

**ANDRÉ ALMEIDA SCHENKA**

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de Anatomia Patológica do(a) aluno(a) André Almeida Schenka

Campinas, 18 de novembro de 2005.

Prof(a). Dr(a). José Vassallo  
Orientador.



**VALIDAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA E ULTRAESTRUTURAL  
DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO NG97**

**BIBLIOTECA CENTRAL  
DESENVOLVIMENTO  
COLEÇÃO  
UNICAMP**

**CAMPINAS**

**2005**

**BIBLIOTECA CENTRAL  
DESENVOLVIMENTO  
COLEÇÃO  
UNICAMP**

2005.11.18

*ANDRÉ ALMEIDA SCHENKA*

***VALIDAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA E ULTRAESTRUTURAL  
DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO NG97***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual  
de Campinas para Obtenção do título de Doutor em  
Ciências Médicas, Área de Concentração Anatomia  
Patológica*

***ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ VASSALLO***

***CAMPINAS***

***2005***

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TUNICAMP
V	EX
TOMBO BC/	06466
PROC.	6-00086-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	4,00
DATA	30/11/05
Nº CPD	

Bib ID 374023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Sé27v

Schenka, André Almeida

“Validação imunofenotípica e ultraestrutural da linhagem de glioma humano NG97” / André Schenka. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : José Vassallo

Tese ( Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Imunohistoquímica. 2. Linhagem celular. 3. Ultraestrutura. 4. Oncologia. 5. Astrocitoma. 6. Patologia. I. Vassallo, José Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

---

## **Banca examinadora da tese de Doutorado**

---

---

**Orientador : Prof. Dr. José Vassallo**

---

---

---

### **Membros:**

---

**1. Prof. Dr. Luiz Fernando Bleggi Torres**

---

**2. Prof. Dr. Leila Maria Cardão Chimelli**

---

**3. Profa. Dra. Maria Leticia Cintra**

---

**4. Prof. Dr. Liliana Ap. Lucci De Angelo Andrade**

---

**5. Prof. Dr. José Vassallo**

---

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 18/11/05**

---

***DEDICATÓRIA***

*À minha família, dedico este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço simplesmente (e não necessariamente nesta ordem)...

Aos meus pais, Erli e André, pela inspiração.

À minha esposa, Natália, pelo amor, companhia e paciência.

Ao meu orientador, Dr. José Vassallo, pela oportunidade, amizade e serenidade.

Às minhas irmãs, Michelle e Ada, pela compreensão silenciosa.

Aos meus avós, pela ternura.

Aos Drs. Júlia e Adnei, pelo suporte psicológico e principalmente por terem feito a minha esposa.

Aos meus padrinhos, Marisa e Sérgio, pelo “*coaching*” à distância.

Ao Dr. Luciano, pela amizade e apoio lingüístico.

À Dra. Liana Verinaud, pela linhagem NG97 e prontidão.

À Dra. Liliana, pelo estímulo e pelo programa de análise de imagem.

Ao Dr. Pierre Brousset, *pour les leçons de immunohistochimie, finesse et pragmatisme.*

Aos brilhantes colegas de “bancada”, Glauce, Marisa, Cristiano, Julius, Eduardo, Lea, Camila Machado, Mariângela Grippo, Dona Gê, Lucinha, Fátima, Adilson, Florence (e tantos outros), pelo companheirismo e ensinamentos fundamentais.

Às minhas consultoras administrativas, Do Carmo, Bete, Rose, Flávia, Ivete e Malvina, pelo apoio logístico e delicadeza.

... e, sobretudo, a Deus, por ter proporcionado tudo e todos neste trabalho.

*“I do not know what I may appear to the world  
but to myself I seem to have been only like a boy  
playing on the seashore, and diverting myself  
in now and then finding a smoother pebble  
or a prettier shell than ordinary,  
whilst the great ocean of truth  
lay all undiscovered before me.”*

*ISAAC NEWTON (1642-1727)*

	<i>PÁG.</i>
<b>RESUMO</b> .....	xix
<b>ABSTRACT</b> .....	xxi
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	23
Neoplasias gliais do Sistema Nervoso Central: gliomas malignos.....	25
Linhagens celulares imortais.....	29
Validação de linhagens celulares.....	30
A linhagem celular NG97.....	32
Imunofenotipagem: análise de histogênese.....	33
Microscopia eletrônica: um importante adjuvante morfológico.....	37
Justificativa.....	38
<b>OBJETIVOS</b> .....	41
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
Desenho do estudo.....	47
Obtenção do tecido tumoral e da linhagem celular NG97.....	47
Manutenção e preparo da linhagem.....	48
Crescimento da linhagem NG97 “ <i>in vivo</i> ”.....	49
Imunofenotipagem.....	50
Marcadores de histogênese.....	50
Preparo do material citológico.....	56
Preparo do material histológico.....	57
Reação de imunoperoxidase em material citológico.....	58
Reação de imunoperoxidase em material histológico.....	59

Análise de dados.....	60
Análise quantitativa.....	60
Validade interna do estudo.....	63
Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	64
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
Imunofenotipagem.....	69
Análise imunofenotípica quantitativa.....	69
Tumor original (parental).....	69
Células NG97 em cultura (P33).....	79
Xenoinxerto NG97 (P33).....	88
Validade interna do estudo.....	93
Análise ultraestrutural.....	97
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>115</b>
Validação imunofenotípica e ultraestrutural da linhagem NG97.....	117
Validade interna do estudo.....	124
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>127</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>131</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>147</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>153</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
Cemib	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica, Unicamp
CGA	Campo de grande aumento
ck	Citoqueratina
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica média do pixel
DON	Densidade óptica média do pixel, normalizada
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , ácido etilendiaminotetraacético
<i>e.g.</i>	<i>Exempli gratia</i> , por exemplo
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i> , e outros
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , órgão normativo norte-americano
Fig.	Figura
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> , proteína ácida fibrilar glial
GIST	<i>Gastro-intestinal stromal tumor</i> , tumor estromal gastrointestinal
DAB	3-3' diaminobenzidina
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> , sulfóxido de dimetila
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> , fator de crescimento epidérmico

HE Hematxilina-eosina (coloração)

HMB45 *Human melanoma black-45*, marcador de diferenciação melanocítica

IB Instituto de Biologia

*i.e.* *Id est*, isto é

IgG Imunoglobulina G

i.p. Intraperitoneal (via)

i.v. Intravenosa (via)

NSE *Neuron-specific enolase*, enolase neurônio-específica

OMS Organização Mundial da Saúde

OsO<sub>4</sub> Tetróxido de Ósmio

P16 Passagem "16" da linhagem NG97

P33 Passagem "33" da linhagem NG97

PBS *Phosphate buffered saline*, solução salina tamponada (tapão fosfato, pH7.4 a 7.6)

PDGF *Platelet derived growth factor*, fator de crescimento derivado de plaqueta

PDGFR *Platelet derived growth factor receptor*, receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta

PSA *Prostate specific antigen*, antígeno específico da próstata

PVPI Iodopovidona a 10%

s.c. Subcutânea (via)

SFB Soro fetal bovino

SNC Sistema Nervoso Central

Tab. Tabela

TTF1 *Thyroid transcription factor 1*, fator de transcrição da tireóide 1

Unicamp Universidade Estadual de Campinas

Vim Vimentina

## *LISTA DE TABELAS*

---

	<i>PÁG.</i>
1. Comparação entre os três principais sistemas de graduação histológica dos astrocitomas.	5
2. Perfis imunofenotípicos (positividade em “ <i>hotspots</i> ”) do tumor original, das células NG97 em cultura e do xenotransplante (P33).	61
3. Perfil imunofenotípico das passagens P16 e P33 (positividade em “ <i>hotspots</i> ”).	73

## *LISTA DE FIGURAS*

---

	<i>PÁG.</i>
1. Alterações genéticas relacionadas aos estágios de progressão dos astrocitomas.	4
2. Imagens demonstrativas do programa Imagelab® 2000 (versão 2.4).	41
3. Fotomicrografias do tumor parental (HE).	49-50
4. Cortes axiais tomográficos do tumor parental pré- e pós- infusão i.v. de contraste iodado.	52
5. Imagens de ressonância magnética do tumor original, ponderadas em T1, com e sem contraste i.v.	53-54
6. Imagens de ressonância magnética do tumor original, ponderadas em T2.	55
7. Imunomarcção do Ki67 (tumor parental).	56-57
8. Perfil imunoistoquímico da neoplasia original.	60
9. Fotomicrografias representativas de células NG97 coletadas em culturas semi-confluentes (HE).	62-63
10. Células NG97: imunoexpressão de GFAP, proteína S-100, NSE e Leu-7.	64-65
11. Fotomicrografias representativas do xenoenxerto da linhagem NG97 (HE).	68-69
12. Perfil imunofenotípico do heterotransplante NG97.	70-71
13. Comparação entre os perfis imunofenotípicos das passagens P16 e P33.	74-75

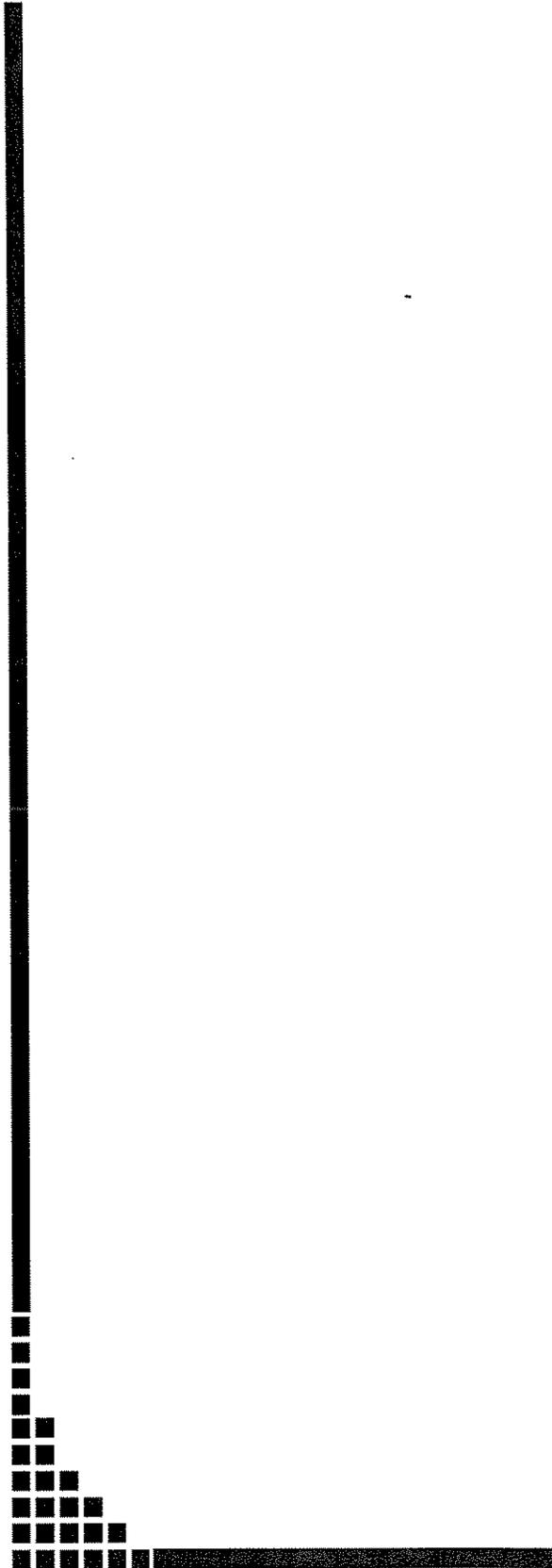
14.	Elétron-micrografia representativa do xenoenxerto NG97: amplo espectro de formas.	77-78
15.	Elétron-micrografia de um grupo de células com características intermediárias em relação aos dois extremos morfológicos do xenotransplante (células redondas e células fusiformes/dendríticas).	79-80
16.	Elétron-micrografias apresentando ninhos de células redondas em íntima aposição.	81-82
17.	Elétron-micrografia ilustrando um agrupamento de células poligonais/fusiformes em detalhe.	83-84
18.	Elétron-micrografias apresentando filamentos intermediários em região perinuclear e em processos celulares.	86-87
19.	Elétron-micrografia ilustrando filamentos intermediários citoplasmáticos associados a estrutura desmossomo-símile.	88
20.	Elétron-micrografia apresentando retículo endoplasmático rugoso (RER) bem desenvolvido.	89-90
21.	Elétron-micrografias do xenotransplante ilustrando a matriz intercelular.	91-92

## RESUMO

Uma nova linhagem de glioma humano, NG97, foi estabelecida por Grippo *et al.* em 2001 a partir de um astrocitoma grau III (OMS, 2000). Neste primeiro estudo, o cultivo da linhagem revelou a existência de duas subpopulações morfológicamente distintas: uma constituída por células fusiformes/dendríticas e outra, por células pequenas e redondas. A injeção de células NG97 em camundongos *nude* induziu a formação de um tumor agressivo caracterizado por atipia citológica intensa, proliferação vascular e necrose em pseudopaliçadas (achados sugestivos, mas não diagnósticos de glioblastoma multiforme). O objetivo do presente estudo foi caracterizar os aspectos imunofenotípicos e ultraestruturais desta linhagem celular, utilizando o tumor parental, as células em cultura e o xenotransplante, com o intuito de avaliar sua natureza glial e possíveis diferenciações divergentes. A comprovação de sua natureza glial é de fundamental importância para a caracterização e validação desta linhagem como um modelo de glioma. As células NG97 e o xenotransplante expressaram os principais marcadores neurogliais (GFAP, proteína S-100, NSE e Leu-7) e não apresentaram qualquer expressão aberrante de outros marcadores de histogênese. GFAP foi expressa de maneira similar no tumor parental e nas células em cultura, diminuindo significativamente no xenotransplante. A expressão de NSE era reduzida nas células NG97, em comparação ao tumor parental, sendo substancialmente recuperada no xenotransplante. Esta variabilidade de expressão de GFAP e NSE foi interpretada como um fenômeno de indiferenciação ou, alternativamente, como um fenômeno relacionado a uma possível seleção microambiental de subclones específicos. A proteína S-100 foi expressa de maneira semelhante nos três contextos de análise (tumor original, células de cultura e transplante). A análise ultraestrutural do xenotransplante revelou uma neoplasia altamente indiferenciada compatível com um glioblastoma. Não foram observadas diferenças imunofenotípicas ou ultraestruturais significativas entre as duas subpopulações morfológicamente distintas. Assim, nossos dados demonstram que as células NG97 constituem uma linhagem celular pura, comprometida com o fenótipo glial, que poderá ser útil como um modelo de glioma maligno em estudos direcionados a questões fisiopatológicas, diagnósticas e terapêuticas.

## ABSTRACT

A human glioma cell line, NG97, was established by Grippo *et al.* in 2001 from tissue obtained from a grade III astrocytoma (WHO, 2000). In this first study, the cell line grew as two morphologically distinct subpopulations: dendritic/spindle cells and small round cells. The injection of NG97 cells into nude mice induced an aggressive tumor characterized by: severe cytological atypia, vascular proliferation and pseudopalisading necrosis (features which are suggestive but not conclusive for the diagnosis of glioblastoma multiforme). The purpose of the present study was to characterize the immunophenotype and ultrastructural aspects of this cell line, using the parental tumor, cultured cells and the xenotransplant, in order to assess its glial nature and possible divergent differentiation. Proof of glial differentiation is fundamental to the process of characterization and validation of this cell line as a glioma model. NG97 cells and xenotransplant expressed the main neuroglial markers (GFAP, S-100 protein, NSE and Leu-7) and showed no aberrant expression of other histogenetic markers. GFAP was similarly expressed in the parental tumor and in the cells in culture, but decreased in the xenotransplant. NSE expression was reduced in NG97 cells, but substantially recovered in the xenotransplant. This variability in expression of GFAP and NSE was interpreted as either a phenomenon of dedifferentiation or due to microenvironmental selection of specific subclones. S-100 was equally expressed in the three contexts. The xenotransplant's ultrastructural features were those of a highly undifferentiated tumor consistent with glioblastoma. No significant immunophenotypic or ultrastructural differences between the two morphologically distinct populations were found. Thus, our data demonstrate that NG97 cells constitute a pure glial-committed cell line, which may prove useful as a malignant glioma model in studies addressing pathophysiological, diagnostic and therapeutic issues.



## INTRODUÇÃO

### *Neoplasias gliais do Sistema Nervoso Central: gliomas malignos*

As neoplasias primárias do Sistema Nervoso Central (SNC) representam 2% de todas as neoplasias malignas e 20% dos cânceres em crianças com idade inferior a 15 anos (Ellison *et al.*, 1998a). A grande maioria destes tumores é originada em células da glia, sendo designados genericamente como gliomas (Ellison *et al.*, 1998b; Kleihues & Cavenee, 2000). Os gliomas constituem um grupo heterogêneo de neoplasias que pode ser subdividido segundo a célula glial de origem hipotética (*i.e.*, astrócito, oligodendrócito e célula ependimária) (Ellison *et al.*, 1998b). Assim sendo, os astrócitos dariam origem aos astrocitomas; os oligodendrócitos, aos oligodendrogliomas; e as células ependimárias, aos ependimomas, havendo ainda neoplasias mistas que combinariam mais de um tipo celular (*e.g.*, oligoastrocitomas).

As neoplasias astrocíticas (ou astrocitomas) são subclassificadas segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (Kleihues & Cavenee, 2000), em:

- Astrocitoma pilocítico
- Xantoastrocitoma pleomórfico
- Astrocitoma subependimário de células gigantes
- Astrocitoma (fibrilar, protoplasmático e gemistocítico)
- Astrocitoma anaplásico e
- Glioblastoma.

As três últimas entidades (astrocitoma, astrocitoma anaplásico e glioblastoma) formam um espectro de lesões com malignidade progressiva, que compartilham alterações genéticas e uma propensão a invadir o tecido nervoso adjacente de maneira difusa (Ellison *et al.*, 1998b). Por esse motivo são designadas em conjunto, por alguns autores, como "astrocitomas difusos" para distingui-los do astrocitoma pilocítico, bem como de outras formas localizadas mais raras (xantoastrocitoma pleomórfico e astrocitoma subependimário de células gigantes) (Ellison *et al.*, 1998b).

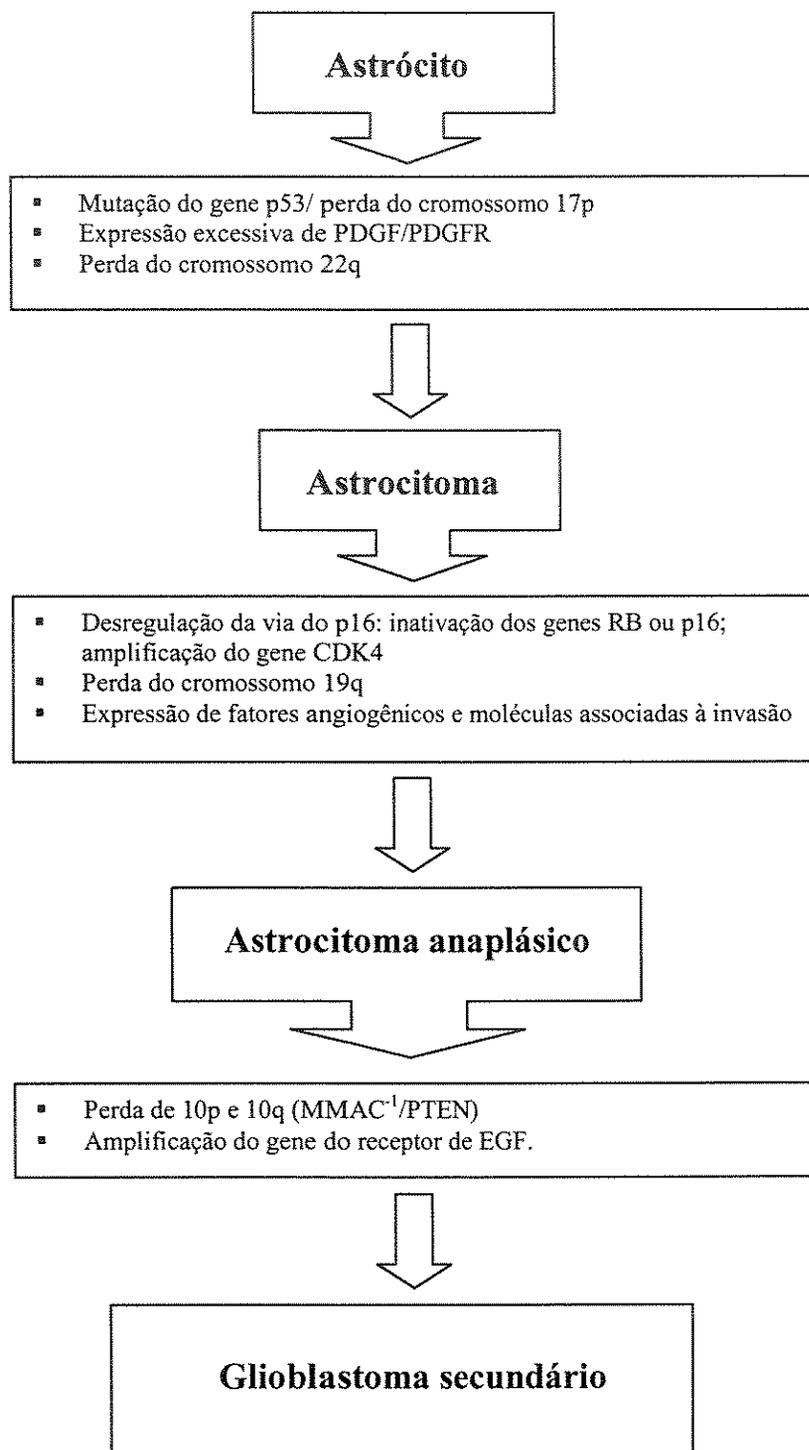
A tendência à malignização progressiva ou transformação anaplásica é uma característica importante dos astrocitomas. Cerca de 50 a 75% progredem para astrocitomas anaplásicos e em última instância para glioblastomas (Ellison *et al.*, 1998b). Esta progressão está associada à aquisição seqüencial de múltiplas alterações genéticas, tais

---

como a mutação do gene p53 e a perda do cromossomo 10 (Figura 1) (Von Deimling *et al.*, 1995; Ellison *et al.*, 1998b; Kleihues & Cavenee, 2000).

As neoplasias astrocitárias têm sido objeto de vários sistemas de graduação histológica (Kernohan *et al.*, 1949; Daumas-Duport *et al.*, 1988; Ellison *et al.*, 1998b, Kleihues & Cavenee, 2000). Utilizando critérios tais como atipia nuclear, mitoses, proliferação vascular e necrose, esses sistemas classificam os tumores em 3 ou 4 subgrupos, buscando alguma correlação com o comportamento biológico (Tabela 1) (Kernohan *et al.*, 1949; Daumas-Duport *et al.*, 1988; Ellison *et al.*, 1998b; Kleihues & Cavenee, 2000). Apesar de algumas diferenças, nota-se ampla correspondência entre os diversos sistemas e o apresentado pela OMS, sendo este preferido pela maioria dos autores.

Dentre os astrocitomas difusos, destacam-se os glioblastomas por representarem a neoplasia intracraniana maligna mais freqüente (cerca de 50% dos gliomas intracranianos), bem como a forma mais agressiva de glioma (astrocitoma grau IV, segundo a OMS) (Ellison *et al.*, 1998b; Kleihues & Cavenee, 2000). Os glioblastomas caracterizam-se por atipia e pleomorfismo celular, alto índice mitótico, neovascularização proeminente, bem como múltiplos focos de necrose, nos quais ocasionalmente as células assumem o aspecto característico de pseudopaliçadas (Ellison *et al.*, 1998b; Kleihues & Cavenee, 2000).



**Figura 1.** Altera es genéticas relacionadas aos estágios de progressão dos astrocitomas. PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; PDGFR, receptor do PDGF; RB, retinoblastoma; EGF, fator de crescimento epidérmico. (adaptado de Von Deimling et al., 1995).

**Tabela 1.** Comparação entre os três principais sistemas de graduação histológica dos astrocitomas.

Entidade	Organização Mundial da Saúde (OMS)*	Kernohan**	St. Anne/ Mayo Clinic***
Astrocitoma	II	1	2
Astrocitoma anaplásico	III	2	3
Glioblastoma	IV	3 e 4	4

\* As neoplasias grau I são os astrocitomas pilocíticos.

\*\* As neoplasias grau I incluem os astrocitomas pilocíticos.

\*\*\* Neste sistema, as neoplasias grau I são muito raras.

(adaptado de Kleihues & Cavenee, 2000)

Apesar das opções terapêuticas disponíveis na atualidade, que combinam, em linhas gerais, cirurgia, radioterapia e quimioterapia, o prognóstico dos portadores de glioblastoma é reservado (Saroja *et al.*, 1989; Chauvenic *et al.*, 1996; Ellison *et al.*, 1998b; Kleihues & Cavenee, 2000; Carpentier, 2005; Chinot, 2005). O tempo médio de sobrevida dos pacientes com glioblastoma é inferior a dois anos (Winger *et al.*, 1989; Stewart *et al.*, 1997). Menos de 3% dos pacientes estão vivos após cinco anos (Ohgaki & Kleihues, 2005). Diante deste quadro, nota-se, nas últimas décadas, um esforço multidisciplinar contínuo em se desenvolver novas estratégias terapêuticas que sejam mais eficientes na redução da mortalidade e morbidade observadas nestes pacientes. Para que tais avanços ocorram, é de fundamental importância o desenvolvimento de um conhecimento mais aprofundado acerca da biologia e fisiopatologia dos gliomas (Perzelova *et al.*, 1998). Nesse sentido, destacam-se como uma ferramenta promissora, as chamadas linhagens celulares imortais derivadas de gliomas (Perzelova *et al.*, 1998).

### *Linhagens celulares imortais*

O cultivo de células, hoje uma técnica amplamente praticada em todo o mundo, desenvolveu-se de maneira paulatina ao longo do século passado (Langdon, 2003a). Suas origens datam de 1885, ano em que Wilhem Roux relatou pela primeira vez a manutenção *in vitro*, por vários dias, de um tecido vivo (placa medular de um embrião de galinha) (Langdon, 2003a). Destaca-se, em 1951, a descrição da primeira linhagem de células cancerosas (células HeLa), por George Gey (Masters, 2002). Desde então, com o estudo sistemático das necessidades nutricionais de células animais em cultura e com o conseqüente aprimoramento dos meios de cultura, observou-se o desenvolvimento de milhares de linhagens celulares que cobrem grande parte do espectro de neoplasias humanas malignas (Langdon, 2003a).

A imortalização de tumores através do cultivo *in vitro* permite a abordagem de inúmeros temas, dentre os quais destacam-se: (1) o estudo da expressão de marcadores antigênicos e moleculares com possíveis aplicações práticas no entendimento da biologia tumoral, no diagnóstico, prognóstico e seguimento terapêutico destas neoplasias (Diserens

---

*et al.*, 1981; Westphal *et al.*, 1988; Kato *et al.*, 1995; McKeever *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998; Ashmore *et al.*, 1999; Husain *et al.*, 1998; Kuklinski *et al.*, 2000; Decleves *et al.*, 2002); e (2) o teste de novos agentes e/ou esquemas terapêuticos anti-tumorais (Shapiro & Shapiro, 1985; Kimmel *et al.*, 1987; Yung, 1989). A principal vantagem destas linhagens contínuas reside no fato de constituírem uma fonte quase inesgotável de amostras celulares com relativa uniformidade de características biológicas (Langdon, 2003a).

Algumas linhagens celulares permanentes podem ser transplantadas com sucesso em modelos animais (Goldbrunner *et al.*, 2000). Estes heterotransplantes ou xenoenxertos permitem, além de estudos semelhantes aos descritos acima, um maior entendimento acerca da fisiopatologia do tumor *in vivo*, isto é, o estudo das interações hospedeiro-tumor relacionadas a mecanismos fisiopatológicos básicos, tais como progressão, invasão, metastatização, etc.

### ***Validação de linhagens celulares***

Como discorrido acima, as linhagens celulares permanentes podem servir a muitos propósitos. Na dependência de suas características (morfológicas, bioquímicas, genéticas, etc.) estas linhagens podem ser utilizadas como um modelo ou protótipo experimental de uma entidade (*e.g.*, uma neoplasia) e/ou de um fenômeno fisiopatológico (*e.g.*, metastatização). Contudo, antes de serem declaradas como tal, *i.e.*, como um substituto ou modelo experimental, as linhagens devem passar por um conjunto de procedimentos que visam verificar a ocorrência, a estabilidade e a reprodutibilidade destas características ou critérios essenciais que as tornam, de maneira objetiva, um protótipo fidedigno (ainda que dotado de certos limites) (Langdon, 2003b). Em conjunto, estes procedimentos de controle de qualidade constituem uma forma de validação.

O propósito de um estudo de validação, no sentido amplo, é demonstrar, através de um ato documentado que um procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente conduza aos resultados esperados (*Food and Drug Administration [FDA]*, 1993; Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA], 2003). No contexto de cultivo celular, este estudo constitui uma etapa fundamental dentro do amplo processo

de caracterização de uma linhagem recém-estabelecida, independente dos seus fins, sejam estes acadêmicos (pesquisa) ou comerciais (produção de insumos biológicos).

Sem uma validação criteriosa de características morfológicas, bioquímicas e genéticas, não se pode garantir que uma linhagem irá se comportar como a entidade/fenômeno que pretende simular em estudos aplicados futuros (*e.g.*, em testes de medicamentos). Esta dúvida crucial que antecede a validação - se a linhagem reproduz ou não a entidade/processo real - compromete seriamente a validade externa dos resultados obtidos a partir destes estudos aplicados, ou seja, a capacidade de se extrapolar ou generalizar o conhecimento adquirido com o modelo, para entidades/situações reais semelhantes ao protótipo. Com mais de 3000 linhagens celulares cancerosas citadas na literatura, estando muitas delas em uso regular, a caracterização e a autenticação destes modelos tornaram-se fundamentais (Hay, 1989; Langdon, 2003b).

As principais etapas cumpridas em estudos de validação, neste contexto de caracterização e autenticação de linhagens celulares, são: (1) a comprovação de que as células da linhagem derivam do tecido parental (tumor de origem), (2) a verificação de ocorrência de contaminação da cultura celular com outras células de fonte externa (de mesma espécie animal ou de espécie diferente) ou de fonte interna (células estromais, presentes na amostra original, *e.g.*), durante o estabelecimento, manutenção, manuseio ou intercâmbio de linhagens celulares; e (3) a verificação da ocorrência de modificações fenotípicas (morfológicas, bioquímicas, metabólicas, etc.) decorrente dos processos de indiferenciação e desdiferenciação (Hay, 1989; Langdon, 2003b). Trata-se de abordagens complementares, não necessariamente realizadas nesta ordem.

A validação é um processo que pode se fundamentar em diferentes níveis metodológicos, agregando seletivamente estratégias diversas, na dependência do propósito e da complexidade do modelo experimental representado pela linhagem celular. Dentre as principais estratégias metodológicas utilizadas, destacam-se a genética (que inclui: *DNA profiling*, *DNA fingerprinting* e análise citogenética), a isoenzimológica (perfil de mobilidade eletroforética de diferentes enzimas espécie-específicas ou entidade-específicas) e imunomorfológica (morfologia à microscopia óptica, imunofenotipagem, e análise ultraestrutural) (Hay, 1989; Langdon, 2003b). Apesar de superponíveis em certos aspectos, cada metodologia apresenta suas próprias vantagens e limitações, sendo as duas

primeiras habitualmente utilizadas na pesquisa de contaminação celular (células de mesma espécie ou de espécies diferentes) e a última na comprovação do parentesco com o suposto tumor original e na caracterização da histogênese e grau de diferenciação das linhagens (Hay, 1989; Langdon, 2003b).

