isso, diversas questões ainda estão em aberto e muito ainda precisa ser estudado a respeito do papel dessas células em seu microambiente. Pesquisas focadas em caracterizar os fatores liberados pelas MSCs e compreender a comunicação dessas células com células de outros tecidos, como tumores, por exemplo, têm sido fundamentais nessa finalidade.

### **3.1.1 Células-tronco adiposo-derivadas**

Há cerca de 17 anos, Zuk e colaboradores identificaram e descreveram um grupo de potenciais células-tronco mesenquimais originadas a partir do processamento de tecidos de lipoaspirados obtidos cirurgicamente. Essas células foram isoladas pela digestão enzimática da fração de estroma vascular coletada dos tecidos [97]. Após um certo tempo em cultivo, o grupo caracterizou as propriedades multipotentes (tronco) dessas células e desde então diversos estudos foram publicados com o uso das mesmas, hoje principalmente reconhecidas como células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo ou somente células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSCs).

Dentre as possíveis fontes para o isolamento de MSCs, o tecido adiposo é descrito como a menos invasiva, menos dispendiosa e de maior reprodutibilidade, além de apresentar um maior rendimento, uma vez que um grande número de células pode ser coletado em apenas um isolamento [98]. Além disso, o grande número de procedimentos estéticos realizados, especialmente de lipoaspirações, constitui uma enorme fonte para a obtenção dessas células a partir da gordura de descarte gerada. Segundo dados da Sociedade Internacional de Cirurgia Plástica, para o ano de 2016, os EUA e o Brasil foram os países que lideraram o ranking de número de procedimentos estéticos no mundo – 4.217.862 e 2.524.115 procedimentos foram realizados em cada um deles, respectivamente (<https://www.isaps.org/wp-content/uploads/2017>). Outra vantagem na utilização do tecido adiposo para obtenção de MSCs é a de que diferentes estudos mostram que ADSCs podem ser cultivadas por mais tempo antes de se tornarem senescentes do que as células-tronco derivadas de medula óssea, mantendo o seu potencial de diferenciação em diversos fenótipos celulares [99, 100].

Assim como MSCs em geral, as ADSCs secretam fatores que desempenham papéis importantes em processos biológicos diversos, tais como: indução de angiogênese [101];

modulação de apoptose [102]; supressão do sistema imunológico com potencial aplicação para a doença do enxerto contra o hospedeiro e doenças autoimunes e inflamatórias diversas [103–106]; cicatrização de lesões [107]; e modulação da biologia de tumores, como discutido no tópico subsequente [108, 109]. Muitos dos fatores liberados pelas MSCs são os mesmos liberados por ADSCs. Dentre as moléculas que mais frequentemente modulam suas ações estão: TGF $\beta$ , HGF, VEGF, IGF, SDF-1, IL10, IL13, dentre outros. Na clínica, as ADSCs têm atraído crescente interesse e já foram utilizadas em ensaios para diversas condições patológicas. Para uma revisão recente a respeito das aplicações de ADSCs em ensaios clínicos, referir-se a [110].

#### 4. Células-tronco mesenquimais no câncer e em gliomas

Relembrando o que foi discutido no tópico 2, durante a progressão de um tumor, as interações entre as células malignas e as células que fazem parte do estroma tumoral resultam na formação de um microambiente alterado e reativo – o TME - que tende a favorecer a progressão da doença. MSCs, principalmente originadas da medula óssea, dos nichos perivasculares e do tecido adiposo adjacente ao tumor, são frequentemente recrutadas a esses sítios e participam ativamente na construção desse microambiente [60, 111, 112]. Embora o conhecimento a respeito da interação das MSCs com as células que compõem o TME ainda seja limitado e muitas vezes controverso, algumas das possíveis consequências dessa interação tornam-se mais compreensíveis quando as correlacionamos com as funções que as MSCs exercem normalmente no organismo. Esse racional é discutido em maior detalhe nos parágrafos abaixo, com referências para tumores em geral e, especificamente, para gliomas.

Como já mencionado, as MSCs possuem capacidade de *homing*, ou seja, de migrar para sítios de injúria. Da mesma forma, os tumores funcionam como lesões crônicas e contêm em seu microambiente diversos fatores quimioatrativos para as MSCs. Por isso, essas células possuem um alto tropismo para sítios tumorais. Como mostrado em diversos trabalhos, MSCs são capazes de migrar para gliomas [113, 114]. Em modelo animal de gliomas humanos, MSCs de medula óssea migraram diretamente aos tumores tanto quando injetadas intravascularmente, quanto intracranialmente, mesmo que em hemisfério oposto ao qual os mesmos foram implantados [115]. As células-tronco do próprio tecido neural (NSCs) também podem migrar seletivamente para gliomas malignos *in vivo* e *in vitro* [116, 117]. Esse potencial também já foi descrito para outros tipos tumorais, tais como mama [118] e pâncreas [119].

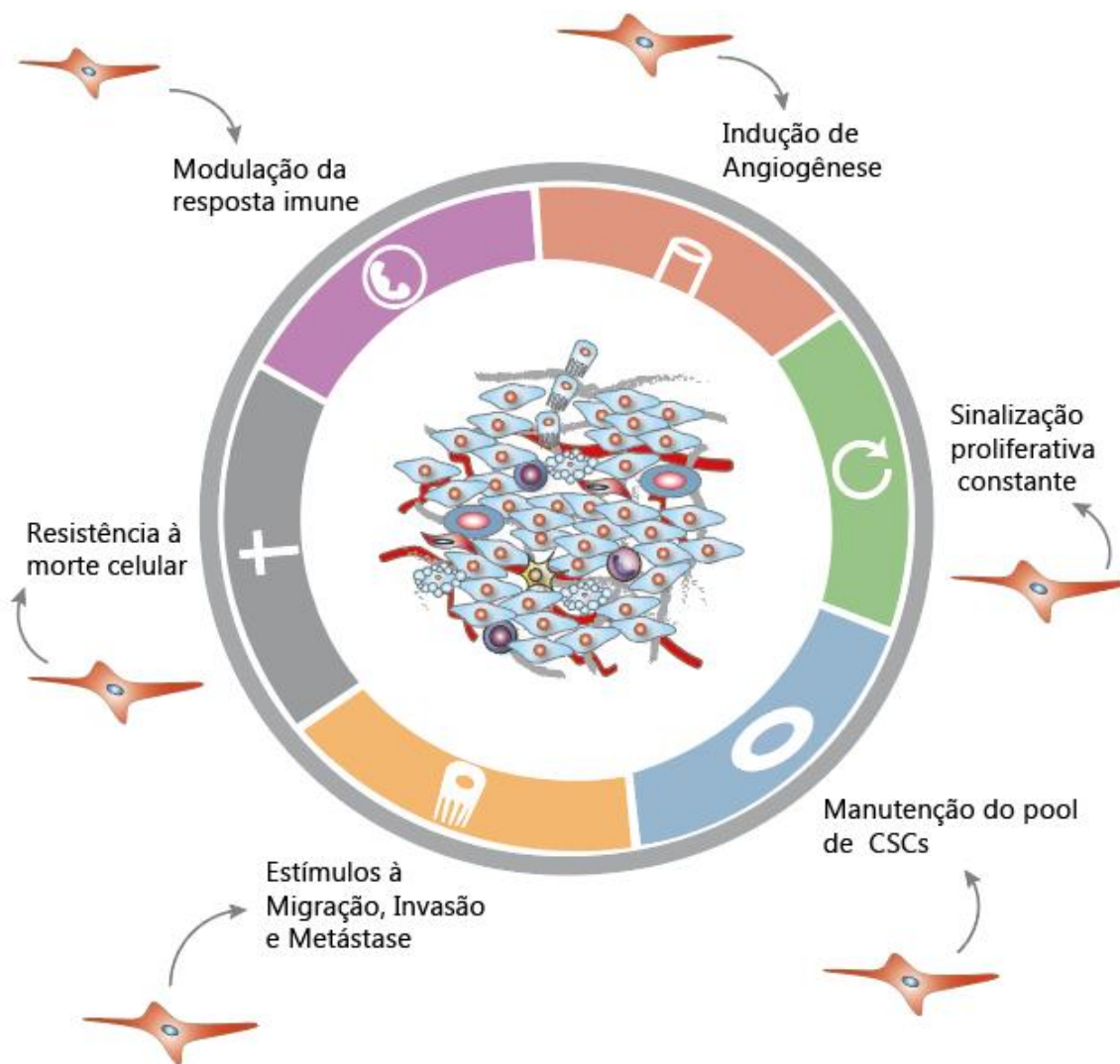
Quando chegam ao TME, uma das principais funções exercidas pelas MSCs é a de modular a resposta imune, considerada como uma característica importante dessas células. As MSCs conseguem estimular as funções pró- e antitumorais da imunidade inata e adaptativa, respectivamente, contribuindo para um ambiente inflamatório e contra uma resposta citotóxica [46]. No caso da imunidade inata, MSCs situadas principalmente nas bordas do tumor, trabalham para recrutar alguns tipos celulares imunológicos específicos. Por meio da produção de quimiocinas como CCL2, CCL7 e CCL12, as MSCs recrutam ao TME, por exemplo, monócitos, macrófagos e MDSCs [46, 120, 121]. Além disso, essas células fazem com que os monócitos recrutados se tornem tolerogênicos, e também estimulam a conversão dos macrófagos ao seu perfil imunossupressor e pró-tumoral M2 [122–124]. Também já foi demonstrada a ação das MSCs sobre a resposta imune adaptativa, principalmente por meio da inibição de linfócitos T CD8+ [125] e da estimulação de células T-regulatórias (T-regs), supressoras da resposta citotóxica [126, 127]. No caso de gliomas, por exemplo, foi mostrado que células mesenquimais perivasculares (CD90+) isoladas do tumor foram capazes de inibir a resposta de linfócitos T em cultura [128].

Outra ação relevante das MSCs, a qual também é característica clássica das mesmas, é a diferenciação a outros tipos celulares, normalmente a fim de suprir necessidades específicas dos tecidos ou de substituir células danificadas por injúria e células senis. No TME, essa capacidade faz com que as MSCs possam dar origem a células do próprio estroma tumoral, como fibroblastos (CAFs). Exemplos dessa diferenciação podem ser observados em diversos trabalhos, tendo sido mostrado inclusive que o meio condicionado de gliomas é capaz de estimular esse processo [66, 129]. A transdiferenciação de MSCs em células endoteliais [130] e pericitos [131], ambas observadas em glioma, também já foi descrita e contribuiu para potencializar a formação de novos vasos sanguíneos.

Por fim, reconhecidas como um dos fatores mais importantes das MSCs, estão as atividades do seu secretoma. Conforme discutido nos tópicos anteriores, as MSCs liberam diversas moléculas para o espaço extracelular, as quais no contexto do câncer acabam modulando não só as células do sistema imune, como acima descrito, mas diretamente as próprias células tumorais. Por meio da ação do seu secretoma, MSCs podem regular o crescimento e proliferação tumoral *in vitro* e *in vivo* [132, 133]. Em culturas de gliomas, MSCs coletadas da massa do tumor estimulam o crescimento de células-tronco tumorais (CSCs) - por liberação de IL6, que ativa STAT3 nas CSCs [111], e também via exossomos contendo miR-1587 [134]. O secretoma de MSCs também pode estimular os processos de migração [62] e transição

epitelial-mesenquimal (EMT) [64] em células de glioma humano e de rato; e de angiogênese em outros tipos tumorais [61, 135]. Karnoub e colaboradores observaram ainda que MSCs humanas de medula óssea foram capazes de induzir a formação de metástases pulmonares de câncer de mama quando co-injetadas com células tumorais em camundongos, efeito mediado pela quimiocina CCL5 liberada pelas MSCs. Finalmente, MSCs também podem auxiliar na resistência das células tumorais à terapia. Roodhart e colaboradores mostraram que, por meio da liberação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), MSCs contribuíram para a resistência de células de tumores de cólon e mama ao tratamento com cisplatina [136]. Já Mürköster e colaboradores mostraram a ação do óxido nítrico liberado pelas MSCs na indução de resistência a etoposídeo em tumor de pâncreas [137]. A figura 7 resume algumas das principais ações já relatadas na literatura das MSCs sobre os diferentes *hallmarks* do câncer, mostrando que essas células participam ativamente no controle da progressão tumoral.





**FIGURA 7. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E OS HALLMARKS DO CÂNCER.** AS MSCs CONTRIBUEM PARA A PROGRESSÃO TUMORAL, SENDO CAPAZES DE MODULAR A MAIOR PARTE DOS HALLMARKS DO CÂNCER.

No caso dos gliomas, alguns estudos mostram que MSCs podem atuar para frear o desenvolvimento tumoral. MSCs derivadas de pele humana migraram e impediram o desenvolvimento de gliomas por reduzir a angiogênese e a invasão em modelos animais de camundongo e embrião de galinha [138]. Ainda, MSCs humanas derivadas de medula óssea foram capazes de suprimir o crescimento de gliomas por meio da inibição da angiogênese [139]. Curiosamente, Akimoto e coladores mostraram que MSCs derivadas de cordão umbilical foram capazes de inibir o crescimento de tumores cerebrais malignos *in vitro* e *in vivo*, enquanto que MSCs de tecido adiposo promoveram o crescimento tumoral [84]. Outro estudo revelou ainda que o meio condicionado de hADSCs foi capaz de induzir apoptose em linhagens humanas de

GBM [140]. Em modelos animais de trabalhos mais recentes foi observado que o transplante de MSCs e concomitante administração de TMZ aumentou a sobrevivência de ratos com GBM [141]; e que houve inibição do crescimento de gliomas quando esses foram injetados com MSCs de tecido adiposo [142]. Esses achados, somados às características favoráveis das MSCs para terapia gênica, levaram a proposta de sua utilização na clínica terapêutica desses tumores. Para este fim, a principal estratégia de ação seria modificar essas células geneticamente com o intuito de carrear algum gene ou fármaco tóxico diretamente ao sítio tumoral. Uma revisão das principais propostas terapêuticas antitumorais utilizando MSCs, bem como dos desafios encontrados, foi recentemente realizada por Stuckey e Shah [108].

Em 2008, o FDA aprovou que o City of Hope Medical Center (Dr. Aboody/Dr. Portnow, Duarte, CA) conduzisse o primeiro ensaio clínico com células-tronco neurais para pacientes com glioma recorrente de alto grau [143]. Todavia, o potencial de translação das NSCs é limitado pelas dificuldades práticas de coleta e expansão dessas células [144]. Além disso, mais do que na aplicação em doenças diversas, a aplicação de MSCs no câncer muito pouco evoluiu na clínica. Apenas dois estudos com NSCs chegaram a fase I, sendo que um deles apresenta resultados pendentes e o outro não foi terminado [145].

Diante desse cenário conflitante, pode-se concluir que as consequências da relação entre tumores e MSCs parecem ser altamente contexto-dependentes, ou microambiente-dependentes. Cabe ressaltar ainda que a heterogeneidade nas células-tronco adultas derivadas de diferentes fontes, as diferenças nos métodos de isolamento e as condições de cultura *in vitro* também contribuem para as variações de efeitos encontradas na literatura. Enfim, é possível se entender também que MSCs, por serem células extremamente plásticas, tendem a ser facilmente moduladas pelo tumor, adquirindo características diferentes das MSCs residentes de tecidos saudáveis. Por isso, quando essas células são reprogramadas pelo tumor passam a ser chamadas de células-tronco mesenquimais associadas ao tumor (TA-MSCs) [109].

## **5. Autofagia**

Há mais de 60 anos, o pesquisador belga Christian de Duve deu início a um novo campo de pesquisa na biologia celular a partir da descoberta dos lisossomos [146]. Duve observou que por vezes, dentro das células, uma certa quantidade de material citoplasmático era entregue aos lisossomos para digestão, e denominou esse processo de “autofagia” (do grego *autós*, “ si

mesmo, próprio” e *fagein*, “comer”), ainda em meados da década de 60 [147]. Nos anos seguintes, a pesquisa na área concentrou-se em entender como o processo de autofagia era regulado; no entanto, a relevância fisiológica e o mecanismo como um todo permaneceram desconhecidos. Cerca de trinta anos mais tarde, o laboratório de Yoshinori Ohsumi realizou uma triagem genética da autofagia em leveduras e identificou 15 proteínas essenciais para a entrega da carga autofágica ao vacúolo (equivalente ao lisossomo na levedura), denominando-as proteínas relacionadas à autofagia (ATGs) [148]. A partir dessa caracterização, as pesquisas na área cresceram exponencialmente. Em 2016, Ohsumi recebeu o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina por sua contribuição no estudo dos mecanismos de autofagia.

A autofagia é hoje definida como um processo catabólico que resulta na degradação de conteúdo citoplasmático por via lisossomal; e os produtos dessa degradação podem ser reutilizados pelas células com diferentes finalidades, como, principalmente, para manter o status energético celular. No entanto, embora uma das funções mais importantes da autofagia seja fornecer nutrientes para atividades celulares vitais durante o jejum, a autofagia também pode executar a eliminação seletiva de material citoplasmático potencialmente nocivo, como organelas danificadas ou agregados de proteínas. Dessa maneira, a autofagia atua como um importante regulador da homeostase celular, sendo ativada em resposta a diferentes formas de estresse, incluindo privação de nutrientes, depleção de fatores de crescimento, infecções e hipóxia [149]. Por fim, a autofagia também pode ser usada pelas células para secretar constituintes citoplasmáticos. Todos esses fatores fazem com que alterações na atividade autofágica estejam envolvidas em diversas patologias - como doenças infecciosas, desordens neurodegenerativas e câncer - e que o estudo da regulação desse processo ganhe cada vez mais importância [150].

## **5.1 O mecanismo da autofagia**

Nas células de mamíferos, existem três diferentes formas de autofagia: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas (CMA) e macroautofagia [151]. Nas duas primeiras formas, o conteúdo a ser degradado (carga autofágica) é entregue diretamente aos lisossomos. Na microautofagia, as partículas entram no lúmen lisossomal por um processo de invaginação da membrana do lisossomo, e na CMA proteínas específicas são destinadas a essas organelas por meio de chaperonas, adentrando os lisossomos através de complexos transportadores transmembrana. Já no caso da macroautofagia, o processo é executado em dois estágios consecutivos: o estágio inicial é caracterizado pela formação de vesículas que irão englobar a

carga autofágica – os autofagossomos -, enquanto a fase tardia envolve a fusão entre autofagossomos e lisossomos e a subsequente degradação desse material. A macroautofagia (a partir daqui referida como autofagia) é a forma mais bem estudada e seu funcionamento é melhor detalhado a seguir.

A indução de autofagia resulta no recrutamento das ATGs, bem como dos demais componentes necessários, para uma localização subcelular específica denominada sítio de montagem do fagóforo (PAS). No PAS, essa maquinaria dá então início à formação de uma membrana de isolamento denominada fagóforo – etapa conhecida como nucleação. O alongamento gradual dessa membrana de isolamento resulta na expansão do fagóforo em uma esfera em torno de uma porção do citoplasma – etapa de expansão. O fagóforo então se fecha em uma vesícula membranosa dupla, denominada autofagossomo, prendendo assim o material citoplasmático englobado que constitui a carga autofágica [152].

Quanto à composição da carga autofágica, a autofagia pode ser considerada relativamente não-seletiva, visando à degradação de qualquer porção do citoplasma, ou pode degradar constituintes celulares específicos de maneira altamente seletiva [149]. Geralmente, as respostas autofágicas desencadeadas pela privação de nutrientes são do primeiro tipo. Por outro lado, danos a organelas ou patógenos intracelulares, por exemplo, desencadeiam formas seletivas de autofagia, na qual por meio da interação com receptores, essas cargas são direcionadas para dentro do autofagossomo. De acordo com os componentes englobados no autofagossomo a autofagia pode receber nomes específicos, como xenofagia (para patógenos), mitofagia (mitocôndrias), pexofagia (peroxissomos), ribofagia (ribossomos) e assim por diante [153].

A partir do englobamento da carga e fechamento do fagóforo, a maior parte das proteínas participantes nesses eventos iniciais é liberada (etapa de maturação) e, através dos microtúbulos, o autofagossomo é direcionado para os lisossomos, localizados principalmente na região perinuclear. Quando essas organelas se encontram em proximidade, inicia-se a etapa de fusão, na qual a membrana externa do autofagossomo funde-se com a membrana lisossomal para formar o autolisossomo (etapa de fusão). A formação dessa vesícula resulta na liberação de um corpo autofágico de membrana única para a luz do lisossomo, onde será degradado, juntamente com sua carga, pela ação das enzimas lisossomais (etapa de degradação ou digestão enzimática) [154].

## 5.2. Moléculas envolvidas na execução e controle da autofagia

### 5.2.1 Executores do processo autofágico

Existem seis principais conjuntos de proteínas envolvidos na execução do fluxo autofágico, desde a formação dos autofagossomos até a sua entrega aos lisossomos e posterior degradação [151, 155], como descrito a seguir:

- (1) **Complexo multiproteico ULK1**, organizado a partir de ULK1 (*unc-51-like autophagy activating kinase 1*), RB1CC1 ou FIP200 (*RB1-inducible coiled-coil 1*), ATG13 e ATG101. Esse complexo inicia a autofagia e a etapa de nucleação do fagóforo;
- (2) **Complexo multiproteico PI3KC3**, envolvendo PI3KC3 (*phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3*) - também conhecido como VPS34 (*vacuolar protein sorting 34*) - Beclin1 (BECN1) e AMBRA1 (*autophagy/beclin-1 regulator*). Esse complexo também participa na etapa de nucleação e formação dos fagóforos;
- (3) Duas **proteínas transmembrana**, ATG9 e VMP1 (*vacuole membrane protein 1*), as quais facilitam o recrutamento de lipídeos para o PAS para participar na etapa de expansão da membrana de isolamento (fagóforo);
- (4) Dois **sistemas de conjugação de ubiquitina**, que catalisam as ligações covalentes de ATG12 a ATG5 e ATG16L1 e de fosfatidiletanolamina (PE) à proteína MAP1LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*, também conhecida como LC3). Esses sistemas atuam na expansão do fagóforo e maturação dos autofagossomos, além de auxiliar na fusão dos mesmos com os lisossomos;
- (5) Conjunto de **proteínas reguladoras da fusão** entre autofagossomos e lisossomos, principalmente mediada pelas proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment receptor*);
- (6) Diversas **enzimas lisossomais**, como as catepsinas, que hidrolisam carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos a baixos níveis de pH, permitindo assim a reciclagem da carga autofágica e sua reutilização pela célula.

Muitas outras moléculas já foram descritas por estarem envolvidas em cada uma dessas etapas, embora não estejam tão bem caracterizadas quanto às mencionadas acima. Para uma recente revisão do assunto, referir-se a [156, 157].

Organelas como retículo endoplasmático, mitocôndria, complexo de Golgi e até mesmo vesículas endossomais já foram identificadas como possíveis PASs, refletindo a contribuição de diferentes fontes de membrana intracelular para a formação dos autofagossomos. Nesses sítios, sob condições de indução de autofagia, ULK1 é autofosforilada e subsequentemente fosforila ATG13 e FIP200 (complexo ULK1). ATG13, por interação com ATG14, atrai para o PAS os componentes do complexo PI3KC3, que são então ativados pelo complexo ULK1 dando início ao processo de nucleação. O complexo PI3KC3, por sua vez, atua na formação de PI3P (*Phosphatidylinositol 3-phosphate*) para o posterior recrutamento de proteínas que interagem com essa molécula – as WIPs (*WD repeat domain phosphoinositide-interacting*) [158]. WIPs então atraem para o PAS os membros dos sistemas de conjugação de ubiquitina - ATG12, ATG5 e ATG16L1 e LC3, ATG3 e ATG7- dando início à etapa de expansão do fagóforo [156]. O complexo ULK1 traz para o PAS ainda, via interação com ATG9 e VMP1, as vesículas que fornecem material lipídico à essa expansão [159].

As proteínas ATGs mais importantes na etapa de expansão são os membros da família ATG8, que incluem a proteína LC3. As LC3 nascentes são processadas por clivagem em sua região C-terminal mediada pela cisteína-protease ATG4, expondo um resíduo de glicina que é essencial para sua conjugação com PE [160]. Após esse processamento, elas são ativadas pela enzima ATG7 e então conjugadas à PE por ação de ATG3, convertendo-se de sua forma livremente difusa (conhecida como LC3-I) à forma lipídica ancorada à membrana do fagóforo (referida como LC3-II). Essa conjugação de PE à LC3 é auxiliada pelo complexo ATG12-ATG5, e é essencial para promover a expansão e o posterior fechamento do fagóforo, formando o autofagossomo [161]. Além do processamento C-terminal das LC3 nascentes, ATG4 também é capaz de desconjugar essas proteínas das moléculas de PE. Como a maior parte das atividades autofágicas das LC3 são atribuídas à sua conjugação com PE, essa possível desconjuração deve ser controlada, e, para funcionar adequadamente na membrana autofágica, as LC3 lipídicas devem ser protegidas de ATG4 [162, 163].

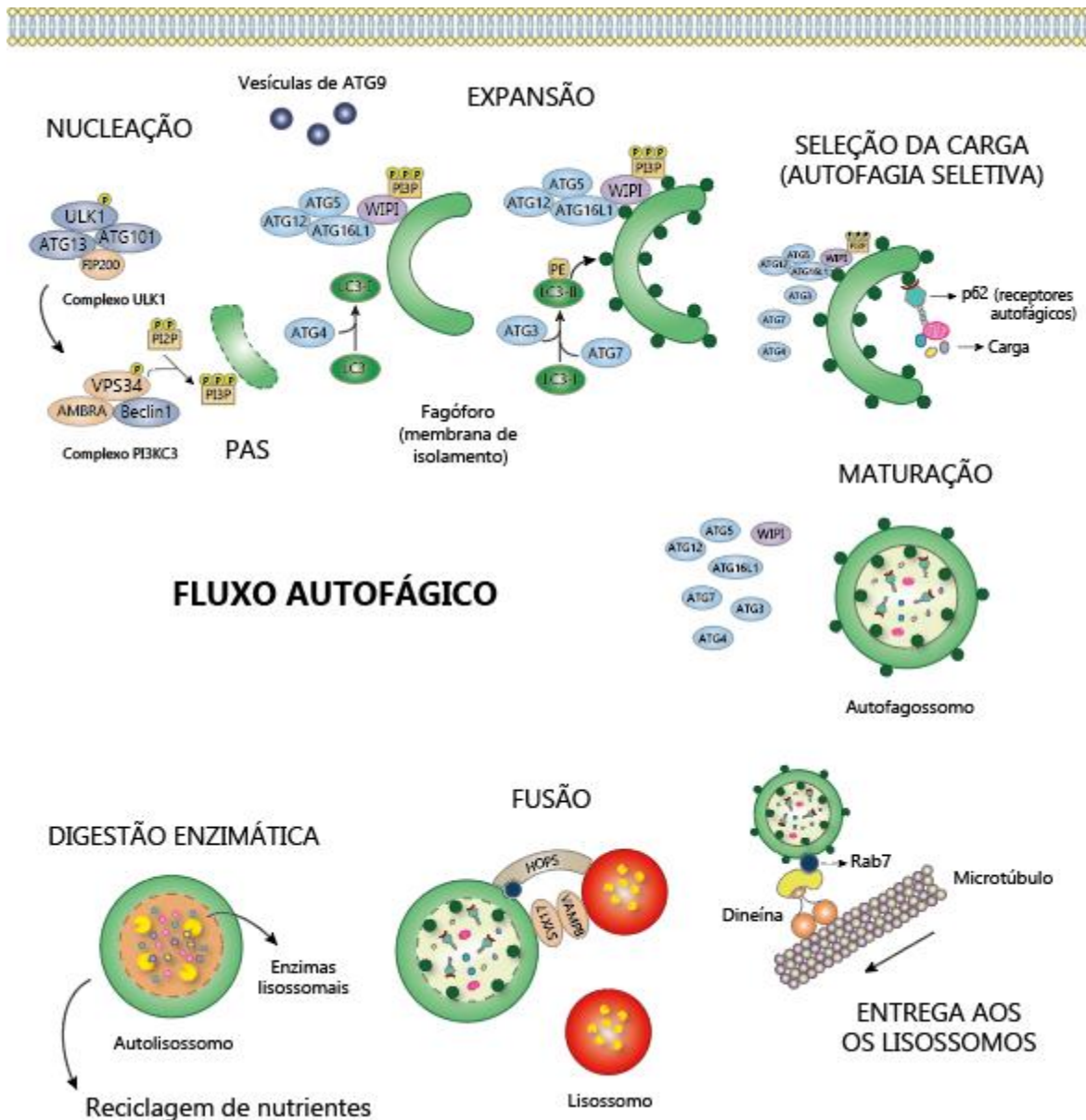
As proteínas LC3 ancoradas à membrana dos fagóforos facilitam o recrutamento da carga autofágica nos casos de autofagia seletiva. Na autofagia seletiva, a carga a ser degradada é especificamente marcada com sinais “*eat-me*”, que em sua maior parte representam moléculas de ubiquitina adicionadas a esse material. Essas moléculas de ubiquitina são então reconhecidas por receptores de autofagia, que vão direcionar essa carga à membrana do fagóforo por meio de sua capacidade de interação com LC3 através do domínio LIR (*LC3-interacting region*). Dentre os principais receptores já descritos por participar no reconhecimento e direcionamento da carga

autofágica estão: p62 (*SQSTM1*), OPTN (*Optineurin*), NBR1 (*Neighbor Of BRCA1 Gene 1 Protein*) e NDP52 (*nuclear dot protein 52 kDa*) [164].

Após o fechamento do fagóforo e a formação completa do autofagossomo, o mesmo sofre um processo de maturação, o qual envolve a liberação das ATGs de sua membrana externa e o recrutamento da maquinaria responsável pelo encaminhamento dos mesmos aos lisossomos e pela mediação da fusão dessas organelas. Proteínas do citoesqueleto trabalham para o encaminhar os autofagossomos à região perinuclear, onde os lisossomos estão preferencialmente localizados. Microtúbulos servem como o caminho no qual as proteínas motoras cinesinas e, principalmente, dineínas deslizam carregando os autofagossomos. Proteínas como a GTPase Rab7 funcionam como adaptadores para conectar os autofagossomos às proteínas motoras [165].

Já a maquinaria de fusão engloba principalmente: Rab GTPases, proteínas de fixação e SNAREs. Rabs, como a Rab7, servem para ativar e recrutar as proteínas de fixação do complexo HOPS (*homotypic fusion and vacuolar protein sorting*). Esse complexo atua para manter em proximidade as membranas das organelas a serem fundidas - autofagossomo e lisossomo - funcionando como uma ponte entre elas e, assim, dando suporte à fusão mediada pelas SNAREs [165]. SNAREs são proteínas de membrana localizadas em complexos de membrana opostos que podem interagir um com o outro. Na autofagia, as SNAREs STX17 (*Syntaxin 17*) e SNAP29 (*synaptosomal-associated protein 29*) nos autofagossomos e as SNAREs VAMP7 e VAMP8 nos lisossomos já foram descritas por mediar a fusão dessas organelas [154, 166].

Por fim, uma vez liberado o conteúdo dos autofagossomos no lúmen do lisossomo, as enzimas lisossomais vão então degradar e reciclar esses componentes de volta para as células. Os lisossomos contêm mais de 50 hidrolases ácidas - entre fosfatases, nucleases, glicosídeos, proteases, peptidases, sulfatases e lipases – que são capazes de degradar virtualmente qualquer macromolécula celular. As proteases catepsinas B, L e D são das moléculas mais ativas na degradação da carga autofágica [167]. A figura 8 ilustra o mecanismo da autofagia e as principais moléculas envolvidas na execução de cada etapa.



**FIGURA 8. A AUTOFAGIA E SEUS EXECUTORES.** A FIGURA ILUSTRA AS DIFERENTES ETAPAS DO FLUXO AUTOFÁGICO - NUCLEAÇÃO, EXPANSÃO, SELEÇÃO DA CARGA, FECHAMENTO E MATURAÇÃO, ENTREGA AOS LISOSSOMOS E DIGESTÃO ENZIMÁTICA -, BEM COMO AS PRINCIPAIS MOLÉCULAS ENVOLVIDAS EM CADA UMA DELAS.

### 5.2.2 Controle e regulação do processo autofágico

Existem diversos acontecimentos ou situações celulares capazes de ativar autofagia, tais como a privação de aminoácidos e/ou de glicose, baixos níveis de acetil-coA, baixos níveis de



ferro, baixa relação intracelular NADPH/NAD<sup>+</sup>, presença de quantidades elevadas de amônia, dentre outros [155]. Desses, os mais bem caracterizados, e para os quais os mecanismos moleculares estão melhor detalhados, são os decorrentes dos baixos níveis de aminoácidos e glicose, conforme discutido a seguir.

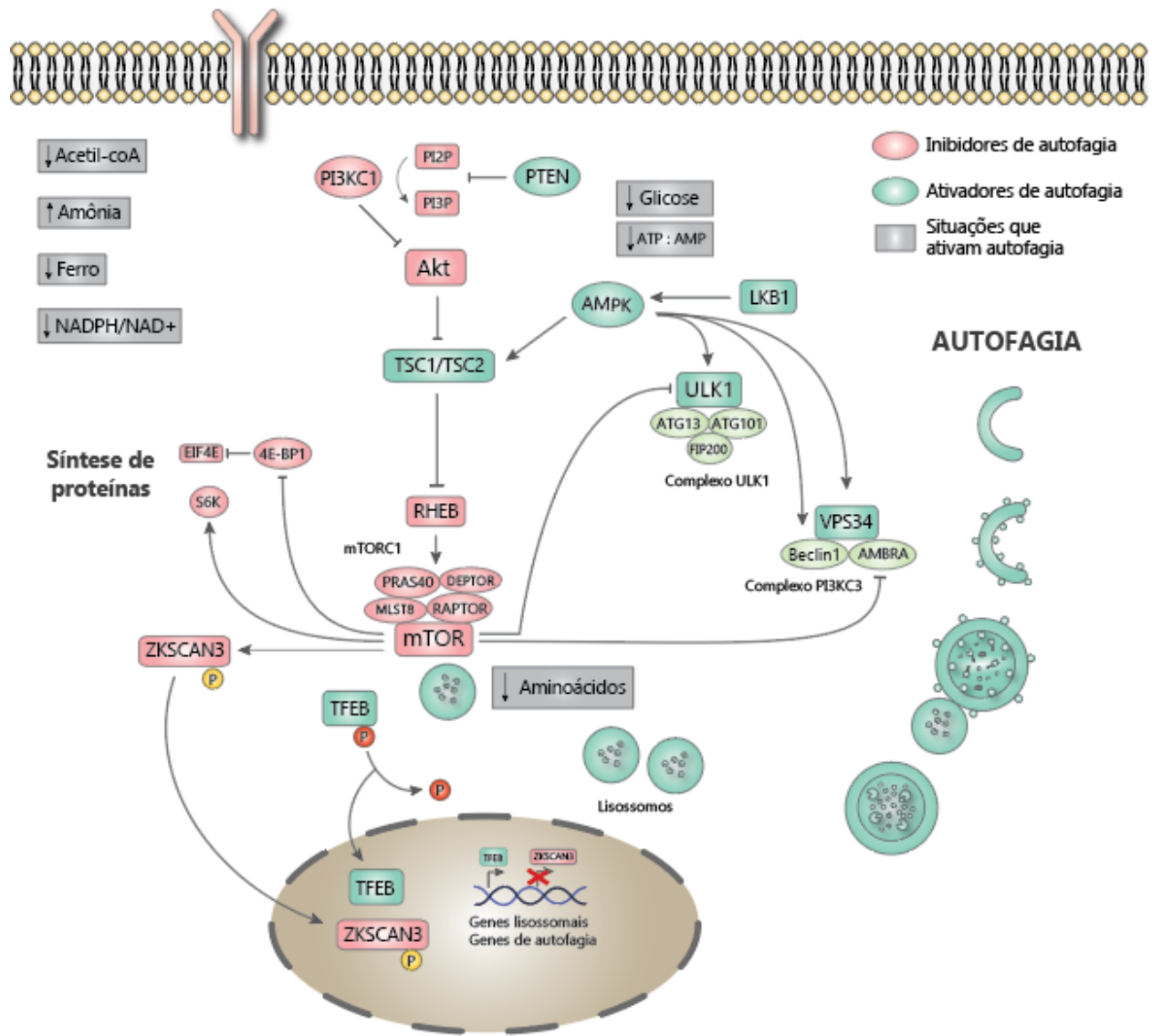
A privação de aminoácidos não-essenciais pode ativar a autofagia de diferentes formas [155]. A mais conhecida delas é por meio da inibição da serina/treonina quinase mTOR, um dos principais reguladores do crescimento celular. mTOR pode ser encontrado no citoplasma em dois complexos proteicos distintos - mTORC1 e mTORC2; no entanto, somente mTORC1 atua diretamente sobre a autofagia. mTORC1 é composto por mTOR e pelas proteínas RAPTOR (*regulatory-associated protein of MTOR*), PRAS40 (*Proline-Rich Akt Substrate 40 KDa*), MLST8 (*MTOR-associated protein, LST8 homolog*) e DEPTOR (*DEP-domain-containing MTOR-interacting protein*) [168]. Diante de condições energéticas intracelulares favoráveis, a quantidade de aminoácidos presente no lúmen dos lisossomos se eleva e ativa um sensor que atua no recrutamento de mTORC1 para a membrana dessas organelas. Esse sensor envolve ATPases lisossomais, Rag GTPases e o ativador de mTORC1, RHEB (*Ras homolog enriched in brain*). Ao chegar à membrana dos lisossomos, mTORC1 é então ativado por RHEB [169]. Nessas condições, mTORC1 inibe a autofagia por meio da fosforilação e inibição de ULK1, ATG14 e AMBRA; e estimula o processo de síntese proteica ao ativar o fator EIF4E (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E*) e a proteína S6K (*ribosomal protein S6 kinase*) [170]. Todavia, diante da privação de nutrientes, os níveis de aminoácidos detectados no lúmen dos lisossomos diminuem e, assim, o mecanismo de recrutamento e ativação de mTORC1 na membrana lisossomal é desligado [171], permitindo que o processo autofágico seja iniciado via ULK1. Por estar diretamente conectado às principais vias de anabolismo e catabolismo celular, mTOR acaba atuando como um dos maiores sensores energéticos da célula.

A autofagia também pode ser induzida pelo declínio dos níveis de energia – ATP - decorrentes da privação de glicose. Esse desequilíbrio é detectado pela relação dos níveis de ATP:AMP intracelulares, controlados pelas enzimas quinases AMPK (*5'AMP-activated protein kinase*) e LKB1 (*liver kinase B1*). Diante de uma baixa disponibilidade energética, com altos níveis de AMP, LKB1 ativa AMPK que, por sua vez, atua na inibição indireta de mTORC1 via ativação do complexo TSC2 (*tuberous sclerosis 2*). Esse complexo é responsável por inibir o ativador de mTORC1 RHEB. Como TSC2 é regulado pela interação com WIPI3 e FIP200, o envolvimento da via LKB1-AMPK-TSC2 na regulação mTORC1 permite a coordenação entre a indução de autofagia e a formação de autofagossomos [172]. AMPK também pode induzir

autofagia de maneira direta, independente de mTOR, por meio da fosforilação e ativação de ULK1, VPS34 e Beclin 1 [173].

Diversos outros mecanismos de controle de autofagia na célula vêm sendo descobertos, incluindo a participação de fatores de transcrição e de mecanismos epigenéticos. Um dos fatores de transcrição que atua como regulador-chave da autofagia é o TFEB (*transcription factor EB*). TFEB é um fator geral de transcrição responsável pelo controle da biogênese lisossomal e de genes envolvidos na autofagia. Dessa forma, quando ocorre a ativação de autofagia em resposta a diferentes estímulos, TFEB é ativado e transloca-se para o núcleo. Lá, promove a transcrição de genes que participam em todas as etapas do processo autofágico, incluindo *ATG4*, *ATG9B*, *MAP1LC3B*, *UVRAG* e *WIPIs*; além de regular múltiplos genes lisossomais, como proteínas de membranas e diferentes enzimas [174]. Entretanto, diante de condições energéticas favoráveis, TFEB encontra-se fosforilado e retido no citoplasma. Essa fosforilação inibitória é mediada principalmente por mTOR - ocorrendo nas proximidades de seu sítio de ativação nos lisossomos - e leva à ligação de TFEB às proteínas 14-3-3, que sequestram essa molécula no citoplasma [175]. Os membros da família TFEB, por sua vez, controlam a ativação de mTORC1 por meio da regulação da expressão do complexo ativador de mTOR nos lisossomos, formando assim outro circuito de retro-alimentação que equilibra o estado metabólico das células [176]. Por fim, outro fator de transcrição, o ZKSCAN3 (*Zinc Finger Protein With KRAB And SCAN Domains 3*), funciona como antagonista de TFEB. Diante da ativação de mTORC1, ZKSCAN3 migra para o núcleo e reprime a transcrição de mais de 60 genes-alvo de TFEB envolvidos na autofagia e nas funções lisossomais [174]. A figura 9 ilustra os principais eventos - mecanismos e vias de sinalização –responsáveis por ativar ou inibir a autofagia nas células.

Para uma revisão completa de fatores de transcrição e reguladores epigenéticos de autofagia, referir-se a [174] e [177], respectivamente.



**FIGURA 9. VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NO CONTROLE DA AUTOFAGIA.** A FIGURA MOSTRA AS VIAS DE SINALIZAÇÃO ATIVADORAS DE AUTOFAGIA EM VERDE E INIBIDORAS DE AUTOFAGIA EM ROSA. SITUAÇÕES CELULARES QUE ESTIMULAM A ATIVAÇÃO DO PROCESSO AUTOFÁGICO ESTÃO APRESENTADAS NAS CAIXAS EM CINZA.

## 6. Autofagia e câncer

Conforme mencionado no tópico anterior, a autofagia é um mecanismo que atua para manter a homeostase fisiológica das células, auxiliando na resposta a diferentes situações de estresse. A autofagia reage a flutuações tanto intracelulares quanto extracelulares nos estados nutricional, metabólico, oxidativo, químico e físico. No câncer, situações de estresse celular e alterações nesses estados acontecem a todo tempo e, por isso, a autofagia desempenha um

papel crucial no processo de formação e progressão dessa doença [178]. No entanto, é importante se considerar que a relação entre autofagia e câncer é extremamente contexto-dependente. É intrigante o fato de que o câncer foi uma das primeiras doenças a ser associada à deficiência de autofagia [179] e, ao mesmo tempo, é uma das primeiras doenças para a qual ensaios clínicos estão sendo realizados a fim de inibir esse processo [180]. Esse paradoxo, todavia, pode ser parcialmente explicado pelos efeitos característicos da autofagia em diferentes estágios do desenvolvimento tumoral [181]. Os mecanismos pelos quais a autofagia relaciona-se com múltiplos aspectos dessa doença são discutidos a seguir.

Sabe-se que o processo de geração de um tumor (tumorigênese) inicia-se a partir de um conjunto de alterações genéticas que levam ao aumento da capacidade proliferativa das células e que são causadas pelo gradual acúmulo de danos celulares. Nesse contexto, por contribuir para a manutenção da integridade celular, a autofagia possui um papel supressor tumoral, trabalhando para impedir que tais danos se tornem exacerbados ou irreversíveis e que levem à transformação maligna das células. A associação entre a deficiência de autofagia e o aumento do risco de câncer já foi mostrada de diferentes formas. Uma delas foi por meio da relação existente entre a perda de função de genes que participam do processo autofágico – como *BCN1* [179], *ATG7* e *ATG5* [182], *ATG4* [183] e *AMBRA* [184] - e o desenvolvimento de diversos tipos de tumor. Outra evidência é a correlação inversa entre genes que promovem a autofagia e oncogenes, bem como a correlação positiva dos mesmos com genes supressores tumorais [185]. Como exemplo, alguns dos principais genes supressores tumorais, como *PTEN*, *TSC1*, *TSC2* e *LKB* levam à ativação de autofagia por inibirem mTOR; do contrário, oncogenes como os que codificam as quinases PI3K e Akt ativam mTOR e, por consequência, inibem o processo autofágico. O principal mecanismo pelo qual a autofagia ajuda a prevenir a transformação das células é por meio da remoção de organelas celulares danificadas, proteínas envelhecidas ou agregados proteicos, e componentes tóxicos, os quais aumentariam o estresse genotóxico e ativariam sinalizações pró-inflamatórias, facilitando a formação de tumores [186–188]. Foi descrito inclusive que a autofagia pode participar na eliminação de fatores prejudiciais específicos como micronúcleos, retrotransposons endógenos e patógenos com potencial de induzir transformação maligna [178]. As principais contribuições da autofagia para impedir o processo de tumorigênese estão resumidas na figura 10A.

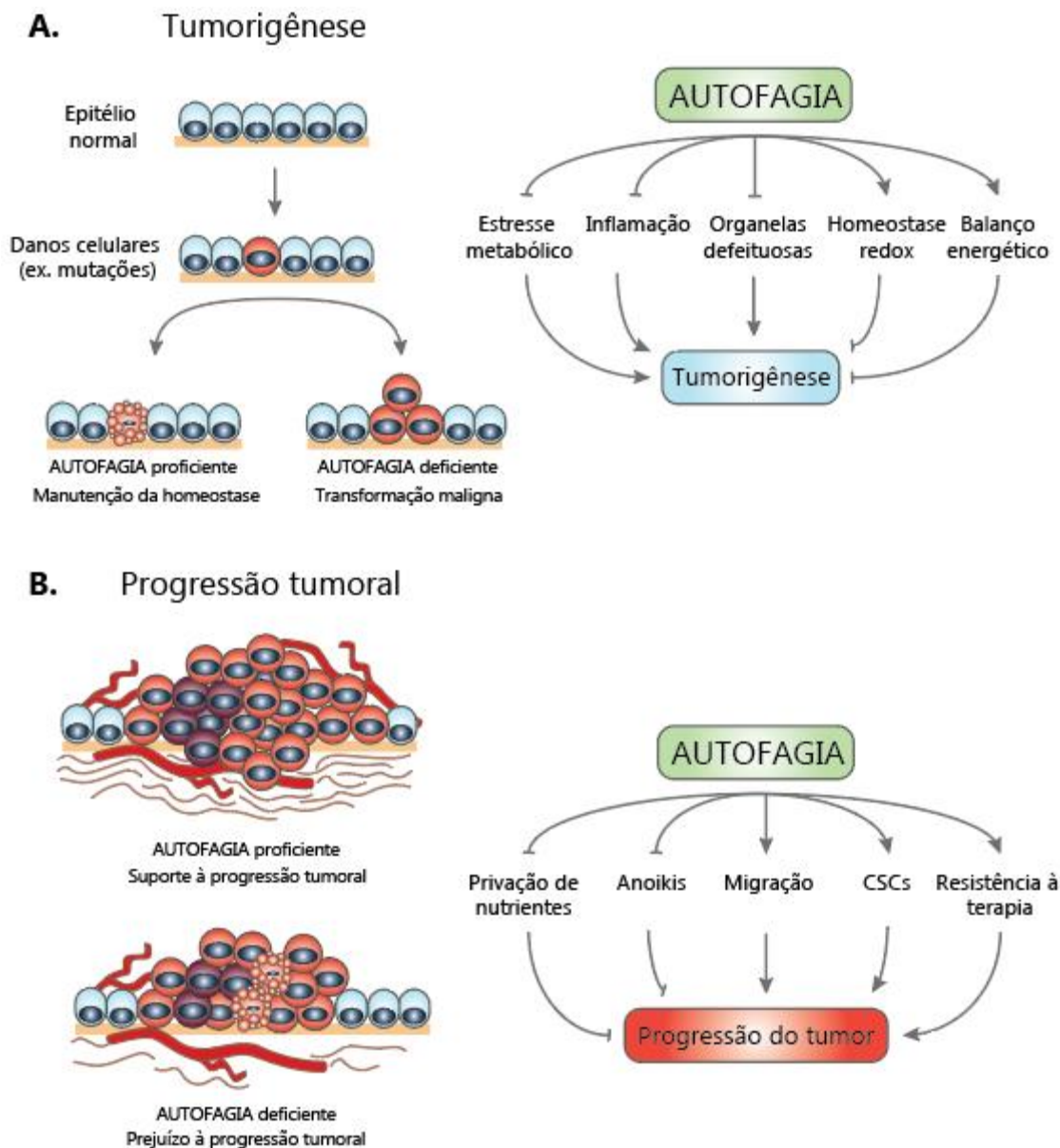
No entanto, se os danos causados não conseguem ser reparados, as células sofrem transformação e dá-se início ao desenvolvimento do tumor. Nessa etapa, novamente, a autofagia vai atuar como um mecanismo citoprotetor, porém passando a proteger as células malignas e

por consequência, a favorecer o seu crescimento. A autofagia fornece plasticidade metabólica às células cancerígenas, permitindo-lhes prosperar em ambientes adversos frequentemente encontrados no sítio tumoral. Um exemplo de tal situação é o de que muitas vezes, devido à rápida proliferação das células tumorais, o aporte sanguíneo torna-se insuficiente e as células passam por condições de restrição de nutrientes. Além disso, essa situação também acarreta no baixo suprimento de oxigênio, gerando regiões de hipóxia principalmente no centro da massa tumoral (no caso de tumores sólidos). A autofagia já foi descrita por tornar as células do câncer mais resistentes a ambas as condições [189, 190]. Foi recentemente mostrado em gliomas, inclusive, que o tratamento antiangiogênico com bevacizumab (anticorpo anti-VEGF) é capaz de induzir autofagia em CSCs e ativar nessas células o potencial de mimetizar células endoteliais e formar uma microvasculatura nesses tumores (característica conhecida como *vascular mimicry*, VM) [191]. Somado a isso, a autofagia pode ainda atuar simplesmente para manter o pool de CSCs, o que aumenta o grau de malignidade da doença, pois as mesmas são responsáveis por manter o tumor em progressão e contribuem para a resistência à terapia [192].

Em tumores já bem desenvolvidos, algumas células acabam adquirindo a capacidade de metastatizar, formando novos focos da doença em tecidos e órgãos distantes, que acabam sendo responsáveis pela maior parte da mortalidade associada ao câncer [193]. Para que consigam formar metástases, as células cancerígenas aderentes do sítio tumoral primário precisam adquirir potencial de motilidade e migrar até o sítio metastático, sobrevivendo aos riscos encontrados nesse trajeto. O potencial de motilidade é adquirido pelas células através do processo de EMT, no qual as mesmas sofrem reprogramação a um estado mesenquimal, rearranjando seu citoesqueleto, perdendo a polaridade apico-basal e reduzindo as moléculas de adesão célula-célula e célula-ECM [194]. A ativação da autofagia mostrou regular negativamente alguns dos principais fatores de indução de EMT [195, 196]. Foi mostrado, por exemplo, que a supressão de autofagia leva ao acúmulo do receptor autofágico p62/SQSTM1, o qual liga-se aos indutores de EMT e impede sua degradação favorecendo o processo de transição, como ocorre com fator Twist1 [197]. Outros trabalhos também demonstraram a inversa correlação entre autofagia e EMT [198–200]. Em um estudo recente foi observado que a caderina 6 (CADH6), uma proteína intimamente relacionada ao processo de EMT e altamente expressa em tumores, prejudica o processo autofágico por possuir capacidade de interagir com proteínas autofágicas como GABARAP e BNIP3 através de domínios LIR [200].

Todavia, como consequência à EMT, as células tumorais desprendem-se da matriz extracelular para poderem então migrar em direção aos vasos sanguíneos e posteriormente

chegar aos sítios metastáticos. Nessa etapa as células podem sofrer anoikis, uma forma específica da morte celular por apoptose que resulta do desprendimento prolongado de células da matriz extracelular [201]. Já foi mostrado em diferentes estudos que a autofagia pode promover resistência à anoikis, possivelmente atenuando as deficiências metabólicas das células que encontram-se separadas da ECM [202, 203]. Entre os sinais intracelulares envolvidos nesse processo estão a ativação de AMPK via PERK (*protein kinase RNA-like ER kinase*) e da via de NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*) [204]. A autofagia também pode desempenhar papel importante sobre a migração das células por atuar no controle do remodelamento do citoesqueleto durante a movimentação das mesmas. Para que as células migrem, suas adesões focais (complexo de proteínas envolvidas na relação célula-ECM) precisam ser desmontadas e então reconstruídas de maneira coordenada. A autofagia contribui para esse remodelamento, controlando o *turnover* de componentes-chave desses complexos proteicos, como a paxilina e a vinculina [205]. Além disso, a autofagia também pode mediar o *turnover* de RHOA (Ras homolog Family member A), proteína indispensável na regulação da dinâmica do processo migratório, envolvida principalmente na formação das protrusões da membrana celular [206]. As principais contribuições da autofagia para a progressão tumoral são resumidas na figura 10B.



**FIGURA 10. AUTOFAGIA E A EVOLUÇÃO TUMORAL.** A FIGURA RESUME AS PRINCIPAIS ASSOCIAÇÕES JÁ DESCRITAS ENTRE A ATIVAÇÃO DE AUTOFAGIA E A EVOLUÇÃO DO CÂNCER – TANTO NA TUMORIGÊNESE (A) QUANTO NA PROGRESSÃO TUMORAL (B).

Por fim, existe o conceito cada vez mais claro de que a autofagia pode modular não só as células malignas, mas também o microambiente tumoral. CAFs e adipócitos associados ao tumor, por exemplo, possuem níveis mais elevados de autofagia do que fibroblastos e adipócitos normais [207, 208] e acredita-se que esse fator contribua para a capacidade dessas células de auxiliar na progressão do câncer. As próprias células do tumor podem induzir autofagia nas células do TME [209]; em contrapartida, a autofagia nas células do estroma atua na secreção de

moléculas pró-tumorais, como IL6 e IL8 [207]. Substratos metabólicos que alimentam a fosforilação oxidativa também podem ser liberados pelas células do TME em decorrência de altos níveis de autofagia, como aminoácidos [210], ácidos graxos [208], dentre outros [178]. Reforçando essas características, um estudo recente mostrou a associação entre a presença de CAFs com altos níveis de LC3-II (forma lipidada) e o mal prognóstico e alta taxa de recidiva em pacientes com câncer de mama [211].

