



Camila Maria Longo Machado

**"ANÁLISE MORFOLÓGICA, CITOGÉNÉTICA E IMUNOFENOTÍPICA DE UMA LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA HUMANO: NG97".**

2004 08 28 84

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular na Área de Imunologia.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Camila Maria Longo Machado e aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Liana Verinaud

2004



IDADE BC  
CHAMADA T/UNICAMP  
M18a  
EX  
MBO BC/ 58314  
OC 16-117-04  
D X  
EÇO R\$ 11,00  
ITA  
CPD

CM00198070-B

BIBID 316907

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

**M18a** **Machado, Camila Maria Longo**  
Análise morfológica, citogenética e imunofenotípica de uma linhagem de glioblastoma humano: NG97/ Camila Maria Longo Machado. -- Campinas, SP: [s.n.], 2004.

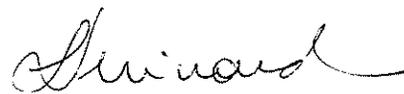
Orientadora: Liana Verinaud  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1. Células -- Cultura. 2. Linhagem (Genética). 3. Tumores. I. Verinaud, Liana.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

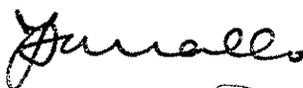
**Data da Defesa: 13/02/04**

**Banca examinadora:**

**Profa. DRA. LIANA MARIA VERINAUD (ORIENTADORA):**



**Prof. DR. JOSÉ VASSALO:**



**Profa. DRA. SELMA C. GENARI:**



**Profa. DRA. WIRLA M.S.C. TAMASHIRO:**

**Profa. Dra. CLARICE W. ARNS:**

*Pesquisar é preciso, viver não é preciso.*  
*Parafrazeando Fernando Pessoa.*

**Aos meus pais e Avó Mabel,**  
*dedico este trabalho.*

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo, em colaboração com os Laboratórios de Patologia Experimental do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UNICAMP, Campinas, São Paulo e Laboratório de Procedimentos Especializados do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher - CAISM da UNICAMP, Campinas, São Paulo .

## *AGRADECIMENTOS*

Gostaria de agradecer a todos que participaram direta ou indiretamente do processo de confecção desta tese de mestrado, e já peço perdão se esquecer de algum nome, pois meu fraco sempre foi, e provavelmente sempre será, a memória.

Àqueles que lembrei, os nomes...

Aos meus pais, Diva Longo Machado e Luis Carlos S. Machado, por terem me apoiado em cada momento acadêmico e pessoal.

À minha avó, Mabel Longo Hataka pelo apoio emocional que lhe é peculiar.

Aos meus irmãos (Gustavo e Márcia) por não terem me atrapalhado nos momentos de estudo e por aturarem minhas exigências “comedidas” de silêncio.

À minha orientadora Liana M. Cardoso Verinaud, cuja paciência, compreensão, inteligência, carinho e jogo de cintura permitiram não só que o projeto se transformasse em tese como também dera-me suporte científico e por que não psíquico?

À prof. Dra. Christine Haeckel pelas idéias flamejantes.

À prof. Dra. Wírla Tamashiro pelas idéias iluminadoras e pela permissão da utilização do laboratório 1.

Aos meus amigos em geral, que aturaram os meus desvios de comportamento leves...ou não, em especial (“elenco” em ordem “analfabética”): Adriane Oliveira, Alexandre Hataka, Analia Cheriavisk, André C. Oliveira (Orc), André Ricardo R. da Silva (Não há o que dizer...só MUITO, obrigada), Andréia Rodrigues Neves, Arrturr Kepler, Cristina (Maria) L.C. Dias, Fabiana Bianchini, Fernando L.C.Dias, Fernando da Márcia, Gisele Cheriario, , Leandro Hataka, Luciana Monteiro, Juliana Morais Canellas, Regiane

Rodrigues, Roseli Longo de Oliveira, Ruxeli M. Loya, Paula Cristina Souza Souto, Victor Santoro (Né!), Vânia N. Brito, etc...

À todos meus tios pelo suporte e risadas, em especial: Danilo Hataka, Wanda e Daguzan L.C. Dias e Darcy Longo de Oliveira.

À bióloga Responsável pelo laboratório 3 da Imuno, Rosimeire Florença e Dirce Gabriel, muito obrigada pelo apoio técnico.

Aos Alunos de iniciação Tati e Felipe...um pé após o outro hein!?

À Prof. Dra. Selma Genari e Estela Gonçalves pelo apoio em Biologia Celular.

À Prof. Dra. Fátima Botcher Luiz e Juliana Heinrich pelo apoio em citogenética e pela cessão do Laboratório de Patologia Experimental.

À Sandra pelo apoio técnico em citogenética, mas espiritual e emocional...quando eu menos imagino você aparece!

Ao Prof. Dr. José Vassalo pelos anticorpos e laboratório cedidos.

Gostaria de oferecer esta tese "*in memoriam*" a meu Avô José Luiz Machado, e Tios Tico e Plínio Longo.

## **RESUMO**

**MACHADO, C.M.L. “ANÁLISE MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E IMUNOFENOTÍPICA DE UMA LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA HUMANO: NG97”. Dissertação de Mestrado, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP.**

Culturas de células malignas podem proporcionar múltiplos modelos experimentais, sendo instrumentos valiosos para a avaliação dos eventos metabólicos e fatores fisiológicos inerentes aos tumores, investigação dos mecanismos de resistência à drogas e para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Recentemente, uma nova linhagem celular de glioma, denominada NG-97, foi estabelecida em nosso laboratório a partir de tecido de paciente diagnosticado com astrocitoma grau III. Esta linhagem foi subcultivada “*in vitro*”, por mais de 100 passagens, em meio-padrão de cultura de células. Inicialmente, duas populações celulares morfológicamente distintas puderam ser observadas após o estabelecimento da linhagem: uma composta por células pequenas e arredondadas e outra composta por células maiores, do tipo dendríticas. Em passagens elevadas, as células apresentaram um tempo de duplicação de 72 horas, com eficiência de plaqueamento de 1%. Ainda, a injeção das células da linhagem NG-97 em camundongos congenitamente atímicos induziu a formação de massas tumorais sólidas, que podiam ser re-transplantadas a cada quatro semanas, indicando seu caráter maligno. Células obtidas da massa tumoral, quando colocadas em cultura, apresentaram morfologia comparável com as células da cultura original.

O objetivo do presente trabalho foi o estudo mais aprofundado das características morfológicas, genéticas e fenotípicas das células da linhagem NG97, visando a utilização desta linhagem como ferramenta de estudo, tanto para um melhor entendimento da biologia dos gliomas como para o desenvolvimento de novos agentes com potencial valor terapêutico.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	13
3.1. Manutenção da linhagem NG-97 .....	14
3.2. Preparo de lâminas para análise imunocitoquímica e análise citológica.....	14
3.3. Preparo das células para análise citogenética da linhagem NG-97.....	15
3.4 Procedimentos em Imunocitoquímica.....	16
3.5. Microscopia de Contraste de Fase.....	17
3.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.).....	17
3.7 Padrão de Crescimento.....	18
4. RESULTADOS.....	19
4.1. Análise citológica em Microscópio Óptico Comum.....	20
4.2. Análise citogenética das células da linhagem NG97.....	20
4.3. Análise Imunocitoquímica.....	23
4.4. Análise do Padrão de crescimento.....	25
4.5. Análise morfológica ao Microscópio Eletrônico de Varredura (M.E.V).....	27
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSOES.....	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
8. ABSTRACT.....	51
9. ABREVIATURAS.....	53

## ***1. INTRODUÇÃO***

---

Gliomas são os tumores primários mais comuns do Sistema Nervoso Central (SNC), podendo-se originar a partir de células gliais como astrócitos, oligodendrócitos, células ependimais e células do plexo coróide (PARNEY *et al*, abril 2000). Respondem por cerca de 3,9 óbitos/100.000 habitantes/ano e representam aproximadamente 50% das neoplasias de S.N.C.

A classificação dos gliomas humanos é feita com base em critérios histopatológicos. Atualmente, utiliza-se mais a determinada pela Organização Mundial de Saúde ( O .M.S) , através de critérios histológicos e de acordo com os diferentes graus de malignidade, que os divide em astrocitomas (graus II, III e IV), oligodendrogliomas (anaplásicos e de grau II) e oligodendroastrocitomas (graus II, III e IV) (LOUIS *et al*, 2001). Os critérios utilizados na determinação da classe tumoral, em astrocitomas está apresentada na tabela 1.

**Tabela 1 :** Gradação de diagnóstico dos gliomas de origem astrocitária dada pela Organização Mundial de Saúde

<b>Grau</b>	<b>Designação</b>	<b>Critério Histológico</b>
I	Astrocitoma pilocítico	
II	Astrocitoma difuso <b>Baixo grau</b>	Atipia nuclear
III	Astrocitoma Anaplásico	Atipia nuclear e mitose
IV	Glioblastoma Multiforme	Atipia, mitose, necrose e/ou vascularização

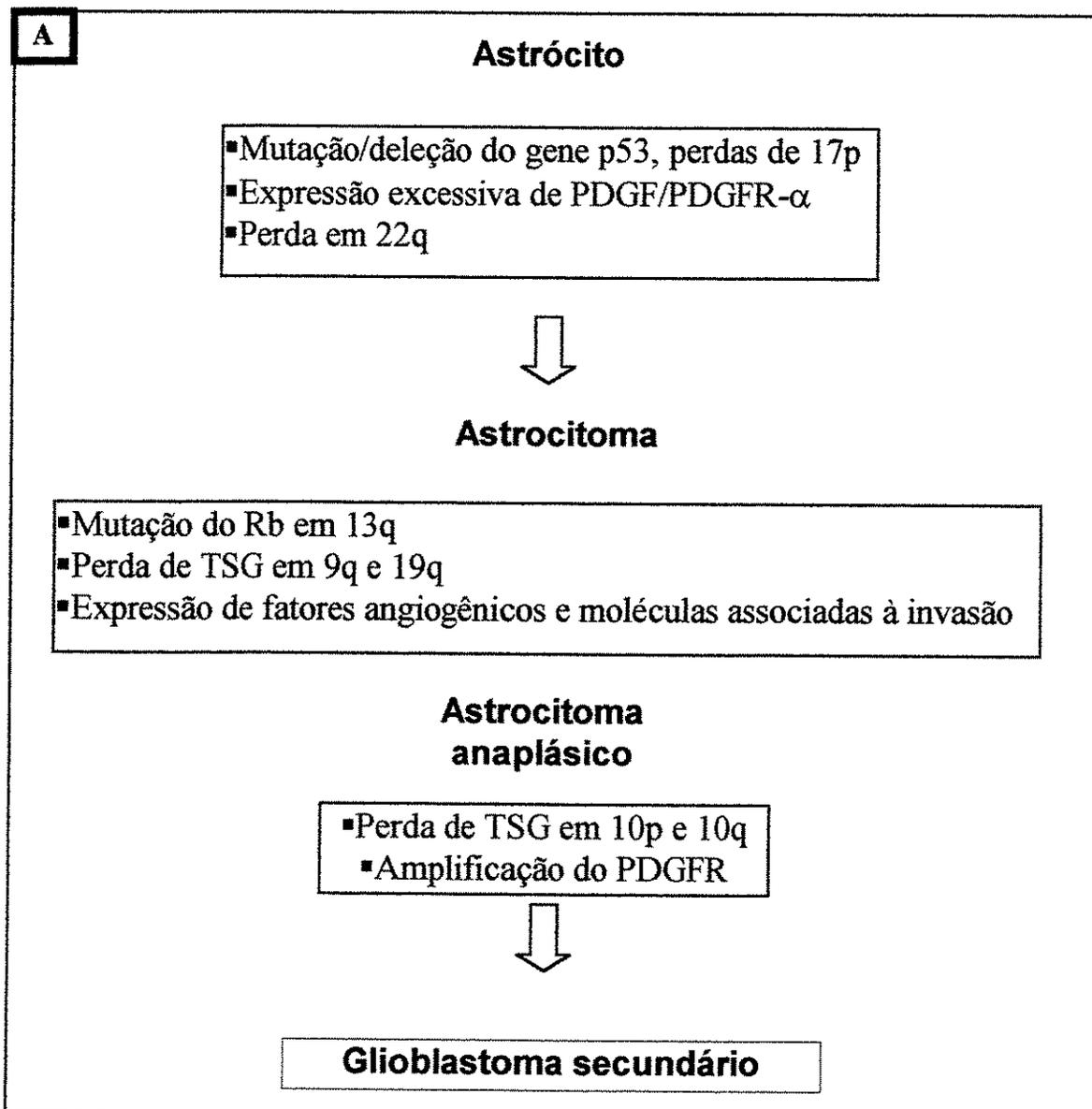
O astrocitoma de grau IV, também denominado de glioblastoma multiforme, é extremamente agressivo uma vez que a massa tumoral cresce rapidamente, e invasivo pelo fato de ocorrer reincidência muito rápida após ressecção do tumor. A presença deste tipo tumoral é deflagrada por um comprometimento variado das funções neurológicas, de acordo com a região do cérebro afetada. A média de vida dos pacientes acometidos por este tipo de tumor, e que sofrem ressecção cirúrgica, não supera dois anos (PARNEY *et al*, 2000). O alto índice de mortalidade é devido ao fato de o tratamento convencional não apresentar grande eficácia pois é dificultado pela alta heterogeneidade apresentada por este tipo tumoral. Pesquisas recentes vêm sendo realizadas no sentido de estabelecer uma relação entre a progressão genética e a progressão clínica com a finalidade de padronizar o diagnóstico para o desenvolvimento de novas e eficazes terapias.

