

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**



**KARINA MIE FURUZAWA**

**“Estabelecimento e caracterização de um modelo experimental de glioma empregando enxerto ortotópico de células híbridas da linhagem glial maligna NG97ht”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
KARINA MIE FURUZAWA  
Fábio Rogério  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

**Orientador: Prof. Dr. Fábio Rogério**

**Co-orientador: Prof. Dr. Roger Chammas**

Campinas

2011

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

**F984e**      ***Furuzawa, Karina Mie***  
Estabelecimento e caracterização de um modelo experimental de glioma empregando enxerto ortotópico de células híbridas da linhagem glial maligna NG97ht / Karina Mie Furuzawa. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Fábio Rogério.  
Co-orientador: Roger Chammas.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Glioma. 2. Gliossarcoma. 3. Ortotópico. 4.  
NG97ht. 5. Galectina 3. I. Rogério, Fábio. II.

**Título em inglês:** Establishment and characterization of an experimental glioma model using orthotopic grafts of hybrid glial cell line NG97ht.

**Palavras-chave em inglês:** Glioma; Gliosarcoma; Orthotopic; NG97ht; Galectin 3.

**Área de concentração:** Fisiologia.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Fábio Rogério, Albina Messias de Almeida Milani Altemani, Simone Aparecida Teixeira.

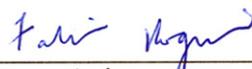
**Data da defesa:** 17/06/2011.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 17 de junho de 2011

**BANCA EXAMINADORA**

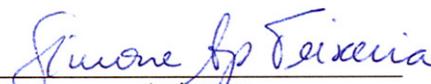
Prof. Dr. Fábio Rogério (Orientador)

  
Assinatura

Profa. Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani

  
Assinatura

Profa. Dra. Simone Aparecida Teixeira

  
Assinatura

Profa. Dra. Andréia Hanada Otake

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

\_\_\_\_\_  
Assinatura

*Dedico este trabalho ao Professor Francesco  
Langone, que mesmo após sua partida deixou  
muitos ensinamentos.*

# AGRADECIMENTOS

Gostaria de poder agradecer ao Professor Francesco Langone por ter me recebido tão bem em seu laboratório e por ter guiado meus primeiros passos na vida acadêmica. Seus ensinamentos e sua confiança depositada em mim foram fundamentais. Sua partida, tão repentina e dolorosa, aconteceu logo no início deste trabalho. Agora, sei que ele, que estava entusiasmado com as novas perspectivas, está feliz com a finalização desta dissertação. Ficarão sempre em minha memória boas lembranças da nossa convivência, desde as longas reuniões durante a Iniciação Científica até as tardes descontraídas em companhia dos alunos do laboratório. Ele foi um exemplo de vida excepcional e até em seus últimos momentos mostrou a pessoa extremamente batalhadora e iluminada que sempre foi. Ficam agora minha admiração e minha gratidão eternas.

Agradeço ao meu querido avô Kingo Takeda, que nos deixou a poucos dias de minha defesa. Era, para ele, uma das maiores alegrias saber que eu estava para defender esta dissertação e fico muito feliz em poder completar esta etapa. Obrigada, “oditian”, por tantos bons momentos que vivemos, por tudo o que aprendi com você e por todo o amor que você me deu. Você foi uma pessoa simplesmente maravilhosa e será sempre uma verdadeira inspiração para mim. Você estará sempre comigo, em meu coração. Muitas saudades.

Agradeço à minha mãe Clara e ao meu pai Adolfo, pois graças a eles eu cheguei até aqui. Obrigada por todo o Amor e todo o apoio desde sempre. Vocês acreditaram em mim desde o início e deram-me muita força para seguir em frente. Amo vocês, muito.

Agradeço à minha avó Teruko por todo o enorme carinho. Com ela, estou sempre aprendendo, com a sua força, seu caráter e amor. Agradeço também aos meus saudosos avós Isamu e Sono.

Agradeço ao Prof. Dr. Fábio Rogério por ter assumido minha orientação mesmo com todas as adversidades. Seu apoio e todos os seus ensinamentos foram extremamente importantes para mim. Tenha certeza que sua competência e dedicação servirão de exemplo para toda a minha vida.

Agradeço ao Prof. Dr. Roger Chammas por ter assumido a co-orientação de meu trabalho e por ter me recebido, tão prontamente, de braços abertos. Esta parceria se iniciou ainda com o Prof. Francesco e foi fundamental para o andamento deste trabalho. Muito obrigada pela confiança e pela imensurável contribuição para minha formação profissional.

Gostaria de frisar que não há palavras que possam descrever o quanto foi importante o enorme apoio que recebi de meu orientador e meu co-orientador. OBRIGADA.

Agradeço à Dra. Camila Maria Longo Machado, do Laboratório de Investigação Médica (LIM-24), sempre me incentivando a ser melhor, pessoal e profissionalmente. Por tudo que me ensinou, pacientemente, pelo entusiasmo e determinação. Obrigada pelo enorme apoio quando mais precisei.

Aos meus queridos amigos Adilson Júnior, Carlos Agena, Fábio Montico, Janice Nascimento, Larissa Rizzo, Monica Gushiken, Raffaella Ignarro, Sílvio Consonni e Tatiane Mazzotti por todo o apoio, fundamental, que me deram nos momentos mais difíceis, e por tantos anos de uma amizade difícil de se encontrar.

Aos amigos do laboratório de Neurobiologia e de Estudos da Dor, André Vieira, que me ajudou muito durante a realização deste trabalho, Raffaella Ignarro, Cesar Sartori, Carlos Assis, Gustavo Facchini, Alexandre Rezende, Janice Nascimento e Priscila Ferreira, pela amizade e prontidão em ajudar sempre que precisei.

Aos amigos do LIM-24, Ana Onuchic, Andréia Otake, Guilherme Francisco, Lara Zimmermann, Luciana Oliveira, Rafael Ikemori, Renata Saito, Rodrigo Aguiar, Silvina Bustos, Tatiane Mazzotti, Tharcísio Tortelli, por todo o carinho e apoio.

À Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, à Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassisse, à Profa. Dra. Simone Aparecida Teixeira, à Profa. Dra. Andréia Hanada Otake e à Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes, por comporem a banca para meu exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Fábio Rogério, à Profa. Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani, à Profa. Dra. Simone Aparecida Teixeira, à Profa. Dra. Andréia Hanada Otake e à Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, por aceitarem compor a banca para a defesa desta dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo importante apoio financeiro.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço a Deus por todas as bênçãos que recebi e por mais esta etapa concluída, que permitiu um grande amadurecimento pessoal e profissional.

# ÍNDICE

<b>Lista de Tabelas e Figuras</b> .....	x
<b>Resumo</b> .....	xi
<b>Abstract</b> .....	xii
<b>Abreviaturas</b> .....	xiii
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. Gliomas.....	1
1.2. Glioblastoma multiforme e gliossarcoma.....	4
1.3. A importância dos modelos experimentais de glioma.....	7
1.4. A linhagem NG97ht.....	10
1.5. Gliomas e galectina-3.....	12
<b>2. Objetivos</b> .....	16
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	17
3.1. Cultura de células.....	17
3.2. Animais e grupos experimentais.....	17
3.3. Cirurgia estereotáxica para implante ortotópico de células tumorais.....	19
3.4. Processamento histológico.....	20
3.5. Análise morfológica.....	21
3.6. Coloração para detecção de fibras reticulínicas.....	21
3.7. Análise imunoistoquímica.....	21
3.8. Análise imunocitoquímica para GFAP <i>in vitro</i> .....	23
3.9. Avaliação da produção de galectina-3 por <i>Western Blotting</i> .....	24

3.10. Avaliação da rejeição do implante ortotópico em camundongos BALB/c através da presença de anticorpos séricos.....	25
3.11. Análises estatísticas.....	26
<b>4. Resultados.....</b>	<b>27</b>
4.1. Análise macroscópica.....	27
4.2. Análise microscópica.....	27
4.3. Distribuição da rede de fibras reticulínicas.....	35
4.4. Análise imunoistoquímica.....	36
4.5. Expressão de GFAP <i>in vitro</i> .....	49
4.6. Detecção de galectina-3 por <i>Western Blotting</i> .....	49
4.7. Avaliação de anticorpos séricos contra o implante ortotópico em camundongos BALB/c.....	52
<b>5. Discussão.....</b>	<b>54</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>68</b>
<b>7. Referências bibliográficas.....</b>	<b>69</b>

## Lista de Tabelas e Figuras

Tabela 1 - Grupos experimentais submetidos a implante ortotópico.....	18
Tabela 2 - Achados morfológicos e imunoistoquímicos observados nos tumores derivados do implante ortotópico de células NG97ht em cérebro de camundongos <i>nude</i> .....	53
Figura 1 - Imagens macroscópicas do encéfalo de camundongo <i>nude</i> após inoculação.....	28
Figura 2 - Cortes transversais do cérebro com neoplasia maligna (HE).....	30
Figura 3 - Cortes transversais do cérebro com neoplasia maligna (HE; 40x).....	31
Figura 4 - Cortes transversais do cérebro com neoplasia maligna (HE; 200x).....	32
Figura 5 - Cortes transversais do cérebro com neoplasia maligna (HE; 400x).....	33
Figura 6 - Cortes transversais evidenciando áreas necróticas (HE; 200x).....	34
Figura 7 - Cortes transversais dos cérebros de camundongo <i>nude</i> controle e BALB/c.....	35
Figura 8 - Cortes transversais submetidos à impregnação pela prata.....	37
Figura 9 - Imunoistoquímica para GFAP em tumor ortotópico (40x).....	39
Figura 10 - Imunoistoquímica para GFAP em tumor ortotópico (100x).....	40
Figura 11 - Imunoistoquímica para GFAP em tumor ortotópico (células neoplásicas e astrócitos hipertróficos reacionais).....	41
Figura 12 - Imunoistoquímica para S-100 em tumor ortotópico.....	42
Figura 13 - Imunoistoquímica para vimentina em tumor ortotópico.....	43
Figura 14 - Imunoistoquímica para CD56 em tumor ortotópico.....	44
Figura 15 - Imunoistoquímica para $\alpha$ -actina de músculo liso em tumor ortotópico.....	45
Figura 16 - Imunoistoquímica para CD34 em tumor ortotópico.....	46
Figura 17 - Imunoistoquímica para PCNA em tumor ortotópico.....	47
Figura 18 - Imunoistoquímica para galectina-3 em tumor ortotópico.....	48
Figura 19 - Expressão de GFAP <i>in vitro</i> .....	50
Figura 20 - Detecção de galectina-3 por <i>Western Blotting</i> .....	51
Figura 21 - Avaliação de anticorpos séricos em camundongos BALB/c.....	52

## Resumo

Gliomas são as mais frequentes neoplasias primárias do sistema nervoso central e compõem um grupo heterogêneo, apresentando diferentes graus de malignidade. Glioblastomas (OMS grau IV) representam aproximadamente 50% dos tumores de origem glial e estão associados ao pior prognóstico, com sobrevida média de menos de um ano após o diagnóstico. O gliossarcoma, uma variante do glioblastoma, apresenta componente mesenquimal, além do componente glial. A linhagem celular de glioma utilizada no presente trabalho, NG97ht, é híbrida humano-murina e foi estabelecida a partir de células neoplásicas implantadas no dorso de camundongos *nudes*. Os tumores que se desenvolveram, por sua vez, são derivados de astrocitoma anaplásico (OMS grau III) ressecado de um paciente masculino de 66 anos. Realizou-se a caracterização morfológica e imunofenotípica de um modelo ortotópico de astrocitoma de alto grau e a análise do padrão de expressão de galectina-3 em tumores derivados da inoculação de células NG97ht. Através de cirurgia estereotáxica, foram inoculadas  $5 \times 10^5$  células NG97ht no córtex cerebral de camundongos *nude* (imunodeprimidos) e BALB/c (imunocompetentes) com oito semanas de idade. Foi realizada ressecção dos tumores que se desenvolveram duas ou quatro semanas pós-implante. Análise morfológica e cálculo do índice mitótico foram realizados em cortes dos tumores incluídos em parafina, assim como coloração para detecção de fibras reticulínicas e reações imunohistoquímicas para GFAP, S-100, vimentina, PCNA, galectina-3, CD34, CD56/NCAM, 1A4, desmina, AE1/AE3 e sinaptofisina. Além disso, foi realizada semi-quantificação da expressão de galectina-3 através de *Western Blotting*. As características morfológicas e imunofenotípicas da neoplasia indicam um glioma de alto grau, particularmente o gliossarcoma. Os tumores apresentaram alta celularidade, presença de focos necróticos e exibem predominantemente células fusiformes com alto índice mitótico. A expressão de GFAP apresentou alta variabilidade, muitas vezes presente em agrupamentos de células neoplásicas. Foi observada imunopositividade citoplasmática para CD56 e 1A4, indicando diferenciação divergente neuroectodérmica e mesenquimal. Além disso, foi detectada rica e fina rede de fibras reticulínicas intercelulares. A localização da galectina-3 foi nuclear e/ou citoplasmática e sua expressão foi intensa, principalmente nos limites da lesão com o tecido normal adjacente. Não foi detectada diferença significativa na expressão de galectina-3 entre tumores obtidos duas e quatro semanas pós-implante. Em camundongos BALB/c não foi observado crescimento tumoral. Em conclusão, o implante ortotópico de células NG97ht representa uma interessante alternativa para investigações *in vivo* de gliossarcoma. Considerando-se a falta de estudos sobre o papel da galectina-3 em gliossarcomas e seu possível envolvimento com migração celular, angiogênese e quimiorresistência, a galectina-3 pode ser um potencial alvo para novas estratégias terapêuticas.

## Abstract

Gliomas are the most frequent primary brain tumors and correspond to various histopathological types and malignancy grades. Glioblastomas (WHO grade IV) account for approximately 50% of glial tumors and are associated with the worst prognoses, with median survival rate of less than 1 year. Gliosarcoma is a rare variant of glioblastoma which displays distinct glial and mesenchymal components. NG97ht is a malignant murine and human hybrid cell line established from a human anaplastic astrocytoma-derived tumor engrafted into *nude* mice. The aims of the present work were morphological and immunophenotypical characterization of an *in vivo* orthotopic glioma model and analysis of galectin-3 expression pattern in NG97ht cell line-derived tumors.  $5 \times 10^5$  NG97ht cells were stereotactically inoculated into cerebral cortex of 8-week-old *nude* or BALB/c mice and tumors were resected after two or four weeks. Morphological analysis and calculation of mitotic index were made in paraffin-embedded sections, as well as immunohistochemical reactions for GFAP, CD56, 1A4, AE1/AE3 and galectin-3. Semi-quantification of galectin-3 expression was obtained through Western Blotting. The neoplastic features favour a high-grade glioma, particularly gliosarcoma. Tumors were predominantly constituted by spindle cells with high mitotic index and showed elevated cellular density and some necrotic areas. GFAP was expressed by groups of tumoral cells. Positivity for CD56 and 1A4 was cytoplasmic and indicates neuroectodermic and mesenchymal divergent differentiation. Localization of galectin-3 was nuclear and/or cytoplasmic and its expression was intense, mainly at tumor borders with adjacent tissue. There was no significant difference in galectin-3 expression between tumors resected after two or four weeks. Tumor growth was not detected in BALB/c mice. In conclusion, the orthotopic implant of NG97ht cells represents an interesting alternative for gliosarcoma *in vivo* studies. Considering the lack of investigation about the role of galectin-3 in gliosarcomas and the possible involvement of galectin-3 in cellular migration, angiogenesis and chemoresistance, it should be a potentially good target for new therapeutic strategies.

## Abreviaturas

**AE1/AE3** – *pool* de citoqueratinas

**Bcl-2** - B-Cell Leukemia/Lymphoma 2 (Leucemia/Linfoma de célula B do tipo 2)

**BSA** - Bovine Serum Albumin (albumina de soro bovino)

**CEEA** - Comitê de Ética em Experimentação Animal

**CGA** - Campos de Grande Aumento

**COBEA** - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

**CRD** - Carbohydrate recognition domain (domínio de reconhecimento de carboidrato)

**CRE** - cAMP responsive element (elemento responsivo a cAMP)

**CREB** - cAMP responsive element binding protein (proteína ligadora ao elemento responsivo a cAMP)

**DAB** - 3,3-diaminobenzidina

**EDTA** - Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

**EGFR** - Epidermal growth factor receptor (receptor do fator de crescimento epidérmico)

**ELISA** - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**ENU** - N-ethyl-N-nitrosourea (N-etil-N-nitrosuréia)

**GBM** - Glioblastoma multiforme

**GFAP** - Glial fibrillary acidic protein (proteína ácida fibrilar glial)

**HLA** - Human leukocyte antigen (antígeno leucocitário humano)

**MHC** – Major histocompatibility complex (complexo principal de histocompatibilidade)

**MMP** - Matrix metalloproteinase (metaloproteinase da matriz)

**NCAM** - Neural cell adhesion molecule (molécula de adesão celular neural)

**MNU** - N-methyl-N-nitrosourea (N-metil-N-nitrosuréia)

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**OPD** - Ortho-phenylenediamine (orto-fenilenodiamina)

**PCNA** - Proliferating cell nuclear antigen (antígeno nuclear de proliferação celular)

**PI3K** - Phosphoinositide 3-kinase (fosfoinositol-3 quinase)

**PBS** - Phosphate buffered saline (tampão fosfato salino)

**PET** – Positron emission tomography (tomografia por emissão de pósitrons)

**PMSF** - Phenylmethylsulfonyl fluoride (fluoreto de fenilmetilsulfonil)

**PTEN** - Phosphatase and tensin homolog

**PVDF** - Polyvinylidene fluoride (fluoreto de polivinilideno)

**RPMI** - meio de cultura Rose Park Memorial Institute

**SDS** - Sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato de sódio)

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**Sp1** - Specificity protein-1 (proteína de especificidade-1)

**TTF-1** - Thyroid transcription fator-1 (fator de transcrição da tireóide-1)

# 1. Introdução

## 1.1. Gliomas

As neoplasias do sistema nervoso incluem um grande número de entidades que refletem a variedade de tipos celulares constituintes do próprio tecido nervoso, bem como as meninges e raízes nervosas. Além disso, aproximadamente um terço dos tumores do sistema nervoso são metástases. As células da glia são o tipo celular do tecido nervoso que mais comumente origina neoplasias, as quais formam um grupo heterogêneo e são genericamente denominadas gliomas (Von Deimling e cols., 1995; Lefranc e cols., 2005). As principais células da glia, os astrócitos, oligodendrócitos e o epêndima originam os astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas, que correspondem a cerca de um terço das neoplasias do sistema nervoso central (SNC). Os neurônios raramente são fonte de tumores no SNC e, quando tal ocorre, geralmente são pouco diferenciados ou imaturos, como o meduloblastoma. Há ainda tumores mistos de glia e neurônios, sendo os principais os gangliogliomas. Os meningiomas, derivados de fibroblastos pavimentosos da aracnóide, compõem o outro terço das neoplasias do SNC (Billis e cols., 2010). Particularmente, os gliomas correspondem a entidades anátomo-clínicas com localização e idades preferenciais de ocorrência. Além disso, os sintomas neurológicos dependem primariamente do local onde o tumor se desenvolve, enquanto que a evolução clínica do paciente está relacionada principalmente às características biológicas da neoplasia (Louis e cols., 2007).