Como consequência aos fatores acima descritos, a indução de autofagia está diretamente relacionada com a resistência à terapia, o que já foi descrito para tumores cerebrais [212], melanoma [213], cânceres de bexiga [214] tireoide [215], pulmão [216], ovário [217], esôfago [218], dentre outros. Nesse contexto, a inibição farmacológica da autofagia tem sido proposta como uma estratégia para aumentar a eficácia de agentes terapêuticos antitumorais. Inúmeros modelos *in vitro* e *in vivo* comprovam os efeitos benéficos dessa abordagem [178, 219–222]. Na clínica, os esforços atuais para inibir a autofagia estão principalmente focados na inibição tardia do processo via cloroquina (CQ) e hidroxicloroquina (HCQ) – drogas que tamponam o pH dos lisossomos e impedem seu funcionamento. Um dos primeiros resultados de ensaios clínicos em câncer visando à inibição de autofagia foi realizado em pacientes com glioblastoma e mostrou que a combinação de CQ com os tratamentos de radiação e TMZ conseguiu triplicar o tempo de sobrevida médio dos pacientes [180]. Alguns ensaios clínicos posteriores corroboraram, enquanto outros não mostram vantagens na utilização dessa abordagem [220]. Inibidores contra outros reguladores de autofagia, como VPS34 [223, 224] e ULK1 [225] já foram descritos e mostraram inibir o crescimento de células tumorais em modelos *in vitro* e *in vivo*. No entanto, a comprovação clínica dos efeitos dessas drogas ainda é necessária.

Curiosamente, alguns tipos de tumor exibem alta atividade autofágica independentemente da presença de estímulos estressores, sendo, por isso, conhecidos como tumores viciados em autofagia (*autophagy addicted tumors*) [220]. Algumas características comuns a esses tumores têm sido reveladas, tais como a existência de mutações em quinases relacionadas ao crescimento e proliferação das células, como RAS e BRAF, e a amplificação do receptor EGFR [220]. Essas células utilizam a autofagia para lidar com a superativação metabólica causada por essas mutações. O interessante é que, em decorrência disso, esses tumores tendem a responder melhor a inibidores de autofagia do que tumores não-dependentes da mesma, como mostrado recentemente em pacientes com tumor cerebral que foram tratados com HCQ [212]. Existem também os casos de tumores e terapias específicas nos quais a ativação, e não a inibição, de autofagia pode ter papel benéfico. Esses representam



principalmente os casos que envolvem a indução de morte celular imunogênica (ICD). Nesse tipo de morte, as células liberam substâncias (DAMPs, Padrões Moleculares Associados a Danos) que são reconhecidas pelas células do sistema imune e resultam na ativação de uma resposta antitumoral, principalmente por parte das células T. Foi mostrado que a autofagia contribui para a liberação de DAMPs e para a ICD. Nesses casos, sua ativação pode ser considerada uma estratégia para aumentar a eficácia terapêutica [226].

Em suma, diante do abrangente papel da autofagia nas células, não há dúvidas de que a mesma é essencial aos tumores; no entanto, entende-se que uma abordagem generalizada a fim de inibir ou ativar a autofagia no câncer não é factível. Ainda, para a maioria dos casos nos quais o tumor já está estabelecido parece existir um controle refinado do processo autofágico a fim de que o mesmo ocorra em um nível no qual as células tumorais conseguem ao mesmo tempo favorecer a instabilidade genômica e a reprogramação metabólica sem comprometer sua capacidade de adaptação a situações de estresse. Por isso, dentro do contexto da medicina de precisão, é necessário adaptar as intervenções a cada situação, considerando as características e o grau de desenvolvimento de cada tumor.

## **7. Heterogeneidade tumoral e as análises de células únicas**

A heterogeneidade dos tumores representa hoje um dos maiores desafios para seu diagnóstico e tratamento [227], funcionando como combustível para o desenvolvimento da resistência terapêutica. Durante a progressão de um tumor, diferentes subpopulações de células com capacidade de resistir a um determinado tratamento podem surgir e se expandir, e essa parcela de células pode ser proveniente tanto da expansão clonal de uma única subpopulação da massa tumoral, quanto de várias populações subclonais diferentes [228]. Conceitualmente, uma colônia gerada *in vitro* a partir de célula única deveria ser composta por células-filhas geneticamente e fenotipicamente idênticas à célula de origem, partindo do princípio que a carga genética das células-filhas fosse conservada ao longo das divisões celulares e que este genótipo determinasse a geração do fenótipo celular. No entanto, à parte dos mecanismos genéticos, diversos outros processos influenciam o fenótipo de resistência, tais como a superativação ou o remodelamento de vias de sinalização celular [229], o estado de evolução no ciclo celular [230], alterações epigenéticas [231] e a influência do microambiente tumoral [42], levando a fenótipos heterogêneos mesmo em células com genótipos idênticos. Assim, para o mesmo tratamento, diferentes células podem responder de forma heterogênea [232].

A maior parte do conhecimento científico a respeito da biologia tumoral tem origem em dados populacionais, nos quais assume-se que células pertencentes ao mesmo subtipo são homogêneas e/ou idênticas. Esses dados são obtidos a partir de técnicas experimentais clássicas - como PCR, western blot, southern blot - que avaliam médias populacionais. Muitas vezes, por permitirem uma simplificação da realidade, tais análises ajudam a entender o quadro global de uma determinada questão. No entanto, essas metodologias mascaram a heterogeneidade celular e não permitem a identificação de células raras que podem ser de extrema relevância na determinação de um contexto biológico. No caso do câncer, são essas raras subpopulações que podem ser as responsáveis por resistir ao tratamento e causar a recidiva da doença com o decorrer do tempo.

Muito embora seja possível avaliar células individualmente desde a criação do microscópio, até poucos anos atrás as técnicas existentes para esta finalidade eram limitadas à análise de alguns poucos parâmetros [233, 234]. Uma das únicas técnicas que possibilitava o estudo de minorias celulares, ou de subpopulações de células, em larga escala era a citometria de fluxo. O uso do citômetro de fluxo permitiu que fossem avaliados um número considerável de diferentes marcadores por célula ao mesmo tempo [235]. O desenvolvimento e aprimoramento de novos anticorpos específicos conjugados com diferentes fluoróforos, e de melhores e mais rápidos algoritmos de análise contribuiu para que se conseguisse usar essa técnica no estudo de populações mistas e na identificação de células raras [236].

Contudo, ao longo da última década, novas tecnologias de análises de células únicas que facilitam a resolução da heterogeneidade tumoral têm se tornado amplamente disponíveis e proporcionado novas percepções sobre o comportamento de diferentes tipos de câncer [237]. Por meio da adaptação da técnica de PCR quantitativo em tempo real, por exemplo, surgiram as reações de PCR quantitativo de células únicas, permitindo comparar a expressão de centenas de genes entre as diferentes células tumorais [238]. Da mesma forma foram desenvolvidos os métodos de sequenciamento de DNA e RNA de células únicas, possibilitando uma caracterização ainda melhor de minorias celulares nos tumores [36, 239]. Ainda, ensaios funcionais e análises de imagens também vêm sendo aprimorados e oferecem alternativas atraentes para a captura de informações multidimensionais que esclarecem a identidade e função celular [240]. Tudo isso somado ao desenvolvimento de ferramentas de análise computacionais e estatísticas cada vez mais poderosas provocou um crescimento exponencial na quantidade de informações a respeito dos tumores e, por consequência, no conhecimento gerado a respeito da biologia tumoral e de como ela pode ser explorada para fins terapêuticos.

## 7.1 Citometria de massas

A citometria de massas (MCy), ou CyTOF (citometria por tempo de voo), é uma das técnicas desenvolvidas nos últimos anos para análises de células únicas que traz uma abordagem diferenciada para o estudo da proteômica de populações de células heterogêneas. Por meio do uso de anticorpos conjugados a metais, o método permite a descrição em tempo real de dezenas de marcadores - proteínas - no nível de célula única, e com o rendimento necessário para avaliar milhões de células em uma mesma amostra. Assim, essa plataforma tornou-se extremamente atraente para se obter uma visão panorâmica dos tumores [241].

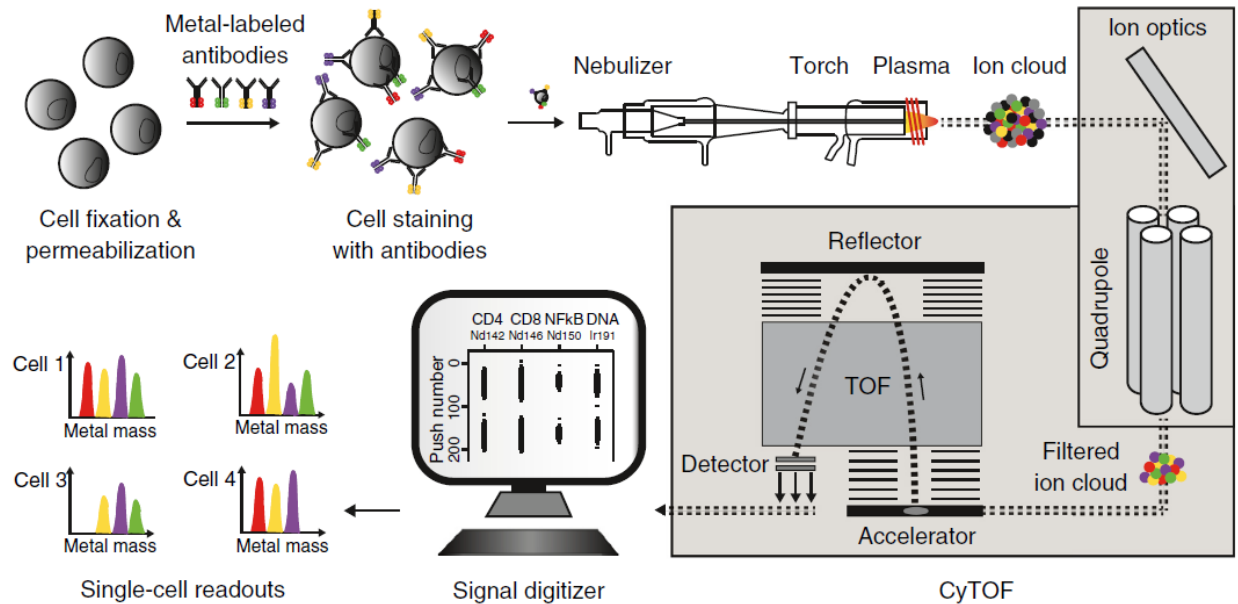
Como explícito no próprio nome, a citometria de massas surgiu a partir da combinação das técnicas de citometria de fluxo e espectrometria de massas. Para se fazer uma comparação, na citometria de fluxo as células a serem analisadas são marcadas com anticorpos específicos conjugados a diferentes fluoróforos. A suspensão de células marcadas é então passada por um capilar estreito no qual incide um laser de determinado comprimento de onda. Os fluoróforos são excitados por esse laser e emitem luz, o que é lido nos detectores do equipamento [235]. No caso da citometria de massas, cada anticorpo é conjugado a um polímero quelado com um isótopo de metal estável único de massa atômica definida; o isótopo atua como o repórter. Quando as amostras são introduzidas no equipamento, as massas e abundâncias dos repórteres de metal ligados às células através dos anticorpos são determinadas e a detecção de cada elemento se dá por meio da sua razão massa/carga ( $m/z$ ), assim como nas análises por tempo de voo na espectrometria de massas. Esses níveis se correlacionam então com o nível de cada epítipo dentro de cada célula [242].

Geralmente, quatro a cinco polímeros se ligam a cada anticorpo, e cada polímero carrega até 30 átomos de metais. O número total de metais que podem ser ligados a um anticorpo, combinado com o nível de sensibilidade do método, resulta em um limite de detecção de centenas de cópias para uma dada molécula. Os metais empregados na citometria de massa são predominantemente os da família dos lantanídeos. Esses metais possuem baixa abundância na natureza - o que contribui para que as análises tenham um ruído (*background*) extremamente baixo - e estão disponíveis em pelo menos 38 isótopos puros de massas únicas adequados para reações químicas com polímeros quelantes de metais [243]. Além dos lantanídeos, outros elementos e seus isótopos também são usados em alguns casos, como por exemplo o Iridio - para marcar o conteúdo de DNA das células e detectar possíveis *doublets* - e a Platina

(Cisplatina) - para avaliar a viabilidade celular [244, 245]. Todas essas possibilidades aumentam consideravelmente o número total de parâmetros que podem ser quantificados em um mesmo experimento. Enquanto que o número alcançado com as técnicas baseadas em fluorescência - o qual é limitado pela sobreposição dos espectros - fica em torno de 10 (com um estudo mostrando o máximo de 17 parâmetros [246]), o número avaliado por CyTOF pode chegar a pelo menos 60 [247].

Conforme mencionado, o equipamento utilizado na citometria de massas, o citômetro de massas, é uma adaptação de um espectrômetro de massas de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) modificado para a aplicação em forma de citometria. Dessa forma, para se avaliar uma amostra, uma suspensão de células individuais é preparada e injetada no equipamento. Dentro dele, essa suspensão é primeiramente nebulizada para formar gotículas de células únicas que são posteriormente evaporadas numa câmara aquecida, e então distribuídas como um fluxo num plasma de argônio. No plasma, as células são atomizadas e ionizadas, gerando nuvens de íons unicelulares - cada nuvem representa uma célula. Essas nuvens de íons são transferidas então para o alto vácuo do CyTOF, configurado como um instrumento híbrido quadrupolo-TOF. O quadrupolo atua como um filtro de massa, permitindo que apenas íons com uma razão de  $m/z$  acima de 80 entrem no analisador de massa TOF e eliminando, assim, íons menores e abundantes gerados pela ionização celular, tais como  $O^+$ ,  $OH^+$ ,  $O_2^+$ ,  $Ar^+$ , dentre outros.

No TOF, cada nuvem de íons de células é detectada em aproximadamente 200 a 300  $\mu s$ . O analisador mede um espectro de massa completo (com faixa de massa medida entre 100-200  $m/z$ ) em pulsos de 13  $\mu s$ , analisando toda a nuvem de íons de uma célula de 20 a 30 vezes. O volume da nuvem de íons e a frequência de amostragem do detector permitem uma taxa de transferência de amostras de até 1.000 células por segundo. A quantidade de cada repórter de metal é determinada para cada nuvem de íon de célula, e todas as varreduras para uma dada nuvem são posteriormente integradas [247]. Arquivos com os resultados computados são gerados em formato de texto e também de FCS 3.0, o que permite a análise dos dados em diversos softwares de citometria de fluxo, tais como o FlowJo. Uma representação do passo-a-passo da técnica é mostrada na Figura 11.



**FIGURA 11. ETAPAS DE UM EXPERIMENTO DE CITOMETRIA DE MASSAS CYTOF.** APÓS SEREM FIXADAS E PERMEABILIZADAS, AS CÉLULAS SÃO MARCADAS COM OS ANTICORPOS CONJUGADOS AOS ISÓTOPOS DE METAIS PUROS DE MASSA DEFINIDA. AS CÉLULAS SÃO NEBULIZADAS, IONIZADAS E ATOMIZADAS, E ENTÃO INTRODUZIDAS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS QUADRUPOLO-TOF. A COMPOSIÇÃO E QUANTIDADE DE CADA METAL SÃO DETERMINADAS E OS SINAIS DOS DIFERENTES ISÓTOPOS SÃO CORRELACIONADOS COM A PRESENÇA DO RESPECTIVO MARCADOR EM CADA CÉLULA. RETIRADO DE [242].

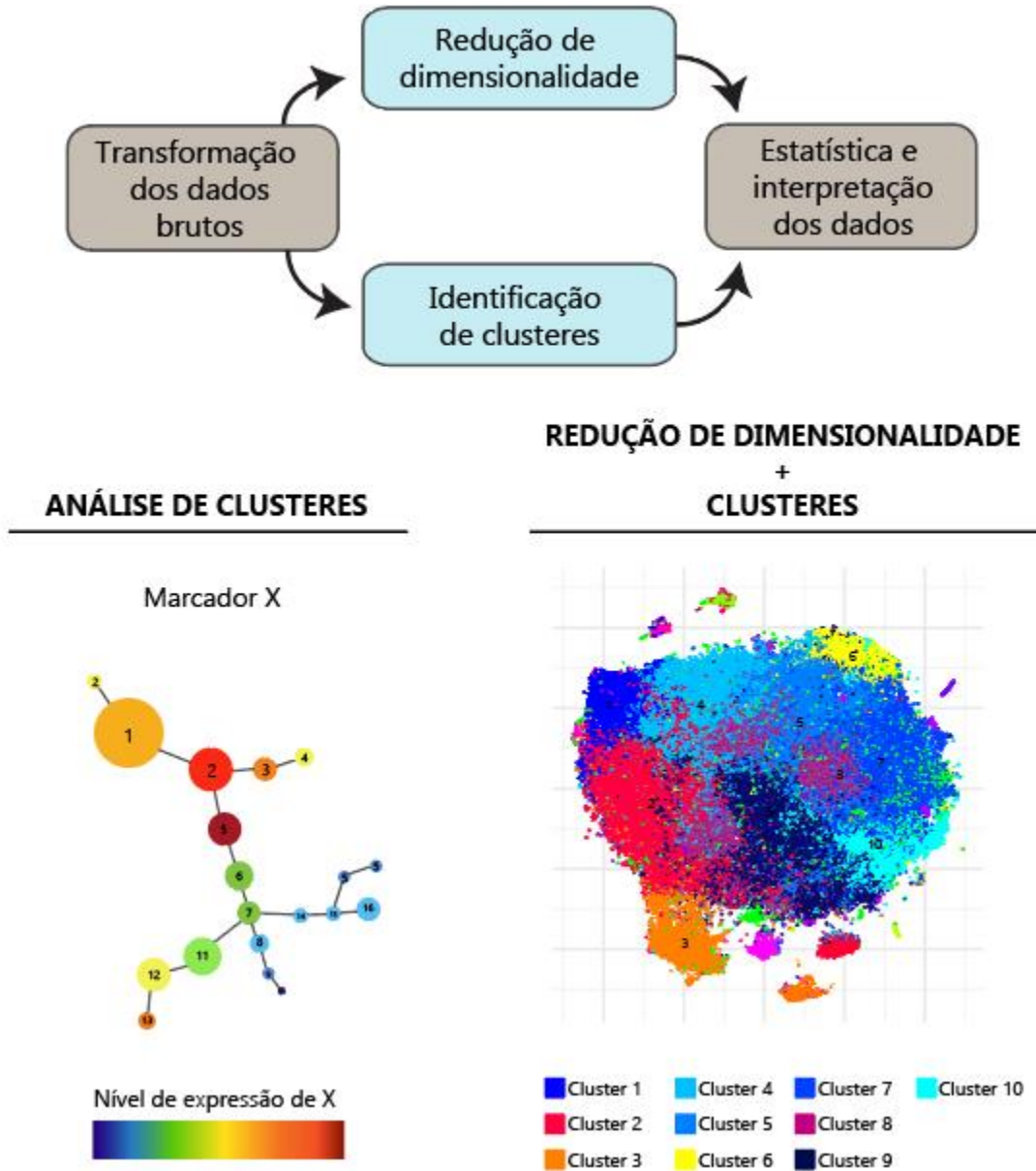
A técnica de citometria de massas, desde a comercialização dos primeiros equipamentos no ano de 2009, tem sido amplamente aplicada. Uma das principais vantagens do método é que ele permite interrogar o comportamento das células a nível de proteínas, que são os definitivos executores dos processos biológicos. Mais do que isso, a técnica não restringe as análises a apenas um nível do metabolismo celular (níveis absolutos de proteínas), pois modificações pós-traducionais e produtos de proteólise também podem ser quantificados a partir de um único experimento. Além disso, níveis de transcritos de mRNA [248], incorporação de nucleotídeos modificados (iododeoxi-uridina) [249], e até mesmo citocinas liberadas pelas células [250] já foram avaliados com uso da técnica. Tudo isso faz com que o método permita uma interrogação profunda dos programas celulares, bem como a investigação da co-regulação e *crosstalk* entre eles, e possa narrar, assim, a história biológica contada por uma amostra.

No entanto, assim como para todas as técnicas de células únicas que avaliam múltiplos parâmetros em larga escala, o grande gargalo da MCy está na forma de analisar os dados gerados. Extrair informações biológicas relevantes de maneira automatizada e imparcial a partir desses dados é ainda uma tarefa complexa. Evidentemente, os dados de MCy podem ser

tratados da mesma forma que os dados de citometria de fluxo são tratados. É possível responder perguntas simplesmente pela identificação de células específicas - através do processo de "gating"- e quantificação de uma característica de interesse nas mesmas. No entanto, isso limitaria o valor da abordagem multiparamétrica [241]. As medidas simultâneas de diversos parâmetros possibilitam uma visão diferenciada dos dados. Ao medir dois parâmetros diferentes em uma amostra - parâmetros A e B, por exemplo - obtemos não só informações de A e/ou de B para aquela amostra, mas também de como A e B se relacionam nas células individuais. Se, agora, considerarmos esse racional aplicado a 50 parâmetros diferentes, podemos ter uma noção da quantidade e complexidade das informações envolvidas nos dados de MCy e de quantas hipóteses podem ser testadas a partir disso.

Existem várias maneiras de se visualizar e analisar dados de citometria de massas. Os métodos (algoritmos) empregados são geralmente classificados, e devem ser escolhidos, de acordo com o objetivo, ou as questões biológicas que eles podem responder, incluindo: visualizar a estrutura global de uma amostra; dividir ou agrupar células em subconjuntos (clusteres) por similaridade; avaliar a progressão temporal de células através de um *continuum* (como em processos de diferenciação); analisar o grau de diversidade das células em uma amostra; interrogar vias de sinalização celular; e avaliar características celulares que se correlacionam com ou predizem determinados resultados [241]. É importante ressaltar que esses objetivos nem sempre são mutuamente exclusivos - alguns algoritmos combinam mais de uma abordagem para chegar à análise final. Nesse sentido, existem duas estratégias importantes que são utilizadas na maioria dos casos. Uma delas é a redução de dimensionalidade. Essa tem por objetivo capturar a maior variância dentro de um conjunto de dados, criando combinações lineares de dimensões para definir novas variáveis compostas. Assim, consegue-se visualizar dados multidimensionais em gráficos de fácil compreensão, contendo duas ou três dimensões, que preservam a estrutura dos dados. Um exemplo clássico dessa estratégia é a análise dos componentes principais (PCA) [251]. A outra estratégia muito comum é a de agrupamento ou *clustering*, a qual visa encontrar similaridades e dissimilaridades entre os eventos (células) para agrupá-los em subconjuntos, ou clusteres [252]. Em geral, os grupos são identificados pela sua proximidade no espaço n-dimensional à sua característica mais similar e pela sua distância de outros grupos em características dissimilares. Essa estratégia é muito utilizada quando se deseja identificar subpopulações de células de acordo com a expressão de determinados marcadores, como é feito, por exemplo, na identificação dos diferentes tipos de células do sistema imunológico. A figura 12 mostra a visualização gráfica dos dados gerada a partir das duas

principais estratégias de análise. Algumas das principais metodologias já desenvolvidas são descritas em [253–258].



**FIGURA 12. ANÁLISE COMPUTACIONAL E FERRAMENTAS DE VISUALIZAÇÃO DOS DADOS DE CITOMETRIA DE MASSAS.** OS DADOS BRUTOS COLETADOS SÃO PRIMEIRAMENTE PROCESSADOS - NORMALIZADOS E TRANSFORMADOS - PARA AS SUBSEQUENTES ANÁLISES. DIVERSAS ABORDAGENS DE ANÁLISE PODEM SER UTILIZADAS. EXEMPLOS DE GRÁFICOS GERADOS A PARTIR DO USO DE ALGORITMOS DE REDUÇÃO DE DIMENSIONALIDADE E CLUSTERIZAÇÃO SÃO MOSTRADOS NA PARTE INFERIOR DA FIGURA. ADAPTADO DE [242].

Em 2012, a empresa Fluidgm<sup>®</sup> (antiga DVS Sciences), que comercializa citômetros de massa, firmou uma parceria com a empresa de softwares e soluções de informática Cytobank<sup>®</sup> a fim de disponibilizar uma plataforma on-line (na nuvem) que permitisse o manejo, a análise e até mesmo o compartilhamento dos dados de citometria de massas. Hoje, essa plataforma, que recebeu o nome de Cytobank, é utilizada por cientistas no mundo todo e permite realizar análises de diversos tipos sem a necessidade de um alto conhecimento prévio de estatística ou computação. No entanto, o acesso ao Cytobank se dá mediante pagamento de uma licença anual, o que acaba restringindo seu uso. Por isso, diversas metodologias de análise de dados vêm sendo desenvolvidas para rodar em plataformas gratuitas. Uma das mais utilizadas é o R<sup>®</sup> Studio, baseado na linguagem R, na qual os usuários podem fazer o download de pacotes de análise diversos e, com isso, realizar todas as análises contidas no Cytobank e muitas outras mais, com liberdade para criar suas próprias estratégias. Recentemente Nowicka e cols. propuseram um *workflow* completo para análise de dados de MCy que abrange a maior parte das técnicas acima descritas [259]. O grupo desenvolveu esse protocolo todo baseado na linguagem R e descreve o passo-a-passo para a reprodução do código e sua aplicação nas mais variadas amostras.

A técnica de MCy ainda é relativamente nova, e seu potencial de geração de dados, não só voltado para a oncologia mas para a biologia como um todo, é enorme. Por isso, muitas ideias e formas de se olhar para os dados produzidos ainda podem ser exploradas. De acordo com informações da própria Fluidgm, pode-se observar que dentre as publicações relacionadas a CyTOF nos últimos anos o maior número de trabalhos é dedicado a elaboração/aprimoramento de métodos e análises de dados, tamanha a sua importância para o crescimento da técnica (<https://www.fluidigm.com/publications/cytof--helios>).



## HIPÓTESES DE TRABALHO

### ***Hipótese I***

As consequências da relação entre as células de um tumor e os componentes de seu microambiente para o desenvolvimento e progressão do câncer ainda são amplamente discutidas e muitas precisam ser melhor elucidadas. No nicho tumoral, MSCs associadas ao tumor desempenham papel importante, principalmente devido à sua capacidade de secretar moléculas que medeiam diversos processos biológicos, tais como a regulação do sistema imunológico, apoptose, proliferação e migração celular, angiogênese, formação de metástases, e até mesmo a resposta à terapia. A maioria desses processos são influenciados pela autofagia, a qual é um mecanismo extremamente dinâmico e adaptativo às condições celulares. A autofagia participa diretamente no controle da homeostase celular, na renovação de moléculas importantes e no suprimento de matérias-primas utilizadas nas reações metabólicas das células. Diante desse cenário, a **hipótese de trabalho I** desta tese é de que o secretoma de MSCs possa modular a autofagia em tumores.

### ***Hipótese II***

A heterogeneidade entre as células de um tumor é o principal obstáculo na busca por terapias que possam erradicar o câncer. Em diversos casos, minorias celulares com fenótipos raros são responsáveis por resistir ao tratamento e levar ao surgimento de um novo foco da doença. Nesse contexto, a combinação de tecnologias para o estudo de células únicas e métodos de análise de dados eficientes é fundamental para que se possa detectar essas minorias de células e identificar o que as diferencia das demais células tumorais. Características como a amplificação de genes, a expressão exacerbada de determinadas proteínas e a ativação anormal de vias de sinalização intracelulares estão frequentemente associadas a esses raros perfis. Diante disso, a **hipótese de trabalho II** desta tese é de que o estudo de *outliers* em dados de células únicas de tumores possa revelar informações relevantes a respeito de células raras com maior potencial de resistência terapêutica.

## OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto do microambiente tumoral em gliomas por meio da investigação do efeito do secretoma de células-tronco mesenquimais na autofagia dessas células e auxiliar na identificação e caracterização de células raras com potencial de resistência à droga por meio da criação de uma abordagem de análise de *outliers* em dados de células únicas tumorais.

### Objetivos Específicos

- i. Investigar os mecanismos de modulação de autofagia pelo secretoma de hADSCs em gliomas;
- ii. Identificar moléculas presentes no secretoma de hADSCs envolvidas na modulação de autofagia em glioma;
- iii. Avaliar as consequências da modulação de autofagia causada pelo secretoma de hADSCs em gliomas;
- iv. Discutir, através de um artigo de revisão, a influência das condições de cultivo celular no comportamento de células de glioma e seu impacto para descobertas experimentais;
- v. Criar uma abordagem metodológica simples que permita identificar *outliers* em dados de células únicas;
- vi. Utilizar a abordagem descrita no item v. para comparar o comportamento de células *outliers* com o comportamento de células não-*outliers* em tumores.

# Capítulo II

## ***Adipose-derived stromal cells secretome disrupts autophagy in glioblastoma***

Artigo em revisão no periódico *Journal of Molecular Medicine*

*As células-tronco mesenquimais são frequentemente recrutadas aos sítios tumorais, onde participam ativamente na formação do microambiente associado ao tumor. O envolvimento dessas células no TME se dá principalmente via comunicação parácrina com os demais componentes deste nicho, intermediando processos biológicos importantes para o desenvolvimento do tumor. Neste capítulo investigamos os efeitos do secretoma de hADSCs na modulação de autofagia em glioblastomas. Os presentes resultados ajudam a elucidar os efeitos parácrinos que as MSCs podem modular nos tumores e chamam a atenção para o potencial a ser explorado no secretoma dessas células.*

## **Adipose-derived stromal cells secretome disrupts autophagy in glioblastoma**

Giovana Ravizzoni Onzi<sup>1</sup>, Juliano Luiz Faccioni<sup>1</sup>, Luiza Cherobini Pereira<sup>1</sup>, Marcos Paulo Thomé<sup>1</sup>, Ana Paula Santin Bertoni<sup>2</sup>, Tiago Fazolo<sup>3</sup>, Eduardo Fillipi-Chiela<sup>4</sup>, Márcia Rosângela Wink<sup>2</sup>, Guido Lenz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biophysics and Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 9500 - Porto Alegre, RS, Brazil. Zip code: 91501-970. Phone number: +55.51.33087620. E-mail addresses: Giovana Ravizzoni Onzi (ORCID 0000-0001-8035-3508) - gioonzi@gmail.com; Juliano Faccioni - julianofaccioni@gmail.com; Luiza Cherobini Pereira – luizacp1998@gmail.com; Marcos Paulo Thomé - marcosp.thm@gmail.com

<sup>2</sup>Department of Health Sciences, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). R. Sarmiento Leite, 245 - Porto Alegre, RS, Brazil. Zip code: 90050-170. Phone number: +55.51.33038792. E-mail addresses: Márcia Rosângela Wink - marciawink@yahoo.com.br; Ana Paula Santin Bertoni - anapsantin@gmail.com

<sup>3</sup>Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 6690 - Porto Alegre, RS, Brazil. Zip code: 90619-900. E-mail address: Tiago Fazolo – tiagofazolors@gmail.com

<sup>4</sup>Department of Morphological Sciences, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. R. Sarmiento Leite, 500 – Porto Alegre, RS, Brazil. Zip code: 90050-170. E-mail address: Eduardo Filippi-Chiela - eduardochiela@gmail.com

\*Corresponding author: Av. Bento Gonçalves 9500 - Porto Alegre, RS, Brazil. Zip code: 91501-970. Phone number: +55.51.33087613. Email address: lenz@ufrgs.br (ORCID 0000-0003-4077-6316);

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Carlos F. Menck and Alexandre T. Vessoni (USP, São Paulo, Brazil) for U87 GFP-LC3 cells, Elisa V. Soares for hADSCs isolation and the Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) core facility at UFRGS for the confocal microscopy experiments. This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, Universal (475882/ 2012-1) and Novas Terapias Portadoras de Futuro (457394/2013-7); PROBITEC CAPES (907/2012); and ICGEB (405231/2015-6). G.R. Onzi is recipient of a PhD fellowship from CNPq. M.P.T is recipient of a PhD fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). A.P.S. Bertoni and E. Fillipi-Chiela are recipients of post doc fellowships from CAPES-PNPD. M.R. Wink and G. Lenz are recipients of CNPq research productivity fellowships.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

Giovana Ravizzoni Onzi: Conception and design, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing

Juliano Luiz Faccioni: Collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation

Luiza Cherobini Pereira: Collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation

Marcos Paulo Thomé: Collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation

Ana Paula Santin Bertoni: Collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation

Tiago Fazolo: Collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation

Eduardo Fillipi-Chiela: Conception and design, data analysis and interpretation, final approval of manuscript

Márcia Wink: Conception and design, final approval of manuscript

Guido Lenz: Conception and design, financial support, administrative support, final approval of manuscript

## **ABSTRACT**

Mesenchymal stromal cells (MSCs) are frequently recruited to tumor sites to play a part in the tumor microenvironment (TME). However, their real impact on cancer cells behavior remains obscure. Here we investigated the effects of human adipose-derived stromal cells (hADSC) secretome in autophagy of glioblastoma (GBM), as a way to better comprehend how hADSCs influence the TME. GBM U-87 MG cells were treated with conditioned medium (CM) from hADSCs and autophagic flux was evaluated. hADSC CM treatment blocked the autophagic flux in tumor cells, as indicated by the accumulation of autophagosomes in the cytosol, the high LC3-II and p62/SQSTM1 protein levels, and the lack of increase in the amount of acidic vesicular organelles. These effects were further detected in co-cultures of hADSCs and U-87 MG. hADSC CM did not compromise lysosomal acidification, however it was able to activate mTORC1 signaling and, as a consequence, led to a decrease in the nuclear translocation of TFEB, a master transcriptional regulator of lysosomal biogenesis and autophagy, thereby contributing to a defective autophagic process. hADSCs secrete Transforming Growth Factor beta 1 (TGF $\beta$ 1) and this cytokine is an important mediator of CM effects on autophagy. A comprehensive knowledge of MSCs roles in tumor biology is of great importance to shed light on the complex dialog between these cells and to explore such interactions therapeutically. The present results help to elucidate the paracrine effects of MSCs in tumors and bring attention to the potential to be explored in MSCs secretome.

**Key-words: Glioblastoma. Tumor microenvironment. Mesenchymal Stromal Cell. Secretome. Autophagy. Autophagic flux blockage.**

## LIST OF ABBREVIATIONS

*MSC, mesenchymal stromal cell; hADSC, human adipose-derived stromal cell; CM, conditioned medium; U87, U-87 MG; TME, tumor microenvironment; GBM, glioblastoma; LC3, Microtubule-associated protein 1 light chain 3; p62/SQSTM1, sequestosome1; TGF $\beta$ 1, tumor growth factor  $\beta$ -1; AVOs, acidic vesicular organelles; AO, acridine orange; TFEB, transcription factor-EB.*

## INTRODUCTION

Tumors are complex ecosystems whose fate is strongly determined by the interactions that take place between malignant cells and other cellular and non-cellular components in the tumor microenvironment (TME). In this scenario, interactions both through cell-cell contact and paracrine signaling are essential to shape tumor development. Glioblastoma (GBMs), one of the most aggressive primary malignancies in adults, present a rich TME made up of a variety of cell types, including glial cells, endothelial cells, immune cells and, as recently described, mesenchymal stromal cells (MSCs) [1–3]. MSCs produce and secrete a wide array of bioactive molecules that can have major effects on GBM progression by regulating cancer cells survival, proliferation, migration and drug resistance, as well as by modulating the immune response [4]. Due to favorable biological features, such as tumor tropism and low immunogenicity [5–7], MSCs were initially proposed as candidates to be implemented as delivery agents in cellular therapies; in cancer, the approach would be to use genetically modified MSCs to target residual malignant cells that survived standard treatments [8, 9]. However, based on conflicting reports in the literature, MSCs can either promote or impair tumor growth, and such effects are likely context-



dependent [6, 10, 11]. Thus, there is still room for improvement in the knowledge about how MSCs and tumor cells relate to each other and several questions need to be addressed before one can decide whether MSCs should be used as a therapeutic tool or as a target.

Autophagy is a key biological mechanism for the maintenance of cell homeostasis, playing a fundamental role in tumor development. Autophagy helps cancer cells to cope with intracellular and environmental stresses [12, 13], hence being able to support tumor survival and metastatic dissemination [14, 15]. Interestingly, non-neoplastic cells in the TME undergoing autophagy also contribute to tumor survival by acting as a nutrient-generating source to feed tumor cells [16]. On the other hand, activation of autophagy can sometimes be detrimental to tumors, for instance potentiating immunogenic therapies [17]. Given this context, approaches to modulate - either upregulate and/or inhibit - this pathway in cancer cells have received great attention [18].

Here we show that the secretome of MSCs derived from human adipose tissue - human adipose-derived stromal cells (hADSCs) - disrupts autophagy in GBM U-87 MG cells, causing an accumulation of autophagosomes in the cytosol and preventing the autophagic flux from being completed. Through the activation of mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) signaling, hADSCs CM leads to a decrease in the nuclear translocation of transcription factor-EB (TFEB) - a master regulator of autophagy- and lysosome-related genes - and this contributes to block the late steps of autophagy. Our results draw attention to the importance of understanding the role of MSCs in the TME and its consequences for tumor behavior, as well as shed light on paracrine mechanisms that can control autophagy in tumor cells, which can be exploited in future anti-cancer therapies.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *hADSCs culture and characterization and conditioned medium production*

hADSCs were collected from adipose tissue of patients undergoing abdominoplasty and/or reductive mammoplasty at the Plastic Surgery Service of Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA) Hospital, in a protocol approved by UFCSPA and ISCMPA's ethics committee (nº 846/11). Cultures were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% of fetal bovine serum (FBS) [19]. Characterization of hADSCs regarding differentiation capacity and stem cell marker expression was previously performed [19]. Conditioned medium from hADSCs was produced as described [19] in DMEM media also containing 5% FBS. Collected CM was filtered in a 0.22 µm membrane (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) and stored at -80°C.

### *GBM cell lines culture and treatment conditions*

U-87 MG (U87) and C6 cells were obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC) and were maintained in the same conditions as hADSCs. U87 cells stably expressing the protein LC3 fused with GFP (U87-GFP-LC3 or simply U87-GL), were kindly provided by Dr. Carlos F. Menck. U87 cells stably expressing mCherry-GFP-LC3 tandem-tagged fluorescent protein (U87-tf-LC3) were previously produced in our lab [20]. hADSC CM was added to GBM cultures pure (hADSC CM group) or diluted in unconditioned medium 1:1 (DMEM+CM group), as indicated. CM from U87-wt cells (U87 CM group) was produced for a set of experiments using the same protocol as for hADSC CM. GBM cells were treated with Rapamycin (RAPA) 200 nM as a positive control of autophagy induction or with Bafilomycin A1 (BafA1) 50 nM as a control of autophagy blockage

(Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA). For negative controls (named as DMEM), cells were cultured in unconditioned media, which consisted of DMEM supplemented with 5% of FBS, the same condition used to grow all cells in this study. Temozolomide (TMZ) (Sigma-Aldrich) was administered at a concentration of 100  $\mu$ M for Population Doubling, DCFH-DA and Mitotracker<sup>®</sup> assays. For Transforming Growth Factor  $\beta$ -1 (TGF $\beta$ 1) experiments, GBM cultures were treated with TGF $\beta$ 1 (Sigma-Aldrich, #T7039) at 10 ng/mL. TGF $\beta$ 1 type I receptor (TGF $\beta$ RI) inhibitor SB431542 (Tocris) was administered at 2  $\mu$ M for the indicated times. Rapamycin, BafA1, TMZ and SB 431542 were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Acros Organics, NJ, USA). All culture materials were obtained from Gibco Laboratories (Grand Island, NY).

#### *Co-culture of hADSCs and U87-tf-LC3 cells*

For co-culturing experiments, hADSCs and U87-tf-LC3 cells were seeded in the same culture dishes for three days in two different proportions: 1:1 (1.5 x 10<sup>4</sup> of each cell type) and 1:2 (1 x 10<sup>4</sup> hADSC: 2 x 10<sup>4</sup> U87-tf-LC3).

#### *Online Resource*

All experimental procedures are described in detail in the Supplementary Methods of the Online Resource. The Online Resource also includes supplementary figures.

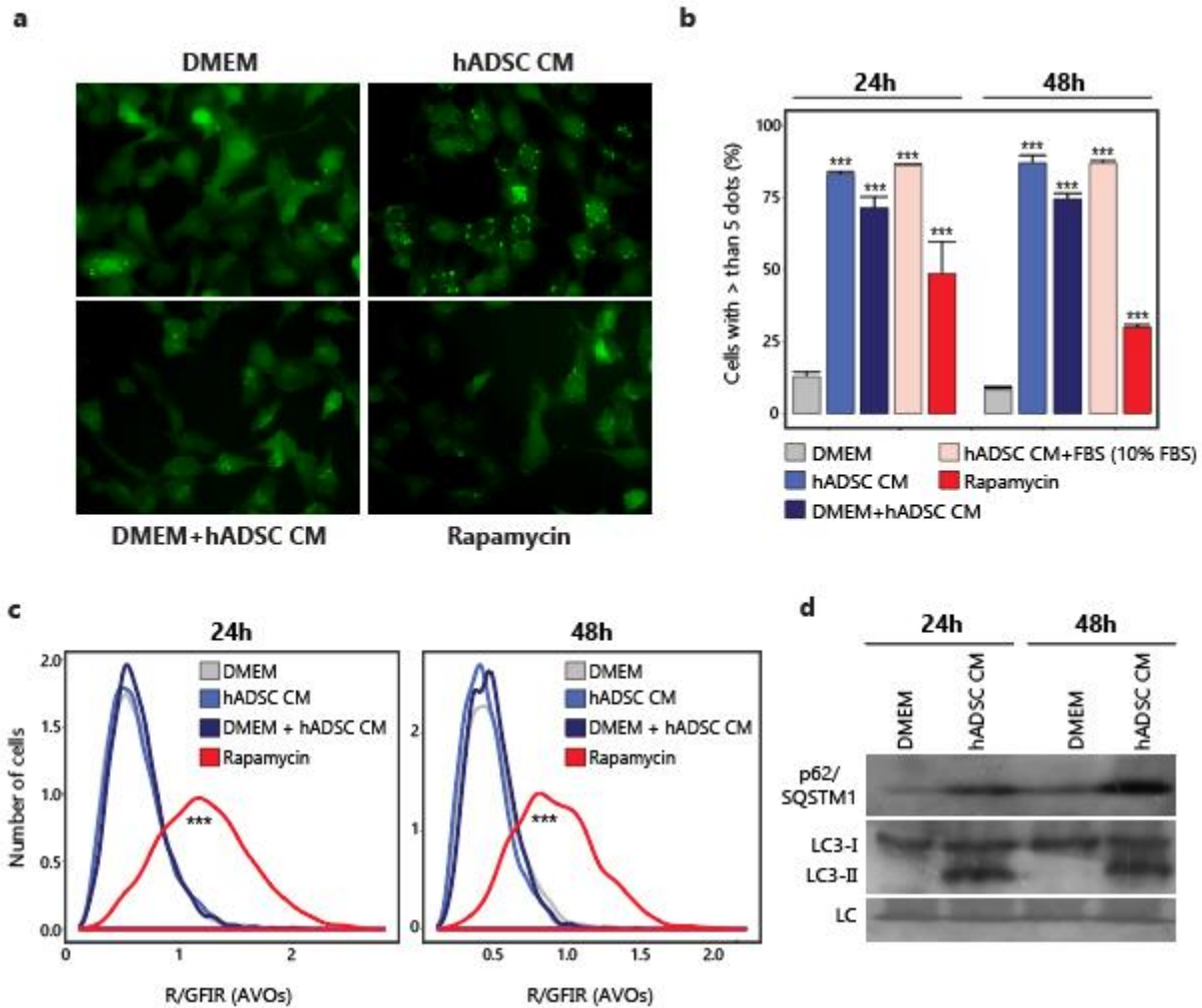
## **RESULTS**

### ***hADSC CM treatment disrupts autophagy in GBM cells***

The first steps of the autophagic flux correspond to the assembly of autophagosome vesicles in the cytosol. A common tool to track this event involves cells in which the LC3 protein

is fused with a GFP molecule. Upon autophagy induction, cytosolic LC3 is lipidated and incorporated in the autophagosome membrane, forming green dots that can be observed by fluorescence microscopy. U87 cells expressing the GFP-LC3 construct (U87-GL) were imaged after treatment with hADSC CM and the green dots were quantified. hADSC CM markedly increased the percentage of cells with more than 5 GFP-LC3+ dots - threshold to consider a cell as autophagic - even when CM was diluted (Fig. 1A and 1B). To rule out the possibility of this effect being associated to lower levels of FBS in the CM when compared to fresh culture medium, cells were treated with hADSC CM supplemented with additional 5% of FBS, for a final concentration of 10% FBS. Under this condition cells still formed as many autophagosomes as when they received hADSC CM without FBS replacement (Fig. 1B).

Contrastingly, however, this increase in autophagosomes was not accompanied by a higher activity in the late steps of the autophagic flux. The number of acidic vesicular organelles (AVOs) in hADSC CM-treated cells, as shown by acridine orange staining, was very similar to the untreated control, in contrast to the Rapamycin-treated positive control (Fig. 1C). To corroborate this result, protein levels revealed LC3-II and p62/SQSTM1 accumulation (Fig 1D). p62/SQSTM1 is known for targeting specific cargoes for autophagic degradation and is also degraded by lysosomal enzymes in the end of the process. Thus, p62/SQSTM1 levels were expected to be reduced upon increased autophagy levels (when the mechanism is completed), as observed for Rapamycin treatment. Taking together, these results indicate that hADSC CM disrupts autophagic flux in U87 cells, leading to autophagosome accumulation yet preventing their fusion with lysosomes and degradation, impairing the late steps of the process.



**Fig. 1 Autophagy is disrupted in hADSC CM-treated GBM cells**

**a.** Photomicrographs (400x magnification) of GFP-LC3+ autophagosomes in U87-GL cells after 48 hours of different treatments. **b.** Quantitative analysis of autophagic cells (more than 5 green dots/cell) for each condition in 24 or 48 hours of treatment (n=4, \*\*\*p<0.001 relative to the untreated control). **c.** Measurement of acidic vesicular organelles (AVOs) by acridine orange staining after 24 (*left*) and 48 (*right*) hours of exposure to the respective treatments (n=4, \*\*\*p<0.001). R/GFIR values correspond to the amount of AVOs. **d.** Western blot for LC3 and p62/SQSTM1 following the indicated treatments. CM: conditioned medium; FBS: Fetal Bovine Serum; LC: loading control; R/GFIR: red-to-green fluorescence intensity ratio.

To confirm these findings, another fluorescence assay that relies on a tandem monomeric mCherry-GFP-tagged LC3 protein was tested to monitor autophagic flux. GFP signal is sensitive

to the acidic pH of the lysosome lumen whereas mCherry is more stable [21]. Therefore, colocalization of GFP and mCherry fluorescences indicates autophagosomes that have not fused with lysosomes. U87-tf-LC3 cells were then used to compare the effects of hADSC CM treatment to other well-known pharmacological modulators of autophagy. hADSC CM, Rapamycin (inducer) and/or Bafilomycin A1 (blocker), were added to U87-tf-LC3 alone or in different combinations, and the number of cells with predominant red or yellow (green and red) fluorescence dots was assessed. Cells that presented less than 5 dots in the cytosol were considered as non-autophagic, whereas cells with predominant red or yellow dots were considered as having, respectively, a profile of autophagy induction or blockage [21]. As shown in Fig 2A, while Rapamycin led to a predominance of "red dot" (RD) cells, hADSC CM increased the percentage of "yellow dot" (YD) cells, resembling the effect of Bafilomycin A1, an inhibitor of the lysosomal H<sup>+</sup>-ATPase that blocks the fusion of autophagosomes to lysosomes. When cells were treated with Rapamycin + hADSC CM, the percentage of RD cells was reduced in relation to Rapamycin alone and a higher proportion of YD cells was observed when compared to untreated control, similar to the Rapamycin + Bafilomycin A1 combination (Fig 2A). Also, p62/SQSTM1 levels were higher in the combinations of Rapamycin + hADSC CM and Rapamycin + Bafilomycin A1 than in cells treated with Rapamycin only (Fig 2B). Altogether, these results demonstrate that hADSC CM blocks the late steps of autophagy, as illustrated in Fig 2C.

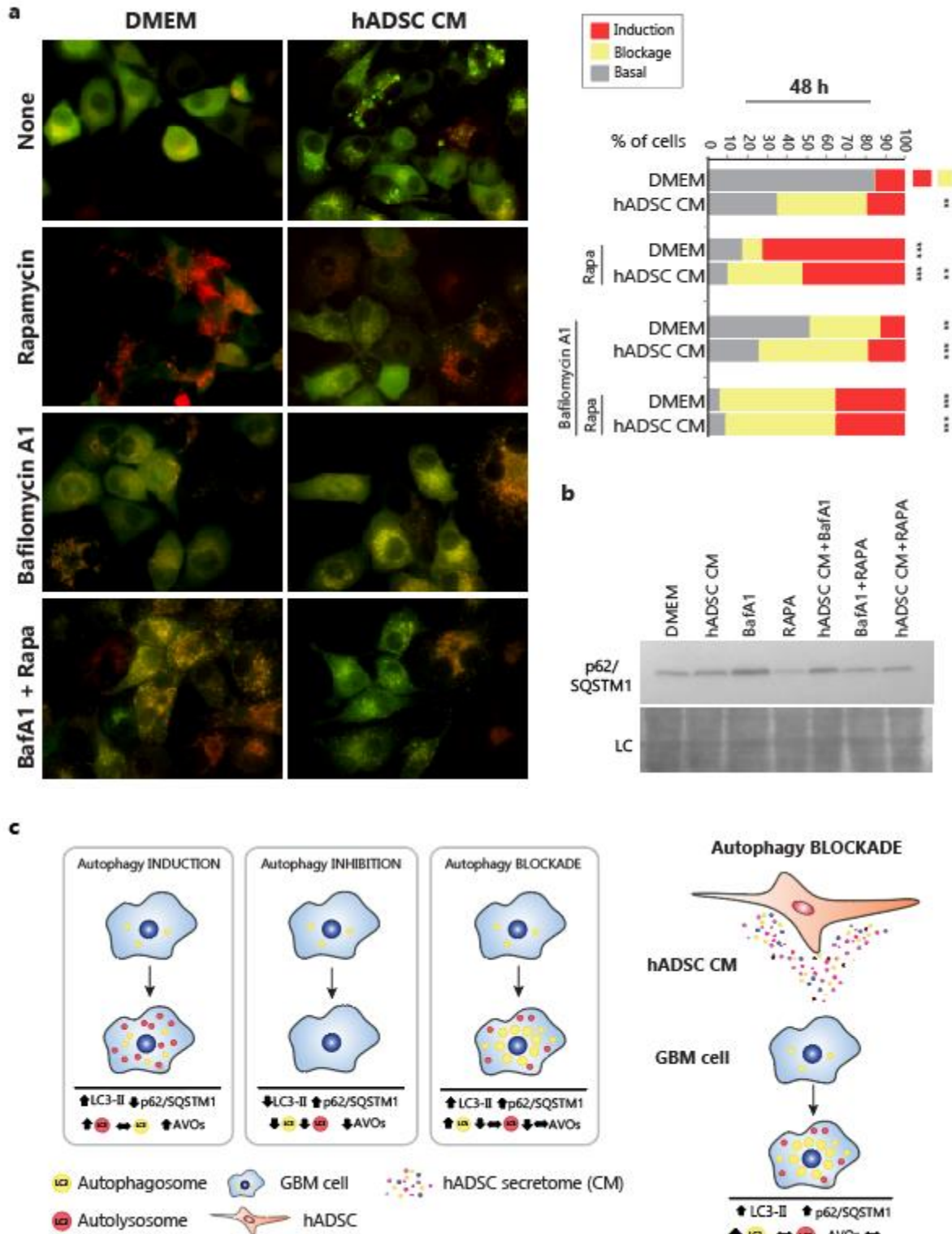


Fig. 2 hADSC CM treatment blocks autophagic flux of GBM cells

**a.** Representative photomicrographs (1000x magnification) of U87-tf-LC3 cells after 48 hours of different treatments (*left*). Relative quantification plots of cells in each established category of autophagy state - basal, blockage or induction (*right*) Statistical significances are all related to the untreated control (DMEM) (n=4, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 all relative to the untreated control). **b.** Western blot for p62/SQTM1 after 48 hours of treatment in the indicated conditions (n=2). **c.** Graphic illustration of the hADSC CM-mediated autophagy blockage. CM: conditioned medium; BafA1: Bafilomycin A1; Rapa: Rapamycin; LC: loading control.

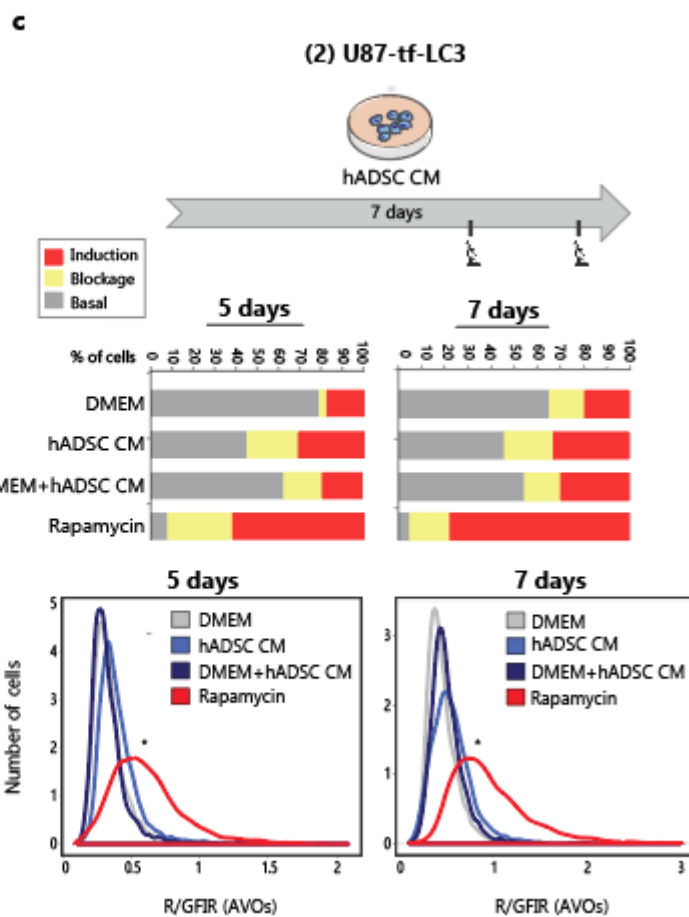
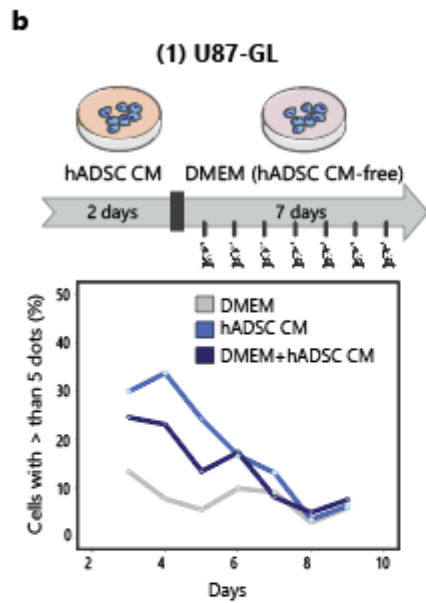
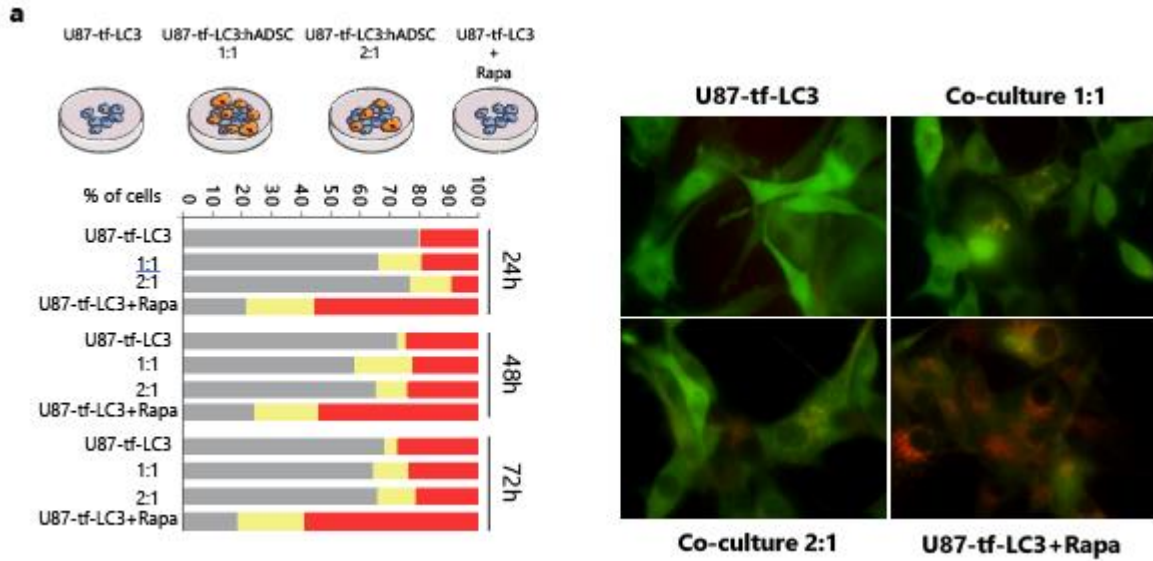
Additionally, hADSCs were co-cultured with U87-tf-LC3 cells to test whether the blockage in autophagy would be affected by cell-to-cell contact. Two different proportions of cells were used for co-cultures - 1:1 and 2:1 U87-tf-LC3: hADSC - and in both conditions there was an increase in the percentage of YD cells when compared to U87-tf-LC3 cultures alone (Fig 3A).