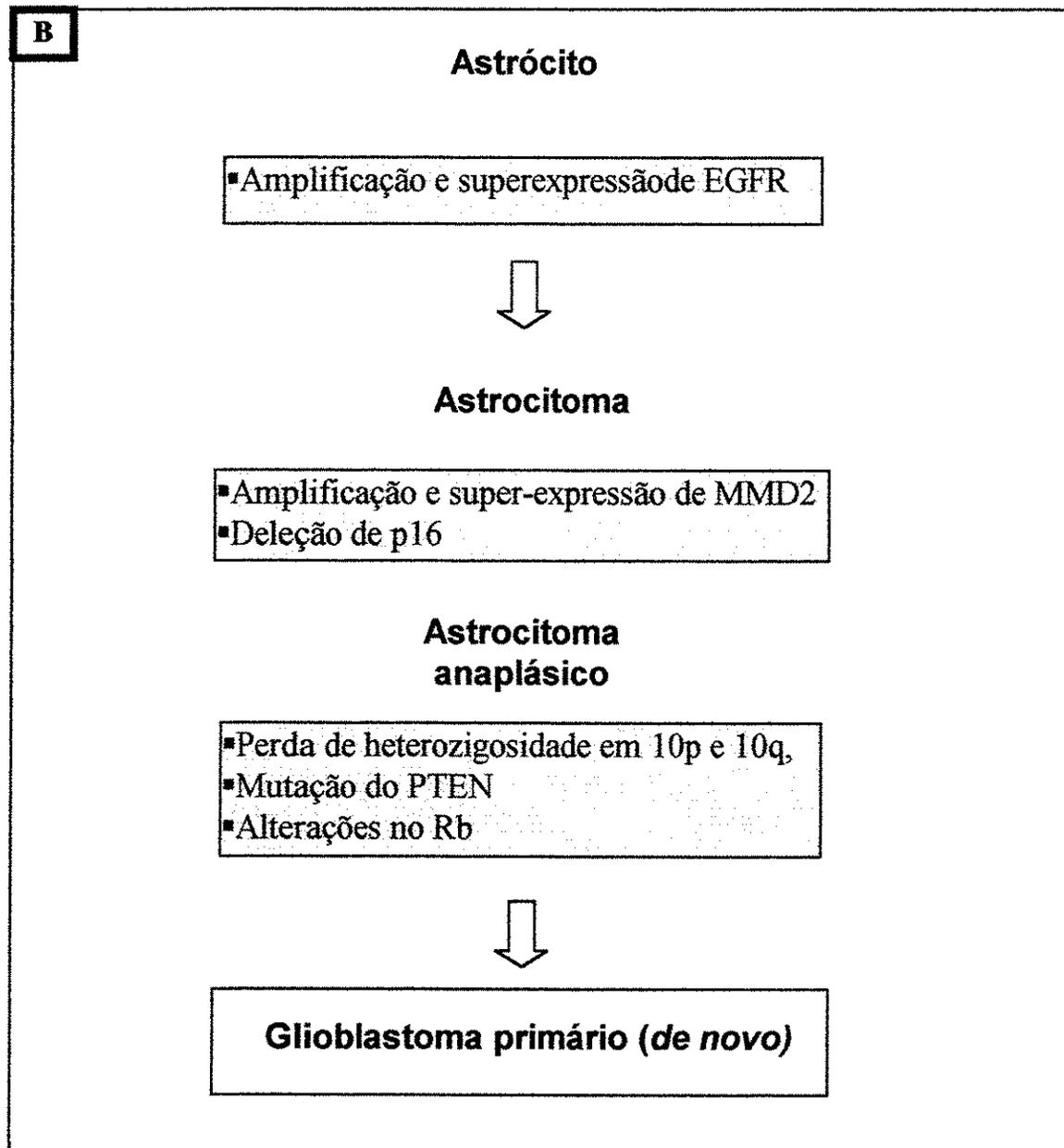
A maioria das investigações tem demonstrado que as alterações genéticas estão ligadas principalmente a dois eventos : (i) perdas de funções em genes supressores de tumor responsáveis pelo controle da proliferação e diferenciação celulares; e (ii) pela super expressão de proto-oncogenes, que levam ao desenvolvimento da neoplasia (OSBORNE *et al*, 2001).

Em gliomas, muitas das alterações observadas envolvem genes que controlam a transição da fase G1 para a fase S durante o ciclo celular. Mutações ou deleções em genes como o p53, retinoblastoma (RB1) e Kinase dependente de AMPc (CDKN2) A/B alteram o ciclo celular. Além disso, muitos genes produzem proteínas que podem alterar as funções de outros genes. O gene CDKN2, por exemplo, codifica a proteína p16 que atua sobre a proteína Rb, inibindo o evento de fosforilação de CDK4/ciclina D a qual é

importante para a regulação do ciclo celular. Amplificações e super-expressão de genes, tais como CDK4 (kinase dependente de ciclina 4), CDK6 (kinase dependente de ciclina 6) e MMD2, um oncogene regulador negativo de p53 e bcl-2, também podem ocorrer.

As principais alterações genéticas conhecidas durante os estágios de desenvolvimento dos gliomas estão apresentadas no quadro abaixo. Estas alterações genéticas, combinadas à histopatologia levam à diferenciação dentre os glioblastomas primários (*de novo*) e secundários. Ambas apresentam aspectos clínicos distintos, com diferenças prognósticas e terapêuticas (ARSLANTAS *et al*, 2004).





*Quadro 1 : Sumário das alterações genéticas conhecidas na progressão tumoral do fenótipo astrocitoma a glioblastoma multiforme. (A) Alterações correlacionadas ao fenótipo clínico/histopatológico glioblastoma secundário. (B) Alterações genéticas associadas ao aparecimento do fenótipo glioblastoma primário (de novo)*

Com o objetivo de facilitar os estudos, proporcionando um melhor entendimento da biologia dos gliomas astrocitários, algumas linhagens celulares têm sido estabelecidas a partir de fragmentos de gliomas humanos, estes obtidos após ressecção cirúrgica da massa tumoral. Estas linhagens são amplamente utilizadas tanto de modelo para testes de novos agentes com potencial terapêutico, como também para investigação de marcadores de crescimento, ontogenia e malignidade, (WÜNSCH FILHO & GATTÁS, 2001). Sendo assim à partir do estabelecimento destas linhagens celulares, torna-se possível o estudo das características citogenéticas dos gliomas, a identificação de marcadores biológicos, para fins de diagnóstico, e ainda investigação do possível potencial destes tipos tumorais em responder a drogas inibidoras de seu crescimento (KANEMURA *et al*, 2001).

Os marcadores biológicos podem ser dados por moléculas de adesão e proteínas de citoesqueleto típicas das células que deram origem ao tumor. Muitas destas moléculas são determinantes de tipos celulares e importantes para a manutenção da integridade celular, morfologia e crescimento (RUTKA *et al*, 1994). Em células de origem glial destacam-se a Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP), a vimentina e outras pequenas proteínas ácidas como, por exemplo, a S100 (SARRIA *et al*, 1994).

A GFAP, uma proteína de citoesqueleto, difere de microtúbulos e microfilamentos de actina porque soluções salinas contendo detergentes iônicos, que normalmente solubilizam a maioria dos componentes celulares, não afetam as estruturas químicas desta molécula. Esta proteína define a ontogenia celular, apresentando papel importante na manutenção da plasticidade e na modulação do crescimento astrocitário. A origem astrocitária de uma linhagem celular pode ser determinada por este filamento intermediário tanto em estados

normais, quanto em estados patológicos (PATEAU *et al* 1979; RUTKA *et al*, 1998). RODNIGHT *et al* (1997) demonstraram, em culturas celulares, que a dissociação do citoesqueleto, evento que precede a mitose, é regulada por um aumento de fosforilação destas proteínas. Também tem sido observada uma estreita relação entre a diminuição, ou até mesmo a ausência da expressão desta molécula de citoesqueleto, com o aumento do grau de malignidade da célula tumoral (ROYMANS *et al*, 2001; BONGCAM-RUDLOFF *et al*, 1991).

A vimentina, também um filamento intermediário de classe III, é uma proteína relacionada à plasticidade celular e nuclear. SARRIA *et al* (1994) demonstraram, em linhagens tumorais humanas, irregularidades na morfologia nuclear associadas a um bloqueio na expressão de vimentina. Células negativas para vimentina apresentaram proeminências e fissuras em seus núcleos, ao passo que células vimentina positivas não apresentaram as mesmas alterações descritas.

A S100 é uma proteína ligante de cálcio e como tal aparece envolvida numa gama de funções que envolvem o controle da progressão celular durante a divisão, a ativação de enzimas e a regulação da contração muscular (MAZZUCHELLI *et al*, 2002). Dentre as várias subunidades diferentemente expressas, a S100A e a S100B aparecem como as mais relevantes. A S100A tem sido utilizada como marcador de prognóstico para os glioblastomas, sendo a diminuição de sua expressão correlacionada a um prognóstico ruim. A S100B é expressa predominantemente em astrócitos, oligodendrócitos e células de Schwann. No interior da célula, regula a dinâmica do citoesqueleto através de dissociações de filamentos de tubulina e ligações a proteínas fibrilares ácidas (DAVEY *et al*, 2001). A subunidade S100B é expressa no citoplasma celular e está envolvida na regulação do

potencial de invasividade e metástase, em diversas neoplasias. Favorecem a angiogênese, a adesão e proliferação celular e ainda participam da remodelação da matriz extracelular (MAZZUCHELLI *et al*, 2002). Esta proteína é excretada constitutivamente, causando um aumento de citocinas pró-inflamatórias como a IL6 por induzir a translocação nuclear do fator  $\kappa$ -B-ligante expresso em neurônios (NKBF) (DONATO R, 2003).

Alterações genéticas, como mudanças em proto-oncogenes ou em genes supressores de tumores, levando a alterações celulares que propiciam características de malignidade, são típicos em células neoplásicas neurais (KRUSE *et al*, 1992). A heterogeneidade observada em cariótipos de diferentes linhagens celulares de gliomas já foi documentada (BIGNER *et al*, 1990). As alterações cromossômicas mais freqüentes, nas diferentes linhagens estabelecidas, são as perdas de 9p, 10, 13q, 17p (região do gen p53), 19, 22 (região prevista para um gene supressor de tumor) e a amplificação dos cromossomos 7 e 12q (região sugestiva de proto-oncogenes) (OSBORNE *et al*, 2001).

A detecção de aberrações cromossômicas presentes em linhagens celulares de gliomas pode propiciar informações valiosas para fins de tratamento. LOUIS *et al* (2001), por exemplo, descreveram que há uma boa resposta à quimioterapia em oligodendroglioma anaplásico com perda de cromossomo 1p. LAM *et al* 2001 também relataram que a perda de 1p e 19q indicam melhor prognóstico. SHAPIRO & SHAPIRO (1992) concluíram que uma grande porcentagem dos glioblastomas apresenta trissomia do cromossomo 7, relacionada a uma super expressão do oncogene erbB, mapeado para gene de fator de crescimento epidermal, o EGFR (7p12), ocasionando uma maior expressão dos receptores para o crescimento epidermal e conseqüentemente, um aumento da vascularização local,

deslocamento de nutrientes e oxigênio para o tumor o que propicia seu estabelecimento e crescimento.