Em especial, as lesões originadas em astrócitos podem surgir em diferentes topografias do SNC e apresentam ampla variedade de características morfológicas e comportamento biológico. Estes tumores são graduados utilizando-se critérios histopatológicos estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), os quais consideram a presença de atipias nucleares (pleomorfismo, formato irregular, multinucleação, cromatina dispersa), mitoses, proliferação vascular e necrose. Como regra geral, a graduação baseia-se na quantidade de critérios

morfológicos detectados na lesão. Dessa maneira, estas neoplasias podem ser classificadas como astrocitoma pilocítico (grau I) ou astrocitomas difusos (graus II/III/IV). Estes últimos apresentam delimitação imprecisa e crescem de maneira difusamente infiltrativa entre os elementos pré-existentes. Exibem forte tendência à invasão e progressão cronológica a graus mais altos de malignidade. Em contraposição, os astrocitomas pilocíticos exibem lento crescimento, são geralmente bem delimitados e sem tendência à malignização (Louis e cols., 2007).

Astrocitomas pilocíticos (OMS grau I) ocorrem predominantemente nas primeiras duas décadas da vida. São tumores circunscritos e frequentemente císticos, observados com maior frequência no cerebelo. O padrão histológico é bifásico, com proporções variáveis de tecido compacto, densamente fibrilar formado por astrócitos com longos processos citoplasmáticos, e tecido frouxo, que apresenta astrócitos com múltiplos prolongamentos curtos. Com relação aos sintomas, estas neoplasias podem causar déficits neurológicos específicos, em função do local onde se desenvolvem, além de pressão intracraniana aumentada (Louis e cols., 2007).

Os astrocitomas difusos de baixo grau (OMS grau II) afetam tipicamente jovens adultos (média de 34 anos). Representam aproximadamente 25% dos gliomas nos hemisférios cerebrais e possuem tendência à progressão maligna. Dentre os sintomas, convulsões são manifestações clínicas comuns, além de outros sinais como dificuldades na fala e alterações sensoriais ou motoras. Os astrocitomas difusos de baixo grau apresentam crescimento lento e infiltração difusa em estruturas cerebrais adjacentes. Exibem apenas um dos aspectos morfológicos usados para graduação histológica segundo a OMS: atipia nuclear. Fenotipicamente, astrócitos neoplásicos podem variar consideravelmente quanto ao tamanho, proeminência dos processos celulares e abundância de filamentos citoplasmáticos. No entanto, o reconhecimento histológico dos astrócitos neoplásicos depende principalmente de características nucleares. Um astrócito normal geralmente possui núcleo oval a alongado, massas de cromatina de tamanho intermediário,

nucléolo evidente e citoplasma dificilmente identificável à coloração de hematoxilina e eosina. Por sua vez, astrócitos reacionais exibem núcleo maior e excêntrico, além de citoplasma eosinofílico amplo e volumoso, com projeções exuberantes. Finalmente, os astrócitos neoplásicos são caracterizados por núcleos irregulares, ocasionalmente alongados, hipercromáticos, além de citoplasma de volume variável (Louis e cols., 2007).

Por sua vez, o astrocitoma anaplásico (OMS grau III) ocorre, em média, aos 41 anos e homens são mais afetados. Os sintomas clínicos são similares aos apresentados por pacientes com astrocitoma difuso de baixo grau, mas geralmente a evolução clínica é mais rápida. Esta neoplasia exibe infiltração difusa e possui considerável potencial proliferativo. É considerada para seu diagnóstico a presença de dois dos critérios histopatológicos estabelecidos pela OMS: atipia nuclear e mitose. O astrocitoma anaplásico pode surgir a partir de um astrocitoma de grau II, mas também pode ser diagnosticado sem sinais de uma lesão precursora de menor malignidade. Quando comparadas neoplasias de graus II e III, estas últimas tendem a mostrar maior celularidade, local ou difusa, um importante achado morfológico. Quanto maior o grau de anaplasia, mais frequentemente observam-se aumento da celularidade, variações no formato e tamanho nuclear, dispersão da cromatina, nucléolo proeminente, multinucleação e mitoses típicas ou atípicas (Louis e cols., 2007).

O glioblastoma multiforme (GBM; OMS grau IV) representa a neoplasia maligna intracraniana mais frequente, bem como a forma mais agressiva de glioma (Ma e cols., 2002; Schenka e cols., 2005; Brandes e cols., 2008; Colman & Aldape, 2008). Esta neoplasia é mais comum em homens e localiza-se preferencialmente nos hemisférios cerebrais, particularmente nas regiões fronto-temporais e parietais. GBMs no tronco encefálico são menos comuns e mais frequentemente atingem crianças, enquanto que o cerebelo e a medula espinal são raramente acometidos. A classificação de acordo com a OMS baseia-se na presença de pelo menos três

achados morfológicos considerados como critérios diagnósticos: atipia nuclear, mitose, proliferação vascular e/ou focos de necrose, os quais ocasionalmente assumem o aspecto de pseudopaliçada (Ellison e cols., 1998; Furnari e cols., 2007). A distribuição destes elementos histológicos dentro do tumor é variável, mas grandes áreas necróticas geralmente ocupam a região central, enquanto que células tumorais viáveis localizam-se na periferia. Proliferação vascular normalmente é encontrada próxima aos focos necróticos e na região de infiltração periférica (Louis e cols., 2007).

## ***1.2. Glioblastoma multiforme e gliossarcoma***

GBMs primários, mais comuns em pacientes idosos, manifestam-se após rápida evolução clínica sem evidências de lesão precedente de menor grau. GBMs secundários são mais raros e ocorrem predominantemente em pacientes com cerca de 45 anos, originados da transformação progressiva de astrocitomas de grau II ou III. GBMs são agressivos e apresentam tendência a se infiltrar difusamente no tecido cerebral adjacente. Os sintomas manifestados pelos pacientes podem ser gerais, como dores de cabeça e aumento de pressão intracraniana, ou específicos, em função da região do SNC comprometida pela neoplasia (Louis e cols., 2007). Finalmente, a excisão completa dos astrocitomas difusos (OMS graus II/III/IV) é virtualmente impossível e recorrências são comuns: cinco a dez anos após o diagnóstico, cerca de 70% dos gliomas de grau II progridem para grau III ou IV (Watanabe e cols., 1997; Kleihues & Ohgaki, 2000; Louis, 2006; Furnari e cols., 2007). Esta progressão está associada à aquisição de alterações genéticas, tais como amplificação do gene EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico), mutações dos genes p53 e PTEN (do inglês, *phosphatase and tensin homolog*) e perda alélica do cromossomo 10 (Nozaki e cols., 1999; Sarkar e cols., 2002; Put-Ti-Noi e cols., 2004; Rong e cols., 2009).

Em geral, neoplasias astrocitárias são amplamente caracterizadas por imunopositividade para GFAP (proteína ácida fibrilar glial), proteína do filamento intermediário presente em astrócitos, mas a intensidade e distribuição da reatividade é muito variável. Geralmente, os astrócitos neoplásicos maiores e os reacionais ao crescimento tumoral são fortemente positivos, enquanto que células astrocitárias tumorais pequenas e indiferenciadas tendem a ser negativas ou fracamente positivas (Louis e cols., 2007). Outros marcadores frequentemente estudados em astrocitomas difusos são a vimentina, proteína de filamento intermediário comumente expressa em células de origem mesenquimal, e a S-100, proteína ligante de cálcio presente em astrócitos, oligodendrócitos e células endimárias (Reifenberger & Collins, 2004; Ivaska e cols., 2007; Balik e cols., 2009).

Como explícito pela denominação “multiforme”, os achados histopatológicos do GBM são muito diversificados. Enquanto algumas lesões exibem elevado grau de pleomorfismo celular e nuclear, com numerosas células gigantes multinucleadas, outras mostram alta celularidade, mas são consideravelmente monótonas. Em alguns casos, a natureza astrocitária da neoplasia pode ser identificada em certas regiões da lesão, porém, em outros, é dificilmente reconhecível devido ao alto grau de anaplasia. A heterogeneidade dos GBMs é marcante e representa um importante desafio para o diagnóstico histopatológico. Segundo a última edição da classificação dos tumores do SNC proposta pela OMS, o GBM apresenta variantes, como o gliossarcoma e o glioblastoma de células gigantes (Louis e cols., 2007; Miller & Perry, 2007).

Em particular, o gliossarcoma foi descrito por Stroebe e cols. em 1895 e representa aproximadamente 2% dos GBMs. Manifestam-se preferencialmente entre 40 e 60 anos de idade, afetando principalmente homens. De maneira geral, a evolução clínica é rápida e os sintomas correspondem à localização do tumor, geralmente nos lobos temporal, frontal, parietal e occipital. Dentre os sintomas comuns encontram-se convulsões, parestesia e aumento da pressão intracraniana

(Louis e cols., 2007). Alguns estudos sugerem prognóstico sutilmente melhor para pacientes com gliossarcoma quando comparados àqueles com GBM, mas não tem sido observada diferença estatisticamente significativa (Meis e cols., 1991; Galanis e cols., 1998; Lutterbach e cols., 2001; Louis e cols., 2007). As lesões possuem padrão tecidual bifásico, essencial para o diagnóstico, com regiões exibindo diferenciação mesenquimal e regiões com características gliais. A porção glial normalmente possui características típicas de GBM, com variável grau de anaplasia e expressão de GFAP. A porção mesenquimal pode apresentar uma variedade de diferenciações, como formação de cartilagem, osso, tecido osteocondral e muscular liso ou esquelético. Frequentemente, observa-se o padrão arquitetural “em espinha de peixe” (*herringbone*) característico de fibrossarcomas, com longos e densos feixes de células fusiformes. Notam-se também atipia nuclear, figuras de mitose e áreas necróticas. A formação de uma rede de fibras reticulínicas nas áreas mesenquimais geralmente mostra que estas são bem delimitadas em relação à porção glial do tumor (Louis e cols., 2007). Estudos indicam uma origem monoclonal da neoplasia, com diferenciação do componente mesenquimal a partir do componente astrocitário de alto grau (Boerman e cols., 1996; Biernat e cols., 1995; Reis e cols., 2000). É importante ressaltar que a ocorrência de células fusiformes em um GBM não justifica um diagnóstico de gliossarcoma, pois é fundamental identificar áreas com características fenotípicas gliais e mesenquimais (Meis e cols., 1990; Louis e cols., 2007). Especificamente, a investigação do imunofenótipo glial dos gliossarcomas tem sido feita através da imunomarcação para GFAP, S-100 e vimentina. Marcadores utilizados para se identificar a presença do componente mesenquimal são a actina de músculo liso, a desmina (proteína de filamento intermediário de músculo esquelético), as citoqueratinas (proteínas do citoesqueleto), o neurofilamento (filamento intermediário neuronal), a vimentina, CD34 (glicoproteína presente em células endoteliais e progenitores hematopoiéticos) e CD56/NCAM (molécula de adesão celular neural; proteína de

adesão presente em células de origem neuroectodérmica) (Meis e cols., 1990; Jones e cols., 1991; Perry e cols., 1995; Sreenan & Prayson, 1997; Hayashi e cols., 2009).

Apesar das opções terapêuticas disponíveis que combinam cirurgia, radioterapia e, mais recentemente, tratamento quimioterápico com temozolamida, o prognóstico dos portadores de glioblastoma é reservado (Kuo e cols., 2006; Sathornsumetee & Rich, 2008). Aproximadamente um quarto dos pacientes tratados com temozolamida sobrevive por dois anos após diagnóstico (Stupp e cols., 2005) e o tempo médio de sobrevivência de pacientes com glioblastoma é de menos de um ano (Vogelhuber e cols., 2002; Rich e cols., 2004; Lefranc e cols., 2005). Diante deste quadro, nota-se, nas últimas décadas, um esforço multidisciplinar contínuo para o estudo da fisiopatogênese dos astrocitomas difusos de alto grau e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que sejam mais eficientes na redução da mortalidade e morbidade associadas a estas neoplasias.

### ***1.3. A importância dos modelos experimentais de glioma***

Diversos modelos experimentais têm sido utilizados para a investigação de neoplasias do SNC, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Especificamente, a implantação ortotópica (isto é, em um órgão do mesmo tipo tecidual) de células tumorais do SNC em ratos e camundongos possibilita o acompanhamento *in vivo* do crescimento tumoral e, comparada a modelos mais simplificados, possui a vantagem de permitir a análise da relação entre os tecidos neoplásico e normal adjacente. Entretanto, a complexidade desses modelos dificulta o estudo individual de determinados processos relacionados às características do comportamento maligno das neoplasias, como invasão e angiogênese. Neste contexto, modelos *in vitro* constituem estratégia interessante para se examinar efeitos associados a modificações na composição de substratos da lâmina basal, fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular, proteases e moléculas de adesão.

Assim, o estudo do comportamento de tumores cerebrais malignos é amplamente beneficiado pelo uso combinado de diferentes modelos experimentais tanto *in vivo* quanto *in vitro*, uma vez que tal estratégia permite uma melhor caracterização celular da neoplasia (Grobben e cols., 2002).

Uma das primeiras descrições da indução seletiva de tumores do SNC em ratos adultos data de meados de 1970, através de injeções intravenosas semanais de N-metil-N-nitrosuréia (MNU) ou dose única de N-etil-N-nitrosuréia (ENU). Estes achados conduziram ao desenvolvimento de diversos modelos experimentais de tumores cerebrais em ratos, sem necessidade de aplicação tópica de carcinógeno no encéfalo. As primeiras abordagens experimentais para implante de células ou fragmentos tumorais no cérebro dos animais não apresentavam reprodutibilidade e precisão satisfatórias. Estes procedimentos foram significativamente aperfeiçoados com: (1) a implantação estereotáxica de células tumorais derivadas de cultura de tecidos ou de suspensões celulares concentradas em pequenos volumes, (2) o refinamento da localização estereotáxica de estruturas na substância branca mais profundas, como o núcleo caudado e (3) adaptação da injeção para uma velocidade mais lenta (Kobayashi e cols., 1980, Barth & Kaur, 2009). Tais avanços resultaram em uma técnica confiável que eliminou a disseminação de células neoplásicas para regiões extracranianas e para a medula espinal. Além disso, a estratégia de implante permanente de cânulas plásticas ou metálicas no crânio após a injeção ortotópica de células tumorais tem possibilitado administração pós-cirúrgica precisa de agentes terapêuticos (Lal e cols., 2000; Saini e cols., 2004).

Um modelo experimental de tumores do SNC em ratos amplamente utilizado é a linhagem 9L de gliossarcoma, induzida em ratos Fisher através de injeções intravenosas de MNU (5 mg/kg) durante 26 semanas (Schmidek e cols., 1971; Benda e cols., 1971). As células foram clonadas no *Brain Tumor Research Center*, na Universidade da Califórnia, São Francisco (Barker

e cols., 1973; Schmidek e cols., 1971), e tornaram-se um bom modelo para estudos *in vivo* em inúmeras modalidades terapêuticas. Quando implantadas ortotopicamente em ratos Fisher, as células da linhagem 9L formam tumores compostos por células fusiformes e bem delimitados, ou seja, sem sinais aparentes de invasão no tecido normal adjacente. Recentemente, foi descrita na linhagem 9L presença de células neoplásicas com características de células-tronco (do inglês, *cancer stem-like cells*), que formam neuroesferas e expressam marcadores de progenitores neurais, como nestina e Sox2. Estas células são auto-replicáveis e *in vitro* diferenciam-se em células com características gliais e neuronais (Ghods e cols., 2007). O modelo de gliossarcoma 9L tem sido utilizado na investigação de mecanismos de resistência a drogas (Barcellos-Hoff e cols., 1992; Schepkin e cols., 2006), transporte de drogas através da barreira hematoencefálica (Khan e cols., 2005; Black e cols., 2008), efeito de substâncias anti-angiogênicas (Wolff e cols., 1997; Yang e cols., 2007), cisplatina e temozolamida (Donawho e cols., 2007; Bencokova e cols., 2008) e em estudos que utilizam ressonância magnética e tomografia por emissão de pósitrons (PET) (Yuan e cols., 2006; Bansal e cols., 2008), entre outros. Desta forma, o estabelecimento de linhagens celulares permanentes oferece uma oportunidade ímpar para o estudo da biologia de tumores agressivos, como o GBM (Michailowsky e cols., 2003; Mathieu e cols., 2007). A imortalização de tumores através do cultivo *in vitro* permite a abordagem de inúmeros temas, dentre os quais se destacam: (1) o estudo da expressão de marcadores antigênicos contribuindo para o entendimento da biologia tumoral, diagnóstico, prognóstico e seguimento terapêutico destas neoplasias e (2) teste de novas drogas e estratégias terapêuticas (Westphal e cols., 1988; McKeever e cols., 1991; Jennings e Pietenpol, 1998).