To verify whether hADSC CM effects were specific for molecules released by this cell type, U87-tf-LC3 cells were also treated with CM from U87-wt cells (U87 CM). Unlike hADSC CM, neither the percentage of RD nor YD cells were affected by U87 CM treatment, and p62/SQSTM1 levels remained similar to the untreated control (Online Resource 1A - upper and lower - and 1B). hADSC CM was also tested on a murine GBM cell line - C6 - and, as for U87, there was an increase in both LC3-II and p62/SQSTM1 levels. AVOs quantification through AO flow cytometry was similar to the untreated control (Online Resource 1C – upper and lower).

Finally, analysis of long-term hADSC CM effects in U87-GL cells revealed that soon after CM is removed from the culture (after 48 h of treatment) the percentage of cells with more than 5 green dots tends to reduce until it becomes similar to the untreated control (Fig 3B). However, when U87-tf-LC3 cells were maintained in hADSC CM for longer periods - up to 7 days with CM replacement every 2 days - the percentage of YD cells remained constant. Also, hADSC CM did



not delay autophagosome maturation, as the amount of AVOs detected was similar to the untreated control for all time points analyzed (Fig 3C).



### **Fig. 3 hADSC CM treatment blocks autophagic flux of GBM cells – effects of long-term treatment**

**a.** Co-culture of hADSCs and U87-tf-LC3 cells. Relative quantification plot of U87-tf-LC3 cells in each autophagy state category - basal, blockage or induction - after 24, 48 and 72 hours of co-cultures and controls (*left*) (n=2). Representative photomicrographs (1000x magnification) of U87-tf-LC3 cells in co-cultures and controls (*right*). **b.** U87-GL were cells treated for 48 hours and then cultured in unconditioned medium, as represented on the scheme. The plot shows GFP-LC3+ autophagosomes quantification per cell until day 9. **c.** U87-tf-LC3 cells were maintained for 7 days in hADSC CM, as represented on the scheme. The plots show relative quantification of cells in each established category of autophagy state (*upper*) and measurement of AVOs by acridine orange staining (*lower*). Both experiments were performed on days 5 and 7 (n=2). CM: conditioned medium; R/GFIR: red-to-green fluorescence intensity ratio.

### ***Lysosomal pH, mitochondrial viability and levels of oxidative species were not affected by hADSC CM-mediated autophagy blockage***

Aiming to address the possible causes to hADSC CM-mediated disruption in autophagy, we wondered whether lysosomal alterations, such as changes in the pH of the lumen, could be leading to autophagy blockage [22]. To test this hypothesis, after the treatment with CM, lysosomes from U87-wt cells were tracked with a red fluorescence probe that accumulates inside these organelles in a pH-dependent manner (LysoDeep). hADSC CM did not reduce lysosome staining in comparison to the control (Online Resource 2A), suggesting that the blockage in the late steps of autophagy was not related to alterations in the pH of the lysosomal lumen. No changes were observed as well when a non pH-dependent probe was used (Lysotracker) (Online Resource 2B).

Since a deficient autophagy was shown to trigger intracellular metabolic stress [23], functional mitochondrial mass and levels of reactive oxygen species were assessed in U87-wt cells upon treatment with hADSC CM. Temozolomide (TMZ), the standard chemotherapeutic agent to treat

GBM, was used as a positive control [24]. No alterations were found on these parameters after hADSC CM treatment (Online Resource 2C and 2D).

It was previously shown by our group that modulating autophagy in combination with TMZ extends the time that glioma cells take to reestablish growth, improving drug efficacy [18]. The most effective approach was to induce autophagy before TMZ treatment and then inhibit this mechanism to prevent tumor cells of using it as a way to survive TMZ effects. However, growth reestablishment only took longer times when autophagy was inhibited by targeting its initial steps using 3-MA - a class III PI3K inhibitor. This was not observed when blocking the late steps of autophagy with Bafilomycin A1 [18]. Thus, we decided to investigate whether inducing autophagy before treatment with TMZ, and then blocking autophagy with hADSC CM would affect tumor drug response. To do that, cells received Rapamycin before TMZ, and right after TMZ the hADSC CM was added. As reported for Bafilomycin A1, hADSC CM did not affect cell proliferation in any of the drug combinations, again supporting the late phase-directed autophagy blockage by hADSC CM (Online Resource 2E).

### ***Signaling pathways involved in hADSC CM-mediated autophagy blockage***

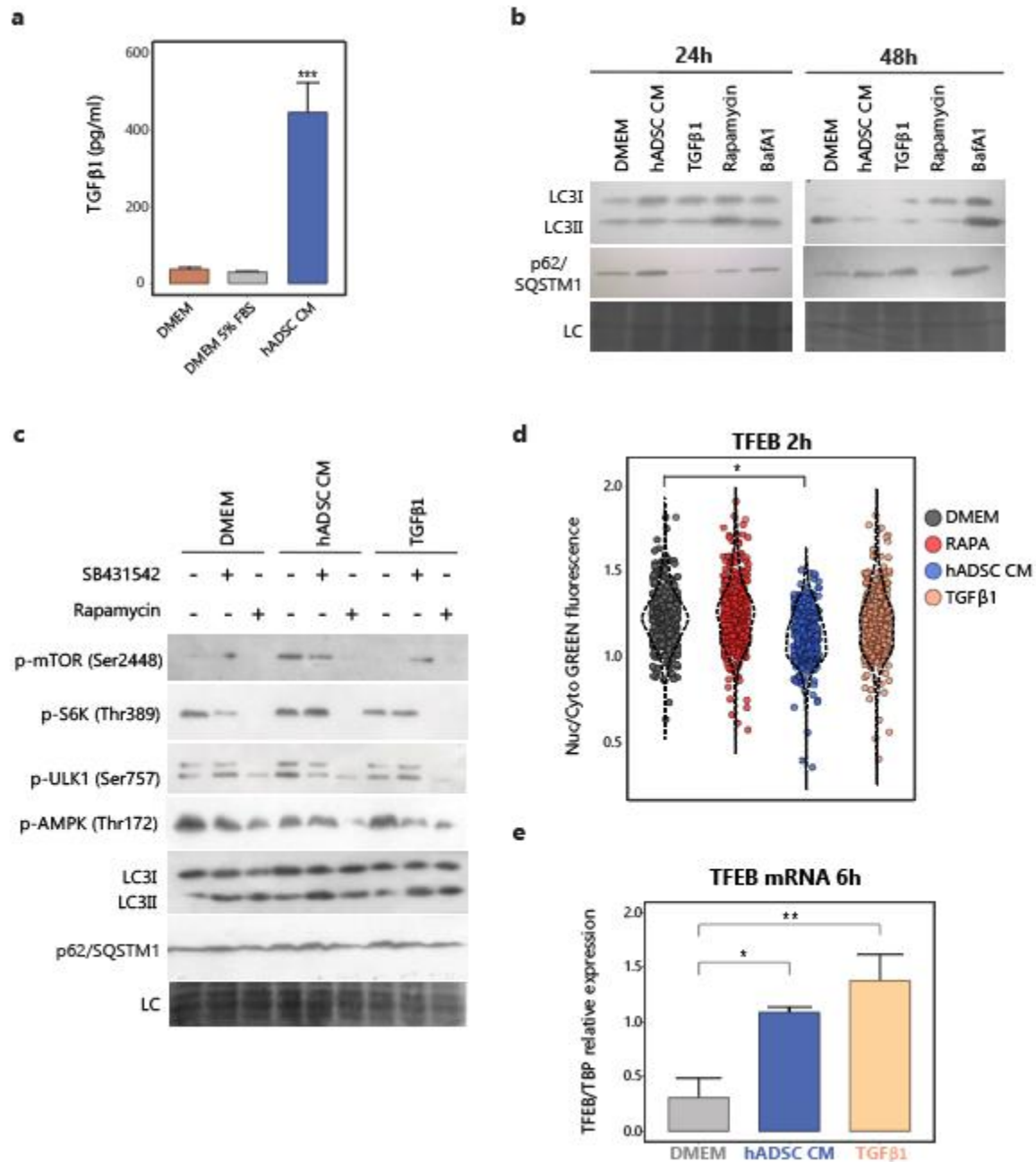
To address the mechanism – particularly paracrine molecules and signaling pathways - involved in hADSC CM-mediated autophagy blockage, we decided to investigate the cytokine TGF $\beta$ . TGF $\beta$  participates in the control of several cell processes including autophagy, which was already described for a range of tumor types [25, 26]. It is also known that MSCs can secrete high amounts of TGF $\beta$ , which was confirmed by the high levels of TGF $\beta$ 1 detected in hADSC CM (Fig 4A). Furthermore, mRNA levels of vimentin, one of the classical targets of TGF $\beta$ , were increased

by both hADSC CM and TGF $\beta$ 1 treatment (Online Resource 3A), although we did not observe a significant nuclear translocation of SMAD4 – an important molecule in the TGF $\beta$  canonical signaling – with CM (Online Resource 2F).

In 48h of treatment, TGF $\beta$ 1 led to an increase in p62/SQSTM1 levels similar to the observed for hADSC CM. Nonetheless, 24h of treatment with TGF $\beta$ 1 reduced p62/SQSTM1 (Fig 4B) and, intriguingly, upon its pharmacological inhibition for 48h, p62/SQSTM1 levels were higher than in the respective control, even when the inhibitor (SB431542) was added to CM treatment (Online Resource 3B). Treatment for 2h of U87-tf-LC3 cells with TGF $\beta$ 1 increased the number of YD cells in relation to control; however, in 48h only the proportion of RD cells was significantly augmented (Online Resource 3C).

TGF $\beta$  can also execute functions through non-canonical pathways, as occurs in the TGF $\beta$ -driven activation of mTOR signaling. mTOR regulates autophagy in different ways, such as by controlling lysosomal function [27]; thus, we wondered whether hADSC CM could be activating mTOR signaling via TGF $\beta$  and thereby leading to autophagy blockage. We found that TGF $\beta$ 1-mediated activation of mTOR pathway was similar to the untreated control and was not reverted upon TGF $\beta$ RI inhibitor administration (Fig 4C), as detected by protein levels of mTOR targets – stimulatory phosphorylation of ribosomal protein S6-kinase (S6K) (Thr389) and inhibitory phosphorylation of Unc51-Like Autophagy Activating Kinase 1 (ULK1) (Ser757). For hADSC CM, however, the expression of these targets was higher than in the control. Furthermore, the phosphorylation levels of AMPK (p-AMPK, Thr172), a classic autophagy-promoting enzyme, were lower in CM-treated cells than in control and TGF $\beta$ 1-treated cells.

One of the most important mechanisms through which mTOR regulates autophagy and lysosomal function is by preventing the master transcriptional regulator TFEB (transcription factor EB) from translocating to the nucleus to trigger the expression of lysosome and autophagy-related genes. We assessed TFEB mRNA levels and nuclear translocation and observed that in 2h of hADSC CM treatment its translocation to the nucleus was compromised (Fig 4D and Online Resource 3D) and after 6h of treatment TFEB gene expression was increased (Fig 4E). These results together suggest that CM acts on the mTOR/TFEB signaling to mediate autophagy blockage. However, although TGF $\beta$ 1 is also affecting autophagy, its mechanisms are less clear and hADSC CM-mediated mTOR activation might not happen solely through TGF $\beta$ .



**Fig. 4 Signaling pathways involved in hADSC CM-mediated autophagy blockage**

**a.** Quantification of TGFβ1 levels in hADSC CM. Values were measured by ELISA (n=3, \*\*\*p<0.001). **b.** Western blot for LC3 and p62/SQSTM1 of U87-wt cells treated as specified for 24 and 48 hours. **c.** Western blot for mTOR signaling and autophagy-related proteins. U87-wt cells were treated under different conditions for 2 hours. When indicated, cells received TGFβRI inhibitor SB431542 (2uM) 30 minutes before the other treatments. **d.** Quantification of nuclear/cytoplasmic green fluorescence intensity ratio of TFEB ICC images after 2 hours of the respective treatments (n=3, \*p<0.05). **e.** TFEB mRNA expression levels

measured by qPCR after 6h of the respective treatments (n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01). CM: conditioned medium; LC: loading control.

## **DISCUSSION**

MSCs actively participate in the TME of human GBM [2] and one major mechanism by which they interact with tumor cells is via secreted factors. Paracrine communication is key for cancer progression, which justifies the growing interest on exploiting the MSCs secretome in tumor biology. Miscellaneous effects caused by MSCs-derived molecules on cancer cells were already described [28, 29]; however, the impact of this secretome on autophagy was not yet defined.

In the present work we show that hADSC CM disrupts the autophagic flux in GBM cells. Treatment with hADSC CM for 48h led to a significant accumulation of autophagosomes and impaired the late steps of the process. High p62/SQSTM1 levels, presence of predominant YD cells in U87-tf-LC3 analysis and lack of increase in the amount of AVOs are all evidences of an incomplete autophagic flux caused by hADSC CM, which were not observed when tumor cells were treated with their own CM (U87 CM). Additionally, lysosome tracking assays showed similar lysosomal mass and pH values between cells that received hADSC CM and untreated cells, indicating that the impairment in the late steps of autophagy was not being caused by alterations in lysosomal mass or in its lumen acidity. Moreover, even though autophagy is crucial to help cells circumvent stressful conditions [30], its disruption by hADSCs secretome did not cause major changes on tumor cells proliferation and response to the chemotherapeutic agent TMZ.

Previous works from our group have shown that CM from MSCs can stimulate GBM cells to migrate [19, 31] and TGF $\beta$ , one of the main cytokines released by MSCs on their environment [32], is a classical inducer of this phenotype. In line with that, high levels of TGF $\beta$ 1 were found in hADSC CM (around 5 ng/mL). It is known that in order to induce epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and migration, TGF $\beta$  upregulates p62/SQSTM1 as means of stabilizing EMT mediators, such as Twist1, for example. p62/SQSTM1 binds to Twist1 and prevents its degradation [33]. This led us to the hypothesis that this molecule could be blocking autophagy as a way to facilitate EMT. TGF $\beta$ 1 caused an increase in p62/SQSTM1 after 48h, consistent with what was observed for hADSC CM. However, the action of this cytokine proved to be more complex than expected, as inhibiting signaling through its receptor TGF $\beta$ RI did not revert the augmented p62/SQSTM1 levels. Also, prior to the increase, TGF $\beta$ 1 reduced p62/SQSTM1 levels, suggesting an initial induction, followed by a blockage in the autophagic flux. Given that cell responses to TGF $\beta$  are highly context-dependent and that autophagy is a dynamic and adaptive process, it is conceivable that there is a refined control of these processes in a time-dependent manner to help cells to accomplish certain functions. As a consequence of that, reports on the literature regarding whether TGF $\beta$  induces or inhibits autophagy have shown that both can occur [26, 34, 35].

mTOR is a central regulator of intracellular energetic balance and, therefore, controls autophagy through multiple mechanisms [36]. It was previously demonstrated that TGF $\beta$  can induce phosphorylation and activation of mTOR in a SMAD-independent but TGF $\beta$ RI-dependent way, in epithelial cells [34]. We wondered if that was the case for hADSC CM, since the canonical SMAD-regulated signaling was not significantly activated by it, as shown in the SMAD4 ICC images. Here



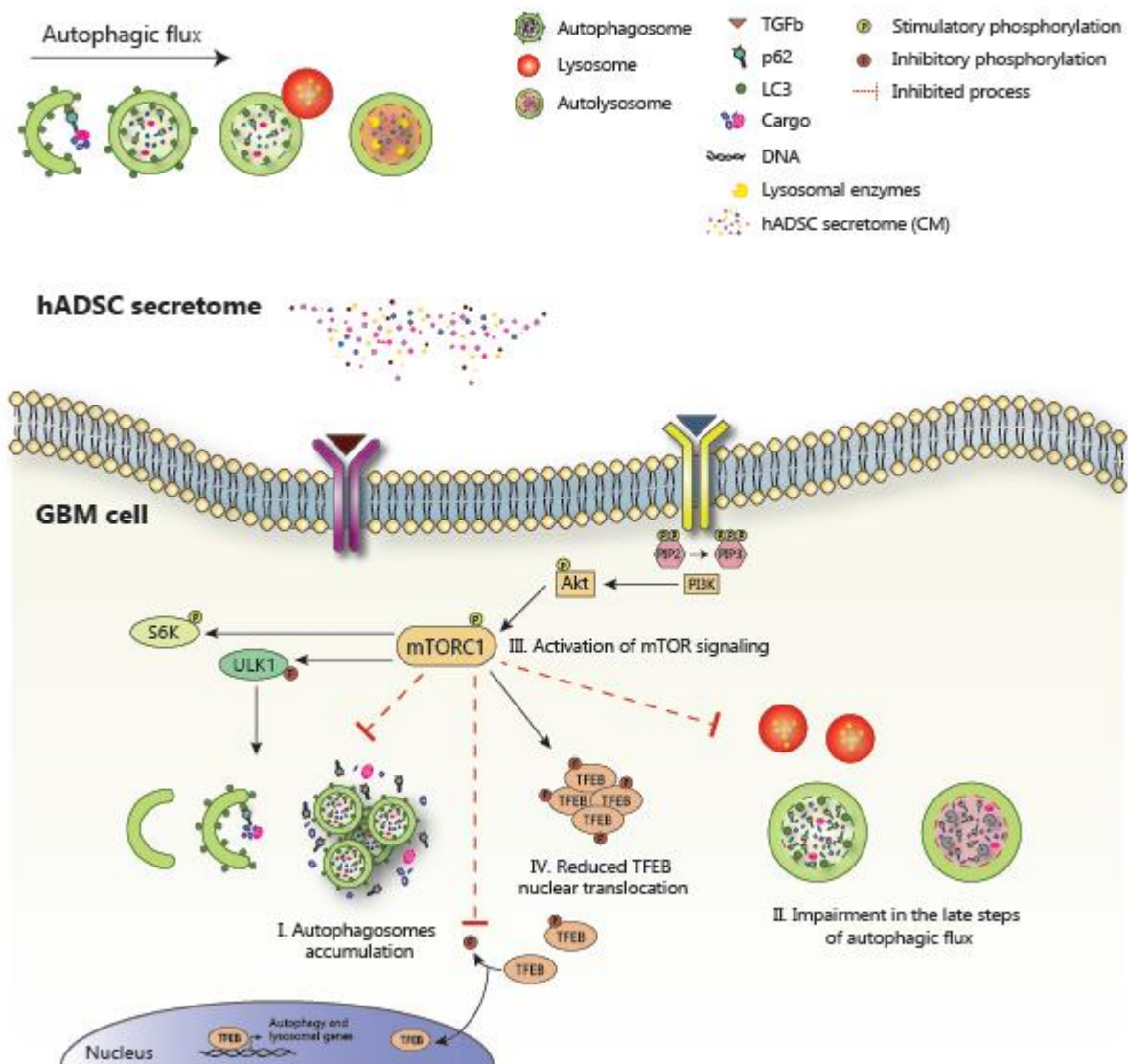
we found that hADSC CM increased the phosphorylation of mTORC1 and its targets S6K and ULK1 in GBM cells, although the levels of the same targets in TGF $\beta$ 1-treated cells were similar to the untreated control. ULK1 participates in the initial steps of autophagy, being involved in autophagosomes formation. hADSC CM led to the accumulation of autophagosomes while inhibited ULK1. Thus, autophagosomes in this case are probably being assembled through an ULK1-independent way, as already described in the literature [37].

Besides being known by its effect on the initial steps of autophagy, mTOR is an important negative regulator of lysosomal function. mTORC1 is located to the lysosomes surface and thereby interferes with different aspects of their activity, such as lysosomal biogenesis, membrane potential and lumen acidification [27]. One of the main mechanisms of mTORC1-mediated lysosomal regulation is the inhibition of nuclear translocation of transcription factor-EB (TFEB) - a master regulator of lysosome and autophagy-related genes [38, 39]. According to that, our results show that, in 2 hours of treatment, hADSC CM reduces TFEB nuclear translocation. Interestingly, when we assessed TFEB mRNA expression after 6h of hADSC CM treatment, we observed an approximate 4-fold increase in relation to control, which can be the result of a feedback response to the lack of TFEB in the nucleus. These findings reinforce that hADSC CM activates mTOR and prevents the autophagic flux from being completed and that, in this context, mTOR actions are preferentially modulating the late steps of the process rather than specifically inhibiting autophagy initiation. A schematic illustration of our main findings is provided in Figure 5.

Nonetheless, we cannot rule out the possibility that other molecules in the CM are also involved in autophagy blockage. Recently published results show that MSCs secretome is enriched for

molecules of the Wnt signaling pathway [32]. This pathway is related to cell migration and invasion and could cause a block in autophagy as a way to prevent  $\beta$ -catenin or dishevelled degradation, for example, as already described [40, 41]. Accordingly, DKK3, a Wnt signaling inhibitor was also described as a marker of high autophagy levels [42].

In summary, the present results highlight the fact that although we are beginning to understand how MSCs and tumor cells interact and how this could be prospected to the development of microenvironment-targeted therapies, many questions and hurdles still remain.



### **Fig. 5 Schematic overview of hADSC CM effects on autophagy in GBM**

MSCs are known to participate in GBM microenvironment and modulate cancer cells behavior. Through the release of molecules such as growth factors and cytokines that interact with surface receptors or are internalized by tumor cells, MSCs can trigger different signaling pathways that will result in a variety of effects. Here we show that the secretome of hADSCs can disrupt autophagy in GBM cells. When U87 cells are in contact with hADSC CM, autophagosomes accumulate in the cytoplasm (I). In addition, the assembly of autolysosomes is compromised and the autophagic flux cannot be completed (II). As a consequence, molecules that were to be degraded by autophagy also start to accumulate. mTOR is a central nutrient sensing molecule that controls the autophagic process in different ways, such as phosphorylating and inhibiting ULK1 - which plays a role in autophagosome formation - or affecting lysosomal function. mTOR phosphorylates TFEB preventing its translocation to the nucleus. As a consequence, TFEB targets are not transcribed, impairing the appropriate function of lysosomes and autophagy. mTOR signaling activation (III) and a reduced TFEB nuclear translocation (IV) were observed when GBM cells were treated with hADSC CM. mTORC1: mammalian Target of rapamycin complex 1; TFEB: Transcription factor-EB; ULK1: Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1; SK6: Ribosomal protein S6 kinase.

### **CONCLUSION**

Our results show that hADSCs secretome disrupted autophagy in GBM cells. Molecules released by hADSCs on their CM were able to block the late steps of the autophagic flux, preventing autolysosomes formation and subsequent degradation. hADSC CM treatment led to a decrease in TFEB nuclear translocation, thereby contributing to a defective autophagy. The cytokine TGF $\beta$ 1 present in hADSC CM is one of the molecules mediating the observed outcomes. These findings emphasize the vast range of processes that MSCs can regulate in cells that live in their surroundings, as well as the various forms through which autophagy can be modulated. From the TME perspective, modulating autophagy can be even more significant, since this biological process is an important contributor to cell survival, especially in glioblastomas. Another challenge will be to investigate how other cells in the tumor niche could be affected by MSCs, which adds even more complexity to the crosstalk that takes place in the TME.

## AUTHOR DECLARATION STATEMENT

The authors have no conflicts of interest to declare.

## REFERENCES

1. Droujinine IA, Eckert MA, Zhao W (2013) To grab the stroma by the horns: from biology to cancer therapy with mesenchymal stem cells. *Oncotarget* 4:651–664. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1040>
2. Shahar T, Rozovski U, Hess KR, et al (2017) Percentage of mesenchymal stem cells in high-grade glioma tumor samples correlates with patient survival. *Neuro-oncology* 19:660–668. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now239>
3. Hossain A, Gumin J, Gao F, et al (2015) Mesenchymal Stem Cells Isolated From Human Gliomas Increase Proliferation and Maintain Stemness of Glioma Stem Cells Through the IL-6/gp130/STAT3 Pathway. *Stem Cells* 33:2400–2415. <https://doi.org/10.1002/stem.2053>
4. Shi Y, Du L, Lin L, Wang Y (2017) Tumour-associated mesenchymal stem/stromal cells: emerging therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 16:35–52. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.193>
5. Caplan AI (2009) Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 217:318–324. <https://doi.org/10.1002/path.2469>
6. Nakamizo A, Marini F, Amano T, et al (2005) Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res* 65:3307–3318. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1874>
7. Yong RL, Shinojima N, Fueyo J, et al (2009) Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas. *Cancer Res* 69:8932–8940. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3873>
8. Porada CD, Almeida-Porada G (2010) Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 62:1156–1166. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.08.010>
9. Bagó JR, Okolie O, Dumitru R, et al (2017) Tumor-homing cytotoxic human induced neural stem cells for cancer therapy. *Sci Transl Med* 9:. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah6510>

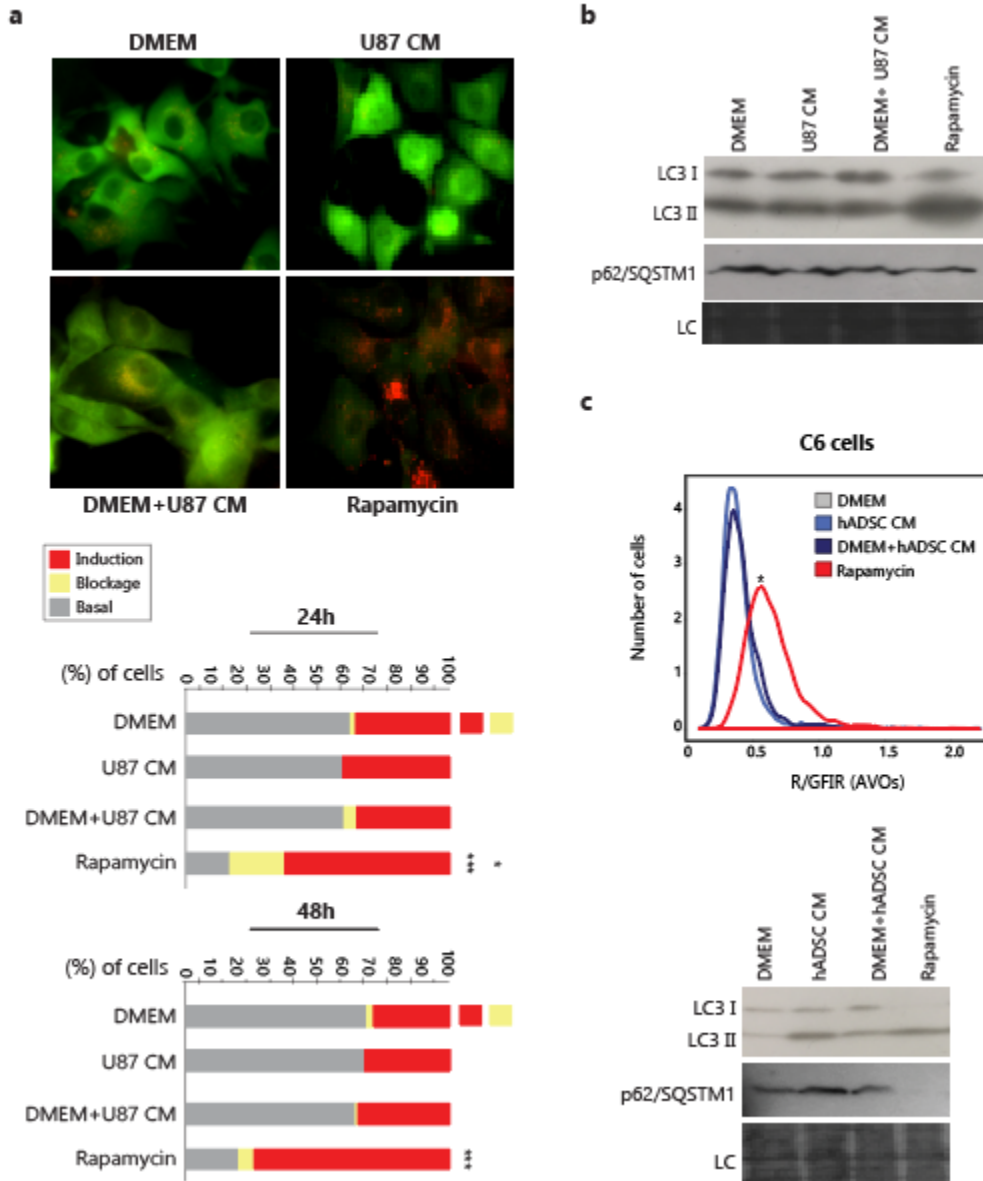
10. Pisati F, Belicchi M, Acerbi F, et al (2007) Effect of human skin-derived stem cells on vessel architecture, tumor growth, and tumor invasion in brain tumor animal models. *Cancer Res* 67:3054–3063. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1384>
11. Behnan J, Isakson P, Joel M, et al (2014) Recruited brain tumor-derived mesenchymal stem cells contribute to brain tumor progression. *Stem Cells* 32:1110–1123. <https://doi.org/10.1002/stem.1614>
12. Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, et al (2015) Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J* 34:856–880. <https://doi.org/10.15252/emj.201490784>
13. Levy JMM, Towers CG, Thorburn A (2017) Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 17:528–542. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.53>
14. Lazova R, Camp RL, Klump V, et al (2012) Punctate LC3B expression is a common feature of solid tumors and associated with proliferation, metastasis, and poor outcome. *Clin Cancer Res* 18:370–379. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1282>
15. Kroemer G, Mariño G, Levine B (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 40:280–293. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.023>
16. Katheder NS, Khezri R, O’Farrell F, et al (2017) Microenvironmental autophagy promotes tumour growth. *Nature* 541:417–420. <https://doi.org/10.1038/nature20815>
17. Pietrocola F, Pol J, Vacchelli E, et al (2016) Caloric Restriction Mimetics Enhance Anticancer Immunosurveillance. *Cancer Cell* 30:147–160. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.016>
18. Filippi-Chiela EC, Bueno e Silva MM, Thomé MP, Lenz G (2015) Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. *Autophagy* 11:1099–1113. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1009795>
19. Onzi GR, Ledur PF, Hainzenreder LD, et al (2016) Analysis of the safety of mesenchymal stromal cells secretome for glioblastoma treatment. *Cytotherapy* 18:828–837. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.03.299>
20. Thomé MP, Filippi-Chiela EC, Villodre ES, et al (2016) Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. *J Cell Sci* 129:4622–4632. <https://doi.org/10.1242/jcs.195057>
21. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12:1–222. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356>

22. Kawai A, Uchiyama H, Takano S, et al (2007) Autophagosome-lysosome fusion depends on the pH in acidic compartments in CHO cells. *Autophagy* 3:154–157
23. Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G (2014) Metabolic control of autophagy. *Cell* 159:1263–1276. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.006>
24. Oliva CR, Moellering DR, Gillespie GY, Griguer CE (2011) Acquisition of Chemoresistance in Gliomas Is Associated with Increased Mitochondrial Coupling and Decreased ROS Production. *PLOS ONE* 6:e24665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024665>
25. Joseph JV, Conroy S, Tomar T, et al (2014) TGF- $\beta$  is an inducer of ZEB1-dependent mesenchymal transdifferentiation in glioblastoma that is associated with tumor invasion. *Cell Death Dis* 5:e1443. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.395>
26. Kiyono K, Suzuki HI, Matsuyama H, et al (2009) Autophagy is activated by TGF-beta and potentiates TGF-beta-mediated growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 69:8844–8852. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4401>
27. Puertollano R (2014) mTOR and lysosome regulation. *F1000Prime Rep* 6:52. <https://doi.org/10.12703/P6-52>
28. Ono M, Kosaka N, Tominaga N, et al (2014) Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Sci Signal* 7:ra63. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005231>
29. Vallabhaneni KC, Penforinis P, Dhule S, et al (2015) Extracellular vesicles from bone marrow mesenchymal stem/stromal cells transport tumor regulatory microRNA, proteins, and metabolites. *Oncotarget* 6:4953–4967. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3211>
30. Dikic I, Elazar Z (2018) Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19:349–364. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>
31. Iser IC, Ceschini SM, Onzi GR, et al (2016) Conditioned Medium from Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) Promotes Epithelial-to-Mesenchymal-Like Transition (EMT-Like) in Glioma Cells In vitro. *Mol Neurobiol* 53:7184–7199. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9585-4>
32. Vieira de Castro J, Gomes ED, Granja S, et al (2017) Impact of mesenchymal stem cells' secretome on glioblastoma pathophysiology. *J Transl Med* 15:. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1303-8>
33. Qiang L, Zhao B, Ming M, et al (2014) Regulation of cell proliferation and migration by p62 through stabilization of Twist1. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:9241–9246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322913111>

34. Lamouille S, Derynck R (2007) Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J Cell Biol* 178:437–451. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611146>
35. Zhang C, Zhang X, Xu R, et al (2017) TGF- $\beta$ 2 initiates autophagy via Smad and non-Smad pathway to promote glioma cells' invasion. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 36:162. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0628-8>
36. Saxton RA, Sabatini DM (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168:960–976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
37. Wong P-M, Puente C, Ganley IG, Jiang X (2013) The ULK1 complex. *Autophagy* 9:124–137. <https://doi.org/10.4161/auto.23323>
38. Settembre C, Di Malta C, Polito VA, et al (2011) TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* 332:1429–1433. <https://doi.org/10.1126/science.1204592>
39. Rocznik-Ferguson A, Petit CS, Froehlich F, et al (2012) The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Sci Signal* 5:ra42. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002790>
40. Ndoye A, Budina-Kolomets A, Kugel CH, et al (2017) ATG5 Mediates a Positive Feedback Loop between Wnt Signaling and Autophagy in Melanoma. *Cancer Res* 77:5873–5885. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0907>
41. Gao C, Cao W, Bao L, et al (2010) Autophagy negatively regulates Wnt signalling by promoting Dishevelled degradation. *Nat Cell Biol* 12:781–790. <https://doi.org/10.1038/ncb2082>
42. Kraya AA, Piao S, Xu X, et al (2015) Identification of secreted proteins that reflect autophagy dynamics within tumor cells. *Autophagy* 11:60–74. <https://doi.org/10.4161/15548627.2014.984273>

Online Resource

Supplementary Figures

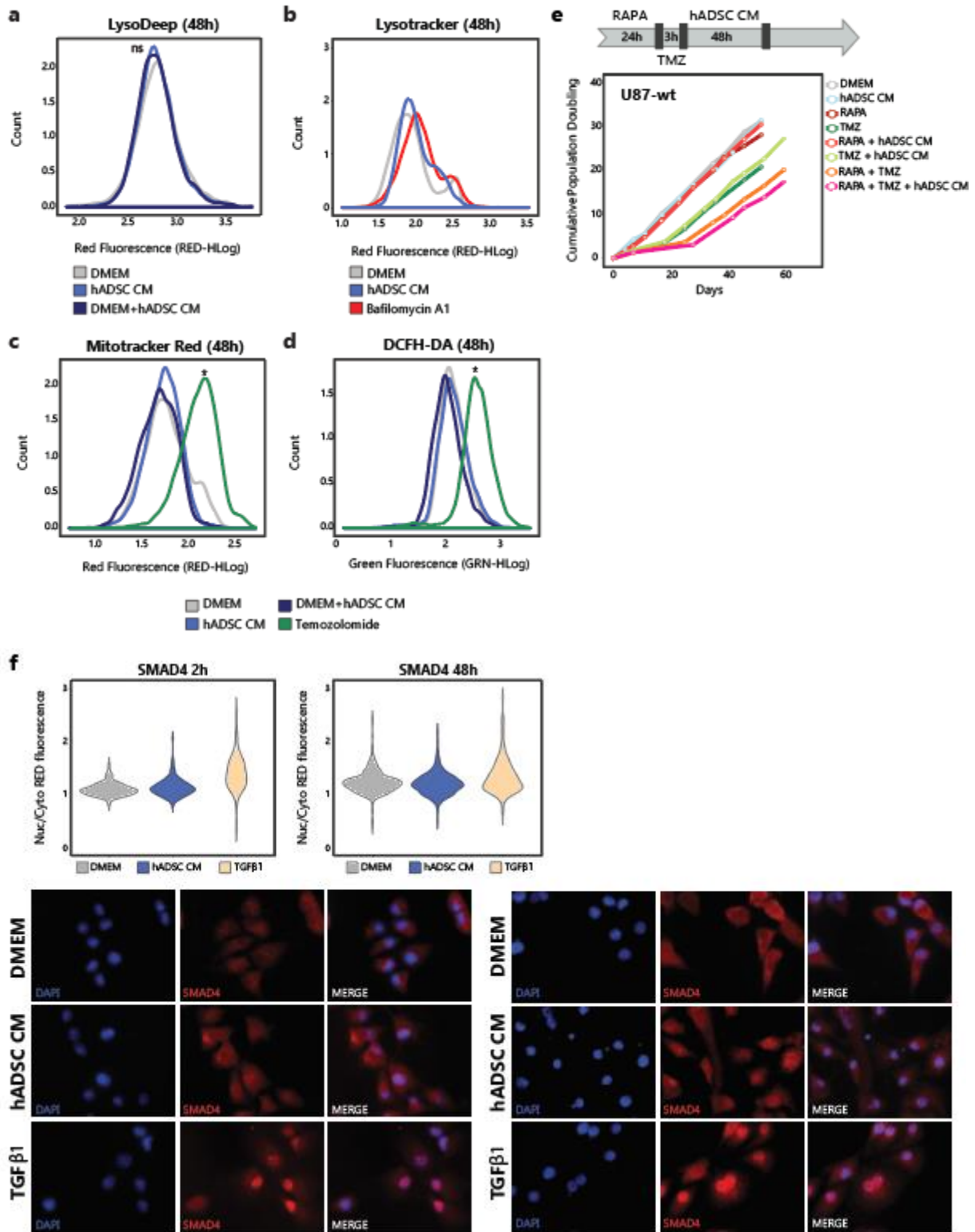


**Online Resource 1.**

**a.** Representative photomicrographs (1000x magnification) of U7-tf-LC3 cells treated with U87 CM and controls after 48 hours (**upper**). Relative quantification plots of U7-tf-LC3 cells in each established category of autophagy state - basal, blockage or induction - following 24 and 48h of U87 CM treatment and controls (**lower**) (n=4, \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 relative to the untreated control). **b.** Western blot for LC3 and p62/SQSTM1 after treatment with U87 CM for 48 hours (n=1). **c.** Measurement of acidic vesicular



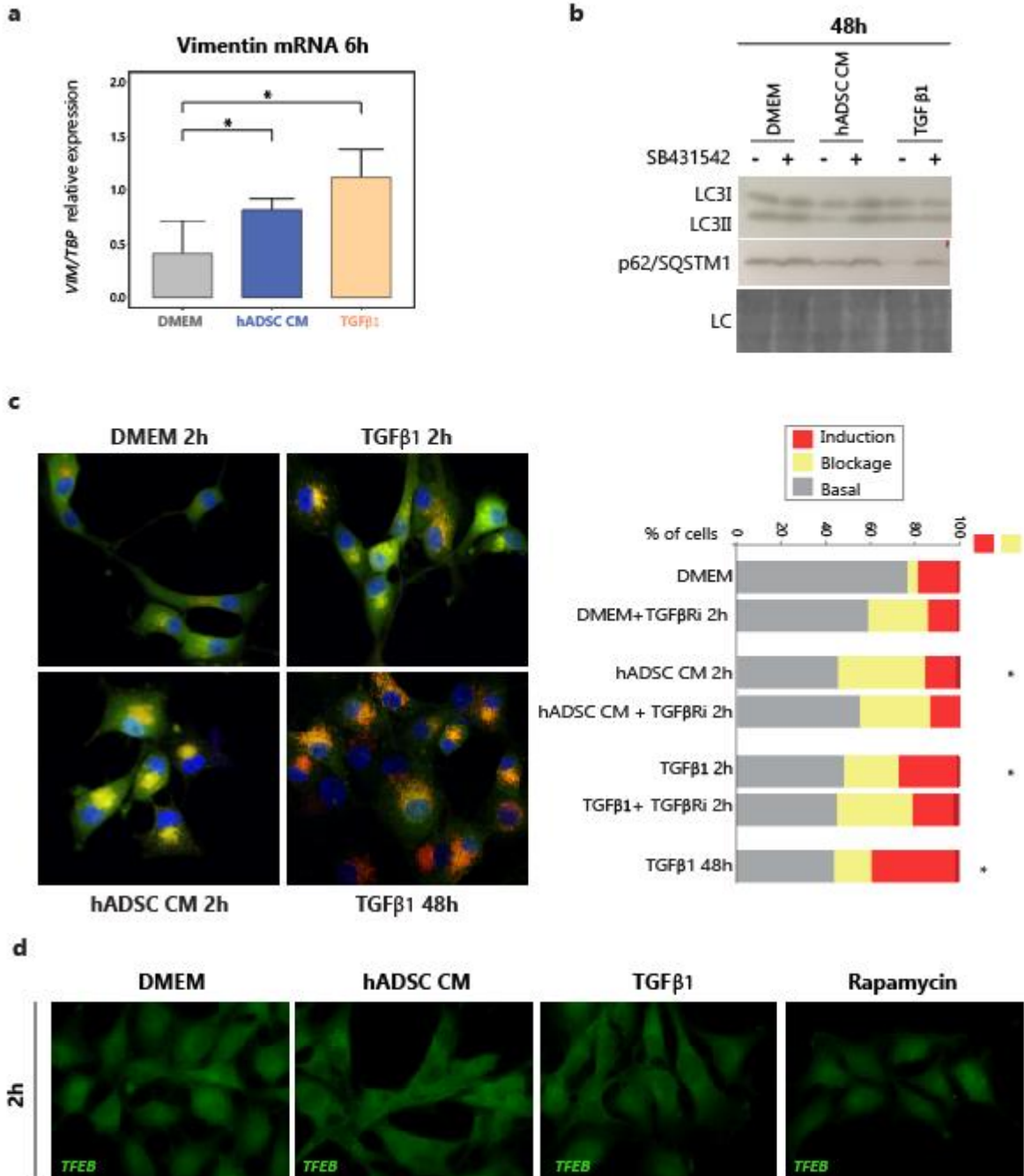
organelles by acridine orange staining in C6 cells after 48 hours of treatment with hADSC CM (**upper**) (n=3, \*p<0.05 relative to the untreated control). Western blot for LC3 and p62/SQSTM1 in hADSC CM-treated C6 cells (**lower**) (n=1). CM: conditioned medium; LC: loading control; R/GFIR: red-to-green fluorescence intensity ratio.



**Online Resource 2.**

**a.** Lysosome analyses using LysoDeep or **b.** LysoTracker fluorescent probes in U87-wt cells control or treated for 48h with hADSC CM (n=3). **c.** Measurement of functional mitochondrial mass and **d.** levels of

reactive oxygen species in U87-wt cells upon treatment with hADSC CM and controls. TMZ 100  $\mu$ M was used as a positive control for both experiments (n=3, \*p<0.05 relative to the untreated control). **e.** Cumulative population doubling analysis of U87-wt cells. Plot shows proliferation rates along time for different treatment conditions, as indicated (n=2). **f.** Quantification of nuclear/cytoplasmic red fluorescence intensity ratio of SMAD4 ICC images after 2 (**upper left**) (n=2) or 48 (**upper right**) (n=3) hours of the respective treatments. Representative photomicrographs (1000x magnification) of SMAD4 ICC after 2 (**lower left**) or 48 (**lower right**) hours of treatment. CM: conditioned medium; DCFH-DA: dichloro-dihydro-fluorescein diacetate; TMZ: Temozolomide.



### Online Resource 3.

**a.** Vimentin (*VIM*) mRNA expression measured by qPCR in U87-wt cells after 6h of the respective treatments (n=3). **b.** Western blot for LC3 and p62/SQSTM1 in U87-wt cells treated for 48h as specified, in the presence or absence of the TGF $\beta$ RI inhibitor, SB431542 (n=3). **c.** Representative photomicrographs (1000x magnification) of U87-tf-LC3 cells treated as indicated (**left**). Relative quantification of U87-tf-LC3 cells in each established category of autophagy state - basal, blockage or induction - following treatment for 2 or 48 hours (**right**) (n=3, \*p<0.05 relative to the untreated control). **c.** Representative photomicrographs (1000x magnification) of TFEB ICC after 2 hours of the respective treatments. CM: conditioned medium.

### Supplementary Methods

#### *GFP-LC3 and mCherry-GFP-LC3 puncta formation assays*

U87-GL (GFP-LC3) cells present a diffuse green fluorescence under non-autophagic conditions, due to the distribution of Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3 (LC3) in the cytoplasm. However, upon autophagy induction a punctuate pattern of GFP-LC3 (GFP-LC3+ dots) is produced, indicating LC3-I to LC3-II conversion (lipidation) and incorporation in the autophagosome membrane. After treatments, U87-GL cells were imaged using an inverted fluorescence microscope with a 40x objective. The number of green dots per cell was then quantified and cells with more 5 green dots were considered as autophagic [21].

U87-tf-LC3 (mCherry-GFP-LC3) cells were used to analyze autophagic flux [22]. GFP tag is acid-sensitive while mCherry tag is acid-insensitive. Thus, the tandem fusion of these proteins to LC3 generates a pH-sensitive sensor that can be used to monitor autophagic flux. Once autophagosomes fuse with lysosomes, the acidic environment of the latter quenches the fluorescence of GFP, and only the red fluorescence signal from mCherry can be detected [23]. U87-tf-LC3 cells were treated and then imaged on a Zeiss Axiovert 200 M inverted fluorescence microscope with a 100x oil immersion objective or in an Olympus FluoView FV1000 confocal microscope with a 60x objective. For confocal microscopy images, nuclei were counterstained with 2  $\mu$ g/mL of Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich). Cells in each image were classified as having a profile that indicates autophagy induction or blockage based on the predominant color of cytoplasmic dots – red or yellow (green and red), respectively. Images for both cell lines were processed and analyzed using ImageJ software.

### *Acridine orange staining*

Acridine Orange (AO) staining was performed and analyzed as recently described by our group [21]. Results are presented as a distribution of Red/Green Fluorescence intensity ratio (R/GFIR) values of individual events, corresponding to the amount of acidic vesicular organelles (AVOs) detected in each cell.

### *Western Blot*

After lysis, protein concentration was assessed using QuantiPro BCA Assay Kit (Sigma-Aldrich, #23225). Twenty  $\mu\text{g}$  of each protein sample were separated on a 12.5 % SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane (Millipore, IPVH00010). Membranes were stained with Coomassie R-250, imaged and a representative band was used as loading control [24]. After blockage with non-fat dry milk, membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies: LC3B (Cell Signaling, #3868), p62/SQSTM1 (Cell Signaling, #5114), phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (Cell Signaling, #9234), phospho-AMPk (Thr172) (Cell Signaling, #2535) and phospho-ULK1 (Ser757) (Cell Signaling, #6888) in 1:1000 dilutions. Secondary antibody (Cell Signaling, #7074) was then added to a final concentration of 1:2000 and incubated for 2h, followed by ECL and X-ray films exposition (Kodak-Xmat).

### *Analysis of mitochondrial network, oxidative stress state and lysosomal acidification*

The fluorescent probe Mitotracker<sup>®</sup> Red FM (Molecular Probes, #M22425) is retained inside functional mitochondria. Thus, we used this marker to assess the total amount of functional mitochondria in U87 wt cells treated with hADSC CM. Cells were labeled with Mitotracker Red at the concentration of 200 nM for 30 minutes.

To evaluate the oxidative state of U87 wt cells upon treatment with hADSC CM, Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) (Thermo Fischer Scientific, #D339) staining was used. DCFH-DA

is a green fluorescence probe used to detect oxidative species within the cells. Cells were incubated with 10  $\mu\text{M}$  of DCFH-DA for 30 minutes. Treatment with temozolomide 100  $\mu\text{M}$  for 3 hours was used as a positive control for both Mitotracker<sup>®</sup> Red and DCFH-DA experiments.

To verify if hADSC CM could be interfering with the lysosome pool or its acidification, we performed a lysosomal analysis using the fluorescent probe CytoPainter LysoDeep Red (Abcam, #ab176829). LysoDeep is a lysotropic dye that selectively accumulates in lysosomes via lysosome pH gradient. Therefore, the lower the pH the higher the red fluorescence signal detected. After treatments, cells were resuspended in fresh medium containing LysoDeep and incubated for 30 minutes, as indicated by the manufacturer.

Fluorescence signal data for each of the three markers were collected in a GUAVA EasyCyte flow cytometer (Guava Technologies).

#### *Population Doubling assay*

Cumulative population doubling (cPD) assay was used to evaluate proliferation rate and survival to treatment in tumor cells. Approximately  $1.5 \times 10^4$  U87-wt or U87-ATG7-kd cells were seeded in a 12-well plate and treated under different conditions. GBM cells received 200 nM of rapamycin for 24 hours and then TMZ was added and left for 3 hours at a concentration of 100  $\mu\text{M}$ . Next, drugs were removed and cells were maintained in hADSC CM for 48 hours. Their growth in culture was followed until the PD values in each condition became linear. For experiments with U87-ATG7-kd cells, cells received only TMZ or hADSC CM alone or in combination.

As previously described [1], cells were passaged every time they reached around 70% of confluence and counted in a flow cytometer (Guava Technologies). PD values of each interval was determined according to the formula  $\text{PD} = [\log N(t) - \log N(t_0)] / \log 2$ , where  $N(t)$  is the number of cells at the time of passage, and  $N(t_0)$  is the number of cells at the previous passage. The sum of PDs (cPD - cumulative PD) was then plotted against time of culture.

### *Immunocytochemistry (ICC)*

GBM cells were cultured in poly-L-lysine coated glass coverslips and, after treatments, fixed and permeabilized with 4% paraformaldehyde and 0.5% Triton x-100 in PBS, respectively. Cells were then blocked for 40 minutes in blocking solution (0.1% Triton X-100, 3% BSA in PBS) and incubated with primary antibodies - anti-SMAD4 1:50 (Santa Cruz, #sc-7966) or anti-TFEB 1:400 (Santa Cruz, #Sc 48784) - overnight at 4°C. Secondary antibodies - Alexa fluor® 555 anti-mouse (Cell Signaling, #4409) or 488 anti-rabbit (Cell Signaling, #4412) - were added to a final concentration of 1:500 and incubated for 2 hours. DNA was counterstained with DAPI (1 µg/mL) for 5 min. Coverslips were mounted using Fluoromount G (EMS, Washington, PA, USA) and fluorescent cells were analyzed in a Zeiss Axiovert 200 M microscope, using a 100 x oil immersion objective.

### *ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)*

The presence and concentration of TGFβ in hADSC CM was determined using the Human/Mouse TGFβ1 ELISA kit (eBioscience, #88-8350-88). DMEM without FBS and DMEM 5% FBS were used as controls. Assay was performed following manufacturer's instructions. Absorbance was measured at 450 nm in an ELISA reader equipment.

### *qPCR*

After 6 hours of treatment with hADSC CM, TGFβ or untreated controls (DMEM), total RNA was extracted from the GBM U87-wt cultures using Trizol LS reagent (Sigma-Aldrich, #T9424). The complementary DNA (cDNA) was synthesized using the M-MLV reverse transcriptase enzyme (Sigma Aldrich, #M1302) from 3 µg of total RNA and in accordance with manufacturer's instructions. Primers for transcription factor EB (TFEB; forward 5'-CGTCTGGACGATGTCCTTGG-3', reverse 5'-GGGTCGCTGCTGTACACATT-3) and vimentin (VIM; forward 5'-CGGGAGAAATTGCAGGAGGA-3', reverse 5'-AAGGTCAAGACGTGCCAGAG-3') were designed using Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). The qPCR reaction was carried

out in a thermocycler StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems and all samples were run in duplicate. Reaction settings were composed of an initial enzymatic activation step of 20 s at 95 °C, followed by 40 cycles of 3s at 95°C and 30s at 60°C. The reaction was done in a final volume of 12.5 µL, consisting of 6.25 µL of Fast SYBR green master mix (Applied Biosystems, #4385612), 0.3µl of primer pairs 10 µM, 4.95 µL of Milli-Q water and 1µL of cDNA. Analysis of the melting curves from 60°C to 95°C at 0.1°C/s were performed to generate the denaturation curve of the amplified products. mRNA expression levels were calculated based on the standard curve method using a serial dilution of the samples and TATA-box binding protein (TBP) was used as the constitutive gene for control. Data is presented as ratio of target-gene/TBP expression.

### *Statistical Analysis*

The level of significance was determined using one-way analysis of variance (ANOVA) test (PASW software) followed by Tukey's or Dunnett's multiple comparison post-test. All quantitative data presented are the mean ± standard error of the mean (SEM). p values < 0.05 were considered as significant.