### *A linhagem celular NG97*

Penteado e cols. estabeleceram, em 2001, uma nova linhagem glial permanente denominada NG97 (Grippio *et al.*, 2001). Esta linhagem celular foi obtida a partir de um astrocitoma anaplásico (grau III, OMS) de lobo temporal, extraído de um paciente masculino de 66 anos. As células originadas neste tumor foram subcultivadas em série, apresentando um tempo de duplicação de aproximadamente 72h a 37°C e uma densidade de saturação celular de  $6 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. Após múltiplos subcultivos ("passagens"), observou-se um aumento na velocidade de crescimento das células, indicando uma perfeita adaptação da linhagem às condições de cultura.

Quando em cultivo, as células NG97 formaram monocamadas no fundo do recipiente de cultura, onde se distinguiram duas populações celulares (**Anexo 1**): uma de células redondas e monótonas e outra de células fusiformes, por vezes de aspecto "dendrítico-símile". Ambos os tipos celulares ocorreram de modo relativamente uniforme mesmo após múltiplos subcultivos (Grippio *et al.*, 2001).

No trabalho original de Penteado e cols (Grippio *et al.*, 2001), o transplante (enxerto) de células NG97 subcutaneamente no dorso de camundongos *nude* (camundongos atímicos congênitos) (**Anexo 2**) induziu a formação de massas tumorais sólidas – uma forte evidência da malignidade desta linhagem celular. Histologicamente, o tumor transplantado apresentou aspectos de uma neoplasia agressiva e pouco diferenciada, tais como atipia citológica, alto índice mitótico, extensa necrose (por vezes com distribuição celular em pseudopaliçada) e proliferação vascular, que poderiam ser compatíveis com o diagnóstico de glioblastoma multiforme (tendo em vista sua origem em um astrocitoma e a possibilidade de progressão ao longo dos sucessivos subcultivos) (Diserens *et al.*, 1981).

Entretanto, neste estudo, a natureza glial destas células não foi investigada à luz de critérios imunistoquímicos ou ultraestruturais (Grippo *et al.*, 2001).

### *Imunofenotipagem: análise de histogênese*

A imunistoquímica e a imunocitoquímica estão baseadas no reconhecimento de componentes e produtos celulares através do uso de anticorpos monoclonais ou policlonais marcados (Hsu *et al.*, 1981; Poirier *et al.*, 1987; Schmitt, 1999). A técnica se desenvolveu rapidamente após a descoberta do hibridoma por Köhler & Milstein, em 1975. Uma grande variedade de anticorpos está disponível comercialmente na atualidade, tendo grande valor prático tanto em pesquisa quanto em patologia cirúrgica. Dentre os principais usos rotineiros da imunistoquímica destacam-se:

- A identificação da histogênese de neoplasias indiferenciadas (*e.g.*, marcadores de linhagens celulares: epitelial - citoqueratinas; linfóide – CD45 [Antígeno Leucocitário Comum]; melanocítica - HMB45; etc) (Schmitt, 1999);
  - A determinação de sítios primários de metástases (marcadores tecido-específicos: próstata - PSA; tireóide - Tireoglobulina; tireóide e pulmão - TTF1 [Thyroid Transcription factor 1]; etc) (Schmitt, 1999);
  - A imunofenotipagem de linfomas e outras neoplasias hematológicas (marcadores de clonalidade: cadeias kappa e lambda; marcadores de linhagem B - CD20; linhagem T - CD3, etc) (Vassallo, 1999; Bacchi, 1999; Soares & Arias, 1999);
  - A identificação de agentes infecciosos (toxoplasma, micobacteria, etc) (Sternberger *et al.*, 1970; Duarte & Pagliari, 1999);
  - A identificação de substâncias extracelulares e marcadores de processos inflamatórios e degenerativos (membrana basal - laminina, colágeno 4; amiloidose - amilóide, etc) (Schmitt, 1999).
  - A distinção entre processos benignos e malignos (Bcl2 ausente em centros germinativos reacionais e presente nos neoplásicos; restrição de
-

cadeia leve de imunoglobulinas em neoplasias plasmocitárias; deleção de marcador T [e.g. CD7] em linfomas cutâneos, etc.) (Vassallo, 1999).

- A determinação de índices relacionados ao ciclo celular e atividade proliferativa (e.g., Ki-67), os quais guardam relação com o prognóstico de certas neoplasias (Mello & Alves, 1999).
- A pesquisa de moléculas que indicam o uso de certas drogas em determinadas neoplasias (e.g., positividade para C-kit – uso autorizado de mesilato de imatinib [Gleevec®] em pacientes portadores de tumores estromatosos gastrintestinais [GISTs]) (Candelaria *et al.*, 2005).

O método imunoistoquímico/imunocitoquímico baseia-se na premissa de que um anticorpo monoclonal deve se ligar especificamente a um determinado antígeno alvo e que esta reação pode ser observada por meio de fluorescência (Poirier, 1987; Schmitt, 1999) ou pela reação de peroxidase-antiperoxidase (Nakane & Pierce, 1966; Poirier, 1987; Schmitt, 1999), entre outros métodos.

Um dos pressupostos fundamentais do uso da imunoistoquímica na determinação da histogênese de tumores é a manutenção da expressão de alguns antígenos (componentes ou produtos celulares) característicos de um determinado tecido normal (maduro ou imaturo) em um tecido neoplásico cuja origem não pôde ser determinada segundo critérios morfológicos puros (*i.e.*, à coloração pela hematoxilina-eosina) (Alves *et al.*, 1999).

No processo de desdiferenciação celular da neoplasia, alguns antígenos podem deixar de ser expressos (Diserens *et al.*, 1999; Bocchini *et al.*, 1991) ao passo que outros componentes celulares, normalmente ausentes no tecido de origem, podem ser produzidos de forma anômala ou aberrante (Henricks, 1997). Deste modo, a análise histogenética de um tecido tumoral é um processo complexo que deve envolver um amplo painel de marcadores ontogênicos, a fim de se identificar não apenas a origem mais provável da neoplasia como também uma possível diferenciação divergente (co-expressão aberrante de marcadores de diferentes linhagens celulares).

Os principais marcadores antigênicos associados ao imunofenótipo glial e, portanto, comumente utilizados na confirmação diagnóstica dos gliomas são: a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Eng *et al.*, 1971; Bignami *et al.*, 1972; Uyeda *et al.*, 1972; Manoury *et al.*, 1977; Bignami & Dahl, 1977; Paetau *et al.*, 1979; Diserens *et al.*, 1981;

Bonnin & Rubinstein, 1984; Poirier *et al.*, 1987; Bocchini *et al.*, 1991; Bleggi-Torres, 1999; Morrison & Prayson, 2000), a proteína S-100 (Cicero *et al.*, 1970; Edström *et al.*, 1973; Ludwin, 1976; Moller *et al.*, 1978; Diserens *et al.*, 1981; Bonnin & Rubstein, 1984; Bleggi-Torres, 1999), a enolase neurônio específica (NSE) (Cicero *et al.*, 1970; Haglid *et al.*, 1973; Royds *et al.*, 1982; Bonnin & Rubinstein, 1984; Vinores *et al.*, 1984; Bleggi-Torres, 1999) e a vimentina (Schnitzer *et al.*, 1981; Osborn *et al.*, 1981; Ramaekers *et al.*, 1983; Bonnin & Rubinstein, 1984; Gullotta *et al.*; Schiffer *et al.*, 1986; Poirier *et al.*, 1987; Bleggi-Torres, 1999).

A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é um polipeptídeo de 48-52Kd que constitui o principal componente de um filamento intermediário de subclasse III presente em astrócitos (normais e patológicos) e de grande utilidade no diagnóstico de astrocitomas e glioblastomas (Eng *et al.*, 1971; Bonnin & Rubinstein, 1984; Bleggi-Torres, 1999; Morrison & Prayson, 2000). O padrão de positividade nestas células é usualmente citoplasmático, sendo a proteína detectada tanto no corpo quanto nos processos celulares (Morrison & Prayson, 2000). Embora seja considerada como o marcador astrocítico mais emblemático, não é específica para astrócitos normais, nem patológicos. Pode ser encontrada em outros tipos celulares (células de Schwann, condrócitos, células mioepiteliais, etc.) (Jessen *et al.*, 1984; Fields & Yen, 1985; Kepes *et al.*, 1984; Viale *et al.*, 1991), em outras neoplasias gliais não-astrocíticas (*e.g.*, ependimomas) (Morrison & Prayson, 2000), bem como em tumores neuroectodérmicos primitivos centrais (*e.g.*, meduloblastomas) dotados de diferenciação glial (Morrison & Prayson, 2000), entre outras exceções mais raras. Possui papel importante na plasticidade e na modulação do crescimento astrocitário, uma vez que a sua fosforilação-desfosforilação contribui para a remodelação do arcabouço glial (Rutka *et al.*, 1994; Rodnight *et al.*, 1997; Rutka *et al.*, 1998; Bleggi-Torres, 1999).

A proteína S-100 é a proteína solúvel do SNC mais extensivamente estudada (Bonnin & Rubinstein, 1984). Trata-se de um dímero ligado ao cálcio com 20-25Kda, composto por duas subunidades distintas, alfa e beta, o que resulta em 3 formas distintas de expressão (alfa-alfa, alfa-beta e beta-beta) (Bonnin & Rubinstein, 1984; Bleggi-Torres, 1999; Morrison & Prayson, 2000). Foi originalmente descrita como marcador específico para células derivadas da crista neural, mas desde então tem sido descrita em inúmeros

---

tecidos de ontogenia distinta (e.g., em cartilagem) (Nakajima *et al.*, 1982; Bonnin & Rubinstein, 1984; Morrison & Prayson, 2000). É positiva em (1) células normais do sistema nervoso (tais como: astrócitos, oligodendrócitos, células endimárias e células de Schwann) (Cícero *et al.*, 1970; Ludwin *et al.*, 1976; Moller *et al.*, 1978; Bonnin & Rubinstein, 1984; Loeffel *et al.*, 1985; Bleggi-Torres, 1999; Morrison & Prayson, 2000), e em (2) tumores, tais como astrocitomas localizados e difusos (incluindo glioblastomas) (Kimura *et al.*, 1986; Bleggi-Torres, 1999; Morrison & Prayson, 2000). Localiza-se tanto no núcleo, quanto no citoplasma, sendo sua função exata pouco conhecida (Loeffel *et al.*, 1985; Bonnin & Rubinstein, 1984; Morrison & Prayson, 2000). Alguns estudos recentes sugerem que a proteína possa estar implicada no controle da progressão celular durante a divisão, na ativação de enzimas e na regulação da contração muscular, entre outras funções (Mazzucchelli, 2002). Além do papel fisiológico e como marcador ontogénico, a proteína S-100 parece ter uma importância prognóstica em gliomas: a diminuição da produção desta proteína está associada a um pior prognóstico em glioblastomas (Mazzucchelli, 2002).

A enolase é uma enzima citoplasmática envolvida na catálise de um dos últimos passos da via glicolítica (Bonnin & Rubinstein, 1984). É composta por duas das subunidades alfa-beta ou gama (cada uma com peso molecular de 40-50Kd), podendo formar homo- ou heterodímeros (ao todo, 5 isoenzimas diferentes) (Bonnin & Rubinstein, 1984; Bleggi-Torres, 1999). É utilizada para demonstrar, em conjunto com outros marcadores, a diferenciação neuronal ou neuroendócrina em neoplasias primárias do SNC, bem como marcar gliomas e carcinomas neuroendócrinos. A enolase gama geralmente é encontrada em neurônios e células do sistema APUD (*Amine Precursor Uptake and Decarboxylation*), ao passo que a alfa usualmente encontra-se presente em células gliais, meningoteliais, endoteliais e de Schwann (Schmechel *et al.*, 1978; Tapia *et al.*, 1981; Wick *et al.*, 1983; Bonnin & Rubinstein, 1984; Bleggi-Torres, 1999). Inicialmente, Royds *et al.* (1982) atestaram que neoplasias gliais como astrocitomas, oligodendrogliomas e endimomas poderiam ser positivos para homodímeros  $\alpha\alpha$ , mas não para homodímeros  $\gamma\gamma$  (enolase neurônio-específica). Contudo, desde então, inúmeros artigos têm demonstrado a positividade de NSE tanto em neoplasias gliais quanto em linhagens celulares derivadas

destas (Vinores *et al.*, 1984a,b; Vinores et Rubinstein LJ, 1985; Liwnicz *et al.*, 1986; Cras *et al.*, 1988; Seshi *et al.*, 1988; Takeshita *et al.*, 1990; Takekawa *et al.*, 2001).

A vimentina é uma subunidade protéica de 57kD de filamentos intermediários, típica de células mesenquimatosas (células endoteliais, fibroblastos, células musculares lisas, etc.) e coexpressa com GFAP em células gliais imaturas, reativas, na glia de Bergmann e em tanicitos (Schnitzer *et al.*, 1981; Ramaekers *et al.*, 1983; Bonnin & Rubinstein, 1984; Bleggi-Torres, 1999), onde contribui para a manutenção do arcabouço celular. É a primeira proteína a aparecer no desenvolvimento embriológico, independente da linhagem celular, sendo posteriormente substituída por filamentos intermediários mais específicos. Em alguns casos pode co-existir com GFAP durante o desenvolvimento normal de células gliais ou em estados neoplásicos (astrocitomas e, em particular, glioblastomas) (Perzelova *et al.*, 1998; Kleihues & Cavenee, 2000). Dados de Sarria *et al.* (1994) indicam que a vimentina estaria implicada na plasticidade nuclear de células tumorais. Neste estudo, alterações de morfologia nuclear (tais como presença de fendas e proeminências) estiveram consistentemente presentes em células de linhagens tumorais humanas negativas para vimentina e ausentes nas que expressavam a proteína.

### *Microscopia eletrônica: um importante adjuvante morfológico*

O grau de intensidade e a extensão dos marcadores mencionados acima são muito variáveis nos gliomas malignos (Bleggi-Torres, 1999; Kleihues & Cavenee, 2000), refletindo a grande heterogeneidade destes tumores. Nos glioblastomas, por exemplo, a positividade para GFAP varia não só em intensidade e extensão, mas também segundo o componente celular analisado, sendo maior em células bem diferenciadas e gemistócitos, e menor em células pequenas e indiferenciadas (Kleihues & Cavenee, 2000). Além disso, em algumas linhagens gliais, com a desdiferenciação progressiva ao longo de inúmeros subcultivos, a quantidade de marcadores gliais produzida pode se tornar inferior ao limite de detecção do método imunistoquímico (Weinstein & Kornblith, 1971; Diserens *et al.*, 1981). Nesta eventualidade, torna-se útil a complementação do estudo com a análise ultraestrutural do heterotransplante, o que permite deflagrar algumas características típicas,

embora não diagnósticas, do fenótipo glial, bem como confirmar o grau de diferenciação da neoplasia (Weinstein & Kornblith, 1971; Diserens *et al.*, 1981).

Dentre as características ultraestruturais de importância para o diagnóstico de uma neoplasia astrocitária, destaca-se o achado de filamentos intermediários (7-11nm) e microfibrilas intracitoplasmáticas (5-7nm) em quantidade variável segundo o grau de diferenciação da célula (Weinstein & Kornblith, 1971; Diserens *et al.*, 1981; Dickersin, 2000). Contudo, vale lembrar que o diagnóstico diferencial entre GFAP, vimentina e outros filamentos intermediários não relacionados à linhagem glial (*e.g.*, citoqueratinas) não pode ser feito à microscopia eletrônica em bases meramente morfométricas (os filamentos intermediários são idênticos entre si). Para tanto, é necessária a utilização de metodologia imunológica, *i.e.*, imunomicroscopia eletrônica (Erlandson, 1994).

A despeito da relativa inespecificidade destes achados ultraestruturais (quando tomados isoladamente), pode-se defender a análise ultraestrutural (qualitativa e morfométrica) como um recurso adjuvante na caracterização histogenética de linhagens gliais. Por um lado, seu emprego em paralelo à imunoistoquímica convencional pode fornecer evidências adicionais a confirmar a natureza glial de uma linhagem, quando os marcadores imunoistoquímicos forem indubitavelmente positivos. Por outro, na eventualidade da abordagem imunoistoquímica convencional falhar, a detecção de características ultraestruturais compatíveis ou sugestivas de diferenciação glial, tais como filamentos intermediários, pode indicar de maneira mais racional a realização de imunomicroscopia eletrônica (uma técnica mais complexa e onerosa).

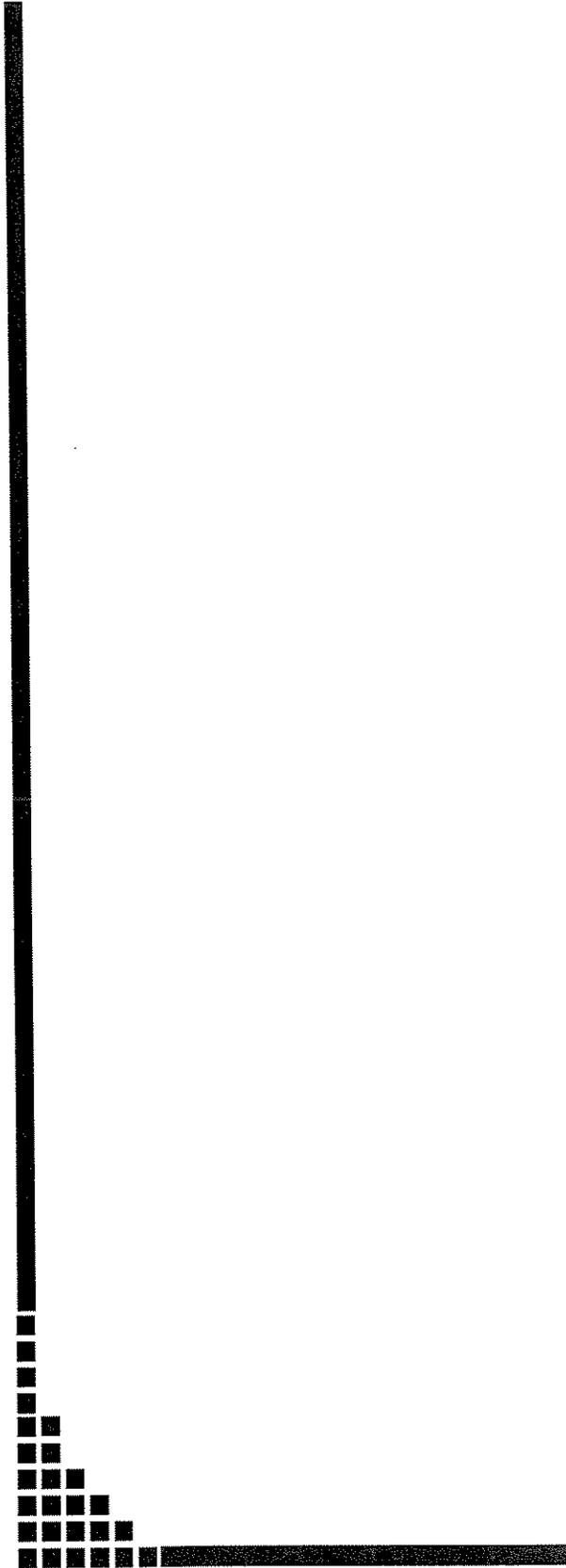
### ***Justificativa***

Constituem grandes dificuldades no estabelecimento de linhagens celulares gliais permanentes: a desdiferenciação celular, a diferenciação divergente e a contaminação celular. As duas primeiras, que se verificam com freqüência ao longo de um subcultivo seriado, consistem, respectivamente: (1) na perda de características morfológicas (citológicas, arquiteturais, imunofenotípicas, ultraestruturais, etc.) consideradas típicas do tecido original e (2) no ganho de atributos usualmente ausentes neste e típicos de outros

tecidos (Diserens *et al*, 1981; Welch *et al*, 1995). O último fenômeno, por sua vez, decorre da incapacidade das células de interesse em se adaptar às condições de cultura ou enxertia, dando lugar a células com vantagens adaptativas. Estas podem corresponder a células pré-existentes na amostra do tumor parental (*e.g.*, fibroblastos), no hospedeiro do xenoenxerto ou introduzidas por descuidos técnicos a partir de outras fontes externas.

Apesar das similaridades morfológicas com um glioblastoma, a natureza glial da linhagem NG97 ainda não foi devidamente demonstrada. Constituem motivos para se suspeitar da ocorrência de desdiferenciação/ diferenciação divergente ou de contaminação celular: (1) a diferença de grau histológico entre o tumor parental (um astrocitoma anaplásico ou grau III) e o xenoenxerto (um possível glioblastoma ou astrocitoma grau IV), bem como (2) a morfologia bifásica apresentada pelas células de cultura (ao microscópio de contraste de fase) e pelo xenoenxerto.

É fundamental para a validação da linhagem NG97 enquanto modelo de glioma, a apresentação de evidências que comprovem sua natureza glial. A perda de características gliais e/ou o desenvolvimento de diferenciação divergente podem limitar e até mesmo impedir qualquer generalização de resultados baseados em estudos de fisiopatologia ou de teste terapêutico que utilizem a linhagem NG97 como protótipo de glioma. Assim sendo, neste estudo, a manutenção do fenótipo glial, bem como o desenvolvimento de características divergentes foram investigados utilizando a pesquisa de marcadores imunoistoquímicos e análise ultraestrutural.



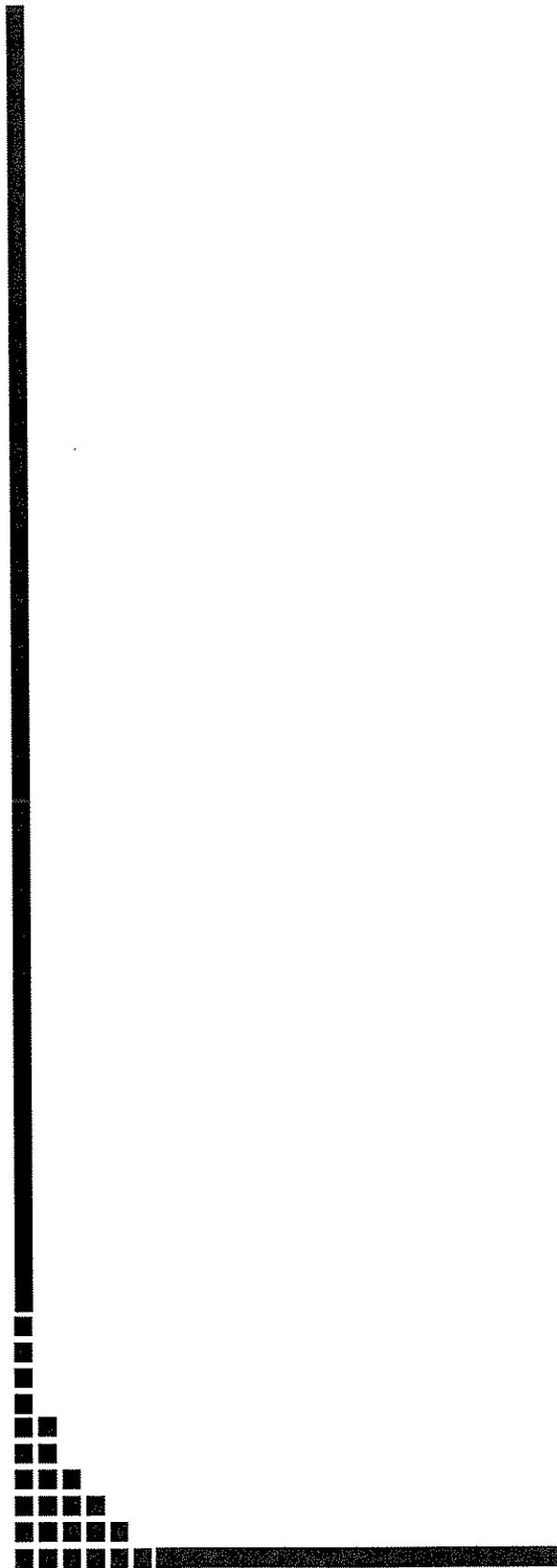
## **OBJETIVOS**

### ***Objetivo geral***

Verificar a manutenção de características gliais na linhagem NG97 (células de cultura e heterotransplante), por meio de imunofenotipagem e análise ultraestrutural, pesquisando em paralelo a ocorrência de diferenciação divergente e/ ou contaminação celular.

### ***Objetivos específicos***

1. Revisar as características clínico-evolutivas, imagenológicas e imunomorfológicas do tumor original (parental), com o intuito de re-classificá-lo (re-graduá-lo) segundo os critérios da OMS.
  2. Determinar o perfil imunoistoquímico do glioma maligno que originou a linhagem NG97 (tumor parental) através da frequência e intensidade de positividade para antígenos relacionados a diferentes classes ontogenéticas.
  3. Utilizando o mesmo painel de anticorpos e parâmetros de análise, determinar o perfil imunocitoquímico e imunoistoquímico da linhagem NG97 (*i.e.*, das células em cultura e do heterotransplante, respectivamente).
  4. Descrever as principais diferenças imunofenotípicas entre o tumor original, células NG97 em cultura e xenoenxerto.
  5. Discriminar as diferenças imunofenotípicas entre as subpopulações celulares da linhagem (células redondas X fusiformes/dendríticas).
  6. Pesquisar a presença de características ultraestruturais sugestivas de diferenciação glial e/ou indicativas de diferenciação divergente/ contaminação celular no xenotransplante da linhagem NG97.
-



**MATERIAL E  
MÉTODOS**

## DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de caráter descritivo.

### **OBTENÇÃO DO TECIDO TUMORAL E DA LINHAGEM CELULAR NG97: RESUMO DO PROCEDIMENTO DESCRITO POR GRIPPO *et al.* (2001)**

O espécime tumoral foi gentilmente fornecido pelo Departamento de Neurocirurgia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, HC-Unicamp, imediatamente após sua exérese, ocorrida em julho de 1997. Durante este procedimento cirúrgico diagnóstico, o tumor - um glioma maligno - foi parcialmente ressecado do lobo temporal direito de um paciente masculino (N.G.) de 66 anos de idade.

Parte do material assim obtido foi enviada para o Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia – Unicamp, para o desenvolvimento da linhagem celular glial maligna NG97.

O restante do espécime foi enviado, como de costume, para o Departamento de Anatomia Patológica do HC-Unicamp, para exame histopatológico de rotina, o qual revelou uma neoplasia hiper celular, composta de astrócitos com atipia citológica leve a moderada, esparsas figuras de mitose (sem proliferação vascular ou necrose), então classificada como um astrocitoma anaplásico (astrocitoma grau III, OMS).

A fim de ser cultivado, o tumor foi seccionado em fragmentos de 1 a 2 mm aproximadamente. Estes foram dispostos no fundo de frascos plásticos Falcon (25 cm<sup>2</sup>) contendo 5mL de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos da América), complementado com soro fetal bovino (SFB) inativado a 20% (Nutricell Campinas, SP, Brasil), 500UI de penicilina G (100UI/mL) e 500ug de estreptomicina (100 ug/mL).

A cultura foi incubada a 37°C em atmosfera umidificada, com 5% de CO<sub>2</sub>. Quando a cultura primária atingiu confluência, as células foram transferidas para outro frasco, mediante tratamento com tripsina a 0,05% e EDTA a 0,02% (GIBCO BRL, Edinburgh,

---

Escócia), e mantidas no mesmo meio. Em seguida, as culturas foram submetidas seqüencialmente ao mesmo procedimento, configurando cada transferência, uma "passagem" ou "repique". Foram obtidas cerca de 120 passagens. Grandes quantidades de células NG97 foram congeladas rotineiramente em várias passagens diferentes e estocadas em soro fetal bovino contendo sulfóxido de dimetila a 1% (DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos da América), a  $-80^{\circ}\text{C}$  em nitrogênio líquido, para utilização posterior.

### MANUTENÇÃO E PREPARO DA LINHAGEM

Atualmente, quando necessário, as passagens de interesse são descongeladas e transferidas para garrafas de cultura de células ( $75\text{ cm}^2$ ) contendo meio de crescimento (RPMI 1640) suplementado com SFB 5%, 0,5 mg/mL de glutamina e antibióticos (100 $\mu\text{g/l}$  de penicilina, 100mg/l de estreptomicina e 50 $\mu\text{g/mL}$  de neomicina).

As culturas são incubadas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ , em atmosfera úmida de ar e 5% de  $\text{CO}_2$ . As células são "repicadas" duas vezes por semana utilizando-se tripsina (0,05%) e EDTA (0,02%) (GIBCO BRL, Grand Island, NY, Estados Unidos da América).

Freqüentemente as culturas são testadas para detecção de micoplasma e novas amostras são estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , em nitrogênio líquido, conforme descrito acima, para uso posterior (a viabilidade após o descongelamento permanece entre 93 e 98%). O estoque localiza-se no Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia – Unicamp.

Para o experimento proposto, selecionamos duas amostras referentes às passagens "33" (P33) e "16" (P16). Uma vez selecionadas as passagens, suas células foram descongeladas, novamente semeadas em meio de cultura e cultivadas até fornecerem material suficiente para a realização de todos os estudos imunocitoquímicos, bem como para o xenoenxerto em camundongos atímicos congênicos (*nude*) previamente preparados para esta finalidade.

## CRESCIMENTO DA LINHAGEM NG97 “*in vivo*” (HETEROTRANSPLANTE OU XENOENXERTO HETEROTÓPICO)

Animais atímicos congênitos (nu/nu) da linhagem C3H/Uni (animais *nude*)<sup>1</sup>, de ambos os sexos (n= 6), e com 8 semanas de idade foram obtidos do Cemib/Unicamp, transferidos para o biotério do Departamento de Imunologia e Microbiologia do Instituto de Biologia – Unicamp e mantidos em isoladores flexíveis tipo TREXLER com água e rações estéreis fornecidas *ad libitum*, sob temperatura constante de 20° C a 25° C e com um ciclo de fotoperíodo de 12/12 horas.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos:

- *Naive* (N= 2): animais que não sofreram qualquer manipulação cirúrgica, servindo como um controle para o desenvolvimento espontâneo de neoplasia.
- Experimental 1 (N= 2): animais submetidos à injeção s.c. de células da linhagem NG97 ( $1 \times 10^6$ ), referentes à passagem P33.
- Experimental 2 (N= 2): animais submetidos à injeção s.c. de células da linhagem NG97 ( $1 \times 10^6$ ), referentes à passagem P16.

As inoculações de células tumorais foram realizadas com técnica asséptica, *i.e.*, após tricotomia de uma área de  $1\text{cm}^2$ , limpeza com solução tópica de iodopovidona a 10% (PVPI) e colocação de campos estéreis, em local previamente desinfetado e de pouco trânsito, no Departamento de Microbiologia e Imunologia, Unicamp.

O crescimento da massa tumoral “*in vivo*” foi acompanhado três vezes por semana. A cada avaliação o volume tumoral foi determinado segundo a equação  $V = \pi (a \times b \times c) / 6\text{cm}^3$ , onde a, b e c correspondem aos três maiores eixos perpendiculares do tumor. Após atingirem o volume de  $2\text{cm}^3$ , ou quando os animais apresentaram sinais clínicos de caquexia, os tumores foram removidos, processados e encaminhados a exame histopatológico e imunoistoquímico.