#### ***1.4. A linhagem NG97ht***

Grippe e cols. estabeleceram, em 2001, no laboratório de Imunopatologias da Unicamp, uma nova linhagem glial permanente denominada NG97. Esta linhagem celular foi obtida a partir de um astrocitoma anaplásico (OMS grau III) de lobo temporal, ressecado de um paciente masculino de 66 anos. As células originadas neste tumor foram subcultivadas em série, apresentando um tempo de duplicação de aproximadamente 72 horas. Quando em cultivo, as células NG97 formaram monocamadas no recipiente de cultura, onde se distinguiram três tipos celulares: uma população de células pequenas e arredondadas, uma de células fusiformes/estreladas e uma terceira população de células grandes e multinucleadas, com extensos prolongamentos (Machado e cols., 2005). O enxerto subcutâneo destas células no dorso de camundongos *nude* (atímicos congênitos) induziu a formação de massas tumorais sólidas, demonstrando a malignidade desta linhagem celular, inclusive após implante heterotópico. Histologicamente, as células tumorais transplantadas apresentaram características de neoplasia agressiva e pouco diferenciada, tais como atipia celular, alto índice mitótico, focos de necrose (por vezes em pseudopaliçada) e proliferação vascular, achados morfológicos encontrados em astrocitomas de alto grau. Entretanto, neste estudo, a natureza glial destas células não foi investigada à luz de critérios imunoistoquímicos ou ultraestruturais (Grippe e cols., 2001).

Um dos pressupostos fundamentais do uso da imunoistoquímica na determinação da histogênese de tumores é a verificação da expressão de alguns antígenos, característicos de um tecido normal (maduro ou imaturo), em um tecido neoplásico cuja origem não pôde ser determinada segundo critérios morfológicos puros (Alves, 1999). No processo de desdiferenciação celular da neoplasia, alguns antígenos podem deixar de ser expressos (Bocchini e cols., 1991), ao passo que outros componentes celulares, normalmente ausentes no tecido de origem, podem ser produzidos de forma anômala ou aberrante (Henricks e cols., 1997). Os

principais marcadores antigênicos associados ao imunofenótipo glial são a GFAP, a proteína S-100 e a vimentina (Wikstrand & Bigner, 1980; Bonnin & Rubinstein, 1984; Dai & Holland, 2001). A intensidade e distribuição tecidual das proteínas mencionadas acima são muito variáveis nos gliomas malignos, refletindo a grande heterogeneidade destes tumores (Louis e cols., 2007). As células de origem astrocitária têm como característica embrionária a expressão única de filamentos de citoesqueleto do tipo vimentina, anterior à migração dos progenitores celulares para a glia radial (Bignami e cols., 1982; Yang e cols., 1994). Esta migração é acompanhada da diferenciação das células que constituirão o cérebro adulto, a qual é determinada pelos mediadores químicos presentes no microambiente (Mehler e cols., 1995). Com a maturação das células da glia, tanto a vimentina quanto a GFAP tornam-se presentes (Dahl, 1981; Gomes e cols., 1999) e, no cérebro adulto, encontra-se prioritariamente a expressão de GFAP, que pode ser alterada em condições patológicas, como o mal de Alzheimer e alguns tumores astrocitários (He e Sun, 2007).

Schenka e cols. (2005) demonstraram a manutenção imunofenotípica glial da linhagem NG97, detectando a expressão, tanto nas células em cultura quanto no xenoinxerto, dos marcadores GFAP e S-100. Porém, através de reações imunoistoquímicas foi observada diminuição da expressão de GFAP no xenoinxerto quando comparado ao tumor original. Além disso, análise ultraestrutural do xenoinxerto por meio de microscopia eletrônica de transmissão mostrou presença de escassos filamentos intermediários, os quais provavelmente corresponderiam à GFAP. Estes dados somados às diferenças imunofenotípicas observadas entre o xenoinxerto e o tumor original poderiam representar indícios de desdiferenciação.

Mais recentemente, verificou-se que várias culturas de células NG97 apresentavam características híbridas. Especificamente, estas células possuíam um lote cromossomal murino hipertriplóide com translocações de cromossomos humanos. As células foram então classificadas

como um híbrido interespecífico e passaram a ser denominadas NG97ht. É provável que tenha ocorrido fusão das células tumorais com células de partes moles do dorso de camundongos *nude*, nos quais foi testada a capacidade tumorigênica destas células neoplásicas (Machado e cols., 2008). A análise de tais células mostrou que, embora o componente murino exista, houve expressão de proteínas humanas e manutenção do padrão histopatológico de astrocitoma de alto grau quando estas células foram implantadas no dorso de camundongos imunodeficientes *nude* e CB-17-Prkdc<sup>scid</sup>/PasUnib (Machado, 2008). Quando analisados os perfis imunofenotípicos de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano e murino verificou-se que as células NG97ht não expressam HLA-ABC (MHC de classe I) e HLA-DRDPDQ (MHC de classe II), ambos humanos, nem o haplótipo murino H-2<sup>d</sup> (Dra. Camila M.L. Machado, comunicação pessoal). Portanto, a ausência destas moléculas diminui a probabilidade de reação enxerto *versus* hospedeiro às células NG97ht quando inoculadas em camundongos imunocompetentes (Abbas e Lichtman, 2003).

Machado e cols. (2008) observaram que, ao longo do subcultivo, as células NG97ht apresentaram diminuição da expressão de GFAP associada ao aumento da expressão de vimentina. Este fato poderia estar associado à recuperação de características embrionárias, fenômeno comum em células tumorais. Tal achado coincidiu com a diminuição do tempo de duplicação das células, sugerindo aumento da capacidade de divisão celular, compatível com o fenótipo de células malignizadas.

### ***1.5. Gliomas e galectina-3***

Recentemente, Ikemori (2009) verificou que na massa tumoral gerada pelo implante de células NG97ht no dorso de camundongos *nude*, houve formação de zonas de pseudopaliçada. Esta zonas apresentaram áreas hipercelulares margeando regiões necróticas, evidenciadas por

meio de reações imunoistoquímicas para caspase-3 no tecido tumoral. As zonas de pseudopaliçada têm sido interpretadas como sendo compostas por células migrantes provenientes de ambientes hipóxicos, criados pelo crescimento exagerado de células tumorais com consequente diminuição relativa do oxigênio disponível. Estas células migrariam em direção a vasos sanguíneos, sendo seis a vinte vezes mais propensas à apoptose do que células adjacentes (Brat e cols., 2004). Também neste mesmo estudo foi detectada forte expressão de galectina-3 nas células ao redor das áreas necróticas.

As galectinas são proteínas relativamente pequenas, com massas moleculares entre 14,5 a 38 kDa. Tais proteínas possuem sequências conservadas de ~130 aminoácidos, os domínios de reconhecimento de carboidratos (do inglês, *carbohydrate recognition domains*, CRDs), os quais possuem afinidade específica para  $\beta$ -galactosídeos (Perillo e cols., 1998). Foram identificadas em mamíferos 15 galectinas, sendo que algumas possuem dois CRDs (galectina-4, -6, -8, -9 e -12), outras, apenas um (galectina-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15), atuando preferencialmente em monômeros ou dímeros, respectivamente (Elola e cols., 2005). A galectina-3 possui uma estrutura única, pois contém um único CRD com repetições de curtas sequências de aminoácidos (Cooper, 2002). As galectinas ligam-se aos componentes da matriz extracelular, glicoproteínas de membrana e lipídeos presentes em células adjacentes, participando da adesão célula-matriz ou adesão intercelular (Ozeki e cols., 1995). Embora estas observações sugiram que as galectinas sejam extracelulares, a quantidade secretada no meio extracelular é mínima (Cho & Cummings, 1995) e a maioria destas proteínas está localizada no citoplasma e núcleo, o que sugere importante função intracelular em processos fisiológicos e patológicos (Satelli e cols, 2008).

Especificamente, a galectina-3 está presente em diversos tecidos em diferentes estágios de desenvolvimento (Dumic e cols., 2006; Yang e cols., 2008) e suas funções são definidas por sua localização intracelular ou extracelular. Em tecidos neurais normais, a expressão de galectina-3 é

restrita a subpopulações de neurônios do gânglio da raiz dorsal. Porém, esta proteína passa a ser expressa por células de Schwann no caso de lesão do nervo ciático e pela micróglia cerebral *in vivo* e *in vitro*, em situações de traumatismo (Kuklinski e cols., 2000). Dependendo do tipo celular, das condições experimentais *in vitro* ou da localização tecidual, tem sido descrito que a galectina-3 pode ser exclusivamente citoplasmática, predominantemente nuclear ou presente em ambos compartimentos (Haudek e cols., 2010). A localização citosólica parece estar envolvida na regulação da proliferação celular, diferenciação e sobrevivência através de interações com o oncogene K-Ras ou pela via de sinalização da fosfoinositol-3 quinase (PI3K) – Akt (Dumic e cols., 2006). Além disso, proteínas relacionadas à regulação da apoptose têm sido identificadas como ligantes da galectina-3, como a Bcl-2, CD95/FasR e *nucling* (Yang e cols., 1996; Fukumori e cols., 2004; Liu e cols., 2004). Em contraste, expressão nuclear de galectina-3 tem sido associada aos mecanismos de transcrição gênica, ao modular a atividade promotora da ciclina D1 através da regulação da atividade de fatores de transcrição (Lin e cols., 2002). Por sua vez, galectina-3 extracelular exibe diversos efeitos autócrinos e parácrinos. Ela pode mediar a adesão e ativação celular e atuar como quimioatrativo para certos tipos celulares, modulando diferentes processos biológicos como homeostase celular, reações imunológicas, angiogênese, invasão tumoral e metástase (Ochieng e cols., 2004; Takenaka e cols., 2004; van den Brule e cols., 2004; Liu & Rabinovich, 2005).

Particularmente em gliomas, a galectina-3 está presente em maior frequência no citoplasma e, em algumas linhagens celulares, também no núcleo, em diferentes graus de distribuição (Yang e cols., 1996). Ela possui participação importante no desenvolvimento tumoral por inibir a apoptose induzida por drogas (Ingrassia e cols., 2006). Além disso, quando secretada por células tumorais, esta proteína participaria do mecanismo de escape imunológico tumoral ao induzir apoptose em linfócitos T infiltrantes (Fukumori e cols., 2003; Lahm e cols., 2004). Tem

sido descrito que a galectina-3 estimula a migração celular *in vitro* em linhagens derivadas de GBM (U87 e U373) e que sua atividade é modulada por metaloproteinases da matriz (MMPs), as quais possuem importante participação na motilidade celular e invasão em gliomas (Ochieng e cols., 1994; Ochieng e cols., 1998; Camby e cols., 2001).

Finalmente, considerando a reduzida probabilidade de indução da reação enxerto *versus* hospedeiro das células NG97ht, é particularmente interessante investigar a capacidade adaptativa e o comportamento destas células em condições de inoculação ortotópica. Além disso, estudos anteriores realizaram análises *in vivo* apenas após implante heterotópico, ou seja, inoculação no dorso de camundongos. Desse modo, o presente trabalho visa contribuir para melhor compreensão do comportamento biológico dos gliomas de alto grau e fornecer dados para o estabelecimento e caracterização de um modelo experimental *in vivo* para estudos fisiopatológicos de gliomas (Vince e cols., 2004), bem como para a investigação de novas estratégias terapêuticas (Szentirmai e cols., 2006). Deve-se ressaltar ainda a importância da utilização de camundongos BALB/c no presente estudo, já que estes animais possuem capacidade de desenvolvimento e maturação de linfócitos T e B, componentes principais da resposta imune adaptativa (Mills e cols., 2000).

## 2. Objetivos

### 2.1. Gerais

- Avaliar o crescimento celular *in vivo* da linhagem NG97ht após implante no córtex frontal de camundongos imunodeprimidos (*nude*) e imunocompetentes (BALB/c);
- Realizar a caracterização *in vivo* do tumor através de avaliação histológica e imunofenotípica após implante das células NG97ht no córtex frontal em camundongos imunodeprimidos (*nude*) e imunocompetentes (BALB/c).

### 2.2. Específicos

- Descrever os aspectos histológicos do tumor que se desenvolver a partir do implante ortotópico;
- Investigar o imunofenótipo das células tumorais para GFAP, S-100, vimentina, CD56,  $\alpha$ -actina de músculo liso, desmina, AE1/AE3 e sinaptofisina em duas e quatro semanas após implante ortotópico;
- Descrever os aspectos morfológicos da vascularização tumoral através de análise imunoistoquímica em duas e quatro semanas após implante ortotópico;
- Descrever a distribuição espacial das células em proliferação no tumor através de imunorreação em duas e quatro semanas após implante ortotópico;
- Estudar a expressão de galectina-3 nos tumores que se desenvolverem em duas e quatro semanas após implante ortotópico.

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1. Cultura de células

Células da linhagem NG97ht foram cultivadas utilizando-se meio de crescimento RPMI 1640 suplementado com 13% de soro fetal bovino (GIBCO, Invitrogen) em placas de 24 poços com lamínulas redondas para reações de imunistoquímica *in vitro* e em garrafas de cultura de células (75 cm<sup>2</sup>) para os demais procedimentos. Todas as culturas foram incubadas em estufa a 37°C, atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub> até o momento de formação de camada confluenta. Após a formação da monocamada, as garrafas de cultura foram repicadas utilizando ATV Tripsina-Versene 0,05% (Instituto Adolf Lutz, São Paulo, Brasil).

### 3.2. Animais e grupos experimentais

Camundongos *nude* (background BALB/c) e BALB/c machos, com 8 semanas de idade, foram obtidos no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP - São Paulo. Os animais *Specific Pathogen Free* foram mantidos no Biotério de Experimentação III da Disciplina de Oncologia, com água e rações estéreis fornecidas *ad libitum*, sob temperatura constante de 20°C a 25°C e com ciclo de fotoperíodo de 12/12 horas. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da Unicamp (protocolo nº 1792-1).

Conforme apresentado na Tabela 1, os camundongos *nude* e BALB/c foram distribuídos segundo a quantidade de células NG97ht inoculadas no córtex cerebral (passagens 55 a 60) e tempos de análise após implante. No caso dos BALB/c, um grupo foi inoculado com uma quantidade maior de células (1 x 10<sup>6</sup>). Esta última concentração de células foi testada após se observar que nos BALB/c inoculados com 5 x 10<sup>5</sup> células não foi detectado crescimento tumoral

(vide item 4.1 na seção Resultados). Os grupos “Controle” de animais *nude* e BALB/c foram inoculados com 1  $\mu$ L de meio de crescimento (RPMI 1640) não enriquecido com soro fetal bovino.

**Tabela 1.** Grupos experimentais submetidos a implante ortotópico.

Tempo de análise após implante (semanas)	Grupos experimentais	Número de células inoculadas no córtex cerebral (1 $\mu$ L)
2	<i>Nude</i> [n=3 (E); n=5 (P)]	$5 \times 10^5$
	<i>Nude</i> Controle (n=4)	-
4	<i>Nude</i> [n=3 (E); n=4 (P)]	$5 \times 10^5$
	<i>Nude</i> Controle (n=4)	-
	BALB/c (n=6)	$5 \times 10^5$
	BALB/c (n=5)	$1 \times 10^6$
	BALB/c Controle (n=5)	-

Com relação aos grupos “*Nude*” analisados duas e quatro semanas após implante das células neoplásicas, três amostras (n=3) foram destinadas para extração protéica (E). Destes mesmos grupos foram obtidas ainda amostras do hemisfério cerebral contralateral à inoculação, as quais foram utilizadas como controle. Cinco amostras (n=5) do grupo “*Nude*” analisado duas semanas após o implante e quatro amostras (n=4) do grupo “*Nude*” analisado quatro semanas após o implante foram empregadas para o processamento histológico em parafina (P). Todas as amostras dos demais grupos (“*Nude* Controle”, “BALB/c” e “BALB/c Controle”) foram destinadas para processamento em parafina.

### 3.3. Cirurgia estereotáxica para implante ortotópico de células tumorais

As células NG97ht foram contadas utilizando-se câmara de Neubauer e ressuspendidas em 70  $\mu\text{L}$  de meio de crescimento RPMI 1640 estéril não enriquecido com soro fetal bovino, a fim de se obter  $5 \times 10^5$  ou  $1 \times 10^6$  células por microlitro. As células em suspensão eram mantidas em gelo e em sequência, iniciavam-se os procedimentos cirúrgicos para o implante ortotópico em cabine de fluxo laminar horizontal.

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Cloridrato de Cetamina 10% (Vetbrands®) e Cloridrato de Xilazina 2% (Vetbrands®), diluídas em salina e administradas i.p. nas doses de 0,05 mg/g e 0,005 mg/g de peso corporal, respectivamente. Após tricotomia do dorso da cabeça, o animal foi colocado em um aparelho estereotáxico para camundongos (Insight EFF 331, Brasil). Realizou-se a assepsia da área tricotomizada com uma solução tópica de iodopovidona a 10% e o escalpo do animal foi seccionado na linha média, expondo a calota craniana e removendo-se o perióstio.