### **References**

1. Onzi, G.R., et al., *Analysis of the safety of mesenchymal stromal cells secretome for glioblastoma treatment*. *Cytotherapy*, 2016. **18**(7): p. 828-37.



# Capítulo III

## ***Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries?***

Artigo publicado no periódico *Oncotarget*

*Na pesquisa do câncer, a cultura de células in vitro serviu e vem servindo de base para descobertas a respeito da biologia básica dos tumores e também para o desenvolvimento de novas drogas. No entanto, para garantir a reprodutibilidade e o potencial de translação desses achados iniciais, as condições de cultivo precisam ser escolhidas ou adaptadas a fim de que a população de células em cultura melhor mimetize o comportamento das células tumorais in vivo. Este desafio não é trivial, uma vez que envolve descobrir condições de crescimento que minimizem alterações no estado biológico das células, o que muitas vezes sequer é discutido na execução de um projeto de pesquisa. Apresentamos neste capítulo uma revisão sistemática da literatura mostrando o estado da arte a respeito das condições de cultura mais utilizadas para amostras de GBM e discutimos como a escolha dessas condições pode interferir nas respostas às questões biológicas levantadas por diferentes estudos*



## Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries?

Pítia Flores Ledur<sup>1,\*</sup>, Giovana Ravizzoni Onzi<sup>1,\*</sup>, Hui Zong<sup>2</sup> and Guido Lenz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biophysics and Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS-Brazil

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Immunology, and Cancer Biology, University of Virginia, Charlottesville, VA, USA

\* Authors contributed equally to this work

**Correspondence to:** Hui Zong, **email:** hz9s@virginia.edu  
Guido Lenz, **email:** lenz@ufrgs.br

**Keywords:** culture conditions, culture media, glioblastoma, heterogeneity, drug discovery

**Received:** March 22, 2017

**Accepted:** August 02, 2017

**Published:** August 11, 2017

Copyright: Ledur et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### ABSTRACT

**In cancer research, the use of established cell lines has gradually been replaced by primary cell cultures due to their better representation of *in vivo* cancer cell behaviors. However, a major challenge with primary culture involves the finding of growth conditions that minimize alterations in the biological state of the cells. To ensure reproducibility and translational potentials for research findings, culture conditions need to be chosen so that the cell population in culture best mimics tumor cells *in vivo*. Glioblastoma (GBM) is one of the most aggressive and heterogeneous tumor types and the GBM research field would certainly benefit from culture conditions that could maintain the original plethora of phenotype of the cells. Here, we review culture media and supplementation options for GBM cultures, the rationale behind their use, and how much those choices affect drug-screening outcomes. We provide an overview of 120 papers that use primary GBM cultures and discuss the current predominant conditions. We also show important primary research data indicating that "mis-cultured" glioma cells can acquire unnatural drug sensitivity, which would have devastating effects for clinical translations. Finally, we propose the concurrent test of four culture conditions to minimize the loss of cell coverage in culture.**

### INTRODUCTION

Glioblastoma (GBM) represents the most common and aggressive primary brain tumor, with a dismal prognosis. Despite standard-of-care treatment, GBM is among the most resistant cancers to radiation and cytotoxic chemotherapy, therefore remaining as an incurable disease with an overall median survival of 15 months [1].

Progresses made in the "omic" areas - genomic, proteomic and so on - have revealed GBM as an extremely heterogeneous disease [2], and many targeted pharmacological agents have been developed since then with the aim to improve current therapies. Unfortunately, the great majority of these drugs have not achieved long-term remissions when tested in

animals or even in clinical trials, making treatment options still limited [3].

In the challenge of developing more effective therapeutic strategies, perhaps one of the most important issues to be addressed is to look back on how we are studying this disease and how we are approaching its complexity in the current models of study that we use. In this idea, initial *in vitro* models are crucial, once they serve as a platform for screening novel therapeutic agents, selecting which compounds can and which cannot move forward in the several phases of clinical research, until they finally reach patients. If we do not cover the issues of cellular heterogeneity and of being loyal to the identity of the cells we are studying in *in vitro* assays, substantial information could be misunderstood or even lost in our researches.

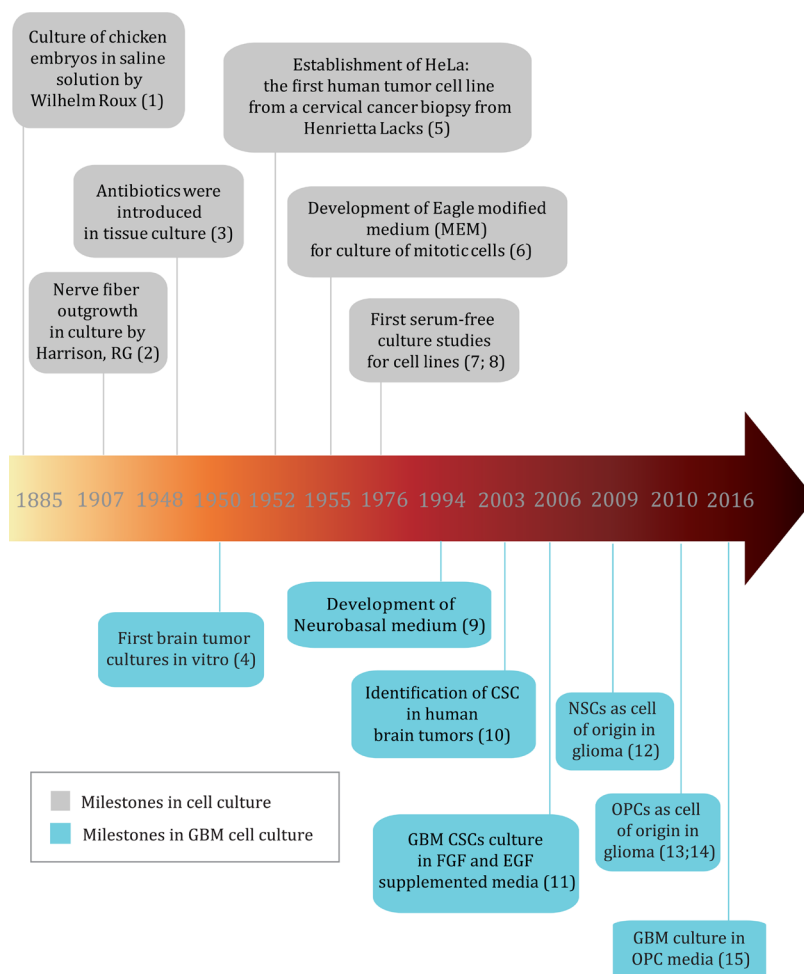
## Brief history of tissue culture

### *In vitro* cell growth establishment

Cell culture is a key technique for cancer research, as it allows scientists to study the biology of tumor cells in an environment with controlled variables. Additionally, due to the ease to scale up and the availability of multi-channel liquid handler, cell culture has become a cost-effective platform for high-throughput drug screening. Rigorous cell culture practice, however, is fundamental for research reproducibility throughout laboratories in the world and for translational potential from bench research into clinical settings.

The history of cell culture can be traced back to late 1800s, when chicken embryos were for the first time maintained alive in a saline solution for several days [4] (Figure 1 - milestones references can be found in Supplementary File 1). Soon after, researchers were able to keep frog and chicken embryo cells alive and growing *in vitro* by using lymph clots [5] and later plasma [6] as nutrient sources. In 1951, a prominent milestone for cell culture was the successful culture of HeLa cells, the first human tumor cell line derived from a cervical cancer biopsy [7]. Using HeLa cells, chemically defined

media such as MEM and DMEM were developed and improved, which was a major breakthrough as it avoided the batch-to-batch variation of the animal fluids and thus improved research reproducibility and data comparison among different laboratories [8, 9]. Since then, media supplemented with a source of growth factors has been broadly used to maintain cell lines, and tissue culture has flourished. Among all varieties of growth factor supplements, serum from animal origin, mostly fetal bovine serum (FBS), became the preferred choice because it can sustain most human and animal cell types. Moreover, FBS contains fewer immune system molecules that could interfere with cell growth in culture when compared to serum from a mature bovine immune system [10]. However, FBS components can also vary according to the batch and its components are not fully known, which can lead to low reproducibility and robustness of data generated from cells cultured under this condition [11]. Several serum components present a considerable concentration range among different batches [12], and even growth factors including FGF-2, transforming growth factor  $\beta$  1 (TGF $\beta$ -1) and glial growth factor (GGF) can be added to this list [13].



**Figure 1: Timeline of important milestones in cell culture and GBM cell culture (reference numbers for milestones can be found in Supplementary File 1).**

Such inconsistency could also lead to unwanted effects in culture such as non-specific binding, activation or inactivation of molecules [11, 14], and interfere with biological aspects such as growth capacity and induction of differentiation. Furthermore, ethical concerns with regards to animal rights in the use of serum have arisen [11]. These issues led to the development of serum-free media supplemented with defined growth factors [15].

### **Establishment and evolution of GBM cell culture conditions**

Since most cell culture systems have been developed to culture fibroblasts, epithelial and blood cells, the culture of brain cells, including GBM, faces its unique challenges. While fibroblasts, epithelial and blood cells are in contact with serum, brain cells are in contact with cerebrospinal fluid (CSF), that has a distinct protein composition, as many serum proteins are unable to cross the blood-brain barrier [16]. Although the majority of CSF proteins originate from the blood, about 20% of them are brain derived [17]. Also, basal media such as DMEM and DMEM/F12 were developed in order to promote rapid cell division of somatic cells, and therefore were not developed for post-mitotic cells such as neurons.

Neurobasal media was the first media developed for neurons [18], based on DMEM with reduced osmolarity and lower glutamine concentrations. Excitatory amino acids were also eliminated to avoid neurotoxicity. Moreover, serum-free supplements for neuronal and glial cell culture started to be developed, such as B27 and N2. These supplements contain basic molecules needed for neuronal growth such as vitamins like biotin (B27) and proteins like insulin and transferrin (B27 and N2). Some of them are also composed of growth factors, including EGF and FGF, as is the case of G-5 supplement (ThermoFischer®), developed for the culture of glial cells of astrocytic phenotype (normal and tumor) [15]. B27 and the combination of Neurobasal media with B27, for instance, allowed long-term survival with high cell viability for hippocampal neurons [18].

While the primary consideration of media/growth factor/hormone choices is to sustain the proliferation and viability of cultured cells, it should be noted that some components can significantly skew cellular behaviors from their *in vivo* biology and this has been shown to be true for neural cells. A good example is that of mature astrocytes. After being exposed to serum, astrocytes have long lasting gene expression changes that remain even after serum withdrawal [16]. To improve this scenario, Foo and collaborators have shown that mature astrocytes can be successfully cultured in serum-free media in the presence of HBEGF and vascular cells, maintaining their gene expression profile much closer to that of astrocytes *in vivo*. Another example regarding neurophysiological

activity when culturing mature neurons *in vitro*, where even small adjustments in media composition - such as inorganic salts, energetic substrates and amino acid concentration - can lead to better action potential and synaptic communication [19].

The first brain tumors were cultured *in vitro* in the 50s [20], and their culture prospered in the beginning of the 60s [21]. In 1968, Pontén and Macixtyre initiated the Uppsala (U) series of malignant glioma (MG) cell lines by establishing four cell lines derived from human malignant gliomas, still widely used by researchers in the glioma field [22]. Researchers from the Uppsala University have found also that one of the most used GBM cell lines, U87MG, obtained from American Type Culture Collection (ATCC) was quite different from that collected from the original tumor. Despite sharing transcriptional features of brain tumors, ATCC's U87MG has an unknown source. This incident highlighted the urgent need for researchers to carefully validate the cell lines used in their works [23].

Glioma had been traditionally cultured in FBS-enriched DMEM media, the prevalent method in the past. However, in 2003, the description of cancer stem cells (CSCs) in GBM [24] raised serious concerns about serum use since it can induce neural stem cell (NSC) differentiation [25], and CSCs were thought to arise from NSCs [26]. Ever since, the search for a medium to better preserve the phenotype of patient-derived glioma cells began [24, 26]. In 2006, inspired by NSC culture conditions, the Fine lab used serum-free, EGF/FGF-2-supplemented Neurobasal medium to cultivate primary glioma cells and found that these cells remained more similar to the parental tumors than those cultured in serum-containing DMEM medium [27]. They observed that serum-cultured GBM cells had limited growth, responded less to differentiation stimulus and presented genomic alterations not found in the original tumors. In contrast, GBM cells maintained in Neurobasal medium supplemented with EGF/FGF-2 retained the same proliferation capacity, migration/invasion histological features, genotype and gene expression profile of the tumors from which they were obtained. More recently, the Uhrbom lab has established a biobank of glioma cell lines (The Human Glioblastoma Cell Culture Resource) with over sixty cell lines from surgical GBM samples, by growing them first as spheres and then as monolayer cultures in EGF/FGF-2 enriched media [28, 29]. Most of the cell lines produced in this manner were classified at the same proportions as the parental tumors, with a few exceptions [29]. These findings demonstrate the importance of tailoring culture conditions based on the biological properties of cell types in culture. In the next sections, we review the most common culture media used for glioma and how to customize media options for a particular biological question.

## Review of the growth conditions used in GBM primary cultures

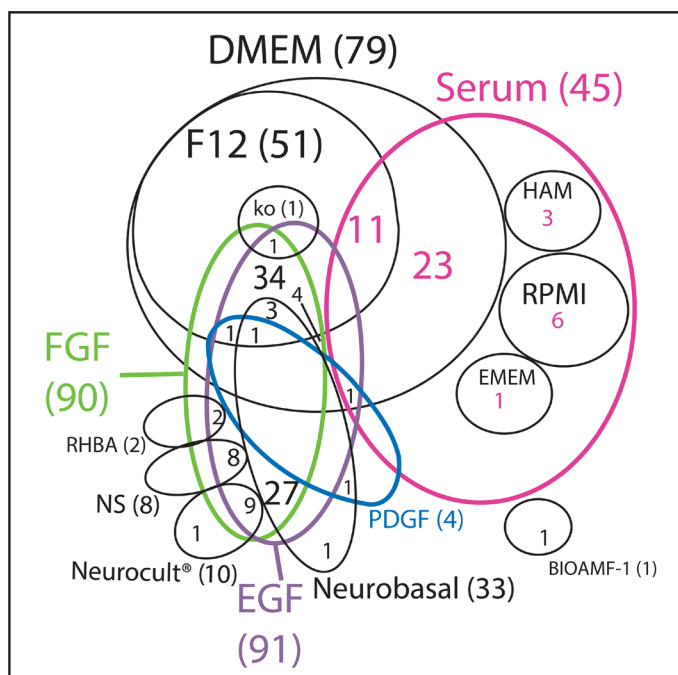
We reviewed the literature to gather information on the most commonly used conditions for culturing GBM primary cells. Data collected from 120 papers show that DMEM as base medium, alone or mixed with Ham's F12 nutrient mixture, and Neurobasal medium are the most common choices of medium to culture these cells in (Figure 2 and Supplementary File 2). DMEM and F-12 are standard types of media, broadly used in mammalian cell culture. Neurobasal media, as already discussed in this review, was designed to meet the neuronal cell requirements without the need of an astrocyte feeder layer [18]. These media are basically composed of glucose, amino acids, vitamins and inorganic salts, in specific and controlled concentrations. For the full list of papers reviewed to investigate the most common primary culture conditions, please refer to Supplementary File 2.

Although medium choice has an impact in cell behavior, growth factor supplementation is also fundamental to maintain cell metabolism and promote specialized cell functions. Our search shows that serum is still widely used in GBM research, representing close to half of the studies when compared to EGF/FGF-2 (Figure 2). This may be because serum as a rich nutrient source could potentially embrace a higher variety of cell types than media containing one or two isolated growth factors. Notwithstanding, certain types of glioma have proven hard to maintain *in vitro* even when cultured in the presence of serum, such as the IDH1 mutant gliomas [30].

Therefore, it is not surprising that growing biopsies in NSC media, where a narrower variety of growth factors is provided, has been such a challenging task. Although NSC media seems to be a better choice than serum in terms of maintaining some of the parental tumor properties [27], at the same time it does not work for all glioma samples. Gunther and collaborators were able to culture only 9 out of 19 glioma biopsies for longer than 8 passages in NSC media [31]. Galli and collaborators found a similar proportion, 6 out of 12 tumors were well-established *in vitro* [32] under the same conditions. This indicates that NSC conditions are not always ideal for keeping cells alive in culture, especially when we consider different cells of origin, as discussed below. Our observations show that there is a higher initial growth efficacy of primary GBM tumors in serum-containing media when compared to defined medium, although serum-containing media seems to induce a higher rate of senescence.

The complexity of the Venn diagram shown in Figure 2 indicates that, although some culture conditions are clearly preferred, there are over 20 different culture conditions published; therefore, there is far from consensus on the ideal media to grow primary tumors. The vast array of conditions employed makes the comparison of studies much more difficult, adding to the already challenging heterogeneity of gliomas. Unfortunately, none of the papers reviewed explained the rationale behind the choice of growth factor combination.

Thirteen papers compared differentiating and non-differentiating growth conditions concomitantly in GBM samples. Among the 28 different biological features



**Figure 2: Literature review of growth conditions used in GBM primary cultures.** Venn diagram of the most used culture media (in black) and the respective supplementation factors (different colors) used in GBM primary cultures. NS: non-specified basal medium. Ko: DMEM/F12 knockout.

evaluated, 4 were not significantly different, 10 were higher in the differentiated cells and 14 were higher in the non-differentiated cells (Supplementary File 3). Among the differences found, GBM cells in non-differentiating culture conditions displayed higher invasive potential [33], lower drug efflux capacity [34] and higher sensitivity to immune responses mediated by NK and T-cells [35] when compared to their more differentiated counterparts.

The differentiating culture condition most frequently used was media supplemented with 10% FBS while the most common non-differentiating condition was serum-free media, usually supplemented with FGF-2 and EGF. However, even the concentrations of each growth factor varied among the “two-conditions” papers, as well as among all the other papers that used these factors. Standardizing culture conditions would be critical to improve the comparative analysis among all published studies.

### **Maintaining the original conditions of cells in culture**

The habitat of a cancer cell in a solid tumor is a complex niche that includes immune cells, blood vessels, and dynamic pH and oxygen levels, besides the heterogeneity of the tumor population *per se* [36, 37]. This ecosystem still cannot be reproduced *in vitro*, but some variables such as choice of substrate where cells adhere to, nutrients, growth factors and levels of oxygen can be optimized.

GBM tumor cells in 3D cultures can behave in a different way from cells in a 2D environment [38, 39], favoring the idea that 3D conditions can better mimic what happens in an *in vivo* situation. However, the Kornblum group recently established a gliomasphere bank from 68 patient-derived GBM samples [40] and found a limited correlation between gliomaspheres and their parent tumors as it relates to patterns of gene expression of molecular GBM subtypes, although the model allowed the identification of novel genes of malignancy. Moreover, we have shown that the OPC-glioma model, even though cultured in a 2D manner, shows features considered as “stem-like”, such as formation of spheres, self-renewal, differentiation capacity and the ability to form tumors that recapitulate the parental tumor [41, 42]. Notwithstanding, the discussion of whether to grow GBM in suspension as spheres (3D), or as an adherent culture (2D) is too broad to be addressed in the present review, but it certainly is fundamental to be considered in the design of the culture condition.

When culturing tumors of a high cellular heterogeneity such as GBMs, it is reasonable to consider that the more media/growth factors combinations used, the more likely we are to cover a wider range of this heterogeneity. Nevertheless, when there is a target cell population it is also possible to tailor culture conditions

to fulfill the requirements of that specific population. This is the case, for example, of using defined media that favors a non-differentiated state - *i.e.* when working with cancer stem cells and cells of origin - and also of using serum-containing media for more differentiated cells [27, 43]. Despite the well-documented pro-differentiation properties of serum [27, 43], its broader range of growth factors and hormones could favor cell survival and even increase heterogeneity when compared to media with defined growth factors, which may justify the close to 50% of papers published using this condition.

### **Cancer stem cells (CSCs)**

In most cancer types, cells with markers of stemness are generally identified as having a higher proportion of grafting rate and resistance capacity than their more differentiated counterparts. However, markers used to identify these cells and the stability of their expression has brought controversy to the field [44, 45].

The similarity of CSCs to normal NSCs led to the hypothesis that human glioma may originate from this cell type. Moreover, normal NSCs express EGFR and therefore, it seemed only natural to keep glioma cells in NSC media *in vitro* [24, 32], which has EGF and FGF-2 as the main growth factors [46, 47]. NSC media became the serum-free standard media for primary cultures in GBM research since then (see Figure 2), and several drug assays have been performed in this media, as a way to search for specific ways of steering CSCs towards death or differentiation [48–51]. Nevertheless, CSC targeting has proven much more challenging than anticipated, since this subpopulation has also been described as extremely heterogeneous [2, 52] and as having a dynamic phenotype [53–55], making its differentiation or elimination a very difficult task. Moreover, there are still inconsistencies in the literature regarding the enrichment of CSCs in NSC media [56], although this could be caused by technical issues, such as the markers used to isolate and/or to analyze the cells or the media used to culture them in.

### **Cell of origin**

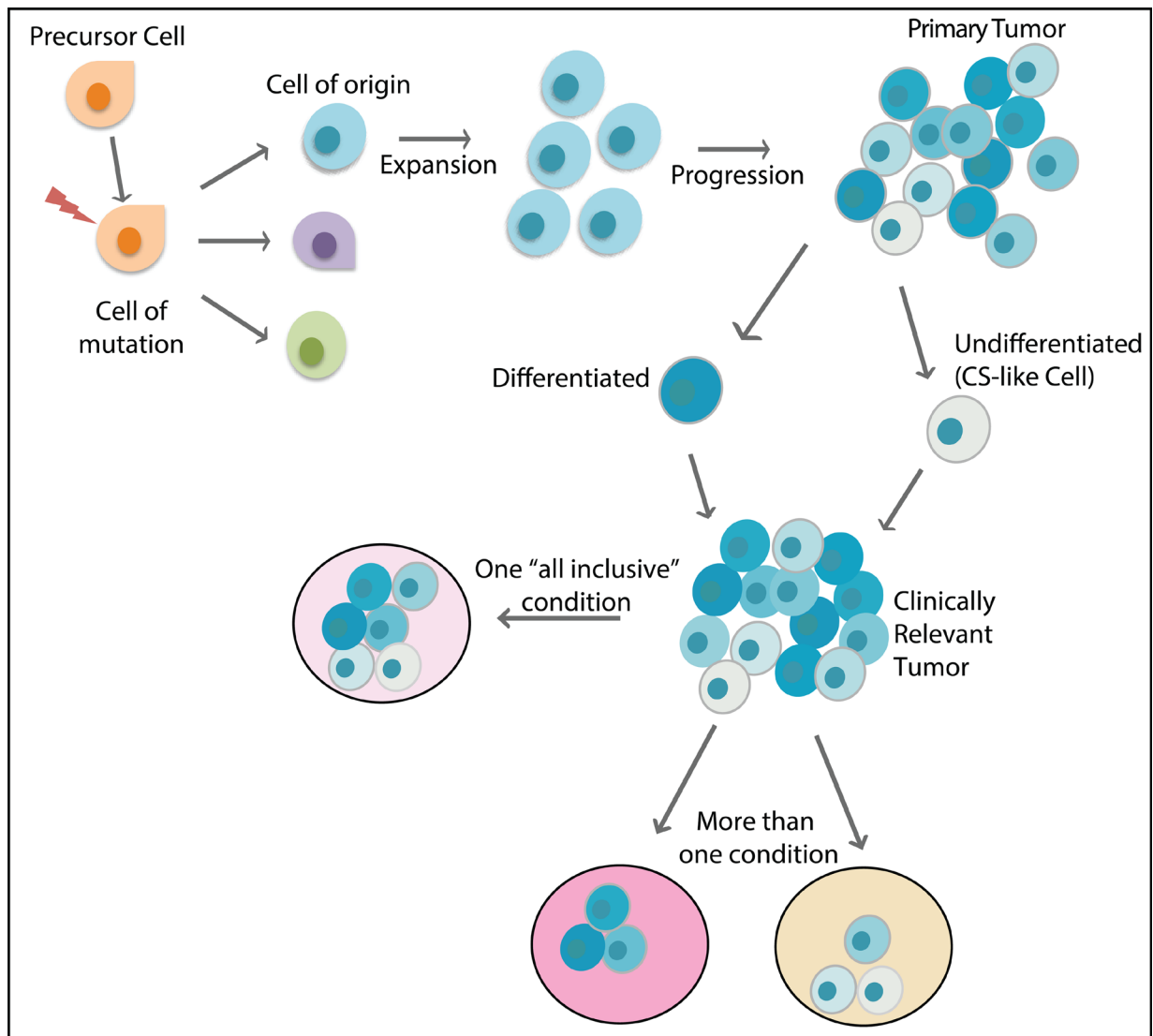
The cell of origin is the cell that undergoes transformations that lead to cancer. The concept of cell of origin emerged from the observation that a certain type of cancer can have different subtypes with distinct cellular and molecular characteristics, and therefore could probably result from different cells of origin [57]. Genetic animal models have been crucial for the investigation of the origin, as specific promoters can drive genetic alterations only in certain target cells. Glioma, for instance, have been shown to have several origins, from progenitor cells [58] to more specialized cells in the brain, such as astrocytes and even neurons [59–61]. Genetic studies have shown that the introduction of mutations in NF1 and p53 in both embryonic and adult NSCs can lead to gliomagenesis [62, 63], as well as the inactivation of p53 and PTEN in the same cell type [64]. In other



models, oligodendrocyte precursor cells (OPCs) - a glial cell progenitor - act as cell of origin [42, 65, 66], giving rise to tumors that resemble human oligodendroglioma or the proneural subtype of GBM [67, 68]. A recent conceptual advancement in the field is that the cell that initiates the tumor may be a different cell from the one that undergoes the first mutation event [42, 57, 69] because the latter may not have the signaling context for malignant transformation. It is important to note that the cell of origin concept is different from the CSC concept. CSCs refer to a rare population of tumor cells within the tumor mass that serves as the root (highest hierarchy), which gives rise to less malignant cells to propagate the tumor mass. On the other hand, the cell of origin refers to a normal cell type,

which could initiate the tumor when oncogenic mutations occur [57, 70, 71] (Figure 3). The differences between cells of origin in cancer and CSCs as well as some of the best methodologies to characterize and distinguish them were recently reviewed [57, 72].

It has been shown that growing glioma cells based on the knowledge about the cell of origin can maintain some of the original properties of the cells, such as morphology and expression of certain markers. If we consider tumors that have OPCs as their cells of origin, we should use OPC media supplemented with platelet-derived growth factor (PDGF), which has been shown to sustain OPC proliferation and development *in vitro* [41, 42, 73, 74].



**Figure 3: The main players in the evolution of a cancer.** The cell that undergoes the first mutation event is considered the cell of mutation, which may or may not undergo transformation to originate a tumor. The cell of origin is the specific cell type that is capable of undergoing transformation that generates the tumor mass. The tumor mass is very heterogeneous, with more differentiated (darker blue colors) and less differentiated cell (lighter blue colors), and it is not clear which cells are responsible for establishing metastasis or new tumors in animal models. To maintain the heterogeneity of clinically relevant tumors, either an “all-inclusive” condition or more than one condition must be used separately.

Previously, we tested whether OPC-originated glioma cells could preserve their elemental characteristics in culture conditions tailored for OPCs *in vitro*. To test this idea, OPC-originated mouse glioma cells were cultured in conditions for normal OPCs or NSCs for multiple passages. We found that 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 [41]. Recently, Jiang et al. have separated patient-derived GBM cells based on a cell of origin signature, and have shown that cells from different origin present distinct sensitivity to drugs [28].

In our literature search, we also found two papers that cultured primary glioma cells in media supplemented with a mixture of EGF, FGF-2 and PDGF [75, 76]. Perhaps this type of media supplementation can be suitable for keeping alive a broader range of less differentiated glioma cells when compared to serum-enriched media, and should therefore be considered according to the research goal.

Therefore, to improve translational potential of glioma research, it is important to identify the cell-of-origin and subsequently consider this knowledge to establish culture conditions that allow the preservation of native properties of tumor cells.

### The role of *in vitro* culture for drug screening

Given the importance of *in vitro* tests for initial screenings of new drugs, cell culture models have increased in complexity with the aim to better mimic what happens to tumors *in vivo*, trying to reduce experimental uncertainties and anticipate possible effects of these new compounds. Novel *in vitro* models have been developed, such as 3D cell culture, tissue engineering, biomaterials, microfluidics, allowing us to incorporate different cell types and extracellular matrix components to cultures, as well as to control spatial and temporal introduction of soluble factors [77].

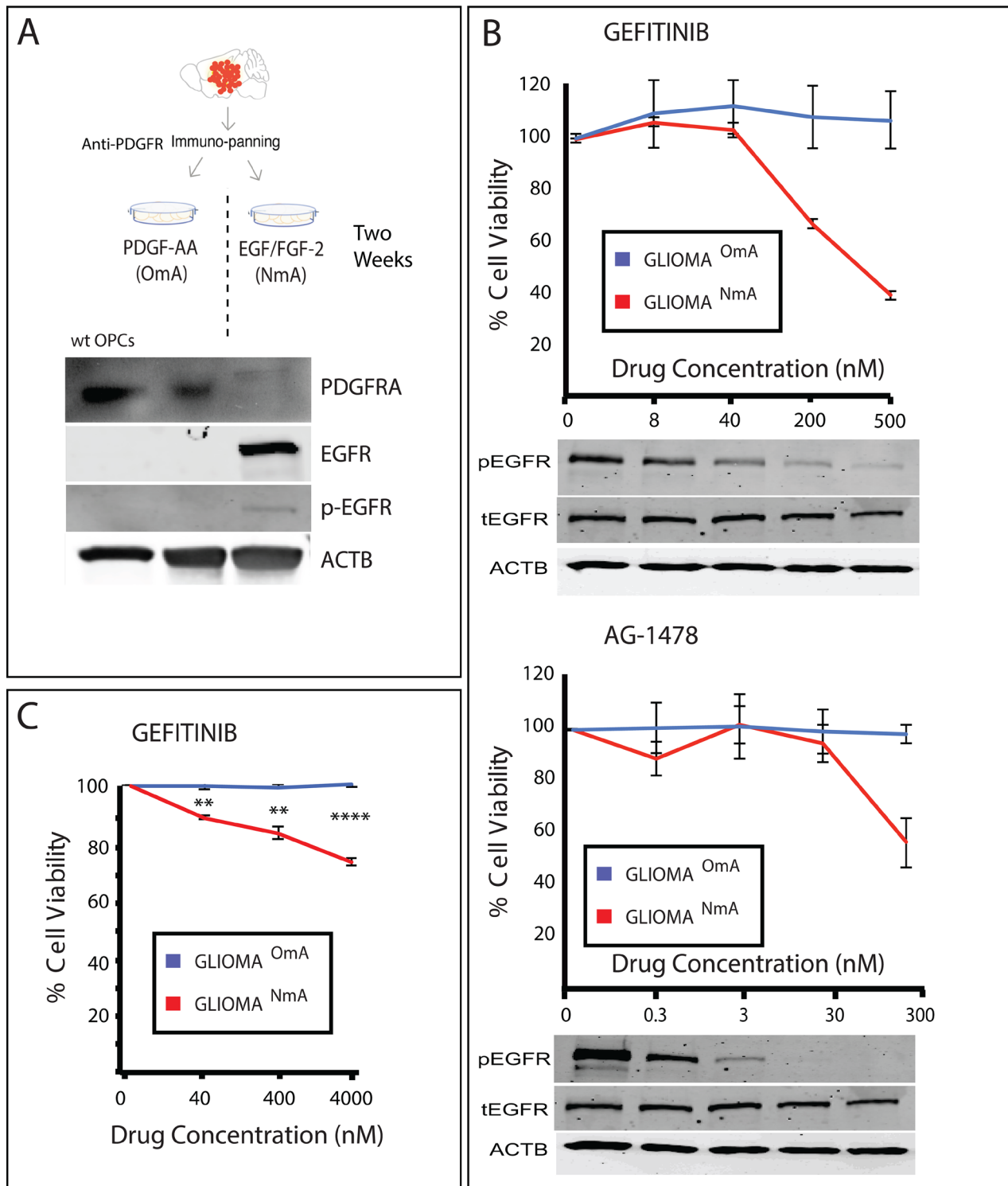
However, besides making use of these high complexity models, simpler cell culture concepts and ideas can be further explored to avoid misinterpretation of results, which is crucial when screening new drugs. One question to debate is about the culture medium used in the tests. Since all drug screenings depend upon an *in vitro* step prior to moving to *in vivo* assays and then clinical trials [78], the media in which cells are maintained might have a pivotal role in the choice of which drugs go forward in the pre-clinical setting towards clinical development. We have recently shown that cells from a GBM model driven by a promoter that is active in OPCs were more resistant to TMZ when cultured in media suitable for this cell type than the same cells cultured in NSC media [41].

Additionally, growing these cells in NSC media containing EGF and FGF-2 increased the expression and signaling of EGFR and the acquired sensitivity to selective EGFR inhibitors (Figure 4). It is important to mention that this model resembles the proneural subtype of GBM and that tumors with other molecular profiles may present different responses.

Although a similar trend was observed in a human GBM line (Figure 4C), human GBMs are more heterogeneous and complex than a genetic model and could present subpopulations of cells that express different receptor tyrosine kinases (RTKs), or even more than one RTK simultaneously [79], which could lead to different possible scenarios. It is also important to stress that there is no easy test to determine which condition produces responses more similar to the response of the tumor but the fact that different growth conditions lead to different pharmacological results suggests that cells with these conditions or the plasticity to adopt these conditions are present and could potentially be expressed in the tumor [79]. This example should serve as a cautionary note for cell-based drug screening efforts as mis-cultured cells could lead to drug hits that might be ineffective to the original tumor cells and that would go forward in the drug development process.

### Final remarks

Whether GBM drug screenings are performed in serum or NSC media, the most commonly used media for *in vitro* GBM culture and research (Figure 2), there is room for improvement, as GBM heterogeneity is very high [2] and culture conditions are selective [41]. The most up to date classification of glioma in Proneural, Neural, Classical and Mesenchymal subtypes based on molecular signatures [67, 80] might not be representative of individual tumors, but only of a majority of cells within the region of the analyzed biopsy [2]. Tumors are genotypically unstable [81–84], and different subtypes could imply different cells of origin. These scenarios raise an important question in terms of how to maintain gliomas *in vitro*. Usually, biopsies are dissociated and cultured in one media choice only, which can work for a specific hypothesis. However, when taking drug discovery into account, as previously discussed (see Figure 4 and references 28, 41, 85), an approach to be considered is to culture cells in all media choices available for glioma (i.e., NSC media, OPC media and FBS containing media). Other media possibilities might also be considered, such as the one adapted for mature astrocytes where HBEGF is used as growth factor [16], as suggested in Figure 5 and; then perform drug screenings in each media option. The drugs that perform best on all choices simultaneously should be the ones moving forward to clinical research. This approach could also be applied to other tumor types, and perhaps drug discovery studies could greatly



**Figure 4: Culture conditions can interfere with response to drugs.** (A) Mouse glioma was dissociated, purified through immunopanning and cultured in OPC media (containing PDGF as growth factor) and NSC media (containing EGF/FGF-2 as growth factors). Wild type (wt) OPCs were purified through immunopanning and used as control. PDGFR expression, naturally present in wt OPCs, is reduced when cells are cultured in NSC media, and EGFR starts to be expressed in an active (phosphorylated) form. (B) EGFR inhibitors Gefitinib and AG-1478 reduce cell viability of treated cells only when they are cultured in NSC media (NmA– NSC media accustomed cells), and not in OPC media accustomed cells (OmA). pEGFR = phosphorylated EGFR, tEGFR = total EGFR. Values were normalized based on a non-treated control (vehicle–DMSO-only). (C) A similar response is seen in a human GBM primary cell line accustomed to both NSC media and OPC media and treated with Gefitinib. Samples were normalized based on non-treated controls.  $**p \leq 0.01$ ;  $****p \leq 0.0001$ .

benefit from this strategy, thus improving the process of developing more efficient drugs to patients.

## MATERIALS AND METHODS

### Search details

We performed an electronic search (last updated on May 2nd, 2017) for papers indexed in the Web of Science database. The search strategy comprised the terms “GBM primary culture” and papers published between 2012–2017. For inclusion in this review, papers had to describe the conditions in which GBM primary cells were cultivated *in vitro* regarding media choice and/or growth factor supplementation. No language restriction was applied. By this search strategy, 175 papers were identified. After reviewing their abstracts and their full-text form, 120 eligible papers were chosen and examined. Exclusion criteria:

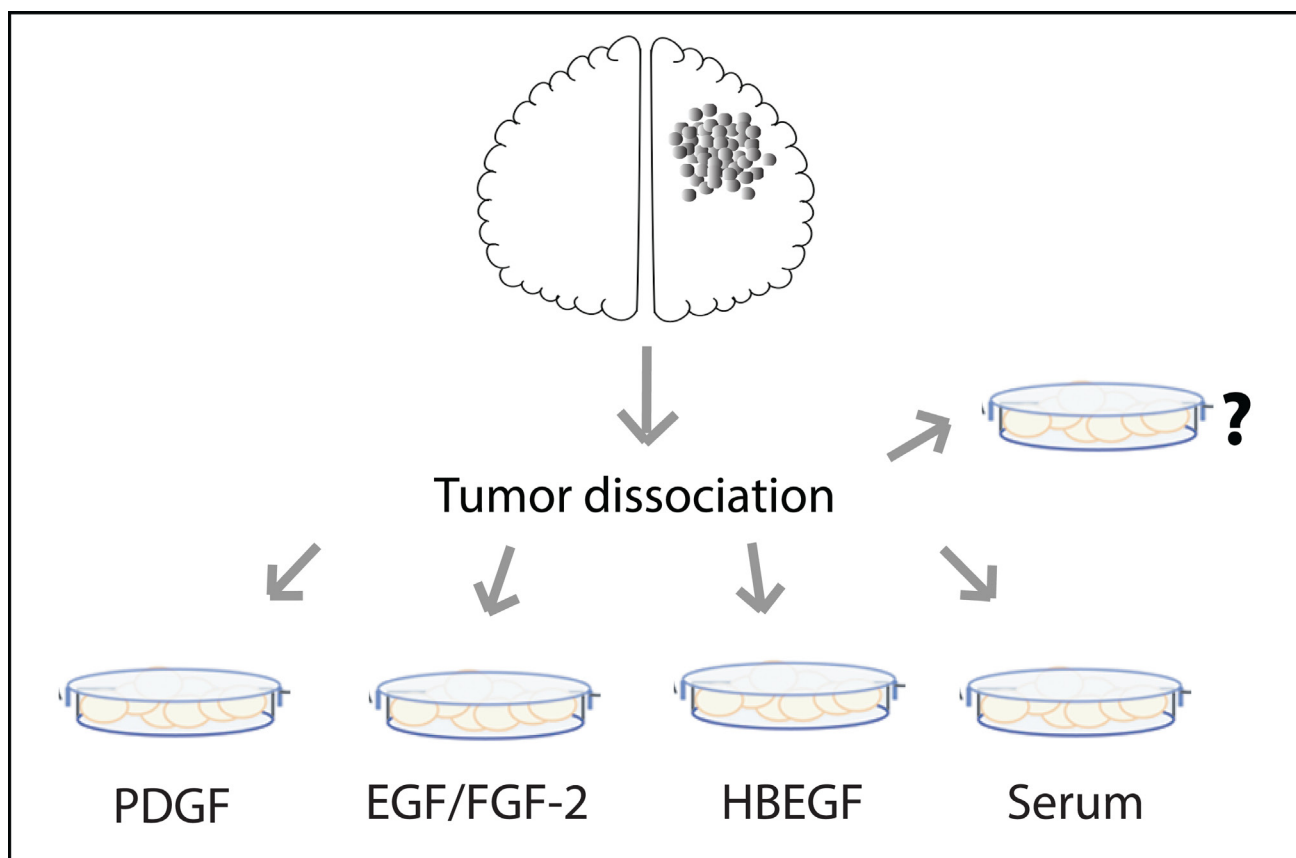
- papers which did not use GBM cells;
- papers which used only commercial GBM cell lines instead of primary cultures;
- papers which did not describe the conditions used to grow primary GBM cells;

### Cell culture

Mouse cells used in Figure 4 were purified from tumors from MADM (TG11, GT11), hGFAP-Cre, p53KO, NF1 flox or MADM (TG11, GT11), NG2-Cre, p53KO, NF1 null mice. Cells were purified through an immunopanning procedure [42] and cultured in either FGF-2 and EGF enriched media or in PDGF-AA enriched media as previously described [41]. Animal procedures followed animal care guidelines, under University of Virginia IACUC, approval #3955. Human glioma use was approved by the University of Virginia Hospital institutional review board under protocol IRB-HSR#17626. After biopsy collection, cells were dissociated and cultured in the same media as the mouse cells and as previously described [41].

### Western blotting

Cells were lysed in 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



**Figure 5: Schematic representation of media choice options available for GBM primary culture.** To select all cell types possible, one can grow GBM cells in NSC media (with EGF and FGF-2 as growth factors), in PDGF-enriched media (a.k.a. OPC media), in astrocyte specific media (HBEGF as the main growth factor) or in Serum-enriched media. Other possibilities might also be considered.

samples were subjected to SDS-PAGE and transferred to polyvinylidenedifluoride membranes.

## MTT assay and drug treatments

Glioma<sup>NmA</sup> and Glioma<sup>OmA</sup> cells were plated at a density of  $2 \times 10^5$  cells/well in 96-well plates and treated with various concentrations of EGFR inhibitors Gefitinib and AG-1478 (Selleckchem), as indicated. Control samples were treated with the vehicle used to dilute drugs with (DMSO), and treated samples were normalized based on non-treated control. MTT assay was used to assess cell viability 48 hours after treatments.

## Abbreviations

GBM: Glioblastoma; CSC: Cancer stem-like cell; NSC: Neural stem cell; OPC: oligodendrocyte precursor cell; EGF: epidermal growth factor; EGFR: epithelial growth factor receptor; HBEGF: Heparin-binding EGF-like growth factor; FGF: fibroblast growth factor; PDGF: Platelet -derived growth factor; TGF $\beta$ -1: transforming growth factor  $\beta$  1; GGF: glial growth factor; CSF: cerebrospinal fluid; FBS: fetal bovine serum; IDH1: isocitrate dehydrogenase; EFEMP2: EGF Containing Fibulin Like Extracellular Matrix Protein 2; LGALS8: Lectin, Galactoside-Binding, Soluble,8; NmA: NSC media accustomed cells; OmA: OPC media accustomed cells.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Lene Uhrbom (Uppsala University, Sweden) for proofreading the manuscript. This work was supported by the National Institutes of Health/National Cancer Institute R01-CA136495, CAPES/PROBITEC004/2012, FAPERGS/PPSUS 1210-2551/13-1. G. R. Onzi and G. Lenz are recipients of CNPq fellowships, P. Ledur receives a FAPERJ fellowship.

## CONFLICTS OF INTEREST

All authors declare that they have no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS. Glioblastoma. From Molecular Pathology to Targeted Treatment. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2014; 9:1–25.
2. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, Cahill DP, Nahed BV, Curry WT, Martuza RL, Louis DN, Rozenblatt-Rosen O, Suvà ML, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science.* 2014; 344:1396–1401.
3. Polivka J, Holubec L, Kubikova T, Priban V, Hes O, Pivovarcikova K, Treskova I. Advances in Experimental Targeted Therapy and Immunotherapy for Patients with Glioblastoma Multiforme. *Anticancer Res.* 2017; 37:21–33.
4. Langdon SP. *Cancer Cell Culture.* Volume 88. New Jersey: Springer Science & Business Media. 2004.
5. Harrison RG, Greenman MJ, Mall FP, Jackson CM. Observations of the living developing nerve fiber. *The Anatomical Record.* 1907; 1:116–128.
6. Burrows MT. The cultivation of the chick-embryo outside the body. *JAMA.* 1910; 55:2057–2058.
7. Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2:315–319.
8. Eagle H. The minimum vitamin requirements of the l and HeLa cells in tissue culture, the production of specific vitamin deficiencies, and their cure. *J Exp Med.* 1955; 102:595–600.
9. Dulbecco R, Freeman G. Plaque Production by the Polyoma Virus. *Virology.* 1959; 8:396–397.
10. Triglia RP, Linscott WD. Titers of nine complement components, conglutinin and C3b-inactivator in adult and fetal bovine sera. *Mol Immunol.* 1980; 17:741–748.
11. van der Valk J, Mellor D, Brands R, Fischer R, Gruber F, Gstraunthaler G, Hellebrekers L, Hyllner J, Jonker FH, Prieto P, Thalen M, Baumans V. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol In Vitro.* 2004; 18:1–12.
12. Price PJ, Gregory EA. Relationship between *in vitro* growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement. *In Vitro.* 1982; 18:576–584.
13. Zheng X, Baker H, Hancock WS, Fawaz F, McCaman M, Pungor E Jr. Proteomic Analysis for the Assessment of Different Lots of Fetal Bovine Serum as a Raw Material for Cell Culture. Part IV. Application of Proteomics to the Manufacture of Biological Drugs. *Biotechnol Progress.* 2008; 22:1294–1300.
14. Goegan P, Johnson G, Vincent R. Effects of serum protein and colloid on the alamarBlue assay in cell cultures. *Toxicol In Vitro.* 1995; 9:257–266.
15. Bottenstein J. *Cell Culture in the Neurosciences.* Current Topics in Neurobiology. Boston, MA: Springer Science & Business Media. 1985.
16. Foo LC, Allen NJ, Bushong EA, Ventura PB, Chung WS, Zhou L, Cahoy JD, Daneman R, Zong H, Ellisman MH, Ben A Barres. Development of a Method for the Purification and Culture of Rodent Astrocytes. *Neuron.* 2011; 71:799–811.
17. Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta.* 2001; 310:173–186.
18. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res.* 1993; 35:567–576.
19. Bardy C, van den Hurk M, Eames T, Marchand C, Hernandez RV, Kellogg M, Gorris M, Galet B, Palomares

- V, Brown J, Bang AG, Mertens J, Böhnke L, et al. Neuronal medium that supports basic synaptic functions and activity of human neurons *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112:E2725–34.
20. Kersting G. *Tissue Culture of Human Gliomas*. Volume 2. Karger Publishers. 1968:165–202. [Progress in Neurological Surgery]
  21. Hoshino T, Barker M, Wilson CB. The kinetics of cultured human glioma cells. *Acta Neuropathol*. 1975; 32:235–244.
  22. Pontén J, Macintyre EH. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1968; 74:465–486.
  23. Allen M, Bjerke M, Edlund H, Nelander S, Westermark B. Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. *Sci Transl Med*. 2016; 8:354re3–354re3.
  24. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003; 63:5821–5828.
  25. Quiñones-Hinojosa A, Sanai N, Gonzalez-Perez O, Garcia-Verdugo JM. The human brain subventricular zone: stem cells in this niche and its organization. *Neurosurg Clin N Am*. 2007; 18:15–20–vii.
  26. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004; 432:396–401.
  27. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, Park JK, Fine HA. 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; 9:391–403.
  28. Jiang Y, Marinescu VD, Xie Y, Jarvius M, Maturi NP, Haglund C, Olofsson S, Lindberg N, Olofsson T, Leijonmarck C, Hesselager G, Alafuzoff I, Fryknäs M, et al. Glioblastoma Cell Malignancy and Drug Sensitivity Are Affected by the Cell of Origin. *Cell Rep*. 2017; 18:977–990.
  29. Xie Y, Bergström T, Jiang Y, Johansson P, Marinescu VD, Lindberg N, Segerman A, Wicher G, Niklasson M, Baskaran S, Sreedharan S, Everlien I, Kastemar M, et al. The Human Glioblastoma Cell Culture Resource: Validated Cell Models Representing All Molecular Subtypes. *EBioMedicine*. 2015; 2:1351–1363.
  30. Piaskowski S, Bienkowski M, Stoczynska-Fidelus E, Stawski R, Sieruta M, Szybka M, Papierz W, Wolanczyk M, Jaskolski DJ, Liberski PP, Rieske P. Glioma cells showing IDH1 mutation cannot be propagated in standard cell culture conditions. *Br J Cancer*. 2011; 104:968–970.
  31. Günther HS, Schmidt NO, Phillips HS, Kemming D, Kharbanda S, Soriano R, Modrusan Z, Meissner H, Westphal M, Lamszus K. Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene*. 2008; 27:2897–2909.
  32. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*. 2004; 64:7011–7021.
  33. Beliveau A, Thomas G, Gong J, Wen Q, Jain A. Aligned Nanotopography Promotes a Migratory State in Glioblastoma Multiforme Tumor Cells. *Sci Rep*. 2016; 6:26143.
  34. Rama AR, Alvarez PJ, Madeddu R, Aranega A. ABC transporters as differentiation markers in glioblastoma cells. *Mol Biol Rep*. 2014; 41:4847–4851.
  35. Miconi G, Palumbo P, Dehcordi SR, La Torre C, Lombardi F, Evtoski Z, Cimini AM, Galzio R, Cifone MG, Cinque B. Immunophenotypic characterization of human glioblastoma stem cells: correlation with clinical outcome. *J Cell Biochem*. 2015; 116:864–876.
  36. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 2013; 501:346–354.
  37. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013; 19:1423–1437.
  38. Gomez-Roman N, Stevenson K, Gilmour L, Hamilton G, Chalmers AJ. A novel 3D human glioblastoma cell culture system for modeling drug and radiation responses. *Neuro Oncol*. 2017; 19:229–241.
  39. Fernandez-Fuente G, Mollinedo P, Grande L, Vazquez-Barquero A, Fernandez-Luna JL. Culture Dimensionality Influences the Resistance of Glioblastoma Stem-like Cells to Multikinase Inhibitors. *Mol Cancer Ther*. 2014; 13:1664–1672.
  40. Laks DR, Crisman TJ, Shih MYS, Mottahedeh J, Gao F, Sperry J, Garrett MC, Yong WH, Cloughesy TF, Liao LM, Lai A, Coppola G, Kornblum HI. Large-scale assessment of the gliomasphere model system. *Neuro Oncol*. 2016; 18:1367–1378.
  41. Ledur PF, Liu C, He H, Harris AR, Minussi DC, Zhou HY, Shaffrey ME, Asthagiri A, Lopes MBS, Schiff D, Lu YC, Mandell JW, Lenz G, Zong H. Culture conditions tailored to the cell of origin are critical for maintaining native properties and tumorigenicity of glioma cells. *Neuro Oncol*. 2016; 18:1413–1424.
  42. Liu C, Sage JC, Miller MR, Verhaak RGW, Hippenmeyer S, Vogel H, Foreman O, Bronson RT, Nishiyama A, Luo L, Zong H. Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell*. 2011; 146:209–221.
  43. Suvà ML, Rheinbay E, Gillespie SM, Patel AP, Wakimoto H, Rabkin SD, Riggi N, Chi AS, Cahill DP, Nahed BV, Curry WT, Martuza RL, Rivera MN, et al. Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell*. 2014; 157:580–594.
  44. Vlashi E, Kim K, Lagadec C, Donna LD, McDonald JT, Eghbali M, Sayre JW, Stefani E, McBride W, Pajonk F. *In vivo* imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells. *J Natl Cancer Inst*. 2009; 101:350–359.

45. Diamandis P, Wildenhain J, Clarke ID, Sacher AG, Graham J, Bellows DS, Ling EKM, Ward RJ, Jamieson LG, Tyers M, Dirks PB. Chemical genetics reveals a complex functional ground state of neural stem cells. *Nat Chem Biol.* 2007; 3:268–273.
46. Gage FH, Ray J, Fisher LJ. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci.* 1995; 18:159–192.
47. Codega P, Silva-Vargas V, Paul A, Maldonado-Soto AR, Deleo AM, Pastrana E, Doetsch F. Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche. *Neuron.* 2014; 82:545–559.
48. Campos B, Wan F, Farhadi M, Ernst A, Zeppernick F, Tagscherer KE, Ahmadi R, Lohr J, Dictus C, Gdynia G, Combs SE, Goidts V, Helmke BM, et al. Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. *Clin Cancer Res.* 2010; 16:2715–2728.
49. Aguado T, Carracedo A, Julien B, Velasco G, Milman G, Mechoulam R, Alvarez L, Guzmán M, Galve-Roperh I. Cannabinoids induce glioma stem-like cell differentiation and inhibit gliomagenesis. *J Biol Chem.* 2007; 282:6854–6862.
50. Gal H, Makovitzki A, Amariglio N, Rechavi G, Ram Z, Givol D. A rapid assay for drug sensitivity of glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 358:908–913.
51. Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, Danovi D, Stricker S, Russell R, Bayani J, Head R, Lee M, Bernstein M, Squire JA, Smith A, Dirks P. Glioma Stem Cell Lines Expanded in Adherent Culture Have Tumor-Specific Phenotypes and Are Suitable for Chemical and Genetic Screens. *Cell Stem Cell.* 2009; 4:568–580.
52. Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, Carlson MD, Ambudkar SV, Varticovski L. Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res.* 2008; 10:R10.
53. Vermeulen L, Sprick MR, Kemper K, Stassi G, Medema JP. Cancer stem cells – old concepts, new insights. *Cell Death Differ.* 2008; 15:947–958.
54. Kemper K, Sprick MR, de Bree M, Scopelliti A, Vermeulen L, Hoek M, Zeilstra J, Pals ST, Mehmet H, Stassi G, Medema JP. The AC133 Epitope, but not the CD133 Protein, Is Lost upon Cancer Stem Cell Differentiation. *Cancer Res.* 2010; 70:719–729.
55. Bidlingmaier S, Zhu X, Liu B. The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. *J Mol Med.* 2008; 86:1025–1032.
56. Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer.* 2012; 12:133–143.
57. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature.* 2011; 469:314–322.
58. Liu C, Zong H. Developmental origins of brain tumors. *Curr Opin Neurobiol.* 2012; 22:844–849.
59. Bachoo RM, Maher EA, Ligon KL, Sharpless NE, Chan SS, You MJ, Tang Y, DeFrances J, Stover E, Weissleder R, Rowitch DH, Louis DN, DePinho RA. Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell.* 2002; 1:269–277.
60. Dufour C, Cadusseau J, Varlet P, Surena AL, de Faria GP, Dias-Morais A, Auger N, Léonard N, Daudigeos E, Dantas-Barbosa C, Grill J, Lazar V, Dessen P, et al. Astrocytes reverted to a neural progenitor-like state with transforming growth factor alpha are sensitized to cancerous transformation. *Stem Cells.* 2009; 27:2373–2382.
61. Chow LML, Endersby R, Zhu X, Rankin S, Qu C, Zhang J, Broniscer A, Ellison DW, Baker SJ. Cooperativity within and among Pten, p53, and Rb pathways induces high-grade astrocytoma in adult brain. *Cancer Cell.* 2011; 19:305–316.
62. Alcantara Llaguno S, Chen J, Kwon C-H, Jackson EL, Li Y, Burns DK, Alvarez-Buylla A, Parada LF. Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell.* 2009; 15:45–56.
63. Zhu Y, Guignard F, Zhao D, Liu L, Burns DK, Mason RP, Messing A, Parada LF. Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma. *Cancer Cell.* 2005; 8:119–130.
64. Zheng H, Ying H, Yan H, Kimmelman AC, Hiller DJ, Chen AJ, Perry SR, Tonon G, Chu GC, Ding Z, Stommel JM, Dunn KL, Wiedemeyer R, et al. p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature.* 2008; 455:1129–1133.
65. Persson AI, Petritsch C, Swartling FJ, Itsara M, Sim FJ, Auvergne R, Goldenberg DD, Vandenberg SR, Nguyen KN, Yakovenko S, Ayers-Ringler J, Nishiyama A, Stallcup WB, et al. Non-stem cell origin for oligodendroglioma. *Cancer Cell.* 2010; 18:669–682.
66. Lindberg N, Kastemar M, Olofsson T, Smits A, Uhrbom L. Oligodendrocyte progenitor cells can act as cell of origin for experimental glioma. *Oncogene.* 2009; 28:2266–2275.
67. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 2010; 17:98–110.
68. Lei L, Sonabend AM, Guarnieri P, Soderquist C, Ludwig T, Rosenfeld S, Bruce JN, Canoll P. Glioblastoma models reveal the connection between adult glial progenitors and the proneural phenotype. *PLoS One.* 2011; 6:e20041.
69. Jiang Y, Uhrbom L. On the origin of glioma. *Ups J Med Sci.* 2012; 117:113–121.
70. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature.* 2001; 414:105–101.
71. White AC, Lowry WE. Refining the role for adult stem cells as cancer cells of origin. *Trends Cell Biol.* 2015; 25:11–20.
72. Rycak K, Tang DG. Cell-of-Origin of Cancer versus Cancer Stem Cells: Assays and Interpretations. *Cancer Res.* 2015; 75:4003–4011.