Nos últimos anos vários estudos voltados para a investigação de biomarcadores e de alterações genéticas, utilizando diferentes linhagens celulares estabelecidas a partir de tumores primários brutos, têm sido divulgados.

DISERANS *et al* (1981) estabeleceram uma linhagem de glioma humano maligno (LN18), a partir de tumor bruto extraído de um paciente do sexo masculino (61 anos), para pesquisa de antígenos específicos associados ao tumor. O estudo citogenético das células desta linhagem revelou modificações como, por exemplo, a presença de um cromossomo grande e acrocêntrico de origem indefinida, e duplicações em 9p. O estudo dos autores demonstrou também discrepâncias em relação à expressão de marcadores biológicos. Embora o tumor bruto apresentasse positividade para GFAP e S100, as células da cultura mostraram-se negativas para estes marcadores.

KRUSE *et al* (1992) estabeleceram a linhagem contínua de glioblastoma humano denominada de DBTRG-05MG, à partir de um tumor bruto retirado de uma paciente de 59 anos do sexo feminino. Esta linhagem não apresentou positividade para o marcador GFAP, porém apresentou positividade para o marcador S100. A análise citológica demonstrou a existência de citoplasma eosinofílico, núcleos ovais sem nucléolo conpiscuo e várias figuras mitóticas. Além disso, foram descritas alterações citogenéticas como tetraploidias, perdas do cromossomo 10 e super-expressão do cromossomo 7.

PERZELOVA *et al* (1998) estabeleceram duas linhagens permanentes de glioblastoma humano: 8-MG-BA e 42-MG-BA. Estas linhagens foram estabelecidas a partir de um tumor de um paciente do sexo feminino com 54 anos, e de paciente com 63 anos do

sexo masculino, respectivamente. Células de ambas linhagens apresentaram-se com formato achatado e poligonal, e positividade para os marcadores GFAP e vimentina. A análise citogenética das linhagens demonstrou um número cromossômico que variava de 58 a 67 para a linhagem 42-MG-BA e de 50 a 63 na linhagem 8-MG-BA.

ENGELHARD *et al* (1997), em estudos com a linhagem de glioblastoma humano U138B, demonstraram a presença de células com morfologia poligonal e poucos prolongamentos citoplasmáticos. A análise imuno-histoquímica desta linhagem revelou uma marcação mínima para GFAP. A U138B apresentou alterações em proto-oncogenes, com decréscimo na expressão da proteína c-myc (55%).

Recentemente, foi estabelecida em nosso laboratório uma linhagem celular derivada de um astrocitoma humano (GRIPPO *et al*, 2000). Esta linhagem, denominada NG-97, apresentou inicialmente duas populações morfologicamente distintas: uma composta por células pequenas, arredondadas e com núcleo grande, e outra composta por células maiores do tipo (fusiformes). A inoculação subcutânea de células da linhagem NG-97 no dorso de camundongos congenitamente atímicos (*nu/nu*) induziu o desenvolvimento de massa tumoral sólida, o que demonstra a tumorigenicidade destas células. A análise histopatológica da massa tumoral obtida dos camundongos demonstrou hiperplasticidade, atipia nuclear, pleomorfismos celulares, além de altos índices mitóticos, áreas de necrose e extensa proliferação vascular. Células recuperadas da massa tumoral dos animais apresentavam as mesmas características da cultura original quando re-introduzidas em cultura.

Por todas estas características, a linhagem tumoral NG-97 apresentou-se como uma excelente ferramenta para estudos imunológicos e biológicos dos gliomas, justificando a

continuidade de seu estudo. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo ampliar a caracterização desta nova linhagem de glioma, uma vez que pode providenciar um sistema bastante útil para um melhor entendimento da biologia e do tratamento deste tipo de neoplasia.

## ***2. OBJETIVOS***

---

Este trabalho teve como objetivo geral:

- A avaliação das propriedades morfológicas, genéticas e fenotípicas das populações celulares presentes na linhagem NG-97, estabelecida recentemente em nosso laboratório.

Para tanto, foram realizadas:

- Análises morfológicas, pelas características citológicas e ultra-estruturais das diferentes populações de células presentes da linhagem NG97;
- Análises das alterações citogenéticas apresentadas pelas células da linhagem NG97; e
- Análise da expressão de marcadores moleculares como a Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP), a proteína S100 e a vimentina.

### ***3. MATERIAL E MÉTODOS***

---

### **3.1. Manutenção da Linhagem celular NG-97**

As células da linhagem NG97 foram gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Liana M. Verinaud do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas.

As células foram rotineiramente cultivadas em garrafas de cultura de células (25 cm<sup>2</sup>) contendo meio de crescimento (RPMI 1640)(Cultilab, Campinas, Brasil) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil), 0,5 mg/ml de glutamina e antibióticos (100µg/ml de estreptomicina). Todas as culturas foram incubadas em estufa 37° C , em atmosfera úmida de ar e 5% de CO<sub>2</sub> sendo repicadas duas vezes por semana utilizando-se ATV Tripsina-Versene (0,05%) (Instituto Adolf Lutz, São Paulo, Brasil). A cada passagem, alíquotas eram separadas para serem estocadas em SBF contendo 1% de DMSO (Dimetil Sulfoxido) (Fischer Scientific, NY), em nitrogênio líquido para uso posterior.

### **3.2. Preparo de lâminas para análise imunocitoquímica e análise citológica.**

Células da linhagem NG-97 foram descoladas das garrafas de cultura 25cm<sup>2</sup> com tripsina e centrifugadas por 10 min à 150x g. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspense em 0,5mL de meio RPMI 1640, acertando-se o número de células para 10<sup>5</sup>células/mL. Células contidas em 100µL foram assentadas em lâmina, previamente tratadas com poli-Lysina, utilizando-se citocentrífuga por 7 min a 150x g, sendo então fixadas com acetona gelada, à temperatura de 4°C , por 15 min. Parte destas lâminas foram utilizadas para análise imunocitoquímica e parte para análise citológica, sendo estas

últimas imediatamente coradas por 60 segundos com Hematoxilina de Harris e montadas com meio para montagem histológica Permount (Fischer Scientific, NY).

### **3.3. Preparo das células para análise citogenética da linhagem NG -97**

A análise citogenética da linhagem NG-97, foi realizada conforme técnica descrita por Moorehead *et al* (1960) e adaptada pelo Laboratório de Procedimentos Especializados (LAPESP/CAISM/UNICAMP). Resumidamente, colchicina (Cultilab, Campinas, Brasil) diluída em meio RPMI 1640, numa concentração de 0.01ug/ml foi adicionada às células do frasco de cultura da linhagem NG97, deixando-se agir por um período de 3,5 a 4 horas. Após remoção da colchicina, as células foram tratadas com tripsina, re-suspendidas e centrifugadas por 8 min a 150xg sendo o sobrenadante desprezado. 8mL de solução hipotônica KCL (0,075M) foram adicionados seguindo-se homogeneização por 6 minutos. Após adição de 3mL de fixador metanol:ácido acético glacial (3:1) (MERCK, Darmstadt, Germany) as células foram centrifugadas por 8 min a 150xg. O sedimento obtido foi novamente suspenso em 8 mL da solução fixadora descrita acima e as células centrifugadas por três vezes durante 8 min. Após a última centrifugação o *pellet* foi re-suspenso em 1ml de fixador para cada 0,5mL de sedimento. Findo este procedimento, a suspensão foi gotejada, com o uso de pipeta Pauster, em lâminas limpas retiradas do freezer esperando-se secar a temperatura ambiente. As lâminas foram imersas numa solução de tripsina (1:250 tampão) e agitadas de 3 a 8 segundos. As células foram então coradas (Banda GTG) com corante Giemsa (MERCK, Darmstadt, Germany) diluído 1:3 em tampão fosfato sendo, posteriormente, exaustivamente lavadas em água corrente.

### **3.4. Procedimentos em Imunocitoquímica**

Imediatamente antes do uso, as lâminas previamente fixadas foram lavadas em PBS 1% (BSA). Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas com os anticorpos primários gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. José Vassallo do Laboratório de Patologia Experimental (LAPE/FCM/UNICAMP). Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-GFAP (anticorpo policlonal de coelho anti-GFAP bovina) (DakoCytomation, Califórnia, USA), anti-vimentina (anticorpo monoclonal de rato clone V9) (DakoCytomation, Califórnia, USA), anti-S100 (anticorpo policlonal de coelho anti-S100 bovina) (DakoCytomation, Califórnia, USA). As lâminas foram incubadas por 60 minutos a 37° C em câmara úmida com o anticorpo primário e a seguir por 120 minutos com o anticorpo secundário. As lâminas eram então lavadas, por 3 vezes em salina tamponada com fosfato (PBS-BSA 1%). O “kit” DAKO *EN VISION* SYSTEM HRP (DakoCytomation, Califórnia, USA) foi então aplicado às lâminas conforme as instruções do fabricante. A revelação da reação foi feita utilizando-se o substrato da peroxidase (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e 3,3-diaminobenzidina (DAB). Após lavagem em água corrente e destilada, as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris. Controles negativos incluíam a reação completa com ausência do anticorpo primário.

### **3.5. Microscopia de Contraste de Fase**

A quantidade de  $1 \times 10^4$  células da linhagem NG-97 foram cultivadas sobre lamínulas redondas de 13mm de diâmetro, previamente acomodadas em microplacas de 24 poços. As células foram analisadas utilizando-se microscópio óptico de inversão acoplado ao sistema de câmaras Olympus PMC35DX

### **3.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.)**

Para análise por M.E.V células cultivadas sobre lamínulas foram pré-fixadas em tampão de Karnovisk. Após passagem pela solução de tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) 1%, o material foi desidratado em diferentes gradientes de etanol. As células foram então levadas para secagem no ponto crítico com  $\text{CO}_2$  líquido (Balzers CPD 030), fixadas com adesivo em suporte de alumínio, recobertas com ouro-palladium (Sputer Coater Balzers SCD 050), e finalmente observadas ao microscópio eletrônico de varredura (JEOL 5800 SV) do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Unicamp, com aceleração de voltagem de 10 Kv.

### 3.7. Padrão de Crescimento

A quantidade de  $1 \times 10^4$  células da linhagem NG-97 foram cultivadas, em triplicata e por um período de dez dias, em microplacas de 24 poços para determinação da curva de crescimento. Para tal, diariamente, após tripsinização das culturas, as células eram ressuspensas em meio RPMI completo e contadas em hemocitômetro. O número de duplicações na quantidade de células da cultura foi calculado a partir da fórmula:

$$N = N_0 \times 2^n$$
 onde,  $N$  é o número final de células após dez dias de cultura,  $N_0$  o

número de células no início da fase de crescimento exponencial da cultura e  $n$  o número de duplicações na quantidade de células.

Para determinação do tempo de duplicação na quantidade de células utilizou-se a fórmula:

$$T = t_2 - t_0$$
 onde  $t_2$  representa o tempo final em horas quando  $n$  foi determinado e  $t_0$

o tempo inicial quando  $N_0$  foi estudado. O tempo de duplicação (T) da quantidade celular foi então obtido pela equação  $T/n$  (DISERENS *et al*, 1981).

## ***4. RESULTADOS***

---

**Figura 1:** Análise citológica das células da linhagem NG-97. Observa-se: (A) Células com morfologia atípica, polinucleadas; (B) e (C) Células apresentando mitoses poliplóides (→); (D) Células com padrão de divisão poliplóides (setas azuis) e com padrão nuclear com aparência “granular”, sugerindo alto índice mitótico (setas vermelhas). Aumento original: 200x (A e B); 400x (D e C).