Para a ressecção dos tumores, os animais foram anestesiados com uma mistura de Ketamina (Ketalar®, 20mg/mL; Parke-Davis, São Paulo, Brasil) e Xilazina (Rompun®, 0,3mg/mL; Bayer, São Paulo, Brasil), diluídas em salina e administradas i.p. na dose de

---

<sup>1</sup> Vide descrição sumária sobre este modelo animal no Anexo 2.

0,07mL/10g de peso corporal. Após a exérese do tumor, os animais experimentais foram sacrificados por deslocamento cervical. Os animais *Naive* também sofreram eutanásia por deslocamento cervical, sob anestesia, no mesmo dia de seus respectivos pares experimentais.

Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e encaminhados à aprovação pela Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, bem como pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia (IB) da Unicamp.

## IMUNOFENOTIPAGEM

### *Marcadores de histogênese*

A determinação das propriedades imunofenotípicas da linhagem celular NG-97 foi realizada através dos métodos imunocitoquímico e imunoistoquímico. Esta determinação procurou contemplar não apenas a confirmação de características gliais como também a pesquisa de possível diferenciação divergente. Para tanto, fez-se necessária a realização de um amplo painel de anticorpos:

#### ▪ **Marcadores neurais/ neurogliais**

- **Anti-GFAP: anti-proteína ácida fibrilar glial** (anticorpo policlonal de coelho anti-GFAP de vaca). Imunógeno: GFAP isolada de medula espinhal de vaca. Apresentação: fração imunoglobulina purificada a partir do anti-soro de coelho, com título de anticorpos inferior a 10%. Especificidade: reage fortemente com GFAP humana e de outras dez espécies (gato, galinha, vaca, cobaia, hamster, canguru, macaco, camundongo, rato e carneiro). Fornecedor: DAKOCYTOMATION (DAKO), Carpenteria, Califórnia, Estados Unidos da América

(código: Z0334). Diluição preconizada: 1:100-1:500 (utilizada: 1:100).

- **Anti-vimentina** (anticorpo monoclonal murino anti-vimentina).  
Imunógeno: vimentina purificada de cristalino porcino. Clone:V9.  
Apresentação: 190mg/E de IgG murina. Especificidade: este clone reconhece a vimentina, uma proteína de 57kD presente em células gliais (imaturas, reacionais e neoplásicas) e células de origem mesenquimatosas. Fornecedor: DAKO (código: M0725). Diluição preconizada: 1:10-1:50 (utilizada: 1:10).
  
  - **Anti-proteína S-100** (anticorpo policlonal de coelho anti-vaca).  
Imunógeno: S-100 isolado de cérebro de vaca. Apresentação: título de anticorpos de 95mg/L. Especificidade: reage fortemente com S-100 humana (reação cruzada), uma proteína expressa em glia, estruturas neurais e células melanocíticas. Fornecedor: DAKO (código: Z0311). Diluição preconizada: 1:200-1:400 (utilizada: 1:200).
  
  - **Anti-NSE: anti-enolase neurônio-específica** (anticorpo monoclonal murino anti-enolase neurônio-específica humana). Imunógeno: gama-gama enolase purificada de cérebro humano. Clone: BBS/NC/VI-H14. Apresentação: 430µg/mL de IgG murina. Especificidade: este clone reconhece a enolase gama-gama. Fornecedor: DAKO (código: M873). Diluição preconizada: 1:100-1:200 (utilizada: 1:100).
  
  - **Anti-Leu-7** (anticorpo monoclonal murino anti-natural killer cell-like humana). Imunógeno: linfócitos sanguíneos periféricos. Clone: NK1. Apresentação: 388µg/mL de IgG murina. Especificidade: este clone reconhece um antígeno linfocitário resistente à fixação com
-

formalina (CD57), expresso também em nervos periféricos. Fornecedor: DAKO (código: M1014). Diluição preconizada: 1:50-1:75 (utilizada: 1:50).

- **Anti-HMB45<sup>2</sup>** (anticorpo monoclonal murino anti-melanoma humano). Imunógeno: extrato de metástases linfonodais de melanoma pigmentado. Clone: HMB45. Apresentação: 64µg/mL de IgG murina. Especificidade: este clone reconhece uma cadeia oligossacarídica lateral, neuraminidase sensível, de um glicoconjugado presente em melanossomos imaturos (Fornecedor: DAKO (código: M0634). Diluição preconizada: 1:10-1:50 (utilizada: 1:50).

#### ▪ **Marcadores neuronais**

- **Anti-neurofilamento** (anticorpo monoclonal murino anti-neurofilamento humano). Imunógeno: neurofilamento purificado de cérebro humano. Clone: 2F11. Apresentação: 345g/L de IgG murina. Especificidade: este clone reconhece os componentes de 200kD e 70kD das três principais subunidades polipeptídicas dos neurofilamentos, os quais estão presentes em neurônios normais e nas principais neoplasias com diferenciação neuronal. Fornecedor: DAKO (código: M0762). Diluição preconizada: 1:50-1:100 (utilizada: 1:50).
- **Anti-cromogranina** (anticorpo de coelho anti-cromogranina A humana). Imunógeno: metade C-terminal de cromogranina A purificada de urina de pacientes com síndrome carcinóide. Apresentação: concentração protéica de 3.6g/L. Especificidade: este

---

<sup>2</sup> Incluímos este anticorpo no grupo dos marcadores neurais, dada a sua especificidade no diagnóstico do melanoma, uma neoplasia maligna de melanócitos, *i.e.*, em última análise, células derivadas da crista neural.

anticorpo reage à cromogranina A (porção C-terminal). Fornecedor: DAKO (código: A0430). Diluição preconizada: 1:50-1:100 (utilizada: 1:50).

- **Anti-sinaptofisina** (anticorpo de coelho anti-sinaptofisina humana). Imunógeno: sinaptofisina humana sintética acoplada com ovalbumina. Apresentação: concentração protéica de 0,3g/L. Especificidade: reconhece uma seqüência peptídica hidrofílica selecionada da seqüência de amino-ácidos deduzida da sinaptofisina. Fornecedor: DAKO (código: A0010). Diluição preconizada: 1:50-1:100 (utilizada: 1:50).

▪ **Marcadores epiteliais**

- **Anti-AE1AE3** (anticorpo monoclonal murino anti-citoqueratina humana). Imunógeno: queratina epidérmica humana. Clones: AE1 e AE3. Apresentação: 87µg/mL de IgG murina. Especificidade: o clone AE1 reconhece as citoqueratinas (cks) da subfamília ácida (*i.e.*, cks de 56,5, 50, 50', 48 e 40 kD) ao passo que o clone AE3 reconhece as citoqueratinas da subfamília básica (citoqueratinas de 65-67, 64, 59, 58, 52 kD). Fornecedor: DAKO (código: M3515). Diluição preconizada: 1:50 (utilizada: 1:50).
  - **Anti-35βH11/ck8** (anticorpo monoclonal murino anti-citoqueratina 8 humana, ou citoqueratina de baixo peso molecular). Imunógeno: extrato de citoesqueleto de Hep3B (uma linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano). Clone: 35βH11. Apresentação: 511µg/mL de IgG murina. Especificidade: este clone reconhece uma proteína de 54kD correspondente à ck8, presente em todos os
-

epitélios não escamosos. Fornecedor: DAKO (código: M631).  
Diluição preconizada: 1:25-1:50 (utilizada: 1:50).

- **Anti-34βE12** (anticorpo monoclonal murino anti-citoqueratina humana, ou citoqueratina de alto peso molecular). Imunógeno: queratina solubilizada extraída de extrato córneo humano. Clone: 34βE12. Apresentação: 55μg/mL de IgG murina. Especificidade: este clone identifica proteínas de 66 e 57kD extraídas de extrato córneo, reagindo principalmente com epitélios escamosos e ductais, quer sejam normais ou neoplásicos (*e.g.*, mama, pâncreas, ductos biliares, etc.). Fornecedor: DAKO (código: M0630). Diluição preconizada: 1:50 (utilizada: idem).

- **Marcadores mesenquimatosos**

- **Anti-desmina** (anticorpo monoclonal murino anti-desmina humana). Imunógeno: desmina purificada de músculo humano. Clone: D33. Apresentação: 220mg/L de IgG murina. Especificidade: este clone reconhece o filamento intermediário desmina de 53kD presente em células musculares e em tumores derivados tanto de músculo liso quanto de músculo estriado. Fornecedor: DAKO (código: M0760). Diluição preconizada: 1:50-1:100 (utilizada: 1:50).
- **Anti-1A4: anti-actina de músculo liso humana** (anticorpo monoclonal murino anti-actina de músculo liso humana). Imunógeno: decapeptídeo sintético N-terminal da actina α de músculo liso. Clone: 1A4. Apresentação: 90g/L de IgG murina. Especificidade: este clone reconhece a actina de músculo liso humana. Fornecedor: DAKO (código: M0851). Diluição preconizada: 1:50-1:100 (utilizada: 1:50).

- **Anti-HHF35, actina muscular específica** (anticorpo monoclonal murino anti-actina muscular humana). Imunógeno: uma fração protéica do miocárdio. Clone: HHF35. Apresentação: 50µg/mL de IgG murina. Especificidade: este clone reconhece uma proteína de 42 kD, presente em preparações purificadas de músculo esquelético, aorta, útero, diafragma e coração, não reagindo com actinas de origem não-muscular. Fornecedor: DAKO (código: M0635). Diluição preconizada: 1:50 (utilizada: idem).
  
- **Anti-MyoD1** (anticorpo monoclonal murino anti- MyoD1). Imunógeno: proteína MyoD1 murina do tipo selvagem recombinante. Clone: 5.8A. Apresentação: 1035 µg/mL de IgG murina. Especificidade: a proteína MyoD1 é uma fosfoproteína nuclear de 45kD que induz a miogênese através da ativação transcripcional de genes músculo-específicos. A expressão nuclear desta proteína é característica de músculo esquelético, sendo um marcador sensível de diferenciação miogênica. Fornecedor: DAKO (código: M3512). Diluição preconizada: 1:50-1:75 (utilizada: 1:50).

▪ **Marcadores linfóides/ hemopoiéticos:**

- **Anti-CD34** (anticorpo monoclonal murino anti-CD34 humano, classe II). Imunógeno: endotélio isolado de vênulas humanas. Clone: QBEnd 10. Apresentação: 50mg/L de IgG murina. Especificidade: este clone reconhece células KG-1a (uma linhagem celular primitiva de leucemia mielóide), bem como células endoteliais capilares. Fornecedor: DAKO (código: M7165). Diluição preconizada: 1:25-1:50 (utilizada: 1:50).
-

- **Anti-CD45** (anticorpo monoclonal murino anti-antígeno leucocitário comum humano). Imunógeno: linfócitos periféricos humanos mantidos em fator de crescimento para célula T (clone PD7/26/16) e células de linfoma T (clone 2B11). Clones: PD7/26/16 e 2B11. Apresentação: 273µg/mL de IgG murina. Especificidade: este clone reconhece o chamado antígeno leucocitário comum (família de 5 ou mais glicoproteínas de alto peso molecular presentes na maioria dos leucócitos humanos). Fornecedor: DAKO (código: M701). Diluição preconizada: 1:50-1:200 (utilizada: 1:50).
  
- **Anti-CD20** (anticorpo monoclonal murino anti-célula B humana). Imunógeno: células B de tonsilas humanas. Clone: L26. Apresentação: 3550g/L de IgG murina. Especificidade: este clone reconhece um polipeptídeo de 33kD presente em células B, relacionado ao antígeno CD20. Fornecedor: DAKO (código: M0755). Diluição preconizada: 1:50-1:100 (utilizada: 1:50).
  
- **Anti-CD68** (anticorpo monoclonal murino anti-macrófago humano). Imunógeno: grânulos lisossomais de macrófagos pulmonares humanos. Clone: KP1. Apresentação: 360mg/L de IgG murina. Especificidade: este clone reconhece macrófagos de uma grande variedade de tecidos. Fornecedor: DAKO (código: M0814). Diluição preconizada: 1:50-1:100 (utilizada: 1:50).

### ***Preparo do material citológico***

Ao atingirem semi-confluência, as culturas referentes às passagens selecionadas foram tripsinizadas (tripsina a 0,05% e EDTA a 0,02% [GIBCO BRL, Edinburgh, Escócia]) a fim de liberar as células aderidas na superfície dos frascos.

A solução de tripsina foi então neutralizada com meio de cultura (RPMI 1640, complementado com soro fetal bovino inativado a 20%) e a mistura, centrifugada por 10 minutos a 150X g, em um frasco de 50mL.

Descartado o sobrenadante, o "pellet" foi ressuspensado em uma solução salina balanceada de 0,5mL, acertando-se o número de células para  $10^5$  células/mL. Células contidas em 100 $\mu$ L foram assentadas em lâminas previamente tratadas com poli-Lysina, utilizando citocentrífuga por 7 minutos a 150X g. As lâminas assim obtidas foram imersas em acetona 100% a 4°C, por 5 minutos, para fixação. O processo foi repetido até a obtenção de amostras suficientes para todas as análises.

Todas as lâminas foram então identificadas e transferidas para um recipiente apropriado o qual foi conservado em ambiente refrigerado a  $-27^{\circ}\text{C}$ , até o momento da realização da reação imunocitoquímica. Foram realizadas, para cada marcador, duas lâminas citológicas. Lâminas suplementares foram reservadas para o propósito de controle negativo (duas lâminas por bateria de colorações). Finalmente, do total de lâminas realizadas, duas foram aleatoriamente selecionadas e coradas em hematoxilina-eosina (HE), para revisão das principais características morfológicas.

### ***Preparo do material histológico***

Uma vez ressecada, a lesão tumoral foi seccionada imediatamente em fatias com espessura máxima de 0,2cm as quais foram fixadas em formaldeído a 10% tamponado (pH 7.4-7.6), por um período inferior a 24 horas.

Após a fixação, o material foi processado automaticamente em aparelho histotécnico (*i.e.*, submetido a desidratação, diafanização e impregnação por parafina, por meio de banhos consecutivos de álcoois em concentrações crescentes, xilol e parafina), sendo finalmente incluído em blocos de parafina.

Secções de 4 $\mu$ m, realizadas a partir destes blocos, foram colocadas em lâminas previamente lavadas, desengorduradas e tratadas com solução de organossilano a 25% em acetona (3-aminopropil-trietoxi-silano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos

---

da América; cod. A3648). As lâminas com os cortes foram deixadas à temperatura ambiente até o momento da reação imunoistoquímica.

Cortes histológicos de 4µm também foram obtidos a partir dos blocos de parafina que continham o tumor original e submetidos ao mesmo protocolo. Estes blocos são mantidos atualmente no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica, FCM - Unicamp.

Foram realizadas, para cada marcador/entidade, duas lâminas histológicas. Um estoque de lâminas suplementares foi reservado para o propósito de controle negativo (duas lâminas por bateria de colorações). Além disso, do total de lâminas realizadas, duas foram aleatoriamente selecionadas de cada entidade e coradas em hematoxilina-eosina (HE), para revisão das principais características morfológicas.

Cumpra aqui mencionar que a revisão dos achados morfológicos do tumor parental revelou um astrocitoma com características limítrofes entre um grau II e um grau III, OMS (vide “Resultados”, para pormenores). Com o intuito de melhor precisar a graduação histológica deste tumor, procedemos à revisão do prontuário (visando o levantamento de dados clínico-evolutivos e radiológicos), bem como à determinação do índice de proliferação celular através do marcador imunoistoquímico Ki67 (clone Ki-S5, DAKO, código M7187; 1:50).

### ***Reação de imunoperoxidase em material citológico (imunocitoquímica)***

O anticorpo primário foi gotejado sobre o preparado citológico na diluição adequada e incubado durante o dia (*overday*), por 2 horas a temperatura ambiente.

Após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS, sob agitação, secadas e incubadas com *EnVision Labeled Polymer Component* (DAKOCYTOMATION, Carpenteria, Califórnia, Estados Unidos da América) por uma hora a 37° C. Terminada a incubação, foram realizadas três lavagens em PBS, sob agitação.

Para a revelação da reação foi utilizado um substrato cromogênico - a solução DAB (tetraidroclorato de 3-3'-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos da América) na proporção de 0,06g para 100mL de PBS-, 500µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 20

volumes e 1mL de DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos da América), por cinco minutos a 37° C.

O material foi lavado em água corrente e contracorado com hematoxilina de Mayer durante 30 a 60 segundos. As lâminas foram desidratadas em banhos de álcool etílico em concentrações crescentes, e encaminhadas a três banhos de xilol, para em seguida serem montadas em lamínulas e resina Entellan<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Preparados citológicos correspondentes (*i.e.*, extraídos da mesma passagem ou repique de cultura) sem o anticorpo primário foram utilizados como controles negativos. Os diferentes anticorpos, seus padrões de positividade esperados e respectivos controles positivos encontram-se resumidos no **Apêndice 1**.

#### ***Reação de imunoperoxidase em material histológico (imunoistoquímica)***

As secções foram desparafinizadas em banho de xilol previamente aquecido em estufa a 110° C e, a seguir, em banhos subseqüentes de xilol à temperatura ambiente. Logo após este processo, as lâminas foram hidratadas em álcool etílico nas concentrações decrescentes de 100%, 80% e 50% e lavadas em água corrente e destilada.

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por meio de três banhos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 10 volumes cada um, com duração de cinco minutos, seguidos de lavagens em PBS.

Para recuperação antigênica foi utilizada uma panela a vapor T-fall, com o objetivo de desmascarar os antígenos. As lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio, em pH 6,0 durante 30 minutos a 95° C e, a seguir, lavadas em água corrente.

Após a recuperação do antígeno, procedeu-se exatamente como o descrito no item anterior (“Reação de imunoperoxidase em material citológico”).

Secções correspondentes do heterotransplante e do tumor original, não incubadas com o anticorpo primário, foram utilizadas como controles negativos. Os diferentes anticorpos, seus padrões de positividade esperados e seus respectivos controles positivos encontram-se resumidos no **Apêndice 1**.

---

## ANÁLISE DE DADOS

### *Análise quantitativa*

Imagens representativas das colorações realizadas no tumor original e passagem P33 da linhagem NG97 (HE e reações imunoquímicas) foram obtidas utilizando uma câmera CCD Olympus Oly-200 (Olympus, Melville, NY, Estados Unidos da América) adaptada a um microscópio Olympus BX51 (Olympus, Melville, NY, Estados Unidos da América), equipado com uma objetiva de 40X (abertura numérica de 0.65). As imagens foram adquiridas e estocadas no formato *Bitmap* (BMP). A frequência de células positivas bem como a intensidade da reação foram avaliadas utilizando o programa de análise de imagens Imagelab 2000<sup>®</sup> (versão 2.4), que permite a contagem e segmentação manual de células e áreas (**Fig. 2**).

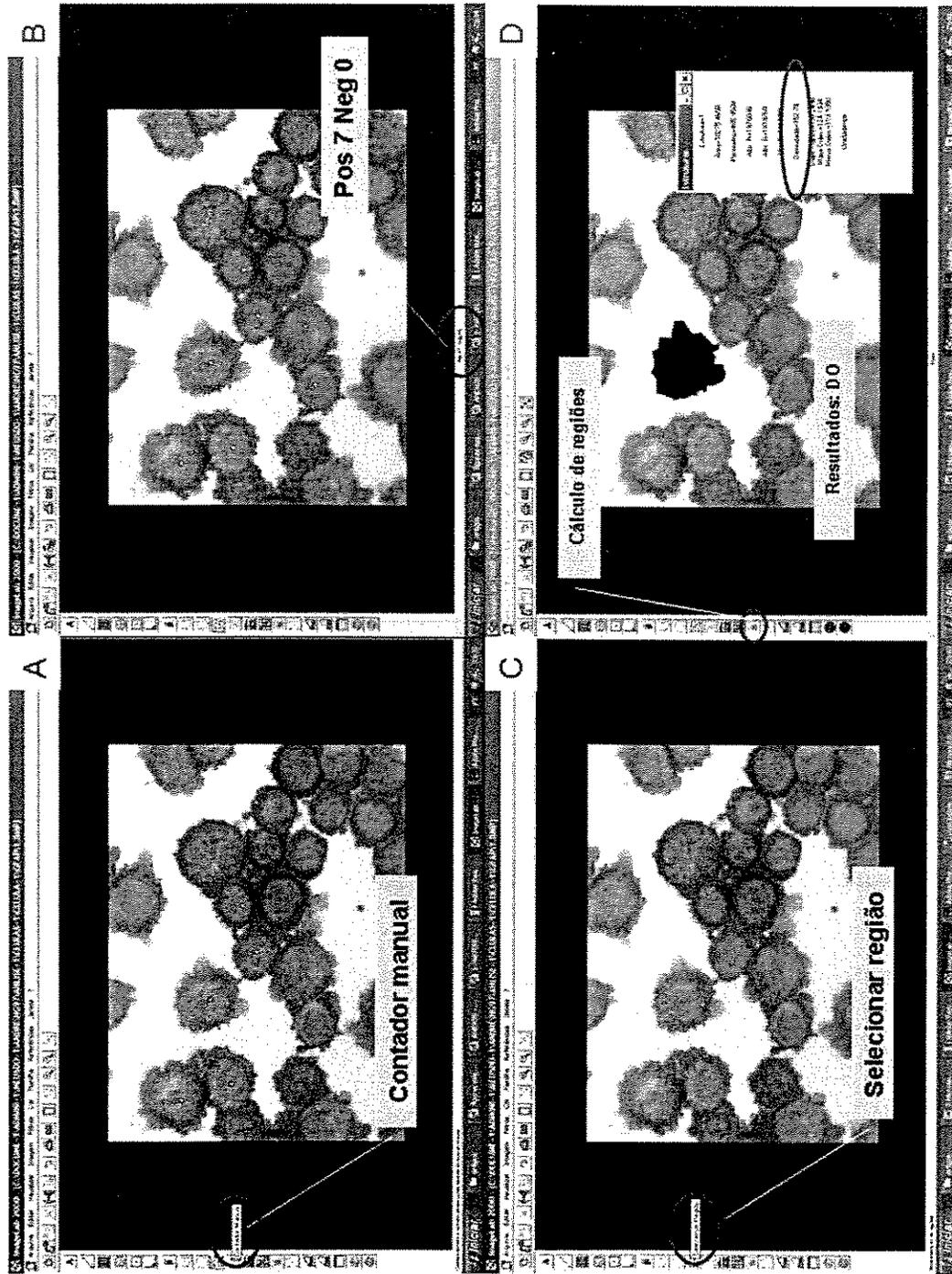


Figura 2.  
Imagens

demonstrativas do programa Imgelab® 2000 (versão 2.4): contagem de células (A e B) e mensuração de intensidade de positividade (C e D).

A frequência de células positivas foi determinada em 500 células aleatoriamente contadas em áreas de maior positividade (“hotspots”), em ambas as lâminas realizadas para cada marcador/entidade. O número de imagens necessárias a fim de se obter 500 células variou conforme a entidade (tumor original, células de cultura e xenoenxerto) e o marcador analisados. No caso do xenotransplante, do total de 500 células contadas para cada marcador, foram discriminadas ainda as frequências relativas de positividade dentro das subpopulações de células redondas e fusiformes/dendríticas. A fim de complementar a revisão morfológica, a frequência de células redondas e fusiformes em 500 células contadas em cortes HE do xenotransplante também foi determinada utilizando a ferramenta de contagem manual do programa Imagelab 2000® (versão 2.4).

Com relação ao cálculo da intensidade de reação, foram selecionadas, para cada entidade, cinco imagens contendo o maior número possível de células positivas. Este número variou entre 1 a 100 células/imagem, dependendo da entidade e do marcador avaliados. Em cada uma destas imagens, a intensidade de coloração foi mensurada em unidades de densidade óptica média do pixel (DO), dentro de uma escala de 1 (escuro ao máximo) a 256 (claro ao máximo).

Em resumo, para o cálculo da DO, as células positivas presentes em cada imagem foram “isoladas” utilizando a ferramenta de segmentação manual do programa de análise de imagens. Uma vez isoladas, a DO deste conjunto de células foi mensurado automaticamente através da ferramenta “Cálculo de Regiões”. Em seguida, calculou-se a média das DOs obtidas em cinco imagens de cada lâmina, visando obter-se um valor único de DO para cada entidade.

Com o intuito de remover variações inespecíficas de densidade (*i.e.*, reação de fundo), a DO referente a intensidade de positividade em cada entidade foi normalizada em relação a DO média de áreas negativas também selecionadas em cinco imagens diferentes, para cada entidade. Este procedimento de normalização envolveu a seguinte fórmula:

$$DON = DO_{neg} - DO_{pos}, \text{ onde}$$

**DON** significa densidade óptica média normalizada, **DO<sub>neg</sub>** se refere à densidade óptica média de áreas negativas (em cinco imagens selecionadas) e **DO<sub>pos</sub>**, à densidade óptica média de áreas positivas (em cinco imagens selecionadas). Como as reações imunoquímicas foram realizadas em duplicata, para cada lâmina analisada, calculamos uma

DON. Assim, para cada marcador/entidade, a DON final foi expressa em média  $\pm$  desvio padrão das duplicatas.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS<sup>®</sup> para Windows (versão 8.0). Diferenças na frequência de células positivas entre as entidades e entre os subtipos celulares (células redondas X fusiformes) foram analisadas pelo Qui-quadrado. Diferenças de intensidade de positividade entre entidades e tipos celulares foram avaliadas pela ANOVA (análise de variância). Um valor de *P* inferior a 0,05 foi considerado como estatisticamente significativo.

### *Validade interna do estudo*

Mutações espontâneas levando a alterações fenotípicas aleatórias são observadas em muitas culturas de células, desde as primeiras descrições de cultivo celular (**Langdon, 2003b**). Trata-se de um fenômeno esperado, isto é, com probabilidade crescente de incidência ao longo de sucessivos subcultivos (**Rossmann et al, 1995**), embora imprevisível cronologicamente (não se pode prever se ocorrerá, nem em que passagem ele se manifestará).

A variação fenotípica no decorrer do cultivo seriado representa um dos parâmetros de estabilidade de uma linhagem, de grande relevância para a reprodutibilidade de estudos baseados em linhagens celulares (vide Introdução). Dependendo da intensidade ou do efeito cumulativo, tais modificações fenotípicas (sejam morfológicas, bioquímicas, metabólicas, etc.) podem levar ocasionalmente ao nascimento de entidades biológicas diferentes entre si e muito distintas do tecido parental. Muitas vezes, contudo, estas variações são leves e desprezíveis do ponto de vista biológico, não comprometendo a consistência do modelo experimental.

Assim sendo, após procedermos à análise comparativa entre a linhagem NG97 e seu tumor parental, foi preciso avaliar a estabilidade desta linhagem ao longo de seu subcultivo, *i.e.*, pesquisar a ocorrência de discrepâncias fenotípicas entre as passagens selecionadas neste estudo (P16 e P33), que justificasse eventualmente a separação destas alíquotas de estocagem em entidades biológicas distintas. Como se estava à busca de diferenças

qualitativas grosseiras que pudessem invalidar as conclusões extraídas a partir da comparação tumor original X linhagem NG97, optou-se por uma abordagem qualitativa/semiquantitativa (e não uma abordagem quantitativa minuciosa).

Esta abordagem qualitativa/semi-quantitativa consistiu na classificação subjetiva da distribuição de células positivas nos “*hotspots*” em ausente (0%), focal ( $\leq 25\%$ ) ou difusa ( $>26\%$ ), e da intensidade da reação em ausente (0), leve (+), moderada (++) ou intensa (+++). Este procedimento foi realizado por dois patologistas independentes utilizando um microscópio óptico (diâmetro de campo de 490  $\mu\text{m}$ ). Os resultados discrepantes foram revisados em conjunto pelos mesmos patologistas, até a obtenção de um consenso.

## MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Após a exérese, parte dos produtos do xenoinxerto de células NG97 (P33) em camundongos *nude* foi seccionada em fragmentos de 1x1mm, que foram imersos em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído a 2,5% + paraformaldeído a 2%, em tampão cacodilato a 0,1M), por cerca de 24 horas, pós-fixados em tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) a 1% por duas horas, e deixados durante a noite em solução de acetato de uranila a 0,5 %. Os blocos foram desidratados em concentrações crescentes de acetona (30%, 30min; 50%, 15min; 70%, 15min; 90%, 15min; anidra I, 15min; anidra II, 15min) e incluídos em resina epóxida (Araldite<sup>®</sup>, Huntsman Advanced Materials, São Paulo, Brasil).

Cortes semi-finos de 1 $\mu\text{m}$  foram obtidos em ultramicrótomo, corados em azul de toluidina a 1% e examinados ao microscópio de luz com o intuito de selecionar campos de interesse para cortes ultrafinos. Estes foram obtidos com navalha de diamante, montados em grades de cobre, corados com citrato de chumbo e observados ao microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM10) do Departamento de Anatomia Patológica, HC-Unicamp, a 60kV.

Além de observar as características morfológicas gerais do heterotransplante (*i.e.*, variações de forma e tamanho das células e seus núcleos), pesquisou-se também a presença de filamentos intracitoplasmáticos, sendo estes caracterizados quanto ao diâmetro médio e classificados em microfilamentos (5-7nm) e filamentos intermediários (7-11nm). Foram

mensurados 50 filamentos, aleatoriamente selecionados, utilizando-se a ferramenta de cálculo de distâncias do programa Imagelab 2000® (versão 2.4) aplicada a eletromicrografias com magnificação final mínima de 200.000X. Estas haviam sido previamente digitalizadas com o scanner de mesa HP scanjet 7400C equipado com XPA (adaptador para digitalização de negativos) (Hewlett-Packard USA, Houston, TX, Estados Unidos da América), com resolução de 2400dpi.