Conforme as coordenadas estereotáxicas descritas por Franklin e Paxinos (1997), um orifício de 0,5 mm foi feito na calota craniana, utilizando-se uma broca. A inoculação foi realizada no córtex cerebral do lado direito e a coordenada ântero-posterior foi considerada em relação ao bregma (AP=2,0 mm; L=2,0 mm; V=2,0 mm) (Miura e cols., 2010). Utilizou-se uma seringa Hamilton de 10  $\mu\text{l}$  e a infusão foi realizada manualmente a uma velocidade aproximada de 0,5  $\mu\text{l}/\text{minuto}$  e, ao final, a agulha foi deixada no local por mais 2 minutos antes da sua lenta remoção, com o intuito de minimizar o refluxo do inóculo ao longo do trajeto da agulha. Finalmente, o orifício da calota foi recoberto com cera para osso e a incisão cutânea suturada com fio Vycril® 5-0. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições estéreis e os animais foram controlados quanto a sinais de dor, estresse e hipotermia durante esses procedimentos e no pós-operatório imediato até completa recuperação motora.

### **3.4. Processamento histológico**

Ao final do período correspondente após implante, os animais foram anestesiados com uma solução de Cloridrato de Cetamina 10% (Vetbrands®) e Cloridrato de Xilazina 2% (Vetbrands®), diluídas em salina e administradas i.p. nas doses de 0,05 mg/g e 0,005 mg/g de peso corporal, respectivamente. Fez-se a perfusão transcardíaca com 50 mL de cloreto de sódio 0,9%, seguida de 50 mL de solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4). A seguir, os animais tiveram o encéfalo removido e mergulhado em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,4), onde permaneceu por 16 horas até o processamento de inclusão em parafina (Paraplast®, Merck). Os espécimes foram lavados em tampão fosfato e desidratados em gradientes alcoólicos 70%, 80%, 90% e 100%. Seguiram-se dois banhos de xilol, xilol/parafina (v/v) e dois banhos em parafina, sendo as amostras posteriormente emblocadas para cortes em micrótomo.

Foram obtidos cortes coronais de 5 µm de espessura da região correspondente a 3,0 mm anterior e 1,0 mm posterior ao bregma (Franklin e Paxinos, 1997) empregando-se micrótomo Leica (RM2125RT). Os cortes foram recolhidos diretamente sobre lâminas positivadas (EasyPath®), coletando-se 10 cortes sequenciais, dispostos cada um em uma lâmina diferente e desprezando-se os 20 cortes subsequentes. Este procedimento foi realizado sucessivamente até serem obtidas quatro séries de cortes por lâmina.

As lâminas foram mantidas em estufa a 60°C por 2 horas. As lâminas contendo os 1°, 5° e 8° cortes de cada série foram coradas com hematoxilina de Harris e eosina para análise morfológica e as demais foram utilizadas na análise imunofenotípica (vide item 3.7).

### **3.5. Análise morfológica**

Os cortes histológicos do tumor corados com hematoxilina e eosina foram avaliados quanto à presença de atipias celulares, figuras de mitose, proliferação vascular e necrose, achados morfológicos microscópicos presentes em neoplasias gliais de alto grau (Louis e cols., 2007). Ainda, estimou-se o índice mitótico tumoral. Para isso, em dez campos de grande aumento (objetiva de 40x), escolhidos aleatoriamente em cada corte, foi contado o número de figuras de mitose típicas e atípicas. O índice mitótico foi representado como número de figuras de mitose/ 10 campos de grande aumento (CGA).

### **3.6. Coloração para detecção de fibras reticulínicas**

A visualização de fibras reticulínicas na matriz extracelular do tecido tumoral foi realizada através da impregnação pela prata. As secções foram desparafinizadas em banhos de xilol, hidratadas em gradientes decrescentes de álcool etílico, lavadas em água corrente e tratadas com permanganato de potássio 0,5% por cinco minutos. Em seguida, as secções foram tratadas com ácido oxálico 2% por cinco minutos e expostas ao sulfato de amônio férrico ou alúmen de ferro 2% por cinco minutos, lavando-se nos intervalos. Então, os cortes foram expostos ao nitrato de prata amoniacal por 30 segundos, tratados com formol 20% por três minutos, cloreto de ouro 0,2% por dez minutos e tiosulfato de sódio 2% por cinco minutos, lavando-se em água destilada nos intervalos. Por fim, as secções foram desidratadas e montadas com Entellan (Merck).

### **3.7. Análise imunoistoquímica**

Foram realizadas reações imunoistoquímicas para GFAP, S-100, vimentina, CD56, AE1/AE3,  $\alpha$ -actina de músculo liso/1A4, desmina, sinaptofisina, CD34, PCNA e galectina-3.

As secções foram desparafinizadas em três banhos de xilol, hidratadas em álcool etílico nas concentrações decrescentes de 100%, 90% e 70% e lavadas em água corrente. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 10 volumes durante 15 minutos, seguidos de lavagens em tampão fosfato salino (PBS; pH 7,4). A recuperação antigênica foi realizada em forno de microondas (900W). Aplicaram-se três ciclos de cinco minutos com intervalos de um minuto entre eles, com as lâminas imersas em tampão citrato de sódio (pH 6,0) ou Tris-EDTA (pH 9,0) específico a cada anticorpo. Ao atingir a temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas em PBS-BSA (albumina de soro bovino) 1% por 20 minutos em câmara úmida. Posteriormente, foi realizada incubação com anticorpo primário por 16 horas a 4°C.

Os anticorpos primários utilizados foram: anti-GFAP (1:70, Z0334, policlonal (coelho), DakoCytomation, Dinamarca), anti-S-100 (1:20, Z0311, policlonal (coelho), DakoCytomation, Dinamarca), anti-vimentina (1:500, M70201, monoclonal (camundongo), DakoCytomation, Dinamarca), anti-CD56 (1:150, M7304, monoclonal (camundongo), DakoCytomation, Dinamarca), anti- $\alpha$ -actina de músculo liso/1A4 (1:200, M0851 monoclonal (camundongo), DakoCytomation, Dinamarca), anti-desmina (1:50, M0760, monoclonal (camundongo), DakoCytomation, Dinamarca), anti-AE1AE3 (1:200, M3515, monoclonal (camundongo), DakoCytomation, Dinamarca), anti-sinaptofisina (1:100, M0776, monoclonal (camundongo), DakoCytomation, Dinamarca), anti-CD34 (1:20, ab8158, monoclonal (rato), Abcam, USA), anti-PCNA (1:20, M0879, monoclonal (camundongo), DakoCytomation, Dinamarca) ou anti-galectina-3 (1:10, IgG de rato anti-galectina-3 proveniente de hibridoma M3/38). Após lavagens consecutivas em PBS, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário correspondente: anti-coelho (1:100, ab7090, policlonal, Abcam, USA), anti-coelho (1:50, A9169, policlonal, Sigma-Aldrich, USA), anti-camundongo (1:50, ab6789, policlonal, Abcam, USA), anti-rato

(1:50, ab6517, policlonal, Abcam, USA) ou anti-rato (1:300, A5795, policlonal, Sigma-Aldrich, USA). Após período de incubação, as lâminas foram novamente lavadas em PBS e para a revelação da reação foram utilizados o substrato da peroxidase ( $H_2O_2$ ) e 3,3-diaminobenzidina (DAB). Após lavagem em água corrente e destilada, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris. Em seguida, realizou-se a desidratação com álcool etílico em concentrações crescentes de 70%, 90% e 100%, dois banhos de xilol e montagem das lâminas em resina Erv-mount (EasyPath®). Controles negativos incluíram a reação completa sem anticorpo primário.

### **3.8. Análise imunocitoquímica para GFAP *in vitro***

Foram realizadas reações imunocitoquímicas para GFAP em células NG97ht (passagem 60) cultivadas sobre lamínulas redondas. A fixação foi feita com álcool etílico 70% ou paraformaldeído 4% por 15 minutos. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com  $H_2O_2$  a 10 volumes por 15 minutos, seguidos de lavagens com PBS (pH 7,4), bloqueio com PBS-BSA 1%-Saponina 0,1% durante 15 minutos e novas lavagens com PBS. As lamínulas foram incubadas com anticorpo primário anti-GFAP (1:70, Z0334, policlonal (coelho), DakoCytomation, Dinamarca) ou PBS-BSA 1% (controle) por 16 horas a 4°C e, após lavagens com PBS, incubadas com anticorpo secundário anti-coelho (1:150, ab7090, policlonal, Abcam, USA). A revelação com DAB e contra-coloração com hematoxilina de Harris foram realizadas conforme descrito anteriormente, seguidas da secagem das lamínulas e montagem em resina Erv-mount (EasyPath®).

As observações das lâminas foram realizadas em microscópio óptico Leica (DMLB), acoplado ao sistema de captura Leica (DC300F).

### 3.9. Avaliação da produção de galectina-3 por Western Blotting

Duas ou quatro semanas após implante ortotópico, os grupos *Nude* foram anestesiados conforme descrito no item 3.4. O encéfalo foi rapidamente removido da caixa craniana, o tumor foi dissecado em uma placa de Petri imersa em gelo picado e uma amostra contralateral do encéfalo foi coletada para controle. Em seguida, as amostras foram pesadas e imediatamente congeladas a -80°C.

Após lavagem em PBS gelado, as proteínas das amostras foram extraídas através de um tampão detergente descrito por Califice e cols. (2004) (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8, 1% Triton X-100, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM de PMSF, 2 µg/mL de aprotinina), incubadas por 15 minutos a 4°C. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi classificado como de fração citoplasmática. O pellet foi ressuscitado em tampão de lise nuclear (20 mM Hepes, 630 mM NaCl, 0,2 mM de EDTA, 25% glicerol, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF e 2 µg/mL aprotinina) por 15 minutos a 4°C e centrifugado a 15000 g por 15 minutos, sendo este novo sobrenadante classificado como de fração nuclear. Após quantificação pelo Método de Lowry (1951), proteínas das frações citoplasmáticas foram incubadas em tampão não redutor (120 mM Tris pH 6,8, 4% SDS, 0,01% azul de bromofenol e 20% glicerol), aquecidas a 100°C em banho seco por cinco minutos e corridas em gel de eletroforese 12% de bis-0,8%-acrilamida-30%, em tampão de corrida pH 8,5 (250 mM de Tris base, 190 mM de glicina, 1% de SDS). Foram aplicados 20 µg de proteína de cada amostra. Posteriormente, elas foram transferidas para membranas de PVDF em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina e 20% metanol) a 100 volts por uma hora. Os anticorpos utilizados nas membranas resultantes foram: IgG de rato anti-galectina-3 proveniente de hibridoma M3/38 (1:10) e IgG de camundongo anti-β-actina (1:3000, ab8226, monoclonal, Abcam, USA) diluídos em PBS. Os anticorpos secundários utilizados foram: anti-rato (1:3000, A5795, policlonal,

Sigma-Aldrich, USA) e anti-camundongo (1:3000, ab6789, policlonal, Abcam, USA), ambos conjugados com peroxidase, sendo as membranas reveladas pelo kit *West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce) e fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

### **3.10. Avaliação da rejeição do implante ortotópico em camundongos BALB/c através da presença de anticorpos séricos**

O grupo de camundongos BALB/c inoculado com  $5 \times 10^5$  células NG97ht e analisado quatro semanas após implante teve o sangue coletado através do plexo orbital em três diferentes tempos: uma semana antes do implante, duas semanas após o implante e quatro semanas após o implante ortotópico.

As amostras de sangue foram centrifugadas e realizou-se a dosagem protéica (*BCA Protein Assay Kit*, Pierce) dos soros obtidos. A fim de se investigar possível reconhecimento de antígenos das células NG97ht por componentes do soro destes animais imunocompetentes, os soros foram utilizados como anticorpos primários em reação de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), realizada com células cultivadas em microplaca. Após padronização da reação, fez-se o plaqueamento de 3000 células (passagem 61) por poço em triplicata, em meio RPMI 1640 suplementado com 13% de soro fetal bovino (GIBCO, Invitrogen). No dia seguinte, retirou-se o meio de crescimento, fez-se lavagem com PBS-Tween 0,05% e incubação com água oxigenada 3% por cinco minutos. Após lavagem com PBS, fez-se bloqueio com PBS-BSA 1% por uma hora a 37°C e incubação com os soros (anticorpos primários) na diluição de 1:82 em PBS-BSA 1%, em média, corrigindo os valores conforme a dosagem protéica, durante duas horas a 37°C. O controle negativo recebeu apenas PBS-BSA 1% e o controle positivo, anticorpo primário anti-CD29 (1:50,  $\beta$ 1-integrina; sc-6622, policlonal (cabra), Santa Cruz, USA) diluído em PBS-BSA 1%. Em seguida, realizou-se incubação com respectivos anticorpos secundários:

anti-mouse (ab6789, policlonal, Abcam, USA) ou anti-cabra (A8919, policlonal, Sigma-Aldrich, USA) na diluição de 1:1500 por uma hora a 37°C. Após lavagem com PBS-Tween 0,05% e com PBS, as amostras foram incubadas, protegidas da luz, com solução de OPD (orto-fenilenodiamina; Sigma-Aldrich) 0,03%, peróxido de hidrogênio 0,03% em tampão citrato-fosfato 0,05 M por 20 minutos. A fim de se parar a reação, adicionou-se ácido sulfúrico 2 M e fez-se a leitura das absorbâncias em comprimento de onda de 490 nm.

### **3.11. Análises estatísticas**

A avaliação estatística da expressão de galectina-3 através de *Western Blotting* nos dois tempos após implante foi realizada através do teste de Mann-Whitney. Para análise da rejeição do implante ortotópico em camundongos BALB/c através de reação de ELISA, realizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney (SPSS® 18.0). Para se avaliar a diferença entre as médias, adotou-se um nível de significância de 5%.

## 4. Resultados

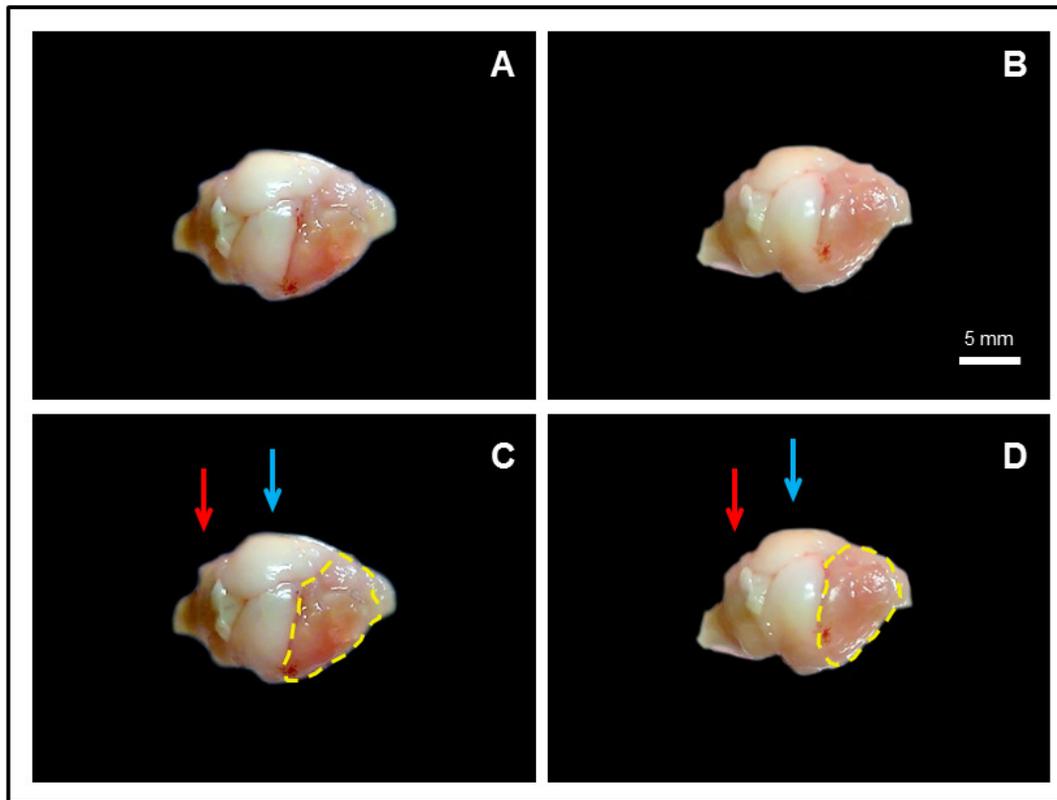
### 4.1. Análise macroscópica

Após o implante das células da linhagem NG97ht no córtex frontal dos camundongos *nude*, foi acompanhado o crescimento tumoral por duas ou quatro semanas após a inoculação. Após o período de duas semanas, não foi possível identificar macroscopicamente o crescimento tumoral. Por outro lado, as lesões que se desenvolveram quatro semanas após a inoculação ortotópica foram mais facilmente identificadas, uma vez que o tamanho dos tumores obtidos variou de 5,6 a 7,4 mm. Além disso, os aspectos morfológicos da neoplasia e do parênquima normal adjacente eram consideravelmente distintos. Frequentemente observava-se plano de clivagem entre o tecido circunjacente e massa tumoral, a qual apresentava, em geral, coloração mais escura e avermelhada (Figura 1).

Nos grupos de camundongos BALB/c submetidos à inoculação de células NG97ht não se identificou macroscopicamente lesão tumoral.