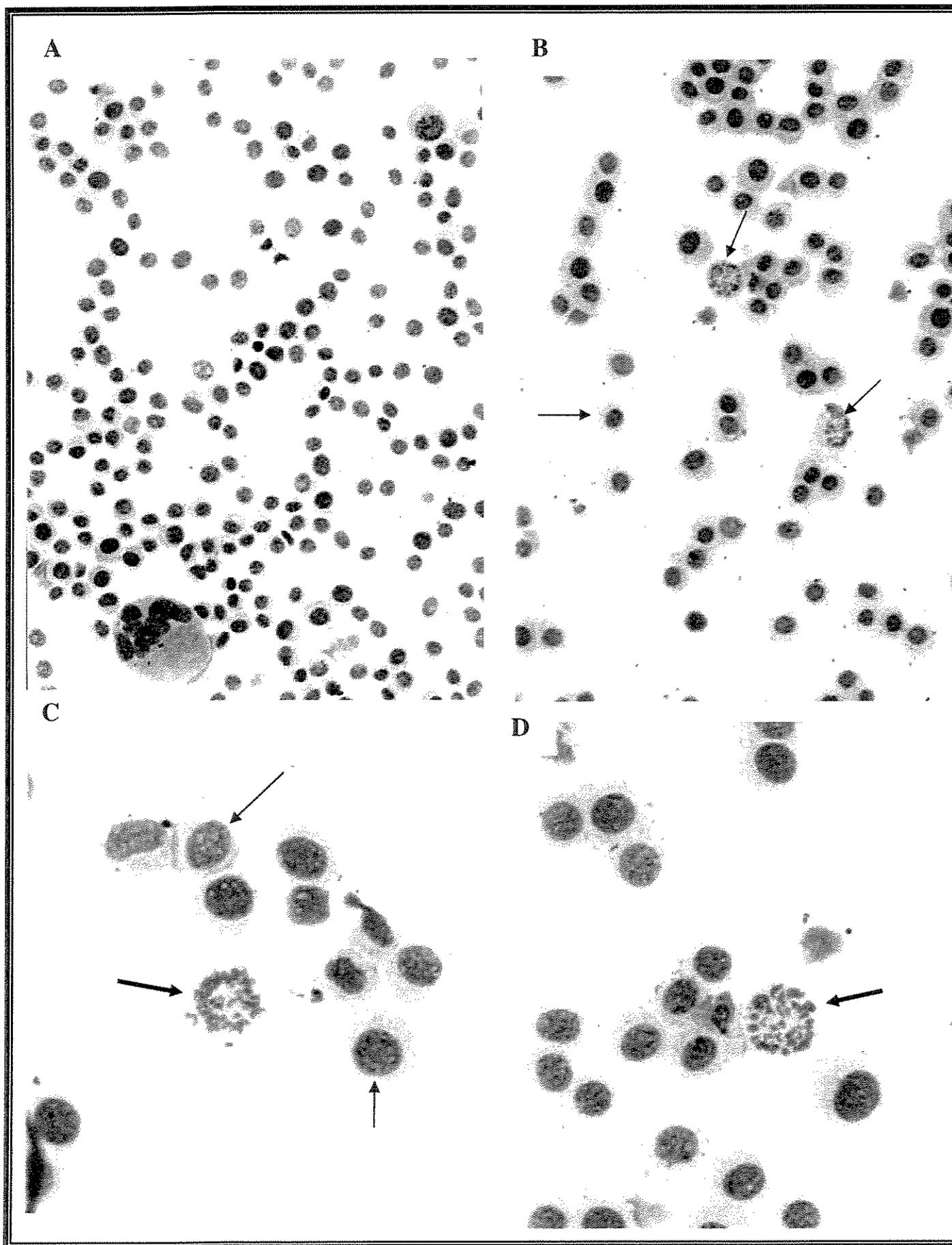
#### **4.1. Análise citológica em Microscópio Óptico Comum**

A análise citológica das células da linhagem NG-97 mostrou a presença de atipias celulares, comumente encontradas em células de origem tumoral, e modificações sugestivas de alterações no fuso de divisão das células. Mitoses poliplóides, que podem originar células multinucleares (freqüentemente observadas), e presença de células com sugestivos de altos índices mitóticos também foram observadas ao longo das lâminas. Estes resultados são apresentados na Figura 1.

#### **4.2. Análise citogenética das células da linhagem NG-97**

Cinquenta metáfases, da passagem dezesseis (P16) da linhagem NG-97, foram visualizadas. Grande quantidade de cromossomos acêntricos, acrocêntricos e cromossomos com sugestivos re-arranjos foram observados (Figura 2).

Além disso, pôde-se observar que as células da linhagem NG-97 são hiperdiplóides com lote cromossômico variando de 49 a 92 e número modal de 62, conforme demonstra o gráfico 1.



*Figura 2: Análise citogenética prévia das células da linhagem NG-97 (P16). Embora não apresentem bandeamento padrão, as metáfases foram processadas para bandeamento GTG. As setas indicam cromossomos com sugestivos rearranjos. Imagens capturadas em microscópio Olympus BX 60, acoplado com sistema de captura de imagens Cytovision™ (Applied Imaging Corporation)(800x).*

---

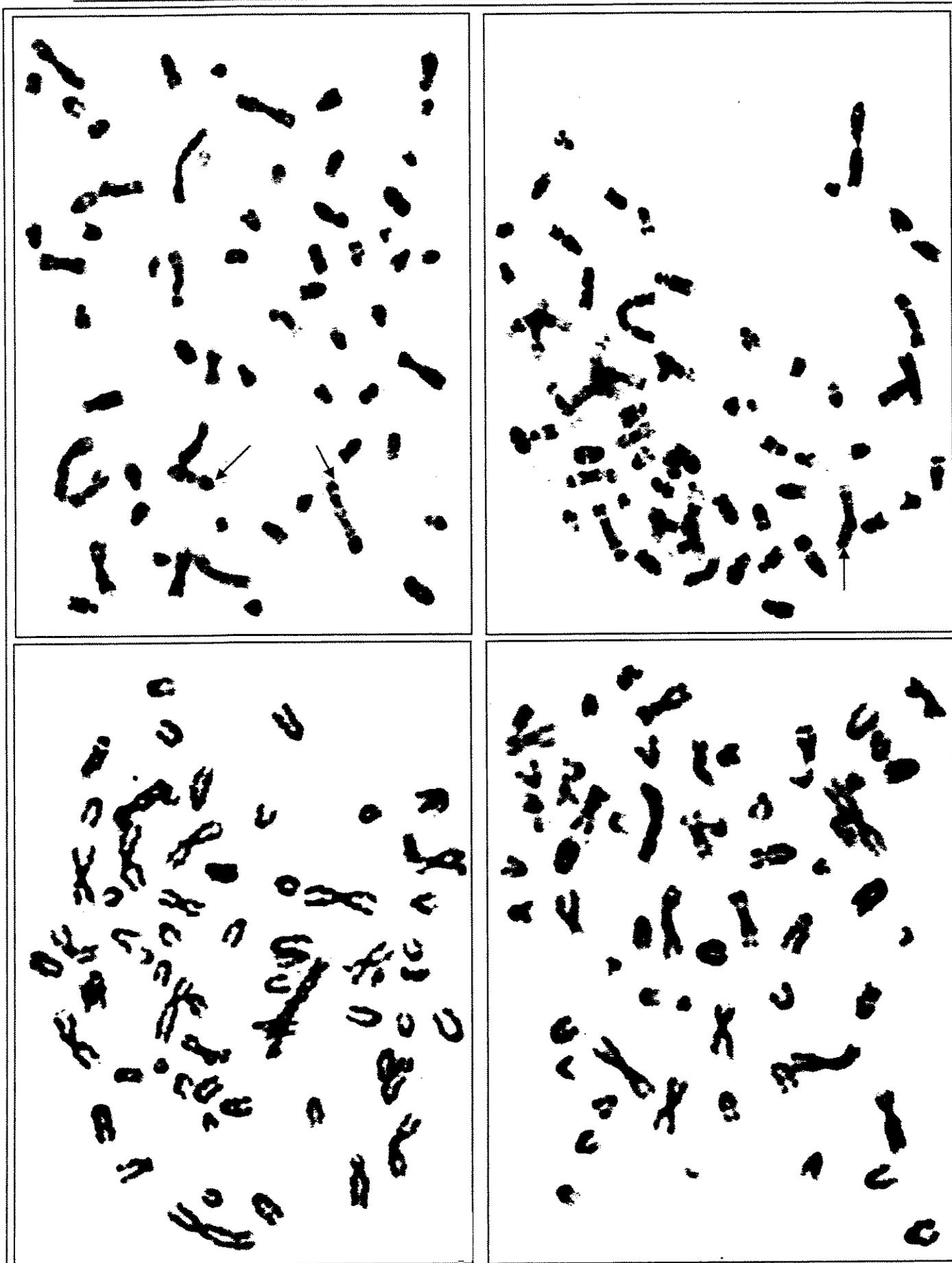
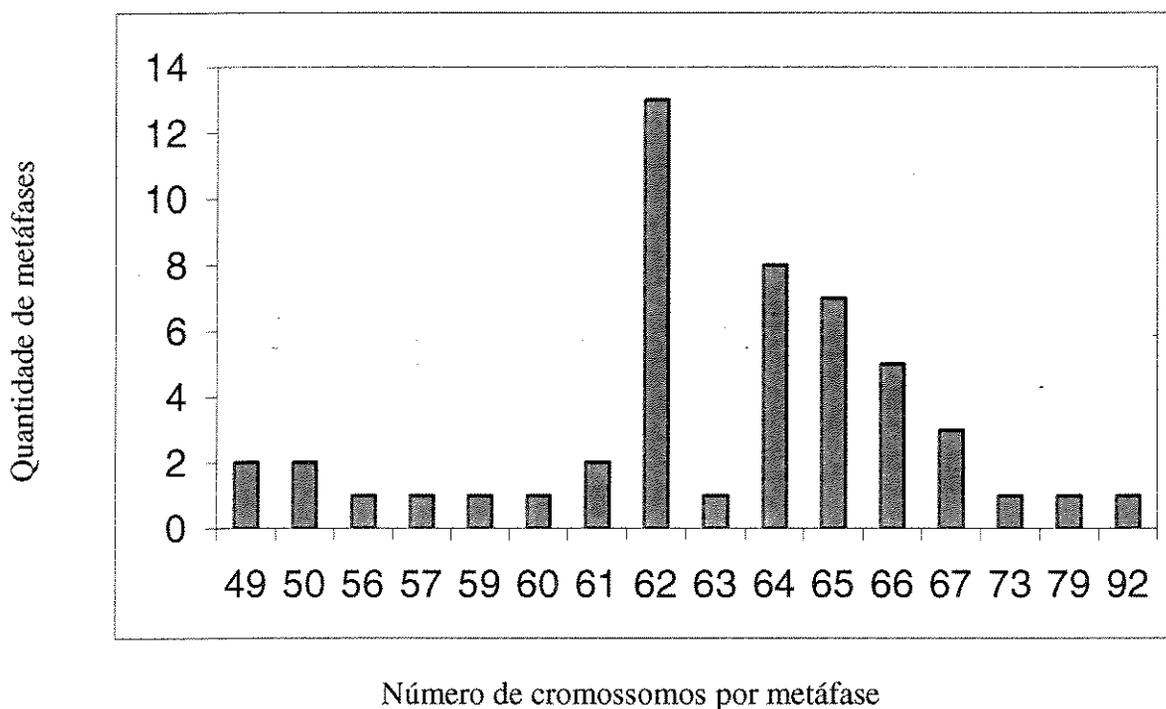