73. Raff MC, Lillien LE, Richardson WD, Burne JF, Noble MD. Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture. *Nature*. 1988; 333:562–565.
74. Richardson WD, Pringle N, Mosley MJ, Westermarck B, Dubois-Dalcq M. A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. *Cell*. 1988; 53:309–319.
75. Chang E, Pohling C, Natarajan A, Witney TH, Kaur J, Xu L, Gowrishankar G, D'Souza AL, Murty S, Schick S, Chen L, Wu N, Khaw P, et al. AshwaMAX and Withaferin A inhibits gliomas in cellular and murine orthotopic models. *J Neurooncol*. 2016; 126:253–264.
76. Di K, Linskey ME, Bota DA. TRIM11 is overexpressed in high-grade gliomas and promotes proliferation, invasion, migration and glial tumor growth. *Oncogene*. 2013; 32:5038–5047.
77. Katt ME, Placone AL, Wong AD, Xu ZS, Searson PC. *In Vitro* Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Front Bioeng Biotechnol*. 2016; 4:311–14.
78. Ocana A, Pandiella A, Siu LL, Tannock IF. Preclinical development of molecular-targeted agents for cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010; 8:200–209.
79. Szerlip NJ, Pedraza A, Chakravarty D, Azim M, McGuire J, Fang Y, Ozawa T, Holland EC, Huse JT, Jhanwar S, Leversha MA, Mikkelsen T, Brennan CW. Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109:3041–3046.
80. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, Morozova O, Newton Y, Radenbaugh A, Pagnotta SM, Anjum S, Wang J, Manyam G, et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell*. 2016; 164:550–563.
81. Bhat KPL, Salazar KL, Balasubramanian V, Wani K, Heathcock L, Hollingsworth F, James JD, Gumin J, Diefes KL, Kim SH, Turski A, Azodi Y, Yang Y, et al. The transcriptional coactivator TAZ regulates mesenchymal differentiation in malignant glioma. *Genes Dev*. 2011; 25:2594–2609.
82. Bhat KPL, Balasubramanian V, Vaillant B, Ezhilarasan R, Hummelink K, Hollingsworth F, Wani K, Heathcock L, James JD, Goodman LD, Conroy S, Long L, Lelic N, et al. Mesenchymal differentiation mediated by NF- $\kappa$ B promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer Cell*. 2013; 24:331–346.
83. Ozawa T, Riestter M, Cheng YK, Huse JT, Squatrito M, Helmy K, Charles N, Michor F, Holland EC. Most human non-GCIMP glioblastoma subtypes evolve from a common proneural-like precursor glioma. *Cancer Cell*. 2014; 26:288–300.
84. Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, Bollo RJ, Zhao X, Snyder EY, Sulman EP, Anne SL, Doetsch F, Colman H, Lasorella A, Aldape K, Califano A, Iavarone A. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature*. 2010; 463:318–325.
85. Jiang Y, Marinescu VD, Xie Y, Jarvius M, Maturi NP, Haglund C, Olofsson S, Lindberg N, Olofsson T, Leijonmarck C, Hesselager G, Alafuzoff I, Fryknäs M, et al. Glioblastoma Cell Malignancy and Drug Sensitivity Are Affected by the Cell of Origin. *Cell Rep*. 2017; 18:977–990.



## **Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries?**

### **SUPPLEMENTARY MATERIALS**

**Supplementary File 1: List of references cited in milestones addressed in Figure 1 -Timeline of important milestones in cell culture and GBM cell culture. See Supplementary\_File\_1**

**Supplementary File 2: Literature review of growth conditions used in GBM primary cultures. See Supplementary\_File\_2**

**Supplementary File 3: Qualitative summary of the data published in papers comparing the effect on several characteristics of differentiating versus non-differentiating culture conditions. See Supplementary\_File\_3**

References for Figure 1:

1. Langdon SP. *Cancer Cell Culture*. New Jersey: Springer Science & Business Media, 2004.
2. Harrison RG, Greenman MJ, Mall FP et al. Observations of the living developing nerve fiber. *The Anatomical Record* 1907;1:116–28.
3. Keilová H. The effect of streptomycin on tissue cultures. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1948.
4. Kersting G. *Tissue Culture of Human Gliomas*. Karger Publishers, 1968:165–202.
5. Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 1953;97:695–710.
6. Eagle H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 1955;122:501–14.
7. Ham RG. Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1965;53:288–93.
8. Hayashi I, Sato GH. Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature* 1976;259:132–4.
9. Brewer GJ, Torricelli J, Evege EK et al. Neurobasal medium/B27 supplement: A new serum-free medium combination for survival of neurons. *Focus* 1996:1–4.
10. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003;63:5821–8.
11. 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;9:391–403.
12. Wang Y, Yang J, Zheng H et al. Expression of mutant p53 proteins implicates a lineage relationship between neural stem cells and malignant astrocytic glioma in a murine model. *Cancer Cell* 2009;15:514–26.
13. Persson AI, Petritsch C, Swartling FJ et al. Non-stem cell origin for oligodendroglioma. *Cancer Cell* 2010;18:669–82.
14. Liu C, Sage JC, Miller MR et al. Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell* 2011;146:209–21.
15. Ledur PF, Liu C, He H et al. Culture conditions tailored to the cell of origin are critical for maintaining native properties and tumorigenicity of glioma cells. *Neuro Oncol* 2016;18:1413–24.





Establishment and Biological Characterization of a Panel of Glioblastoma Multiforme (GBM) and GBM Variant Oncosphere Cell Lines	2016	PLOS ONE																0	20	10	
Differential response of patient-derived primary glioblastoma cells to environmental stiffness	2016	SCIENTIFIC REPORTS																0	20	10	
Metformin inhibits proliferation and migration of glioblastoma cells independently of TGF- $\beta$ 2	2016	CELL CYCLE																0	20	20	
Sensitizer drugs for the treatment of temozolomide-resistant glioblastoma	2016	JOURNAL OF B.U.O.N. OFFICIAL JOURNAL OF THE BALKAN UNION OF ONCOLOGY																1			
Directly visualized glioblastoma-derived extracellular vesicles transfer RNA to microglia/macrophages in the brain	2016	NEURO-ONCOLOGY																1			
AshwaMAX and Withaferin A inhibits gliomas in cellular and murine orthotopic models	2016	JOURNAL OF NEURO-ONCOLOGY																0	20	20	10
Wnt inhibition is dysregulated in gliomas and its re-establishment inhibits proliferation and tumor sphere formation	2016	EXPERIMENTAL CELL RESEARCH																0	20	10	
A novel stem cell culture model of recurrent glioblastoma	2016	JOURNAL OF NEURO-ONCOLOGY																0	20	20	
Serum-Induced Differentiation of Glioblastoma Neurospheres Leads to Enhanced Migration/Invasion Capacity That Is Associated with Increased MMP9	2015	PLOS ONE																0	20	20	
Discovery of potent and selective cytotoxic activity of new quinazoline-ureas against TMZ-resistant glioblastoma multiforme (GBM)	2015	EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY																0	20	20	
The Human Glioblastoma Cell Culture Resource: Validated Cell Models Representing All Molecular Subtypes	2015	EBIOMEDICINE																0	10	10	
Chloroquine inhibits the malignant phenotype of glioblastoma partially by suppressing TGF-beta	2015	INVESTIGATIONAL NEW DRUGS																1			
In vitro and in vivo effect of human lactoferrin on glioblastoma growth	2015	JOURNAL OF NEUROSURGERY																1			
Glioblastoma-derived extracellular vesicles modify the phenotype of monocytic cells	2015	INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER																0	5	5	

Combined expressional analysis, bioinformatics and targeted proteomics identify new potential therapeutic targets in glioblastoma stem cells	2015	ONCOTARGET														0	20	10	
Knockdown of NAT12/NAA30 reduces tumorigenic features of glioblastoma-initiating cells	2015	MOLECULAR CANCER														0	20	10	
Endothelial cells induce cancer stem cell features in differentiated glioblastoma cells via bFGF	2015	MOLECULAR CANCER														0	20	50	
Dexamethasone-Mediated Activation of Fibronectin Matrix Assembly Reduces Dispersal of Primary Human Glioblastoma Cells	2015	PLOS ONE														1			
Novel chemical library screen identifies naturally occurring plant products that specifically disrupt glioblastoma-endothelial cell interactions	2015	ONCOTARGET														0	20	20	
Identification of Global DNA Methylation Signatures in Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells	2015	JOURNAL OF GENETICS AND GENOMICS														0	20	20	
Enhanced immunosuppression by therapy-exposed glioblastoma multiforme tumor cells	2015	INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER														1			
Controlled release microspheres loaded with BMP7 suppress primary tumors from human glioblastoma	2015	ONCOTARGET														0	40	20	
PTPIP51 levels in glioblastoma cells depend on inhibition of the EGF-receptor	2015	JOURNAL OF NEURO-ONCOLOGY														1			
Immunophenotypic Characterization of Human Glioblastoma Stem Cells: Correlation With Clinical Outcome	2015	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY														1			
																0	20	20	
Combined treatment of Nimotuzumab and rapamycin is effective against temozolomide-resistant human gliomas regardless of the EGFR mutation status	2015	BMC CANCER														1			
Radiation-induced PGE2 sustains human glioma cell growth and survival through EGF signaling	2015	ONCOTARGET														0	20	25	
Constitutive Activation of Myosin-Dependent Contractility Sensitizes Glioma Tumor-Initiating Cells to Mechanical Inputs and Reduces Tissue Invasion	2015	CANCER RESEARCH														0	20	10	

ABT-888 enhances cytotoxic effects of temozolomide independent of MGMT status in serum free cultured glioma cells	2015	JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE															0	5	5	
Proportional Upregulation of CD97 Isoforms in Glioblastoma and Glioblastoma-Derived Brain Tumor Initiating Cells	2015	PLOS ONE															0	20	20	
Oncostatin-M Differentially Regulates Mesenchymal and Proneural Signature Genes in Gliomas via STAT3 Signaling	2015	NEOPLASIA															1			
Radiotherapy Followed by Aurora Kinase Inhibition Targets Tumor-Propagating Cells in Human Glioblastoma	2015	MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS															0	20	20	
Secretory prostate apoptosis response (Par)-4 sensitizes multicellular spheroids (MCS) of glioblastoma multiforme cells to tamoxifen-induced cell death	2015	FEBS OPEN BIO															1			
Reactive oxygen species-mediated therapeutic response and resistance in glioblastoma	2015	CELL DEATH & DISEASE															0	25	25	
Evaluation of Novel Imidazotetrazine Analogues Designed to Overcome Temozolomide Resistance and Glioblastoma Regrowth	2015	MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS															0	20	20	
Myelin-forming cell-specific cadherin-19 is a marker for minimally infiltrative glioblastoma stem-like cells	2015	JOURNAL OF NEUROSURGERY															0	20	20	
Human Cytomegalovirus Gene Expression in Long-Term Infected Glioma Stem Cells	2014	PLOS ONE															0	20	20	
Selective Lentiviral Gene Delivery to CD133-Expressing Human Glioblastoma Stem Cells	2014	PLOS ONE															0	20	20	
Interrogation of gossypol therapy in glioblastoma implementing cell line and patient-derived tumour models	2014	BRITISH JOURNAL OF CANCER															0	20	10	
Hypoxia-cultured human adipose-derived mesenchymal stem cells are non-oncogenic and have enhanced viability, motility, and tropism to brain cancer	2014	CELL DEATH & DISEASE															0	20	20	

TRIM28 and beta-Actin Identified via Nanobody-Based Reverse Proteomics Approach as Possible Human Glioblastoma Biomarkers	2014	PLOS ONE															1	10	10
Feasibility assessment of in vitro chemoresponse assay on stereotactic biopsies of glioblastoma multiforms: a step towards personalized medicine	2014	Iranian Journal of Basic Medical Sciences															1		
A co-culture model with brain tumor-specific bioluminescence demonstrates astrocyte-induced drug resistance in glioblastoma	2014	JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE															1		
Human Brat Ortholog TRIM3 Is a Tumor Suppressor That Regulates Asymmetric Cell Division in Glioblastoma	2014	CANCER RESEARCH															0	NS	NS
FANCD2 re-expression is associated with glioma grade and chemical inhibition of the Fanconi Anaemia pathway sensitises gliomas to chemotherapeutic agents	2014	ONCOTARGET															0	20	20
ABC transporters as differentiation markers in glioblastoma cells	2014	MOLECULAR BIOLOGY REPORTS															0	20	20
																	1		
Differential expression of miR200a-3p and miR21 in grade II-III and grade IV gliomas Evidence that miR200a-3p is regulated by O-6-methylguanine methyltransferase and promotes temozolomide responsiveness	2014	CANCER BIOLOGY & THERAPY															1		
Novel Anti-Apoptotic MicroRNAs 582-5p and 363 Promote Human Glioblastoma Stem Cell Survival via Direct Inhibition of Caspase 3, Caspase 9, and Bim	2014	PLOS ONE															0	NS	NS
A Novel Berbamine Derivative Inhibits Cell Viability and Induces Apoptosis in Cancer Stem-Like Cells of Human Glioblastoma, via Up-Regulation of miRNA-4284 and JNK/AP-1 Signaling	2014	PLOS ONE															0	20	20
Response of primary glioblastoma cells to therapy is patient specific and independent of cancer stem cell phenotype	2014	NEURO-ONCOLOGY															1		
																	0	20	20



Differentiation of glioblastoma multiforme stem-like cells leads to downregulation of EGFR and EGFRvIII and decreased tumorigenic and stem-like cell potential	2014	CANCER BIOLOGY & THERAPY																0	10	10		
A novel tumor-promoting role for nuclear factor IA in glioblastomas is mediated through negative regulation of p53, p21, and PAI1	2014	NEURO-ONCOLOGY																	0	20	20	
Differential patterns of NOTCH1-4 receptor expression are markers of glioma cell differentiation	2014	NEURO-ONCOLOGY																	0	20	20	
																				1		
Selective anti-tumor activity of the novel fluoropyrimidine polymer F10 towards G48a orthotopicGBM tumors	2014	JOURNAL OF NEURO-ONCOLOGY																	1			
Indatraline inhibits Rho- and calcium-mediated glioblastoma cell motility and angiogenesis	2014	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS																	0	NS	NS	
The mTORC1/mTORC2 inhibitor AZD2014 enhances the radiosensitivity of glioblastoma stem-like cells	2014	NEURO-ONCOLOGY																	0	50	50	
Inhibition of CXCL12/CXCR4 autocrine/paracrine loop reduces viability of human glioblastoma stem-like cells affecting self-renewal activity	2013	TOXICOLOGY																	0	20	10	
																				1		
Frequency of NFKBIA deletions is low in glioblastomas and skewed in glioblastoma neurospheres	2013	MOLECULAR CANCER																	0	20	20	
NF-kappa B-Induced IL-6 Ensures STAT3 Activation and Tumor Aggressiveness in Glioblastoma	2013	PLOS ONE																	0	10	10	
A High-Content Small Molecule Screen Identifies Sensitivity of Glioblastoma Stem Cells to Inhibition of Polo-Like Kinase 1	2013	PLOS ONE																	0	10	10	
TRIM11 is overexpressed in high-grade gliomas and promotes proliferation, invasion, migration and glial tumor growth	2013	ONCOGENE																	0	20	40	20
Assessment of genetic markers and glioblastoma stem-like cells in activation of dendritic cells	2013	HUMAN CELL																	1			

Polo-like kinase 1 inhibition causes decreased proliferation by cell cycle arrest, leading to cell death in glioblastoma	2013	CANCER GENE THERAPY																	1				
Intravenous injection of oncolytic picornavirus SVV-001 prolongs animal survival in a panel of primary tumor based orthotopic xenograft mouse models of pediatric glioma	2013	NEURO-ONCOLOGY																		0	50	50	
																					1		
CMV-Independent Lysis of Glioblastoma by Ex Vivo Expanded/Activated V delta 1+gamma delta T Cells	2013	PLOS ONE																		1			
Establishment and Characterization of Primary Glioblastoma Cell Lines from Fresh and Frozen Material: A Detailed Comparison	2013	PLOS ONE																		1			
Lyn Facilitates Glioblastoma Cell Survival under Conditions of Nutrient Deprivation by Promoting Autophagy	2013	PLOS ONE																		0	NS	NS	
Cytoplasmic TRADD Confers a Worse Prognosis in Glioblastoma	2013	NEOPLASIA																		0	10	10	
Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid, an inhibitor of Sp1-mediated survivin transcription, induces apoptosis and acts synergistically with chemo-radiotherapy in glioblastoma cells	2013	INVESTIGATIONAL NEW DRUGS																		1			
Level of Notch activation determines the effect on growth and stem cell-like features in glioblastoma multiforme neurosphere cultures	2013	CANCER BIOLOGY & THERAPY																		0	10	10	
Vaccinia virus expressing bone morphogenetic protein-4 in novel glioblastoma orthotopic models facilitates enhanced tumor regression and long-term survival	2013	JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE																		0	20	20	
Effect of lomeguatrib-temozolomide combination on MGMT promoter methylation and expression in primary glioblastoma tumor cells	2013	TUMOR BIOLOGY																		1			
Targeting the Cytosolic Innate Immune Receptors RIG-I and MDA5 Effectively Counteracts Cancer Cell Heterogeneity in Glioblastoma	2013	STEM CELLS																		0	50	50	

Targeting Cancer Cells With the Natural Compound Obtusaquinone	2013	JNCI-JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE																0	20	10	
Murine cell line model of proneural glioma for evaluation of anti-tumor therapies	2013	JOURNAL OF NEURO-ONCOLOGY																1		10	10
Overexpression of CD97 Confers an Invasive Phenotype in Glioblastoma Cells and Is Associated with Decreased Survival of Glioblastoma Patients	2013	PLOS ONE																1			
Using a preclinical mouse model of high-grade astrocytoma to optimize p53 restoration therapy	2013	PNAS																0	20	20	
A Cancer Stem Cell Model for Studying Brain Metastases From Primary Lung Cancer	2013	JNCI-JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE																0	20	20	
Oncolytic measles virus strains have significant antitumor activity against glioma stem cells	2013	GENE THERAPY																1			
																		0			
5'-ectonucleotidase mediates multiple-drug resistance in glioblastoma multiforme cells	2013	JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY																1			
High-Resolution Mutational Profiling Suggests the Genetic Validity of Glioblastoma Patient-Derived Pre-Clinical Models	2013	PLOS ONE																0	20	10	
Mer receptor tyrosine kinase promotes invasion and survival in glioblastoma multiforme	2013	ONCOGENE																0	20	20	
Rapamycin inhibits the growth of glioblastoma	2013	BRAIN RESEARCH																1			
Sorafenib selectively depletes human glioblastoma tumor-initiating cells from primary cultures	2013	CELL CYCLE																0	20	10	
Cyclopamine cooperates with EGFR inhibition to deplete stem-like cancer cells in glioblastoma-derived spheroid cultures	2012	NEURO-ONCOLOGY																0	20	20	
																		1			
Overexpression of Calcium-Permeable Glutamate Receptors in Glioblastoma Derived Brain Tumor Initiating Cells	2012	PLOS ONE																0	20	20	
																		1			
Cancer stem cells from a rare form of glioblastoma multiforme involving the neurogenic ventricular wall	2012	CANCER CELL INTERNATIONAL																0	20	20	
																		1			

Lectins Identify Glycan Biomarkers on Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells	2012	STEM CELLS AND DEVELOPMENT																0	20	10	
																		0			
Imp2 controls oxidative phosphorylation and is crucial for preserving glioblastoma cancer stem cells	2012	GENES & DEVELOPMENT																0	10	10	
																		1			
Progenitor-like Traits Contribute to Patient Survival and Prognosis in Oligodendroglial Tumors	2012	CLINICAL CANCER RESEARCH																0	NS	NS	
In vitro and in vivo characterization of a novel hedgehog signaling antagonist in human glioblastoma cell lines	2012	INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER																0	20	20	
																		1			
p16-Cdk4-Rb axis controls sensitivity to a cyclin-dependent kinase inhibitor PD0332991 in glioblastoma xenograft cells	2012	NEURO-ONCOLOGY																1			
Analysis of Tumor Metabolism Reveals Mitochondrial Glucose Oxidation in Genetically Diverse Human Glioblastomas in the Mouse Brain In Vivo	2012	CELL METABOLISM																0	20	10	
Hypoxia Moderates gamma(1)34.5-Deleted Herpes Simplex Virus Oncolytic Activity in Human Glioma Xenoline Primary Cultures	2012	TRANSLATIONAL ONCOLOGY																0	10	10	
Hedgehog signaling in glioblastoma multiforme	2012	CANCER BIOLOGY & THERAPY																1			
CXCL12 Mediates Trophic Interactions between Endothelial and Tumor Cells in Glioblastoma	2012	PLOS ONE																0	20	20	
Targeting autophagy enhances BO-1051-induced apoptosis in human malignant glioma cells	2012	CANCER CHEMOTHERAPY AND PHARMACOLOGY																1			
Human Glioblastoma Stem-Like Cells are More Sensitive to Allogeneic NK and T Cell-Mediated Killing Compared with Serum-Cultured Glioblastoma Cells	2012	BRAIN PATHOLOGY																0	20	20	
																		1			
Bmi1 marks intermediate precursors during differentiation of human brain tumor initiating cells	2012	STEM CELL RESEARCH																0	20	20	
Maintenance of primary tumor phenotype and genotype in glioblastoma stem cells	2012	NEURO-ONCOLOGY																0	20	20	

LEGEND		
NS= non specified	YES= 1	[concentration]
	NO= 0	ng/mL
		ug/mL
Papers that used more than one growth condition		%

Title	Year	Journal	Phenotype	Culture Condition	
				Non-differentiating	Differentiating
Stattic and metformin inhibit brain tumor initiating cells by reducing STAT3-phosphorylation	2017	ONCOTARGET	Migration	=	=
			Proliferation	-	+
			Response to Stat3 inhibitor and AMPK activator	+	-
			Invasion	=	=
Aligned Nanotopography Promotes a Migratory State in Glioblastoma Multiforme Tumor Cells	2016	SCIENTIFIC REPORTS	Cytoskeletal Stiffness	-	+
			Invasion	+	-
			Cell traction stress	-	+
Immunophenotypic Characterization of Human Glioblastoma Stem Cells: Correlation With Clinical Outcome	2015	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY	Overall Survival	-	+
			Progression-free Survival	-	+
ABC transporters as differentiation markers in glioblastoma cells	2014	MOLECULAR BIOLOGY REPORTS	Drug efflux capacity	-	+
Response of primary glioblastoma cells to therapy is patient specific and independent of cancer stem cell phenotype	2014	NEURO-ONCOLOGY	TMZ resistance	=	=
			XRT resistance	=	=
Differential patterns of NOTCH1-4 receptor expression are markers of glioma cell differentiation	2014	NEURO-ONCOLOGY	NOTCH1 expression	-	+
			NOTCH4 expression	+	-
Inhibition of CXCL12/CXCR4 autocrine/paracrine loop reduces viability of human glioblastoma stem-like cells affecting self-renewal activity	2013	TOXICOLOGY	CXCL12/CXCR4 dependence	+	-
			CXCL12 release	+	-
Cyclopamine cooperates with EGFR inhibition to deplete stem-like cancer cells in glioblastoma-derived spheroid cultures	2012	NEURO-ONCOLOGY	Erlotinib resistance	-	+
			Cyclopamine resistance	-	+
Overexpression of Calcium-Permeable Glutamate Receptors in Glioblastoma Derived Brain Tumor	2012	PLOS ONE	Calcium-permeable AMPA receptor expression	+	-
Lectins Identify Glycan Biomarkers on Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells	2012	STEM CELLS AND DEVELOPMENT	GalNAc expression	+	-
			GlnNAc expression	+	-
Imp2 controls oxidative phosphorylation and is crucial for preserving glioblastoma cancer stem cells	2012	GENES & DEVELOPMENT	Imp2 expression	+	-
			O2 consumption	+	-
			Anaerobic glycolysis inhibitor sensitivity	-	+
			OXPHOS inhibitor sensitivity	+	-
In vitro and in vivo characterization of a novel hedgehog signaling antagonist in human glioblastoma cell lines	2012	INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER	Hedgehog components expression (SMO, SHH and PTCH1)	+	-
			Hedgehog inhibitors sensitivity (Curis, SEN450, Cyclopamine)	+	-
Human Glioblastoma Stem-Like Cells are More Sensitive to Allogeneic NK and T Cell-Mediated Killing Compared with Serum-Cultured Glioblastoma Cells	2012	BRAIN PATHOLOGY	NK-mediated cell lysis	+	-
			T cell-mediated cell lysis	+	-

# Capítulo IV

## ***Single-cell Outlier analysis in cancer***

Artigo em preparação

Este capítulo foi desenvolvido com base no trabalho realizado durante meu estágio de doutorado sanduíche pelo período de 6 meses no laboratório do professor Dr. Harley Kornblum, na Universidade da Califórnia de Los Angeles (UCLA). Nesse estágio trabalhei com a técnica de citometria de massas, participando da implementação da mesma no laboratório, desde os protocolos experimentais até a análise de dados. Os dados experimentais utilizados nesse estudo são parte do conjunto de dados gerados durante esse período.

*Tecnologias modernas de análises de célula única são ferramentas cruciais para o estudo da heterogeneidade intratumoral, permitindo uma caracterização completa da identidade e da função de cada célula no câncer. No entanto, obter informações relevantes desses experimentos se torna um obstáculo diante da enorme quantidade de dados gerada. Neste capítulo, apresentamos uma abordagem diferente para analisar dados de células únicas com foco em células outlier. As células que estão nos extremos da distribuição de uma amostra são geralmente descartadas da análise de dados. No câncer, no entanto, essas células podem ser de grande importância, uma vez que podem revelar características incomuns associadas à resistência terapêutica.*

## Single-cell Outlier analysis in cancer

**Giovana Ravizzoni Onzi<sup>1</sup>, Alvaro G. Alvarado<sup>2</sup>, Juliano Luiz Faccioni<sup>1</sup>, Paula Andreghetto Bracco<sup>3</sup>, Guido Lenz<sup>1\*</sup> and Harley I. Kornblum<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biophysics and Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 9500 - Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil. E-mail addresses: Giovana Ravizzoni Onzi - gioonzi@gmail.com; Juliano Luiz Faccioni – julianofaccioni@gmail.com

<sup>2</sup>Department of Psychiatry and Biobehavioral Sciences and Semel Institute for Neuroscience, University of California Los Angeles. Los Angeles, CA 90095, USA. E-mail address: Alvaro Alvarado - agac86@gmail.com

<sup>3</sup>Graduate Program in Epidemiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). R. Ramiro Barcelos, 2400 - Porto Alegre, RS 90035003, Brazil. E-mail address: paula.abracco@gmail.com

\*Corresponding author: Av. Bento Gonçalves 9500 - Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil. Phone number: +55 (051).33087613. E-mail address: lenz@ufrgs.br

\* Corresponding author: 635 Charles E. Young Drive South - Los Angeles, CA 90095, EUA. Phone number: +1 (310) 794-7866. E-mail address: HKornblum@mednet.ucla.edu; Harley@ucla.edu.



## ABSTRACT

Heterogeneity has significant implications for the understanding of cancer biology. Particularly in the cellular level, it works as a fuel for resistance, making tumors extremely difficult to treat. Thus, dissecting intratumoral heterogeneity is a fundamental step to overcome this barrier and propose more efficient therapeutic strategies. Significant advances have been made in the development of modern multi-dimensional single-cell techniques capable of uncovering heterogeneity in cancer. Nevertheless, gathering meaningful information from the huge amounts of data generated by these methodologies remains an obstacle, and efforts made in the sense of better exploring these results are necessary. In the present work we propose a rationale for single-cell data analysis focused on outlier cells, which we named as Single-Cell OUTlier analysis (SCOUT). When studying a certain phenotype or characteristic in a cell population, observations (cells) that are unusually far from the others are often ignored by researchers. In cancer, however, these cells can be of major importance, since they have uncommon characteristics that may confer them resistance to therapeutic approaches. We applied SCOUT to datasets generated by mass cytometry, including experimental data of a glioblastoma (GBM) sample and literature data of melanoma samples treated with different therapeutic agents. Based on statistical concepts, outlier cells for the expression of several important molecules were identified and had their abundance and expression compared between control and treated samples. As a result, we show that outlier cells can behave differently from non-outliers in many situations, and indicate that relevant information can be extracted from this type of analysis that would be overlooked in most average-based approaches. To broaden SCOUT application, we tested the analysis in single-cell RNA-seq results from the literature, and to encourage the use of SCOUT in single-cell data from different platforms we also provide a graphical user interface developed in Python that automates the detection and selection of outliers for analysis, the SCOUT Selector (SCOUTS). Insights obtained from outlier analysis can serve as basis to identify rare cell populations potentially associated with resistance and understand their underlying biology to aid in the development of more effective therapeutic strategies capable of minimizing the risk for disease recurrence.

**Keywords:** Cancer; Single cells; Outlier; Outlier analysis; Mass Cytometry.

**List of Abbreviations:** *IQR: Interquartile Range; IR: irradiation treatment; OutC: Outliers by Control; OutS: Outliers by Sample; Out/Non-out: Outliers/Non-outliers ratio; SCOUT: Single-Cell OUTlier analysis; SCOUTS: Single-Cell OUTlier Selector; TF: Tukey factor.*

## Background

Tumor heterogeneity poses a major challenge to cancer therapy. Individual cells in a tumor are characterized by complex and dynamic profiles that ultimately lead to treatment failure and disease recurrence. Hence, a broad characterization of each component in a tumor is of great importance to derive more effective therapies. In this context, significant advances have been made in the development of single-cell methodologies capable of describing several aspects of this heterogeneity. Besides improvements in flow cytometry and cell imaging techniques, single-cell sequencing and mass cytometry have emerged in the field offering attractive alternatives for capturing multi-dimensional information that clarifies cellular identity and function, working as appealing platforms for tumor cells phenotyping. Mass cytometry, or CyTOF (cytometry by time-of-flight), uses metal-conjugated antibodies to enable a high-dimensional description of tens of targeted molecules at the single-cell level, allowing a thorough interrogation of cellular programs with the simultaneous investigation of different levels of cellular metabolism [1]. Moreover, CyTOF provides enough throughput to investigate millions of cells from an individual sample [2], which, despite improvements made [3], is still a limitation of single-cell sequencing.

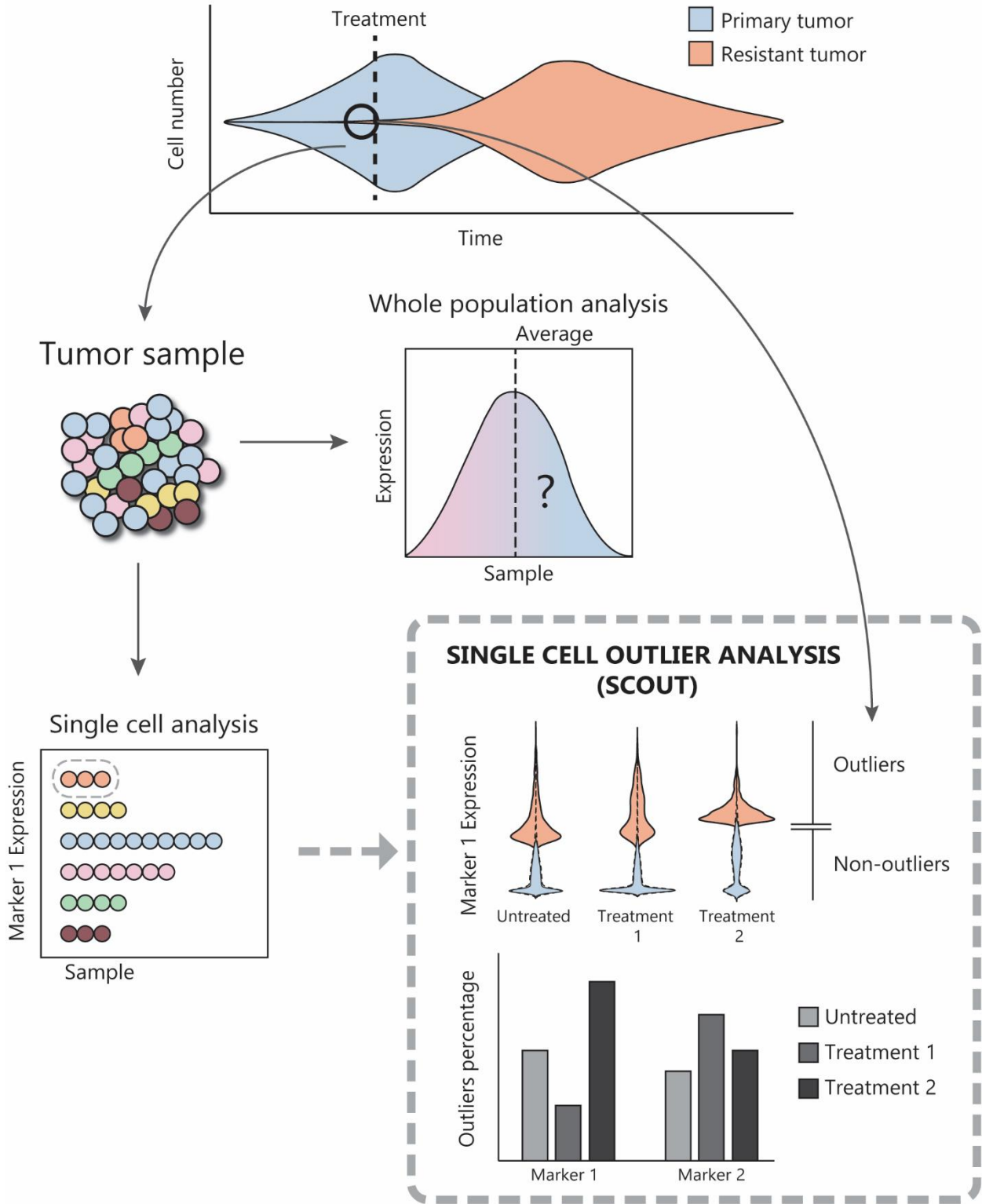
The combination of high parameterization and high throughput in single-cell techniques is essential for the detection and characterization of rare cell populations. In cancer, rare cells, as is the case of cancer stem cells or specific subpopulations of immune cells that infiltrate the tumor mass, can be relevant for many pathological processes, including resistance to therapy [4, 5]. The identification of outlier cancer cells also fits in this rare events detection task. Outliers are observation points in a dataset that fall far outside the typically expected variation, distant from other 'normal' observations. They can be considered as either a measure variability or as an experimental error, and it is often easy to designate them as noise, since they can cause problems in data analyses and visualization [6]. However, in some cases, and especially in cancer, outliers can provide extremely useful information. Most oncologists have already had the experience of cancer patients that responded exceptionally well to a treatment while most patients worsened or died. Despite not indicative of the overall response within a population or tumor type, the investigation of the underlying biology in these outliers can sometimes provide more effective information than additional tests in broader groups of patients. In this regard, the National Cancer Institute has launched the Exceptional Responder Initiative, aiming to promote an in depth investigation of these cases [7, 8]. The same rationale can be applied to the cellular level, where looking at outliers can be crucial in the sense that they may represent small groups or even individual cells in a tumor either sensitive or exceptionally resistant to specific treatments. In flow cytometry, for example, a rationale similar to

analysis of outliers is used when evaluating “side populations” by gating cells with differential dye efflux properties for analysis of drug resistance [9]. In this scenario, the strategy of excluding outliers from data analysis can be a pitfall.

Outlier analyses in cancer have been proposed to detect rare gene variants and gene fusions in certain types of tumors [10], based on the premise that the identification of important gene alterations by normal statistical analyses approaches frequently fails. Traditionally, one of the most used approaches for identifying differentially expressed genes between samples was simply running a t-statistic and looking for significant differences [11]. Nonetheless, the realization that some genes were often dysregulated in only a subset of tumors led to the development of more powerful tools, focused on improving the evaluation of these events in cancer and taking into account highly heterogeneous samples. Some of the main methods described so far are the Cancer Outlier Profile Analysis (COPA), proposed by Tomlins et al. [12] and later modified by James W. MacDonald and Debashis Gosh [13] and Wang et al. [14], the outlier-sum statistic [15] and the outlier robust t-statistic [11]. However, even though several approaches have been suggested to identify sample outliers based on gene expression, little was done with the aim to investigate cellular outliers in an individual tumor sample.

In the present work, we propose the Single-Cell OUTlier analysis - SCOUT - to identify and characterize outlier cells within a population (Fig. 1). Coupling mass cytometry data as a model and statistics we were able to detect outliers for the expression of important proteins related to cancer progression and evaluate their behavior after treatment. A graphical user interface application written in Python was developed to automate the detection and subsetting of outliers, and hence facilitate the application of this approach to data obtained from single-cell platforms. The study of outliers in cells of different cancer types may contribute to the discovery of new therapeutic targets and aid in the design of effective drug combinations to eliminate not only the massive tumor bulk, but also these eccentric and potentially resistant cells.

# TUMOR EVOLUTION



**Fig. 1** Rationale of the Single Cell Outlier Analysis. Single cell techniques have been fundamental to the dissection of tumor heterogeneity. Here we propose the specific analysis of outliers from single-cell data, with the aim to identify cells that can potentially lead to treatment failure and disease recurrence.

## Methods

### *Test datasets for Single-Cell Outlier analysis*

A patient-derived glioblastoma sample analyzed by mass cytometry was used as one of the test datasets for SCOUT. The expression of 23 different surface and intracellular proteins involved in cell growth, proliferation and survival were interrogated on this sample after treatment with ionizing gamma-radiation (IR), standard treatment for patients with GBM [16], or torin, a specific mTORC1/mTORC2 inhibitor. Collected data were pre-processed and analyzed as described below. Detailed information on cell culture, reagents, drugs and mass cytometry protocols, including the panel of antibodies used, can be found on the Supplementary Material.

The other mass cytometry cancer dataset used for testing SCOUT was downloaded from the FlowRepository website (<http://flowrepository.org>) – ID: FR-FCM-ZYW7. These data were produced by Doxie et al., and consisted of melanoma samples from patients enrolled in a clinical trial in which biopsies were collected before and 4 weeks after treatment with targeted BRAF<sup>V600E</sup> and MEK inhibitors (dabrafenib and trametinib, respectively) [17]. In the study, the samples were analyzed by mass cytometry for the expression of 32 different protein markers [17].

Additionally, two mass cytometry datasets from normal non-tumor samples (FlowRepository IDs - FR-FCM-ZYBD and FR-FCM-ZYB8) and one single-cell RNA-seq (scRNA-seq) dataset from GBM samples were analyzed using SCOUT. scRNA-seq results were downloaded from Gene Expression Omnibus - GSE103224 - (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>). A brief description of these data is provided in the Results and Discussion session.

### *Single-Cell Outlier analysis – SCOUT*

The main steps of SCOUT are described below, taking in consideration mass cytometry-derived datasets.

#### *1. Data pre-processing*

GBM data collected from Helios mass cytometer was first normalized using the MATLAB-based Normalizer [18] and gated to remove doublets and dead cells. FCS files were loaded into the statistical software RStudio® and the package *cytofkit* was used to transform expression data to the arcsinh scale [19]. Data from the study of Doxie et al. were already normalized and gated [17]. These pre-processing steps are normally performed in mass cytometry data before analysis, resulting in data frames of expression values containing a defined number of columns and rows corresponding to the number of markers and cells in each sample, respectively. In SCOUT, we added an extra gating strategy to exclude poorly stained cells. To this end, the average expression of all markers evaluated was calculated for each cell. Cells with an average lower than 0.1 were considered as poorly stained and excluded from the analysis.

## 2. *Outlier detection*

An event is considered as outlier when it assumes a value that falls far out from the majority of the sample data. When these values are in the extremes of the sample, that is, when they are either too high or too low, the outlier analysis can also be referred to as extreme value analysis. In this last scenario, in statistics, there are two main types of outlier detection strategies: the formal tests of discordancy or the labeling methods [20]. Even though discordancy tests are powerful under well-behaving statistical assumptions such as a distribution assumption, most of the times in biological sciences samples have unknown behaviors which may not follow specific distributions [21]. Moreover, another limitation of these tests is that they are susceptible to masking or swamping problems [22]. Therefore, if the purpose of the outlier detection is not a preliminary step to find the extreme values violating the distribution assumptions of the main statistical analyses, but to find the extreme values away from the majority of the data regardless of the distribution and analyze them, outlier labeling methods can be applied [20]. The labeling methods consist of generating an interval or criterion for outlier detection, and then any observations beyond the interval or criterion is labeled as an outlier. To define a reasonable interval or criterion for outlier detection, location and scale parameters are employed [20]. Among the different types of labeling methods, one of the most widely used is the Boxplot, developed by Tukey (1977). Tukey's method is very helpful, since it makes no distributional assumptions and does not depend on mean or standard deviation measures.

According to this method, the criterion for outlier detection, hereinafter referred to as cutoff, is established by: 1) determining the 25th (first quartile) and 75th (third quartile) percentiles of the sample, 2) calculating the interquartile interval (IQR) and then 3) multiplying the IQR by a factor called Tukey factor

(TF), which can assume values of either 1.5, to select for possible outliers, or 3, to select for probable outliers [20]. The result from the multiplication of IQR and TF is then 4) summed to the first or third quartile to establish cutoffs for low-value or high-value outliers, respectively. In SCOUT, after pre-processing the data, this equation was applied to calculate cutoffs and select outlier cells for subsequent analyses. An illustrative scheme of the main steps applied to the mass cytometry dataset is presented in Supp. Fig. 1.

Outliers in SCOUT were determined for each marker (target molecule) in each sample, considering their respective cutoffs, and the resulting events were then named as Outliers by Sample (OutS) (Fig. 2A - upper). As both the GBM and melanoma datasets contained a control sample, an additional type of outlier selection was also performed in which cells in treated samples were classified as outliers based on the control cutoff value. In this case, outliers were named as Outliers by Control (OutC) (Fig. 2A - lower). This type of selection can also be applied when comparing normal non-tumor and tumor samples, for example. OutC were selected with the aim to have a more direct comparison of changes in relation to control. Of note, OutC only represents the statistic definition of outliers for the control sample.

### 3. *Outlier analysis*

After selecting outliers, their abundance was determined for each marker and sample. Absolute and relative numbers of outliers (i.e. their proportion in relation to the total population – Fig. 2B) are presented in the results. Expression levels for each marker were also compared between outlier and non-outlier cells, as well as between treatments and control. To investigate whether changes in expression happened specifically in outliers, a ratio of the mean values of outliers and non-outliers (*Out/Non-out ratio*) was calculated (Fig. 2C). Relative Out/Non-out ratios, which refers to the ratio of this value in relation to a control sample, were also determined to compare control and treated samples.

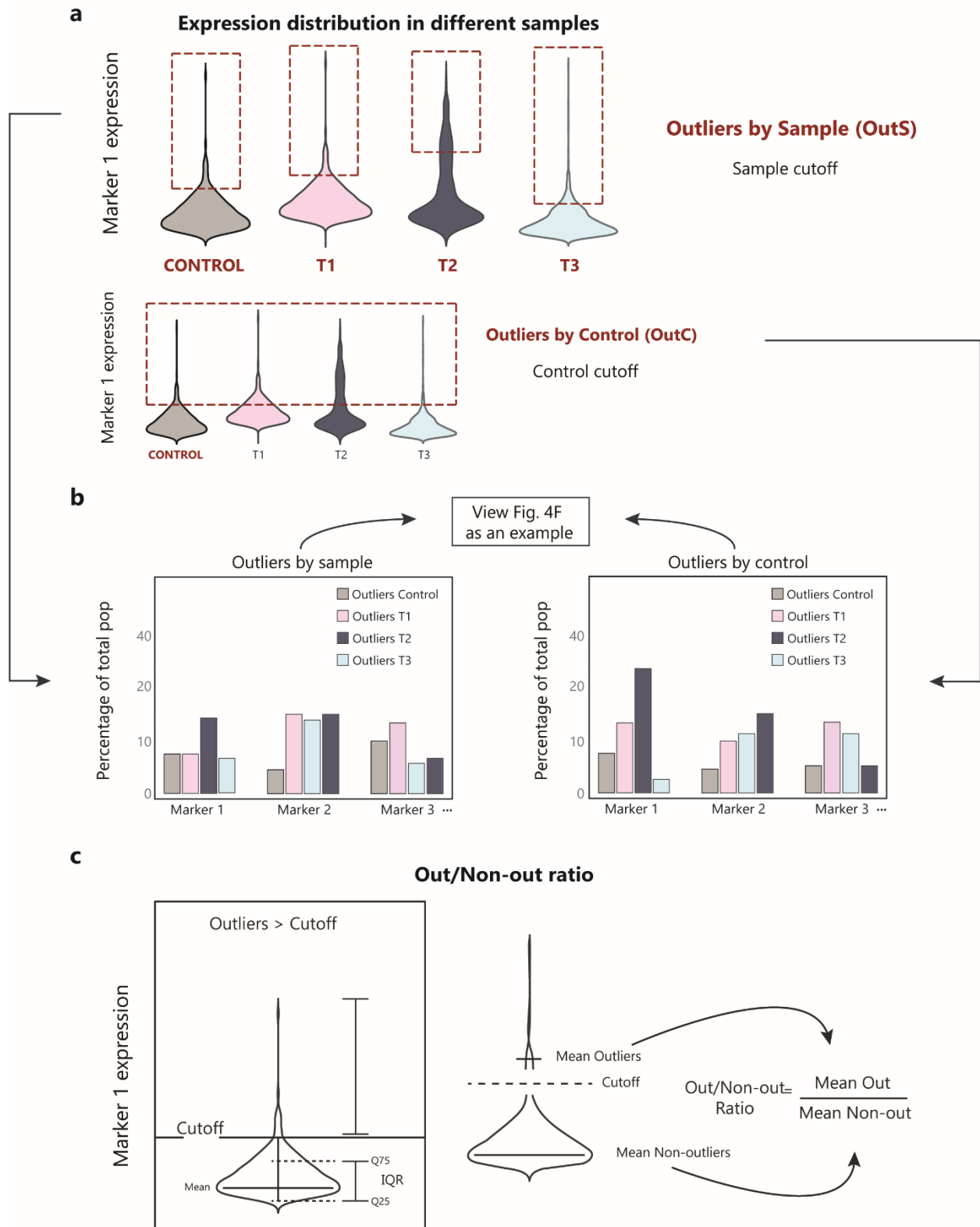
Correlation analyses between markers in outliers were performed by Pearson's correlation method using the *Hmisc* package in RStudio. All plots and graphical illustrations presented in this work were generated using RStudio and Adobe Illustrator®, respectively.

#### *Single-Cell Outlier Analysis Selector (SCOUTS)*

In order to automate outlier detection and subsetting for analysis, a Qt-based application named Single-Cell Outlier Analysis Selector was developed using Python. The source code for SCOUTS was released under a MIT license, and is available for download and use at <https://github.com/jfaccioni/scouts>. Detailed instructions regarding the application and functionalities of

SCOUTS can be found in the Supplementary Material, and on the Github repository page (<http://github.com>).





**Fig. 2 a. upper** The figure illustrates the main approach used to detect outliers based on cutoff values of each sample - Outliers by Sample (OutS). **lower** For specific cases when comparing control and treated samples, outliers were also detected based on the control cutoff value - Outliers by Control (OutC). After detection of outliers, subsequent analyses were performed, such as the comparison of expression levels in outlier and non-outlier cells and **b.** abundance of outliers (i.e. proportions in relation to the total population) between samples. **c.** Calculation of the 'Out/Non-out' ratio indicates whether changes in expression occurred in the whole population or specifically in outliers. Non-out: non-outliers; Out: outliers; Pop: whole population; Out/Non-out: Outliers/Non-outliers ratio; IQR: Interquartile range; Q25 and Q75: first/third quartiles, respectively.

## Results and Discussion

### *Single-cell outlier analysis in mass cytometry data*

Outliers represent a small fraction of events in a dataset that are usually neglected due to their non-standard features. In cancer, however, non-standard behaviors or highly specific patterns can be the key for understanding cancer evolution and disease relapse, which are many times dictated by a few or even single cells [23, 24]. With this in mind, here we propose an approach to study outliers in single-cell data. To develop and test SCOUT, we used two mass cytometry datasets in which signaling pathways related to cell growth, proliferation and survival were investigated in cancer samples before and after treatment. The GBM data were produced in our lab and the melanoma data were obtained from the literature [17]. From the latter, samples of three patients were chosen for analysis: MP29, MP34 and MP59 and within these samples only tumor cells that were CD45<sup>low</sup> were considered for analysis.

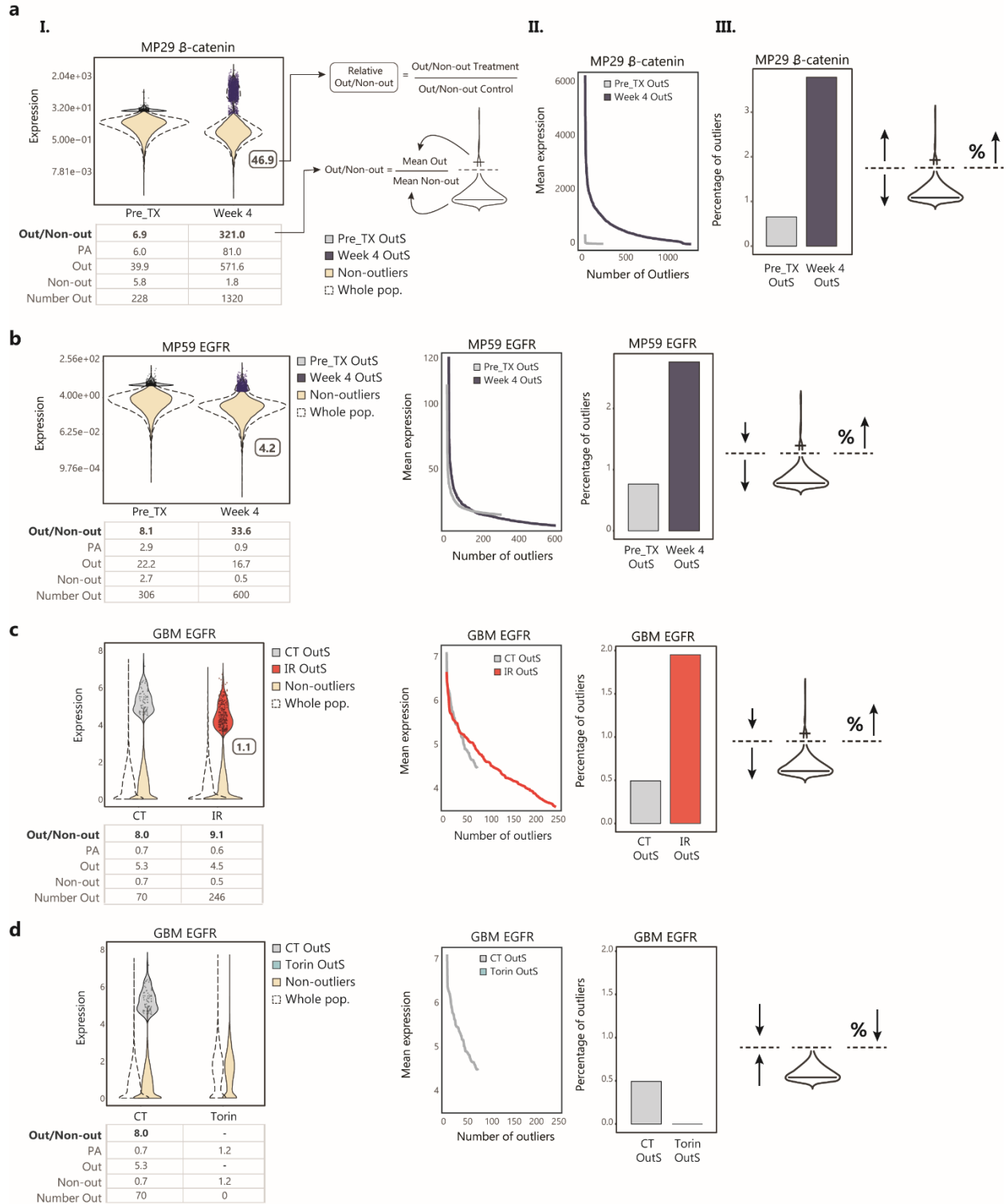
As detailed in the Methods session, we applied Tukey's labeling method using a TF of 3 to establish cutoffs for each marker for CT (control), IR and torin in the GBM sample, and untreated (Pre-TX) and treated (Week 4) melanoma samples. According to the respective cutoffs, tumor cells were then classified as outliers or non-outliers. The selected outliers were called outliers by sample, OutS, as they were selected based on the cutoff values of each sample. Although outliers can represent both the highest or lowest values in a sample, since markers evaluated comprehended mostly pro-tumoral proteins, we opted to focus only on outliers of high-expression values. Comparisons in terms of expression values and abundance were made between outliers and non-outliers in the different samples.