### 4.2. Análise microscópica

Nos grupos *Nude*, a análise dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina, além de permitir a avaliação microscópica dos espécimes, possibilitou a aferição aproximada do comprimento do maior eixo dos tumores que se desenvolveram duas semanas após a injeção das células tumorais. Assim, verificou-se que as lesões obtidas neste período após implante mediam de 1,1 a 2,6 mm.

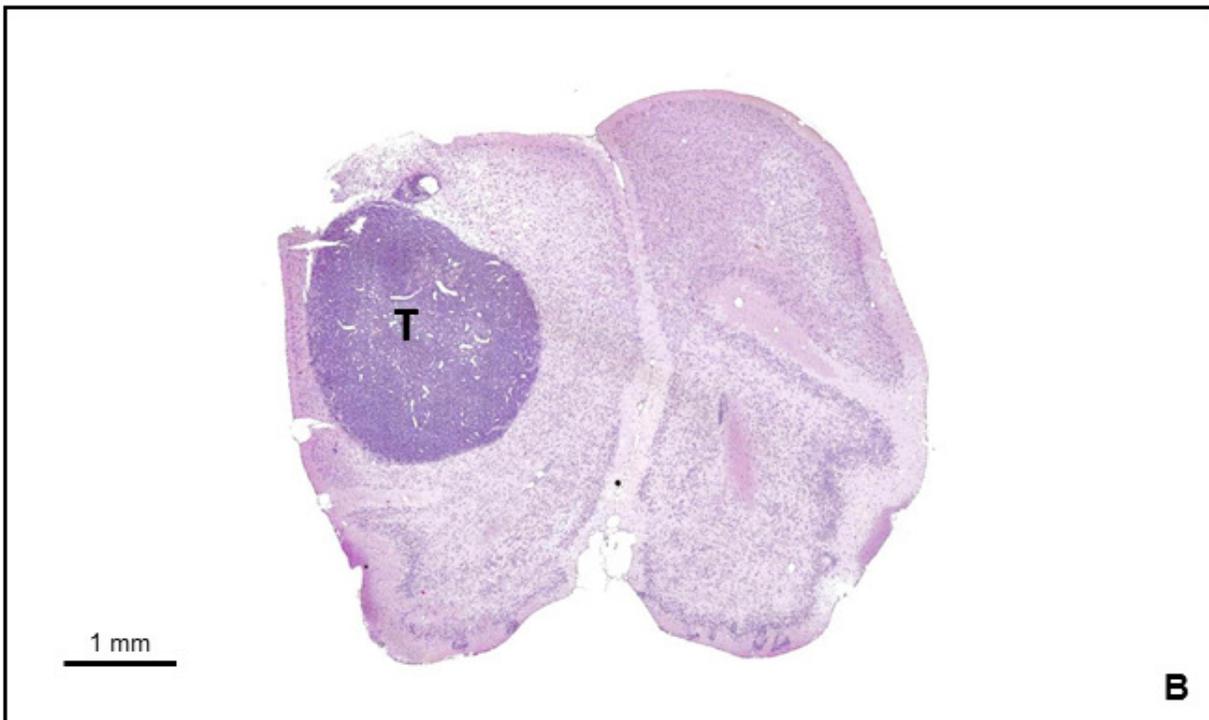
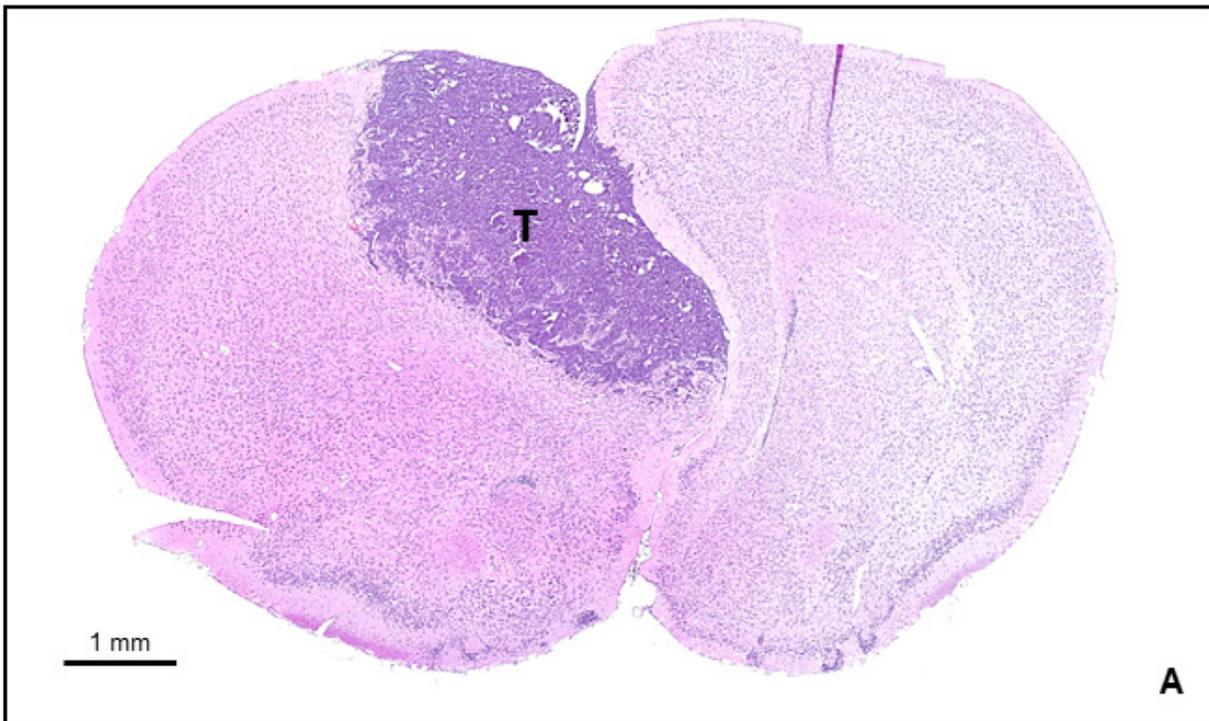


**Figura 1.** Imagens macroscópicas do encéfalo de camundongo *nude* quatro semanas após inoculação de células NG97ht no córtex frontal. A e C, B e D mostram uma visão superior e lateral do encéfalo, respectivamente. As setas azuis indicam os hemisférios cerebrais e as setas vermelhas, o cerebelo. Em tracejado, a região ocupada pela massa tumoral. Ressalta-se o efeito de massa, ou seja, o deslocamento dos hemisférios cerebrais devido ao crescimento da neoplasia. Barra (A – D) = 5 mm.

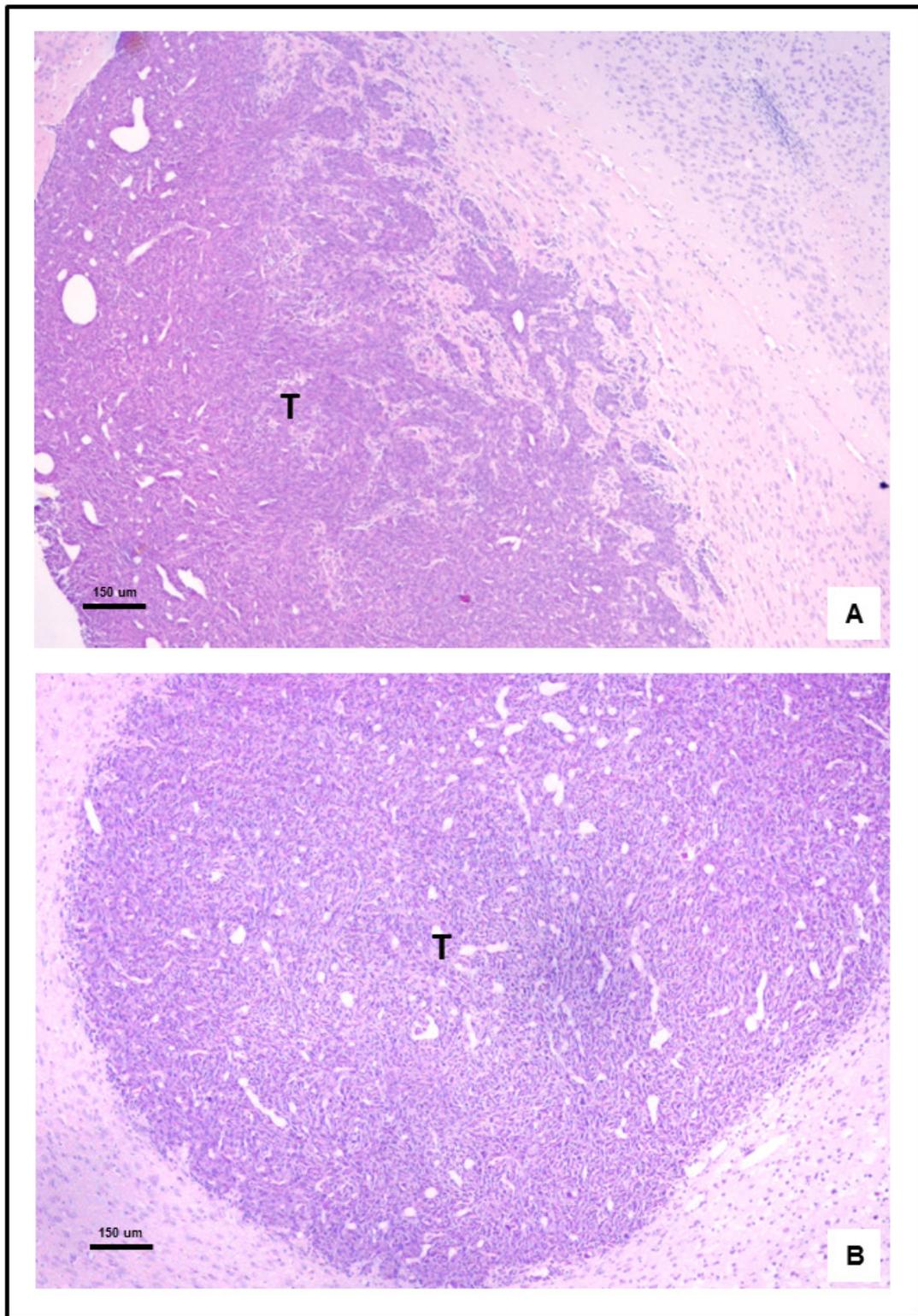
Com relação à análise histológica, as características morfológicas observadas foram semelhantes nos dois tempos analisados, sendo que o tumor apresentou-se compacto, bem delimitado e não-encapsulado (Figura 2). A interface entre a neoplasia e o tecido cerebral normal adjacente era linear ou apresentava áreas com blocos sólidos de células neoplásicas com contornos espiculados (Figura 3). Foram notadas também algumas células malignas isoladas distribuídas no parênquima normal, predominando nas proximidades dos blocos neoplásicos. Especificamente, a lesão mostrou características de uma neoplasia maligna sólida, com aspecto predominantemente fusocelular. Os tumores apresentaram alta densidade celular, com núcleos variando de fusiformes a arredondados e

cromatina homogeneamente distribuída, por vezes determinando hipercromasia nuclear (Figura 4). Quando evidente, o nucléolo era pequeno. Puderam ser observadas ainda frequentes figuras de mitose, sendo muitas delas atípicas (Figura 5). Os índices mitóticos médios do grupo analisado duas e quatro semanas após o implante foi de 20,3 e 14,3 figuras de mitose/10 campos de grande aumento (CGA), respectivamente. Em geral, os tumores exibiam muitos vasos capilares de paredes finas irregularmente distribuídos. No entanto, não foi observada proliferação vascular com ou sem arranjo pseudoglomerular. Áreas de necrose foram detectadas em apenas uma das lesões analisadas quatro semanas pós-inoculação, por vezes esboçando arranjo em pseudopaliçada (Figura 6). Não foi identificada necrose tumoral duas semanas após a injeção das células NG97ht. Por fim, foram observados no tecido cerebral adjacente à lesão, frequentes astrócitos gemistocíticos reacionais ao crescimento neoplásico.

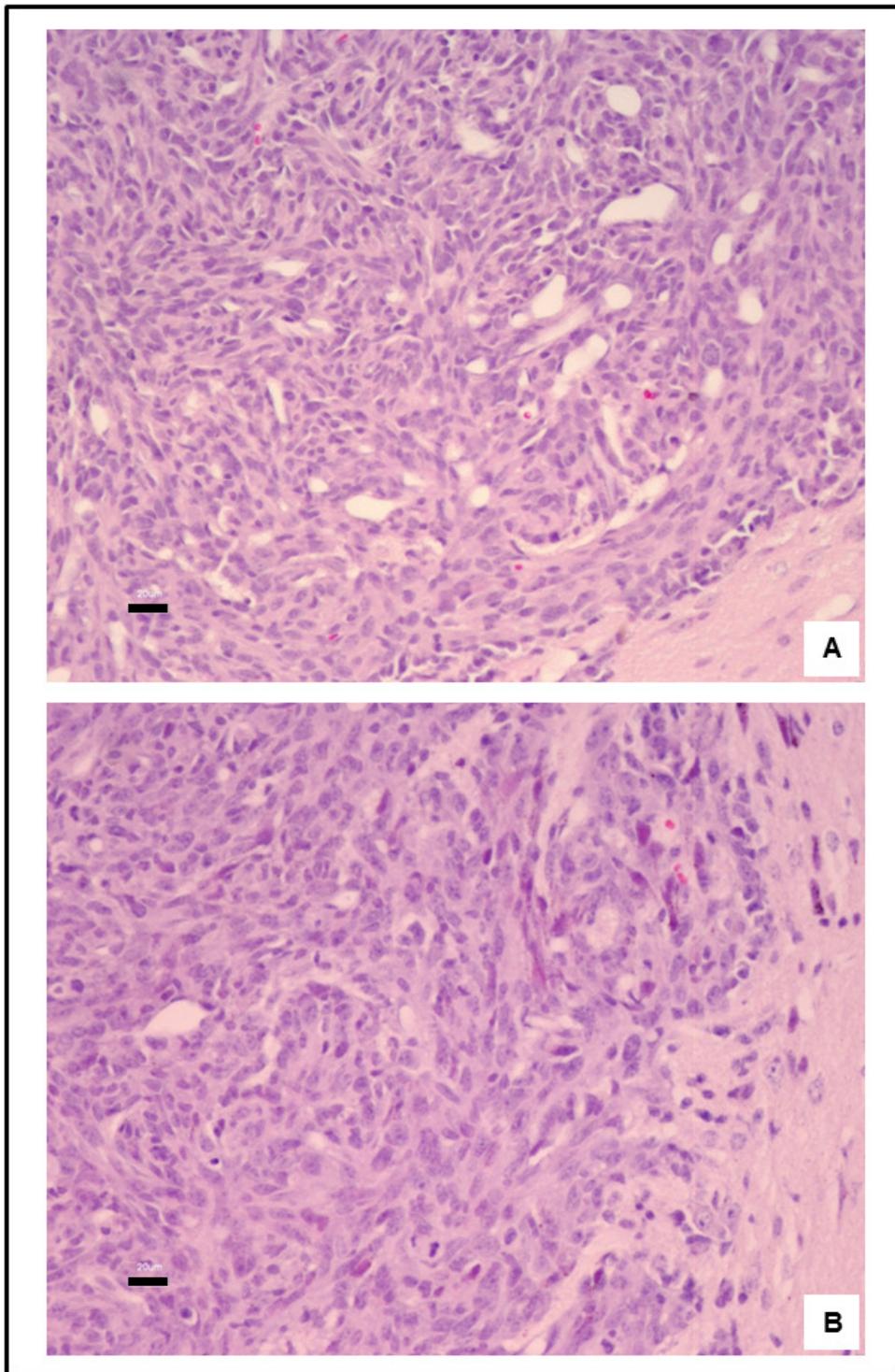
Os cortes histológicos do cérebro dos camundongos *nude* controle e dos camundongos BALB/c submetidos ao implante de células tumorais não revelaram crescimento tumoral (Figura 7).