**BIBLIOTECA CENTRAL  
DESENVOLVIMENTO  
COLEÇÃO  
UNICAMP**



## RESULTADOS

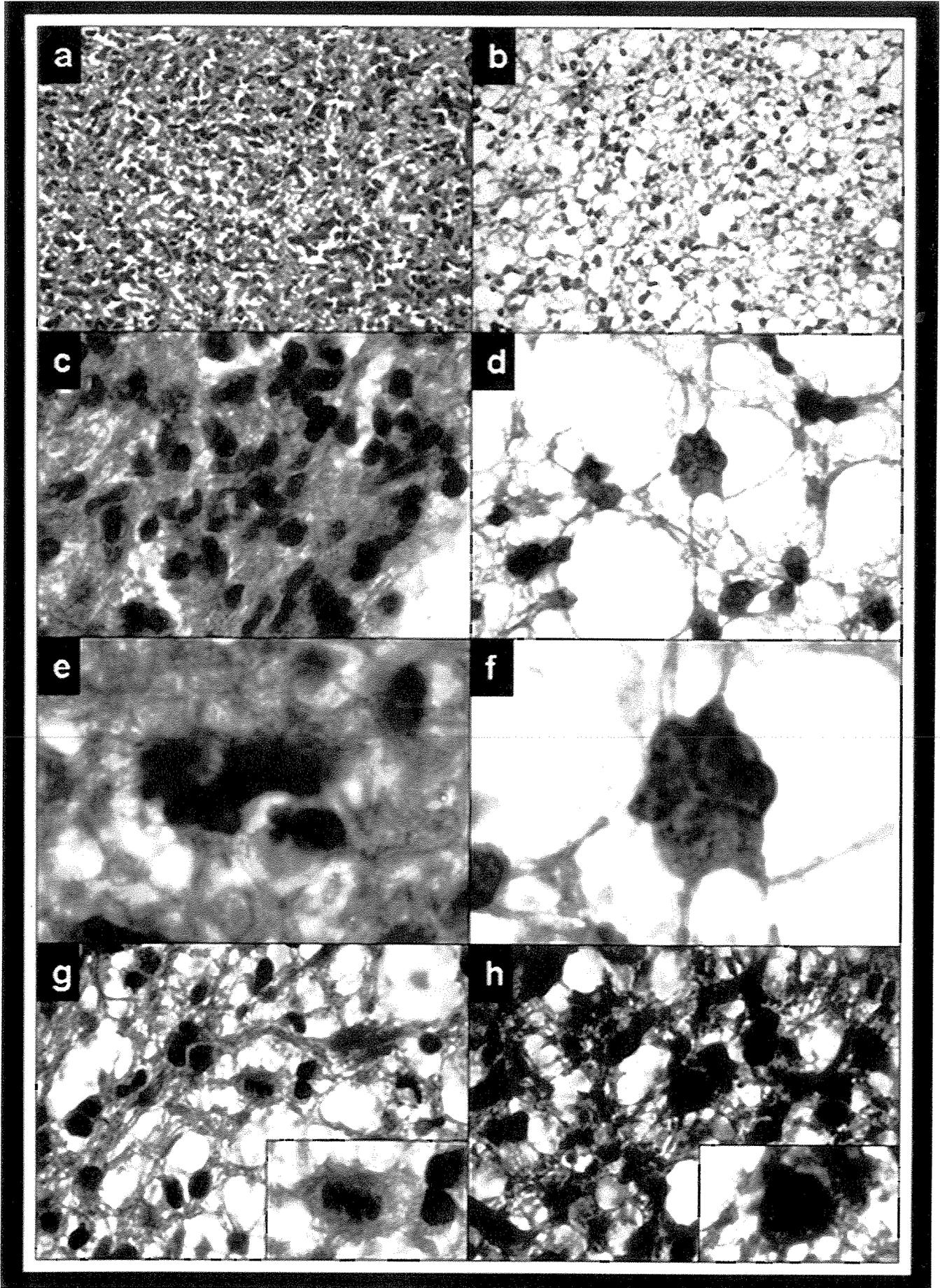
## IMUNOFENOTIPAGEM

### *Análise imunofenotípica quantitativa*

#### **Tumor original (ou parental)**

O exame dos cortes histológicos do glioma parental da linhagem NG97, corados em HE, revelou a presença de uma neoplasia predominantemente hipercelular, constituída por células semelhantes a astrócitos, com atipia nuclear leve a moderada, esparsas figuras de mitose, porém sem áreas de necrose ou neovascularização (**Fig. 3**). Notou-se que, embora a presença de atividade mitótica (5 figuras de mitose em 50 CGA) fosse compatível com um astrocitoma grau III OMS (diagnóstico assumido por **Grippio et al. [2001]**, no primeiro trabalho publicado sobre esta linhagem), a celularidade e a atipia nuclear eram mais sugestivas de um grau II, fato que levou a uma revisão de prontuário e à determinação do índice proliferativo, no presente trabalho.

A análise do prontuário revelou tratar-se de uma neoplasia de evolução rápida, associada ao aparecimento abrupto de alterações da fala, marcha e perda de controle esfínteriano, dois meses antes do diagnóstico, em um paciente sem antecedentes mórbidos prévios. Realizada a ressecção parcial do tumor, notou-se o desenvolvimento de afasia e hemiplegia esquerda. Após 20 meses e 27 dias do diagnóstico e tendo sido realizadas 32 sessões de radioterapia craniana bilateral com feixes de raios gama através de equipamento de cobalto (dose total de 5760cGy, em frações diárias de 180cGy), o paciente evoluiu a óbito.



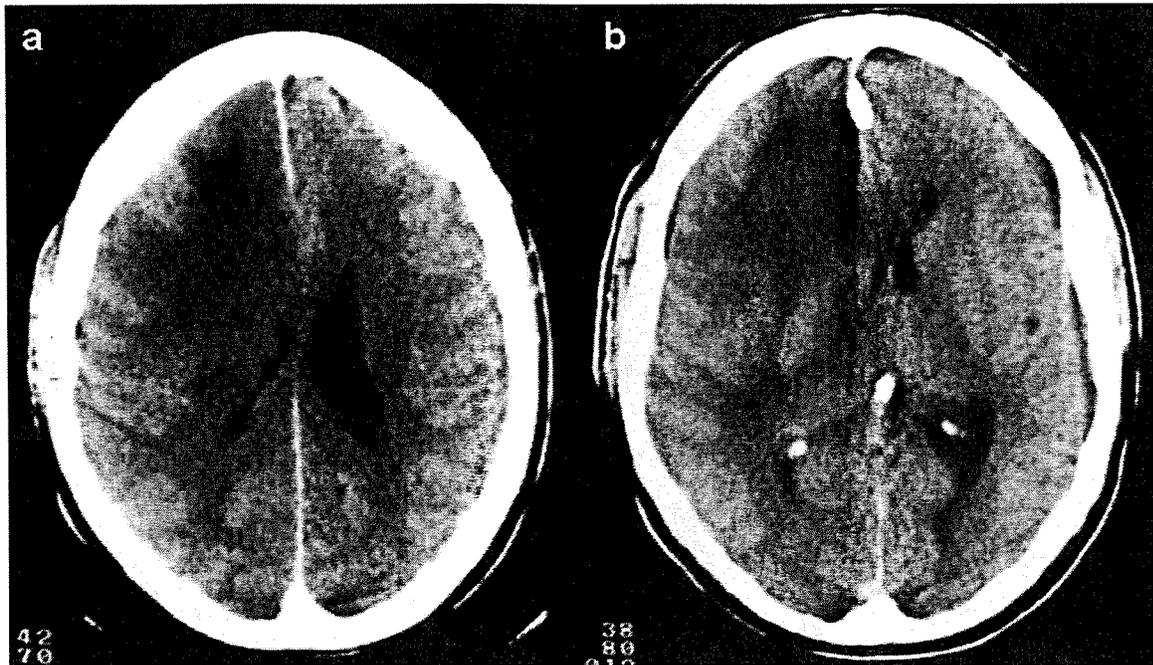
**BIBLIOTECA CENTRAL  
DESENVOLVIMENTO  
COLEÇÃO  
UNICAMP**

**Figura 3.** Fotomicrografias do tumor parental apresentando áreas mais celulares (a, c) alternadas com áreas de celularidade menos marcada e aspecto microcístico (b, d); atipia citológica leve a moderada na maior parte da amostra (c, d), exceto pela presença de raras células dotadas de núcleos bizarros (d, e, f). Presença de esparsas figuras de mitose (g, h). HE, aumentos originais: a, b= 200X; c, d= 400X; e, f= 1000X; g, h= 400X [pormenores= 1000X]).

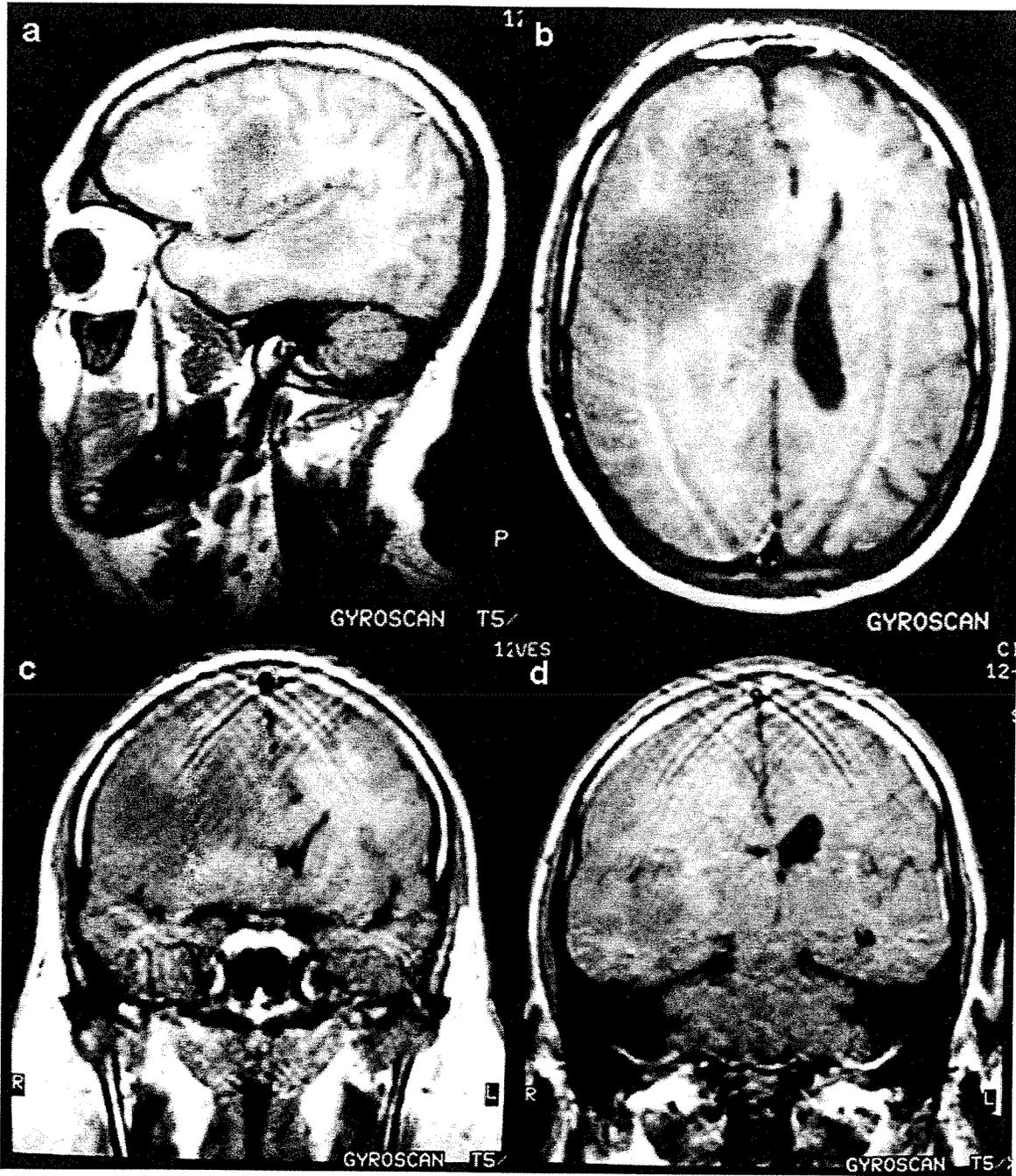
As imagens de tomografia computadorizada (cortes axiais antes e após infusão de contraste iodado) (**Fig. 4**) revelaram a presença de extensa área de hipotenuação desde a região fronto-temporal até a região parietal na convexidade direita, com evidente efeito de massa, desviando estruturas da linha média para o lado oposto e obliterando os ventrículos do mesmo lado. Não se demonstrou captação patológica de contraste na região descrita.

Nas imagens de ressonância magnética (obtidas com técnica de *spin-echo*, em seqüências ponderadas em T1, com e sem contraste i.v., e T2) (**Figs. 5 e 6**) observou-se uma volumosa lesão expansiva, irregular, de limites pouco precisos, apresentando hipossinal em T1 (**Fig. 5**) e hipersinal em T2 (**Fig. 6**). A tumoração era predominantemente subcortical, projetando-se na região fronto-têmporo-insular (**Fig.5a,b; 6a,b**), com extensão aos núcleos da base e discretamente ao corpo caloso à direita (**Fig.5c,d**). Além disso, comprimia o ventrículo lateral direito e o terceiro ventrículo, com desvio das estruturas ventro-medianas para a esquerda e apagamento de sulcos e fissuras em todo o hemisfério direito (**Fig. 5b-d; 6a**). Da mesma forma que nas imagens de tomografia computadorizada, não se observou impregnação anômala de contraste (**Fig.5b-d**).

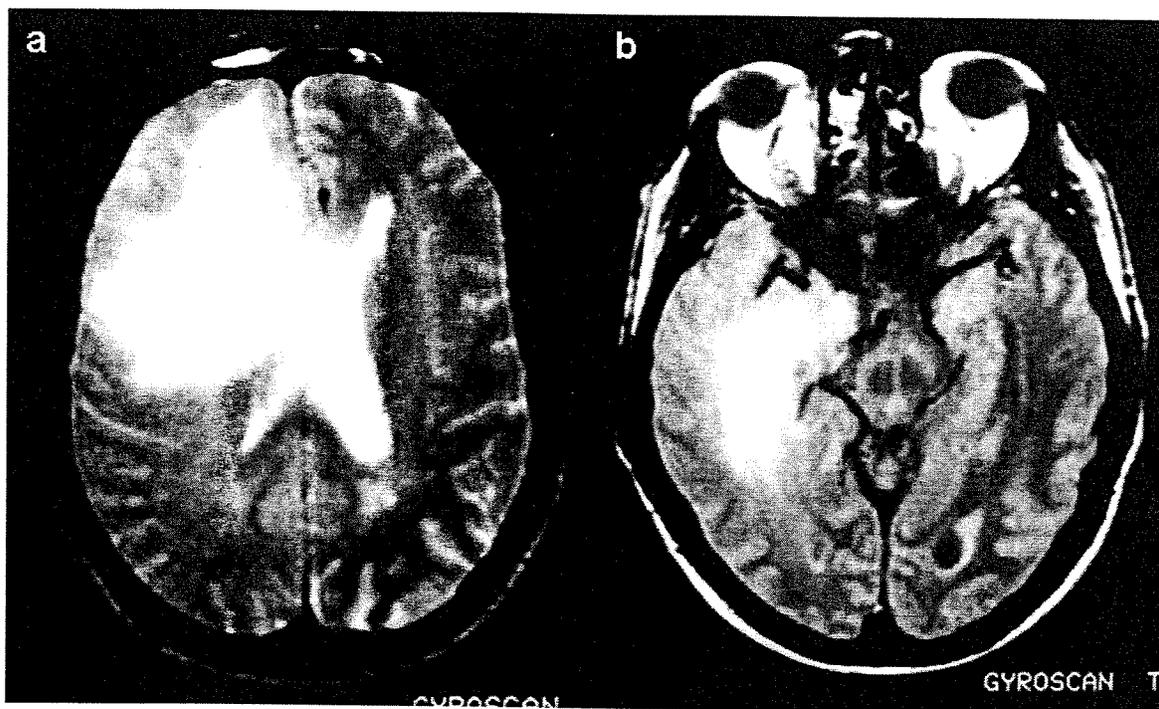
A imunomarcção do Ki67, por sua vez, revelou um índice proliferativo de 27% (**Fig. 7**), estando as células positivas distribuídas de maneira homogênea ao longo da amostra.



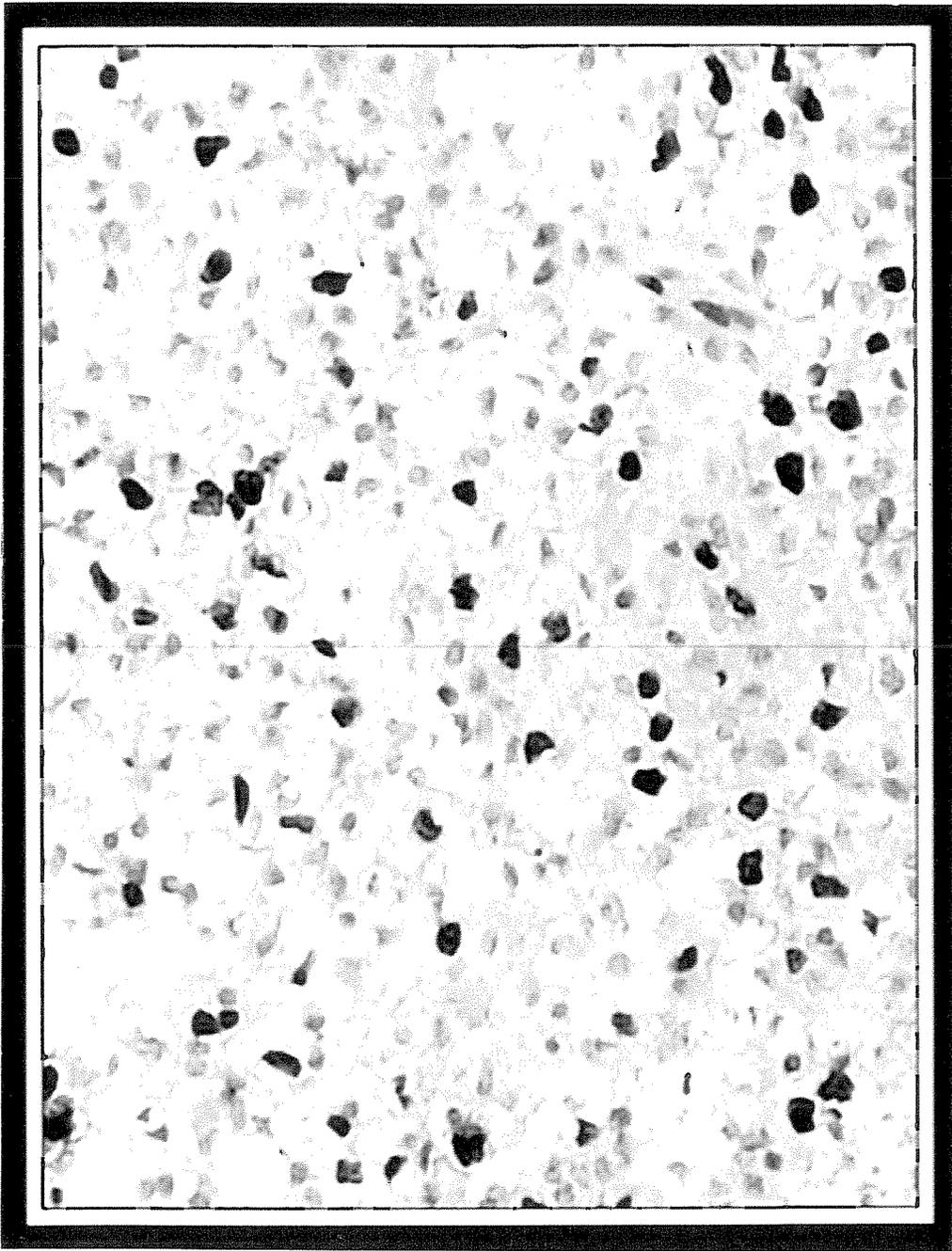
**Figura 4.** Cortes axiais tomográficos pré- (a) e pós- (b) infusão de contraste iodado mostrando extensa área de hipotenuação em região fronto-parieto-temporal direita, com evidente efeito de massa, obliteração de ventrículos ipsilaterais e desvio de estruturas da linha média para o lado oposto. Ausência de captação patológica de contraste na região descrita.



**Figura 5.** Imagens de ressonância magnética ponderadas em T1, com (b-d) e sem contraste i.v. (a) apresentando área irregular de hipossinal, com limites imprecisos, predominantemente subcortical, projetando-se na região fronto-têmporo-insular. Nota-se extensão aos núcleos da base e discretamente ao corpo caloso à direita (c,d), além de compressão do ventrículo lateral direito e do terceiro ventrículo, desvio de estruturas ventro-medianas para a esquerda e apagamento de sulcos e fissuras em todo o hemisfério direito (b-d). Ausência de impregnação anômala de contraste (b-d).



**Figura 6.** Imagens axiais de ressonância magnética ponderadas em T2 mostram uma volumosa lesão tumoral subcortical apresentando hipersinal, em região fronto-têmporo-insular (a,b). Presença de desvio de estruturas ventro-medianas para a esquerda e apagamento de sulcos e fissuras em todo o hemisfério direito (a).



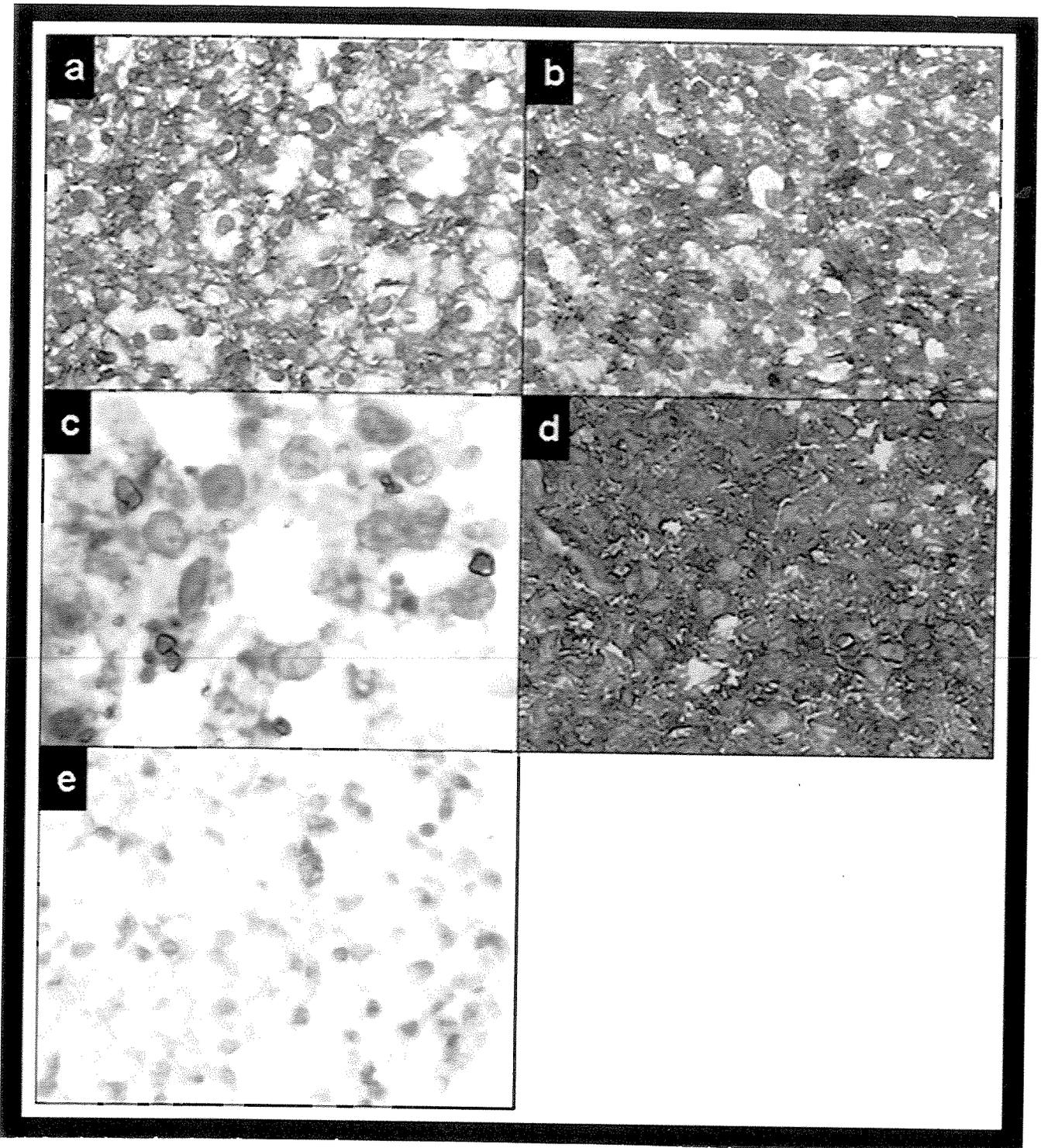
**Figura 7.** Imunomarcacão do Ki67: índice proliferativo de 27%. Distribuição homogênea de células positivas (Reação de imunoperoxidase [Sistema Envision<sup>®</sup>], aumento original: 400X).

Quanto ao imunofenótipo, observamos no tumor original uma expressão moderada a intensa (DON média variando entre  $34,6 \pm 4$  e  $56,8 \pm 4$ ) dos marcadores neurogliais GFAP, S-100, NSE e Leu-7, em quase 100% das células (**Fig. 8 e Tabela 2**). A expressão de vimentina foi focal (2,2%) e moderada (DON média de  $28,4 \pm 9$ ), enquanto todos os demais marcadores histogenéticos foram consistentemente negativos (**Tab. 2**). Nas células positivas, a expressão dos marcadores neurogliais e da vimentina (**Fig.8**) concentrou-se tanto no citoplasma do corpo quanto no dos processos celulares.

### **Células NG97 em cultura (P33)**

As células NG97 coletadas de culturas semi-confluentes para o estudo imunocitoquímico caracterizaram-se por uma população monótona de células redondas, com citoplasma escasso e processos celulares curtos. (**Fig. 9a,b**). A maioria destas células possuía um núcleo único com múltiplos nucléolos (**Fig. 9a-c**), havendo contudo algumas células maiores (ainda assim arredondadas), com até quatro núcleos (**Fig. 9d**). Nesta instância, não foram detectadas células fusiformes ou dendríticas.

Virtualmente todas as células apresentaram uma positividade intensa para GFAP e proteína S-100 (**Fig. 10a,b**), embora apenas algumas expressaram fracamente NSE (5%, DON média de  $16 \pm 4$ ) e Leu-7 (1%, DON média de  $28 \pm 4$ ) (**Fig. 10c,d; Tab. 2**). Nota-se que a intensidade de reação de GFAP (DON média de  $51,1 \pm 6$ ) e S100 (DON média de  $64,3 \pm 2$ ) nas células de cultura foi significativamente maior que a observada no tumor original (DON média<sub>GFAP</sub> =  $40,6 \pm 4$ ; DON média<sub>S100</sub> =  $56,8 \pm 4$ ) e no xenoinxerto (DON média<sub>GFAP</sub> =  $11,7 \pm 5$ ; DON média<sub>S100</sub> =  $52,8 \pm 6$ ) ( $P < 0,05$ ) (**Tab. 2 e Apêndice 3**). Todos os marcadores neurogliais foram mais evidentes nos processos celulares rudimentares (**Fig. 10a-d**). Não foi detectada expressão de vimentina, nem de qualquer outro marcador (**Tab. 2**).

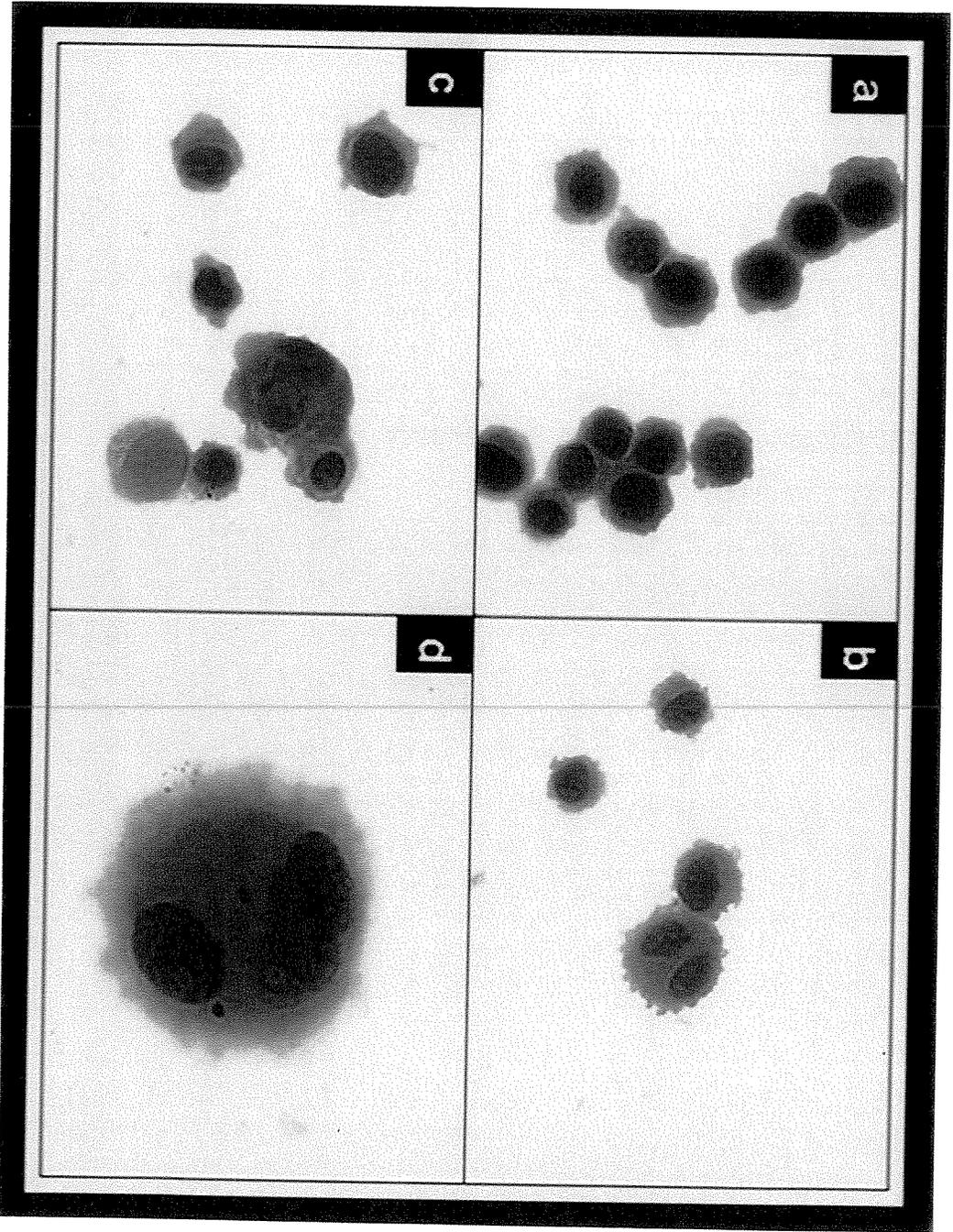


**Figura 8.** Imagens representativas do perfil imunoistoquímico da neoplasia original: (a) GFAP, (b) proteína S-100, (c) NSE, (d) Leu-7 e (e) vimentina. Reação de imunoperoxidase (sistema *Envision*<sup>®</sup>), aumentos originais: a,b,d,e= 400X; c= 1000X.