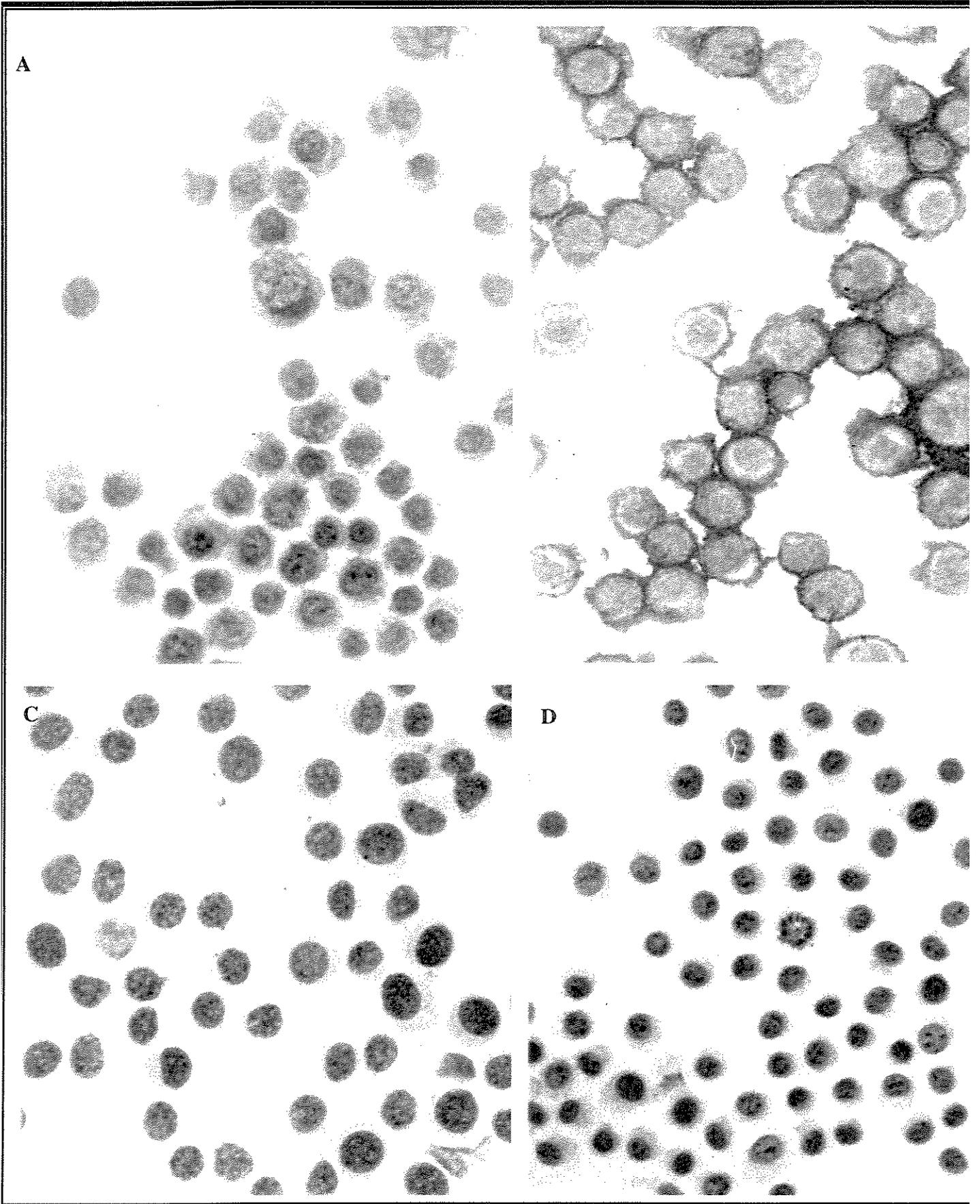
Gráfico 1: Número total de cromossomos por metáfase.



### 4.3 Análise Imunocitoquímica

Os resultados obtidos com o estudo imunocitoquímico estão apresentados na figura 3. As células da linhagem NG-97, passagem 14, apresentaram-se positivas para os marcadores GFAP e S100. Ambos marcadores estão presentes no citoplasma, sendo observada uma condensação difusa perinuclear no caso da GFAP e um padrão disperso para S-100. A vimentina, não foi detectada nas células NG97.

**Figura 3:** *Imunocitoquímica para detecção de GFAP (A), proteína S100 (B) e vimentina (C) em células da linhagem NG-97 (400x). (D) controle negativo(200x).*





#### 4.4. Análise do Padrão de crescimento

Inicialmente, células NG-97 proliferaram formando em alguns campos, agregados flutuantes na cultura e somente células pequenas e arredondadas podiam ser observadas (Figura 4A). Após a 13ª passagem, células com aspecto dendrítico começaram a aparecer na cultura (Figura 4B). Estas células apresentavam extensos prolongamentos, que proporcionavam o contato com as células pequenas, e mostravam a existência de vários núcleos (Figura 4C). Conforme a cultura se tornava densa um terceiro tipo celular, com morfologia fusiforme, aparecia na cultura (Figura 4D). Em monocamadas confluentes da cultura NG-97 este tipo celular é predominante.

Importante ressaltar que a cinética de crescimento celular aumentou após o aparecimento das células com aspecto dendrítico na cultura. O tempo de duplicação observado foi de 24 horas, como indicado no gráfico 2.

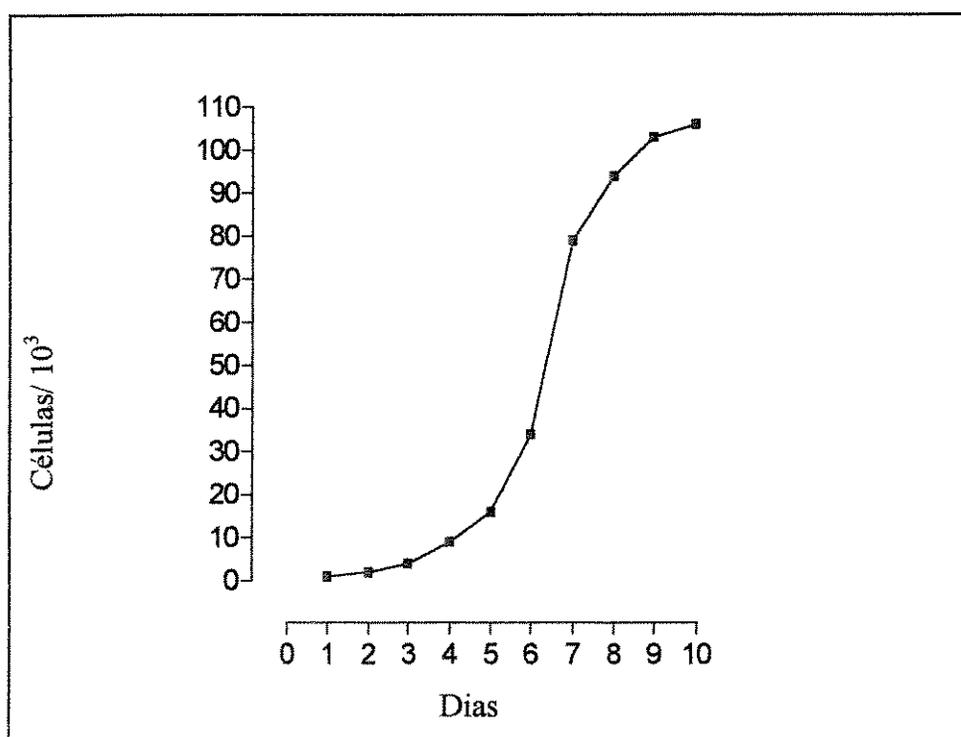
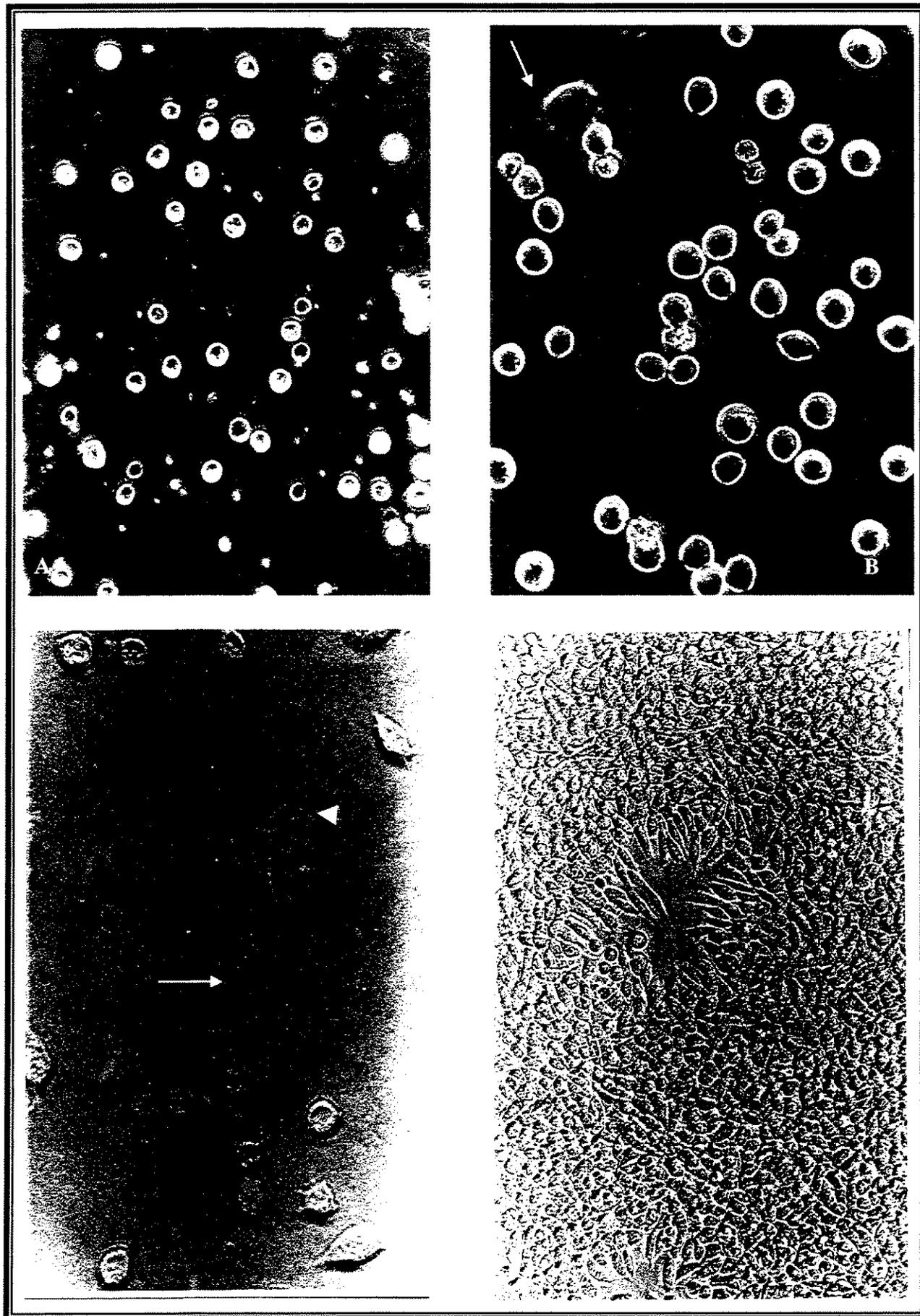


Gráfico 2: Curva de crescimento da linhagem NG97 (Passagem 14).

**Figura 4:** *Análise por Microscopia Óptica das células da linhagem NG-97. Observam-se: (A) células pequenas e arredondadas crescendo como flutuantes; (B) células com morfologia dendrítica (→); (C) célula com morfologia dendrítica apresentando extenso prolongamento (→) e vários núcleos (▶); (D) aspecto geral da camada confluyente da cultura NG-97. Aumento original: 400x (A, B e C) e 200x (D);*