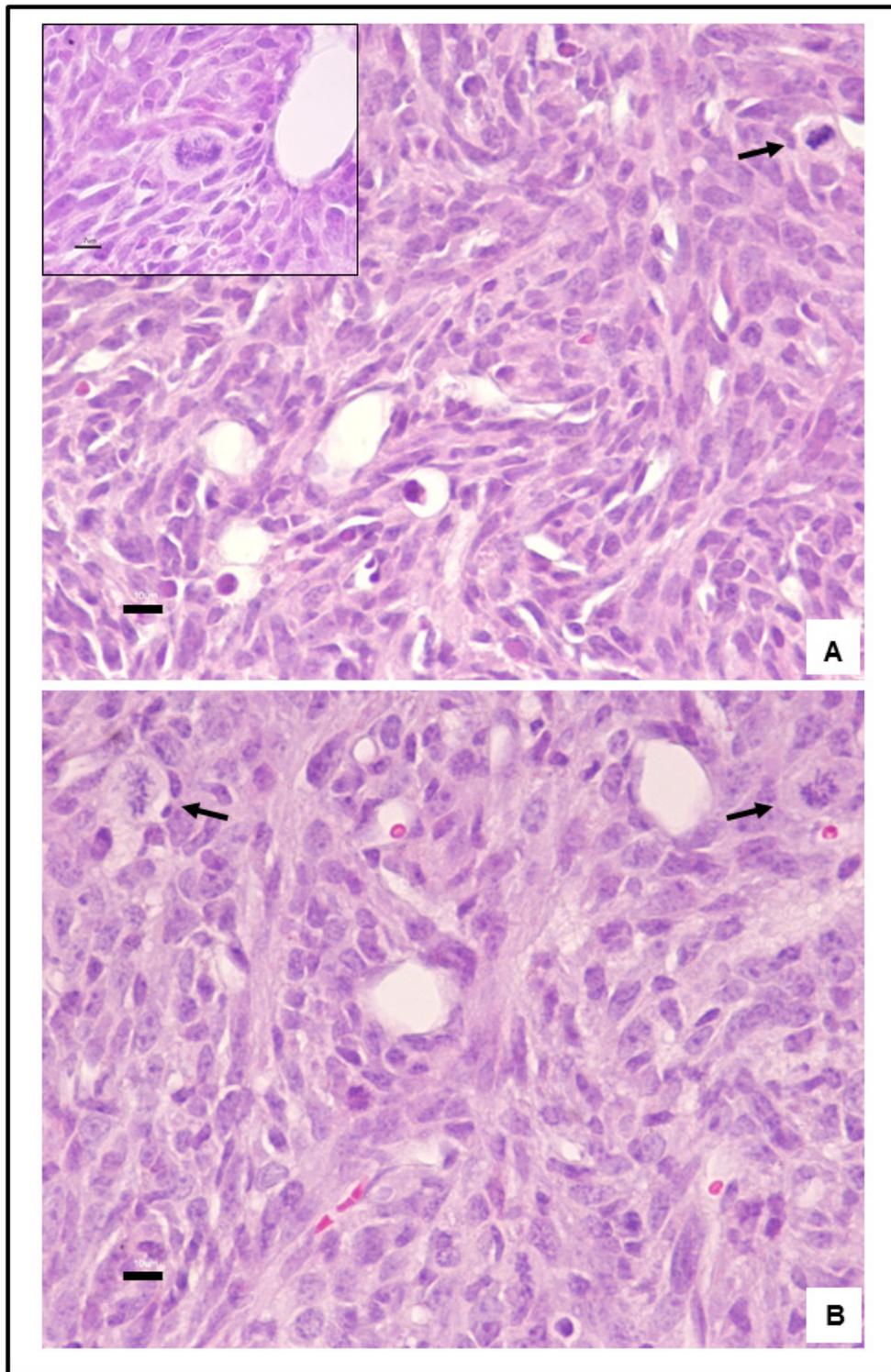
**Figura 2.** Cortes transversais do cérebro com neoplasia maligna derivada de implante ortotópico analisados duas (A) ou quatro (B) semanas após inoculação em camundongos *nude*. Notar arranjo sólido e compacto do tumor (T). É apresentada em B apenas uma parte da lesão, na porção intra-axial. Hematoxilina e eosina. Barra (A, B) = 1 mm.



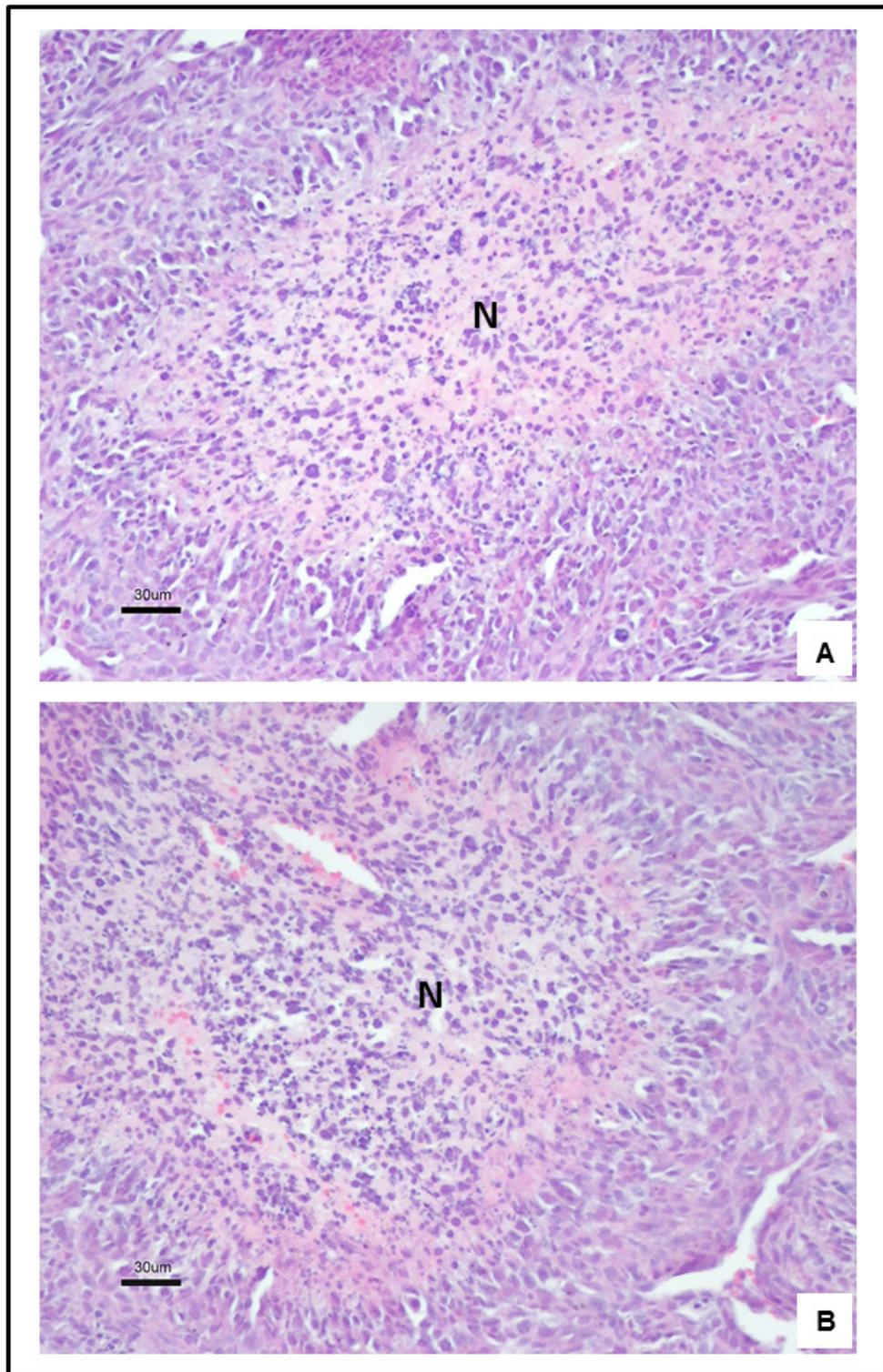
**Figura 3.** Cortes transversais do cérebro com neoplasia maligna derivada de implante ortotópico analisados duas (A) ou quatro (B) semanas após inoculação em camundongos *nude*. Notar arranjo bem delimitado do tumor (T), bem como os limites com o tecido normal adjacente, por vezes espiculados (A) ou regulares (B). Hematoxilina e eosina. Aumento de 40x. Barra (A, B) = 150 µm.



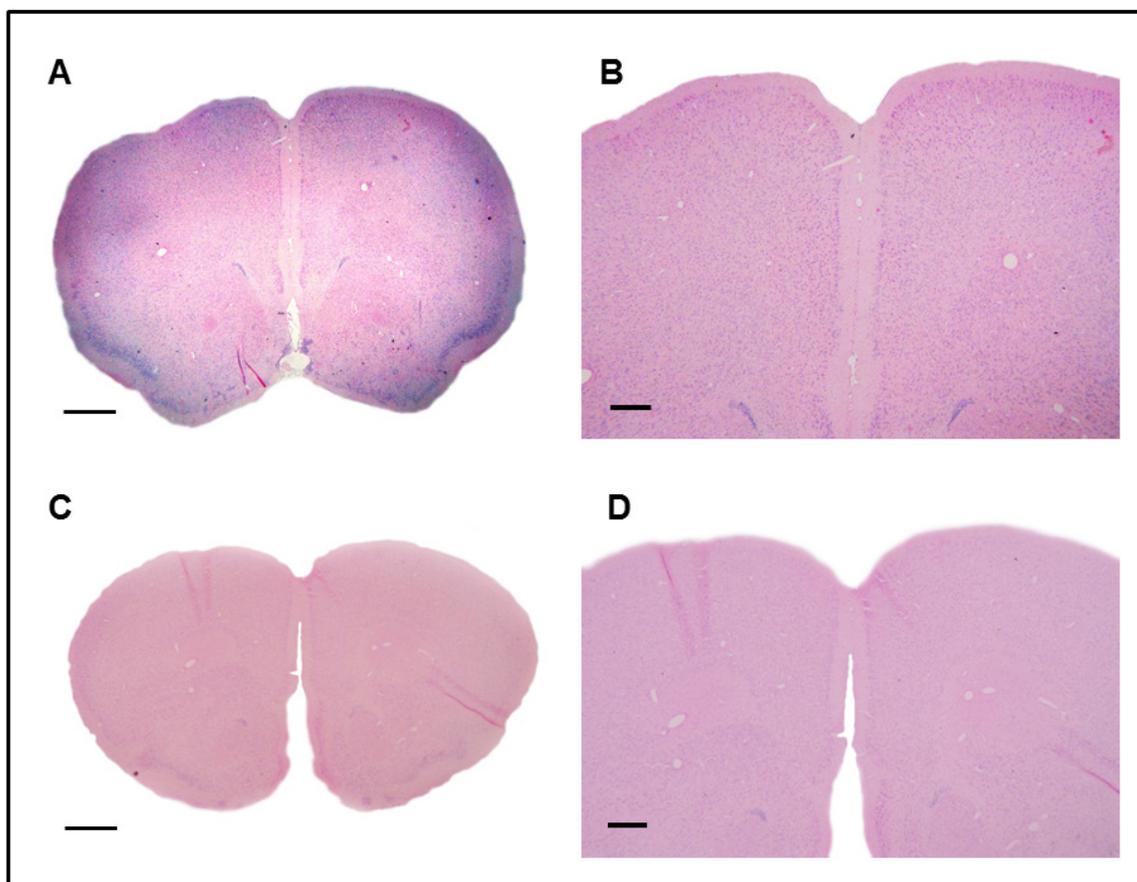
**Figura 4.** Cortes transversais do cérebro com neoplasia maligna derivada de implante ortotópico analisados duas (A) ou quatro (B) semanas após inoculação em camundongos *nude*. Notar alta densidade celular e presença de vasos capilares irregularmente distribuídos. Hematoxilina e eosina. Aumento de 200x. Barra (A, B) = 20 µm.



**Figura 5.** Cortes transversais do cérebro com neoplasia maligna derivada de implante ortotópico analisados duas (A) ou quatro (B) semanas após inoculação em camundongos *nude*. Observar a presença de núcleos fusiformes a arredondados e frequentes figuras de mitose (setas). Aumento de 400x. Barra (A, B) = 10  $\mu$ m. O detalhe em A mostra uma figura mitótica atípica (aumento de 1000x; barra = 7  $\mu$ m). Hematoxilina e eosina.



**Figura 6.** Cortes transversais do cérebro com neoplasia maligna derivada de implante ortotópico analisados duas (A) ou quatro (B) semanas após inoculação em camundongos *nude*. Notar áreas necróticas (N) com arranjo em pseudopaliçada no interior da lesão. Hematoxilina e eosina. Aumento de 200x. Barra (A, B) = 30  $\mu$ m.



**Figura 7.** Cortes transversais do cérebro de camundongo *nude* controle (A, B) e de camundongo BALB/c submetido à inoculação de células tumorais (C, D), quatro semanas após realização de cirurgia estereotáxica. A análise dos cortes histológicos não demonstrou crescimento tumoral. Hematoxilina e eosina. Aumento de 12,5x (A, C) e 40x (B, D). Barra (A, C) = 1 cm; (B, D) = 150 μm.

### 4.3. Distribuição da rede de fibras reticulínicas

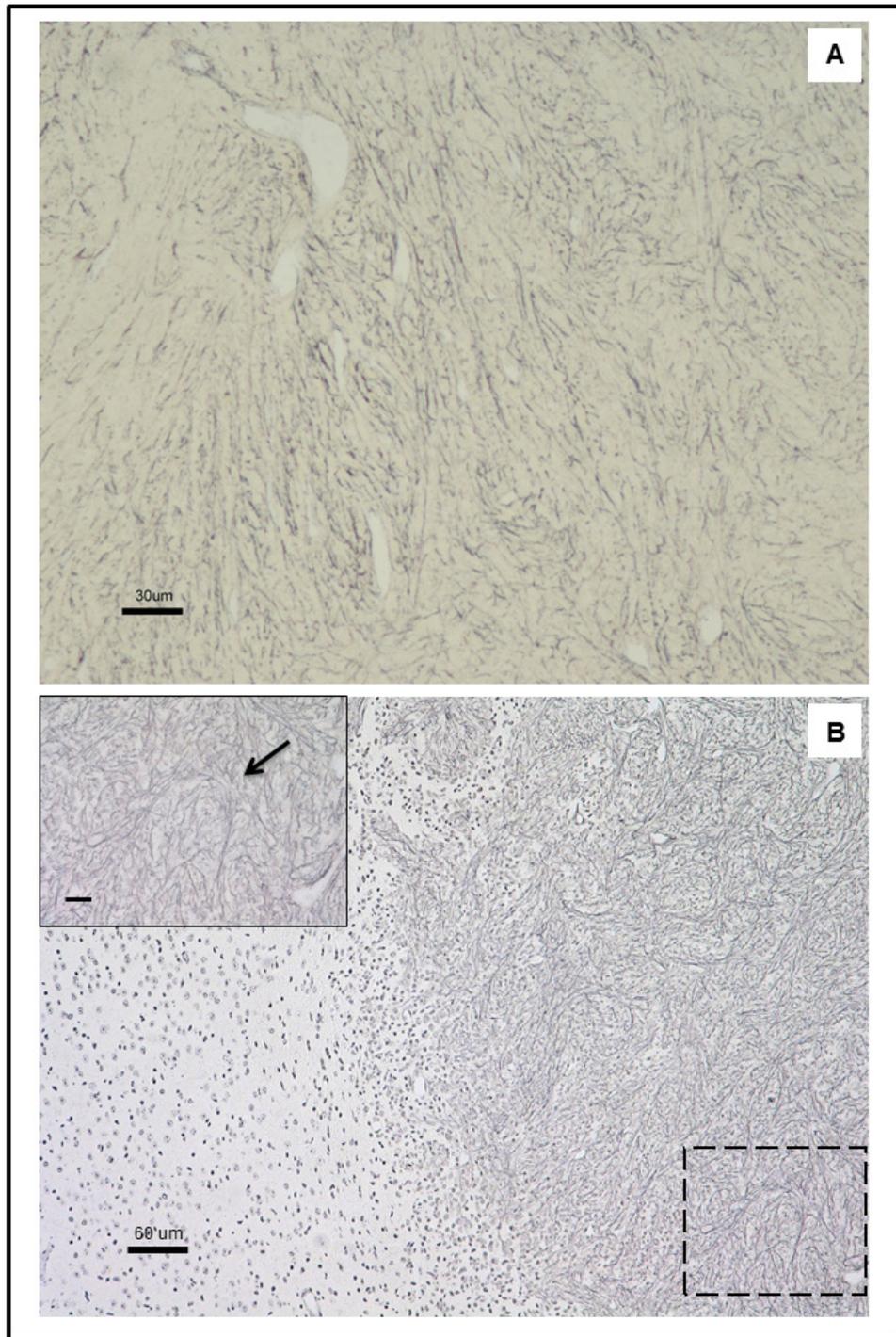
Duas e quatro semanas após implante, os espécimes tumorais apresentaram rica e fina rede de fibras reticulínicas intercelulares homogeneamente distribuídas por toda massa tumoral. Em alguns, foi possível observar a organização das fibras reticulínicas de maneira retilínea ou esboçando arcabouços que envolviam parcialmente grupamentos celulares. Por sua vez, no tecido cerebral normal, foram detectadas fibras reticulínicas apenas ao redor de vasos (Figura 8).

#### 4.4. Análise imunoistoquímica

Reações imunoistoquímicas para GFAP (proteína do filamento intermediário encontrada em astrócitos) foram realizadas nos cortes transversais dos tumores derivados de implante ortotópico em camundongos *nude*. Tais reações revelaram citoplasma escasso e marcado em células tumorais isoladas ou formando pequenos agrupamentos, demonstrando a presença de componente celular glial. Quanto à distribuição e quantidade de células GFAP-positivas, os espécimes exibiram certa variabilidade, isto é, foram detectadas células imunorreativas desde a interface do tumor com o tecido normal adjacente até a região central da lesão (Figuras 9 e 10). Foram observados também, no tecido cerebral não tumoral e próximo à neoplasia, astrócitos reacionais gemistocíticos, os quais comumente apresentavam citoplasma amplo e volumoso, com densos prolongamentos (Figura 11B) em comparação com as células tumorais que expressaram GFAP (Figura 11A).

A localização da proteína S-100, normalmente expressa por neurônios e células gliais foi citoplasmática e/ou nuclear e detectada em escassas células tumorais. A intensidade da marcação foi de leve a moderada (Figura 12).

Por sua vez, a vimentina, proteína de filamentos intermediários, foi identificada em muitas células neoplásicas. O padrão de marcação foi predominantemente citoplasmático, moderado a intenso, e homogêneo (Figura 13).



**Figura 8.** Cortes transversais do cérebro com neoplasia maligna derivada de implante ortotópico analisados duas (A) ou quatro (B) semanas após inoculação em camundongos *nude*. Cortes submetidos à impregnação pela prata para detecção de fibras reticulínicas. Padrão de marcação homogêneo, mostrando rica rede de fibras na matriz extracelular. Por vezes, as fibras organizam-se de maneira retilínea (A) ou esboçam arranjo nodular (B; seta). Aumento de 200x (A) e 100x (B). Barras = 30 µm (A), 60 µm (B). O detalhe é uma ampliação da área tracejada (aumento de 400x; barra = 20 µm).