To illustrate the results obtained by SCOUT, we initially selected four different examples (Fig. 3). In the first, an opposite behavior between outliers and non-outlier cells can be observed. In the melanoma sample MP29, the majority of cells (non-outliers) presented an almost three-fold decrease in the

expression of  $\beta$ -catenin upon treatment with BRAF<sup>V600E</sup> and MEK inhibitors (Fig. 3A - I), while outliers (OutS), showed a markedly (almost fifteen-fold) increase in the levels of this protein. Therefore, the Out/Non-out ratio was also strikingly higher in treatment when compared to control (Fig. 3A - I – see illustration and boxes below and within the plot). The differences between outliers of the control and treated samples can be further observed in Fig. 3A - II. This plot presents the expression of all outliers and reveals that, besides the great difference in expression values, outliers in control were more homogeneous than in treatment, as indicated by the shapes of the curves (Fig. 3A - II). To analyze changes in the abundance of OutS over treatment we compared the percentage of OutS - in relation to the total number of cells in the sample – and noticed that not only outliers had a higher expression of  $\beta$ -catenin in the treated sample but were also enriched in proportion when compared to control (Fig. 3A - III).

In the second example, it can be observed that expression levels of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in the melanoma sample MP59 had a general decrease in non-outliers and outliers upon treatment with the inhibitors (Fig. 3B). However, this reduction was stronger in non-outliers and therefore the Out-non-out ratio increased in the treated sample. Furthermore, the proportion of OutS was more than two-times higher in treatment than in the control, also suggesting an enrichment of outliers, which is noteworthy since EGFR activation is one of the classical mechanisms of acquired resistance to BRAF inhibitors in melanoma [25]. The same response pattern was observed for CD44 in this patient (Supp. Fig. 2A). Since the expression levels in most of the cells and also the average expression of the whole population in these cases were reduced upon treatment, the increase in number and expression level described using SCOUT would likely be overlooked in other analysis approaches.

The third (Fig. 3C) and fourth (Fig. 3D) examples correspond to EGFR expression in the GBM sample treated with IR or torin, respectively. In IR, while expression levels remained nearly unchanged upon treatment, with a mild reduction in outliers and non-outliers (Fig. 3C), again, the Out/Non-out ratio and, especially, the proportion of OutS increased in the treated sample (Fig. 3C). On the other hand, in the treatment with torin, a great increase in expression levels, which also became more homogeneous among cells, was observed for non-outliers, suggesting the importance of this receptor to the majority of cells in the response to mTOR inhibition and leading to the absence of outliers (Fig. 3D). In agreement, previous works have already shown that targeting EGFR can help to overcome resistance to mTOR inhibitors in cancer [26].



**Fig. 3** SCOUT applied to mass cytometry data. Results of SCOUT in melanoma patient-derived samples untreated (Pre\_TX) or treated for 4 weeks with BRAF<sup>V600E</sup> and MEK inhibitors (Week 4 Outs) [17] and in GBM patient-derived sample treated with IR or torin are shown as examples. **a**. Results for marker  $\beta$ -catenin in melanoma samples of patient MP29. **b**. Results for marker EGFR in melanoma samples of

patient MP59. **c.** Results for EGFR in GBM samples treated with IR or **d.** torin. Violin plots show expression distribution of indicated markers in outliers (OutS), non-outliers and the whole population. Boxes below each violin plot show the values of Out/Non-out ratios (bold), population, outliers and non-outliers average expression and the absolute number of outliers for each sample. Boxes within plots show the relative Out/Non-out value. Line plots show expression of specified markers by the number outliers (OutS). Bar plots show the percentage of outliers (OutS) relative to the total amount of cells analyzed in each sample. Number Out: number of outliers; Non-out: non-outliers average; Out: outlier average; OutS: Outliers by Sample; Out/Non-out: outliers/non-outliers ratio; PA: population average.

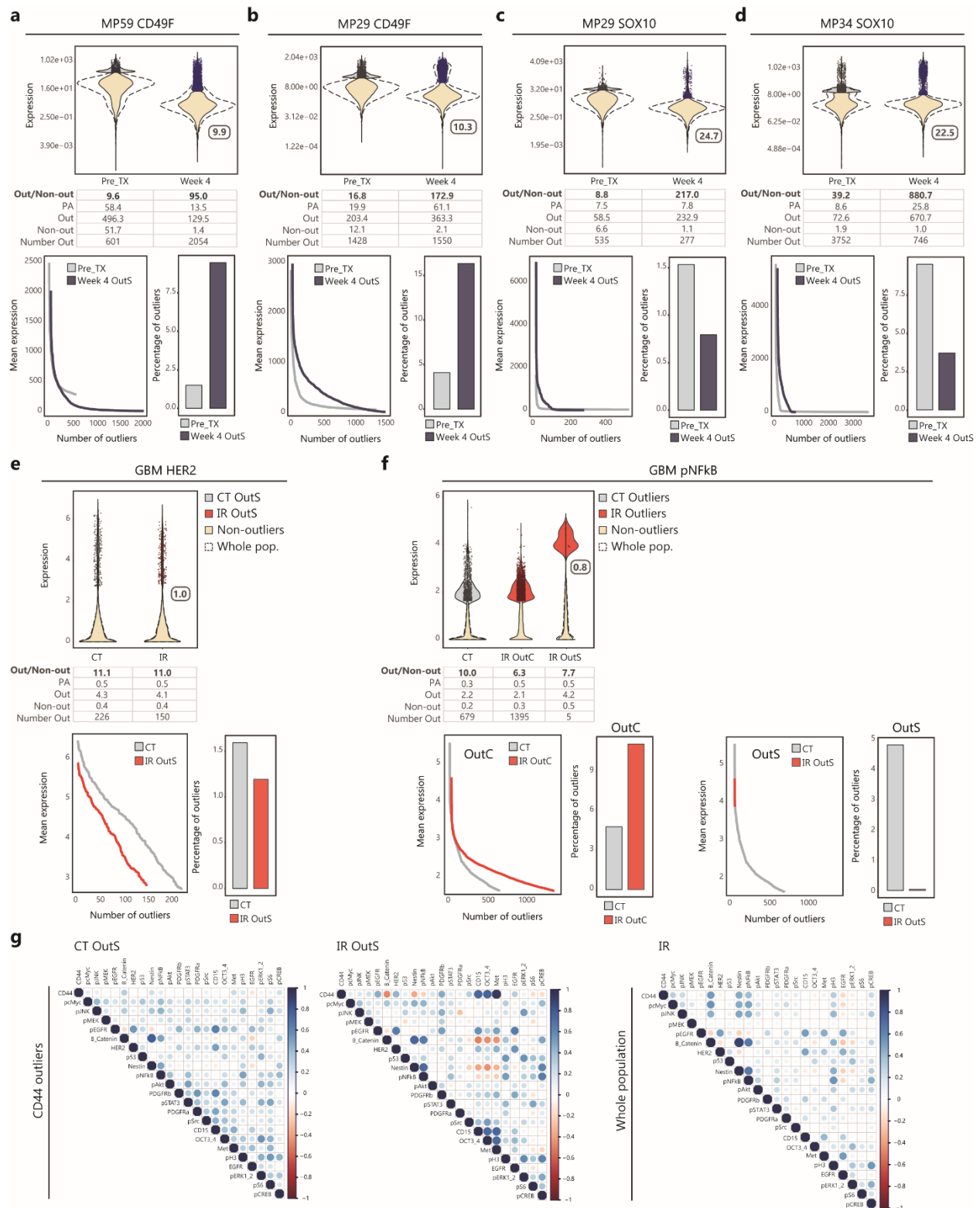
The application of SCOUT to these datasets revealed that outliers response to treatment can be distinct from the majority of cells in a population, and can vary according to markers and treatment conditions evaluated. We further confirmed these observations in outliers of other markers. Doxie et al. detected that expression of the stem cell marker CD49F was broadly reduced in the treated sample of patient MP59 [17]. Interestingly, although this reduction in expression with treatment was also true for outliers, we noticed that the Out/Non-out ratio and the proportion of OutS remarkably increased in this sample (Fig. 4A). Moreover, for patient MP29, besides an increase Out/Non-out ratio and OutS proportion, CD49F levels in outliers after treatment with the inhibitors were even higher than in the control, while the opposite effect was observed for non-outliers (Fig. 4B). Despite the fact that authors found a statistically significant reduction in the levels of CD49F when comparing all paired samples (pre- and post-treatment) together [17], SCOUT was able to evidence differences between patients regarding outliers and once again indicated that these cells response to treatment can be distinct from the majority of non-outlier cells. Notably, CD49F is involved in pro-tumorigenic features such as self-renewal, drug resistance and metastasis [27–31], and therefore the few cells with higher expression levels than the rest of the population and that were enriched after treatment could be the responsible for therapeutic resistance and even disease recurrence.

Another interesting result was observed for marker SOX10. The outliers of treated samples for both patients MP29 and MP34 presented higher SOX10 levels than the outliers of control, while the expression in non-outliers was reduced upon treatment (Fig. 4C and D). Interestingly, the proportions of OutS were reduced with treatment in these cases, suggesting that the upregulation of this marker was characteristic of a specific small fraction of cells that were not necessarily enriched in the population. A distinct response of outliers, however, is not always observed. For some proteins (or other targets being analyzed), outliers may behave similarly to the rest of the cells in the sample, and may also not change with treatment. As an example, we show the results for HER2 (Erb-B2 Receptor) in the GBM sample treated with IR (Fig. 4E).

No major changes were observed for outliers and non-outliers, and the Out/Non-out ratios remained similar between the two conditions.

Finally, when comparing two conditions (e.g. treatment versus control), it is also possible to select cells in treated sample based on the outlier cutoff of the control condition. The selected cells in treated samples in this case are named as outliers by control (OutC), as they are outliers by the control cutoff. In Fig. 4F we show results for marker pNFkB in the GBM sample treated with IR, and compare it between outliers selected by sample, OutS, and by control, OutC (Fig. 4F). Upon treatment, there was an increase in the levels of pNFkB in the whole population, but especially in non-outliers. This increase in non-outliers led to a more homogeneous sample and to a higher cutoff value to determine OutS and, as a consequence, the absolute number and proportion of OutS decreased significantly (only 5 outliers were detected). When we considered the cutoff value of the CT, which was lower, to detect outliers in IR (the OutC selection), the number and proportion of IR outliers increased (Fig. 4F). Therefore, the proportion of IR OutC was much higher than the proportion of IR OutS, and although OutC cells do not represent the statistical definition of outliers, they serve as a direct manner to show the overall increase in expression in relation to CT outliers.

These results together shed light on the relevance of analyzing outliers and indicate that SCOUT may aggregate relevant information to other analyses usually performed on single-cell data. Moreover, other investigations can be implemented in the analysis of outliers selected by SCOUT, such as the interrogation of correlations between markers. Here we show correlation matrices for CD44 outliers (OutS) of the GBM sample as an example, in which interesting results were observed, such as the high correlation of markers Met, CD15 and OCT3/4 in CD44 outliers treated with IR (Fig. 4G). Also, for some markers, correlations found in outliers can be different from those of the whole population (Fig. 4G). It is noteworthy, however, that when performing these analyses in cases containing a very small number of outliers the power of correlations may be compromised, and for such situations is recommended that the results be further investigated [32].



**Fig. 4.** SCOUT of mass cytometry data from melanoma patient-derived samples untreated (Pre\_TX) or treated with BRAF<sup>V600E</sup> and MEK inhibitors (Week 4 Outs) [17]. Data for marker CD49F are shown for patients **a.** MP29 and **b.** MP59, and data for marker SOX10 are shown for patients **c.** MP29 and **d.** MP34.

**e.** SCOUT of GBM sample treated with IR for marker HER2. **f.** SCOUT of GBM sample treated with IR for marker pNFκB. Results considering OutS and OutC are presented. **g.** Correlation analysis in CD44 outliers (OutS) of the GBM sample. Pearson correlation coefficients ( $r$ ) ranging from -1 to 1 are represented by color and size of each circle, where larger sizes correspond to stronger correlations, either positive or negative, and red or blue colors correspond to positive or negative correlations, respectively. Violin plots show expression distribution for outliers, non-outliers and the whole population, line plots show expression values only for outliers and bar plots show the percentage of outliers in each sample. Boxes below violin plots show the values of Out/Non-out ratios (**bold**), population, outliers and non-outliers average expression and the absolute number of outliers for each sample. Boxes within plots show the relative Out/Non-out value. Number Out: number of outliers; Non-out: non-outliers average; Out: outlier average; OutS: Outliers by Sample; OutC: Outliers by Control; Out/Non-out: outliers/non-outliers ratio; PA: population average.

Dimensionality reduction-based or clustering-based analyses, frequently used to evaluate multi-dimensional single-cell data, can also be applied to outliers. As outliers represent a small fraction of cells in the whole population, it is often possible to perform dimensionality reduction with algorithms such as tSNE (T-distributed Stochastic Neighbor Embedding) [33] using all cells (i.e. all outliers), instead of having to subset the data as usually done for larger samples due to time constraints. Clustering analyses are used to identify cell populations, whether or not previously known, abundant or rare. Thus, clustering algorithms are per se used as a tool to identify outliers in some settings. However, this strategy is especially used when the goal of outlier detection is to find cells that are significantly different from the rest regardless of having extreme values [34], and are most useful when multiple and not individual parameters (as in the case of SCOUT) are considered to group the events. Therefore, in SCOUT, clustering analyses can be performed with the aim to find interesting groups of cells within outliers.

#### *SCOUT application to non-tumoral samples and single-cell RNA-seq data*

Using other mass cytometry datasets from the literature, we tested SCOUT in non-tumoral samples. Data were obtained from a study that evaluated the expression of 35 markers in MCF10A normal breast cell line under conditions of starvation (no FBS or growth factors) or treatment with six different concentrations of EGF [35]. To exemplify, we only analyzed samples starved and treated with 10 or 100 ng/mL of EGF. When we evaluated three markers associated to EGF signaling activation – pEGFR, pAkt and pS6 - a mild increase in expression was detected in non-outliers in the presence of EGF (Supp. Fig. 2B). In outliers, although the expression levels of pS6 increased with treatment, no major changes were observed for pEGFR and pAkt (Supp. Fig. 2B). As a consequence, Out/Non-out ratios were in general lower in EGF treated samples (Supp. Fig. 2B). The same study also analyzed cells of human breast tissue samples



from different donors treated under the same conditions. When we tested SCOUT on these cells, outliers for pAkt were very few in number and outliers for pS6 were mostly absent. For pEGFR, besides the also low number of outliers, treatment did not cause major effects on these cells, as noticed by the similar Out/Non-out ratios between starved and EGF-treated cells (examples are shown in Supp. Fig. 2C). Also, for most of the 35 markers evaluated expression values were similar between treatments and the number of outliers was very small compared to the total number of cells analyzed (data not shown). The overall modest differences between treatments and the low number of outliers in these results may be a reflection of the treatment conditions per se, but can also be associated to a higher similarity among cells of individual samples when compared to the tumor samples previously analyzed. While in datasets variables often contain outliers that have unusual large or small values when compared with others, some datasets may come from homogeneous groups, and for those cases the analysis of outliers may not be as relevant [15].

Aiming to broaden the application of our approach, we tested SCOUT using data from scRNA-seq. Datasets of GBM patient-derived samples from the work published by Yuan et al. were downloaded from GEO (GSE103224) [36]. Genes related to the markers that were used in the GBM mass cytometry experiment were chosen for investigation. Due to the small amounts of starting material and low sampling, scRNA-seq results have inherently more noise than those obtained from bulk RNA-seq experiments [37] and, as a consequence, expression matrices usually contain excessive zero values. As a large number of zeros was observed in all GBM samples, we excluded these values from the data to determine cutoffs.

SCOUT revealed distinct patterns of gene expression in outliers of different samples. As an example, cells in PJ017 sample had a higher expression of *CD44* and *EGFR* in both outliers and non-outliers when compared to PJ018, although Out/Non-out ratio was lower for *CD44* and considerably higher for *EGFR* in this sample (Supp. Fig. 2D). Another interesting observation revealed by SCOUT was that, even in a sample with a determined gene amplification, expression of that gene in outliers can vary greatly. This was the case of PJ017 (Supp. Fig. 2D), that according to Yuan and cols. presented *EGFR* amplification [36]. One possible explanation for this variation would be the presence of extrachromosomal DNA molecules containing amplified *EGFR*, which can vary greatly in number from cell to cell [38]. The same behavior was observed for *PDGFRA* outliers in patient PJ048 (Supp. Fig. 2D) and, although information regarding alterations in this gene was not available, this sample was classified as belonging to the proneural molecular subtype, for which changes in *PDGFRA* are one of the main markers [39]. Finally, the usually low yields of scRNA-seq experiments may in some cases restrict the application of SCOUT. Nonetheless,

technical improvements have been made to enable the analysis of larger numbers of cells [3], and SCOUT application to these data may become even more useful.

### **Concluding Remarks**

One of the main hurdles of outlier analyses is that they generally suffer from lack of power, compared with the standard multiple testing setting, which is a reflection of their rare occurrence. That might justify the relatively small number of works focusing on outliers in cancer. In addition, the few works analyzing outliers mostly deal with expression data from bulk tumor samples instead of individual cells [13, 14, 40]. On the other hand, data cleaning algorithms that exclude outliers from analysis of cytometry data were also already proposed [41, 42]. However, as observed in our results, excluding outliers from analysis can be a misleading strategy when looking for cancer cells with an enhanced capacity to survive treatments.

Therefore, we proposed an outlier-based analysis approach that can serve as a screening test to identify uncommon characteristics that are specific for minorities of cells within a population, facilitating the study of the underlying biology in these cells. Moreover, besides the mass cytometry and scRNA-seq applications shown in this work, SCOUT can also be adapted to explore data from other single-cell platforms (e.g. flow cytometry). As an extensible approach, an integrative evaluation of SCOUT results from different experiments could then be performed, giving support to possible findings.

Using a few examples, we were able to show that SCOUT application to single-cell results, especially for tumor samples, can aggregate meaningful information to data analysis. As these rare extreme cells displayed a distinct behavior from the rest of the population in several cases, SCOUT evidenced that looking at the effects of a given intervention on the whole population and also in outliers is key. Moreover, using SCOUT in the analysis of pharmacological or genetic screenings results may help to differentiate those interventions that reduce the bulk population together with the outliers from those only affecting the majority of non-outlier cells while having an opposite effect in outliers.

### **Future perspectives**

In the last few years, there has been a significant increase in the number of tools to analyze data generated from high-dimensional single-cell techniques and researchers now have the challenge of

choosing the methods that best suit for their particular questions. However, the upside is that each of these approaches has the potential to disclose different aspects from the same original data, enabling different insights.

The study of outliers is a hot topic in the cancer field [8, 43]. In patients, for example, while not indicative of the overall response rate within a population or tumor type, even a single complete and durable clinical response can provide preliminary evidence regarding the molecular basis of drug response, and its exploration can accelerate expansion and testing of novel clinical hypotheses or the reconsideration of previously failed ones [8].

In the single-cell level, we show that analyzing outliers can provide additional relevant information about the behavior of cancer cells upon treatment and identify important characteristics that would be likely overlooked by other analyses. The implementation of SCOUT in the pipeline of single-cell analysis can serve as a foundation on which future studies can be layered for validation of new hypotheses. In this scenario, experimental methods could then be developed in the future to detect the outlier cells in patient samples and direct specific treatments to target them.

### **Acknowledgements**

We acknowledge the support provided by the Flow Cytometry Core of UCLA and especially thank Alejandro Garcia for the help with mass cytometry experiments. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, Universal (475882/ 2012-1) and Novas Terapias Portadoras de Futuro (457394/2013-7); PROBITEC CAPES (907/2012); and ICGEB (405231/2015-6). G.R.O is recipient of a doctorate fellowship from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and was recipient of a sandwich doctorate fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). J.F. is recipient of an undergraduate fellowship from CNPq. P.A.B is recipient of a doctorate fellowship from CAPES. G.L. is recipient of CNPq research productivity fellowship.

### **References**

1. Irish JM, Doxie DB (2014) High-dimensional single-cell cancer biology. *Curr Top Microbiol Immunol* 377:1–21. [https://doi.org/10.1007/82\\_2014\\_367](https://doi.org/10.1007/82_2014_367)

2. Spitzer MH, Nolan GP (2016) Mass Cytometry: Single Cells, Many Features. *Cell* 165:780–791. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.019>
3. Macosko EZ, Basu A, Satija R, et al (2015) Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell* 161:1202–1214. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.002>
4. Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444:756–760. <https://doi.org/10.1038/nature05236>
5. Barry KC, Hsu J, Broz ML, et al (2018) A natural killer–dendritic cell axis defines checkpoint therapy–responsive tumor microenvironments. *Nat Med* 24:1178–1191. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0085-8>
6. Grubbs FE (1969) Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. *Technometrics* 11:1–21. <https://doi.org/10.1080/00401706.1969.10490657>
7. Takebe N, McShane L, Conley B (2015) Biomarkers: Exceptional responders—discovering predictive biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 12:132–134. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.19>
8. Jonsson P, Taylor BS (2018) Transforming Biomarker Development with Exceptional Responders. *Trends Cancer* 4:3–6. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.11.004>
9. Golebiewska A, Brons NHC, Bjerkgvig R, Niclou SP (2011) Critical appraisal of the side population assay in stem cell and cancer stem cell research. *Cell Stem Cell* 8:136–147. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.01.007>
10. Zhu Z, Ihle NT, Rejto PA, Zarrinkar PP (2016) Outlier analysis of functional genomic profiles enriches for oncology targets and enables precision medicine. *BMC Genomics* 17:. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2807-y>
11. Wu B (2007) Cancer outlier differential gene expression detection. *Biostatistics* 8:566–575. <https://doi.org/10.1093/biostatistics/kxl029>
12. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al (2005) Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310:644–648. <https://doi.org/10.1126/science.1117679>
13. MacDonald JW, Ghosh D (2006) COPA--cancer outlier profile analysis. *Bioinforma Oxf Engl* 22:2950–2951. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl433>
14. Wang C, Taciroglu A, Maetschke SR, et al (2012) mCOPA: analysis of heterogeneous features in cancer expression data. *J Clin Bioinforma* 2:22. <https://doi.org/10.1186/2043-9113-2-22>
15. Tibshirani R, Hastie T (2007) Outlier sums for differential gene expression analysis. *Biostat Oxf Engl* 8:2–8. <https://doi.org/10.1093/biostatistics/kxl005>

16. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
17. Doxie DB, Greenplate AR, Gandelman JS, et al (2018) BRAF and MEK inhibitor therapy eliminates Nestin-expressing melanoma cells in human tumors. *Pigment Cell Melanoma Res*. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12712>
18. Finck R, Simonds EF, Jager A, et al (2013) Normalization of mass cytometry data with bead standards. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 83:483–494. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22271>
19. Chen H, Lau MC, Wong MT, et al (2016) Cytokit: A Bioconductor Package for an Integrated Mass Cytometry Data Analysis Pipeline. *PLOS Comput Biol* 12:e1005112. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005112>
20. Seo S (2006) A Review and Comparison of Methods for Detecting Outliers in Univariate Data Sets. <http://d-scholarship.pitt.edu/7948/>. Accessed 2 Sep 2018
21. Iglewicz B, Hoaglin DC (1993) How to detect and handle outliers. Milwaukee, Wis. : ASQC Quality Press
22. Acuna E, Rodriguez C A Meta analysis study of outlier detection methods in classification. 25
23. Micalizzi DS, Maheswaran S, Haber DA (2017) A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology. *Genes Dev* 31:1827–1840. <https://doi.org/10.1101/gad.305805.117>
24. Ebinger S, Özdemir EZ, Ziegenhain C, et al (2016) Characterization of Rare, Dormant, and Therapy-Resistant Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* 30:849–862. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.11.002>
25. Girotti MR, Pedersen M, Sanchez-Laorden B, et al (2013) Inhibiting EGF Receptor or SRC Family Kinase Signaling Overcomes BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma. *Cancer Discov* 3:158–167. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0386>
26. Chiu CW, Nozawa H, Hanahan D (2010) Survival Benefit With Proapoptotic Molecular and Pathologic Responses From Dual Targeting of Mammalian Target of Rapamycin and Epidermal Growth Factor Receptor in a Preclinical Model of Pancreatic Neuroendocrine Carcinogenesis. *J Clin Oncol* 28:4425–4433. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.0198>
27. Vassilopoulos A, Chisholm C, Lahusen T, et al (2014) A critical role of CD29 and CD49f in mediating metastasis for cancer-initiating cells isolated from a Brca1-associated mouse model of breast cancer. *Oncogene* 33:5477–5482. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.516>
28. Brooks DLP, Schwab LP, Krutilina R, et al (2016) ITGA6 is directly regulated by hypoxia-inducible factors and enriches for cancer stem cell activity and invasion in metastatic breast cancer models. *Mol Cancer* 15:26. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0510-x>

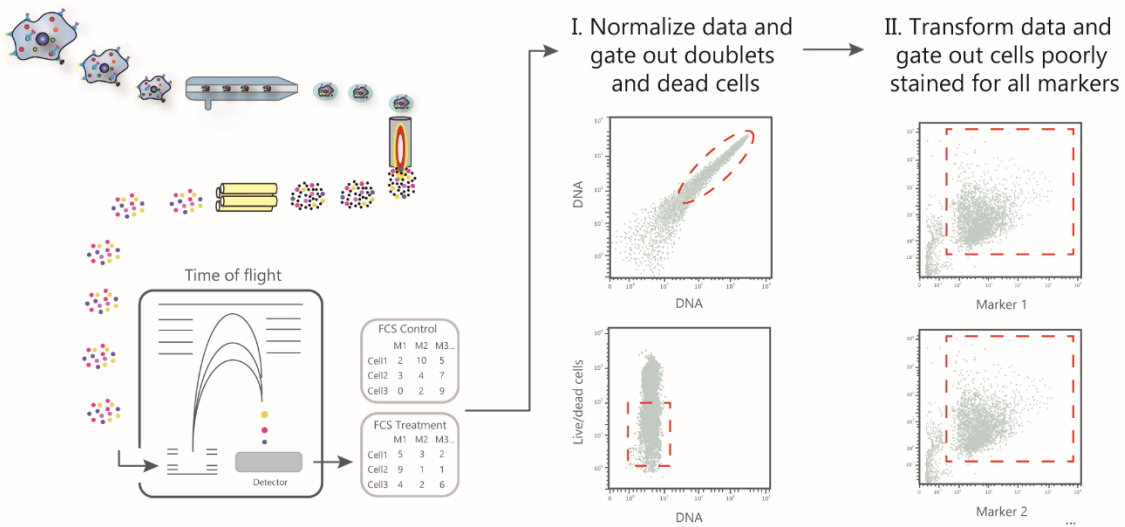
29. Ammothumkandy A, Maliekal TT, Bose MV, et al (2016) CD66 and CD49f expressing cells are associated with distinct neoplastic phenotypes and progression in human cervical cancer. *Eur J Cancer* 60:166–178. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.03.072>
30. Lathia JD, Gallagher J, Heddleston JM, et al (2010) Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* 6:421–432. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.02.018>
31. Gómez-Miragaya J, Palafox M, Paré L, et al (2017) Resistance to Taxanes in Triple-Negative Breast Cancer Associates with the Dynamics of a CD49f+ Tumor-Initiating Population. *Stem Cell Rep* 8:1392–1407. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.03.026>
32. Bonett DG, Wright TA (2000) Sample size requirements for estimating pearson, kendall and spearman correlations. *Psychometrika* 65:23–28. <https://doi.org/10.1007/BF02294183>
33. Maaten L van der, Hinton G (2008) Visualizing Data using t-SNE. *J Mach Learn Res* 9:2579–2605
34. Aggarwal CC (2017) *Outlier Analysis*. Springer International Publishing, Cham
35. Knapp DJHF, Kannan N, Pellacani D, Eaves CJ (2017) Mass Cytometric Analysis Reveals Viable Activated Caspase-3 + Luminal Progenitors in the Normal Adult Human Mammary Gland. *Cell Rep* 21:1116–1126. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.096>
36. Yuan J, Levitin HM, Frattini V, et al (2018) Single-cell transcriptome analysis of lineage diversity in high-grade glioma. *Genome Med* 10:57. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0567-9>
37. Yuan G-C, Cai L, Elowitz M, et al (2017) Challenges and emerging directions in single-cell analysis. *Genome Biol* 18:. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1218-y>
38. Turner KM, Deshpande V, Beyter D, et al (2017) Extrachromosomal oncogene amplification drives tumour evolution and genetic heterogeneity. *Nature* 543:122–125. <https://doi.org/10.1038/nature21356>
39. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, et al (2010) Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17:98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
40. Nuzzo A, Carapezza G, Di Bella S, et al (2016) KAOS: a new automated computational method for the identification of overexpressed genes. *BMC Bioinformatics* 17:5–14. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1188-1>
41. Fletez-Brant K, Špidlen J, Brinkman RR, et al (2016) flowClean: Automated identification and removal of fluorescence anomalies in flow cytometry data. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 89:461–471. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22837>
42. Monaco G, Chen H, Poidinger M, et al (2016) flowAI: automatic and interactive anomaly discerning tools for flow cytometry data. *Bioinforma Oxf Engl* 32:2473–2480. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw191>

43. Kyungsuk Jung MB, Fox Chase Cancer Center P, National Cancer Institute B, Ambray Genetics AV  
Molecular profiling of cancer outliers.

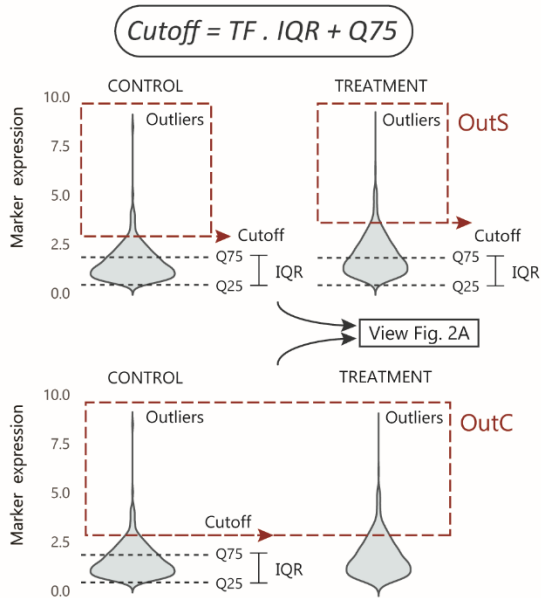
**Supplementary Material**

**Supplementary Figures**

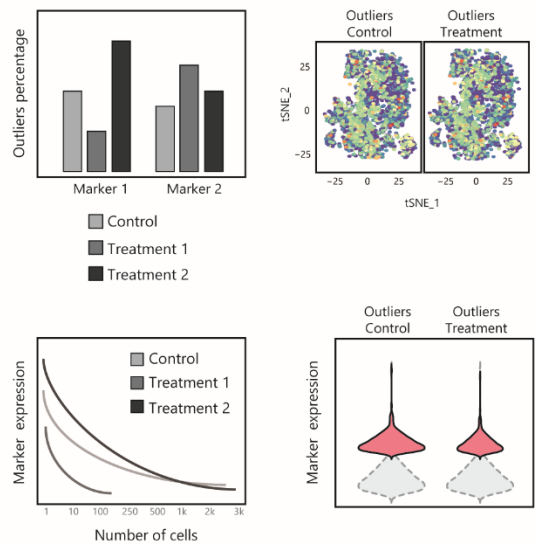
**1** Single-cell data acquisition and pre-processing (e.g. mass cytometry)



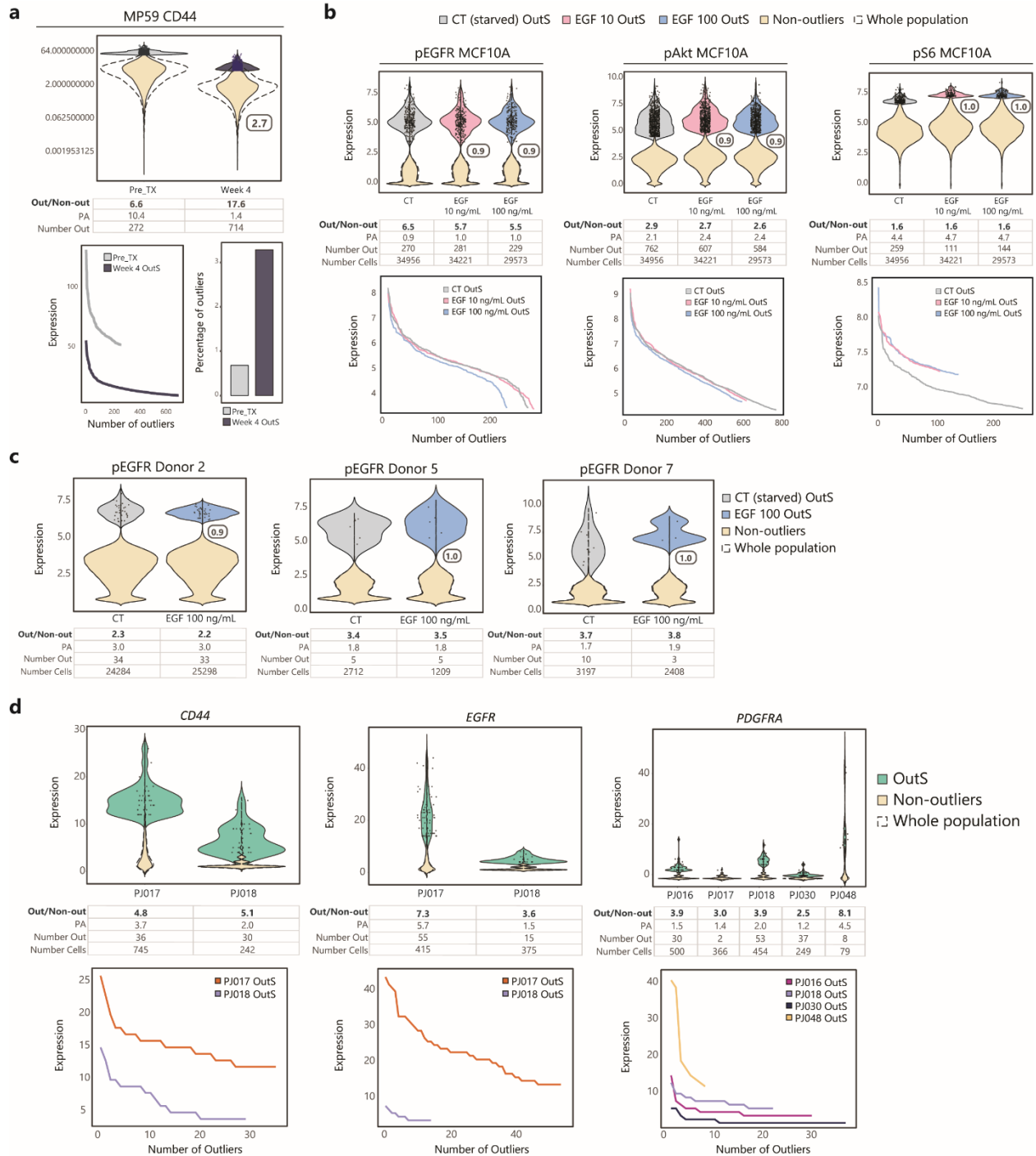
**2** Determine cutoffs and select outliers



**3** Analyze Outliers



**Supp. Fig. 1** Workflow of SCOUT for mass cytometry data. After **1.** collection, datasets are initially pre-processed (e.g. normalized, gated to exclude doublets and dead cells, transformed and gated to eliminate poorly stained events). **2.** Cutoffs are then determined based on Tukey's outlier labeling method and outliers by Sample (OutS), and/or by Control (OutC) when applied, are selected for **3.** subsequent analyses. IQR: Interquartile range; Q25 and Q75: first/third quartiles, respectively; TF: Tukey factor.





**Supp. Fig. 2 a.** SCOUT of mass cytometry data from melanoma patient-derived samples showing expression levels of CD44 outliers and non-outliers for patient MP59 and the percentage of outliers in each sample (Pre\_TX and Week 4 OutS) [17]. **b.** SCOUT of mass cytometry data from MCF10A normal mammary cells under different conditions – CT (starved) or treated with 10 or 100 ng/mL of EGF - and to **c.** primary mammary cells from donors 2,5 and 7 – CT (starved) or treated with 100 ng/mL of EGF [35]. Markers and samples analyzed are indicated on each plot. **d.** SCOUT of single-cell RNA-seq data from GBM samples [36]. Violin and line plots for genes *CD44*, *EGFR* and *PDGFRA* are shown. Boxes below violin plots show the Out/Non-out ratios (bold), the population average and the absolute number of outliers for each group/sample. Boxes within plots show the relative Out/Non-out value. Number Out: number of outliers; Number cells: total number of cells; OutS: Outliers by Sample; Out/Non-out: outliers/non-outliers ratio; PA: population average.

## Supplementary Methods

### *Samples and reagents*

Patient-derived GBM sample - GS25 - were gently provided by Dr. David Nathanson (UCLA) and approved by the Institutional Review Board of UCLA. GBM cells were cultured as neurospheres, as previously described [1]. DMEM/F-12, PBS (1X), 5 mL blue-cap cell strainer filter tubes (Falcon #352235) and 70  $\mu$ m cell strainers (Falcon #352350) were purchased from Corning. B27 supplement, TrypLE Express and penicillin/streptomycin were purchased from Thermo Scientific. Twice a week 20 ng/ml bFGF (R&D Systems Inc.) and 50 ng/mL EGF (Peprotech) were added to the media.

For mass cytometry experiments, a panel of antibodies was designed, and antibodies were either custom-conjugated by the Flow Cytometry Core at UCLA or purchased already conjugated from Fluidigm, as indicated on the Supp. Table 1. MAXPAR Cell Staining Buffer (CSB), MAXPAR Fix/ Perm Buffer, Cisplatin (5 mM stock; #201064), Iridium-intercalator stock solution (#201192B) and EQ four-element beads (#201078) were all purchased from Fluidigm Corporation (South San Francisco, CA).

When indicated, GBM cells were treated with either gamma radiation or Torin (Selleckchem, #S2827), a mTORC 1/2 inhibitor, before being processed for mass cytometry experiments. For irradiation treatment (IR), cells received an 8 Gy dose of ionizing radiation and were maintained for 48 hours in culture before staining procedures. For Torin treatment, cells remained in drug-containing media at a 50 nM concentration for 48 hours and were then stained for CyTOF.

### *CyTOF staining procedure and sample acquisition*

Staining procedures were adapted from the manufacturer's "MaxPar Cytoplasmic/Secreted Antigen Staining" protocol. GBM samples were dissociated, centrifuged and pellets were resuspended in

PBS, filtered and counted. Cells were then incubated in 1 mL of PBS containing 5  $\mu$ M cisplatin for 5 minutes at room temperature and immediately washed in CSB. For surface antibody staining (Supp Table 1), cells were resuspended in a residual volume of 50  $\mu$ L CSB and 50  $\mu$ L of diluted surface antibody cocktail were added to obtain a 100  $\mu$ L final staining solution. Samples were incubated at room temperature for 30 min.

Next, cells were fixed in Maxpar Fix I Buffer for 20 minutes, washed in Maxpar Perm-S Buffer twice and resuspended in a volume of 100  $\mu$ L of CSB-diluted intracellular antibodies cocktail (Supp Table 1). Cells were stained for 30 minutes at room temperature, washed with CSB and then resuspended in the intercalation solution - Maxpar Fix and Perm Buffer containing Ir 500  $\mu$ M - for an overnight incubation at 4°C. In the following day, each sample was washed twice with CSB and once with MilliQ water before acquisition. For injection in the equipment, pellets were diluted to 1 mL with the EQ beads solution (Fluidigm). Around 50k cells per sample were acquired in a Helios instrument (Fluidigm, San Francisco, CA, USA).

*CyTOF antibodies panel*

Intracellular			Surface		
Antibody	Metal	Isotope	Antibody	Metal	Isotope
p-cMyc*	La	139	HER2	Nd	148
p-JNK*	Pr	141	PDGFRb	Gd	156
p-MEK*	Nd	143	PDGFRa	Gd	160
p-EGFR	Nd	146	CD15	Dy	164
$\beta$ -Catenin	Sm	147	CD44	Er	166
p53	Nd	150	Met	Er	167
Nestin	Eu	151	EGFR	Tm	169
p-NFkB*	Sm	152			
p-Akt*	Sm	154			
p-STAT3	Gd	158			
p-Src*	Dy	163			
OCT3/4	Ho	165			
p-H3*	Er	168			
p-ERK1/2	Yb	171			
p-S6	Lu	175			
p-CREB	Yb	176			

**Supplementary Table 1.** CyTOF antibodies panel. The table shows all intracellular and surface antibodies, and the respective metal isotope to which they were conjugated, used in the mass cytometry experiments. \*indicates custom-conjugated antibodies.

### *SCOUTS - Development of a GUI application for SCOUT*

In order to automate outlier detection and selection for analysis, we developed SCOUTS (**S**ingle-**C**ell **O**utlier analysis **S**elector), a Qt-based graphical user interface application written in Python. SCOUTS is able to determine cutoff values for individual target-molecules in input samples and subset the data in outliers and non-outliers accordingly.

SCOUTS expects the input data to be arranged as a spreadsheet, and thus accepts files both in .csv and .xlsx format. The file columns and rows should represent each target molecule (i.e. markers, genes, etc.) and individual cells, respectively. The file header should contain the names of targeted molecules, while the first field of each row is reserved for cell and sample identification. For easy reference on what the data should look like, an example dataset is available on the project's Github page. Since sample names vary widely between datasets, SCOUTS cannot directly identify samples from a dataset only by reading the sample field. To overcome this limitation, SCOUTS contains a module where sample names can be individually input. The user can define the string of text to search for, and the program allocates rows containing that text as belonging to the same sample. SCOUTS also warns the user and preemptively stops the analysis if any given sample name is not found in the dataset.

Ideally, the dataset should be pre-processed prior to analysis using SCOUTS. Pre-processing of a given dataset works as a quality control step and may include e.g. normalization, doublets and dead cells discrimination (in the case of cytometry samples), transformation, and others. Since data pre-processing varies greatly depending on the nature of the experiment and user needs, we made the design choice of not to include pre-processing directly into SCOUTS's workflow. However, SCOUTS does include a simple option of gating samples to exclude poorly-stained cells for mass cytometry data and to exclude zero values for single-cell RNA-seq data. These options can be chosen based on user discretion.

Once running, SCOUTS subsets the dataset into groups, each group being defined by the intersection between a given sample and a given target molecule. The outlier cutoff value for each target molecule is calculated according to Tukey's Boxplot outlier labeling method, as described in the Methods session of the main article [2]. Of note, the user can select the Tukey Factor of 1.5 or 3. Based on the parameters selected for analysis, SCOUTS then subsets each group by choosing the outliers for the respective cutoff.

The analysis can be performed to either subset outliers for each marker, or to select all cells that are outliers for at least one marker. Furthermore, the user can choose to use one or both selection methods described in the main article: Outliers by Sample (OutS) and Outliers by Control (OutC) (view Fig. 2). The results are saved to a previously designated output folder and file format.

Full information about SCOUTS can be found on the online documentation: <https://github.com/jfaccioni/scouts>. To download SCOUTS, please refer to its Github page: <http://github.com>.

## References

1. Laks DR, Masterman-Smith M, Visnyei K, et al (2009) Neurosphere formation is an independent predictor of clinical outcome in malignant glioma. *Stem Cells Dayt Ohio* 27:980–987 . doi: 10.1002/stem.15
2. Seo S (2006) A Review and Comparison of Methods for Detecting Outliers in Univariate Data Sets. <http://d-scholarship.pitt.edu/7948/>. Accessed 2 Sep 2018

# Capítulo V

## DISCUSSÃO

### CAPÍTULO II – Células-tronco mesenquimais bloqueiam a autofagia em gliomas

O câncer é uma doença que se desenvolve em ambientes teciduais extremamente complexos, dos quais dependem diretamente para sustentar o seu crescimento e progressão. Como evidência dessa dependência, além dos inúmeros trabalhos pré-clínicos, já foi mostrado em estudos clínicos que o alto percentual de estroma intratumoral detectado em biópsias de pacientes com câncer está associado à baixa sobrevivência dos mesmos [260]. As células presentes no TME tendem a ser geneticamente mais estáveis do que as células tumorais e, portanto, podem representar um alvo terapêutico atraente com risco reduzido de resistência [46]. Todavia, romper as relações pró-tumorais existentes entre as células malignas e as demais células do TME é uma tarefa desafiadora. Isso porque uma das formas chave de comunicação entre essas células se dá por via parácrina [45] e, nesse sentido, existe uma gama enorme e ainda pouco conhecida de fatores mediando estas relações. Além disso, diferentes tipos celulares podem por vezes secretar as mesmas moléculas e desempenhar funções similares, fazendo com que a eliminação de apenas um tipo de relação não seja suficiente.

Dentre as células presentes no estroma dos tumores que chamam a atenção pela capacidade secretória estão as células-tronco mesenquimais. Nosso grupo de pesquisa vem investigando as características biológicas dessas células [83], e, especialmente, os efeitos que o secretoma de MSCs pode desempenhar sobre a biologia dos gliomas [62, 64]. Alguns de nossos trabalhos prévios mostraram, por exemplo, que MSCs derivadas de tecido adiposo não alteram a proliferação e o crescimento de CSCs nesses tumores [62]; no entanto, podem estimular a capacidade de migração das células tumorais e induzir um processo EMT-like nas mesmas, caracterizado por mudanças na morfologia e pelo aumento da expressão de marcadores mesenquimais [64]. A pesquisa do câncer nos últimos anos tem apontado a autofagia como um processo chave não só para a manutenção da homeostase das células tumorais, mas também para a regulação da comunicação intercelular no TME, revelando cada vez mais suas funções altamente dinâmicas e contexto-dependentes [261]. Nesse cenário, o trabalho apresentado no Capítulo II da presente tese teve por objetivo investigar o papel do secretoma de MSCs na modulação da autofagia em gliomas. Para isso, células de glioblastoma foram tratadas com o meio condicionado (CM) de MSCs humanas derivadas de tecido adiposo (hADSCs) e o fluxo autofágico das células tumorais foi avaliado.

Observamos em nossos resultados que o tratamento com CM por 24 e 48h levou ao acúmulo na quantidade de autofagossomos presentes no citoplasma de células de glioma humano, mas que esse acúmulo não foi acompanhado pelo subsequente aumento da formação de autolisossomos, representados pela quantificação de organelas vesiculares ácidas (AVOs), sugerindo um processo autofágico incompleto. Em contraste, o controle positivo de indução de autofagia com Rapamicina mostrou um aumento tanto de autofagossomos quanto de AVOs, evidenciando que o fluxo autofágico se completou. A análise de expressão de proteínas relacionadas à autofagia revelou que o tratamento com CM aumentou a lipidação de LC3 convertendo-a de LC3-I a LC3-II, etapa necessária para a ativação de autofagia, porém não reduziu os níveis de p62/SQSTM1, o que seria esperado diante da completa execução do processo autofágico. Pelo contrário, o tratamento com CM levou inclusive a um aumento nos níveis de p62/SQSTM1 em relação às células não tratadas. Além disso, quando colocamos as células de glioma em co-cultivo com as hADSCs, o perfil de acúmulo de autofagossomos e baixa quantidade de autolisossomos também foi observado. Esses resultados apontaram para um bloqueio no fluxo autofágico causado pelo secretoma de hADSCs especialmente na fase tardia do processo, visto que houve formação de vesículas autofagossômicas, porém sua fusão com os lisossomos e posterior degradação do seu conteúdo, incluindo p62, estava comprometida. Os efeitos do CM sobre o bloqueio autofágico foram mantidos constantes em tratamentos mais longos – de até 7 dias – e, quando o CM foi removido, os níveis de autofagia das células tumorais voltaram a ser similares aos das células não-tratadas. Corroborando os resultados encontrados para as células tumorais humanas, o mesmo perfil de bloqueio foi observado quando células de GBM murinas C6 receberam o tratamento com CM.

Alguns trabalhos já relataram os efeitos sobre a autofagia causados por MSCs em células não-tumorais. Todavia, poucos trabalhos na literatura investigaram a modulação de autofagia mediada por MSCs nas células cancerígenas. Han e colaboradores mostraram que MSCs foram capazes de contribuir para a resistência de células de carcinoma hepatocelular ao tratamento com cisplatina, e apontaram que essa resistência ocorreu devido à indução de autofagia mediada pelas MSCs (ou seu meio condicionado) nas células tumorais [262]. No entanto, nesse estudo, as MSCs utilizadas tanto na produção do meio condicionado quanto para injeção em animais no modelo *in vivo* foram previamente ativadas pelo tratamento com as citocinas pró-inflamatórias INF $\gamma$  e TNF $\alpha$ . Quando as células tumorais foram cultivadas em CM de MSCs não-ativadas não houve diferença na resistência ao tratamento com cisplatina. Além disso, neste trabalho, apenas a formação de pontos GFP-LC3+ foi avaliada como medida quantitativa de autofagia. Os autores também realizaram microscopia eletrônica de transmissão, porém apenas uma imagem de cada

tratamento foi mostrada, e essas imagens apontavam para vesículas de autofagossomos, e não de autolisossomos. Os níveis de p62/SQSTM1 ou de outros marcadores que permitissem avaliar o fluxo autofágico não foram analisados. Ainda, os autores não descreveram no trabalho a origem e caracterização das células-tronco utilizadas.

Dois outros trabalhos apontaram para uma possível indução de autofagia causada por MSCs e seu secretoma em tumores. Um deles, realizado por Zhang e colaboradores, mostrou que MSCs humanas derivadas de medula-óssea foram capazes de induzir autofagia em linhagens de câncer de pulmão, e assim proteger essas células da morte induzida pela privação de soro fetal bovino (FBS) [263]. No outro, publicado mais recentemente, Luo e colaboradores mostraram que MSCs de medula óssea promoveram EMT por meio da indução de autofagia em células de câncer de pulmão [264]. No entanto, novamente, estes trabalhos concluem indução de autofagia nos tumores apenas pela avaliação do acúmulo de autofagossomos (no primeiro caso) ou pelos níveis de expressão proteica de LC3-I e II e Beclin-1 (no segundo caso). Em ambos os estudos não existe uma medida tardia de fluxo autofágico, não sendo possível afirmar o funcionamento do processo como um todo.

Um outro estudo realizado por Librizzi e colaboradores comparou os efeitos do secretoma de MSCs em diferenciação adipogênica e do secretoma de MSCs diferenciação osteogênica, ambas derivadas de lipoaspirados humanos, em linhagem de câncer de mama. Os pesquisadores observaram que apenas o CM de células em diferenciação osteogênica foi capaz de reduzir a expressão de Beclin-1 e reduzir o número de AVOs, indicando inibição do processo autofágico [265]. Embora o estudo não tenha analisado os níveis de LC3 I e II ou o acúmulo de autofagossomos, curiosamente este foi um dos únicos trabalhos que avaliou a etapa tardia da autofagia e constatou que o secretoma de MSCs não causou indução do processo. Ainda, este estudo mostra que o secretoma das mesenquimais não alterou a função mitocondrial e nem os níveis de ROS das células tumorais. De acordo com esses resultados, nossos dados também mostraram que o CM de hADSCs não causou alterações na viabilidade mitocondrial e nem nos níveis de espécies oxidativas presentes nas células de glioma.

Por último, um estudo avaliou o efeito do secretoma de MSCs de medula óssea em linhagens de tumor de próstata e mostrou que o mesmo induziu um aumento nos níveis de mRNA e proteína de p62/SQSTM1 e também o acúmulo de LC3 I e II, conforme observado em nossos resultados. Porém, quando essas células foram tratadas com a combinação de CM e Cloroquina – um agente bloqueador de fluxo autofágico - os níveis de LC3 I e II e p62/SQSTM1 aumentaram ainda mais, fazendo com que os autores discutissem que o CM sozinho estivesse induzindo e



não bloqueando a autofagia [266]. De acordo com a literatura da área, quando um determinado tratamento é combinado com um bloqueador de fluxo autofágico e para essa combinação os níveis de LC3 aumentam acima dos do tratamento sozinho, é possível que esse tratamento esteja induzindo, e não inibindo, autofagia. No entanto, isso é verdade apenas para os níveis de LC3, e não para os de p62/SQSTM1, que deveriam estar reduzidos diante do tratamento ao invés de aumentados [161]. Não foram encontrados outros estudos correlacionando o secretoma de MSCs com bloqueio tardio de autofagia. Sendo assim, diante da análise desses trabalhos, nossos resultados revelam um outro tipo de regulação autofágica mediada pelo secretoma de MSCs. Mais do que isso, nossos resultados também apontam para a importância de se investigar o fluxo autofágico como um todo, e não apenas as etapas iniciais do processo, reforçando as diretrizes para o estudo da autofagia elaboradas pelos principais pesquisadores da área [161].

Como mencionado anteriormente, em trabalhos prévios do grupo vimos que o secretoma de mesenquimais foi capaz de induzir um fenótipo EMT-like em células de glioma. Diferentes estudos na literatura já mostraram uma relação inversa entre EMT e autofagia. Isso se deve ao fato de que a inibição de autofagia e o consequente acúmulo de p62/SQSTM1 favorecem a interação dessa proteína com mediadores de EMT e levam à estabilização desses fatores, impedindo sua degradação e facilitando a execução do processo de transição [196, 197]. *In vivo*, a inibição de autofagia também foi mostrada por reduzir marcadores epiteliais e aumentar marcadores mesenquimais em hepatócitos [195]. Esse racional nos fez questionar se o motivo pelo qual o CM de hADSCs estaria bloqueando a autofagia seria para dar suporte ao processo de EMT. Ainda nesse sentido, uma das principais citocinas envolvidas na EMT é o TGF $\beta$ , e sabe-se que essa molécula está presente no secretoma de MSCs de diferentes origens [267]. A fim de investigar essas questões, avaliamos inicialmente a presença de TGF $\beta$  no CM de hADSCs e encontramos níveis consideráveis, em torno de 0.5 ng/mL. Embora não tenhamos mensurado os níveis dessa citocina no meio do co-cultivo de células de glioma e hADSCs, foi mostrado que no meio coletado a partir do co-cultivo por três dias de MSCs humanas de tecido adiposo e células tumorais de mama esses valores chegaram a 1 ng/mL [267], sugerindo que os níveis de TGF $\beta$  podem ser ainda mais altos diante do contato célula-célula.