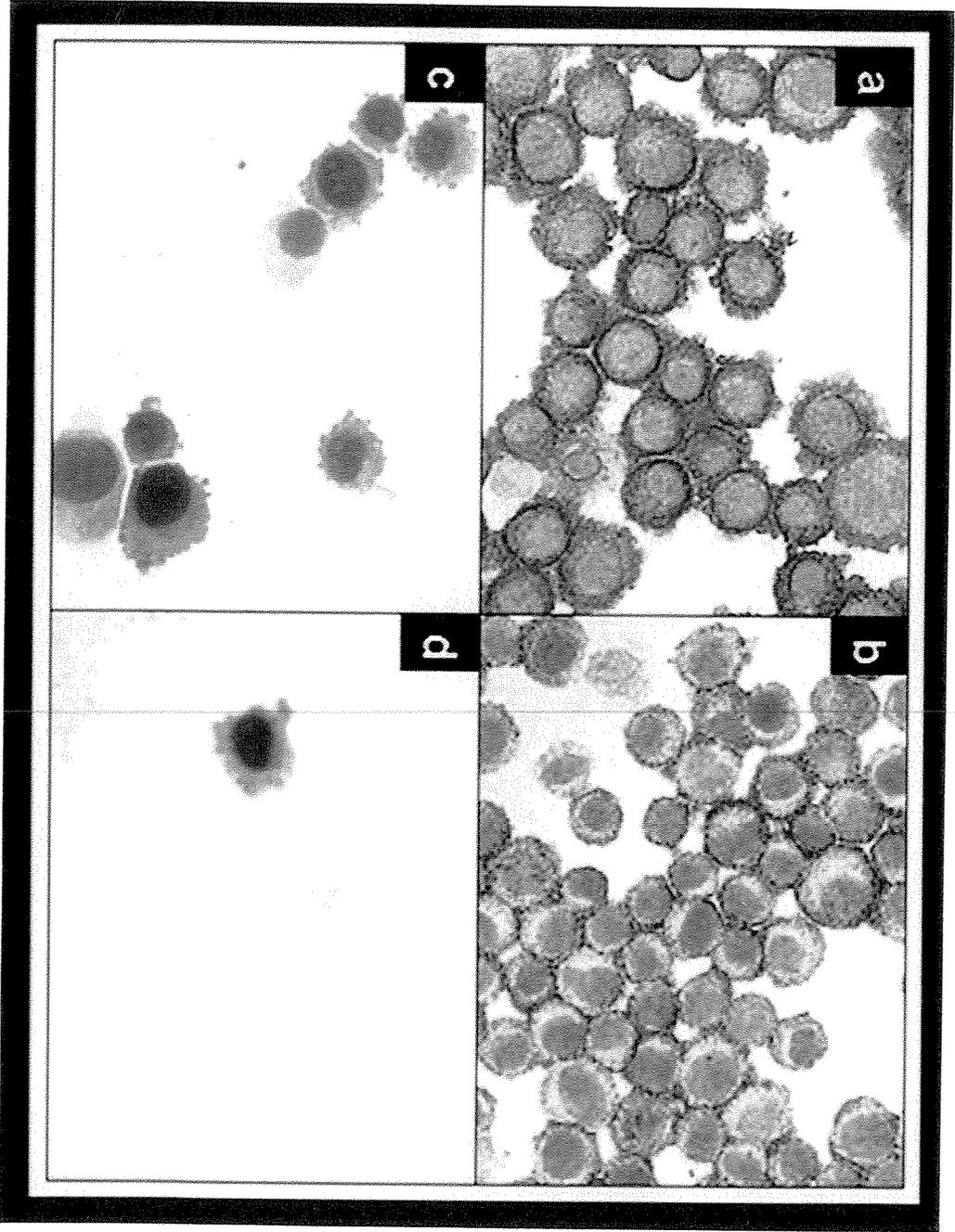
**Tabela 2** – Perfis imunofenotípicos (positividade em áreas contendo “*hotspots*”) do tumor original, das células NG97 em cultura e do xenotransplante (P33).

M	Tumor parental		Células em cultura		Total		Xenotransplante			
	F (%)	I	F (%)	I	F (%)	I	Células fusiformes		Células redondas	
							F (%)	I	F (%)	I
<b>GFAP</b>	100	40,6 ± 4	100	51,1 ± 6	48,2	11,7 ± 5	44,7	12,0 ± 7	55,1	11,4 ± 2
<b>S-100</b>	100	56,8 ± 4	100	64,3 ± 2	100	52,8 ± 6	100	52,6 ± 6	100	53,0 ± 6
<b>NSE</b>	100	34,6 ± 4	5,0	16,0 ± 4	100	23,3 ± 2	100	23,8 ± 3	100	22,8 ± 2
<b>Leu-7</b>	100	49,0 ± 1	1,0	28,0 ± 6	0	0	0	0	0	0
<b>Vim</b>	2,2	28,4 ± 9	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Outros<sup>1</sup></b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

M: marcador; F: frequência de positividade; I: intensidade expressa em DON (Densidade Óptica Média Normalizada); Vim: vimentina; 1: neurofilamento, sinaptofisina, cromogranina, AE1/AE3, 35 $\beta$ H11, 34 $\beta$ E12, desmina, 1A4, HHF35, MyoD1, HMB45, CD34, CD45, CD20, CD68.



**Figura 9.** Fotomicrografias representativas de células NG97 coletadas de culturas semi-confluentes. Estas células constituem uma população monótona de células redondas (a), com citoplasma escasso, processos celulares curtos. (a,b) e núcleo único com múltiplos nucléolos (Fig. 9a-c). Presença de algumas células maiores multinucleadas (Fig. 9d). Ausência de células fusocelulares ou dendríticas. HE, aumento original (a-d): 400X.



**Figura 10.** Células NG97 coletadas em culturas semiconfluentes: imunoposição de GFAP (a), proteína S-100 (b), NSE (c) e Leu-7 (d). Reação de imunoperoxidase (sistema *Envision*<sup>®</sup>), aumento original (a-d): 400X.

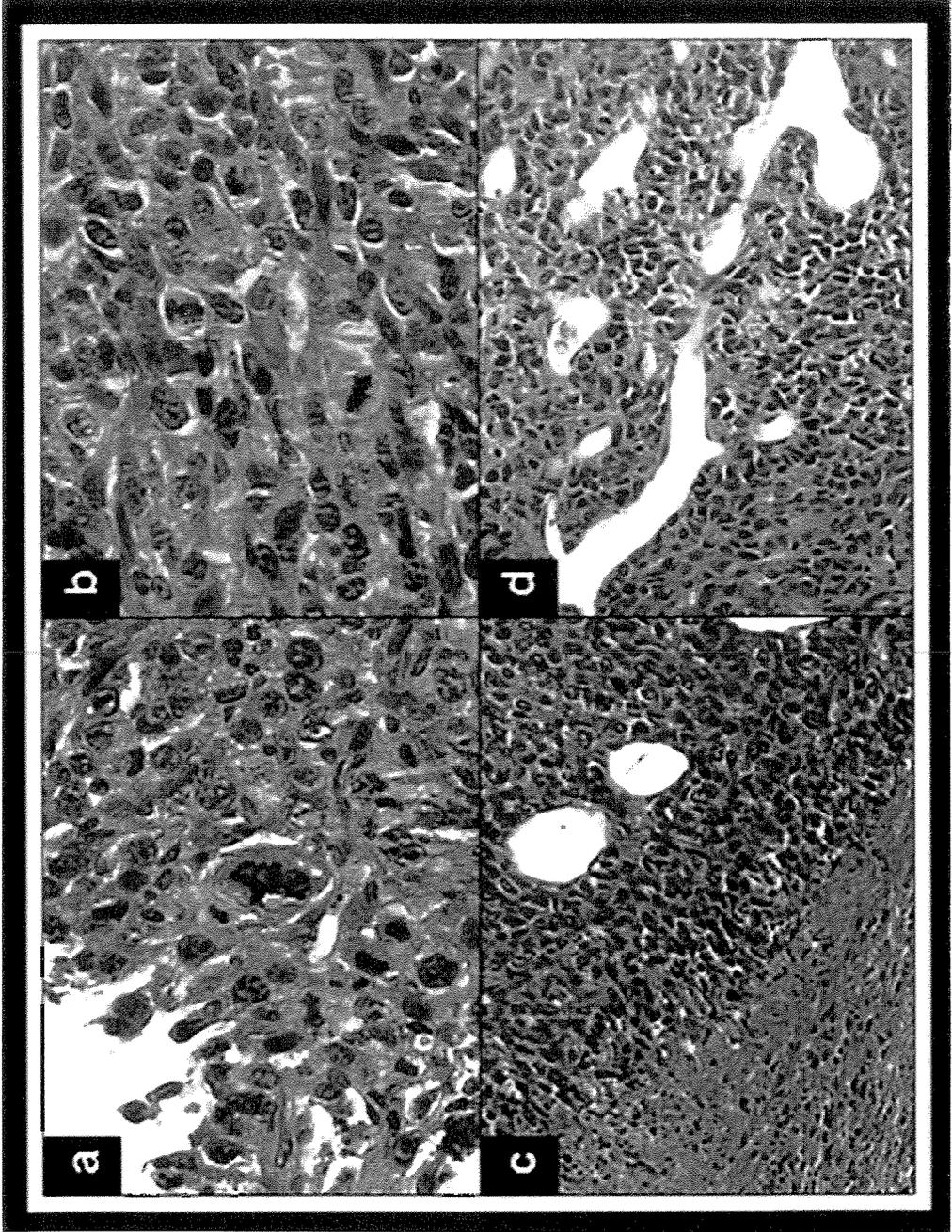
### Xenoenxerto NG97 (P33)

Como ilustrado na Fig. 11, o heterotransplante caracterizou-se por uma neoplasia altamente agressiva, constituída por células arredondadas e fusiformes, distribuídas, aparentemente, de maneira aleatória, sendo o componente fusocelular predominante (65,8%). Observaram-se com freqüência figuras de mitose (Fig. 11a,b), necrose (Fig. 11c) e proliferação vascular (Fig. 11d). Nos animais *Naive*, não se observou crescimento tumoral.

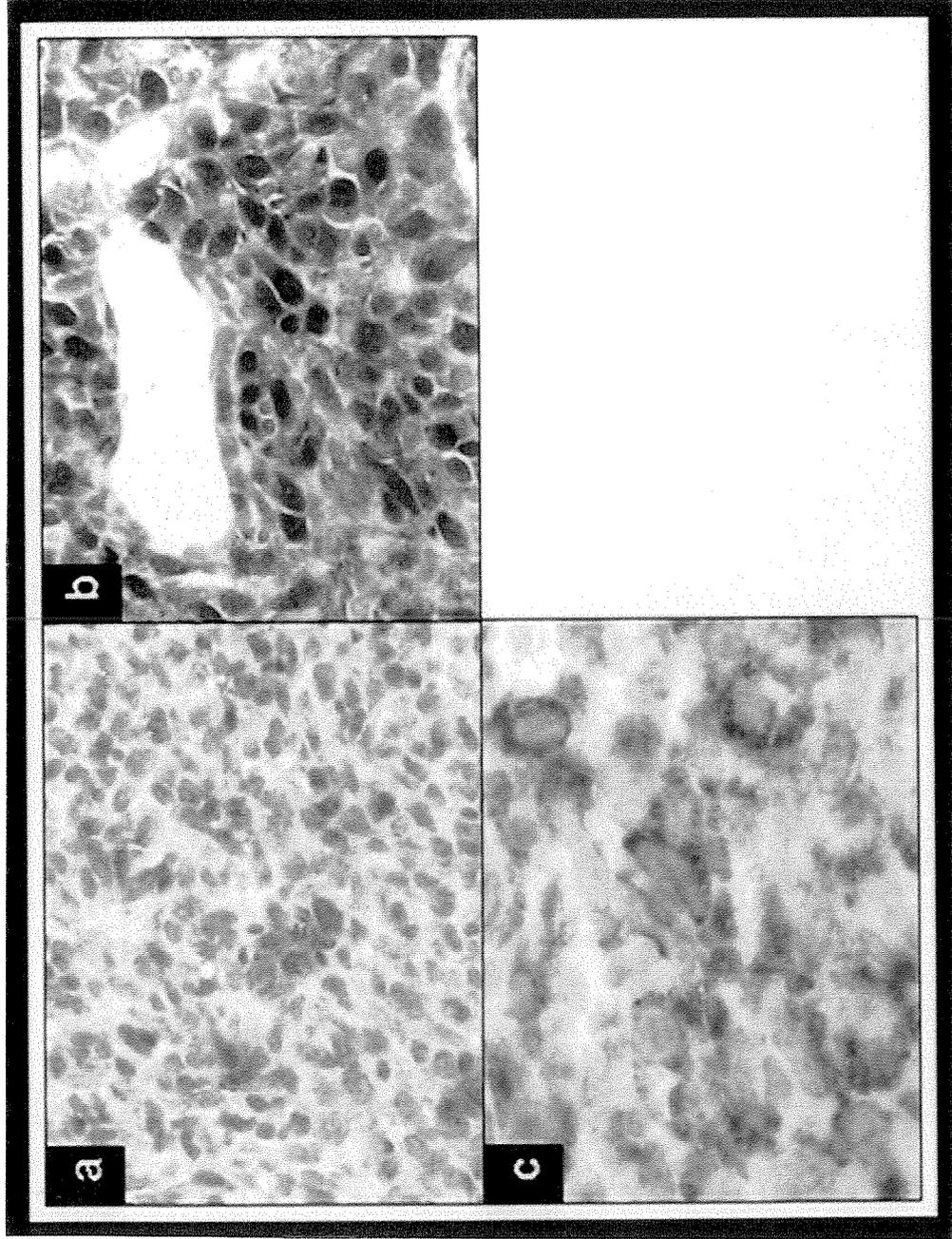
A expressão de GFAP caracterizou-se por “hotspots” ou agrupamentos discretos contendo células positivas, distribuídos aleatoriamente ao longo do tecido (Fig. 12a). Em campos de maior aumento contendo “hotspots”, aproximadamente metade das células (48,2%) eram positivas, sendo a intensidade discretamente variável e geralmente fraca (DON média de  $11,7 \pm 5$ ) (Tab. 2). Tanto a freqüência (48,2%) quanto a intensidade (DON média de  $11,7 \pm 5$ ) de positividade para GFAP no xenoenxerto foram significativamente menores que as do tumor parental e das células em cultura ( $P < 0,05$ ) (Tab. 2, Apêndices 2 e 3).

A expressão de NSE também se concentrou em “hotspots” (a propósito, maiores que os de GFAP) caracterizados por uma positividade citoplasmática granular, moderada (DON média de  $23,3 \pm 2$ ) em cerca de 100% das células (Fig. 12c, Tab. 2). A freqüência de células positivas nos “hotspots” do heterotransplante (100%) foi significativamente maior do que a observada nas células de cultura (5%;  $P < 0,0001$ ) (Tab. 2, Apêndice 2). A intensidade de coloração no xenoenxerto foi igualmente maior do que a observada nas células de cultura (respectivamente,  $23,3 \pm 3$  X  $16 \pm 2$ ,  $P < 0,002$ ) (Tab. 2, Apêndice 3).

A positividade para a proteína S-100 foi difusa (100% das células) e intensa (DON média de  $52,8 \pm 6$ ) no tumor, em padrão nuclear e citoplasmático (Fig. 12b, Tab. 2, Apêndices 2 e 3). Assim como os marcadores GFAP e NSE, a proteína S-100 foi detectada similarmente em ambos os subtipos celulares (célula redondas e fusiformes/dendríticas) ( $p > 0,05$ ) (Fig. 12b, Tab. 2). Todos os demais marcadores, incluindo Leu-7 e vimentina foram negativos no heterotransplante.



**Figura 11.** Fotomicrografias representativas do xenoenxerto da linhagem NG97 exibindo características glioblastoma-símiles: hiper celularidade (a-d), atipia citológica proeminente (a,b), mitoses frequentes (a,b), necrose em pseudopaliçada (c) e proliferação vascular (d). HE, aumentos originais: a,b= 200X, c,d= 400X.



**Figura 12.** Perfil imunofenotípico do heterotransplante NG97: expressão de GFAP (a), proteína S-100 (b) e NSE (c). Reação de imunoperoxidase (sistema *Envision*<sup>®</sup>), aumentos originais: a,b= 400X; c= 1000X.

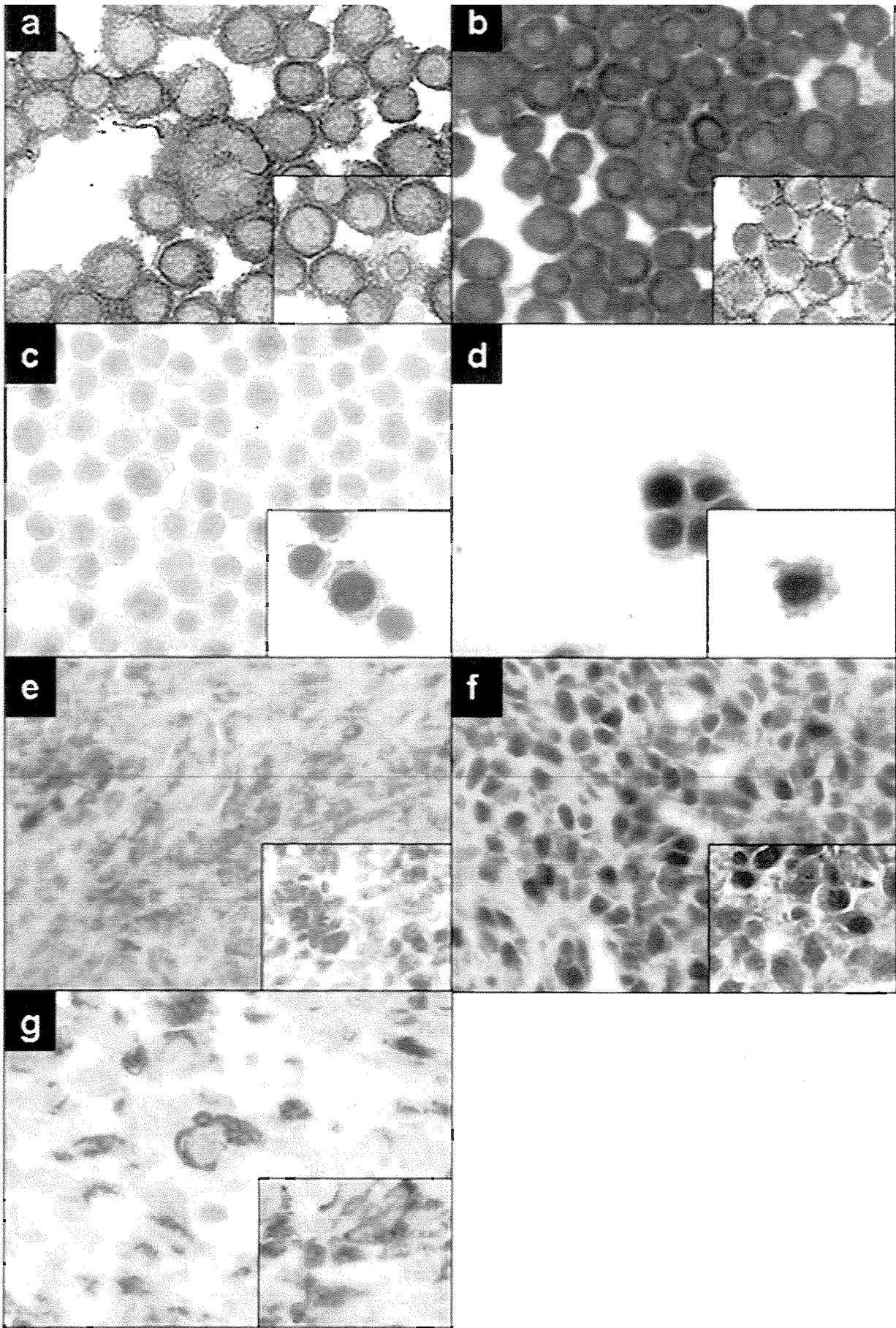
### *Validade interna do estudo*

Os resultados referentes à análise comparativa simplificada entre os perfis imunofenotípicos das passagens P16 e P33 encontram-se discriminados na **Tabela 3 e Fig. 13**. Em resumo, em ambas as passagens analisadas são demonstrados os principais marcadores neurogliais (GFAP, S-100 e NSE) em frequência e intensidade muito semelhantes, não havendo expressão de quaisquer dos demais marcadores histogenéticos. Pequenas diferenças entre as passagens analisadas, sobretudo quanto à intensidade de positividade dos marcadores GFAP, NSE e S-100 foram encontradas.

**Tabela 3.** Perfis imunofenotípicos das passagens P16 e P33 (positividade em áreas contendo “hotspots”).

Marcador	Células NG97 de cultura				Xenoenxerto NG97			
	P16		P33		P16		P33	
	D <sup>1</sup>	I <sup>2</sup>	D	I	D	I	D	I
<b>GFAP</b>	Difuso	+++	Difuso	+++	Difuso	+ -+++	Difuso	+ -++
<b>S-100</b>	Difuso	+++	Difuso	+++	Difuso	++	Difuso	+++
<b>NSE</b>	Focal	+ -++	Focal	+	Difuso	+ -++	Difuso	++
<b>Leu-7</b>	Focal	+	Focal	+	Ausente	0	Ausente	0
<b>Vim<sup>3</sup></b>	Ausente	0	Ausente	0	Ausente	0	Ausente	0
<b>Outros<sup>4</sup></b>	Ausente	0	Ausente	0	Ausente	0	Ausente	0

<sup>1</sup>Distribuição da fração de células positivas, <sup>2</sup>Intensidade da reação de peroxidase, <sup>3</sup>vimentina, <sup>4</sup>Outros marcadores (neurofilamento, sinaptofisina, cromogranina, AE1/AE3, 35 $\beta$ H11, 34 $\beta$ E12, desmina, 1A4, HHF35, MyoD1, HMB45, CD34, CD45, CD20, CD68).

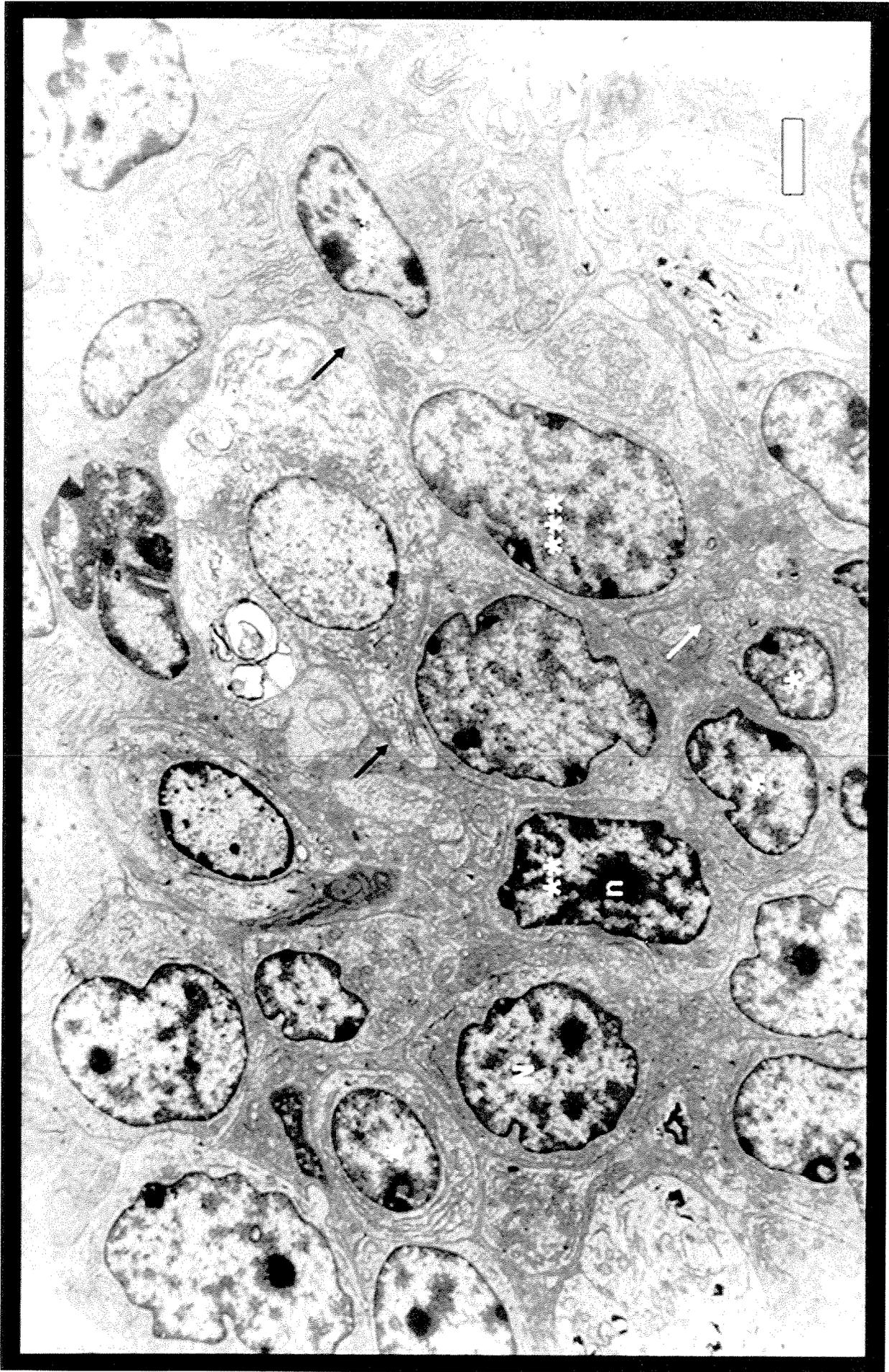


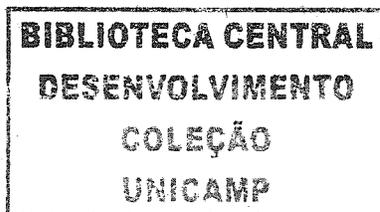
**Figura 13.** Comparação entre os perfis imunofenotípicos das passagens P16 (a-g, fotomicrografias maiores) e P33 (a-g, inserções). Imunoexpressão de GFAP (a, e), S-100 (b,f), NSE (c,g) e Leu-7 (d). Células em cultura= a-d; xenotransplante= e-g. Reação de imunoperoxidase (sistema *Envision*<sup>®</sup>), aumentos originais: a-f= 400X; g= 1000X.

## ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

No exame ultraestrutural, o xenoenxerto NG97 caracterizou-se por uma população polimorfa de células atípicas, com elevada razão núcleo-citoplasma (**Fig. 14**). Nesta instância, foi possível observar com maior riqueza de pormenores tanto os limites citoplasmáticos como os contornos nucleares, fato que levou à identificação de um espectro de formas mais amplo que o suspeitado à microscopia óptica convencional (análise ao HE) (**Fig. 14**). Apesar de ampliado, o espectro morfológico continuou a comportar, em um extremo, células pequenas e arredondas, e, noutro, células mais volumosas, ora poligonais, ora fusiformes (**Fig. 14**). Entre os dois extremos morfológicos, observou-se ainda uma variedade de formas intermediárias ou transicionais, que combinavam aleatoriamente elementos característicos dos dois polos (**Fig. 15**).

Além de menores, as chamadas células redondas apresentavam habitualmente citoplasma escasso, projeções citoplasmáticas rudimentares ou ausentes e núcleo ovalado/pouco convoluto. Geralmente eram encontradas em íntima aposição, formando ninhos discretos (**Figs. 14 e 16**). O pólo dendrítico-símile/fusiforme, por outro lado, era caracterizado por células mais volumosas, com processos citoplasmáticos bem desenvolvidos e núcleos bizarros, dotados de cromatina grumosa e nucléolo proeminente (**Figs. 14 e 17**). Os corpos celulares destas células maiores mostravam-se separados por quantidades variáveis de prolongamentos citoplasmáticos “enovelados”, à semelhança de um verdadeiro neurópilo (**Fig. 17**).

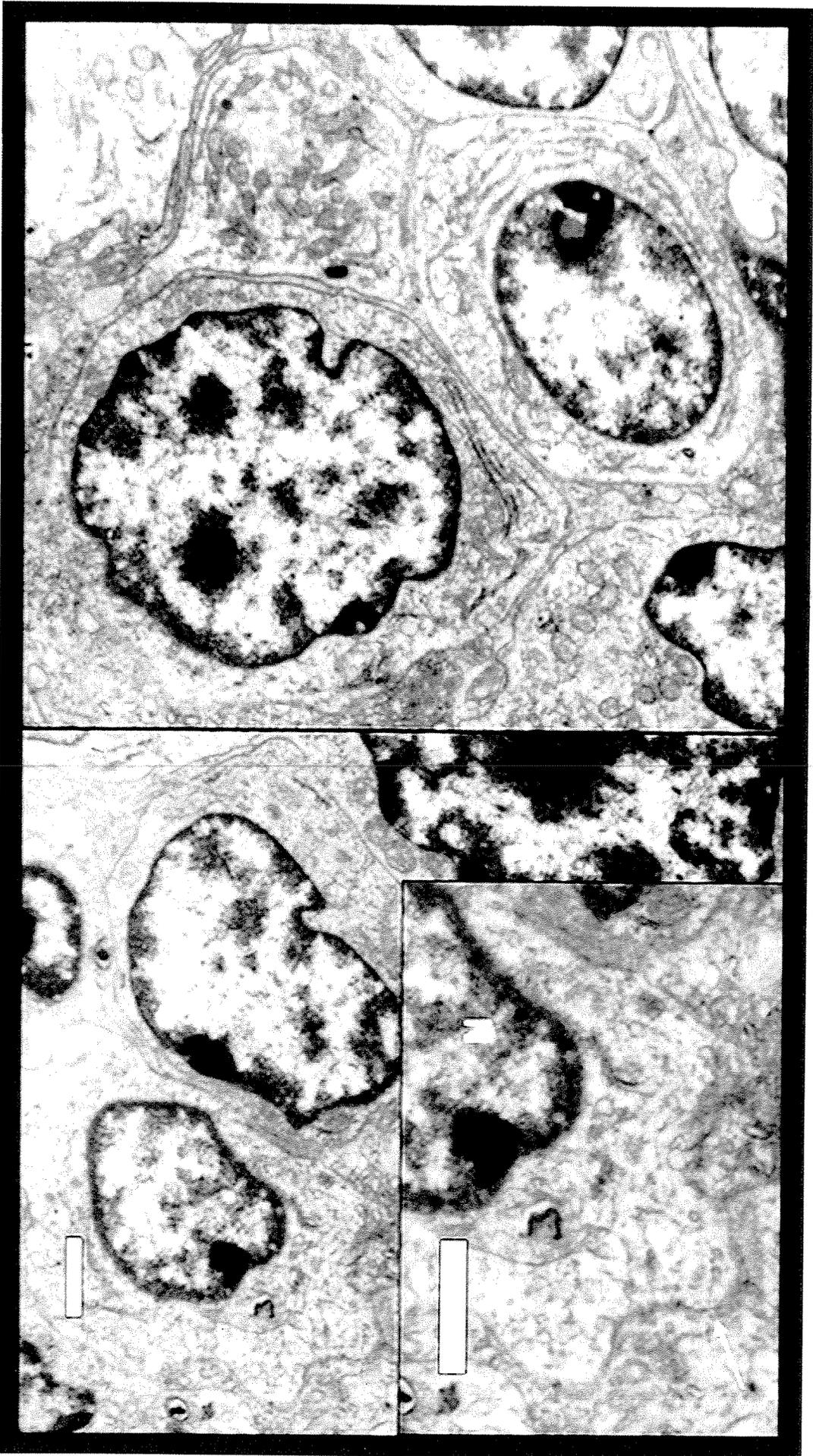




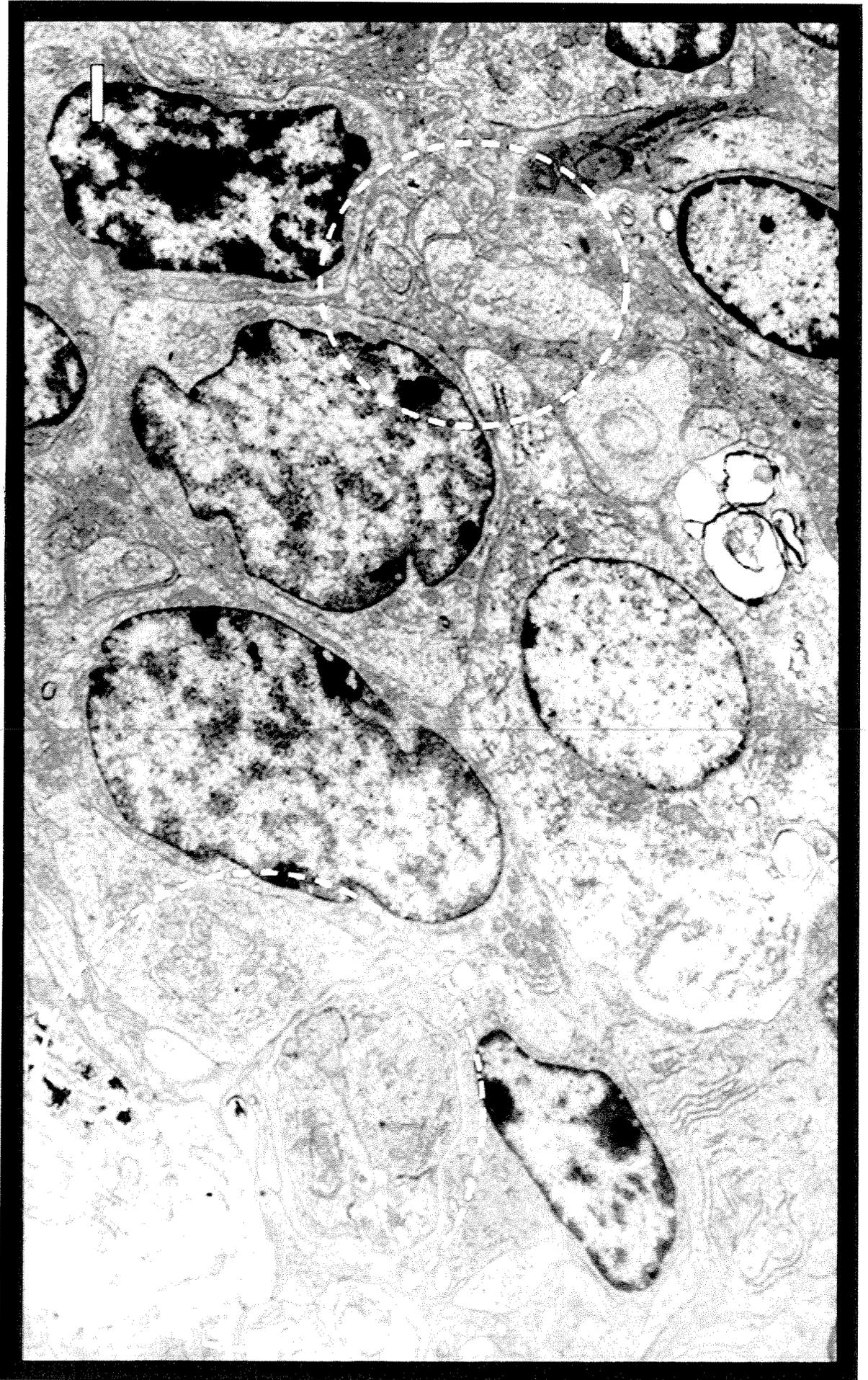
**Figura 14.** Elétron-micrografia representativa do xenoenxerto NG97 ilustrando a presença de células com elevada razão núcleo-citoplasma. Nota-se também um espectro de formas mais amplo que o observado à microscopia óptica convencional. Apesar de ampliado, o espectro morfológico continua a comportar em um extremo células pequenas, arredondadas/ovaladas (\*) e dotadas de processos celulares rudimentares (seta branca), e, noutro, células mais volumosas, ora poligonais (\*\*), ora fusiformes (\*\*\*) e providas de processos celulares bem desenvolvidos (setas pretas); (6.720X; barra de magnificação: 2 $\mu$ m). N= núcleo; n= nucléolo proeminente.