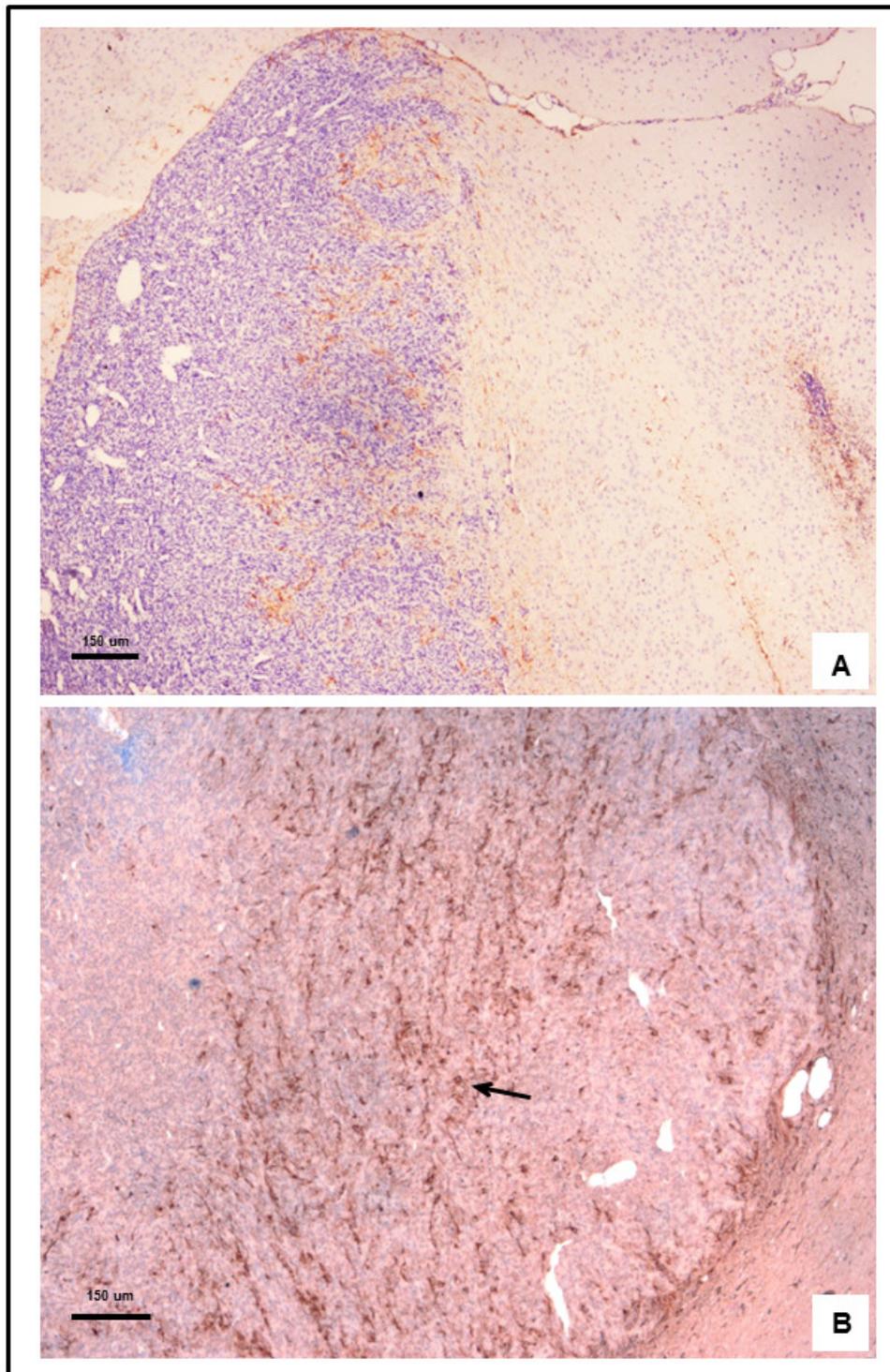
Os antígenos CD56/NCAM (proteína de adesão presente em células de origem neuroectodérmica) e 1A4 ( $\alpha$ -actina de músculo liso) apresentaram padrões de imunomarcacão semelhantes, com positividade citoplasmática de intensidade variando de leve a forte. Além disso, a distribuicão das células marcadas era heterogênea, predominando na área central da neoplasia (Figuras 14 e 15).

A marcaçãõ imunistoquímica para CD34 foi realizada para se observar a arquitetura vascular da lesãõ, visto que este antígeno é expresso por células endoteliais. Tal marcaçãõ evidenciou muitos vasos capilares irregularmente distribuídos, com paredes finas e poucas ramificações, alguns com a luz mais dilatada (Figura 16). Assim como nos cortes transversais corados com hematoxilina e eosina (Figuras 3 e 4), não foi observada proliferaçãõ vascular com ou sem arranjo pseudoglomerular.

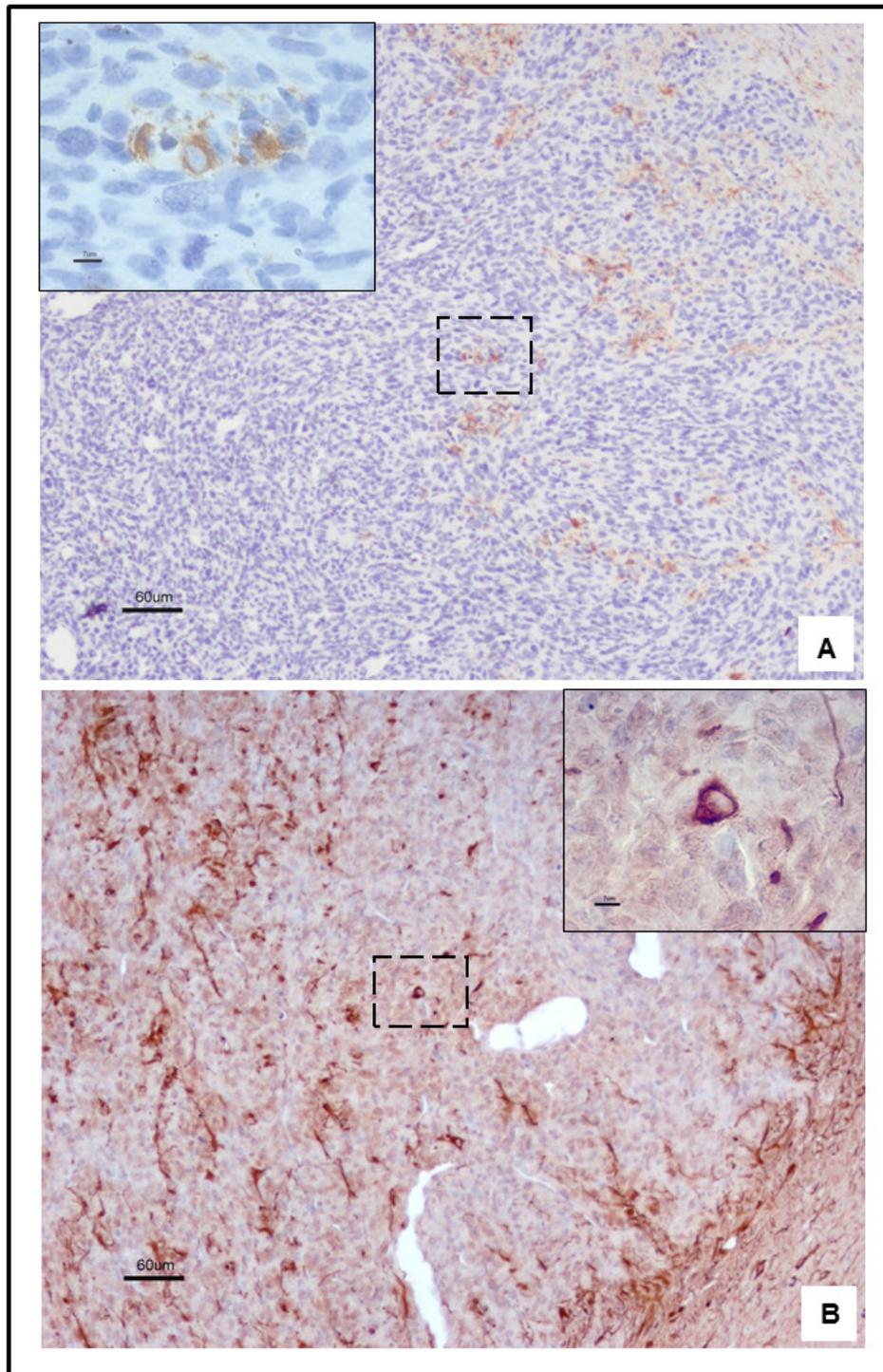
A proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferaçãõ celular), expressa em células tumorais com atividade proliferativa, apresentou forte marcaçãõ nuclear, geralmente mais intensa nas células localizadas na transiçãõ da lesãõ com o parênquima não tumoral (Figura 17).

A galectina-3, lectina ligante de  $\beta$ -galactosídeos relacionada com malignidade e metastatizaçãõ (Bresalier e cols., 1997), apresentou padrão de imunomarcacão nuclear e/ou citoplasmático, predominantemente intenso, com distribuicão irregular por toda a massa tumoral (Figura 18). Alguns tumores mostraram marcaçãõ nuclear e citoplasmática mais frequente e intensa nas regiões limítrofes com o tecido normal vizinho em células neoplásicas organizadas em blocos ou isoladas.

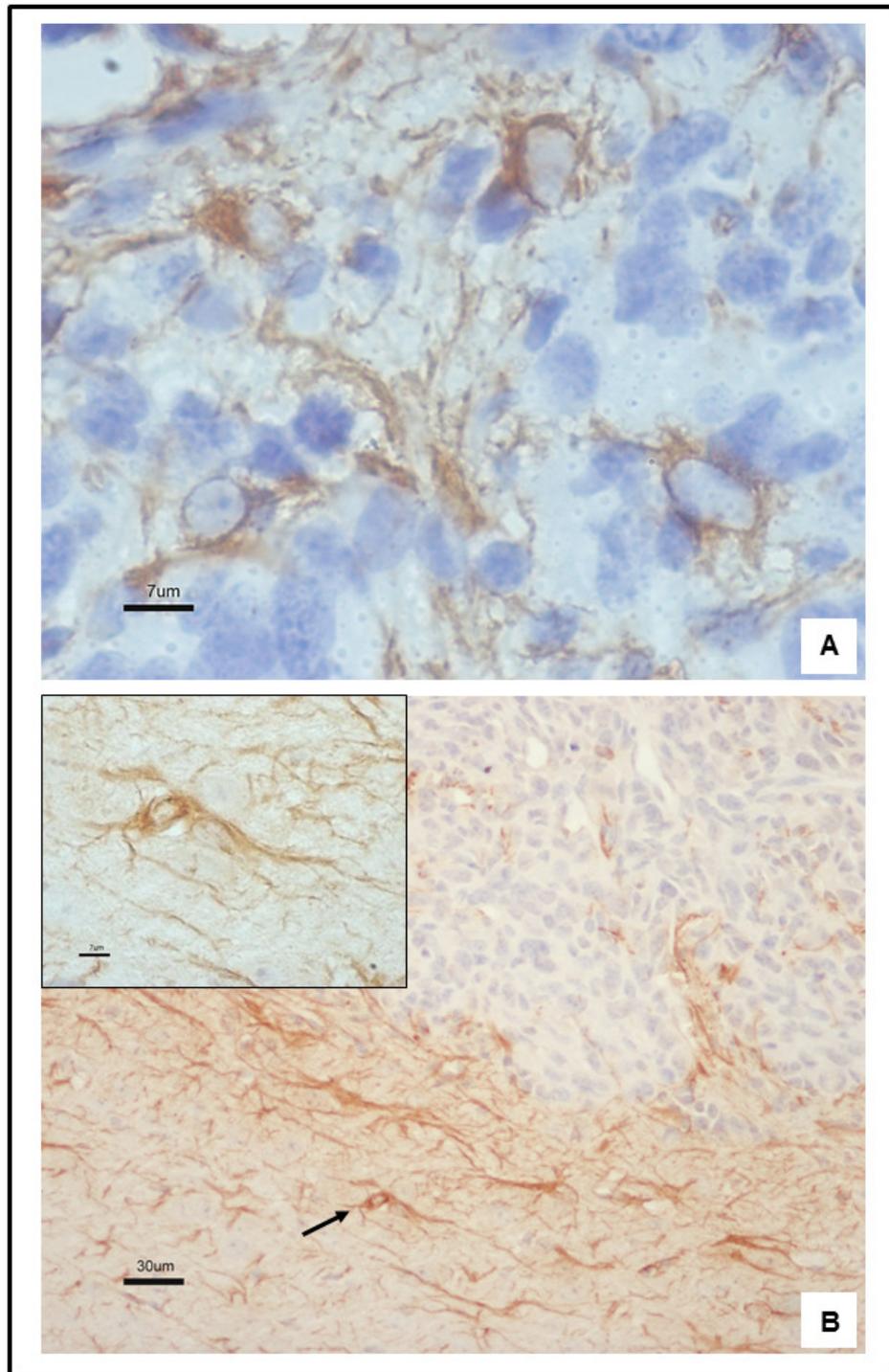
Por fim, foram realizadas reações imunistoquímicas para AE1/AE3 (*pool* de citoqueratinas); desmina (proteína de filamento intermediário de músculo esquelético) e sinaptofisina (glicoproteína de vesícula sináptica), as quais foram negativas. Para todos os antígenos analisados, não foi observada diferençã entre as lesões obtidas duas ou quatro semanas após a inoculaçãõ das células NG97ht, com relaçãõ aos padrões morfológicos de imunorreatividade descritos acima.



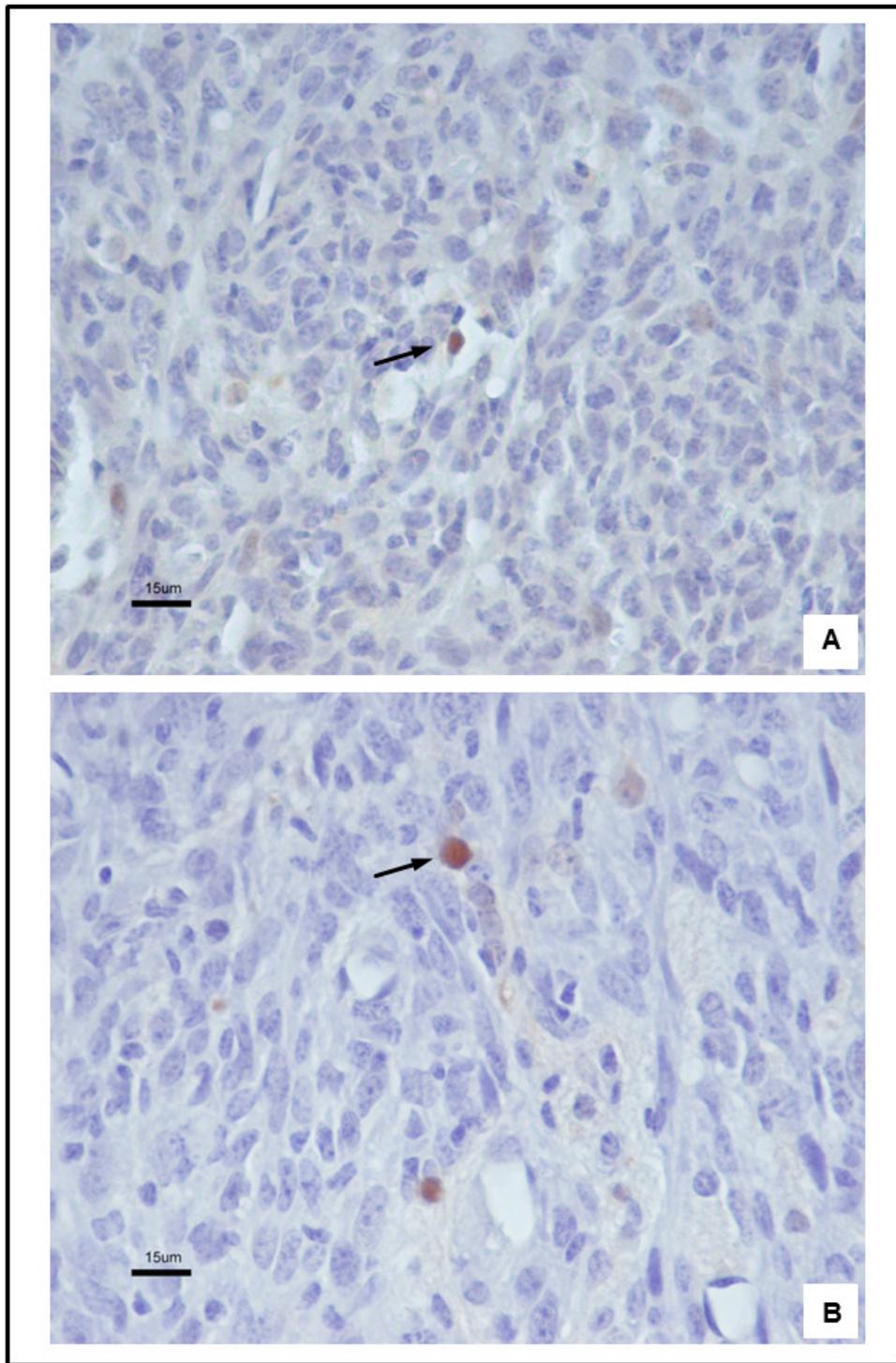
**Figura 9.** Imunoistoquímica para GFAP em cérebro com tumor derivado de implante ortotópico analisado duas (A) ou quatro (B) semanas após inoculação em camundongos *nude*. Em A, o tumor apresenta células positivas isoladas ou em pequenos aglomerados, com padrão de marcação citoplasmático. Em B, nota-se presença de maior número de células positivas (seta) em comparação com a lesão mostrada em A, ilustrando a variabilidade da distribuição das células GFAP-positivas que compõem a neoplasia. Contra-coloração com hematoxilina de Harris. Aumento de 40x. Barra (A, B) = 150 µm.