Quando então analisamos os efeitos do TGF $\beta$  sobre autofagia e os comparamos aos causados pelo tratamento com o CM, observamos que em 24h de tratamento com TGF $\beta$  houve uma diminuição nos níveis de p62/SQSTM1 em relação ao controle. Contudo, de acordo com os resultados observados para o CM, o tratamento por 48h levou ao acúmulo dessa proteína. Estudos na literatura mostram que TGF $\beta$  pode aumentar os níveis de p62/SQSTM1 em diferentes

linhagens celulares de maneira tempo-dependente, principalmente em exposições por mais de 24h [196]. Porém, ainda assim os efeitos observados para o TGF $\beta$  não foram tão claros, visto que a adição do inibidor de seu receptor TGF $\beta$ RI (SB431542) nas células de glioma aumentou ainda mais os níveis de p62/SQSTM1. Além disso, o tratamento com TGF $\beta$  por apenas 2h aumentou a quantidade de autofagossomos sem aumentar a formação de autolisossomos, um indicativo de bloqueio na etapa tardia da autofagia. Contudo, em 48h o *turnover* desses autofagossomos foi induzido e uma maioria de autolisossomos foi observada, apontando para uma indução de fluxo autofágico. Diante desses resultados observamos que os efeitos desempenhados pelo TGF $\beta$  sobre a autofagia foram mais complexos e dinâmicos do que esperado. Na literatura, da mesma forma, as funções apontadas para o TGF $\beta$  na autofagia são variáveis e mostram que esta molécula é capaz tanto de ativar quanto de inibir o processo. Um dos primeiros estudos a mostrar um papel de indução de autofagia observou que em células de carcinoma hepatocelular essa citocina levou ao aumento da quantidade de autofagossomos, dos níveis de algumas ATGs e também da degradação de proteínas de vida longa (uma das funções da autofagia) [268]. No entanto, principalmente por seu papel indutor de EMT, outros trabalhos mostraram que o TGF $\beta$  é capaz de bloquear autofagia, levando ao acúmulo de LC3-II e de p62/SQSTM1 [195]. É importante salientar, entretanto, que a indução de EMT pode levar ao aumento de p62/SQSTM1 e à estabilização de seus mediadores de maneira independente da interação dessa proteína com a LC3 [196], o que poderia justificar as diferenças observadas em 24 e 48h de tratamento com TGF $\beta$  como sendo representativas de um aumento de fluxo autofágico acompanhado de acúmulo em p62/SQSTM1.

A via canônica de TGF $\beta$  culmina na ativação de SMAD4, molécula que acaba se translocando para o núcleo e interagindo com outros fatores a fim de ativar a transcrição dos alvos de TGF $\beta$ . Ao avaliarmos a translocação nuclear de SMAD4, não vimos um aumento significativo diante do tratamento com CM por 2 ou 48h, apenas no tratamento com TGF $\beta$  sozinho. Esses resultados podem ter sido decorrentes da diferença da concentração de TGF $\beta$  no CM (~0.5 ng/mL), a qual foi menor do que a concentração utilizada no tratamento com TGF $\beta$  como controle positivo (10 ng/mL). Entretanto, como já havia sido mostrado que para alguns mediadores de EMT, como o fator de transcrição Twist1, a estabilização mediada por p62/SQSTM1 pode ocorrer de maneira SMAD-independente [196], questionamo-nos se, nesse caso, o TGF $\beta$  presente no CM poderia estar atuando em vias não-canônicas. Sinalizações ativadas por TGF $\beta$  de maneira SMAD-independente incluem a via de PI3K/Akt/mTOR, p38/JNK e MAPKs, e todas estão direta ou indiretamente associadas ao controle de EMT [269]. Dessas vias, especialmente a sinalização de mTOR chamou atenção frente aos resultados do nosso

trabalho até então. Isso porque mTOR é um componente-chave na regulação do equilíbrio energético das células, controlando o balanço entre as vias anabólicas, como a síntese de proteínas, e as vias catabólicas, como a autofagia. Assim, ao mesmo tempo que está envolvido nas mudanças morfológicas e no aumento do tamanho celular que ocorre na EMT em decorrência do estímulo da síntese proteica [269], mTOR também regula os processos iniciais e tardios da autofagia, reprimindo o fluxo autofágico.

Isso nos levou a investigar se o bloqueio de autofagia induzido pelo CM poderia estar ocorrendo via ativação da sinalização de mTOR. Em nossos resultados observamos que o CM ativou a sinalização de mTOR logo em 2h de tratamento, como observado pelos níveis de fosforilação da própria proteína e também de seus alvos ULK1 (Ser757) e S6K (Thr389). Um aumento sutil no tamanho celular foi ainda observado em células tratadas com CM (dados não mostrados). Em um trabalho muito interessante, Duran e colaboradores mostraram que, curiosamente, p62/SQSTM1 participa na ativação de mTORC1. p62/SQSTM1 interage com Raptor, um dos componentes do complexo, e também com as Rag GTPases na superfície lisossomal, formando parte da maquinaria que recruta mTOR aos lisossomos e o ativa na presença de altos níveis de aminoácidos [270]. Essa seria mais uma explicação para o aumento nos níveis de p62/SQSTM1 e bloqueio autofágico observados diante do tratamento com CM. Ressalta-se que esses efeitos sobre a sinalização de mTORC1 foram observados apenas para o CM, sendo que no tratamento com TGF $\beta$  os níveis desses alvos mantiveram-se similares ao das células não tratadas. Esses resultados em conjunto mostram que o secretoma de hADSCs ativa a sinalização de mTOR em células de glioma e leva a um bloqueio na autofagia, e que esses efeitos podem ser apenas em parte mediados por ação de TGF $\beta$ .

No tratamento com CM de hADSCs observamos um aumento inicial no número de autofagossomos. É importante mencionar novamente que, do ponto de vista de fluxo autofágico, este acúmulo de autofagossomos pode ser consequência apenas do bloqueio na etapa tardia detectado, mas também pode estar associado à presença de estímulos de indução e bloqueio autofágico concomitantes. Algumas evidências, entretanto, apontam para o fato de que as alterações no fluxo autofágico detectadas não estejam relacionadas à indução de autofagia, ao menos não por um desbalanço energético. Uma delas é que o acúmulo de autofagossomos observado continuou ocorrendo mesmo diante da reposição de FBS no CM. Outra evidência é o fato de que a proteína AMPK, indutora de autofagia e ativada por condições energéticas desfavoráveis, estava menos fosforilada no tratamento com CM do que nas células não tratadas. Além disso, o CM mostrou inibir ULK1, e a ativação de ULK1 é intimamente relacionada com

queda nos níveis de glicose nas células [271]. É importante mencionar que ULK1 participa na iniciação da formação dos autofagossomos, e que mesmo com a inibição de ULK houve um acúmulo dessas vesículas no tratamento com CM. Por isso, acredita-se que nesse caso a iniciação do processo possa ter acontecido de maneira ULK-independente [271].

A autofagia é regulada de forma transcricional e pós-traducional. Normalmente, diante de situações de restrição energética essa regulação é feita ao nível pós-traducional, para que seja mais rápida, enquanto que estímulos mais a longo prazo acabam afetando a regulação transcricional. Nesse último caso, a maquinaria autofágica está sob regulação da subclasse dos fatores básicos de transcrição hélice-alça-hélice MiT/TFE, que inclui MiT, TFE3 e TFEB [272]. Essa família de fatores de transcrição se liga a sequências de genes possuam o elemento CLEAR (*consensus coordinated lysosomal expression and regulation*), o que engloba os genes envolvidos nas diferentes etapas do fluxo autofágico e também genes relacionados à biogênese dos lisossomos. A transcrição mediada por esses fatores é principalmente ativada nos casos em que existe inibição de mTORC1, pois esse complexo é responsável por fosforilar os membros dessa família e impedir sua translocação para o núcleo das células [175]. Sendo assim, decidimos avaliar a translocação nuclear de TFEB no tratamento com CM e detectamos que a mesma estava reduzida em relação ao controle não-tratado, o que corroborou com a ativação de mTORC1 pelo secretoma de hADSCs e com o mal funcionamento da autofagia observado.

Alguns cânceres, como os de pâncreas, melanomas e rim, são especialmente dependentes da autofagia e da sinalização mediada pela família MiT/TFE. Nesses tumores, os genes que codificam esses fatores encontram-se frequentemente superexpressos, e a sinalização por eles mediada está constantemente ativada, independente de sinais regulatórios. Em linhagens celulares de carcinoma ductal de pâncreas, foi mostrado que a depleção de MiT/TFE resultou em defeitos na morfologia e aumento do diâmetro dos lisossomos, efeitos comumente associados ao estresse lisossomal e proteólise defeituosa. Em nosso trabalho também avaliamos a massa e o pH dos lisossomos, porém não observamos alterações significativas causadas pelo tratamento com CM. Embora mais experimentos poderiam ser realizados a fim de se investigar o funcionamento dessas organelas, esses resultados podem ser indicativos de que o bloqueio autofágico causado pelo CM esteja ocorrendo em outro ponto do fluxo [174].

À parte das possíveis funções sobre o processo de EMT já descritas, o bloqueio de autofagia induzido pelo secretoma das hADSCs nas células dos gliomas pode ter outras funções. Da mesma forma, o acúmulo de p62/SQSTM1 diante do tratamento com hADSC CM pode assumir efeitos não relacionados diretamente com a autofagia. p62/SQSTM1 já foi associada à

tumorigênese de diferentes maneiras, e serve como um centro de ativação para diversas vias de sinalização. Além da participação na ativação de mTORC1, p62/SQSTM1 pode ativar as vias de Nrf2 e NFκB, gerando um microambiente pró-inflamatório crônico que auxilia na progressão dos tumores [273, 274]. Já a autofagia participa em outros processos além da entrega de componentes intracelulares aos lisossomos para degradação e reciclagem. A maquinaria autofágica pode funcionar como uma via de liberação não-convencional de citocinas, quimiocinas, sinais de dano e outras proteínas intracelulares para o espaço extracelular. Esse processo é conhecido como autofagia secretória, e pode ser modulado, por exemplo, pelos níveis de oxigenação tumoral, reprogramação metabólica e pelas interações entre as células tumorais e as demais células do TME [274, 275]. Essa função secretória da autofagia tem recebido cada vez mais atenção, dado que os estímulos provenientes das células malignas podem determinar as respostas ativadas nas células do seu estroma e que sinalizações vindas do estroma também podem regular a secreção dessas moléculas pelas células do tumor, formando uma intrincada rede de comunicação. Em linha com essa ideia, em nossos resultados, quando as células de glioma foram tratadas com seu próprio secretoma, por exemplo, nenhum efeito sobre a autofagia foi observado.

É importante mencionar ainda que as próprias células do estroma podem realizar autofagia para prover estímulos ou nutrientes às células tumorais, suportando as demandas necessárias sem que o processo autofágico tenha que ser superativado nas células malignas [178]. Um trabalho clássico com tumor de pâncreas mostrou que células estreladas (que são como fibroblastos do tecido pancreático) são capazes de prover intermediários metabólicos do ciclo de Krebs às células malignas, e que esse processo é revertido diante da inibição de autofagia nas células estreladas [210]. Um outro trabalho recente também mostrou que altos níveis de autofagia em CAFs estimulam a liberação de HMGB1 por parte dessas células, e este interage com TLR4 nas células tumorais para enriquecer *pool* de CSCs e aumentar a tumorigenicidade [211]. A autofagia em MSCs no estroma tumoral também já foi mostrada por estimular o crescimento de tumores de mama *in vitro* e *in vivo* [276].

Por fim, conforme discutido anteriormente, os efeitos TGFβ sobre a autofagia não justificam todos os resultados observados diante do tratamento das células de glioma com o CM. Por isso, outras moléculas presentes no secretoma das hADSCs também podem estar contribuindo para essas ações. Possíveis outros candidatos liberados por MSCs [133] e com papel já descrito sobre autofagia são moléculas envolvidas na sinalização de Wnt, por exemplo. Essa via está relacionada à migração e invasão celular e poderia estimular o bloqueio na

autofagia como forma de prevenir a degradação de  $\beta$ -catenina ou de Dishevelled, como já descrito [277, 278]. DKK3, um inibidor de sinalização Wnt, também foi apontado como um marcador de altos níveis de autofagia [279]. Cabe ressaltar ainda que MSCs que se associam aos tumores sofrem muitas vezes uma espécie de reprogramação celular, similar ao que ocorre para fibroblastos e macrófagos, por exemplo [109]. Isso acarreta na mudança de comportamento dessas células, principalmente levando a uma modificação no conjunto de moléculas que essas células secretam, ou mesmo na quantidade de cada molécula secretada [109]. Assim, embora tenhamos neste trabalho observado os mesmos efeitos de bloqueio de autofagia no co-cultivo de hADSCs e gliomas, é importante que esses resultados sejam investigados *in vivo* na presença de toda a complexidade associada ao TME.

De qualquer forma, os resultados gerados na execução do presente trabalho nos permitiram identificar um outro papel mediado pelo secretoma de MSCs na biologia tumoral, pouco abordado na literatura até então. Por serem capazes de bloquear a autofagia, as MSCs podem interferir em diversos processos nas células tumorais, incluindo EMT e migração, ambos relacionados à progressão da doença. Além de contribuírem para o entendimento da comunicação entre MSCs e células cancerígenas, esses resultados evidenciam a complexa rede de regulação da autofagia existente nos tumores, na qual a sinalização parácrina vinda das células do microambiente pode participar ativamente.

### CAPÍTULO III - A importância das condições de cultivo no comportamento das células de glioblastoma e seu impacto para novas descobertas

Conforme amplamente discutido nos Capítulos I e II desta tese, o estudo dos tumores e de seu comportamento passa pelo entendimento do seu microambiente e de suas necessidades biológicas. Nesse sentido, na pesquisa experimental do câncer diversas ferramentas metodológicas nos permitem tentar mimetizar o que aconteceria em um tumor dentro do organismo humano, a fim de que possamos desenvolver e validar hipóteses que, após bem fundamentadas no âmbito pré-clínico, cheguem até os pacientes. Dentre essas ferramentas, o cultivo celular *in vitro* desempenhou e ainda desempenha um papel fundamental, possibilitando o estudo das células em um ambiente conhecido e controlado, de maneira prática. Por meio do cultivo de células tumorais, diversas descobertas a respeito de alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novas drogas foram realizadas [280].

No entanto, o cultivo celular pode induzir mudanças nas propriedades biológicas das células e, por consequência, afetar profundamente a reprodutibilidade da pesquisa e o seu potencial de translação. Dessa forma, quando cultivamos tumores *in vitro*, por mais simples que esse modelo seja, alguns fatores podem ser levados em consideração para que se assegure a aplicabilidade dos dados gerados. Normalmente, a escolha do meio de cultivo e dos fatores de crescimento a serem utilizados para suplementar esse meio baseia-se nas condições que consigam melhor sustentar a proliferação e a viabilidade das células. Todavia, muitas vezes isso acaba se tornando um problema, como no caso do FBS que, apesar de estimular o crescimento de diversas células, causa alterações biológicas significantes em astrócitos, por exemplo [281]. Por isso, a identificação das condições ideais de cultivo celular deve considerar as características das células com as quais se está trabalhando, e também as perguntas que se deseja responder com elas, ou seja, a hipótese de cada estudo.

Especificamente na pesquisa de gliomas, esforços foram e vêm sendo feitos a fim de manter as linhagens celulares cultivadas o mais semelhante possível aos seus tumores parentais. Quando a população de CSCs foi pela primeira vez identificada em GBM, essas células foram descritas por se comportar de maneira semelhante às NSCs [282, 283]. Com isso, dúvidas foram lançadas sobre o uso de FBS nessas culturas, pois o soro era conhecido por induzir a diferenciação de NSCs. Além disso, estudos posteriores de fato mostraram que o FBS era capaz de induzir a diferenciação de CSCs de gliomas, alterando seu padrão de expressão gênica e grau de tumorigenicidade, enquanto que o cultivo dessas células em meio livre de FBS e suplementado com fatores de crescimento de NSCs – EGF e FGF - preservava essas características [283, 284]. A partir de então, grande parte do estudo de tumores primários de GBM passou a ser feito adotando-se as condições de cultivo de NSCs.

Contudo, para esses tumores, foi mostrado que considerar as células de origem na hora do cultivo também pode ser fundamental. A identificação da célula de origem é de grande relevância para a compreensão do fenótipo e também do perfil molecular de um tumor, e, em gliomas, diferentes origens foram inclusive relacionadas ao desenvolvimento dos diferentes subtipos moleculares já descritos [17]. Assim, a discriminação da célula de origem pode também ajudar na identificação de alvos terapêuticos mais específicos. Jiang e colaboradores recentemente mostraram que GBMs derivados de diferentes células de origem possuem sensibilidade distinta a drogas, por exemplo [22]. Além disso, características de células-tronco, presentes em NSCs ou CSCs, nem sempre indicam potencial tumorigênico [285], o que sugere que olhar somente para essas células não é ideal.

Até a publicação de um importante trabalho em 2011 por pesquisadores na Universidade da Virgínia (EUA) [20], estudos indicavam que gliomas poderiam se originar de astrócitos [286] ou, principalmente, de NSCs [16], o que daria ainda mais suporte à ideia de que seu cultivo devesse ser feito em meio apropriado para essas células. Todavia, o trabalho desses pesquisadores, liderado por Hui Zhong, mostrou que gliomas também podem se originar de células precursoras de oligodendrócitos [20]. Hoje, sabe-se que ambos os casos podem ser verdade e que os GBM podem ter diferentes origens. Acredita-se que ao menos 25% dos casos de glioma originem-se de OPCs, correspondendo ao subtipo molecular proneural [23]. Porém estudos recentes já sugerem que esse número possa estar subestimado e que características de OPCs sejam encontradas na maioria dos GBM [287]. Diante dessa ideia, parte do nosso grupo de pesquisa somou esforços com o grupo de Zhong a fim de comparar os efeitos das condições de cultivo celular sobre o crescimento e as características biológicas de OPCs, levando-se em consideração essas células como célula de origem, ou seja, comparando o seu cultivo em meio específico para OPCs com o seu cultivo em meio de NSCs [23].

Nesse trabalho, OPCs tumorais de um modelo animal de glioma foram purificadas por *immunopanning* com o marcador PDGFR $\alpha$ , clássico para identificar OPCs, e então mantidas por várias passagens nas duas diferentes condições de cultivo. Os resultados mostraram que quando as OPCs foram cultivadas em meio próprio de OPCs, no qual o principal fator de crescimento suplementado foi o PDGF-AA, as células mantiveram características morfológicas e marcadores de OPCs selvagens. Contudo, quando as mesmas células foram mantidas em meio de NSCs (suplementado com EGF/FGF), observou-se um aumento na taxa de proliferação, alterações morfológicas, redução na expressão dos marcadores de OPCs, e aumento na expressão de marcadores de NSCs. Ainda, quando as OPCs acostumadas em meio de NSCs foram colocadas em meio de OPCs, grande parte das células morreram, sugerindo que essas células se tornaram viciadas em EGF e FGF presentes no meio de NSCs, e acabaram se sendo sensíveis a uma condição diferente de cultivo. Por fim, um dos achados mais surpreendentes desse trabalho foi que OPCs quando mantidas em meio de NSCs apresentaram redução no grau de tumorigenicidade. Quando foram implantadas em animais, essas células formaram tumores cerca de 40 vezes menores do que as células mantidas em meio de OPCs [23].

Esses resultados colocaram ainda em maior evidência o fato de que condições de cultivo são determinantes para o fenótipo das células, e nos motivaram então a escrever uma revisão que chamasse a atenção para a importância das condições de cultivo no comportamento de células de glioblastoma e os possíveis impactos que essas escolhas podem ter sobre novas



descobertas científicas. Essa revisão corresponde ao Manuscrito apresentado no Capítulo III desta tese.

Neste manuscrito, primeiramente apresentamos um breve histórico dos principais marcos científicos do cultivo celular, os quais justificam a maneira como a cultura de células tumorais é hoje realizada. Posteriormente, a fim de se entender o “estado da arte” de como as amostras primárias de GBM vêm sendo cultivadas por pesquisadores no mundo todo, efetuamos uma revisão sistemática da literatura. Utilizando a base de dados *Web of Science*, avaliamos os trabalhos publicados nos últimos 5 anos com as palavras-chave “*GBM primary culture*” e coletamos informações de cada um a respeito de como o cultivo dessas mostras foi realizado.

Ao analisarmos os resultados dessa pesquisa, pudemos observar que não parece existir um consenso na forma de cultivar essas amostras no que diz respeito a meio de cultura e fatores de crescimento utilizados, pois múltiplas combinações foram encontradas. Embora meios específicos para células cerebrais já tenham sido desenvolvidos, como é o caso do Neurobasal, por exemplo, o meio básico de cultivo DMEM, compatível com praticamente qualquer célula mamífera, foi o mais utilizado. Da mesma forma, como suplementação a esses meios, o soro fetal bovino foi o escolhido em praticamente metade dos estudos. Dos trabalhos que não usaram FBS, mas sim fatores específicos de crescimento, a maioria optou por combinar EGF e FGF, provavelmente tendo por base as condições de cultivo de NSCs. Porém, nesses casos, também não houve um consenso sobre as concentrações utilizadas de cada um dos fatores. Apenas um estudo utilizou somente PDGF como fator de crescimento e, curiosamente, dois estudos combinaram EGF, FGF e PDGF no mesmo meio. Infelizmente, além das inúmeras combinações encontradas, do total de 120 trabalhos analisados a grande maioria não justificou explicitamente as condições escolhidas para cultivar as células. Treze estudos parecem ter baseado essa escolha no racional de avaliação de CSCs. Nesses casos, os gliomas foram mantidos em duas condições distintas, uma antidiferenciação e outra pró-diferenciação celular, a fim de comparar características biológicas entre potenciais CSCs e as demais células tumorais. É válido mencionar que, como esperado, a maioria deles encontrou diferenças provocadas por essas condições na biologia das células, incluindo, por exemplo, o maior potencial de invasão e capacidade de efluxo de drogas apresentados pelas células do grupo não diferenciado.

Na parte final desta revisão, adicionamos dados experimentais mostrando que as condições de cultivo podem ainda alterar a resposta das células de glioma a agentes terapêuticos. Nesses dados, utilizando as mesmas células e condições do trabalho com OPCs mencionado acima, observamos que OPCs cultivadas em meio de NSCs passaram a expressar

o receptor de EGF, EGFR, e que o mesmo teve seus níveis de fosforilação aumentados, o que demonstra que esse receptor estaria sendo ativado nessas células. Especialmente em gliomas, o EGFR encontra-se frequentemente amplificado ou superativado (conforme mostrado no Capítulo I desta tese), e, por isso, é alvo de diferentes estratégias terapêuticas [288, 289]. Dessa forma, decidimos avaliar a resposta de OPCs cultivadas nas duas diferentes condições (meio de OPCs e meio de NSCs) a inibidores de EGFR. Utilizamos para isso as drogas AG-1478 e gefitinib (ambas inibidoras específicas de EGFR). As células mantidas em meio de NSCs foram sensíveis aos dois inibidores de maneira dose-específica, enquanto as células em meio de OPCs, que não expressaram EGFR, não responderam às drogas. Esses resultados foram observados tanto em células murinas quanto em células humanas.

Esses dados são extremamente preocupantes quando consideramos ensaios *in vitro* de triagem de drogas para GBM. Em um trabalho publicado em 2009, por exemplo, sete amostras derivadas de pacientes com GBM foram cultivadas em meio de NSCs e, dessas, cinco responderam a gefitinib e erlotinib (outro inibidor de EGFR) [290]. No entanto, possivelmente se cultivadas em meio sem EGF esse resultado não seria o mesmo. O próprio estudo realizou uma análise dos sítios de ligação de EGFR disponíveis por célula em cada amostra e observou uma correlação entre um maior número de sítios e uma melhor resposta às drogas. Um dos trabalhos avaliados em nossa revisão sistemática também mostrou que células cultivadas em EGF e FGF foram significativamente mais sensíveis ao tratamento com erlotinib do que células cultivadas em soro, porém não mencionou a possível associação deste resultado com às diferentes condições de cultivo entre essas células [291]. Ainda, um estudo de 2008, após cultivar amostras de GBM em meio de NSCs, havia afirmado que a TMZ em doses específicas poderia eliminar a população de CSCs nesses tumores [292]. Preocupantemente, no entanto, no trabalho publicado pelo nosso grupo em colaboração com o grupo de Zhong foi mostrado que as OPCs cultivadas em meio NSCs foram significativamente mais sensíveis ao tratamento com TMZ do que quando cultivadas em meio próprio de OPCs [23].

Identificar a célula de origem de cada tumor, no entanto, não é uma tarefa simples, o que dificulta que essa caracterização seja feita para cada amostra de GBM primário antes do seu cultivo para os testes desses fármacos. Histologicamente, GBMs de diferentes origens podem ser muito similares [22]. Por isso, Jiang e cols. propuseram, e validaram em dados de pacientes, uma assinatura molecular contendo 196 genes diferencialmente expressos em tumores originados de células com características de NSCs, de células com características de precursores gliais, e de células com características específicas de OPCs [22]. Assinaturas como

essa poderiam ser avaliadas nas amostras de GBM antes do cultivo para classificá-las quanto às diferentes origens e então escolher as melhores condições a cada uma delas. Contudo, talvez a opção ideal seria ainda estabelecer culturas individuais do material de tumor coletado nos diferentes tipos de meio/fatores de crescimento existentes, incluindo os de NSCs, OPCs, astrócitos [281], e até mesmo meios com FBS. Uma vez crescidas as amostras em cada uma dessas condições, seria possível então comparar os perfis de expressão gênica dessas células com o tumor original a fim de identificar a condição que melhor recapitulasse o tumor parental, e a partir daí, utilizar essa condição para os testes de triagem de drogas.

Para os casos em que se deseja trabalhar com amostras altamente heterogêneas, sem favorecer um tipo celular específico, manter as células em condições menos restritivas possivelmente facilitaria cobrir essa heterogeneidade. Nesse sentido, suplementar meios de cultivo com FBS, o qual contém uma ampla gama de fatores de crescimento e hormônios, seria uma alternativa para favorecer a sobrevivência dos diferentes tipos celulares dessas amostras. Contudo, além de estimular a diferenciação, como já citado, o soro pode muitas vezes induzir parada de replicação em culturas primárias [22]. Sendo assim, uma estratégia alternativa seria realizar a própria triagem de drogas em todas as condições de cultivo acima mencionadas, e então identificar o composto mais amplamente eficaz, o qual serviria para combater a heterogeneidade dos tumores.

Entendemos que as abordagens acima descritas possibilitariam a geração de resultados *in vitro* de maior reprodutibilidade e potencial de translação, aumentando consideravelmente a chance de que os mesmos se refletissem em resultados clínicos.

#### CAPÍTULO IV – Análise de *outliers* em células únicas no câncer

Conforme abordado no Capítulo I desta tese, a heterogeneidade de fenótipos celulares presentes em um mesmo tumor está diretamente relacionada às dificuldades encontradas no seu tratamento. No entanto, especialmente na última década, as técnicas de análises de células únicas vêm revolucionando o estudo de doenças complexas e heterogêneas como o câncer. Tecnologias cada vez melhores estão sendo desenvolvidas e hoje possibilitam uma investigação ampla de células individuais, combinando alta resolução com a possibilidade de investigar diversos parâmetros em uma mesma análise. Dentre as técnicas mais avançadas estão, por

exemplo, a citometria de massas, a citometria de fluxo multi-espectro [293], e o sequenciamento de células únicas. Sistemas modernos de imagem, como a citometria de massas por imagem [294], também permitem a investigação de múltiplos parâmetros, embora ainda não alcancem com facilidade a mesma quantidade de células avaliadas que as demais mencionadas. De qualquer forma, graças a essas inovações, a caracterização dos tumores de cada paciente tem sido possível, e vem contribuindo para significativos avanços no contexto da medicina de precisão.

Contudo, a compreensão da heterogeneidade das células de um tumor não requer apenas plataformas experimentais sofisticadas, mas também ferramentas de análise capazes de obter informações úteis a partir de densos conjuntos de dados. Por avaliarem dezenas ou milhares de parâmetros em milhares de células, as tecnologias de célula única transformaram a biologia numa ciência quantitativa complexa na qual se depende cada vez mais de ferramentas computacionais e estatísticas. Com isso, inúmeros métodos de análise vêm sendo desenvolvidos e a escolha dos mais apropriados para responder as questões biológicas de cada estudo representa um outro desafio encontrado pelos pesquisadores. Até mesmo bases de dados contendo as possíveis opções de análise para uma determinada metodologia já foram criadas a fim de auxiliar nesta tarefa (<http://www.scrna-tools.org/>; <https://omictools.com/>).

No câncer, uma investigação minuciosa dos dados pode facilitar a identificação de minorias celulares, como células tumorais circulantes, CSCs e células raras com perfis relacionados a fenótipos de interesse. A identificação dessas minorias, no entanto, não é trivial. A avaliação de médias de sinal em células de uma mesma amostra acaba por esconder esses eventos, mascarando diferenças específicas principalmente nos casos em que os dados apresentam alto ruído experimental ou em que esses eventos representam uma fração extremamente pequena da população total. Além disso, muitas vezes eventos importantes podem ser erroneamente excluídos do conjunto de dados ainda na fase de pré-processamento, antes mesmo das análises finais, como é o caso de *outliers*.

*Outliers* são pontos de dados significativamente diferentes do restante em uma amostra, e muitas vezes na literatura estatística são ditos como anormalidades, pois desviam-se daquilo que se considera o padrão normal, enquanto pontos dentro da normalidade são chamados de *inliers*. *Outliers* são frequentemente excluídos da análise de dados por causarem um efeito negativo em alguns testes estatísticos, como teste-T e ANOVA, ou mesmo por dificultarem a visualização dos dados [295]. No entanto, eles também podem fornecer informações extremamente úteis sobre os dados quando os analisamos como uma resposta incomum a um

determinado estudo. Em tumores, *outliers* podem revelar, por exemplo, características específicas presentes nos raros casos em que o tumor de um paciente responde a um tratamento para o qual os tumores da maioria dos demais pacientes não responderam. Da mesma forma, no nível celular, *outliers* podem representar células com características excepcionais de sensibilidade ou resistência a tratamentos. Assim, o estudo de *outliers* no câncer pode apontar novos alvos e estratégias terapêuticas ou até mesmo sugerir a reaplicação de terapias existentes para os casos em que características de células responsivas sejam encontradas nos pacientes [296]. Diante desse contexto, no trabalho apresentado no Capítulo IV desta tese propusemos uma abordagem para a análise de *outliers* em dados de células únicas tumorais.

Para se identificar *outliers* em uma amostra, existem métodos focados em avaliar pontos que se diferenciam significativamente dos demais por possuírem valores extremos (altos ou baixos), e métodos que avaliam pontos que se diferenciam significativamente dos demais sem necessariamente possuir valores extremos [297]. Em nossa abordagem de análise, tivemos como objetivo caracterizar *outliers* de valores extremos. Para este fim, dois principais testes de determinação de *outliers* poderiam ser utilizados: os testes formais, ou testes de discordância, e os testes informais, também conhecidos como métodos de *outlier labeling*.

Os testes de discordância exigem o uso de testes estatísticos e uma hipótese para determinar se um valor extremo é ou não um verdadeiro *outlier*. Esses testes possuem alto poder sob condições estatísticas bem definidas, como no caso de amostras com distribuição normal. Todavia, na maioria dos casos na pesquisa lidamos com amostras de comportamento desconhecido ou que não seguem padrões de distribuição específicos [295]. Além disso, os testes de discordância são suscetíveis a problemas de *masking*, quando um evento é considerado *outlier* por si próprio mas deixa de ser classificado como tal na presença de um segundo *outlier*, e *swamping*, quando um evento só é considerado como *outlier* na presença de um segundo *outlier* [298]. Já os testes de *outlier labeling* usam parâmetros de escala dos dados para determinar eventos *outliers*, não dependendo da distribuição da amostra, e, ao invés de basearem-se em um teste de hipóteses, visam apenas estabelecer um critério ou intervalo acima do qual todos valores são rotulados como *outliers* [295]. Os métodos de *outlier labeling* são principalmente aplicados para os casos nos quais a finalidade da detecção de *outliers* não é um passo preliminar para encontrar ou eliminar valores extremos que violem as premissas de distribuição das análises estatísticas, mas sim para estudar esses valores extremos. Como esse constituiu o objetivo das nossas análises, optamos por utilizar esses métodos de detecção em detrimento dos testes formais.

Por fim, diferentes opções de testes de *outlier labeling* podem ser utilizadas, cada uma apresentando vantagens e desvantagens. A escolha do melhor teste geralmente depende do dado a ser analisado, levando-se em consideração critérios como distribuição e tamanho da amostra e tipos de variáveis avaliadas. Em um estudo comparativo de cinco desses testes foi mostrado que dentre os com maior robustez, ou seja, menos influenciados por variações nos dados, está o método de Tukey, ou Boxplot [295]. Esse método considera valores relacionados ao primeiro e terceiro quartis da amostra para o cálculo do critério (ponto de corte) de definição de *outliers*, não sendo sensível a valores extremos. Além disso, um fator multiplicador, ou *Tukey factor* (TF), pode ser fixado em 1.5 ou 3 a fim de possibilitar ajustes no ponto de corte que permitam avaliar *outliers* possíveis e prováveis, respectivamente [295]. Por esses motivos, esse foi o teste de *outlier labeling* escolhido em nossas análises.

Nossa abordagem para o estudo de *outliers* em células únicas recebeu o nome de **Single-Cell *OUT*lier analysis – SCOUT**.

#### *Single Cell Outlier analysis (SCOUT) e sua aplicação em dados de citometria de massas*

Utilizamos dois principais conjuntos de dados para avaliar a SCOUT. Um deles foi produzido a partir da avaliação por citometria de massas de uma amostra de GBM tratada com radiação gama ionizante (IR) ou com torina. A IR foi escolhida por ser um tratamento padrão no manejo dos pacientes com GBM [11], enquanto a torina foi escolhida como comparativo de tratamento alvo-específico, pois constitui um inibidor dos complexos mTORC1 e mTORC2. Nesse experimento, a expressão de 23 marcadores de vias de sinalização relacionadas ao crescimento, proliferação e resistência celular foi interrogada em cada célula tumoral. O segundo conjunto de dados foi obtido da literatura, a partir do banco de dados FlowRepository. Esses dados foram produzidos por Doxie et al., e resultaram da análise por citometria de massas de amostras de pacientes com melanoma antes e depois do tratamento com inibidores de BRAF<sup>V600E</sup> e MEK [299]. Das sete amostras pareadas (mesma amostra não tratada e tratada) disponíveis, três foram analisadas como exemplo. Como essas amostras foram obtidas de biópsias teciduais, optamos por excluir da análise células com alta expressão de CD45 (CD45<sup>high</sup>), as quais possivelmente representariam células imunes e não células tumorais. Para isso, aplicamos um *gate* baseado no valor da mediana de expressão desse marcador na população total, deixando de fora da análise todas as células com valores acima dessa mediana (i.e. 50% da amostra). Deve-se considerar, entretanto, que a estratégia de *gating* utilizada no estudo de Doxie e cols.

foi diferente. Os autores consideraram como malignas as células com baixos níveis não só de CD45, mas também de CD31, MCH de classe I, CD90 e  $\alpha$ -SMA, embora não tenham explicado a forma de seleção em termos de valores de expressão que foi utilizada. Após a aplicação desses *gates*, os autores apenas relataram que a porcentagem de células tumorais nas amostras de cada um dos três pacientes que avaliamos foi, em média, 75% em relação ao total de células.

Os pontos de corte foram calculados para cada um dos marcadores avaliados em cada uma das amostras desses dois conjuntos de dados e, e as células foram então classificadas em *outliers* ou *não-outliers*. Os *outliers* obtidos foram denominados de *outliers* por amostra (OutS), visto que foram detectados com base no ponto de corte de cada uma delas. Após essa classificação, foram feitas comparações de comportamento, em termos de valores de expressão e de abundância (quantidade), entre os *outliers* e as demais células (*não-outliers*) nas amostras controle e tratadas, e alguns exemplos foram selecionados para ilustrar os resultados obtidos pelo SCOUT.

Apresentamos diversos casos nos quais observou-se que o comportamento de *outliers* pode ser distinto das demais células *não-outliers* diante do tratamento. Desses, um dos principais exemplos foi o da proteína  $\beta$ -catenina nas amostras de melanoma do paciente MP29, no qual os *outliers* da amostra tratada tiveram uma expressão consideravelmente maior do que os *outliers* do controle, enquanto os *não-outliers* tiveram menor expressão que os *não-outliers* do controle. Esse comportamento oposto foi confirmado pelo aumento significativo na razão entre as médias de expressão de *outliers* e *não-outliers* (razão Out/Non-out) em relação ao controle. Além disso, a proporção de OutS (i.e. sua porcentagem em relação ao total de células da amostra) foi mais de três vezes maior na amostra tratada. O mesmo comportamento foi observado para a proteína CD49F na amostra de melanoma do paciente MP29 após o tratamento com os inibidores. O aumento específico de expressão nas células identificadas como *outliers* pela SCOUT e o enriquecimento das mesmas na população sugere que as moléculas avaliadas podem ser importantes para essas células diante do tratamento e que os altos níveis de expressão podem representar uma vantagem a elas. Isso se torna ainda mais interessante quando avaliamos a biologia relacionada às moléculas investigadas. A proteína CD49F, por exemplo, é utilizada como marcador de CSCs e está relacionada a fenótipos de resistência à droga [300], e a  $\beta$ -catenina já foi inclusive associada à resistência a inibidores de BRAF em câncer colorretal e melanomas [301, 302]. Nesses casos, essas poucas células com expressão extremamente elevada dessas moléculas poderiam ser responsáveis por resistir ao tratamento e possivelmente levar à recorrência do tumor.

Ainda considerando o exemplo de CD49F, é importante ressaltar que os autores do estudo observaram uma redução estatisticamente significativa nos níveis desse marcador quando compararam todas as amostras pareadas pré e pós-tratamento juntas [299]. Além disso, ao avaliarem o perfil de grupos de células que aumentaram em abundância na maioria das amostras após o tratamento, viram que esses grupos não expressavam CD49F. No entanto, ao aplicarmos a SCOUT nesses dados foi possível mostrar respostas diferentes entre amostras e nas células de uma mesma amostra, evidenciando informações importantes que seriam provavelmente negligenciadas sem essa análise.

Em alguns outros casos revelados pela SCOUT, observou-se que diante do tratamento a proporção de OutS aumentou, porém sua expressão não foi necessariamente maior, ou por vezes foi ainda menor, do que a dos *outliers* do controle, como nos exemplos de EGFR, CD49F e CD44 na amostra de melanoma do paciente MP59 tratada com os inibidores e de EGFR na amostra de GBM tratada com IR. Já para o fator de transcrição de células-tronco SOX10, avaliado nas amostras de melanoma, dois pacientes (MP29 e MP34) apresentaram um aumento considerável de expressão em *outliers*, porém acompanhado de uma redução de sua abundância, nas amostras tratadas em relação ao controle.

Curiosamente, diferente do tratamento com IR, por exemplo, o tratamento com torina levou a um aumento da expressão de EGFR na maioria das células de GBM, especialmente não-*outliers*, de modo que nenhum *outlier* foi detectado na amostra tratada. O mesmo comportamento foi observado para a forma fosforilada de EGFR, pEGFR, (dados não mostrados) sugerindo que a ativação desse receptor é importante para a maioria das células tratadas com o inibidor, relação que já foi apontada na literatura [303]. Esse resultado evidenciou ainda que o comportamento dos *outliers* também pode variar de acordo com o agente terapêutico utilizado. Embora não o tenhamos selecionado como exemplo nas ilustrações do trabalho, vale mencionar que o marcador pS6, alvo indireto da sinalização de mTORC1, também foi investigado na amostra de GBM após o tratamento com torina e, conforme esperado, houve redução nos níveis de expressão de *outliers* e não-*outliers* e também no número absoluto e proporção de OutS em comparação com o CT (dados não mostrados).

Por fim, comparamos os resultados obtidos entre *outliers* selecionados pela amostra, OutS, e *outliers* selecionados pelo controle, OutC, usando como exemplo o marcador pNFkB na amostra de GBM tratada com IR. Como explicado no manuscrito, OutC são células das amostras tratadas selecionadas como *outliers* com base no valor do ponto de corte de *outliers* da amostra controle, e não no ponto de corte da própria amostra, como no OutS. Embora não sejam



considerados como *outliers* na definição estatística, exceto para a amostra controle, os OutC podem ser utilizados para situações em que se deseja realizar uma comparação direta das mudanças que ocorreram em determinado tratamento, ou outra condição, em relação aos *outliers* de uma condição controle. No caso do pNFkB, após o tratamento com IR, houve um aumento nos níveis de expressão em toda a população, mas especialmente em não-*outliers* em relação ao CT, como observado pela redução do valor da razão Out/Non-out. Esse aumento em não-*outliers* tornou os níveis de expressão entre a maior parte das células mais homogêneo e também levou a um maior valor de ponto de corte e, como consequência, o número absoluto e proporção de OutS diminuiu consideravelmente (similar ao exemplo de EGFR no tratamento com torina). Por outro lado, quando consideramos o valor do ponto corte de CT para classificar e selecionar *outliers* na IR, como esse valor foi menor, o número e a proporção de *outliers* (OutC) da IR aumentaram. Assim, a proporção elevada de OutC mostrou que houve uma quantidade considerável de células no tratamento com IR com níveis de expressão de pNFkB acima do nível dos *outliers* de CT.

Além das análises acima apresentadas, comparando níveis de expressão e abundância, outras investigações podem ser feitas a partir dos *outliers* detectados e selecionados pela SCOUT. Identificar correlações entre diferentes moléculas ou vias de sinalização, por exemplo, é uma das grandes vantagens do uso de técnicas que investigam múltiplos parâmetros, e, por isso, avaliar essas correlações nos *outliers* pode mostrar resultados interessantes e diferentes dos obtidos quando a análise de correlação é realizada na população como um todo. Mostramos como exemplo dessa análise o teste de correlação de Pearson realizado nos *outliers* de CD44 da amostra de GBM. Contudo, deve-se ressaltar que correlações encontradas em *outliers* devem sempre que possível ser confirmadas por outras metodologias, visto que por serem muitas vezes baseadas em um número muito pequeno de células o poder da análise pode ser prejudicado [304]. Adicionalmente, outras ferramentas comumente utilizadas para dados de células únicas também podem ser aplicadas em *outliers* em alguns casos, como análises de redução de dimensionalidade e *clustering*.

### *SCOUT aplicado a amostras não-tumorais e dados de scRNA-seq*

O conjunto de resultados obtidos nas análises de amostras tumorais evidenciou que a resposta ao tratamento de células tumorais *outliers* pode ser diferente da resposta de células não-*outliers*, sugerindo a importância de se avaliar esses eventos extremos no câncer. Contudo,

em nosso estudo, decidimos avaliar também a aplicação da análise SCOUT em células saudáveis, ou não-tumorais. Utilizamos para isso dados de um experimento realizado em tecido mamário, no qual células da linhagem MCF10A e de amostras primárias de oito diferentes doadores foram avaliadas por citometria de massas em condições de privação de nutrientes (sem FBS e sem fatores de crescimento) ou de tratamento com EGF. Embora tenhamos mostrado como exemplo apenas os resultados para 3 dos 35 marcadores avaliados, a maioria deles não apresentou uma grande diferença em termos de abundância de *outliers* entre os tratamentos. Além disso, as médias populacionais de expressão de nenhum marcador nas oito amostras avaliadas (MCF10A e 7 amostras de doadores) diferiram em mais de 0.5 entre os tratamentos, e, conseqüentemente, os valores dos pontos de corte também foram muito similares (dados não mostrados). Essa menor discrepância entre amostras tratadas e não tratadas e também entre células *outliers* e não-*outliers* pode estar relacionada ao fato de que o tratamento com EGF nas condições aplicadas não tenha causado grandes perturbações no comportamento das células, e também pode ser reflexo de um menor grau de heterogeneidade dessas amostras quando comparadas às amostras tumorais apresentadas nos outros exemplos.

Especificamente para as amostras primárias de tecido mamário, mesmo utilizando o TF de 1.5, em todos os doadores a maioria dos marcadores avaliados apresentou menos de 50 células *outliers*, tanto em privação de nutrientes quanto no tratamento com EGF, representando menos de 1% da população. O doador 3 apresentou mais de 50 *outliers* em 16 dos 35 marcadores, o doador 1 em 11 dos 35 marcadores, o doador 2 em 10 dos 35 marcadores, e os demais doadores em 5 - 8 marcadores. Ainda, curiosamente, os marcadores com mais de 50 *outliers* foram essencialmente os mesmos em todas as amostras, incluindo CD45, CD31, PDGFR $\alpha$ , CD10 e CD90, e todos esses são utilizados para detectar tipos específicos de células do microambiente tecidual, como células do sistema imune, células endoteliais e fibroblastos. Como essas amostras não foram previamente gateadas para selecionar algum tipo celular específico, é provável que as diferenças encontradas nesses poucos marcadores estejam relacionadas com o fato de os mesmos estarem identificando tipos distintos de célula. De acordo com isso, os autores do trabalho encontraram 6 grupos celulares diferentes nessas amostras com base na expressão de marcadores célula-específicos, e dentre eles foram identificados leucócitos CD45<sup>+</sup>, células endoteliais CD31<sup>+</sup> e três tipos de células epiteliais mamárias, sendo um deles representado especificamente por células CD90<sup>+</sup> e CD10<sup>+</sup>. Assim, o maior grau de similaridade observado nos demais marcadores provavelmente reflete células mais homogêneas entre si em uma mesma amostra.

Por último, a fim de testar a análise SCOUT para outras plataformas experimentais de células únicas, utilizamos dados da literatura provenientes de um estudo que realizou scRNA-seq em amostras de GBM de 8 pacientes [305]. Para reduzir o número de genes investigados, selecionamos apenas genes relacionados aos marcadores avaliados no experimento de citometria de massas com GBM. Perfis de expressão gênica avaliados por scRNA-seq possuem inerentemente mais ruído que os de RNA-seq da massa tumoral total, uma vez que a amplificação de pequenas quantidades de material inicial combinada com a baixa amostragem introduz distorções significativas nos resultados. Por isso, as matrizes de expressão de células únicas geralmente contêm excessivos valores zero [306]. Como para todas as amostras avaliadas um grande número de zeros foi observado, decidimos eliminar esses valores para a determinação dos pontos de corte de cada gene.

Nos resultados da análise, observamos que, assim como para os dados de citometria de massas de tumores, o comportamento de *outliers* também variou de acordo com cada gene e cada paciente, e ilustramos essas diferenças apresentando gráficos para 3 casos, embora tenhamos avaliado uma maior quantidade de genes (dados não mostrados). Contudo, a análise de *outliers* em dados de scRNA-seq também evidenciou outras características relevantes, como a de que mesmo em uma amostra com amplificação de um determinado gene, a expressão desse gene nos *outliers* pode variar consideravelmente. Isso foi observado para os níveis de *EGFR* no paciente PJ017, que segundo o próprio estudo apresentou amplificação nesse gene [305]. Uma possível explicação para essa variação, por exemplo, seria a presença de moléculas de DNA extracromossomal, conhecidas como *double minutes*, contendo *EGFR* amplificado. Essas moléculas são muito comuns em tumores e podem variar enormemente em quantidade de célula para célula, como mostrado para GBM [307]. O mesmo comportamento foi observado para os *outliers* de *PDGFRA* no paciente PJ048 e, embora informações a respeito de alterações nesse gene não estivessem disponíveis, essa amostra foi classificada como pertencendo ao subtipo molecular proneural, para o qual alterações em *PDGFRA* estão entre os principais marcadores [34]. Ainda nesse contexto, *CD44* é um dos marcadores do subtipo mesenquimal e, concordantemente, a amostra PJ017, classificada como mesenquimal, apresentou níveis mais elevados de *CD44* do que a proneural PJ018. No entanto, os *outliers* de *CD44* em PJ017 foram mais similares entre si do que os de PJ018.

Em suma, os resultados da aplicação da SCOUT em diferentes conjuntos de dados mostraram que o estudo de *outliers* pode ser extremamente interessante quando envolve populações de células altamente heterogêneas, como é o caso dos tumores. Foi possível

observar que essas células extremas podem se comportar de forma diferente da maioria das células não-*outliers*, e que diante da exposição a determinados tratamentos podem aumentar em abundância ou apresentarem níveis de moléculas pró-tumorais importantes ainda mais elevados que as demais células. Além disso, esses resultados evidenciaram que, embora alterações de fenótipo que ocorrem para uma maioria de células em uma população possam ser detectadas em diferentes tipos de análise, alterações em *outliers* podem ser negligenciadas sem o uso de uma abordagem específica como a SCOUT.

Diante disso, a fim de facilitar o estudo de *outliers*, desenvolvemos uma ferramenta para automatizar a detecção e seleção de *outliers* em diferentes tipos de dados de células únicas. Essa ferramenta foi desenvolvida em Python e recebeu o nome de **SCOUTS** (*Single Cell OUTlier Selector*). Ainda, embora pipelines e métodos de análise de dados incorporados em linguagens computacionais sejam cada vez mais comuns, eles exigem certas habilidades de programação, o que muitas vezes acaba restringindo o seu uso. Por isso, decidimos criar uma interface gráfica para o uso do SCOUTS. Dessa forma, para detectar e selecionar *outliers* o usuário precisa apenas 1) fornecer à interface um arquivo de *input* contendo os dados de células únicas (conforme modelo detalhado no manuscrito) e 2) selecionar as opções de setagem para a seleção de *outliers* (também detalhado no manuscrito). Como *output*, arquivos com os dados de *outliers* são gerados no formato de extensão escolhido pelo usuário e salvos em uma pasta previamente definida. A ferramenta é distribuída sob a licença MIT, sendo portanto de código aberto e permitindo modificações e implementos por terceiros (<https://opensource.org/licenses/MIT>).

### *Considerações finais*

Diversos trabalhos na literatura já abordaram a análise de *outliers* no câncer. No entanto, a grande maioria deles não se dedicou a avaliar *outliers* em células individuais, mas sim em amostras como um todo. Esses trabalhos tiveram por objetivo encontrar alterações gênicas que ocorrem somente em alguns pacientes com um determinado tipo de tumor. Para isso, utilizaram dados gerados a partir do sequenciamento total de amostras tumorais ou de análises de microarranjo. Para a detecção dos *outliers*, um dos primeiros estudos publicados utilizou valores de mediana e desvio absoluto da mediana (MAD) para transformar os dados e então testou diferentes pontos de corte aleatoriamente por testes estatísticos diferenciais [308]. Estudos

posteriores adicionaram pequenas variações a esse método [309], ou então basearam a detecção em métodos como o de Tukey [310].

Um dos únicos trabalhos encontrados na literatura avaliando *outliers* em células únicas foi o de Gingold e colaboradores [311]. No entanto, o objetivo desse estudo foi identificar, em testes de triagem de siRNA (*small interfering RNA*, ou RNA de interferência), genes *outliers* com efeito diferente dos demais sobre a distribuição da expressão de reporteres numa mesma população de células. Para isso, os autores avaliaram dados de imagens obtidos em uma triagem de siRNA para genes indutores de pluripotência em células-tronco embrionárias de camundongo. Além de ter um objetivo diferente do proposto pela nossa abordagem, o trabalho de Gingold e cols. utilizou testes baseados em distância para detectar *outliers*. Os valores das distâncias entre distribuições associadas a cada gene foram obtidos com análises de *clustering* e foram então usados para aplicar o método de ranqueamento de *outliers* Z-score. No Z-score se calcula quantos desvios em relação a média cada evento está e, assim, se faz um ranqueamento dos eventos de acordo com seu nível de *outlierness*. Assumindo-se uma distribuição normal, calcula-se um ponto de corte baseado na média + 2 ou 3 desvios padrão para considerar eventos como *outliers* [295]. No entanto, o fato de esse método ser baseado em média e desvio padrão o torna mais suscetível a valores extremos e o limita ao estudo de distribuições normais, diferentemente do método de Tukey usado em nossa abordagem.

Em termos de racional de análise, as ferramentas que mais se assemelham ao SCOUT são as que envolvem determinadas estratégias de *gating*, utilizadas em dados de citometria. Um exemplo é o racional utilizado no ensaio de detecção de *side populations* (SP) [312]. Ainda na década de 90, pesquisadores observaram células raras de medula óssea de camundongo com elevado potencial de efluxo de corantes lipofílicos fluorescentes, como o Hoescht 33342, por análise de citometria de fluxo [313]. Esses eventos apareciam como uma fração mínima de células deslocadas à esquerda nos gráficos de intensidade de marcação desses corantes, apresentando um nível de fluorescência significativamente menor do que todas as demais células. Por esse motivo, essas células receberam o nome de *side population*, e, ao serem avaliadas, observou-se que as mesmas apresentavam características clássicas de células-tronco hematopoiéticas. Desde então, a análise de SPs passou a ser amplamente utilizada para investigar células-tronco e células progenitoras em diferentes tecidos. No câncer, SPs foram identificadas e associadas a CSCs. Por possuírem capacidade elevada de efluxo dos corantes, observou-se que essas células também eram capazes de expulsar agentes terapêuticos, tornando-se mais resistentes aos tratamentos que as demais células tumorais [312]. O racional

proposto pela SCOUT assemelha-se ao da análise de SPs, porém permite que células raras sejam detectadas para uma variedade de parâmetros e em diferentes tipos de dados de células únicas. Além disso, a identificação dessas células pela SCOUT é específica para *outliers* e se dá de maneira menos arbitrária do que pela aplicação de gates.

Por fim, duas considerações importantes referentes às análises de *outliers* em células únicas devem ser mencionadas. A primeira é de que é um julgamento muitas vezes subjetivo afirmar o que constitui um desvio “suficiente” para que um evento seja considerado um *outlier* e, por isso, valores muito próximos dos pontos de corte podem em alguns casos representar eventos falso-positivos. Todavia, a distinção entre *outliers* falsos e verdadeiros também nem sempre é clara, e vai depender do interesse de quem analisa os dados [297]. No presente trabalho, para o qual foram considerados valores de expressão de proteínas em células tumorais, essa diferenciação se torna ainda mais complicada, visto que não existem exemplos prévios ou um padrão de comportamento das células que deve ser considerado como *outlier*. Por isso, é importante esclarecer que o objetivo do uso de conceitos estatísticos em nossa abordagem foi apenas estabelecer um critério coerente que permitisse diferenciar células com expressão extremamente alta de moléculas importantes das demais células, para que fosse possível comparar o comportamento desses dois grupos.