**Figura 15.** Elétron-micrografia de um grupo de células apresentando características intermediárias em relação aos dois extremos morfológicos: “A” conserva as características citoplasmáticas e nucleares de uma célula redonda, apesar de ser a mais volumosa deste agrupamento; “B” é proporcionalmente menor e, no entanto, apresenta características nucleares de uma célula dendrítico-símile; “C”, por sua vez, mostra características transicionais entre uma célula redonda e uma fusiforme (28.350X; barra de magnificação: 1µm). N= núcleo.



**Figura 16.** Elétron-micrografias apresentando ninhos de células redondas em íntima aposição. No pormenor (inserção), notam-se prolongamentos citoplasmáticos rudimentares (seta) (12.000X, barra de magnificação: 1x0,2 $\mu$ m; no pormenor: 20.352X barra de magnificação: 1 $\mu$ m). N= núcleo.



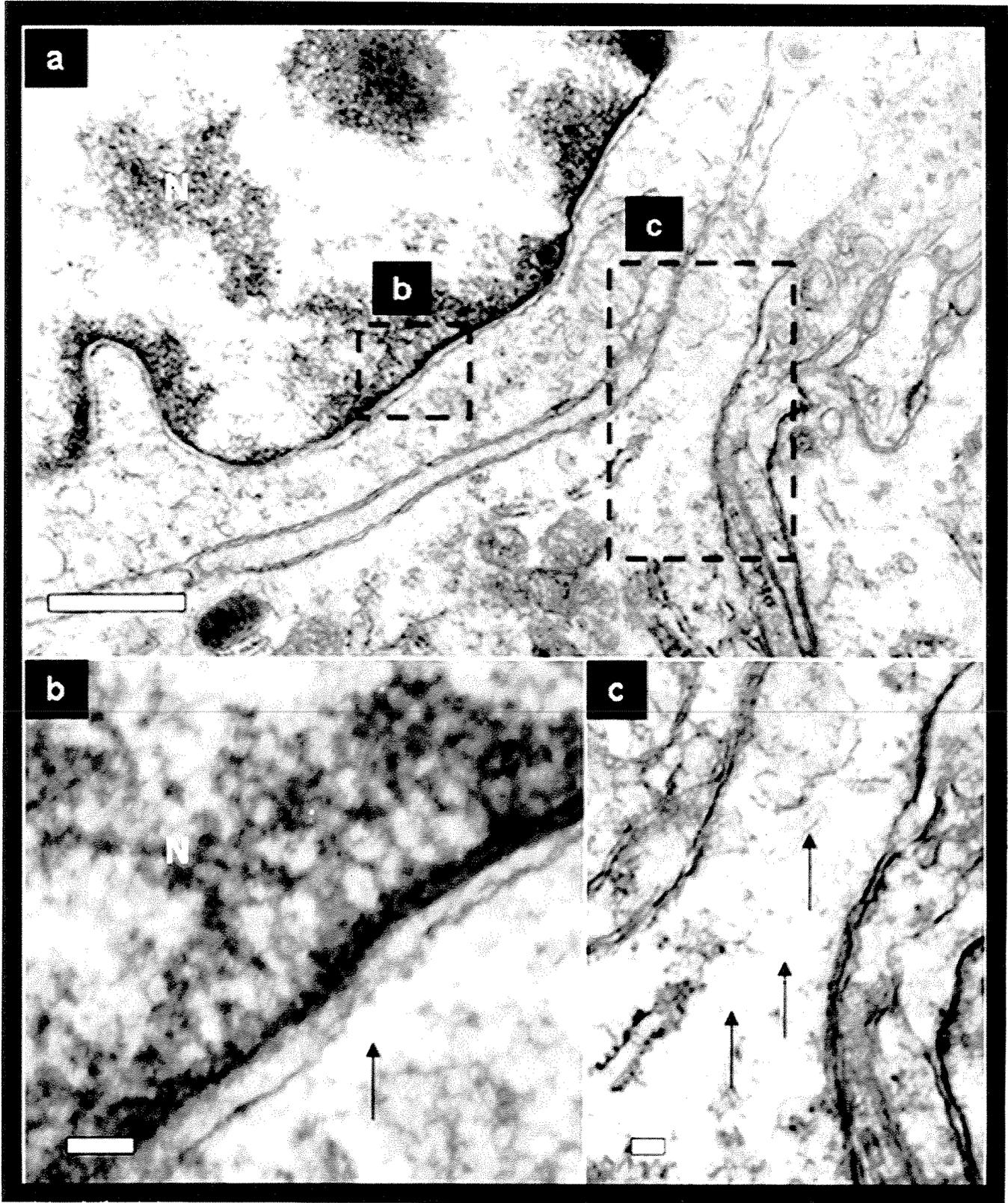
**Figura 17.** Elétron-micrografia ilustrando um agrupamento de células poligonais/fusiformes em detalhe. Nas áreas tracejadas: entrelaçamento imbricado de processos celulares simulando um neurópilo (10.320X, barra de magnificação: 1x0,2µm).

Filamentos intra-citoplasmáticos (**Fig.18**) com diâmetro médio de  $11,82 \pm 1,8\text{nm}$  (diâmetro mínimo: 9,04; diâmetro máximo: 14,27), foram encontrados em quase todas as células (independentemente do subtipo morfológico), porém em escassa quantidade. Do ponto de vista de localização intracelular, estes filamentos intermediários foram observados tanto nos processos citoplasmáticos (**Figs. 18a,b**) quanto na região peri-nuclear (**Figs. 18a,c**). Em algumas células, os filamentos foram encontrados em associação com junções intercelulares rudimentares desmosomo-símiles (**Fig. 19**).

Além de filamentos intermediários, o citoplasma das células neoplásicas mostrou riqueza em mitocôndrias e em retículo endoplasmático rugoso, independentemente do subtipo morfológico (**Figs. 20,21**).

O interstício era caracterizado por (1) substância fundamental amorfa escassa e, em raras ocasiões, por (2) uma matriz fibrilar constituída de fibras colágenas, geralmente em arranjo paralelo. Além de escassas, estas fibras não pareciam participar da composição de lâminas externas (**Fig. 21**).

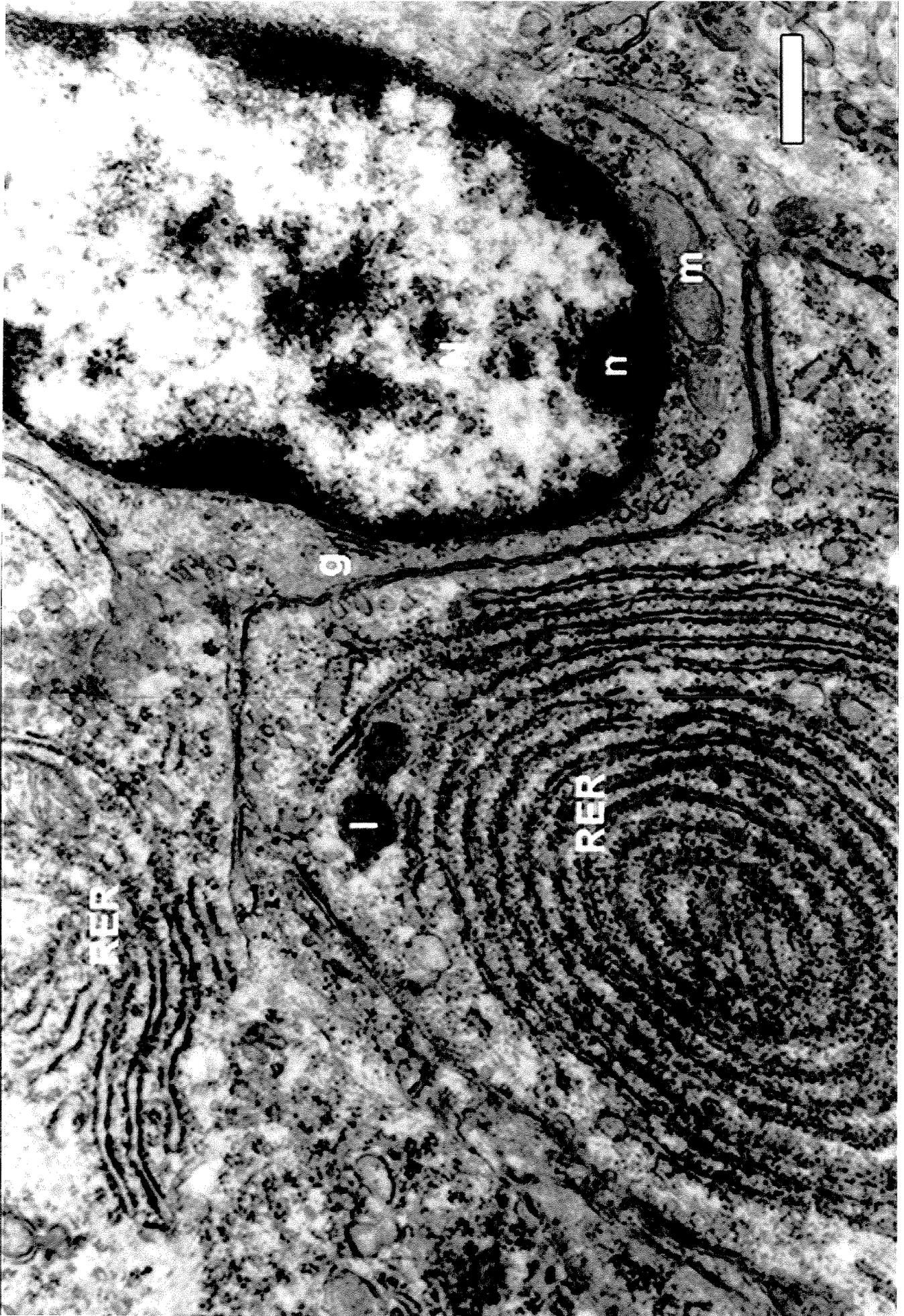
Não foram observados sinais ultraestruturais de diferenciação divergente.



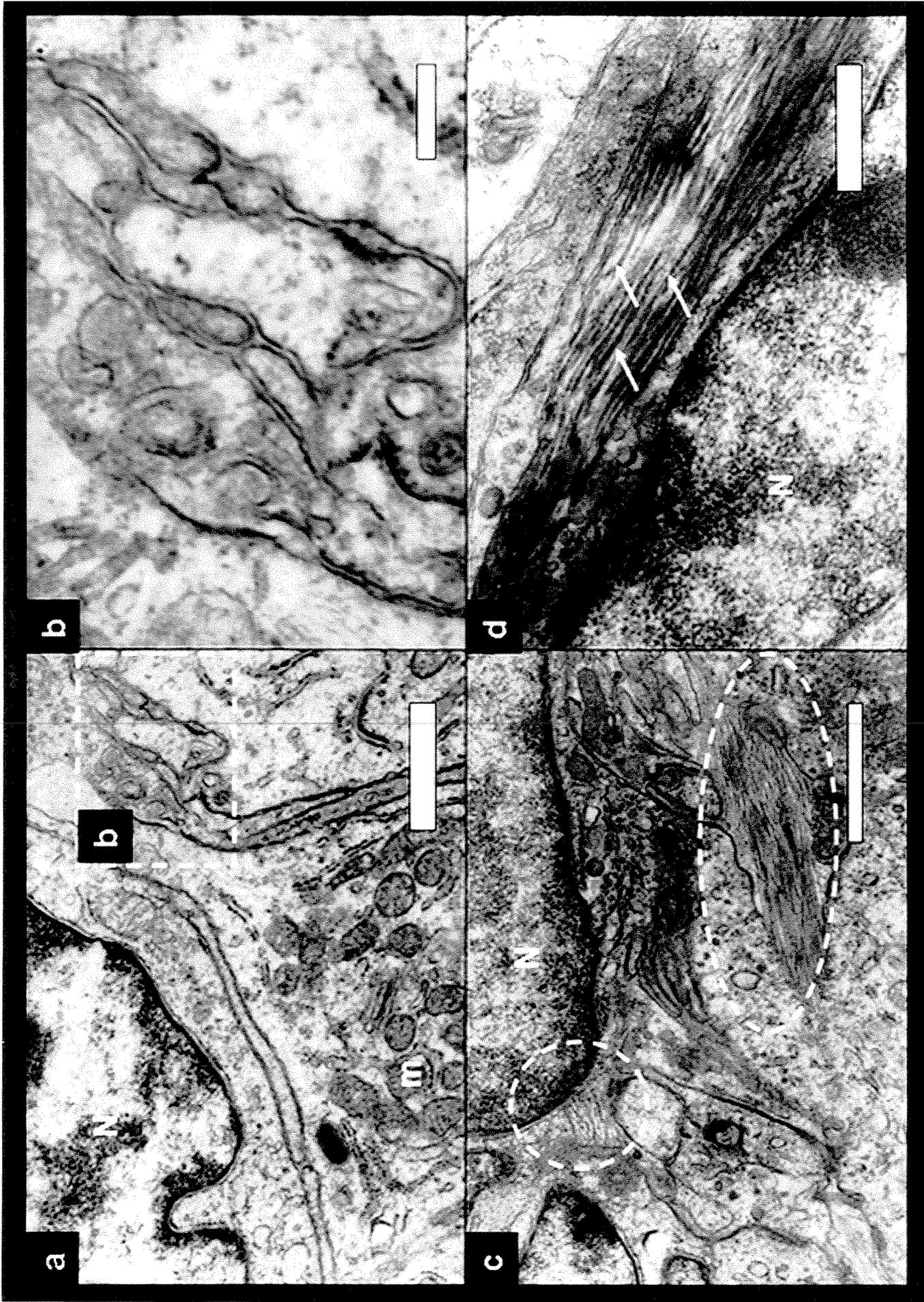
**Figura 18.** Elétron-micrografias apresentando escassos filamentos em região peri-nuclear (a e b) e em processos celulares bem desenvolvidos (a e c). Aumentos originais: (a)= 33.600X; (b)= 134.400X e (c)= 67.200X (barra de magnificação= 1 $\mu$ m, em todas as micrografias). N= núcleo; m= mitocôndrias.



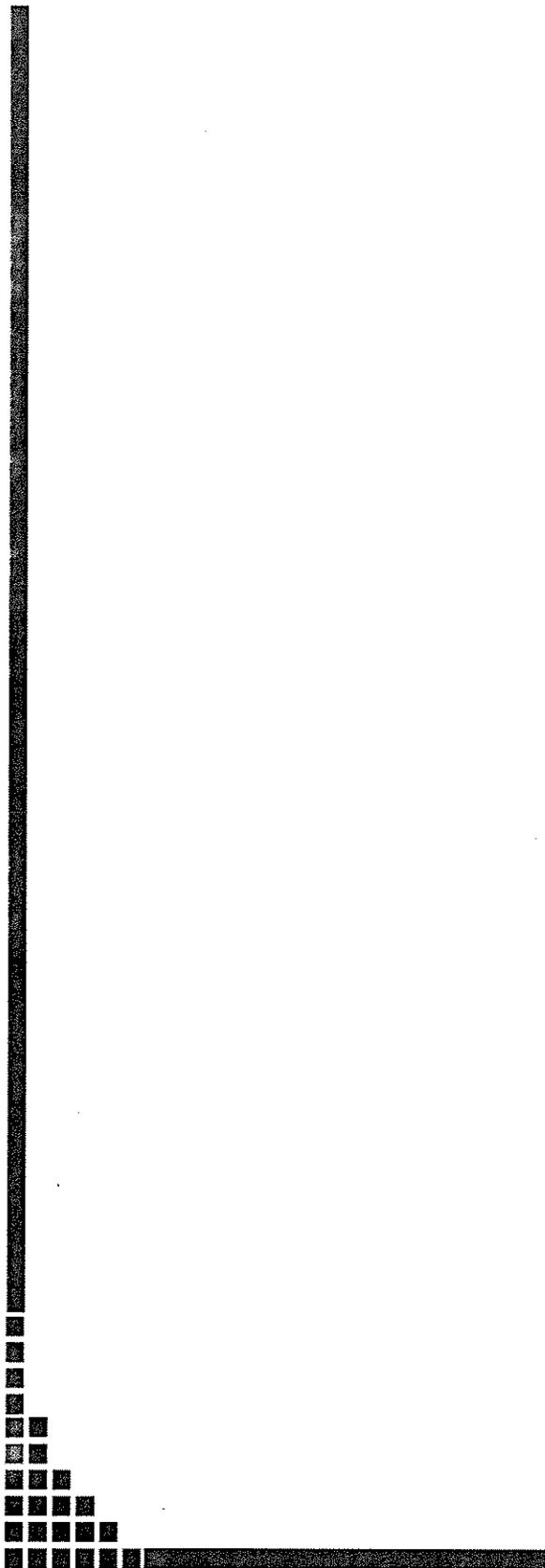
**Figura 19.** Elétron-micrografia ilustrando filamentos intermediários citoplasmáticos (seta branca) associados a estrutura desmosomo-símile (seta preta) (70875X; barra de magnificação: 250X50mm). N= núcleo; n= nucléolo; m= mitocôndria.



**Figura 20.** Elétron-micrografia apresentando retículo endoplasmático rugoso (RER) bem desenvolvido (17300X, barra de magnificação: 1x0,2µm). N= núcleo; l= lisossomo; g= complexo de Golgi; m= mitocôndria; n= nucléolo.



**Figura 21.** Elétron-micrografias representativas do xenotransplante ilustrando espaços intercelulares: na maioria das vezes, nota-se escassa substância amorfa fundamental (a e b); em raras instâncias, contudo, observa-se a presença de fibras colágenas (c e d – áreas tracejadas e setas). Em “a”, observar a riqueza de mitocôndrias. N= núcleo; m= mitocôndrias.



## DISCUSSÃO

### ***Validação imunofenotípica e ultraestrutural da linhagem NG97***

No sentido amplo, o termo validação pode ser definido como um ato documentado que visa demonstrar que um procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema é capaz de gerar certos resultados de maneira fidedigna e reprodutível, isto é, conforme o esperado (FDA, 1993; ANVISA, 2003). Durante o estabelecimento e caracterização de uma linhagem celular qualquer, o estudo de validação constitui uma forma de controle de qualidade. Ele confirma as características genéticas e/ou fenotípicas (morfológicas, bioquímicas, etc) que tornam a linhagem um modelo experimental de uma entidade ou fenômeno específico, garantindo, em última análise, a validade externa (capacidade de generalização de conhecimentos) de futuros estudos aplicados (Langdon, 2003b). O presente trabalho contribui para a validação da linhagem NG97, através da investigação de suas características imunofenotípicas e ultraestruturais.

O estudo de caracterização imunofenotípica realizado neste trabalho teve como objetivos fundamentais confirmar a histogênese da linhagem (isto é, sua origem numa célula de glioma) e pesquisar o desenvolvimento de linhas divergentes de diferenciação. A realização deste tipo de caracterização se justifica principalmente na heterogeneidade e elevado grau de indiferenciação da linhagem quando em arranjo histiotípico (isto é, quando em monocamadas, durante o cultivo *in vitro*, ou ao formar um tecido de características malignas após transplante heterotópico em camundongos *nude*) (Grippio *et al.*, 2001). Este estudo baseia-se no pressuposto fundamental de que as neoplasias podem conservar a expressão de alguns antígenos característicos do tecido normal de origem ou modificar este perfil antigênico através de alterações gênicas (deleção, mutação ou modulação de expressão) espontâneas ou secundárias a estímulos do micro-ambiente (Kaufman *et al.*, 1984; Gould, 1986; Alves *et al.*, 1999).

No caso específico da linhagem NG97, a definição do perfil imunofenotípico consistiu na pesquisa direcionada dos principais marcadores neurogliais (uma vez que a origem hipotética da linhagem era um astrocitoma) e numa espécie de triagem para expressão aberrante de marcadores típicos de outras linhas de diferenciação, utilizando anticorpos comercialmente disponíveis. No que se refere à confirmação do imunofenótipo glial, a abordagem adotada não diferiu significativamente do proposto na literatura. Na

grande maioria dos estudos, utiliza-se um painel mínimo voltado para a identificação de GFAP (considerado o marcador glial mais específico, apesar das exceções anecdóticas), S-100 (o mais sensível) e, por vezes, vimentina (considerado um marcador de imaturidade) (Diserens *et al.*, 1981; Hay, 1989; Welch *et al.*, 1995; Perzelova *et al.*, 1998; Kruse *et al.*, 1998;). Além destes, o presente estudo utilizou NSE e Leu-7, e introduziu pela primeira vez na literatura a preocupação em se descartar diferenciação divergente através de um amplo painel de marcadores tecido-específicos.

Antes de se afirmar que a ausência de um marcador glial típico constitui prova de indiferenciação ou que a expressão de marcador não-glial representa indício de diferenciação anômala, era preciso conhecer o suposto tecido de origem (tumor parental). Dada a heterogeneidade imunofenotípica dos gliomas e linhagens gliais em geral (Diserens *et al.*, 1981; Welch *et al.*, 1995; Perzelova *et al.*, 1998; Kruse *et al.*, 1998; Kleihues & Cavenee, 2000), a mera ausência de um marcador típico ou presença de um marcador aberrante na linhagem poderia ser reflexo do perfil do tumor original e não uma característica adquirida ao longo do desenvolvimento da cultura de células. Assim sendo, a análise de histogênese incluiu a caracterização do tumor parental.

O tumor original era uma neoplasia astrocítica difusa que comprometia os lobos frontal, parietal e temporal em um paciente de sessenta e seis anos, sem antecedentes patológicos prévios. Do ponto de vista de graduação histológica, a neoplasia apresentava características superponíveis entre um astrocitoma grau II e grau III (OMS). A atipia citológica era leve na grande maioria do tumor, sendo mais compatível com a de um astrocitoma difuso grau II. Por outro lado, a presença de esparsas figuras de mitose sugeriam tratar-se de um glioma de alto grau. Esta dificuldade em se graduar o tumor original deveu-se em parte à própria ambigüidade dos critérios propostos pela OMS.

Em um trecho do manual de Patologia e Genética editado pela OMS, afirma-se que os astrocitomas anaplásicos (grau III) seriam caracterizados por atividade mitótica “evidente, óbvia”<sup>1</sup> (“marked mitotic activity”) (Kleihues & Cavenee, 2000). Já em outro trecho, admite-se que a presença de uma única figura de mitose não impede o diagnóstico de astrocitoma grau II (Kleihues & Cavenee, 2000). Entende-se, a partir destas duas asserções, que “marked mitotic activity” deve ser bem mais que uma única figura de

---

<sup>1</sup> *MARKED*. *adj. clear, noticeable, easily seen (...)* (Oxford – Advanced Learner’s Dictionary, 1989).  
*NOTICIABLE*: evidente, óbvio. (Colins GEM English-Portuguese Dictionary, 1987).

mitose. Contudo, uma definição mais precisa (*e.g.*, um ponto de corte) não é claramente estabelecida no texto. Isto dificulta a classificação de casos como o tumor original da linhagem NG97, onde a contagem de mitoses fica entre “mais que uma” e menos que “atividade mitótica evidente”.

Em função desta dúvida, procedemos à revisão dos achados clínico-radiológicos e à determinação do índice de proliferação celular através da imunomarcção do Ki67. Do ponto de vista clínico, a neoplasia parental caracterizou-se por um aparecimento súbito e rápida evolução para óbito, a despeito dos esforços terapêuticos instituídos - dados que favorecem o diagnóstico de um astrocitoma de alto grau (grau III ou IV) *de novo* (Ellison *et al.*, 1998). Por outro lado, a ausência de captação de contraste (gliomas de alto grau em geral são captantes) sugere uma neoplasia de baixo grau sem sinais de progressão (Kleihues & Cavenee, 2000).

Para terminar o impasse, a imunomarcção pelo Ki67 revelou um elevadíssimo índice proliferativo - 27%-, mais compatível até com o de um glioblastoma (índice de proliferação médio entre 15-20%) do que com o de um astrocitoma anaplásico (índice de proliferação média entre 5-10%) ou menos ainda com o de um grau II (inferior a 4%) (Kleihues & Cavenee, 2000). Somam-se a estes dados indicativos de uma neoplasia de alto grau, achados morfológicos obtidos com o recorte seriado do bloco de parafina do tumor. Nestes recortes histológicos corados em HE, foram encontradas mais figuras de mitose, esparsas células dotadas de núcleos bizarros, bem como raros exemplos de multinucleação. Na ausência de necrose e proliferação vascular e em conjunto com os dados clínicos, estes achados imunomorfológicos permitiram o diagnóstico conclusivo de um astrocitoma grau III (astrocitoma anaplásico).

Como o esperado, tanto a neoplasia original quanto as células em cultura da linhagem NG97 expressaram os principais marcadores neurogliais disponíveis comercialmente: GFAP, S-100, NSE e Leu-7. A falta de reatividade para outros marcadores tecido-específicos indicou ausência de diferenciação divergente, nestas entidades. Contudo, diferenças quanto à expressão de marcadores gliais foram observadas. Em relação ao tumor parental, as células NG97 expressaram quantidades similares de GFAP e proteína S-100, porém significativamente menores de NSE, Leu-7 e vimentina. Isto sugere que a linhagem

NG97 seja menos diferenciada que o tumor original (Morrison and Prayson, 2000; Schiffer *et al.*, 1986).

No heterotransplante, embora o S-100 ainda estive presente de maneira difusa e intensa, houve uma diminuição significativa da expressão de GFAP e perda completa da expressão de Leu-7, indicando indiferenciação crescente em relação ao tumor original (tumor original < células em cultura < xenotransplante). Este fato é concordante com as discrepâncias morfológicas observadas entre o tumor original e o xenotransplante: aquele apresentou características compatíveis com um astrocitoma grau III enquanto este seria comparável a um glioblastoma multiforme (astrocitoma grau IV).

Alternativamente, estas variações imunofenotípicas poderiam ser explicadas por diferenças na concentração de substâncias como o ácido láctico, no micro-ambiente celular. Nesse sentido, Takeshita *et al.* (1990), relataram que culturas celulares de glioma tendem a diminuir, por seleção negativa, o número de células GFAP positivas e aumentar a frequência relativa de células produtoras de NSE, quando expostas ao ácido láctico, de maneira dose-dependente. Contudo, a modulação do perfil imunológico de uma linhagem celular pelo seu micro-ambiente, ainda não foi estabelecida para todos os marcadores neurogliciais, não podendo assim explicar todas as variações observadas no presente estudo.

Cumprido ressaltar que o heterotransplante parece recuperar, pelo menos parcialmente, tanto a frequência de células expressando NSE quanto a intensidade da reação deste marcador, observadas no tumor parental e diminuídas nas células de cultura. Contudo, este aumento na expressão de NSE não necessariamente significa que as células do enxerto recuperaram sua capacidade de produzir o marcador. Ao invés, esta observação pode decorrer de uma seleção positiva e expansão de clones produtores de NSE, oriundos das raras células NSE positivas presentes na amostra coletada diretamente da cultura. Como mencionado anteriormente, a seleção positiva de subclones NSE + pode estar relacionada a um aumento na concentração de ácido láctico no microambiente celular do heterotransplante (Takeshita *et al.*, 1990).

Com a indiferenciação observada no heterotransplante em relação ao tumor original, esperar-se-ia um aumento na expressão de vimentina, considerado um marcador de glia imatura – fato que não se concretiza. Sarria *et al.* (1994) relatam perda de expressão de vimentina, à imunohistoquímica, em células de glioma, em cultura, que exibem expressiva

irregularidade nuclear à microscopia eletrônica. Por analogia, este poderia ser o caso do heterotransplante NG97 que além de não expressar vimentina, apresenta células com núcleos irregulares e pleomórficos à microscopia eletrônica. Contudo, este argumento é invalidado pela ausência de vimentina tanto nas células de cultura quanto nas células redondas do xenotransplante, as quais apresentam núcleos arredondados, com pouca ou nenhuma irregularidade de carioteca. É provável que a perda de vimentina na linhagem como um todo esteja relacionada à seleção negativa de clones produtores de vimentina. A perda de expressão de vimentina em linhagens de glioblastoma é uma situação descrita em algumas linhagens (Kruse, 1998).

Não se pode deixar de notar a ocorrência de um aumento na intensidade de reação de GFAP e S-100 nas células NG97, em comparação com o tumor original e o xenotransplante. Este aparente incremento provavelmente reflete diferenças de preservação antigênica, devido a diferenças no processamento das amostras. A saber, as células de cultura haviam sido submetidas apenas à fixação em acetona anidra, ao passo que o tumor original e o xenotransplante haviam sido fixados em formalina e submetidos a processamento histológico para inclusão em parafina.