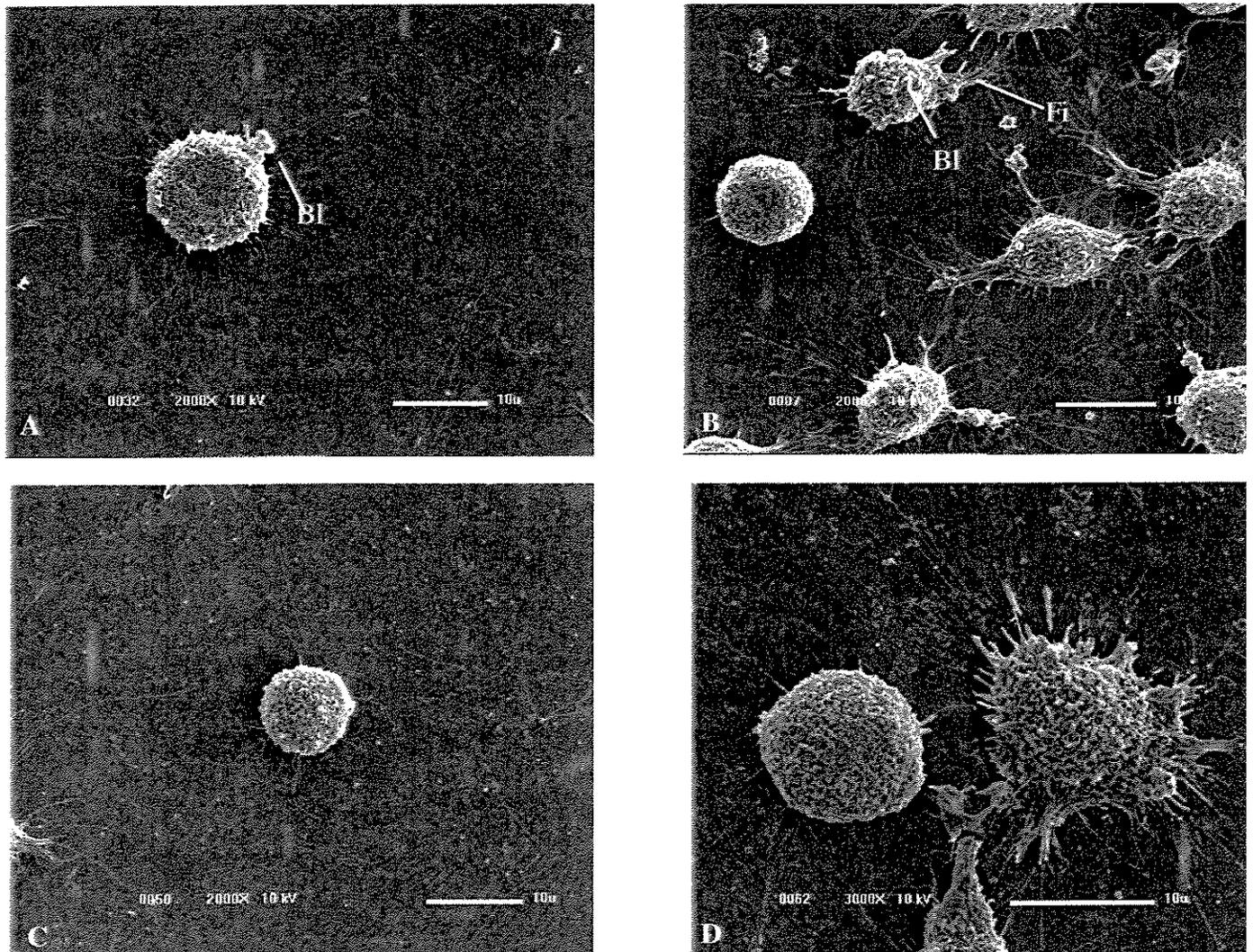


#### **4.5. Análise morfológica ao Microscópio Eletrônico de Varredura (M.E.V)**

A microscopia eletrônica de varredura revelou peculiaridades presentes na superfície das três populações celulares da linhagem NG-97. Células com aspecto arredondado mostraram heterogeneidade de prolongamentos citoplasmáticos, incluindo a presença de prolongamentos esféricos da membrana, conhecidos na literatura como “bolhas”, e filopódios (Figuras 5A a 5D). Interessantemente, uma certa heterogeneidade na expressão dos prolongamentos de membrana de células de uma mesma passagem foi encontrada. Esta heterogeneidade se manteve nas demais passagens. Em alguns casos há diferenças morfológicas na superfície, como demonstrado na figura 5D.

A morfologia das células multi-nucleadas e semelhantes às células dendríticas é ilustrada nas figuras 6A a 6F. Estas células apresentam-se com ausência dos prolongamentos esféricos mas com extensos prolongamentos citoplasmáticos. Encontram-se fortemente ligadas ao substrato e estabelecendo contato com as células pequenas e arredondadas. Além de apresentarem interações célula-célula, pôde-se observar ainda a produção de vesículas em algumas das projeções, como mostra as figuras 6B e 6E .

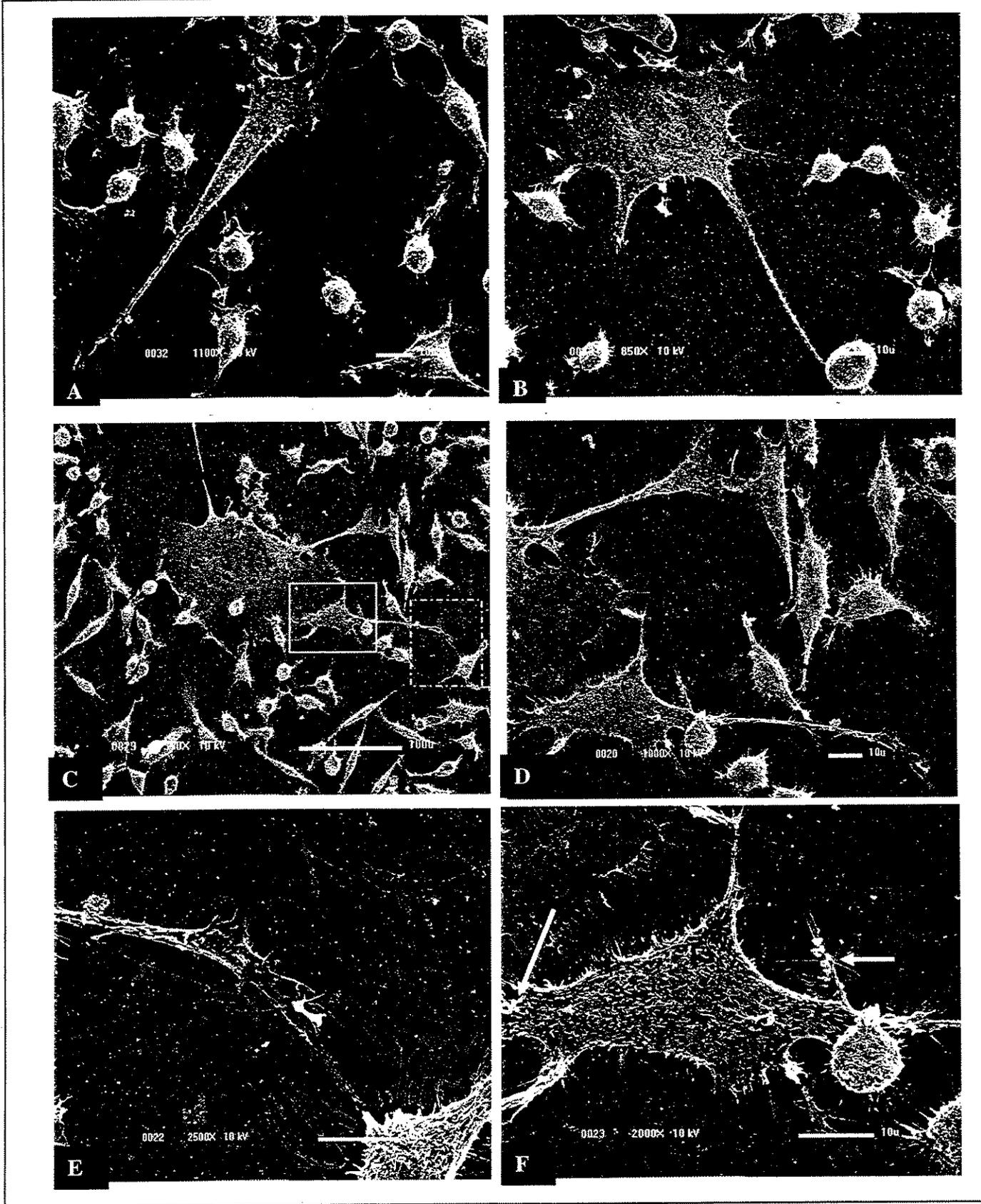
A morfologia do terceiro tipo celular presente na cultura NG-97 é apresentada nas figuras 7A e 7B. Numerosas microvilosidades podem ser observadas na superfície deste tipo celular. A figura 7C mostra o aspecto da monocamada na passagem 13 e a Figura 7D seu aspecto na passagem 18 quando a cultura tornou-se mais densa.

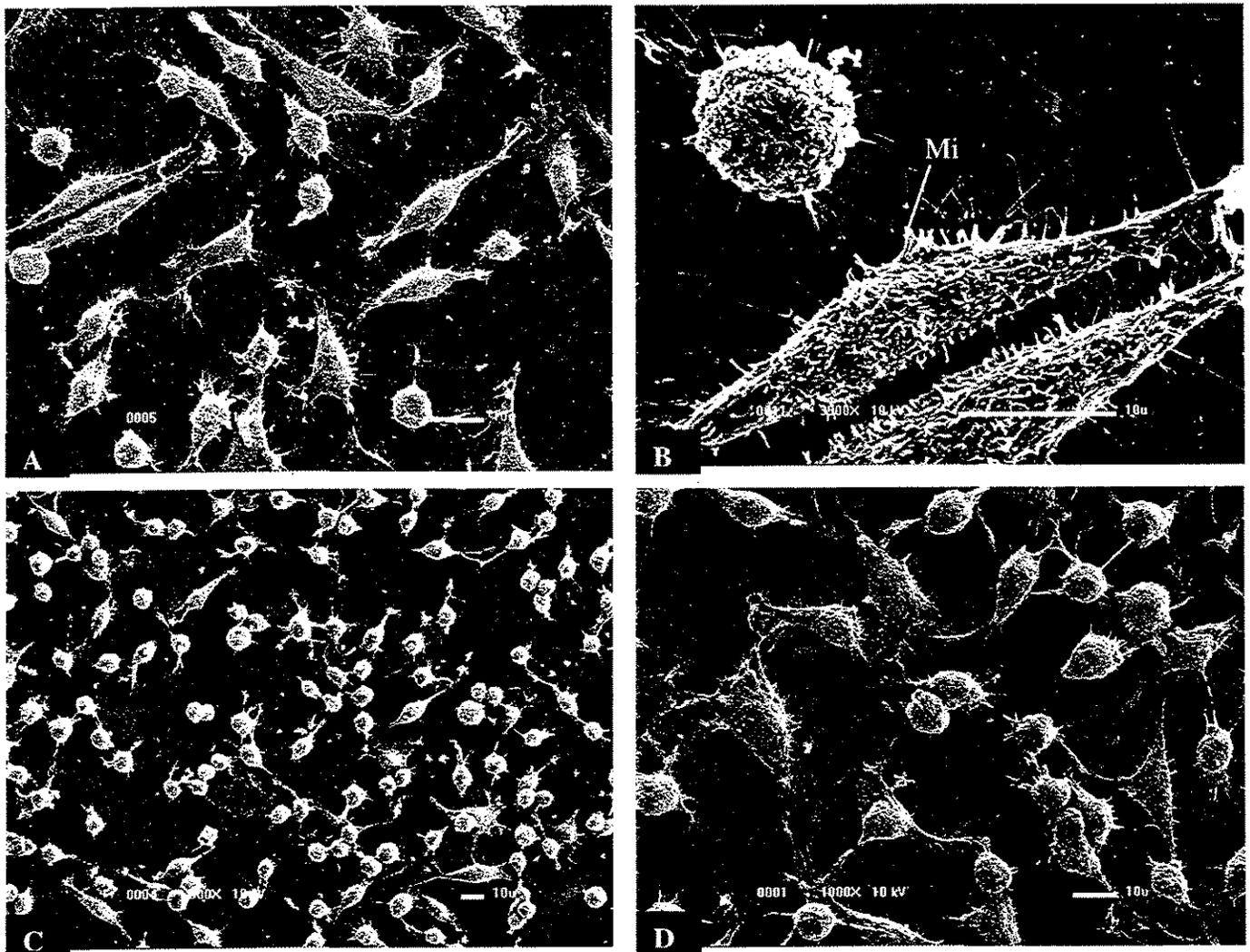


*Figura 5: Microscopia Eletrônica de Varredura de células pequenas e com aspecto arredondado presentes na linhagem NG-97. Notar a presença de “bolhas” (Bl) e filopódios (Fi) na superfície celular. Notar diferença de superfície de membrana entre dois tipos celulares apresentando morfologia semelhante e pertencentes à mesma passagem.*

**Figura 6:** *Microscopia Eletrônica de Varredura de células com aspecto de células dendríticas presentes na linhagem NG-97. Observam-se extensos prolongamentos citoplasmáticos em todas as projeções. A área do retângulo contínuo é mostrada em aumento maior em D e F, e do retângulo tracejado em E. Podem ser observadas em E um prolongamento em maior aumento e, em F algumas vesículas de secreção (→)*

---





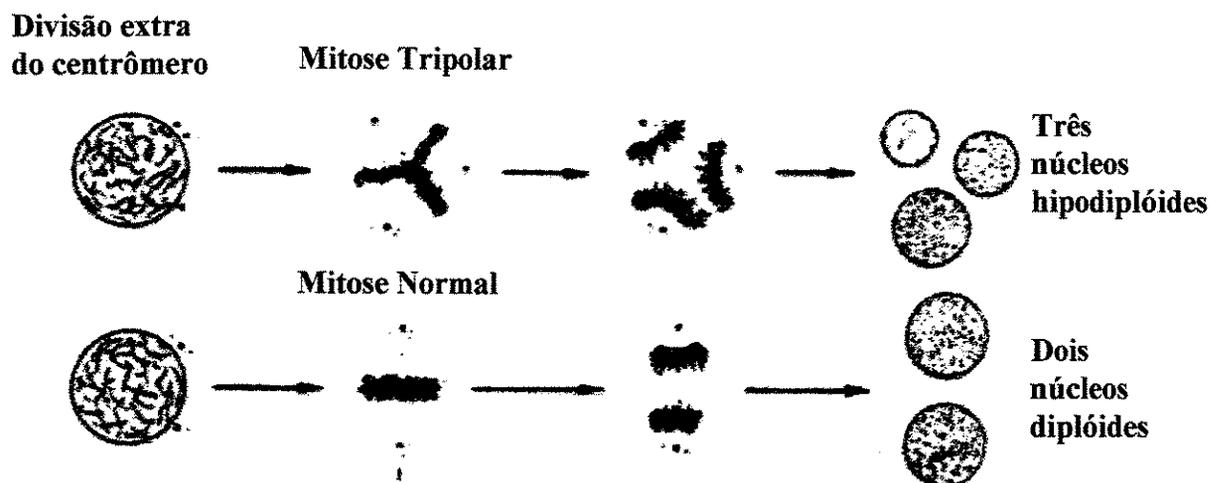
*Figura 7: (A e B) Microscopia Eletrônica de Varredura de células com morfologia fusiforme apresentando numerosas microvilosidades (Mi) em sua superfície. C e D apresentam monocamada celular nas passagens 13 e 18 respectivamente.*

## ***5. DISCUSSÃO***

---

Os aspectos citológicos analisados na linhagem NG-97 demonstraram alterações freqüentemente encontradas em células de origem tumoral, tais como, células com número não usual de núcleos, existência de células com fusos não bipolares indicando alta taxa mitótica e alterações no lote cromossômico.