A segunda consideração a ser feita é a de que a soma de variações técnicas e biológicas em dados de células únicas pode afetar a reprodutibilidade dos dados. Embora existam diversas etapas de pré-processamento, a fim de converter as medidas brutas em sinais biologicamente corretos e significativos, vieses podem ocorrer e levar a uma heterogeneidade nas leituras que nem sempre reflete a real heterogeneidade entre as células. Uma das fontes mais comuns de variação técnica é o efeito de lote (*batch effect*), que pode ocorrer quando células de diferentes grupo biológicos (e.g. tratamentos) são cultivadas, processadas e analisadas separadamente [306]. Também é importante mencionar que para experimentos baseados em ligações antígeno-anticorpo, como as citometrias, a ocorrência de ligações inespecíficas de anticorpos pode levar a falsos aumentos na detecção dos alvos de interesse [314]. Já como variações biológicas, diferenças de tamanho entre células ou de fase do ciclo-celular, por exemplo, podem acarretar em falsas diferenças nos resultados observados. Por isso, esses tipos de vieses devem sempre ser levados em consideração na realização dos experimentos e na interpretação dos resultados obtidos nas análises de *outliers* de célula única.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

### Conclusão geral do trabalho

Neste trabalho foi possível confirmar a importância da sinalização parácrina no contexto do microambiente tumoral de gliomas. Mostramos que fatores presentes no secretoma de MSCs podem bloquear a autofagia em células de GBM. Além disso, evidenciamos que a heterogeneidade das células de um tumor e os estímulos que elas recebem influenciam diretamente sua resposta a agentes terapêuticos. Mostramos e discutimos que as condições de cultivo celular em GBM devem se adequar às características das células que determinam o seu fenótipo *in vivo*, incluindo células-tronco tumorais e células de origem, para que os resultados obtidos sejam fidedignos e tenham maior aplicabilidade. No contexto da heterogeneidade na resposta terapêutica, propusemos uma abordagem de análise de dados de células únicas focada em avaliar células *outliers*, com expressão extremamente elevada de moléculas pró-tumorais. Mostramos que o comportamento dessas células *outliers* pode ser diferente da maioria de células tumorais não-*outliers*, inclusive diante de tratamentos, sugerindo que esse tipo de análise possa agregar informações relevantes ao estudo de células com potencial de resistência à terapia no câncer.

### Conclusões específicas

#### Capítulo II:

- O secretoma de hADSCs bloqueia a autofagia em gliomas *in vitro*;
- O bloqueio autofágico mediado pelo meio condicionado de hADSCs ocorre nas fases tardias do processo autofágico;
- O secretoma de hADSCs ativa sinalização da via de mTORC1;
- O secretoma de hADSCs impede a translocação nuclear do fator de transcrição TFEB em células de glioma.

#### Capítulo III:

- Trabalhos da literatura dos últimos 5 anos mostram não existe um padrão claro nas condições utilizadas para o cultivo de amostras primárias de GBM;
- A maior parte dos trabalhos investigados na literatura não menciona um racional para a escolha das condições nas quais as células de GBM são cultivadas;
- Condições de cultivo podem alterar o fenótipo das células, incluindo sua resposta à droga;
- Em GBM, OPCs cultivadas em meio contendo EGF passam a expressar EGFR e responder a inibidores desse receptor, para os quais seriam resistentes se cultivadas em meio sem esse fator;

#### **Capítulo IV:**

- Uma abordagem de análise simples e baseada em métodos estatísticos pode ser utilizada para identificar *outliers* em populações de células;
- Dados gerados a partir de diferentes plataformas experimentais de células únicas podem ser empregados na análise de *outliers*;
- A análise de *outliers* é particularmente interessante em populações de células altamente heterogêneas, como tumores;
- Células tumorais *outliers* podem se comportar de maneira distinta de células não-*outliers* frente a tratamentos, o que reforça a relevância de sua análise.

#### **Perspectivas**

##### **Capítulo II:**

1. Avaliar se o bloqueio autofágico induzido por hADSCs também pode acontecer de maneira autócrina ou, ainda, em células não malignas que compõe o TME, como fibroblastos e células do sistema imune, por exemplo;
2. Avaliar o efeito do secretoma das células tumorais sobre as hADSCs;
3. Examinar precisamente qual etapa do fluxo autofágico está sendo prejudicada pela ação do secretoma das hADSCs, por meio de técnicas como microscopia eletrônica, por exemplo;
4. Avaliar a expressão de alvos de TFEB, incluindo, especialmente, gene relacionados à autofagia, a fim de confirmar sua baixa atividade no núcleo;
5. Analisar as principais moléculas presentes no secretoma das hADSCs, por meio de análises de proteínas e peptídeos, por exemplo, e avaliar o envolvimento dessas moléculas nos efeitos de bloqueio de autofagia;



6. Validar o bloqueio autofágico induzido por hADSCs *in vivo*.

#### **Capítulo IV:**

1. Aplicar a análise de *outliers* a replicatas experimentais e biológicas a fim de validar a reprodutibilidade de resultados encontrados em cada análise;
2. Testar e comparar as possíveis vantagens da aplicação de barcodes e do processamento único de todas as amostras para a redução da variabilidade de resultados;
3. Validar os achados encontrados pela análise de *outliers* mediante outros experimentos, como a seleção de *outliers* para testes de sensibilidade a drogas, por exemplo;
4. Adaptar análise de *outliers* para técnicas de imagem de células únicas para que seja possível acompanhar as mesmas células *outliers* ao longo do tempo.

### **REFERÊNCIAS**

1. Weller M, Wick W, Aldape K, et al (2015) Glioma. Nat Rev Dis Primer 1:15017. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.17>
2. Westphal M, Lamszus K (2011) The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. Nat Rev Neurosci 12:495–508. <https://doi.org/10.1038/nrn3060>
3. Yabroff KR, Harlan L, Zeruto C, et al (2012) Patterns of care and survival for patients with glioblastoma multiforme diagnosed during 2006. Neuro-Oncol 14:351–359. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nor218>
4. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al (2007) The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Acta Neuropathol (Berl) 114:97–109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>
5. Ohgaki H, Kleihues P (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. Am J Pathol 170:1445–1453. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070011>
6. Sathornsumetee S, Reardon DA, Desjardins A, et al (2007) Molecularly targeted therapy for malignant glioma. Cancer 110:13–24. <https://doi.org/10.1002/cncr.22741>
7. Sukhdeo K, Hambardzumyan D, Rich JN (2011) Glioma development: where did it all go wrong? Cell 146:187–188. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.047>
8. Wen PY, Kesari S (2008) Malignant gliomas in adults. N Engl J Med 359:492–507. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0708126>

9. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl)* 131:803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
10. De Vleeschouwer S (2017) *Glioblastoma*. Codon Publications, Brisbane (AU)
11. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
12. Pegg AE, Dolan ME, Moschel RC (1995) Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 51:167–223
13. Osuka S, Van Meir EG (2017) Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *J Clin Invest* 127:415–426. <https://doi.org/10.1172/JCI89587>
14. Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, ICGC Breast Cancer Consortium, ICGC MMML-Seq Consortium, et al (2013) Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500:415–421. <https://doi.org/10.1038/nature12477>
15. Alcantara Llaguno SR, Parada LF (2016) Cell of origin of glioma: biological and clinical implications. *Br J Cancer* 115:1445–1450. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.354>
16. Alcantara Llaguno S, Chen J, Kwon C-H, et al (2009) Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell* 15:45–56. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.12.006>
17. Alcantara Llaguno SR, Wang Z, Sun D, et al (2015) Adult Lineage-Restricted CNS Progenitors Specify Distinct Glioblastoma Subtypes. *Cancer Cell* 28:429–440. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.09.007>
18. Friedmann-Morvinski D, Bushong EA, Ke E, et al (2012) Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science* 338:1080–1084. <https://doi.org/10.1126/science.1226929>
19. Lindberg N, Kastemar M, Olofsson T, et al (2009) Oligodendrocyte progenitor cells can act as cell of origin for experimental glioma. *Oncogene* 28:2266–2275. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.76>
20. Liu C, Sage JC, Miller MR, et al (2011) Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell* 146:209–221. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.014>
21. Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB (2004) Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23:7267–7273. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207946>
22. Jiang Y, Marinescu VD, Xie Y, et al (2017) Glioblastoma Cell Malignancy and Drug Sensitivity Are Affected by the Cell of Origin. *Cell Rep* 18:977–990. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.003>

23. Ledur PF, Liu C, He H, et al (2016) Culture conditions tailored to the cell of origin are critical for maintaining native properties and tumorigenicity of glioma cells. *Neuro-Oncol* 18:1413–1424. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now062>
24. Ledur PF, Onzi GR, Zong H, Lenz G (2017) Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries? *Oncotarget* 8:69185–69197. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20193>
25. Nakada M, Kita D, Watanabe T, et al (2011) Aberrant signaling pathways in glioma. *Cancers* 3:3242–3278. <https://doi.org/10.3390/cancers3033242>
26. Heimberger AB, Hlatky R, Suki D, et al (2005) Prognostic effect of epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma multiforme patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 11:1462–1466. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1737>
27. Fleming TP, Saxena A, Clark WC, et al (1992) Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors. *Cancer Res* 52:4550–4553
28. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, et al (2013) The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155:462–477. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034>
29. Kita D, Yonekawa Y, Weller M, Ohgaki H (2007) PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 113:295–302. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0186-1>
30. Bos JL (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49:4682–4689
31. Cancer Genome Atlas Research Network (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455:1061–1068. <https://doi.org/10.1038/nature07385>
32. Sallinen S-L, Ikonen T, Haapasalo H, Schleutker J (2005) CHEK2 mutations in primary glioblastomas. *J Neurooncol* 74:93–95. <https://doi.org/10.1007/s11060-005-5953-7>
33. Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, et al (1997) Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 94:303–309
34. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, et al (2010) Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17:98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
35. Wang Q, Hu B, Hu X, et al (2017) Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell* 32:42–56.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.06.003>
36. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, et al (2014) Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 344:1396–1401. <https://doi.org/10.1126/science.1254257>

37. Jin X, Kim LJY, Wu Q, et al (2017) Targeting glioma stem cells through combined BMI1 and EZH2 inhibition. *Nat Med* 23:1352–1361. <https://doi.org/10.1038/nm.4415>
38. Balkwill F, Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet Lond Engl* 357:539–545. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04046-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04046-0)
39. Paget S (1989) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 8:98–101
40. Maman S, Witz IP (2018) A history of exploring cancer in context. *Nat Rev Cancer* 18:359–376. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0006-7>
41. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
42. Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS (2009) Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer* 9:665–674. <https://doi.org/10.1038/nrc2714>
43. Joyce JA, Pollard JW (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9:239–252. <https://doi.org/10.1038/nrc2618>
44. Kalluri R, Zeisberg M (2006) Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:392–401. <https://doi.org/10.1038/nrc1877>
45. Hanahan D, Coussens LM (2012) Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21:309–322. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>
46. Quail DF, Joyce JA (2013) Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 19:1423–1437. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>
47. Dumont N, Liu B, Defilippis RA, et al (2013) Breast fibroblasts modulate early dissemination, tumorigenesis, and metastasis through alteration of extracellular matrix characteristics. *Neoplasia N Y N* 15:249–262
48. Qian B-Z, Pollard JW (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141:39–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014>
49. Condeelis J, Pollard JW (2006) Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124:263–266. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.007>
50. Pollard JW (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4:71–78. <https://doi.org/10.1038/nrc1256>
51. Coniglio SJ, Eugenin E, Dobrenis K, et al (2012) Microglial stimulation of glioblastoma invasion involves epidermal growth factor receptor (EGFR) and colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1R) signaling. *Mol Med Camb Mass* 18:519–527. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00217>

52. Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, et al (2005) Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res* 65:5278–5283. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1853>
53. Gocheva V, Wang H-W, Gadea BB, et al (2010) IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev* 24:241–255. <https://doi.org/10.1101/gad.1874010>
54. Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315:1650–1659. <https://doi.org/10.1056/NEJM198612253152606>
55. Folkman J (1974) Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 19:331–358
56. Weis SM, Cheresh DA (2011) Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med* 17:1359–1370. <https://doi.org/10.1038/nm.2537>
57. Bronte V, Brandau S, Chen S-H, et al (2016) Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun* 7:12150. <https://doi.org/10.1038/ncomms12150>
58. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI (2016) The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol* 37:208–220. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.004>
59. Wang H, Franco F, Ho P-C (2017) Metabolic Regulation of Tregs in Cancer: Opportunities for Immunotherapy. *Trends Cancer* 3:583–592. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.06.005>
60. Shahar T, Rozovski U, Hess KR, et al (2017) Percentage of mesenchymal stem cells in high-grade glioma tumor samples correlates with patient survival. *Neuro-Oncol* 19:660–668. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now239>
61. Beckermann BM, Kallifatidis G, Groth A, et al (2008) VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Br J Cancer* 99:622–631. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604508>
62. Onzi GR, Ledur PF, Hainzenreder LD, et al (2016) Analysis of the safety of mesenchymal stromal cells secretome for glioblastoma treatment. *Cytotherapy* 18:828–837. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.03.299>
63. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al (2007) Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449:557–563. <https://doi.org/10.1038/nature06188>
64. Iser IC, Ceschini SM, Onzi GR, et al (2016) Conditioned Medium from Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) Promotes Epithelial-to-Mesenchymal-Like Transition (EMT-Like) in Glioma Cells In vitro. *Mol Neurobiol* 53:7184–7199. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9585-4>

65. Martin FT, Dwyer RM, Kelly J, et al (2010) Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Breast Cancer Res Treat* 124:317–326. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0734-1>
66. Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, et al (2008) Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 68:4331–4339. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0943>
67. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al (2006) Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107:367–372. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2657>
68. Plumas J, Chaperot L, Richard M-J, et al (2005) Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia* 19:1597–1604. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403871>
69. Pardoll DM (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12:252–264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
70. Ramalho-Santos M, Willenbring H (2007) On the origin of the term “stem cell.” *Cell Stem Cell* 1:35–38. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.05.013>
71. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145–1147
72. Robertson JA (2001) Human embryonic stem cell research: ethical and legal issues. *Nat Rev Genet* 2:74–78. <https://doi.org/10.1038/35047594>
73. Ben-David U, Benvenisty N (2011) The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer* 11:268–277. <https://doi.org/10.1038/nrc3034>
74. Clevers H, Watt FM (2018) Defining Adult Stem Cells by Function, not by Phenotype. *Annu Rev Biochem* 87:1015–1027. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012341>
75. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV (1966) Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16:381–390
76. Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 9:641–650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
77. Panepucci RA, Siufi JLC, Silva WA, et al (2004) Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio* 22:1263–1278. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0024>
78. Muñoz-Elias G, Marcus AJ, Coyne TM, et al (2004) Adult Bone Marrow Stromal Cells in the Embryonic Brain: Engraftment, Migration, Differentiation, and Long-Term Survival. *J Neurosci* 24:4585–4595. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5060-03.2004>
79. Fu X, Fang L, Li X, et al (2006) Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 14:325–335. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2006.00128.x>

80. Chagastelles PC, Nardi NB, Camassola M (2010) Biology and applications of mesenchymal stem cells. *Sci Prog* 93:113–127
81. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119:2204–2213. <https://doi.org/10.1242/jcs.02932>
82. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB (2008) In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio* 26:2287–2299. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1122>
83. Iser IC, Bracco PA, Gonçalves CEI, et al (2014) Mesenchymal stem cells from different murine tissues have differential capacity to metabolize extracellular nucleotides. *J Cell Biochem* 115:1673–1682. <https://doi.org/10.1002/jcb.24830>
84. Akimoto K, Kimura K, Nagano M, et al (2013) Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Inhibit, But Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote, Glioblastoma Multiforme Proliferation. *Stem Cells Dev* 22:1370–1386. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0486>
85. Phinney DG, Prockop DJ (2007) Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells Dayt Ohio* 25:2896–2902. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0637>
86. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
87. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8:726–736. <https://doi.org/10.1038/nri2395>
88. Salem HK, Thiemermann C (2010) Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells Dayt Ohio* 28:585–596. <https://doi.org/10.1002/stem.269>
89. Zimmerlin L, Park TS, Zambidis ET, et al (2013) Mesenchymal stem cell secretome and regenerative therapy after cancer. *Biochimie* 95:2235–2245. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.05.010>
90. Meirelles L da S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI (2009) Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 20:419–427. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.10.002>
91. Cheng L, Zhang K, Wu S, et al (2017) Focus on Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: Opportunities and Challenges in Cell-Free Therapy. *Stem Cells Int* 2017:6305295. <https://doi.org/10.1155/2017/6305295>
92. Arslan F, Lai RC, Smeets MB, et al (2013) Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 10:301–312. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.01.002>

93. Kang D, Oh S, Ahn S-M, et al (2008) Proteomic analysis of exosomes from human neural stem cells by flow field-flow fractionation and nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 7:3475–3480. <https://doi.org/10.1021/pr800225z>
94. Burrello J, Monticone S, Gai C, et al (2016) Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles and Immune-Modulation. *Front Cell Dev Biol* 4:83. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00083>
95. Ferguson SW, Wang J, Lee CJ, et al (2018) The microRNA regulatory landscape of MSC-derived exosomes: a systems view. *Sci Rep* 8:. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19581-x>
96. Galipeau J, Sensébé L (2018) Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell* 22:824–833. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.004>
97. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211–228. <https://doi.org/10.1089/107632701300062859>
98. Choi SA, Lee JY, Wang K-C, et al (2012) Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: characteristics and therapeutic potential as cellular vehicles for prodrug gene therapy against brainstem gliomas. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 48:129–137. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.04.033>
99. Kern S, Eichler H, Stoeve J, et al (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells Dayt Ohio* 24:1294–1301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>
100. Dhanasekaran M, Indumathi S, Poojitha R, et al (2013) Plasticity and banking potential of cultured adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Bank* 14:303–315. <https://doi.org/10.1007/s10561-012-9311-7>
101. De Francesco F, Tirino V, Desiderio V, et al (2009) Human CD34/CD90 ASCs are capable of growing as sphere clusters, producing high levels of VEGF and forming capillaries. *PLoS One* 4:e6537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006537>
102. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al (2004) Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109:1292–1298. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1>
103. Jurado M, De La Mata C, Ruiz-García A, et al (2017) Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells as part of therapy for chronic graft-versus-host disease: A phase I/II study. *Cytotherapy* 19:927–936. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.05.002>
104. Farinazzo A, Angiari S, Turano E, et al (2018) Nanovesicles from adipose-derived mesenchymal stem cells inhibit T lymphocyte trafficking and ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Sci Rep* 8:7473. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25676-2>
105. Yoon W, Jang S, Kook K (2016) Use of Adipose Derived Stem Cells (ASCs) in Treating Autoimmune Skin Diseases: Pilot Study. *Cytotherapy* 18:S132–S133. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.03.259>



106. Cho K-S, Park H-K, Park H-Y, et al (2009) IFATS collection: Immunomodulatory effects of adipose tissue-derived stem cells in an allergic rhinitis mouse model. *Stem Cells Dayt Ohio* 27:259–265. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0283>
107. Kuo Y-R, Wang C-T, Cheng J-T, et al (2016) Adipose-Derived Stem Cells Accelerate Diabetic Wound Healing Through the Induction of Autocrine and Paracrine Effects. *Cell Transplant* 25:71–81. <https://doi.org/10.3727/096368915X687921>
108. Stuckey DW, Shah K (2014) Stem cell-based therapies for cancer treatment: separating hope from hype. *Nat Rev Cancer* 14:683–691. <https://doi.org/10.1038/nrc3798>
109. Shi Y, Du L, Lin L, Wang Y (2017) Tumour-associated mesenchymal stem/stromal cells: emerging therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 16:35–52. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.193>
110. Bateman ME, Strong AL, Gimble JM, Bunnell BA (2018) Using Fat to Fight Disease: A Systematic Review of Non-Homologous Adipose-Derived Stromal/Stem Cell Therapies. *Stem Cells Dayt Ohio*. <https://doi.org/10.1002/stem.2847>
111. Hossain A, Gumin J, Gao F, et al (2015) Mesenchymal Stem Cells Isolated From Human Gliomas Increase Proliferation and Maintain Stemness of Glioma Stem Cells Through the IL-6/gp130/STAT3 Pathway. *Stem Cells Dayt Ohio* 33:2400–2415. <https://doi.org/10.1002/stem.2053>
112. Kim YG, Jeon S, Sin G-Y, et al (2013) Existence of glioma stroma mesenchymal stemlike cells in Korean glioma specimens. *Childs Nerv Syst ChNS Off J Int Soc Pediatr Neurosurg* 29:549–563. <https://doi.org/10.1007/s00381-012-1988-1>
113. Gondi CS, Veeravalli KK, Gorantla B, et al (2010) Human umbilical cord blood stem cells show PDGF-D-dependent glioma cell tropism in vitro and in vivo. *Neuro-Oncol* 12:453–465. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nop049>
114. Park SA, Ryu CH, Kim SM, et al (2011) CXCR4-transfected human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells exhibit enhanced migratory capacity toward gliomas. *Int J Oncol* 38:97–103
115. Nakamizo A, Marini F, Amano T, et al (2005) Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res* 65:3307–3318. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1874>
116. Aboody KS, Brown A, Rainov NG, et al (2000) Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12846–12851. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.23.12846>
117. Tyler MA, Ulasov IV, Sonabend AM, et al (2009) Neural stem cells target intracranial glioma to deliver an oncolytic adenovirus in vivo. *Gene Ther* 16:262–278. <https://doi.org/10.1038/gt.2008.165>

118. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, et al (2009) Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells Dayt Ohio* 27:2614–2623. <https://doi.org/10.1002/stem.187>
119. Starzyńska T, Dąbkowski K, Błogowski W, et al (2013) An intensified systemic trafficking of bone marrow-derived stem/progenitor cells in patients with pancreatic cancer. *J Cell Mol Med* 17:792–799. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12065>
120. Qian B-Z, Li J, Zhang H, et al (2011) CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 475:222–225. <https://doi.org/10.1038/nature10138>
121. Bonecchi R, Galliera E, Borroni EM, et al (2009) Chemokines and chemokine receptors: an overview. *Front Biosci Landmark Ed* 14:540–551
122. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, et al (2009) Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 15:42–49. <https://doi.org/10.1038/nm.1905>
123. Abumaree MH, Al Jumah MA, Kalionis B, et al (2013) Human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages. *Stem Cell Rev* 9:620–641. <https://doi.org/10.1007/s12015-013-9455-2>
124. Hof-Nahor I, Leshansky L, Shvitiel S, et al (2012) Human mesenchymal stem cells shift CD8+ T cells towards a suppressive phenotype by inducing tolerogenic monocytes. *J Cell Sci* 125:4640–4650. <https://doi.org/10.1242/jcs.108860>
125. Bernardo ME, Fibbe WE (2013) Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell* 13:392–402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.006>
126. Patel SA, Meyer JR, Greco SJ, et al (2010) Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. *J Immunol Baltim Md* 1950 184:5885–5894. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903143>
127. Hsu W-T, Lin C-H, Chiang B-L, et al (2013) Prostaglandin E2 potentiates mesenchymal stem cell-induced IL-10+IFN-γ+CD4+ regulatory T cells to control transplant arteriosclerosis. *J Immunol Baltim Md* 1950 190:2372–2380. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202996>
128. Ochs K, Sahm F, Opitz CA, et al (2013) Immature mesenchymal stem cell-like pericytes as mediators of immunosuppression in human malignant glioma. *J Neuroimmunol* 265:106–116. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.09.011>
129. Cuiffo BG, Karnoub AE (2012) Mesenchymal stem cells in tumor development. *Cell Adhes Migr* 6:220–230. <https://doi.org/10.4161/cam.20875>
130. Bagó JR, Alieva M, Soler C, et al (2013) Endothelial differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells in glioma tumors: implications for cell-based therapy. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 21:1758–1766. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.145>

131. Bexell D, Gunnarsson S, Tormin A, et al (2009) Bone marrow multipotent mesenchymal stroma cells act as pericyte-like migratory vehicles in experimental gliomas. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 17:183–190. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.229>
132. De Boeck A, Pauwels P, Hensen K, et al (2013) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through paracrine neuregulin 1/HER3 signalling. *Gut* 62:550–560. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301393>
133. Vieira de Castro J, Gomes ED, Granja S, et al (2017) Impact of mesenchymal stem cells' secretome on glioblastoma pathophysiology. *J Transl Med* 15:. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1303-8>
134. Figueroa J, Phillips LM, Shahar T, et al (2017) Exosomes from Glioma-Associated Mesenchymal Stem Cells Increase the Tumorigenicity of Glioma Stem-like Cells via Transfer of miR-1587. *Cancer Res* 77:5808–5819. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2524>
135. Huang W-H, Chang M-C, Tsai K-S, et al (2013) Mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of tumors in mice. *Oncogene* 32:4343–4354. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.458>
136. Roodhart JML, Daenen LGM, Stigter ECA, et al (2011) Mesenchymal Stem Cells Induce Resistance to Chemotherapy through the Release of Platinum-Induced Fatty Acids. *Cancer Cell* 20:370–383. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.08.010>
137. Mürköster S, Wegehenkel K, Arlt A, et al (2004) Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res* 64:1331–1337
138. Pisati F, Belicchi M, Acerbi F, et al (2007) Effect of human skin-derived stem cells on vessel architecture, tumor growth, and tumor invasion in brain tumor animal models. *Cancer Res* 67:3054–3063. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1384>
139. Ho IAW, Toh HC, Ng WH, et al (2013) Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells suppress human glioma growth through inhibition of angiogenesis. *Stem Cells Dayt Ohio* 31:146–155. <https://doi.org/10.1002/stem.1247>
140. Yang C, Lei D, Ouyang W, et al (2014) Conditioned Media from Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells and Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Efficiently Induced the Apoptosis and Differentiation in Human Glioma Cell Lines In Vitro. In: *BioMed Res. Int.* <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/109389/>. Accessed 24 Jul 2018
141. Bryukhovetskiy I, Bryukhovetsky A, Khotimchenko Y, et al (2015) Combination of the multipotent mesenchymal stromal cell transplantation with administration of temozolomide increases survival of rats with experimental glioblastoma. *Mol Med Rep* 12:2828–2834. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3754>
142. Pacioni S, D'Alessandris QG, Giannetti S, et al (2017) Human mesenchymal stromal cells inhibit tumor growth in orthotopic glioblastoma xenografts. *Stem Cell Res Ther* 8:53. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0516-3>

143. Aboody KS, Najbauer J, Danks MK (2008) Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy. *Gene Ther* 15:739–752. <https://doi.org/10.1038/gt.2008.41>
144. Ahmed AU, Alexiades NG, Lesniak MS (2010) The use of neural stem cells in cancer gene therapy: Predicting the path to the clinic. *Curr Opin Mol Ther* 12:546–552
145. Parker Kerrigan BC, Hossain A, Yamashita S, Lang FF (2018) Stem Cell Therapy of Gliomas. *Prog Neurol Surg* 32:124–151. <https://doi.org/10.1159/000469686>
146. de Duve C, Pressman BC, Gianetto R, et al (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J* 60:604–617
147. Deter RL, Baudhuin P, De Duve C (1967) Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *J Cell Biol* 35:C11-16
148. Tsukada M, Ohsumi Y (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333:169–174
149. Mizushima N, Komatsu M (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147:728–741. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>
150. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Levine B, et al (2017) Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles. *Nat Rev Drug Discov* 16:487–511. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.22>
151. Mizushima N (2007) Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21:2861–2873. <https://doi.org/10.1101/gad.1599207>
152. Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA (2013) The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:759–774. <https://doi.org/10.1038/nrm3696>
153. Hou W, Zhang Q, Yan Z, et al (2013) Strange attractors: DAMPs and autophagy link tumor cell death and immunity. *Cell Death Dis* 4:e966. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.493>
154. Shen H-M, Mizushima N (2014) At the end of the autophagic road: an emerging understanding of lysosomal functions in autophagy. *Trends Biochem Sci* 39:61–71. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.12.001>
155. Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G (2014) Metabolic control of autophagy. *Cell* 159:1263–1276. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.006>
156. Dikic I, Elazar Z (2018) Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:349–364. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>
157. Klionsky DJ, Baehrecke EH, Brumell JH, et al (2011) A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition). *Autophagy* 7:1273–1294. <https://doi.org/10.4161/auto.7.11.17661>

158. Lin MG, Hurley JH (2016) Structure and Function of the ULK1 Complex in Autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 39:61–68. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.02.010>
159. Rubinsztein DC, Shpilka T, Elazar Z (2012) Mechanisms of Autophagosome Biogenesis. *Curr Biol* 22:R29–R34. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.11.034>
160. Slobodkin MR, Elazar Z (2013) The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy. *Essays Biochem* 55:51–64. <https://doi.org/10.1042/bse0550051>
161. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12:1–222. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356>
162. Pengo N, Agrotis A, Prak K, et al (2017) A reversible phospho-switch mediated by ULK1 regulates the activity of autophagy protease ATG4B. *Nat Commun* 8:294. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00303-2>
163. Sánchez-Wandelmer J, Kriegenburg F, Rohringer S, et al (2017) Atg4 proteolytic activity can be inhibited by Atg1 phosphorylation. *Nat Commun* 8:295. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00302-3>
164. Stolz A, Ernst A, Dikic I (2014) Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol* 16:495–501. <https://doi.org/10.1038/ncb2979>
165. Ganley IG (2013) Autophagosome maturation and lysosomal fusion. *Essays Biochem* 55:65–78. <https://doi.org/10.1042/bse0550065>
166. Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N (2012) The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* 151:1256–1269. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.001>
167. Kaminsky V, Zhivotovsky B (2012) Proteases in autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1824:44–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.05.013>
168. Saxton RA, Sabatini DM (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168:960–976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
169. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, et al (2010) Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141:290–303. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.024>
170. Shimobayashi M, Hall MN (2014) Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:155–162. <https://doi.org/10.1038/nrm3757>
171. Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, et al (2011) mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science* 334:678–683. <https://doi.org/10.1126/science.1207056>

172. Bakula D, Müller AJ, Zuleger T, et al (2017) WIPI3 and WIPI4  $\beta$ -propellers are scaffolds for LKB1-AMPK-TSC signalling circuits in the control of autophagy. *Nat Commun* 8:15637. <https://doi.org/10.1038/ncomms15637>
173. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13:132–141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>
174. Füllgrabe J, Ghislat G, Cho D-H, Rubinsztein DC (2016) Transcriptional regulation of mammalian autophagy at a glance. *J Cell Sci* 129:3059–3066. <https://doi.org/10.1242/jcs.188920>
175. Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A (2013) Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:283–296. <https://doi.org/10.1038/nrm3565>
176. Di Malta C, Siciliano D, Calcagni A, et al (2017) Transcriptional activation of RagD GTPase controls mTORC1 and promotes cancer growth. *Science* 356:1188–1192. <https://doi.org/10.1126/science.aag2553>
177. Baek SH, Kim KI (2017) Epigenetic Control of Autophagy: Nuclear Events Gain More Attention. *Mol Cell* 65:781–785. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.027>
178. Rybstein MD, Pedro JMB-S, Kroemer G, Galluzzi L (2018) The autophagic network and cancer. *Nat Cell Biol* 20:243–251. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0042-2>
179. Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402:672–676. <https://doi.org/10.1038/45257>
180. Briceño E, Reyes S, Sotelo J (2003) Therapy of glioblastoma multiforme improved by the antimutagenic chloroquine. *Neurosurg Focus* 14:e3
181. Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B (2012) Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov* 11:709–730. <https://doi.org/10.1038/nrd3802>
182. Takamura A, Komatsu M, Hara T, et al (2011) Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* 25:795–800. <https://doi.org/10.1101/gad.2016211>
183. Mariño G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, et al (2007) Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem* 282:18573–18583. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701194200>
184. Cianfanelli V, Fuoco C, Lorente M, et al (2015) AMBRA1 links autophagy to cell proliferation and tumorigenesis by promoting c-Myc dephosphorylation and degradation. *Nat Cell Biol* 17:20–30. <https://doi.org/10.1038/ncb3072>
185. Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, et al (2015) Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J* 34:856–880. <https://doi.org/10.15252/embj.201490784>

186. Park SM, Ou J, Chamberlain L, et al (2016) U2AF35(S34F) Promotes Transformation by Directing Aberrant ATG7 Pre-mRNA 3' End Formation. *Mol Cell* 62:479–490. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.011>
187. Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, et al (2007) Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* 21:1621–1635. <https://doi.org/10.1101/gad.1565707>
188. Coussens LM, Zitvogel L, Palucka AK (2013) Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science* 339:286–291. <https://doi.org/10.1126/science.1232227>
189. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, et al (2006) Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 10:51–64. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.06.001>
190. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E (2007) Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 7:961–967. <https://doi.org/10.1038/nrc2254>
191. Wu H-B, Yang S, Weng H-Y, et al (2017) Autophagy-induced KDR/VEGFR-2 activation promotes the formation of vasculogenic mimicry by glioma stem cells. *Autophagy* 13:1528–1542. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1336277>
192. Liu K, Lee J, Kim JY, et al (2017) Mitophagy Controls the Activities of Tumor Suppressor p53 to Regulate Hepatic Cancer Stem Cells. *Mol Cell* 68:281–292.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.022>
193. Chaffer CL, Weinberg RA (2011) A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 331:1559–1564. <https://doi.org/10.1126/science.1203543>
194. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW (2006) The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 172:973–981. <https://doi.org/10.1083/jcb.200601018>
195. Grassi G, Di Caprio G, Santangelo L, et al (2015) Autophagy regulates hepatocyte identity and epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions promoting Snail degradation. *Cell Death Dis* 6:e1880. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.249>
196. Bertrand M, Petit V, Jain A, et al (2015) SQSTM1/p62 regulates the expression of junctional proteins through epithelial-mesenchymal transition factors. *Cell Cycle Georget Tex* 14:364–374. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.987619>
197. Qiang L, Zhao B, Ming M, et al (2014) Regulation of cell proliferation and migration by p62 through stabilization of Twist1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:9241–9246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322913111>
198. Catalano M, D'Alessandro G, Lepore F, et al (2015) Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells. *Mol Oncol* 9:1612–1625. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.04.016>

199. Lv Q, Wang W, Xue J, et al (2012) DEDD interacts with PI3KC3 to activate autophagy and attenuate epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer. *Cancer Res* 72:3238–3250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3832>
200. Gugnoni M, Sancisi V, Gandolfi G, et al (2017) Cadherin-6 promotes EMT and cancer metastasis by restraining autophagy. *Oncogene* 36:667–677. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.237>
201. Gilmore AP (2005) Anoikis. In: *Cell Death Differ.* <https://www.nature.com/articles/4401723>. Accessed 4 Aug 2018
202. Cai Q, Yan L, Xu Y (2015) Anoikis resistance is a critical feature of highly aggressive ovarian cancer cells. *Oncogene* 34:3315–3324. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.264>
203. Peng Y-F, Shi Y-H, Ding Z-B, et al (2013) Autophagy inhibition suppresses pulmonary metastasis of HCC in mice via impairing anoikis resistance and colonization of HCC cells. *Autophagy* 9:2056–2068. <https://doi.org/10.4161/auto.26398>
204. Chen N, Debnath J (2013) I $\kappa$ B kinase complex (IKK) triggers detachment-induced autophagy in mammary epithelial cells independently of the PI3K-AKT-MTORC1 pathway. *Autophagy* 9:1214–1227. <https://doi.org/10.4161/auto.24870>
205. Sharifi MN, Mowers EE, Drake LE, et al (2016) Autophagy Promotes Focal Adhesion Disassembly and Cell Motility of Metastatic Tumor Cells through the Direct Interaction of Paxillin with LC3. *Cell Rep* 15:1660–1672. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.065>
206. Belaid A, Cerezo M, Chargui A, et al (2013) Autophagy plays a critical role in the degradation of active RHOA, the control of cell cytokinesis, and genomic stability. *Cancer Res* 73:4311–4322. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4142>
207. New J, Arnold L, Ananth M, et al (2017) Secretory Autophagy in Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Head and Neck Cancer Progression and Offers a Novel Therapeutic Target. *Cancer Res* 77:6679–6691. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1077>
208. Wen Y-A, Xing X, Harris JW, et al (2017) Adipocytes activate mitochondrial fatty acid oxidation and autophagy to promote tumor growth in colon cancer. *Cell Death Dis* 8:e2593. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.21>
209. Katheder NS, Khezri R, O'Farrell F, et al (2017) Microenvironmental autophagy promotes tumour growth. *Nature* 541:417–420. <https://doi.org/10.1038/nature20815>
210. Sousa CM, Biancur DE, Wang X, et al (2016) Pancreatic stellate cells support tumour metabolism through autophagic alanine secretion. *Nature* 536:479–483. <https://doi.org/10.1038/nature19084>
211. Zhao X-L, Lin Y, Jiang J, et al (2017) High-mobility group box 1 released by autophagic cancer-associated fibroblasts maintains the stemness of luminal breast cancer cells. *J Pathol* 243:376–389. <https://doi.org/10.1002/path.4958>



212. Mulcahy Levy JM, Zahedi S, Griesinger AM, et al Autophagy inhibition overcomes multiple mechanisms of resistance to BRAF inhibition in brain tumors. *eLife* 6:. <https://doi.org/10.7554/eLife.19671>
213. Ma X-H, Piao S-F, Dey S, et al (2014) Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *J Clin Invest* 124:1406–1417. <https://doi.org/10.1172/JCI70454>
214. Kang M, Lee K-H, Lee HS, et al (2017) Concurrent Autophagy Inhibition Overcomes the Resistance of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Human Bladder Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 18:. <https://doi.org/10.3390/ijms18020321>
215. Wang W, Kang H, Zhao Y, et al (2017) Targeting Autophagy Sensitizes BRAF-Mutant Thyroid Cancer to Vemurafenib. *J Clin Endocrinol Metab* 102:634–643. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1999>
216. Liu J-T, Li W-C, Gao S, et al (2015) Autophagy Inhibition Overcomes the Antagonistic Effect Between Gefitinib and Cisplatin in Epidermal Growth Factor Receptor Mutant Non--Small-Cell Lung Cancer Cells. *Clin Lung Cancer* 16:e55-66. <https://doi.org/10.1016/j.clc.2015.03.006>
217. Zhang S-F, Wang X-Y, Fu Z-Q, et al (2015) TXNDC17 promotes paclitaxel resistance via inducing autophagy in ovarian cancer. *Autophagy* 11:225–238. <https://doi.org/10.1080/15548627.2014.998931>
218. Yu L, Gu C, Zhong D, et al (2014) Induction of autophagy counteracts the anticancer effect of cisplatin in human esophageal cancer cells with acquired drug resistance. *Cancer Lett* 355:34–45. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.09.020>
219. Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, et al (2007) Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* 117:326–336. <https://doi.org/10.1172/JCI28833>
220. Levy JMM, Towers CG, Thorburn A (2017) Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 17:528–542. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.53>
221. Filippi-Chiela EC, Bueno e Silva MM, Thomé MP, Lenz G (2015) Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. *Autophagy* 11:1099–1113. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1009795>
222. Filippi-Chiela EC, Villodre ES, Zamin LL, Lenz G (2011) Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells. *PLoS One* 6:e20849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020849>
223. Dowdle WE, Nyfeler B, Nagel J, et al (2014) Selective VPS34 inhibitor blocks autophagy and uncovers a role for NCOA4 in ferritin degradation and iron homeostasis in vivo. *Nat Cell Biol* 16:1069–1079. <https://doi.org/10.1038/ncb3053>
224. Ronan B, Flamand O, Vescovi L, et al (2014) A highly potent and selective Vps34 inhibitor alters vesicle trafficking and autophagy. *Nat Chem Biol* 10:1013–1019. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1681>

225. Egan DF, Chun MGH, Vamos M, et al (2015) Small Molecule Inhibition of the Autophagy Kinase ULK1 and Identification of ULK1 Substrates. *Mol Cell* 59:285–297. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.031>
226. Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, et al (2011) Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 334:1573–1577. <https://doi.org/10.1126/science.1208347>
227. Swanton C (2012) Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer Res* 72:4875–4882. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2217>
228. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG (2013) Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 13:714–726. <https://doi.org/10.1038/nrc3599>
229. Sergina NV, Rausch M, Wang D, et al (2007) Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* 445:437–441. <https://doi.org/10.1038/nature05474>
230. Shah MA, Schwartz GK (2001) Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 7:2168–2181
231. Sharma SV, Lee DY, Li B, et al (2010) A chromatin-mediated reversible drug tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* 141:69–80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.027>
232. Spencer SL, Gaudet S, Albeck JG, et al (2009) Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature* 459:428–432. <https://doi.org/10.1038/nature08012>
233. Raj A, Rifkin SA, Andersen E, van Oudenaarden A (2010) Variability in gene expression underlies incomplete penetrance. *Nature* 463:913–918. <https://doi.org/10.1038/nature08781>
234. Taniguchi Y, Choi PJ, Li G-W, et al (2010) Quantifying *E. coli* proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. *Science* 329:533–538. <https://doi.org/10.1126/science.1188308>
235. Bendall SC, Nolan GP, Roederer M, Chattopadhyay PK (2012) A deep profiler’s guide to cytometry. *Trends Immunol* 33:323–332. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.02.010>
236. Proserpio V, Lönnberg T (2016) Single-cell technologies are revolutionizing the approach to rare cells. *Immunol Cell Biol* 94:225–229. <https://doi.org/10.1038/icb.2015.106>
237. Cieřlik M, Chinnaiyan AM (2018) Cancer transcriptome profiling at the juncture of clinical translation. *Nat Rev Genet* 19:93–109. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.96>
238. Dalerba P, Kalisky T, Sahoo D, et al (2011) Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors. *Nat Biotechnol* 29:1120–1127. <https://doi.org/10.1038/nbt.2038>
239. Ramsköld D, Luo S, Wang Y-C, et al (2012) Full-Length mRNA-Seq from single cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol* 30:777–782. <https://doi.org/10.1038/nbt.2282>

240. Angelo M, Bendall SC, Finck R, et al (2014) Multiplexed ion beam imaging of human breast tumors. *Nat Med* 20:436–442. <https://doi.org/10.1038/nm.3488>
241. Spitzer MH, Nolan GP (2016) Mass Cytometry: Single Cells, Many Features. *Cell* 165:780–791. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.019>
242. Di Palma S, Bodenmiller B (2015) Unraveling cell populations in tumors by single-cell mass cytometry. *Curr Opin Biotechnol* 31:122–129. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.07.004>
243. Abdelrahman AI, Dai S, Thickett SC, et al (2009) Lanthanide-containing polymer microspheres by multiple-stage dispersion polymerization for highly multiplexed bioassays. *J Am Chem Soc* 131:15276–15283. <https://doi.org/10.1021/ja9052009>
244. Fienberg HG, Simonds EF, Fantl WJ, et al (2012) A platinum-based covalent viability reagent for single-cell mass cytometry. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 81:467–475. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22067>
245. Ornatsky OI, Lou X, Nitz M, et al (2008) Study of cell antigens and intracellular DNA by identification of element-containing labels and metallointercalators using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem* 80:2539–2547. <https://doi.org/10.1021/ac702128m>
246. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M (2004) Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol* 4:648–655. <https://doi.org/10.1038/nri1416>
247. Bandura DR, Baranov VI, Ornatsky OI, et al (2009) Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 81:6813–6822. <https://doi.org/10.1021/ac901049w>
248. Frei AP, Bava F-A, Zunder ER, et al (2016) Highly multiplexed simultaneous detection of RNAs and proteins in single cells. *Nat Methods* 13:269–275. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3742>
249. Behbehani GK, Bendall SC, Clutter MR, et al (2012) Single-cell mass cytometry adapted to measurements of the cell cycle. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 81:552–566. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22075>
250. Newell EW, Sigal N, Bendall SC, et al (2012) Cytometry by time-of-flight shows combinatorial cytokine expression and virus-specific cell niches within a continuum of CD8+ T cell phenotypes. *Immunity* 36:142–152. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.002>
251. Ringnér M (2008) What is principal component analysis? *Nat Biotechnol* 26:303–304. <https://doi.org/10.1038/nbt0308-303>
252. Nugent R, Meila M (2010) An overview of clustering applied to molecular biology. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 620:369–404. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-580-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-580-4_12)
253. Qiu P, Simonds EF, Bendall SC, et al (2011) Extracting a cellular hierarchy from high-dimensional cytometry data with SPADE. *Nat Biotechnol* 29:886–891. <https://doi.org/10.1038/nbt.1991>

254. Amir ED, Davis KL, Tadmor MD, et al (2013) visNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nat Biotechnol* 31:545–552. <https://doi.org/10.1038/nbt.2594>
255. Spitzer MH, Gherardini PF, Fragiadakis GK, et al (2015) IMMUNOLOGY. An interactive reference framework for modeling a dynamic immune system. *Science* 349:1259425. <https://doi.org/10.1126/science.1259425>
256. Bendall SC, Davis KL, Amir E-AD, et al (2014) Single-cell trajectory detection uncovers progression and regulatory coordination in human B cell development. *Cell* 157:714–725. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.005>
257. Zunder ER, Lujan E, Goltsev Y, et al (2015) A continuous molecular roadmap to iPSC reprogramming through progression analysis of single-cell mass cytometry. *Cell Stem Cell* 16:323–337. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.01.015>
258. Bruggner RV, Bodenmiller B, Dill DL, et al (2014) Automated identification of stratifying signatures in cellular subpopulations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E2770-2777. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408792111>
259. Nowicka M, Krieg C, Weber LM, et al (2017) CyTOF workflow: Differential discovery in high-throughput high-dimensional cytometry datasets. *F1000Research* 6:748. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11622.1>
260. Huijbers A, Tollenaar R a. EM, v Pelt GW, et al (2013) The proportion of tumor-stroma as a strong prognosticator for stage II and III colon cancer patients: validation in the VICTOR trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 24:179–185. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds246>
261. Amaravadi R, Kimmelman AC, White E (2016) Recent insights into the function of autophagy in cancer. *Genes Dev* 30:1913–1930. <https://doi.org/10.1101/gad.287524.116>
262. Han Z, Jing Y, Xia Y, et al (2014) Mesenchymal stem cells contribute to the chemoresistance of hepatocellular carcinoma cells in inflammatory environment by inducing autophagy. *Cell Biosci* 4:22. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-4-22>
263. Zhang M-H, Hu Y-D, Xu Y, et al (2013) Human mesenchymal stem cells enhance autophagy of lung carcinoma cells against apoptosis during serum deprivation. *Int J Oncol* 42:1390–1398. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1810>
264. Luo D, Hu S, Tang C, Liu G (2018) Mesenchymal stem cells promote cell invasion and migration and autophagy-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 lung adenocarcinoma cells. *Cell Biochem Funct* 36:88–94. <https://doi.org/10.1002/cbf.3320>
265. Librizzi M, Tobiasch E, Luparello C (2016) The conditioned medium from osteo-differentiating human mesenchymal stem cells affects the viability of triple negative MDA-MB231 breast cancer cells. *Cell Biochem Funct* 34:7–15. <https://doi.org/10.1002/cbf.3157>

266. Chang MA, Morgado M, Warren CR, et al (2014) p62/SQSTM1 is required for cell survival of apoptosis-resistant bone metastatic prostate cancer cell lines. *The Prostate* 74:. <https://doi.org/10.1002/pros.22737>
267. Xu Q, Wang L, Li H, et al (2012) Mesenchymal stem cells play a potential role in regulating the establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition in MCF7 human breast cancer cells by paracrine and induced autocrine TGF- $\beta$ . *Int J Oncol* 41:959–968. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1541>
268. Kiyono K, Suzuki HI, Matsuyama H, et al (2009) Autophagy is activated by TGF-beta and potentiates TGF-beta-mediated growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 69:8844–8852. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4401>
269. Gugnoni M, Sancisi V, Manzotti G, et al (2016) Autophagy and epithelial–mesenchymal transition: an intricate interplay in cancer. *Cell Death Dis* 7:e2520. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.415>
270. Duran A, Amanchy R, Linares JF, et al (2011) p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Mol Cell* 44:134–146. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.038>
271. Wong P-M, Puente C, Ganley IG, Jiang X (2013) The ULK1 complex. *Autophagy* 9:124–137. <https://doi.org/10.4161/auto.23323>
272. Perera RM, Stoykova S, Nicolay BN, et al (2015) Transcriptional control of autophagy-lysosome function drives pancreatic cancer metabolism. *Nature* 524:361–365. <https://doi.org/10.1038/nature14587>
273. Duran A, Linares JF, Galvez AS, et al (2008) The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell* 13:343–354. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.02.001>
274. Maes H, Rubio N, Garg AD, Agostinis P (2013) Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response. *Trends Mol Med* 19:428–446. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.04.005>
275. Ponpuak M, Mandell MA, Kimura T, et al (2015) Secretory autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 35:106–116. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.04.016>
276. Sanchez CG, Penfornis P, Oskowitz AZ, et al (2011) Activation of autophagy in mesenchymal stem cells provides tumor stromal support. *Carcinogenesis* 32:964–972. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr029>
277. Gao C, Cao W, Bao L, et al (2010) Autophagy negatively regulates Wnt signalling by promoting Dishevelled degradation. *Nat Cell Biol* 12:781–790. <https://doi.org/10.1038/ncb2082>
278. Ndoye A, Budina-Kolomets A, Kugel CH, et al (2017) ATG5 Mediates a Positive Feedback Loop between Wnt Signaling and Autophagy in Melanoma. *Cancer Res* 77:5873–5885. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0907>

279. Kraya AA, Piao S, Xu X, et al (2015) Identification of secreted proteins that reflect autophagy dynamics within tumor cells. *Autophagy* 11:60–74. <https://doi.org/10.4161/15548627.2014.984273>
280. Ocana A, Pandiella A, Siu LL, Tannock IF (2010) Preclinical development of molecular-targeted agents for cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 8:200–209. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.194>
281. Foo LC, Allen NJ, Bushong EA, et al (2011) Development of a Novel Method for the Purification and Culture of Rodent Astrocytes. *Neuron* 71:799–811. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.022>
282. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63:5821–5828
283. Yuan X, Curtin J, Xiong Y, et al (2004) Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23:9392–9400. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208311>
284. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, 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* 9:391–403. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.030>
285. Barrett LE, Granot Z, Coker C, et al (2012) Self-renewal does not predict tumor growth potential in mouse models of high-grade glioma. *Cancer Cell* 21:11–24. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.11.025>
286. Bachoo RM, Maher EA, Ligon KL, 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* 1:269–277
287. Bhat KPL, Balasubramanian V, Vaillant B, et al (2013) Mesenchymal differentiation mediated by NF- $\kappa$ B promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer Cell* 24:331–346. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.001>
288. Mellinghoff IK, Schultz N, Mischel PS, Cloughesy TF (2012) Will kinase inhibitors make it as glioblastoma drugs? *Curr Top Microbiol Immunol* 355:135–169. [https://doi.org/10.1007/82\\_2011\\_178](https://doi.org/10.1007/82_2011_178)
289. Nathanson DA, Gini B, Mottahedeh J, et al (2014) Targeted therapy resistance mediated by dynamic regulation of extrachromosomal mutant EGFR DNA. *Science* 343:72–76. <https://doi.org/10.1126/science.1241328>
290. Griffiero F, Daga A, Marubbi D, et al (2009) Different Response of Human Glioma Tumor-initiating Cells to Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Inhibitors. *J Biol Chem* 284:7138–7148. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807111200>
291. Eimer S, Dugay F, Airiau K, et al (2012) Cyclopamine cooperates with EGFR inhibition to deplete stem-like cancer cells in glioblastoma-derived spheroid cultures. *Neuro-Oncol* 14:1441–1451. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos266>

292. Beier D, Röhrl S, Pillai DR, et al (2008) Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res* 68:5706–5715. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6878>
293. Feher K, Volkman K von, Kirsch J, et al (2016) Multispectral flow cytometry: The consequences of increased light collection. *Cytometry A* 89:681–689. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22888>
294. Giesen C, Wang HAO, Schapiro D, et al (2014) Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat Methods* 11:417–422. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2869>
295. Seo S (2006) A Review and Comparison of Methods for Detecting Outliers in Univariate Data Sets. <http://d-scholarship.pitt.edu/7948/>. Accessed 2 Sep 2018
296. Jonsson P, Taylor BS (2018) Transforming Biomarker Development with Exceptional Responders. *Trends Cancer* 4:3–6. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.11.004>
297. Aggarwal CC (2017) *Outlier Analysis*. Springer International Publishing, Cham
298. Acuna E, Rodriguez C A Meta analysis study of outlier detection methods in classification. 25
299. Doxie DB, Greenplate AR, Gandelman JS, et al (2018) BRAF and MEK inhibitor therapy eliminates Nestin-expressing melanoma cells in human tumors. *Pigment Cell Melanoma Res*. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12712>
300. Gómez-Miragaya J, Palafox M, Paré L, et al (2017) Resistance to Taxanes in Triple-Negative Breast Cancer Associates with the Dynamics of a CD49f+ Tumor-Initiating Population. *Stem Cell Rep* 8:1392–1407. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.03.026>
301. Chen G, Gao C, Gao X, et al (2018) Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway Activation Mediates Adaptive Resistance to BRAF Inhibition in Colorectal Cancer. *Mol Cancer Ther* 17:806–813. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0561>
302. Sinnberg T, Makino E, Krueger MA, et al (2016) A Nexus Consisting of Beta-Catenin and Stat3 Attenuates BRAF Inhibitor Efficacy and Mediates Acquired Resistance to Vemurafenib. *EBioMedicine* 8:132–149. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.04.037>
303. Chiu CW, Nozawa H, Hanahan D (2010) Survival Benefit With Proapoptotic Molecular and Pathologic Responses From Dual Targeting of Mammalian Target of Rapamycin and Epidermal Growth Factor Receptor in a Preclinical Model of Pancreatic Neuroendocrine Carcinogenesis. *J Clin Oncol* 28:4425–4433. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.0198>
304. Bonett DG, Wright TA (2000) Sample size requirements for estimating pearson, kendall and spearman correlations. *Psychometrika* 65:23–28. <https://doi.org/10.1007/BF02294183>
305. Yuan J, Levitin HM, Frattini V, et al (2018) Single-cell transcriptome analysis of lineage diversity in high-grade glioma. *Genome Med* 10:57. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0567-9>
306. Yuan G-C, Cai L, Elowitz M, et al (2017) Challenges and emerging directions in single-cell analysis. *Genome Biol* 18:. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1218-y>

307. Turner KM, Deshpande V, Beyter D, et al (2017) Extrachromosomal oncogene amplification drives tumour evolution and genetic heterogeneity. *Nature* 543:122–125. <https://doi.org/10.1038/nature21356>
308. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al (2005) Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310:644–648. <https://doi.org/10.1126/science.1117679>
309. MacDonald JW, Ghosh D (2006) COPA--cancer outlier profile analysis. *Bioinforma Oxf Engl* 22:2950–2951. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl433>
310. Tibshirani R, Hastie T (2007) Outlier sums for differential gene expression analysis. *Biostat Oxf Engl* 8:2–8. <https://doi.org/10.1093/biostatistics/kxl005>
311. Gingold JA, Coakley ES, Su J, et al (2015) Distribution Analyzer, a methodology for identifying and clustering outlier conditions from single-cell distributions, and its application to a Nanog reporter RNAi screen. *BMC Bioinformatics* 16:225. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0636-7>
312. Golebiewska A, Brons NHC, Bjerkvig R, Niclou SP (2011) Critical appraisal of the side population assay in stem cell and cancer stem cell research. *Cell Stem Cell* 8:136–147. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.01.007>
313. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, et al (1997) Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 3:1337–1345
314. Rahman AH, Tordesillas L, Berin MC (2016) Heparin reduces nonspecific eosinophil staining artifacts in mass cytometry experiments. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 89:601–607. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22826>