Algumas das características ultraestruturais observadas no xenoenxerto, tais como pleomorfismo proeminente, entrelaçamento de processos celulares à semelhança de um neurópilo e escassez de filamentos intermediários são consistentes com o diagnóstico de uma neoplasia glial, em particular de um glioblastoma (Erlandson, 1994), e ressaltam ainda mais a natureza altamente indiferenciada das células tumorais. Assim como no estudo imunofenotípico, não foram encontrados indícios de diferenciação divergente (e.g., sarcômeros rudimentares, pré-melanossomos, etc.). É provável que os filamentos intermediários encontrados à microscopia eletrônica correspondam à GFAP – o único filamento intermediário detectado à imunistoquímica. A discrepância entre a frequência de células positivas para GFAP (48,2%) e a percentagem de células dotadas de filamentos intermediários à microscopia eletrônica (cerca de 100%) indica que este método é mais sensível que a imunofenotipagem na detecção destes filamentos, o que por sua vez justifica o emprego concomitante das duas técnicas.

Os filamentos intermediários são um grupo diversificado de proteínas insolúveis, primariamente intra-citoplasmáticas, com espessura média aproximada de 10nm, *i.e.*,

intermediária à espessura de microfilamentos (6nm) e à de microtúbulos (25nm) (Erlandson, 1994). Podem ser divididos em 6 grupos principais (citoqueratinas, vimentina, desmina, filamentos gliais, neurofilamentos e lamininas nucleares), indistinguíveis à microscopia eletrônica, salvo quando combinada à técnica imunoistoquímica (imunomicroscopia eletrônica) (Erlandson, 1994). Assim, embora os filamentos encontrados no tumor devam corresponder a filamentos gliais (GFAP), a presença de outros filamentos como a vimentina (em quantidade inferior ao limite de detecção imunoquímica) só poderá ser descartada completamente por imuno-microscopia eletrônica.

Em algumas células, os filamentos intermediários foram encontrados em associação com junções intercelulares rudimentares desmosso-símiles. Estas junções foram designadas como tal, por não apresentarem os critérios morfológicos mínimos para o diagnóstico de um desmosso "clássico", segundo o proposto por Ghadially (1988). Isto é, apesar do aspecto geral semelhante a um desmosso, especialmente no que diz respeito à presença de filamentos intermediários convergentes, não foram observados no sítio destas estruturas desmosso-símile: (1) um espaço intercelular alargado contendo material denso linear, nem (2) placas densas intracitoplasmáticas pareadas. Enquanto o achado de desmosmos "perfeitos" virtualmente garante que se está diante de epitélio, mesotélio, meninge ou de seus correspondentes neoplásicos, o encontro de estruturas rudimentares desmosso-símiles não tem qualquer significado para a análise histogenética, sendo descrito em uma ampla variedade de tumores malignos indiferenciados (Ghadially, 1988; Erlandson, 1994), incluindo neoplasias gliais (Erlandson, 1994).

Dois tipos celulares - células redondas e fusiformes/ dendríticas - foram descritos em um estudo anterior que observou a monocamada de células NG97 no frasco de cultura, através de microscopia de contraste de fase - uma abordagem "in situ" (Grippio et al., 2001). No presente estudo, estas subpopulações celulares também puderam ser observadas, embora apenas ao exame histológico do xenoinxerto. Nesta instância, não apenas células redondas e fusiformes puderam ser vistas, como um amplo espectro de variações e nuances entre estes dois extremos. Células obtidas a partir da cultura, após tripsinização e citocentrifugação, eram, com raras exceções, predominantemente pequenas, redondas e monomórficas.

Originalmente, postulava-se que estas duas subpopulações corresponderiam a diferentes linhagens celulares, sendo as células fusiformes possivelmente de natureza mesenquimatosas, quer por contaminação ou por diferenciação divergente<sup>2</sup>. Esta idéia baseia-se no fato de que, em algumas linhagens celulares (especialmente em passagens precoces), é possível observar-se a co-existência de células contaminantes, como fibroblastos e linfócitos, oriundos de células pré-existentes na amostra de tecido parental (Hay, 1989; Langdon, 2003b). Contudo, demonstrou-se imunocitoquimicamente que ambos os tipos celulares expressam GFAP, S-100 e NSE, em frequência e intensidade de positividade semelhantes, fato que indicou comprometimento com o fenótipo glial.

É possível que estas variações de forma estejam relacionadas a estruturas/ moléculas de adesão e/ou algum tipo de sinalização celular uma vez que foram apreciadas apenas quando as células NG97 estavam em contato umas com as outras, *i.e.*, seja formando monocamadas em cultura (Grippio *et al.*, 2001) ou um tecido (heterotransplante). Em consonância com esta hipótese, foram encontradas pequenas junções intercelulares desmosomo-símiles ao exame ultraestrutural do heterotransplante.

Em estudo recente, paralelo ao presente trabalho, foi possível observar, utilizando microscopia eletrônica de varredura, que os principais subtipos celulares da linhagem NG97 seguem uma cronologia de aparecimento durante o subcultivo celular (Machado *et al.*, 2005). Inicialmente, as culturas são constituídas predominantemente por células redondas e pequenas. Em seguida, surgem células maiores e de aspecto dendrítico-símiles, dotadas de prolongamentos citoplasmáticos longos e que interligam várias células ao mesmo tempo. Finalmente, aparecem células fusiformes e alongadas, que em certo momento passam a predominar na população de células (Machado *et al.*, 2005). Em todo momento, estes dois últimos subtipos celulares coexistem com células redondas. Estas observações serviram de base para uma nova subclassificação morfológica que separa o subtipo fusiforme do dendrítico e que introduz a hipótese de que estes dois subtipos seriam oriundos das células redondas (Machado *et al.*, 2005). A variação morfológica teria, portanto, em primeira instância um significado cronológico: diferentes formas= diferentes estádios de desenvolvimento.

---

<sup>2</sup> Dra. Liana Verinaud, comunicação pessoal.

Neste mesmo estudo, observou-se que os prolongamentos das células dendríticas que interligavam várias células ao mesmo tempo eram portadores de uma grande quantidade de microvesículas. Diante deste achado, os autores especularam que estas vesículas poderiam estar associadas à secreção de biomoléculas sinalizadoras, uma vez que o aparecimento deste subtipo celular estava associado a um aumento na cinética de crescimento da cultura (Machado *et al.*, 2005). Uma das moléculas que poderiam estar associadas a este crescimento é a proteína S-100, expressa tanto nas células de cultura quanto nas células do xenotransplante. A propósito, Zimmer *et al.* (1989) relataram uma correlação positiva entre a excreção da proteína S-100 e a regulação do crescimento e diferenciação de células da linhagem de glioblastoma C6. Se confirmadas, estas hipóteses levariam o significado desta variação morfológica a um segundo nível: o funcional.

Solimene e colaboradores (2001), ao estudarem uma linhagem celular derivada de carcinoma colorretal humano, caracterizada por subpopulações morfológicamente distintas, encontraram uma correlação interessante entre heterogeneidade citológica e diferenças funcionais. De acordo com este estudo, o subtipo fibroblastóide mais indiferenciado (células LISP-E11), quando comparado à subpopulação epitelioide bem diferenciada (células LISP-A10), apresentou menos moléculas de adesão e uma maior capacidade de migração em direção a proteínas matriciais, sendo, portanto, mais bem adaptada à metastatização. Com relação à linhagem NG97, a existência de uma correlação entre subtipos morfológicos e diferentes estados funcionais precisa ser mais bem esclarecida.

### ***Validade interna do estudo***

Os achados imunofenotípicos observados na passagem P33 foram amplamente confirmados na passagem P16. Como esperado, a passagem P16 também expressou os principais marcadores neurogliais (GFAP, S-100 e NSE) em frequência e intensidade muito semelhantes, não expressando quaisquer dos demais marcadores histogenéticos. Pequenas diferenças entre as passagens analisadas, sobretudo quanto à intensidade de positividade dos marcadores GFAP, NSE e S-100 foram encontradas. Estas diferenças mínimas, sejam decorrentes de variações técnicas ou reflexo de alterações fenotípicas reais, não indicam

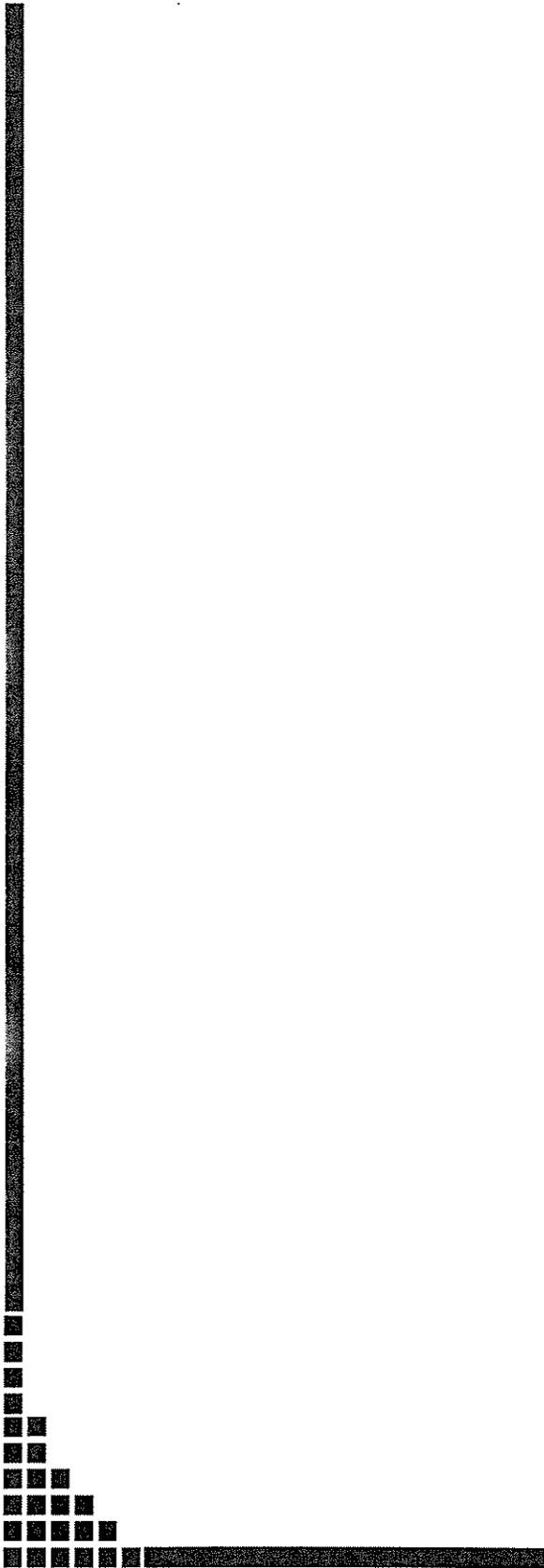
perda significativa do fenótipo glial ou diferenciação divergente, não possuindo, portanto, importância biológica no contexto deste estudo.

Pode-se dizer que a expressão simultânea de GFAP, NSE e S-100 constitui um padrão de referência para passagens precoces da linhagem NG97. Devido à possibilidade constante de mutações gênicas espontâneas ou modificações na expressão gênica secundárias a variações do micro-ambiente (Kaufman *et al.*, 1984; Gould, 1986), é importante que, em estudos futuros, este padrão de referência seja reproduzido nos grupos controle. Assim, é recomendável que, a cada estudo, as amostras de células NG97 sejam submetidas a procedimentos de re-validação mínima, isto é, direcionados para a confirmação da positividade de GFAP, NSE e S-100. Sendo o risco de deriva gênica e fenotípica maior nas passagens mais tardias (Rossman *et al.*, 1995), a utilização destas em estudos aplicados deve ser evitada, quando a linhagem servir ao propósito de modelo de glioma. Se optada pela utilização de uma passagem a despeito de modificações fenotípicas em relação ao padrão aqui estabelecido, estas devem ser claramente consignadas, sendo os resultados do estudo discutidos à luz das mesmas, com as devidas ressalvas.

Diante de um universo recentemente ampliado de linhagens celulares de glioblastoma comercialmente disponíveis (Langdon, 2003), a linhagem NG97 se destaca em primeiro lugar pela forma com que foi estabelecida. Com este presente trabalho, somam-se três estudos inteiramente dedicados à caracterização cinética, morfológica e genética da linhagem (Grippio *et al.*, 2001; Schenka *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2005). A publicação destes trabalhos em revistas especializadas, de grande circulação, remete estas linhagens ao conhecimento e escrutínio da coletividade científica nacional e internacional envolvida neste tipo de pesquisa, um feito raro entre as linhagens em uso corrente. Em segundo lugar, esta linhagem se destaca como uma das poucas linhagens morfológicamente classificadas como de glioblastoma, a expressar simultaneamente os marcadores GFAP, NSE e S-100, sem a necessidade de manipulação do meio de cultura ou outras intervenções (Edström *et al.*, 1973; Bigner *et al.*, 1981; Kruse *et al.*, 1998). Pelo fato de ter se originado de uma neoplasia mais bem diferenciada (astrocitoma grau III), esta linhagem poderá ser particularmente útil no estudo de mecanismos de diferenciação em gliomas (genes envolvidos, moléculas endógenas e exógenas moduladoras, etc.).

Apesar de ser mais uma linhagem disponível para pesquisas no contexto internacional, caracterizado pela existência de vários bancos de linhagens bem estabelecidos e confiáveis, no contexto nacional, esta linhagem de glioma configura a primeira inteiramente desenvolvida aqui, com validação estabelecida, descrita e discutida na literatura internacional. Espera-se que a manutenção desta linhagem nesta Universidade, venha facilitar o acesso de pesquisadores nacionais a esta ferramenta, tendo em vista aspectos econômicos e logísticos, e, conseqüentemente, estimular a pesquisa voltada para o glioblastoma neste país.

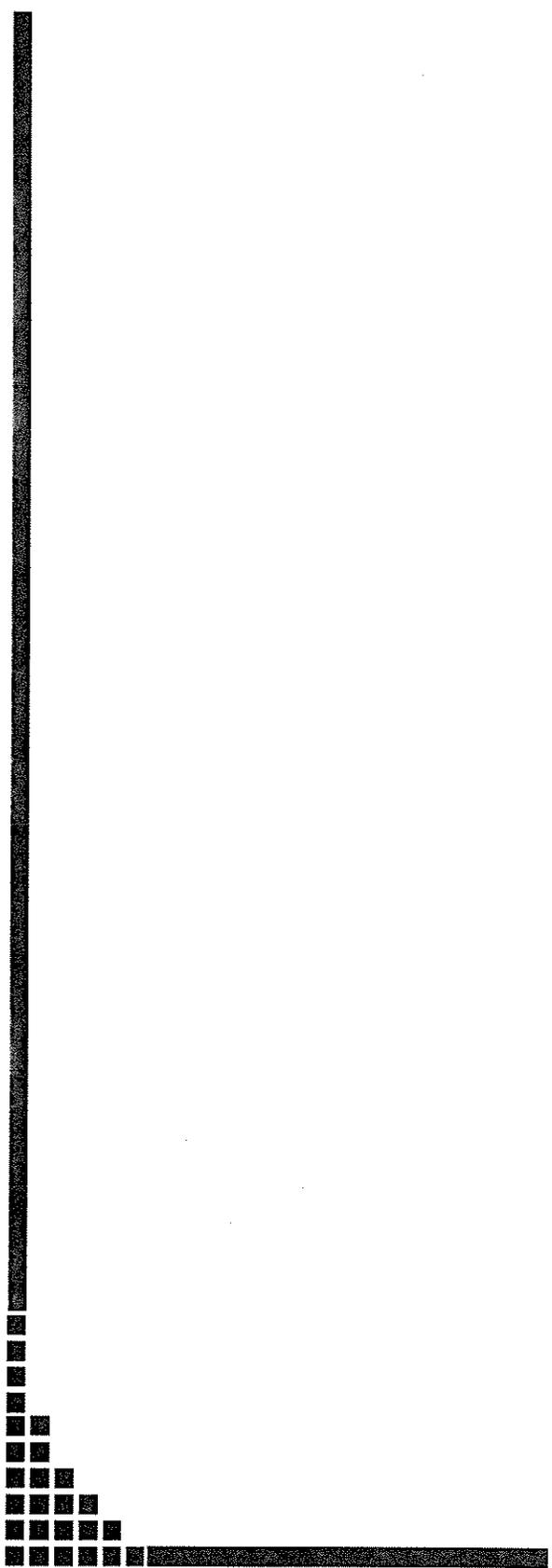
Em resumo, este estudo contribui para o estabelecimento desta nova linhagem de glioma humano, definindo suas principais características imunofenóticas e ultraestruturais. Os dados indicam que, pelo menos do ponto de vista imunofenotípico e morfológico, a linhagem celular NG97 pode ser considerada como pura (*i.e.*, não apresenta sinais de contaminação celular) e comprometida com o fenótipo glial (*i.e.*, não possui sinais de diferenciação divergente). Uma vez que apresenta semelhança considerável com um glioblastoma, esta linhagem poderá ser utilizada em estudos de fisiopatologia e terapia deste tumor.



## CONCLUSÕES

Resumidamente, o presente trabalho demonstra que:

1. O tumor parental possui características clínico-evolutivas e imunomorfológicas que permitem o diagnóstico, segundo os critérios da OMS, de um astrocitoma grau III.
2. O perfil imunistoquímico do tumor parental é caracterizado pela expressão dos marcadores neurogliais GFAP, NSE, proteína S-100, Leu-7 e vimentina, e pela ausência de expressão de marcadores de outra linha de diferenciação.
3. O perfil imunistoquímico da linhagem NG97 é caracterizado: (a) pela expressão de GFAP, NSE e proteína S-100, tanto nas células de cultura quanto no xenotransplante; (b) pela produção fraca e focal de Leu-7, apenas nas células de cultura; e (c) pela negatividade para vimentina e demais marcadores histogenéticos em ambas as entidades representativas da linhagem (células em cultura e xenotransplante).
4. Com relação às principais diferenças imunofenotípicas entre as entidades avaliadas: (a) a GFAP foi mais difusa e intensa no tumor parental e células em cultura que no xenotransplante; (b) a positividade para NSE, tanto em frequência como em intensidade, foi maior no tumor original e no xenotransplante que nas células de cultura; (c) a Leu-7 foi difusa e intensa no tumor original, sendo focal e fraca nas células de cultura e ausente no xenotransplante; e que (d) a vimentina foi focal e fraca no tumor original, não sendo expressa na linhagem.
5. Do ponto de vista imunofenotípico, os subtipos da linhagem NG97 representam apenas variantes morfológicas de uma mesma linha de diferenciação (a glial).
6. As características ultraestruturais do xenotransplante são compatíveis com as de uma neoplasia glial indiferenciada, em particular com as de um glioblastoma multiforme; e, finalmente, que, em conjunto com os dados imunofenotípicos, estas características indicam ausência de diferenciação divergente ou de contaminação celular.



**REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC** n. **210**. Brasília, DF, 2003.124p. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2003/140803.htm>. Acesso em 31 de ago. 2005.

ALVES, V. A. F. Garantia de qualidade em imuno-histoquímica. In: ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALLO, J. (Eds.). **Manual de Imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia (SBP), 1999. p. 1-9.

ASHMORE, S. M.; THOMAS, D. G.; DARLING, J. L. Does P-glycoprotein play a role in clinical resistance of malignant astrocytoma? **Anticancer Drugs**, 10(10): 861-72, 1999.

BACCHI, M. M. Linfomas não-Hodgkin de células B. In: ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALLO, J. (Eds.). **Manual de Imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia (SBP), 1999. p. 135-140.

BIGNAMI, A.; ENG, L. F.; DAHL, D.; UYEDA, C.T. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. **Brain Res**, 43(2): 429-435, 1972.

BIGNAMI, A.; DAHL, D. Specificity of glial fibrillary acidic protein for astroglia. **J Histochem Cytochem**, 25(6): 466-9, 1977.

BIGNER, D. D.; BIGNER, S. H.; PONTEN, J.; WESTERMARK, B.; MAHALEY, M. S.; RUOSLAHTI, E. et al. Heterogeneity of genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas. **J Neuropathol Exp Neurol**, 40(3): 201-29, 1981.

BLEGGI-TORRES, L. F. Sistema Nervoso. In: ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALLO, J. (Eds.). **Manual de Imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia (SBP), 1999. p. 105-26.

BOCCHINI, V.; CASALONE, R.; COLLINI, P.; REBEL, G.; LO CURTO, F. Changes in glial fibrillary acidic protein and karyotype during culturing of two cell lines established from human glioblastoma multiforme. **Cell tissue Res**, 265(1): 73-81, 1991.

BONNIN, J. M.; RUBINSTEIN, L. J. Immunohistochemistry of the central nervous system tumors: Its contributions to neurosurgical diagnosis. **J Neurosurg**, 60(6): 1121-33, 1984.

CANDELARIA, M.; DE LA GARZA, J.; DUENAS-GONZALEZ, A. A clinical and biological overview of gastro-intestinal stromal tumors. **Med Oncol**, 22(1): 1-10, 2005.

CARPENTIER, A. F. New therapeutic approaches in glioblastomas. **Bull Cancer**, 92(4): 355-9, 2005.

CHAUVEINC, L.; SOLA-MARTINEZ, M. T.; MARTIN-DUVERNEIL, M.; NAZERON, J. J.; FAILLOT, T.; CORNU, P. et al. Intraarterial chemotherapy with ACNU and radiotherapy in inoperable malignant gliomas. **J Neurooncol**, 27(2): 141-7, 1996.

CHEN, T. C.; HINTON, D. R.; ZIDOVETZKI, R.; HOFMAN, F. M. Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation, and leads to apoptosis in malignant gliomas. **Lab Invest**, 78(2): 165-74, 1998.

CHINOT, O. New place of the chemotherapy in gliomas. **Bull Cancer**, 92(4): 343-54, 2005.

CICERO, T. J.; COWAN, W. M.; MOORE, B. W.; SUNTZEFF, V. The cellular localization of the two brain specific proteins, S-100 and 14-3-2. **Brain Res**, 18(1): 25-34, 1970.

CRAS, P.; MARTIN, J. J.; GHEUENS, J. Gamma-enolase and glial fibrillary acidic protein in nervous system tumors. An immunohistochemical study using specific monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol (Berl.)*, 75(4): 377-84, 1988.

DAUMAS-DUPORT, C.; SCHEITHAUER, B.; O'FALLON, J.; KELLY, P. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer*, 62(10): 2152-65, 1988.

DECLEVES, X.; FAJAC, A.; LEHMANN-CHE, J.; TARDY, M.; MERCIER, C.; HURBAIN, I.; LAPLANCHE, J. L. et al. Molecular and functional MDR1-Pgp and MRPs expression in human glioblastoma multiforme cell lines. *Int J Cancer*, 98(2): 173-80, 2002.

DICKERSIN, G. R. (Ed). **Diagnostic Electron Microscopy: a text/ atlas** (2a. edição). New York: Springer-Verlag, 2000. p. 499-505.

DISERENS, A. C.; TRIBOLET, N.; MARTIN-ACHARD, A.; GAIDE, A. C.; SCHNEGG, J. F.; CARREL, S. Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18. *Acta Neuropathol (Berl)*, 53(1): 21-8, 1981.

DUARTE, M. I. S.; PAGLIARI, C. Moléstias Infecciosas. In: ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALLO, J. (Eds.). **Manual de Imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia (SBP), 1999. p. 195-207.

EDSTRÖM, A.; HAGLID, K. G.; KANJE, M.; RONNBACK, L.; WALUM, E. Morphological alterations and increase of S-100 protein in cultured human glioma cells deprived of serum. *Exp Cell Res*, 83(2): 426-9, 1974.

ELLISON, D.; LOVE, S.; CHIMELLI, L.; HARDING, B.; LOWE, J.; ROBERTS, G. W.; VINTERS, H. V. Classification and General concepts of CNS neoplasms. In: ELLISON, D; LOVE, S. (Eds.). **Neuropathology - a reference text of the CNS pathology**. London: Mosby, 1998. p.34.1-6.

ELLISON, D.; LOVE, S.; CHIMELLI, L.; HARDING, B.; LOWE, J.; ROBERTS, G. W.; VINTERS, H. V. Astrocytic neoplasms. In: ELLISON, D.; LOVE, S. (Eds.). **Neuropathology** - a reference text of the CNS pathology. London: Mosby, 1998. p. 35.1-15.

ENG, L. F.; VANDERHAEGHEN, J. J.; BIGNAMI, A.; GERSTL, B. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. **Brain Res**, 28(2): 351-4, 1971.

ERLANDSON, R. A (Ed.). **Diagnostic Transmission Electron Microscopy of Tumors** with Clinicopathological, Immunohistochemical and Cytogenetic Correlations. New York: Raven Press, 1994. 857p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Center for Biologics Evaluation and Research. **Draft of points to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals**. Rockville, MD, Estados Unidos da América, 1993. 42p. Disponível em: <http://www.fda.gov/cber/gdlns/ptccell.pdf>. Acesso em 31 de ago. 2005.

FIELDS, K. L.; YEN, S. H. A subset of Schwann cells in peripheral nerves contain a 50-kDa protein antigenically related to astrocyte intermediate filaments. **J Neuroimmunol**; 8(4-6): 311-30, 1985.

GHADIALY, F. N. (Ed.). **Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix** (3<sup>a</sup> Ed.). London: Butterworths, 1988. 1340p, v. 2.

GOLDBRUNNER, R. H.; WAGNER, S.; ROOSEN, K.; TONN, J. C. Models for assessment of angiogenesis in gliomas. **J Neurooncol**, 50(1-2): 53-62, 2000.

GOULD, V. E. Histogenesis and differentiation: a re-evaluation of these concepts as criteria for the classification of tumors. **Human Pathol**, 17(3): 212-5, 1986.

GRIPPO, M. C.; PENTEADO, P. F.; CARELLI, E. F.; CRUZ-HOFLING, M. A.; VERINAUD, L. Establishment and partial characterization of a continuous human malignant glioma cell line: NG97. *Cell Mol Neurobiol*, 21(4): 421-8, 2001.

GULLOTTA, F.; SCHINDLER, F.; SCHMUTZLER, R.; WEKSSEIFERT, A. GFAP in brain tumor diagnosis: possibilities and limitations. *Path Res Pract*, 180(1): 54-60, 1985.

HAGLID, K.; CARLSSON, C. A.; STRAVOU, D. An immunological study of human brain tumors concerning the brain specific proteins S-100 and 14.3.2 *Acta Neuropathol*, 24(3): 187-96, 1973.

HAY, R. J. Preservation and Characterization. In: FRESHNEY, R. I. (Ed.). *Animal cell culture – a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1989. p.71-112.

HENRICKS, W. H.; CHU, Y. C.; GOLDBLUM, J. R.; WEISS, S. W. Dedifferentiated liposarcoma: a clinicopathological analysis of 155 cases with a proposal for an expanded definition of dedifferentiation. *Am J Surg Pathol*, 21(3): 271-81, 1997.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol*, 75(6): 816-21, 1981.

HUSAIN, N.; CHIOCCA, E. A.; RAINOV, N.; LOUIS, D. N.; ZERVAS, N. T. Co-expression of Fas and Fas ligand in malignant glial tumors and cell lines. *Acta Neuropathol (Berl)*, 95(3): 287-90, 1998.

JENNINGS, M. T.; PIETENPOL, J. A. The role of transforming growth factor beta in glioma progression. *J Neurooncol*, 36(2): 123-40, 1998.

JESSEN, K. R.; THORPE, R.; MIRSKY, R. Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: an immunoblotting and

immunohistochemistry study of Schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes. **J Neurocytol**, 13(2): 187-200, 1984.

KATO, T.; SAWAMURA, Y.; TADA, M.; SAKUMA, S.; SUDO, M.; ABE, H. p55 and p75 tumor necrosis factor receptor expression on human glioblastoma cells. **Neurol Med Chir**, 35(8): 567-74, 1995.

KAUFMAN, M. W.; MARTI, J. R.; GALLAGER, H. S.; HOEHN, J. L. Carcinoma of the breast with pseudosarcomatous metaplasia. **Cancer**, 53(9): 1908-17, 1984.

KEPES, J. J.; RUBINSTEIN, L. J.; CHIANG, H. The role of astrocytes in the formation of cartilage in gliomas. An immunohistochemical study of four cases. **Am J Pathol**, 117(3): 471-83, 1984.

KERNOHAN, J. W.; MABON, R. F.; SVIEN, H. J.; ADSON, A. W. A simplified classification of gliomas. **Proc Staff Meet Mayo Clin**, 24(1): 71-5, 1949.

KIMMEL, D. W.; SHAPIRO, J. R.; SHAPIRO, W. R. In vitro drug sensitivity testing in human gliomas. **J Neurosurg**, 66(2): 161-71, 1987.

KIMURA, T.; BUDKA, H.; SOLER-FEDERSPIEL, S. An immunocytochemical comparison of the glia-associated proteins glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S-100 protein (S100P) in human brain tumors. **Clin Neuropathol**, 5(1): 21-7, 1986.

KLEIHUES, P.; CAVENEE, W. K. (Eds.). **World Health Organization Classification of Tumours- Pathology & Genetics of Tumours of the Nervous System**. Lyon: IARC Press, 2000. 314p.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, 256 (5517): 495-7, 1975.

KRUSE, C. A.; VARELLA-GARCIA, M.; KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B. K.; OWENS, G. C.; SPECTOR, E. B.; FAKHAI, H. et al. Receptor expression, cytogenetic, and molecular analysis of six continuous human glioma cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol – Animal*, 34(6): 455-62, 1998.

KUKLINSKI, S.; PESHEVA, P.; HEIMANN, C.; URSHEL, S.; GLOOR, S.; GRAEBER, S. et al. Expression pattern of galectin-3 in neural tumor cell lines. *J Neurosci Res*, 60(1): 45-57, 2000.

LANGDON, S. P. Basic Principles of Cancer Cell Culture. In: LANGDON, S. P (Ed.). **Methods in Molecular Medicine: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols**. Totowa (EUA): Humana Press Inc., 2003a. pp3-15, vol.88.

LANGDON, S. P. Characterization and Authentication of Cancer Cell Lines. In: LANGDON, S. P (Ed.). **Methods in Molecular Medicine: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols**. Totowa (EUA): Humana Press Inc., 2003b. p. 33-42, vol.88.

LIWNICZ, B. H.; ARCHER, G.; SOUKUP, S. W.; LIWNICZ, R. G. Continuous human glioma-derived cell lines UC-11MG and UC-302MG. Morphologic, immunocytochemical and chromosomal characterization. *J Neurooncol*, 3(4): 373-85, 1986.

LOEFFEL, S. C.; GILLESPIE, G.; MIRMIRAN, A. S.; MILLER, E. W.; GOLDEN, P.; ASKIN, F. B. et al. Cellular immunolocalization of S-100 protein within fixed tissue sections by monoclonal antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 109(2): 117-22, 1985.

LUDWIN, S. K.; KOSEK, J. C.; ENG, L. F. The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. *J Comp Neurol*, 165(2): 197-208, 1976.

MACHADO, C. M.; SCHENKA, A. A.; VASSALLO, J.; TAMASHIRO, W. M.; GONÇALVES, E. M.; GENARI, S. C.; VERINAUD, L. Morphological characterization of a human glioma cell line. **Cancer Cell Int.** 5(1): 13, 2005.

*MARKED.* In: **Oxford Advanced Learner's Dictionary.** Oxford: Oxford University Press, 1989.

MASTERS, J. R. HeLa cells 50yr on: the good, the bad, and the ugly. **Nature Rev Cancer,** 2(4): 315-18, 2002.