Estes resultados estão de acordo com o descrito por THERMAM & SUSMAN (1995), que relatam o aparecimento de células com número extra de núcleos como consequência de mitoses poliplóides (diagrama 1).



*Diagrama 1 : Demonstração esquemática de alterações no fuso mitótico e consequente formação de número extra de núcleos. Adaptado de THERMAM e SUSMAN, 1995.*

A alta taxa mitótica da linhagem NG-97, proporcionaria a ocorrência de erros na configuração das fibras do fuso, produção de centríolos e arraste de cromossomos. Estes caracteres, que muitas vezes levam a diminuição ou aumento no lote cromossômico por núcleo, podem também gerar células com número extra de núcleos. Na literatura existem descrições de indícios moleculares da superexpressão de genes ligados ao evento de multinucleação. O gene HR6B humano, por exemplo, codifica uma proteína que participa

---

do processo de reparo cromossômico e, aparentemente, está envolvida na multinucleação, amplificação centrossomal, mitose anormal, aneuploidia e fenótipo de transformação (SHEKHAR *et al.*, 2002). Futuros estudos com a linhagem NG-97 deverão enfatizar este parâmetro molecular para complementar a caracterização desta linhagem e desvendar a origem das células multinucleadas presentes na cultura.

O lote cromossômico da linhagem celular NG-97 apresentou-se aneuploide hiperdiploide, ou seja, com número extra de cromossomos. Foi observada uma variação de 49 a 92 cromossomos por metáfase, sendo que o número modal de cromossomos para a passagem 16 é de 62. Embora a análise do cariótipo da linhagem NG-97 não tenha sido possível ainda, a observação de algumas metáfases demonstra a presença de cromossomos com sugestivos re-arranjos, grande quantidade de quebras cromossômicas e um alto número de cromossomos marcadores. A presença destes eventos deverá ser confirmada em trabalho futuro utilizando-se técnica de bandeamento cromossômico e hibridização fluorescente *in situ* (FISH).

De acordo com a literatura, defeitos na segregação cromossômica levam a aneuploidia, sendo esta um tipo de instabilidade cromossômica muito comum em tumores sólidos como os de mama, os coloretais e o de próstata (YANG *et al.*, 2003). Apesar da análise citogenética, de acordo com a literatura não há homogeneidade entre as ploidias e cromossomos marcadores referentes às linhagens de glioblastomas descritas até o presente momento. DISERENS *et al.* (1981), que descreveram a linhagem de glioma humano denominada LN18, demonstraram a existência de lote cromossômico variando de 70 a 80 cromossomos com um número modal de 78 (XXYY) e, como marcador, a presença de um cromossomo grande, acrocêntrico, de origem não identificada, além de dois outros

pequenos semelhantes com o cromossomo 9p-. Já KRUSE *et al* (1992) encontraram na linhagem DBTRG-05MG hipotetraploide ,variando de 87 a 91 cromossomos por metáfase, e três marcadores de origem indefinida. PERZELOVA *et al* (1998), estudando as linhagens 42-MG-BA e 8-MG-BA, encontraram lote cromossômico que variava de 58 a 67 para a primeira linhagem e de 50 a 63 na outra linhagem. Nestes estudos, entretanto, não foram realizadas análises de cariótipo.

A análise imunocitoquímica realizada com as células da linhagem NG-97 para investigação de proteínas do citoesqueleto, demonstrou positividade perinuclear para o marcador GFAP e uma marcação citoplasmática difusa para a proteína S100. As células, entretanto, mostraram-se negativas para a vimentina. A marcação positiva para GFAP e proteína S100 confirma a origem astrocítica e de Sistema Nervoso Central das células da linhagem NG-97.

Achados da literatura em relação à expressão da molécula GFAP são controversos. Alguns relatos indicam que linhagens de gliomas perdem sua capacidade de sintetizar GFAP após várias passagens *in vitro*. KRUSE *et al.* (1998), demonstraram negatividade para este marcador nas linhagens de glioblastomas humano denominadas CJ-MG, DK-MG, GE-MG, WO-MG. Entretanto, os mesmos autores demonstraram positividade relativa para outra linhagem EV-MG. BISSEL *et al.* (1974), trabalhando com células da linhagem C6, uma linhagem induzida quimicamente em rato, encontraram positividade para GFAP.

A literatura também tem estabelecido uma correlação negativa entre o grau de malignidade e a expressão destes marcadores na maioria dos gliomas humanos (JACQUES *et al.* 1981; DUFFY *et al.* 1982). Entretanto, células NG-97 são tumorigênicas quando implantadas no dorso de camundongos *nude*, o que indica seu caráter neoplásico e maligno

---

(GRIPPO *et al.* 2001). Além disso, este marcador continua sendo expresso em xenoinxertos de células NG-97.

A proteína S100 tem sido identificada em algumas linhagens celulares de gliomas humanos (DONATO R., 2003). Entretanto, ao que parece, também não existe uma uniformidade para este marcador entre linhagens contínuas de glioblastomas multiformes humanos já estabelecidas. BIGNER *et al.*(1979), relataram a não detecção da molécula S100 em 15 diferentes linhagens testadas. KRUSE *et al* (1992), demonstraram uma positividade difusa na linhagem de glioblastoma humano denominada DBTRG-05MG. Entretanto, os mesmos autores em trabalhos posteriores demonstraram negatividade para as linhagens DK-MG e WO-MG, e positividade relativa para a linhagem CJ-MG (KRUSE *et al.*, 1998). Vários relatos na literatura associam a participação da proteína S100 em eventos relacionados à angiogênese, mudanças na concentração de cálcio intracelular e favorecimento da sobrevivência celular através da indução de expressão de NF-kB e bcl-2 com aumento de crescimento por indução autócrina (DAVEY *et al*, 2001). A participação desta molécula nos eventos descritos acima também constituirá objeto de estudo futuro com a linhagem NG-97.

A ausência da molécula vimentina em células da linhagem NG-97 aparece em concordância com relatos da literatura que descrevem seu aparecimento durante a embriogênese das células gliais e depois sua diminuição, ou até completa ausência, na idade adulta. Da mesma forma, a vimentina também possui heterogeneidade de expressão em culturas de longa duração. Em algumas linhagens de glioblastoma humano, tais como CJ-MG, DK-MG, GE-MG, WO-MG, apresentam marcação negativa (KRUSE *et al*,1998).

Entretanto, há relatos de positividade para esta mesma proteína de citoesqueleto como os achados na linhagem DBTRG-05MG (KRUSE *et al.*, 1992).

SARRIA *et al.*(1994) através de estudos realizados com células geneticamente modificadas, demonstraram que o núcleo das células SW-13 vim- apresentavam-se “dobrados”, formando lóbulos e fendas. Os autores atribuem este fato à ausência da vimentina nestas células. Entretanto, ao que tudo indica, a ausência de vimentina nas células da linhagem NG-97 não afeta a forma de seu núcleo.

Em estudo realizado anteriormente com células da linhagem NG-97, GRIPPO *et al.*, 2001 identificaram a presença de duas populações celulares morfologicamente distintas: (i) células pequenas e arredondadas e (ii) células alongadas com aspecto fusiforme.

Entretanto, a análise das diferentes populações celulares presentes em passagens iniciais da cultura (P13 a P18) demonstrou a existência de três populações morfologicamente distintas: (i) células pequenas e arredondadas, (ii) células grandes com aspecto semelhante à célula dendrítica, e (iii) células alongadas com aspecto fusiforme.

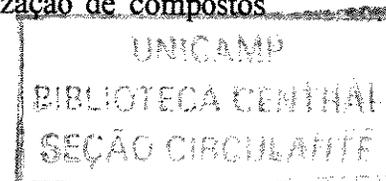
Nossas observações atuais apontam que o tipo celular predominante na P13 era de células pequenas e arredondadas, que cresciam não aderidas ao substrato e com um tempo de duplicação superior a 24 horas. Estas células apresentavam heterogeneidade quanto à expressão de prolongamentos de membranas. Muitos dos prolongamentos observados são descritos na literatura (PORTER *et al.*, 1973) como típicos de células que estão entrando em ciclo de divisão celular.

Em dado momento, a cultura passou a apresentar um segundo tipo celular, caracterizado por seu aspecto dendrítico, com extensos prolongamentos citoplasmáticos. O aparecimento destas células na cultura deveu-se, muito provavelmente, à alterações nas

células arredondas decorrentes de divisões desbalanceadas. Este tipo celular apresentou um grande número de prolongamentos, o que propicia muito a comunicação entre células. Interessante notar também a presença de pequenas vesículas presentes nos prolongamentos destas células. A hipótese que estas vesículas seriam responsáveis pela excreção de biomoléculas capazes de realizar sinalizações importantes para as demais células não deve ser descartada uma vez que, após o aparecimento deste tipo celular a cinética de crescimento da cultura aumentou. ZIMMER *et al.*, 1989, relatam uma correlação positiva entre a excreção da proteína S100 e a regulação do crescimento e diferenciação celular de células da linhagem de glioblastoma C6. A confirmação desta hipótese, bem como, a identificação de possíveis produtos excretados por células com aspecto dendrítico presentes em nossa cultura permanece em aberto.

Mais tardiamente, um terceiro tipo celular pôde ser observado na cultura da linhagem NG-97: células alongadas e com aspecto fusiforme. Este tipo celular apresenta numerosos prolongamentos, do tipo microvilosidades, em sua membrana e também, muito provavelmente, derivam das células arredondadas. Em passagens mais avançadas, quando a monocamada torna-se mais densa, estas células predominam na cultura sendo acompanhadas das células arredondadas. As células grandes com aspecto dendrítico são visualizadas com menor frequência, provavelmente por se estabelecerem abaixo dos outros tipos celulares, razão pela qual não havia sido identificada anteriormente.

Embora a literatura apresente poucos relatos sobre a caracterização morfológica e ultra-estrutural de populações celulares presentes em outras linhagens de glioblastomas humanos estabelecidas *in vitro*, acreditamos que o estudo destes parâmetros será de crucial importância para a realização de estudos futuros envolvendo a utilização de compostos



potencialmente ativos que possam diminuir, ou até mesmo impedir, o crescimento celular da linhagem NG-97.

Diante do exposto, a linhagem NG-97 tem-se mostrado um modelo bastante apropriado para o estudo da biologia dos glioblastomas humanos. A continuidade dos estudos com esta linhagem tumoral, estabelecida em nosso laboratório, poderá desvendar muitos mistérios que ainda cerceiam um melhor entendimento sobre a origem e o desenvolvimento deste tipo de neoplasia.

## ***6. CONCLUSÕES***

---

Resumidamente o presente estudo demonstrou que:

- ☞ As células da linhagem NG-97 possuem atipias nucleares, provavelmente devido a divisões desbalanceadas, com a geração de células polinucleadas freqüentemente observadas em células malignas;
- ☞ A imunofenotipagem parcial confirma a origem glial e de Sistema Nervoso Central das células da linhagem NG-97, uma vez que estas se apresentam positivas para os marcadores GFAP e S100;
- ☞ As células da linhagem tumoral, NG-97 apresentam-se aneuplóides, com um número modal de 62 para a passagem 16 e;
- ☞ Três tipos celulares morfologicamente distintos podem ser observados durante a cultura das células da linhagem NG-97: células arredondadas, células semelhante á células dendríticas e células com aspecto fusiforme. Após o aparecimento de células gigantes, com morfologia dendrítica, o tempo de duplicação da cultura aumenta sensivelmente.