MAUNOURY, R.; DELPECH, A.; DELPECH, B.; VIDARD, M. N.; VEDRENNE, C.; CONSTANS, J. P. et al. Localisation de la protéine gliofibrillaire (GFAP) par immunocytochimie dans le tumeurs cérébrales humaines. **Neurochirurgie,** 23 (3): 173-85, 1977.

MAZZUCHELLI, L. Protein S100A4: too long overlooked by pathologists? **Am J Pathol,** 1(160): 7-13, 2002.

MCKEEVER, P. E.; DAVENPORT, R. D.; SHAKUI, P. Patterns of antigenic expression of human glioma cells. **Crit Rev Neurobiol,** 6(2): 119-47, 1991.

MELLO, E. S.; ALVES, V. A. F. Marcadores de proliferação celular. In: ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALLO, J. (Eds.). **Manual de Imuno-histoquímica.** São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia (SBP), 1999. p. 182-94.

MOLLER, M.; INGILD, A.; BOCK, E. Immunohistochemical demonstration of S-100 protein and GFA protein in interstitial cells of rat pineal gland. **Brain Res,** 140(1): 1-13, 1978.

MORRISON, C. D.; PRAYSON, R. A. Immunohistochemistry in the diagnosis of neoplasms of the central nervous system. **Seminars in Diagnostic Pathology**, 17(3): 204-15, 2000.

NAKAJIMA T, WATANABE S, SATO Y, KAMEYA, T.; HIROTA, T.; SHIMOSATO, Y. An immunoperoxidase study of S-100 protein distribution in normal and neoplastic tissues. **Am J Surg Pathol**, 6(8): 715-27, 1982.

NAKANE, P. K.; PIERCE JR, G. B. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. **J Histochem Cytochem**, 14(8): 929-31, 1966.

*NOTICIABLE*. In: **Collins GEM English-Portuguese Dictionary**. London: William Collins Sons & Co Ltd., 1987.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Epidemiology and etiology of gliomas. **Acta Neuropathol (Berl)**, 109(1): 93-108, 2005.

OSBORN, M.; LUDWIG-FESTL, M.; WEBER, K.; BIGNAMI, A.; DAHL, D.; BAYREUTHER, K. Expression of glial and vimentin type intermediate filaments in cultures derived from human glial material. **Differentiation**, 19(3): 161-7, 1981.

PAETAU, A.; VIRTANEN, I.; STENMAN, S.; KURKI, P.; LINDER, E.; VAHERI, A. et al. Glial fibrillary acidic protein and intermediate filaments in human glioma cells. **Acta Neuropathol (Berl)**, 47(1): 71-4, 1979.

PERZELOVA, A.; MACIKOVA, I.; MRAZ, P.; BIZIK, I.; STENO, J. Characterization of two new permanent glioma cell lines 8-MG-BA and 42-MG-BA. **Neoplasma**, 45(1): 25-9, 1998.

POIRIER, J.; GRAY, F.; GHERARDI, R. L'Immuno-histochemie des tumeurs du système nerveux. *Ach Anat Cytol Path*, 35(2): 116-27, 1987.

RAMAEKERS, F. C. S.; PUTS, J. J. G.; MOESKER, O.; KANT, A.; HUYSMANS, A.; HAAG, D. et al. Antibodies to intermediate filament proteins in the immunohistochemical identification of human tumors: an overview. *Histochem J* 15(7): 691-713, 1983.

RODNIGHT, R.; GONÇALVES, C. A.; WOFCHUCK, S. T.; LEAL, R. Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acid protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions possible key factor in astrocytic plasticity. *Braz J Med Biol Res*,30(3): 325-38, 1997.

ROSSMAN, T. G.; GONCHAROVA, E. I.; NADAS, A. Modeling and measurement of the spontaneous mutation rate in mammalian cells. *Mutat Res*, 328(1): 21-30, 1995.

ROYDS JA, PARSONS MA, TAYLOR CB; TIMPERLEY, W. R. Enolase isoenzyme distribution in the human brain and its tumours. *J Pathol*, 137(1): 37-49, 1982.

RUTKA, J. T.; ACKERLEY, C.; HUBBARD, S.; TILUP, A.; DIRKIS, P. B.; JUNG, S. et al. Characterization of glial filament-cytoskeletal interactions in human astrocytomas: an immuno-ultrastructural analysis. *Eur J Cell Biol*, 76(4): 279-87, 1998.

RUTKA, J. T.; HUBBARD, S. L.; FUKUYAMA, K.; MATSUZAWA, K.; DIRKS, P. B.; BECKER, L. E. Effects of antisense glial fibrillary acidic protein complementary DNA on the growth, invasion and adhesion of astrocytoma cells. *Cancer Res*, 54(12): 3267-72, 1994.

SAROJA, K. R.; MANSELL, J.; HENDRICKSON, F. R.; COHEN, L.; LENOX, A. Failure of accelerated neuron therapy to control high grade astrocytomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 17(6): 1295-97, 1989.

SARRIA, A. J.; LIEBER, J. G.; NORDEEN, S. K.; EVANS, R. M. The presence or absence of a vimentin-type intermediate filament network affects the shape of the nucleus in human SW-13 cell. **J Cell Sci**, 107(Pt 6): 1593-607, 1994.

SCHENKA, A. A.; MACHADO, C. M. L.; GRIPPO, M. C.; QUEIROZ, L. S.; SCHENKA, N. G. M.; CHAGAS, C. A. et al. Immunophenotypic and ultrastructural validation of a new human glioblastoma cell line. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 25(5): 929-41, 2005.

SCHIFFER, D.; GIORDANA, M. T.; MAURO, A.; MIGHELI, A.; GERMANO, I.; GIACCONE, G. Immunohistochemical demonstration of vimentin in human cerebral tumors. **Acta Neuropathol (Berl.)**, 70(3-4): 209-19, 1986.

SCHMECHEL, D.; MARANGOS, P. J.; BRIGHTMAN, M. Neuron-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. **Nature**, 276(5690): 834-36, 1978.

SCHMITT, F. C. Autópsias, Biópsias, Citopatologia e outros métodos de investigação em patologia: o que são e como são utilizados. In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. (Eds.). **Patologia - Processos gerais** (4ª Edição). São Paulo: Atheneu, 1999. p. 288-89.

SCHNITZER, J.; FRANKE, W. W.; SCHACHNER, M. Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. **J Cell Biol**, 90(2): 435-47, 1981.

SESHI, B.; TRUE, L.; CARTER, D.; ROSAI, J. Immunohistochemical characterization of a set of monoclonal antibodies to human neuro-specific enolase. **Am J Pathol**, 131(2): 258-69, 1988.

SHAPIRO, J. R.; SHAPIRO, W. R. The subpopulations and isolated cell types of freshly resected high grade human gliomas: their influence on the tumor's evolution in vivo and behavior and therapy in vitro. **Cancer Metastasis Rev** , 4(2): 107-24, 1985.

SOARES, F. A.; ARIAS, V. E. A. Linfomas Não Hodgkin de células T. In: ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALLO, J. (Eds.). **Manual de Imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia (SBP), 1999. p. 141-51.

SOLIMENE, A. C. C.; CARNEIRO, C. R. W.; MELATI, I.; LOPES, J. D. Functional differences between two distinct cell subpopulations within a human colorectal carcinoma cell line. **Brazilian journal of Medical and Biological Research**, 34(5): 653-61, 2001.

STERNBERGER, L. A.; HARDY, P. H.; CUCULIS, J. J.; MEYER, H. G. The unlabelled antibody-enzyme method of immunocytochemistry. Preparation and properties of soluble antigen antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. **J Histochem Cytochem**, 18(5): 315-33, 1970.

STEWART, D. J.; DAHROUGE, S.; AGBOOLA, O.; GIRARD, A. Cranial radiation and concomitant cisplatin and mitomycin-C plus resistance modulators for malignant gliomas. **J Neurooncol**, 32(2): 161-68, 1997.

TAKEKAWA, Y.; UMEZAWA, T.; UENO, Y.; SAWADA, T.; KOBAYASHI, M. A case of undifferentiated glioma in a 70-year-old woman. **Brain Tumor Pathol**, 18(1): 55-60, 2001.

TAKESHITA, I.; SAWA, H.; NAKAMURA, T.; KURAMITSU, M.; KITAMURA, K.; FUKUI, M. Contrary effect of lactic acid expression of neuron-specific enolase and glial fibrillary acidic protein in human glioma cells. **Acta Neuropathol (Berl)**, 79(5): 506-12, 1990.

TAPIA, F. J.; POLAK, J. M.; BARBOSA, A. J. A.; BLOOM, S. R.; MARANGOS, P.J.; DERMODY, C. et al. Neuron-specific enolase is produced by neuroendocrine tumors. **Lancet**, 1(8224): 808-11, 1981.

UYEDA, C. T.; ENG, L. F.; BIGNAMI, A. Immunological study of the glial fibrillary acidic protein. **Brain Res**, 37(1): 81-9, 1972.

VASSALLO, J. Hematopatologia, aspectos gerais. In: ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALLO, J. (Eds.). **Manual de Imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia (SBP), 1999. p. 127-34.

VIALE, G.; GAMBACORTA, M.; COGGI, G.; DELL'ORTO, P.; MILANI, M.; DOGLIONI, C. Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in normal and diseased human breast. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, 418(4): 339-48, 1991.

VINORES, A. S.; BONNIN, J. M.; RUBINSTEIN, L. J.; MARANGOS, P. J. Immunohistochemical demonstration of neuron-specific enolase in neoplasms of the CNS and other tissues. **Arch Pathol Lab Med**, 108(7): 536-40, 1984a.

VINORES, A. S.; MARANGOS, P. J.; BONNIN, J. M.; RUBINSTEIN, L. J. Immunoradiometric and immunohistochemical demonstration of neuro-specific enolase in experimental rat gliomas. **Cancer Res**, 44(6): 2595-9, 1984b.

VINORES, A. S.; RUBINSTEIN, L. J. Simultaneous expression of glial fibrillary acidic (GFA) protein and neuron-specific enolase (NSE) by the same reactive or neoplastic astrocytes. **Neuropathol Appl Neurobiol**, 11(5): 349-59, 1985.

VON DEIMLING, A.; LOUIS, D. N.; WIESTLER, O. D. Molecular pathways in the formation of gliomas. **Glia**, 15(3): 328-38, 1995.

WEINSTEIN, R. S.; KORNBLITH, P. L. Ultrastructure of a cloned astrocytoma in tissue culture. *Cancer*, 27(5): 1174-80, 1971.

WELCH, W. C.; MORRISON, R. S.; GROSS, J. L.; GOLLIN, S. M.; KITSON, R. B.; GOLDFARB, R. H et al. Morphologic, immunologic, biochemical, and cytogenetic characteristics of the human glioblastoma-derived cell line, SNB-19. *In Vitro Cell Dev. Biol – Animal*, 31(8): 610-16, 1995.

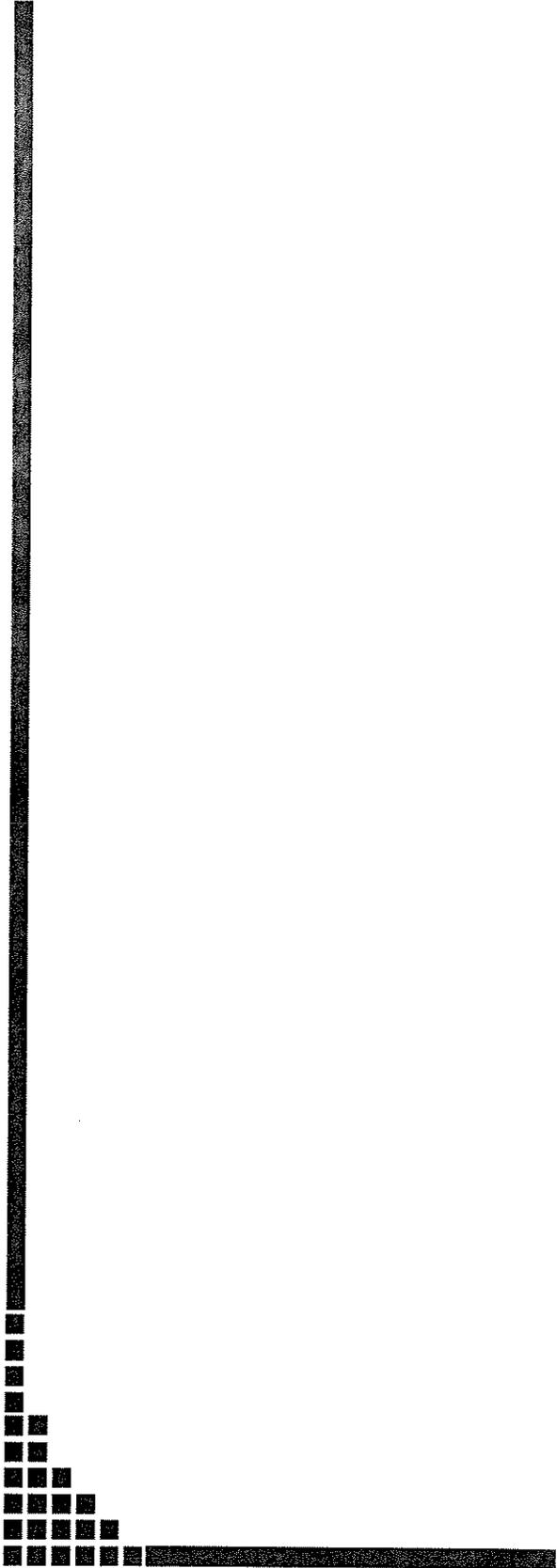
WESTPHAL, M., HANSEL, M.; NAUSCH, H.; ROHDE, E.; KOPPEN, J.; FIOLA, M. et al. Glioma biology in vitro: goals and concepts. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*, 43:107-13, 1988.

WICK, M. R.; SCHEITHAUER, B. W.; KOWACS, K. Neuron-specific enolase in neuroendocrine tumors of the thymus, bronchus, and skin. *Am J Clin Pathol*, 79(6): 703-7, 1983.

WINGER, M. J.; MACDONALD, D. R.; CAIRNCROSS, J. G. Supratentorial anaplastic gliomas in adults. *J Neurosurg*, 71(4): 487-93, 1989.

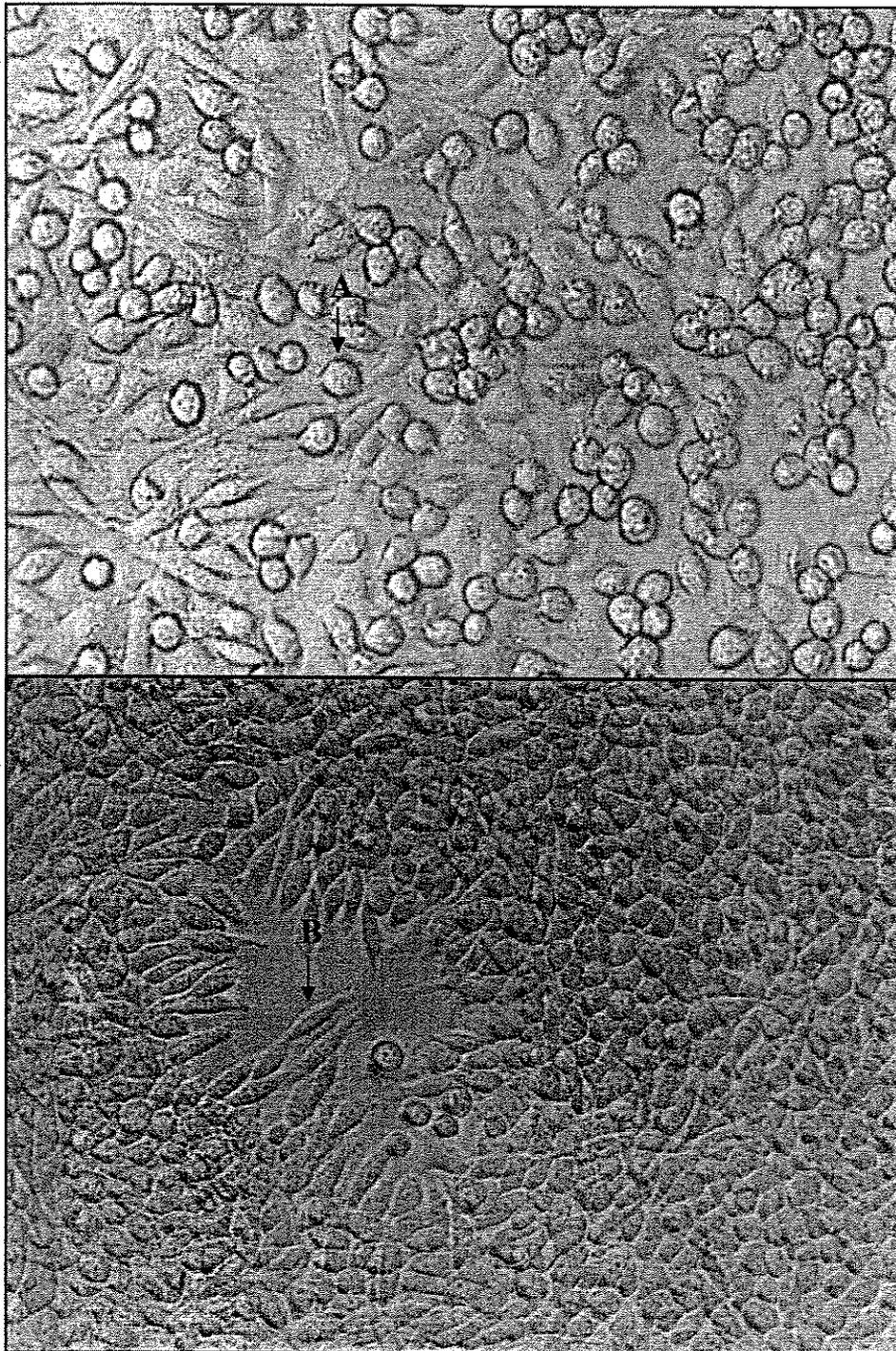
YUNG, W. K. In vitro chemosensitivity testing and its clinical application in human gliomas. *Neurosurg Rev*, 12(3): 197-203, 1989.

ZIMMER, D. B.; VAN ELDIK, L. J. Analysis of the calcium-modulated proteins, S100 and calmodulin, and their target proteins during C6 glioma cell differentiation. *J Cell Biol. Jan*, 108(1): 141-51, 1989.



# ANEXOS

**ANEXO 1.**



**Anexo 1.** População bifásica de células NG97 em cultura, observadas ao microscópio de contraste de fase (Fotomicrografia gentilmente cedida pela Dra. Liana Verinaud). A= célula redonda; B= células fusiforme. Magnificação original: 200X.

## ANEXO 2.

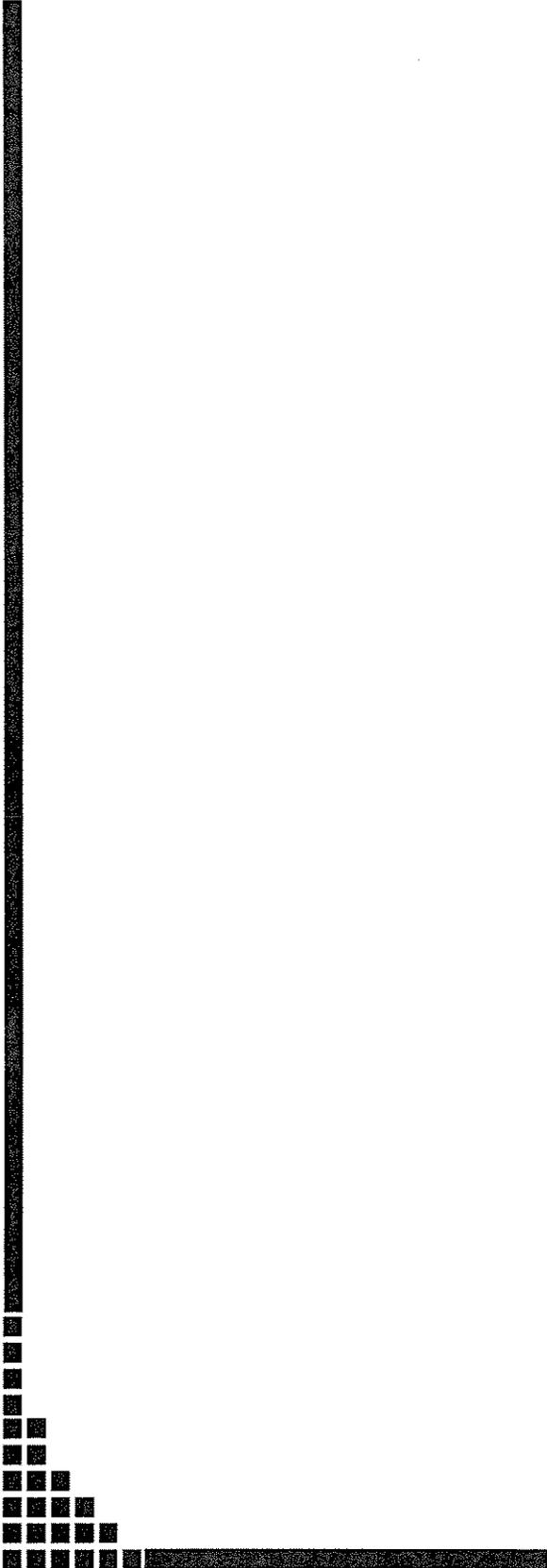
### Camundongos *nude*

O camundongo *nude* recebe este nome graças ao fato de não apresentar pêlos (**vide figura abaixo**) quando portador do gene recessivo mutante *nu* em homozigose (*nu/nu*). Nesta condição, além de não possuir pêlos, o animal também nasce sem timo, o que o impossibilita de gerar linfócitos T maduros. A falta destas células por sua vez, o impede de desenvolver uma série de respostas imunes, tais como: produção de anticorpos mediada por linfócitos T auxiliares CD4+, hipersensibilidade tardia (que requer linfócitos T CD4+), destruição de células infectadas por vírus ou de células malignas (que requer linfócitos CD8+ citotóxicos) e rejeição a enxertos (que requer tanto linfócitos CD4+ quanto CD8+).

A ausência de células T funcionantes impede camundongos *nude* de rejeitar não apenas aloenxertos como também xenoenxertos. Sua capacidade de manter tecido humano os torna ferramentas úteis na investigação de inúmeras questões em Imunologia e Oncologia.

(Adaptado de “The Nude Mouse”, por John W. Kimball, artigo disponível em: <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/N/NudeMouse.html>. Acesso: 11 de set. 2005).

**Anexo 2.** Camundongo *nude* portando xenoenxerto da linhagem NG97 (cortesia da Dra. Liana Verinaud).



## APÊNDICES

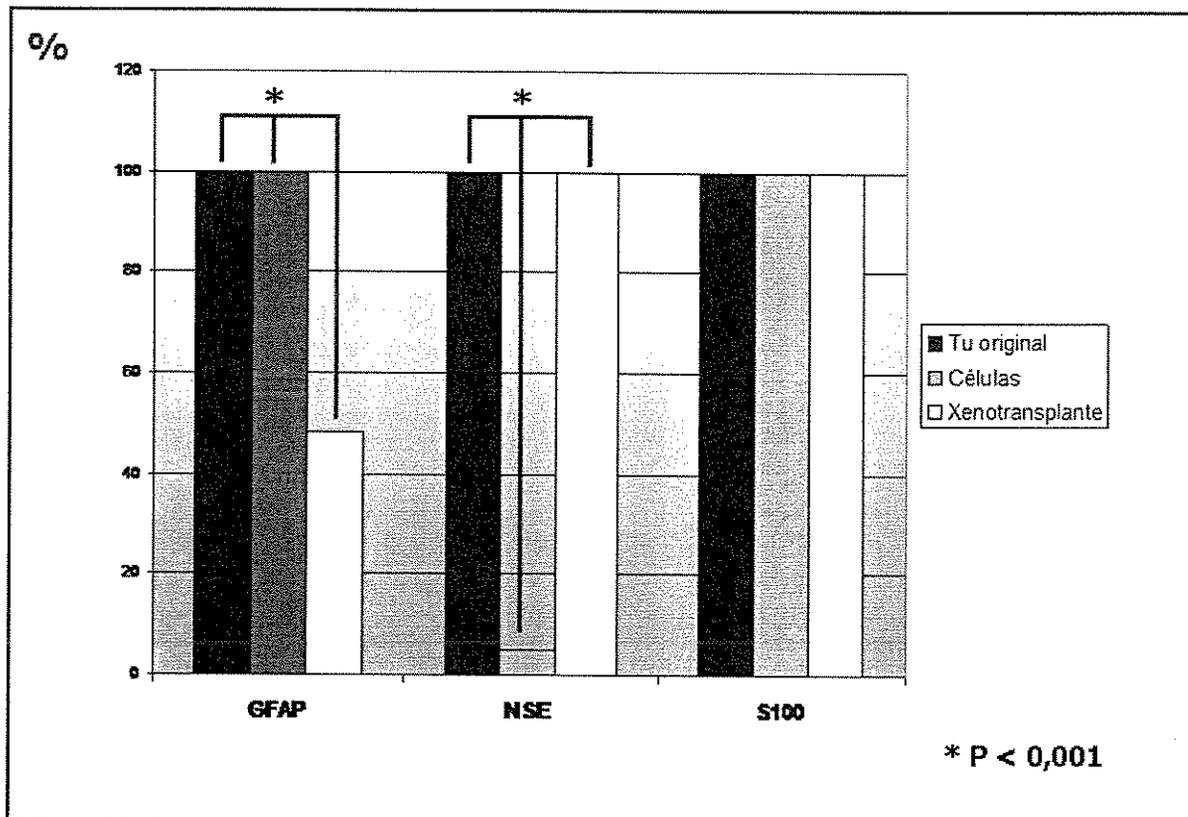
**APÊNDICE 1. Marcadores histogenéticos, padrões de positividade típicos e respectivos controles positivos.**

<b>Marcador</b>	<b>Padrão de positividade</b>	<b>Controle positivo</b>
GFAP	Citoplasma	Astrocitoma
Vimentina	Citoplasma	Tecido conjuntivo
S-100	Núcleo/citoplasma	Schwannoma
NSE	Citoplasma	Tumor carcinóide
Leu-7	Membrana/ citoplasma	Linfonodo
HMB45	Citoplasma	Melanoma
Neurofilamento	Citoplasma	Cérebro normal
Cromogranina	Citoplasma, granular	Tumor carcinóide
Sinaptofisina	Citoplasma	Tumor carcinóide
AE1/AE3	Citoplasma	Pele normal
35 $\beta$ H11/ck8	Citoplasma	Pulmão
34 $\beta$ E12	Citoplasm	Pele normal
Desmina	Citoplasma	Músculo estriado
1A4	Citoplasma	Músculo liso
HHF35	Citoplasma	Músculo liso
MyoD1	Núcleo	Rabdomiossarcoma
CD34	Citoplasma/membrana	Tecido conjuntivo (vaso)
CD45	Membrana/ citoplasma	Linfonodo
CD20	Membrana/ citoplasma	Linfonodo
CD68	Citoplasma/membrana	Linfonodo
Ki67	Núcleo	Carcinoma <i>oat cell</i>

*GFAP= proteína ácida fibrilar glial; S100= proteína S100; NSE= enolase neurônio-específica; Leu-7= marcador neural (CD57); HMB45= marcador melanocítico; AE1/AE3= citoqueratinas; 35 $\beta$ H11= citoqueratina de baixo peso molecular; 34 $\beta$ E12= citoqueratina de alto peso molecular; 1A4= actina muscular lisa; HHF35= actina muscular específica; MyoD1= marcador de músculo esquelético; CD34= marcador de*

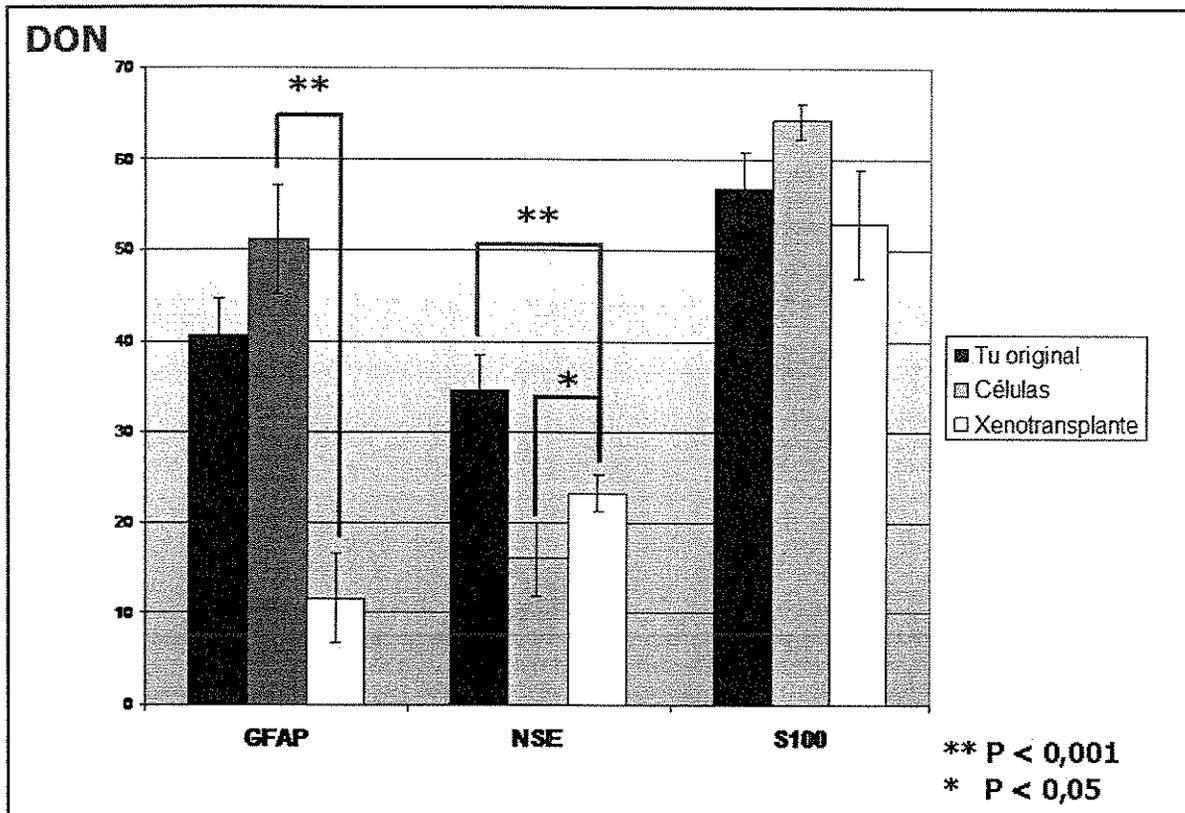
*endotélio; CD45= marcador pan-leucocitário; CD20= marcador pan-B; CD68= marcador macrofágico; Ki67= marcador nuclear de proliferação celular.*

**APÊNDICE 2.** Análise comparativa entre o tumor parental, as células NG97 em cultura e o xenotransplante quanto à frequência de células positivas para os principais marcadores neurogliais (GFAP, NSE e S-100).



*GFAP= proteína acídica fibrilar glial; S100= proteína S100; NSE= enolase neurônio-específica.*

**APÊNDICE 3.** Análise comparativa entre o tumor parental, as células NG97 em cultura e o xenotransplante quanto à intensidade de positividade para os principais marcadores neurogliais (GFAP, NSE e S-100).



*DON= densidade óptica média normalizada; GFAP= proteína acídica fibrilar glial; S100= proteína S100; NSE= enolase neurônio-específica.*