Nós acreditamos que as células da linhagem NG97 possam fornecer conhecimento suficiente para proporcionar um melhor entendimento tanto da biologia como das características imunológicas dos gliomas. Além disso, a linhagem pode ser bastante útil em testes de sensibilidade à drogas ou outras estratégias terapêuticas.

## ***7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

ARSLANTAS A., ARTAN S., ONER U., MUSLUMANOGLU H., DURMAZ R., COSAN E., ATASOY M.A., BASARAN N. E TEL E. : The importance of genomic copy number changes in the prognosis of glioblastoma multiforme. **Neurosurg Rev** 27 : 58-64,2004.

BIGNER D.D., BULLARD D., SCHOLD C., WIKSTRAND C.: Cellular heterogeneity and diversity as a basis for therapeutic resistance of human gliomas. In: Paoletti P, Walker MD, Butti G (eds) *Multidisciplinary aspects of brain tumor therapy*, vol. 1. Neurooncology. Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp. 329-334. 1979

BIGNER D.D., BIGNER S. H., POTEN, J.: Heterogeneity of genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas. **J. Neurological** 47 : 201-229; 1981.

BISSEL MG, RUBSTAEIN LJ, BIGNEMI A, HERMAN MM. : Characteristics of the rat C6 glioma maintained in organ culture systems. Production of glial fibrillary acidic protein in the absence of gliofibrillogenesis. **Brain Res.** 82: 77-89. 1974.

BONGCAM-RUDLOFF E., NIÉSTER M., BETSHOLTZ C., WANG J., STENMAN G., HUEBNER K., CROCE C.M., AND WESTERMARK B. : Human Glial Fibrillary Acid Protein : Complementary DNA cloning, Chromosome localization, and messenger RNA expression in human glioma cell lines of various phenotypes. **Cancer Res** 51, 1553-1560, 1991.

DAVEY G.E., MURMANN P. AND HEIZMANN C.W. : Intracellular Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in Human Glioblastoma. *J. Biol. Chem.* 276 (33) : 30819-30826,2001.

DISERENS A.C., TRIBOLET N., MARTIN-ACHARD A , GAIDE A . C., SCHNEGG J.F., AND CARREL S. : Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18. *Acta Neuropath.* 53: 21-28, 1981.

DONATO R., Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microscopy research technique* 60 : 540 – 551, 2003.

DUFFY PE., The relationship of GFAP to the shape, motility and differentiation of human astrocytoma cells. *Exp. Cell Res.* 139:145-157, 1982.

EDSTRÖM A. *et al.*: Morphological alterations and increase of S100 protein in cultured human glioma cells deprived of serum. *Exp. Cell Res.* 83: 426-429. 1973

ENGELHARD H.H., DUNCAN H.A., MAURO D.C. : Characterization of Glioblastoma Cell differentiation. *Neurosurgery* 41(4) : 886-896, 1997.

JACQUES CM., *et al* (1981) GFAP and S-100 protein levels as an index for malignancy in human gliomas and neurinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 62:479-483.

GRIPPO, M.C.; PENTEADOP.F.; CARELLI E.F., VERINAUD L. : Establishment and partial characterization of a continuous human malignant glioma cell line- NG-97. **Cell. Mol. Neurobiol.** 4 : 421-428, 2001.

HELD-FEINDT J., KRISCH B., MENTLEIN R. : Molecular analysis of somatostatin receptor subtype 2 in human glioma cells. **Mol. Brain Res.** 64: 101-107,1999.

KANEMURA Y., MORI K., FUJIKAWA S.S.H., HAYASHI H., NAKANO A., MATSUMOTO T., TAMURA K., IMAI T., OHNISHI T., FUSHIKI S., NAKAMURA Y., YAMASAKI M., OKANO H. E ARITA N. : Musashi1, an evolutionary conserved neural RNA-binding protein, is a versatile marker of human glioma cells in determining their cellular origin, malignancy, and proliferative activity. **Differentiation** , 68:141-152, 2001

KRUSE, C. A. ; MITCHELL, D. H.; KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B. K.; FRANKLIN,W. A. ; MORSE, H. G.; SPECTOR, E. B. & LILLEHEI, K. O. : Characterization of a Continuous Human Glioma Cell Line DBTRG-05MG: Growth Kinetics, Karyotype, Receptor Expression, and Tumor Suppressor Gene Analyses. **In Vitro Cell. Dev. Biol.** 28 : 609-614, 1992.

KRUSE C.A., VARELLA-GARCIA M., KLEINSCHMIDT-DEMASTERS B.K., OWENS G.C., SPECTOR E.B., FAKHRAI H., SAVELIEVA E., LIANG B. :

Receptor expression, cytogenetic and molecular analysis of six continuous human glioma cell lines. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 34 : 455-462, 1998.

LAM P.Y.P.,BREAKEYFIEL X.O. : Potencial of gene therapy for brain tumors. **Hum. Mol. Genetics** 10(7) : 777-787, 2001.

LIGHTBODY J, PFEIFAR S, KORNBLITH PL, HERSCHMAN H: Biochemical differentiated clonal human glial cells in tissue culture. *J. Neurobiol.* 1:411-417, 1970.

LOUIS D.N.,HOLLAND E.C. & CAIRNCROSS J.G. : Glioma Classification: A molecular reappraisal. **Am. J. of Pathol.** 159 (3) : 779-786, 2001.

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

MOOREHEAD P.S.,NOVELL PC, MELLMAN W.J.,BATTIPS, D.M. E HUNGERFORD B.A. : Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. **Exp. Cell Res.** 20 : 613-616, 1960.

OSBORNE R.H., HOUBEN M.P.W.A., TIJSSEN C.C., COEBERGH J.W.W. AND VAN  
DUIJN C.M. : The genetic epidemiology of glioma. **Neurology** 57(2) : 1751-1755.

PARNEY I.F., FARR-JONES M.A., CHANG L., PETRUK K.C.: Glioma Immunology and  
Immunotherapy. **Neurosurgery**, 46(4) : 778-792, 2001.

PARNEY I.F., FARR-JONES M.A., CHANG L., PETRUK K.C.: Human glioma  
immunology *in vitro*: Implications for immunogene therapy. **Neurosurgery** 46(5)  
: 1169-1178, 2000.

PAETAU A, VIRTANEN I KURKI P., LINDER E., VAHERI A., WESTERMARK B.,  
DAHL D., HALTIA M. : Glial Fibrillary Acidic Protein and intermediate Filaments  
in Human Glioma Cells. **Acta Neuropathol.** 47: 71-74, 1979.

PERLOZVA A., MACIKOVA I., MRAZ P., BIZIK I., STENO J. : Characterization of two  
permanent glioma cell lines 8-MG-BA and 42-MG-BA. **Neoplasma** 45 : 25-29,  
1998.

PORTER K, PRESCOTT D., FRYE J: Changes in surface morphology of Chinese hamster  
ovary cells during the cell cycle. **J. Cell Biology** 57: 815 – 836, 1973.

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) : 325-338,1997.

ROESSMANN U. Neuronal and astrocytic differentiation in human neuroepithelial neoplasms. An immunohistochemical study. **J Neuropathol Exp Neurol**, Mar 1983; 42(2): 113-21, 1983

ROYMANS D., GROBBEN B., CLAES P., SLEGES H. : Protein tyrosine kinase-dependent regulation of adenylate cyclase and phosphatidylinositol 3-kinase activates the expression of a glial fibrillary acidic protein upon induction of differentiation in rat C6 glioma. **Cell Biol. International** 25 (5) : 467-474, 2001.

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 : 3267-3272, 1994.

RUTKA J.T., ACKERLEY C., HUBBARD S., TILUP A., DIRKIS P.B., JUNG S., IVANCHUK S., KURIMOTO M., TSUGU A., BECKER L.E. : Characterization of glial filament-cytoskeletal interactions in human astrocytomas: a immunultrastructural analysis. **Eur. J. Cell Biol.** 76 : 279-287,1998.

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-13cells. **J. Cell Sci.** 107 : 1593-1607, 1994.

SHAPIRO J.R., SHAPIRO W.R. : Therapy modifies cellular heterogeneity in human malignant gliomas. **Adv. Oncol.** 8 : 21-29, 1992.

SHEKHAR PVM, LYAKHOVICH A., VISSCHER D.W., HENG H., KONDRAT N. : Rad6 overexpression induces multinucleation, centrosome amplification abnormal mitosis, and transformation **Cancer research** 62 : 2115 – 2124, 2002.

THERMAM E., & SUSMAN M.: Modificaciones de la mitosis: Cromosomas Humanos – Estructura, Comportamiento y Efectos (Trad.) New York : Springer-Verlag. 1993 : 152-161.

WÜNSCH FILHO V, GATTÁS GJF: Molecular biomarkers in cancer: implications for epidemiological research and public health. **Cad. Saúde pública, Rio de Janeiro,** 17(3) : 467-480, 2001.

ZIMMER DB & E3LDIK LJV : Analysis of calcium-modulated proteins, S100 and calmodulin, and their target proteins during C6 glioma cell differentiation **J. Cell Biology** 108: 141-151, 1989.

YANG AH, KAUSHAL D., REHEN S.K., KRIEDT K., KINGSBURY M.A.,  
MCCONNELL M.J.,CHUN J. : Chromosome segregation defects contribute to  
aneuploidy in normal neural progenitor cells. **The J. Neuroscience** 23 (32) : 10454 –  
10462, 2003.

## **8. *ABSTRACT***

---

MACHADO, C.M.L. **Morphologic, cytogenetic and immunophenotypic analysis of a human malignant glioblastoma cell line: NG97.** Dissertação de Mestrado, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP.

Glioblastomas are highly invasive and aggressive tumors of the Nervous System. Recently, a human malignant continuous cell line, named NG-97, was established in our laboratory. This cell line has been serially subcultured over 100 times in standard culture media presenting no sign of cell senescence. The NG-97 cell line has a doubling time of about 24 h. Immunocytochemical analysis of glial markers demonstrated that cells are positive for glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S-100 protein, and negative for vimentin. Under phase-contrast microscope, cultures of NG-97 showed cells with variable morphological features, such as small rounded cells, fusiform cells (fibroblastic-like cells), and dendritic-like cells. However, at confluence just small rounded and fusiform cells can be observed. At scanning electron microscopy (SEM) small rounded cells showed heterogeneous microextensions, including blebs and filopodia. Dendritic-like cells were flat and presented extensive prolongations, making several contacts with small rounded cells, while fusiform cells presented the surfaces dominated by microvilli. The chromosome number was examined at Passage 16. All cells presented 49 to 92 chromosomes and the modal number of chromosomes was 62.

We believe that the knowledge about NG97 cell line may be useful for a deeper understanding of biological and immunological characteristics of gliomas.

## ***9 . ABREVIATURAS***

---

**B**

BSA: Soro albumina bovina

Bl: Bolhas

**C**

CDK4: Kinase dependente de ciclina 4

CDK6: Kinase dependente de ciclina 6

CDKN2: Kinase dependente de AMPc A/B

**D**

DMSO: Dimetil sulfoxido

**E**

EGFR: Receptor do fator de crescimento epidermal

Erb2/Her2neu: gene homólogo codificador de fator de crescimento epidermal

**F**

Fi: Filopódios

**G**

GFAP : Proteína fibrilar glial ácida

GTG: Banda G-tripsina

**I**

IL6: Interleucina-6

**M**

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

Mi: Microviluosidade

MMD2: Mouse double minute 2

**N**

NG97: Nome da linhagem tumoral de glioblastoma humano

NKBF: Fator  $\kappa$ -B-ligante

nu: Camundongo nude (atímico)

**P**

P13: Passagem treze

P16: Passagem dezesseis

P18: Passagem dezoito

PBS: Tampão Salina fosfato

PDGF: Fator de crescimento de plaqueta

PDFGR: receptor do Fator de crescimento derivado plaquetário

PTEN: Homólogo fosfatase e tensina

**R**

Rb: nome da proteína produzida pelo gene RB

RB1: Gene do retinoblastoma

**S**

S100 : Proteína de citoesqueleto

SBF: Soro fetal bovino

**T**

TSG: Genes supressores de tumores

**V**

Vim-: genótipo alteração pra ausência de expressão de vimentina