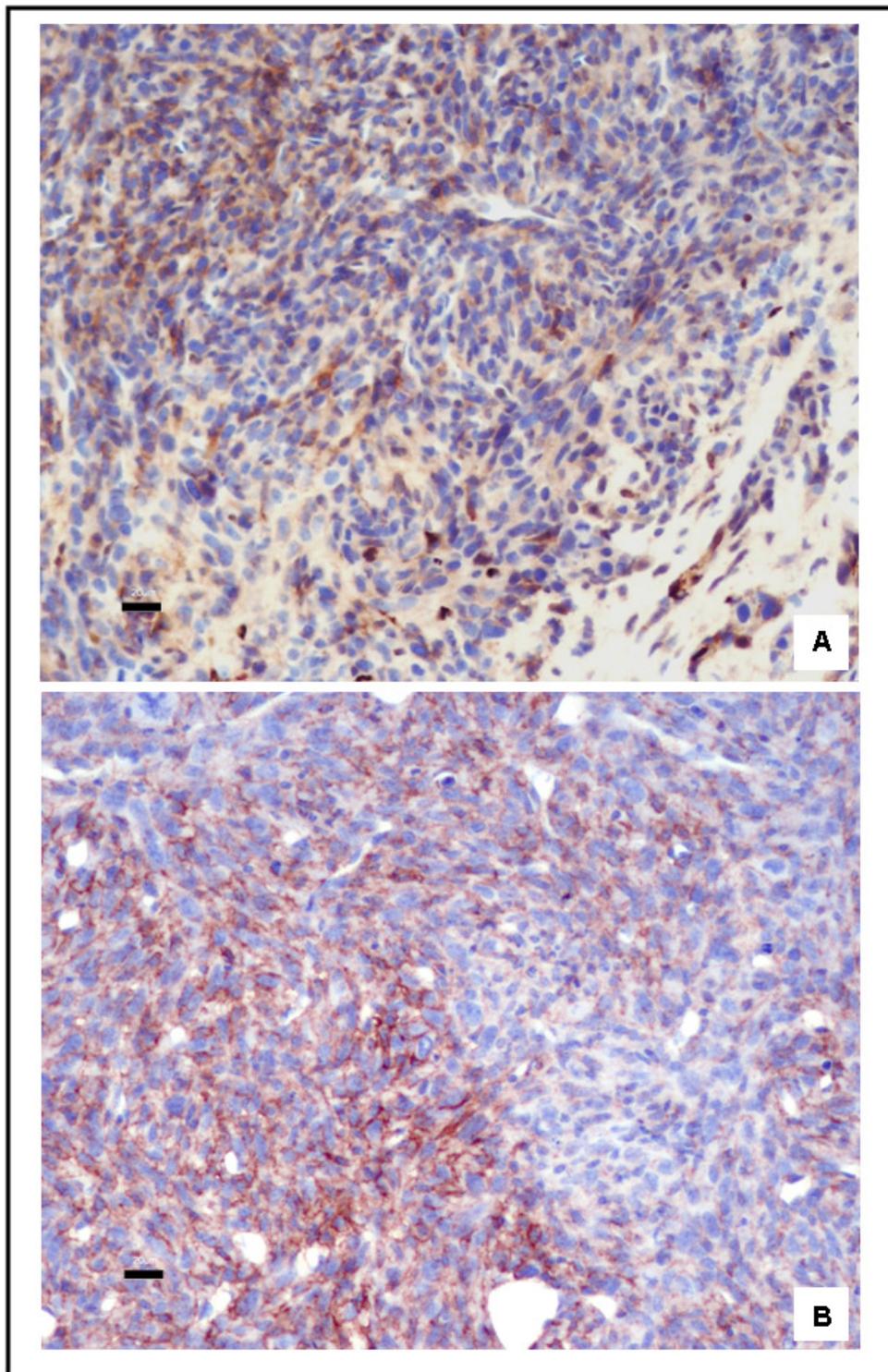
**Figura 10.** Imunomarcção para GFAP em cérebro com tumor derivado de implante ortotópico analisado duas (A) ou quatro (B) semanas após inoculação em camundongos *nude*. Aumento de 100x. Barra (A, B) = 60 µm. Os detalhes são ampliações de células GFAP-positivas nas áreas tracejadas (aumento de 1000x; barra = 7 µm). Contra-coloração com hematoxilina de Harris.



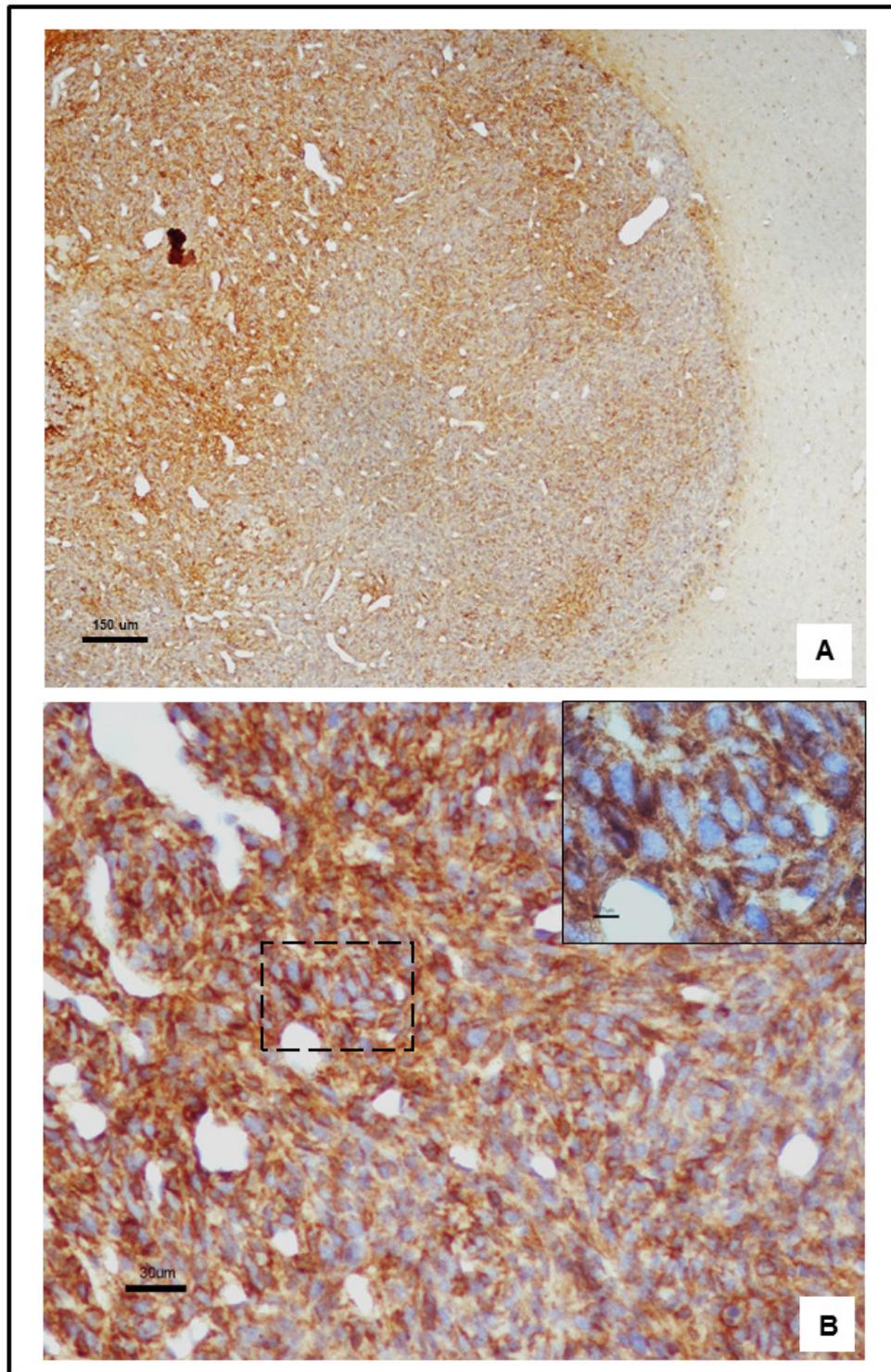
**Figura 11.** Imunomarcção para GFAP em cérebro com tumor derivado de implante ortotópico analisado duas semanas após inoculação em camundongos *nude*. Células neoplásicas GFAP-positivas no interior da lesão (A) e astrócitos hipertróficos reacionais no tecido normal adjacente (B). Aumento de 1000x (A) e 200x (B). Barras = 7  $\mu\text{m}$  (A), 30  $\mu\text{m}$  (B). O detalhe é uma ampliação do astrócito reacional identificado por uma seta (aumento de 1000x; barra = 7  $\mu\text{m}$ ). Contra-coloração com hematoxilina de Harris.



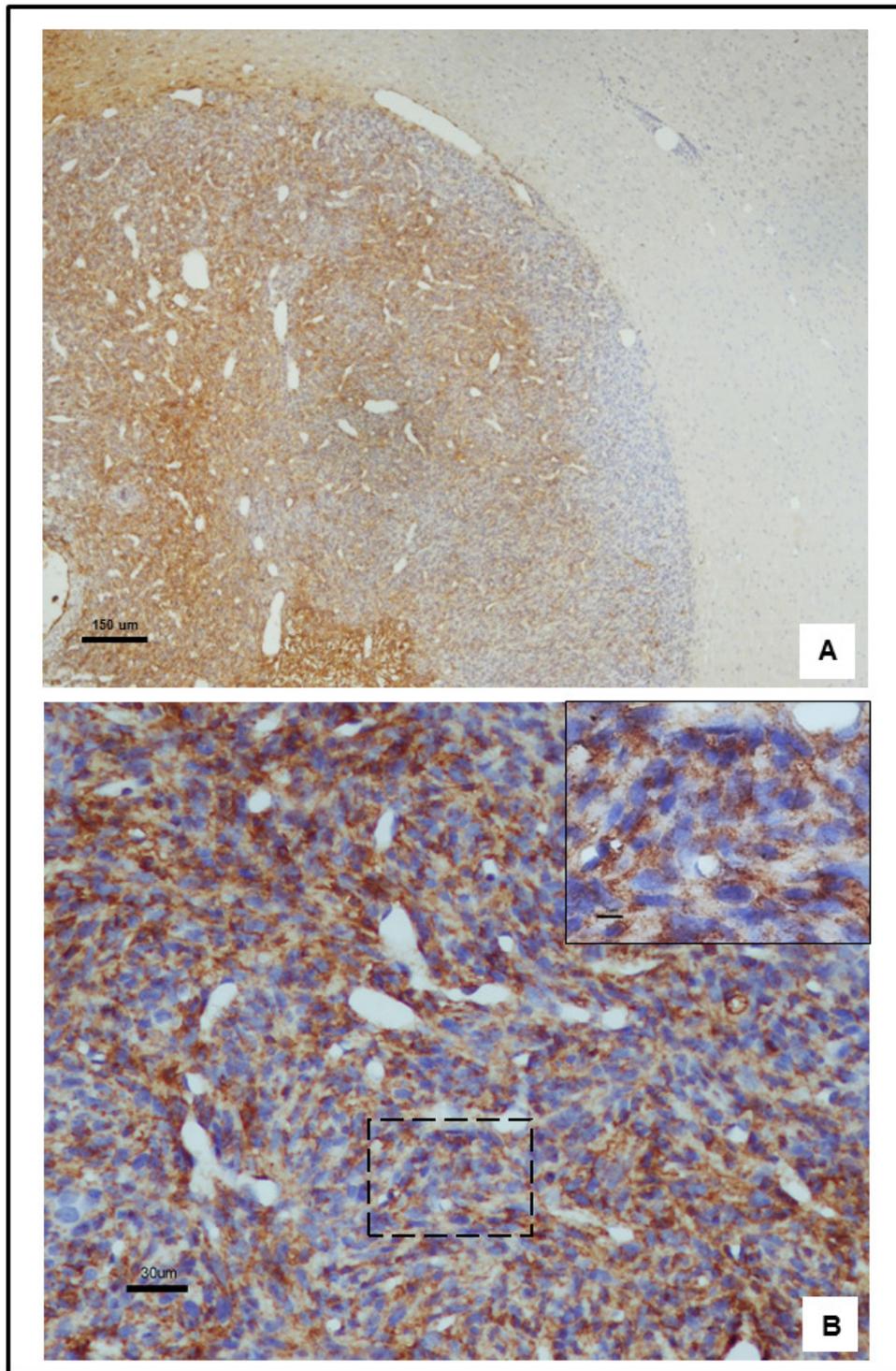
**Figura 12.** Imunopositividade para S-100 em cérebro com tumor derivado de implante ortotópico analisado duas (A) ou quatro (B) semanas após inoculação em camundongos *nude*. Marcação nuclear de intensidade leve a moderada observada em raras células isoladas no interior da lesão (setas). Contra-coloração com hematoxilina de Harris. Aumento de 400x. Barra (A, B) = 15  $\mu$ m.



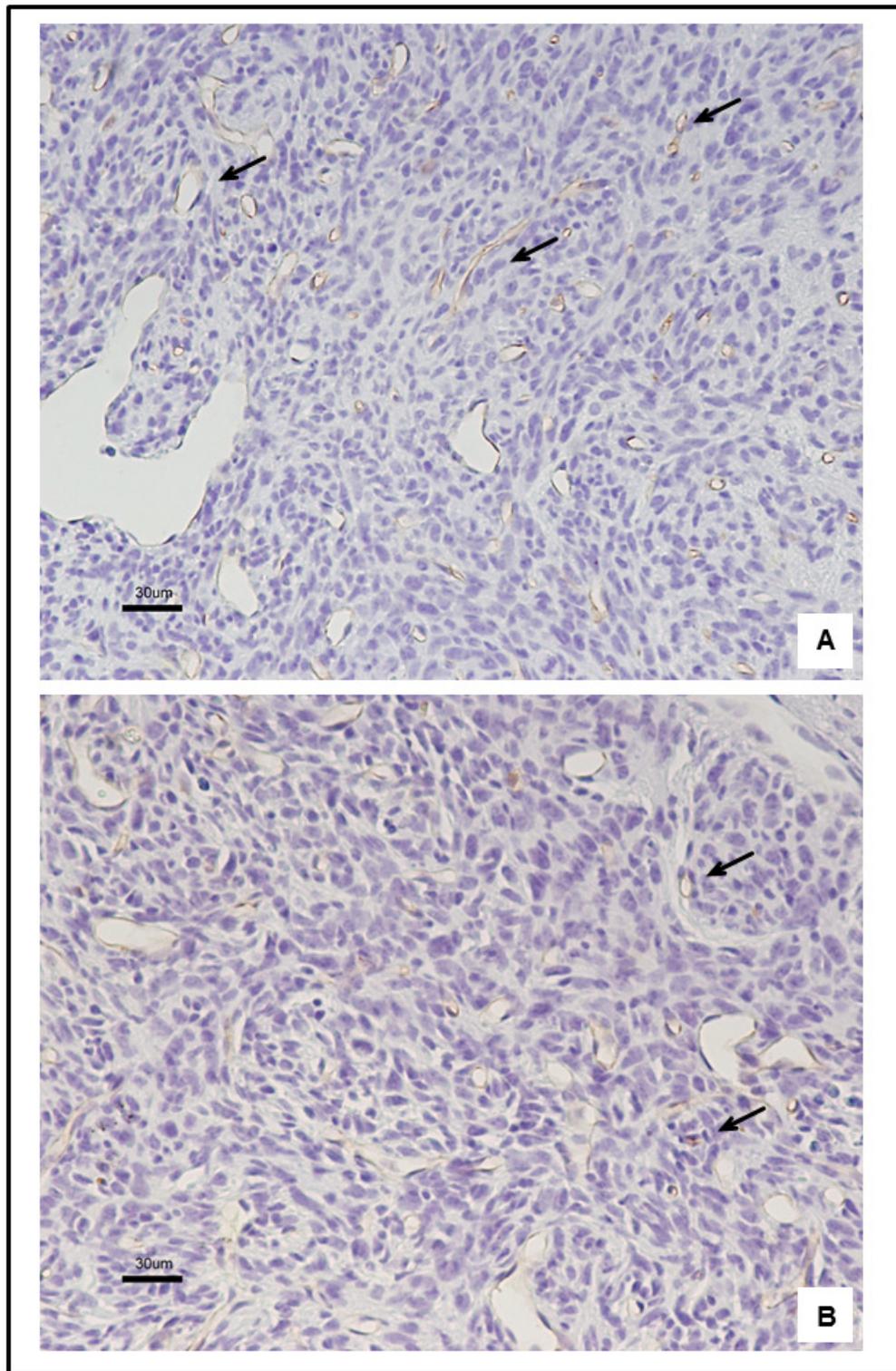
**Figura 13.** Imunoistoquímica para vimentina em cérebro com tumor derivado de implante ortotópico analisado duas (A) ou quatro (B) semanas após inoculação em camundongos *nude*. O padrão de marcação é predominantemente homogêneo em toda a massa tumoral. Contra-coloração com hematoxilina de Harris. Aumento de 200x. Barra (A, B) = 20  $\mu$ m.



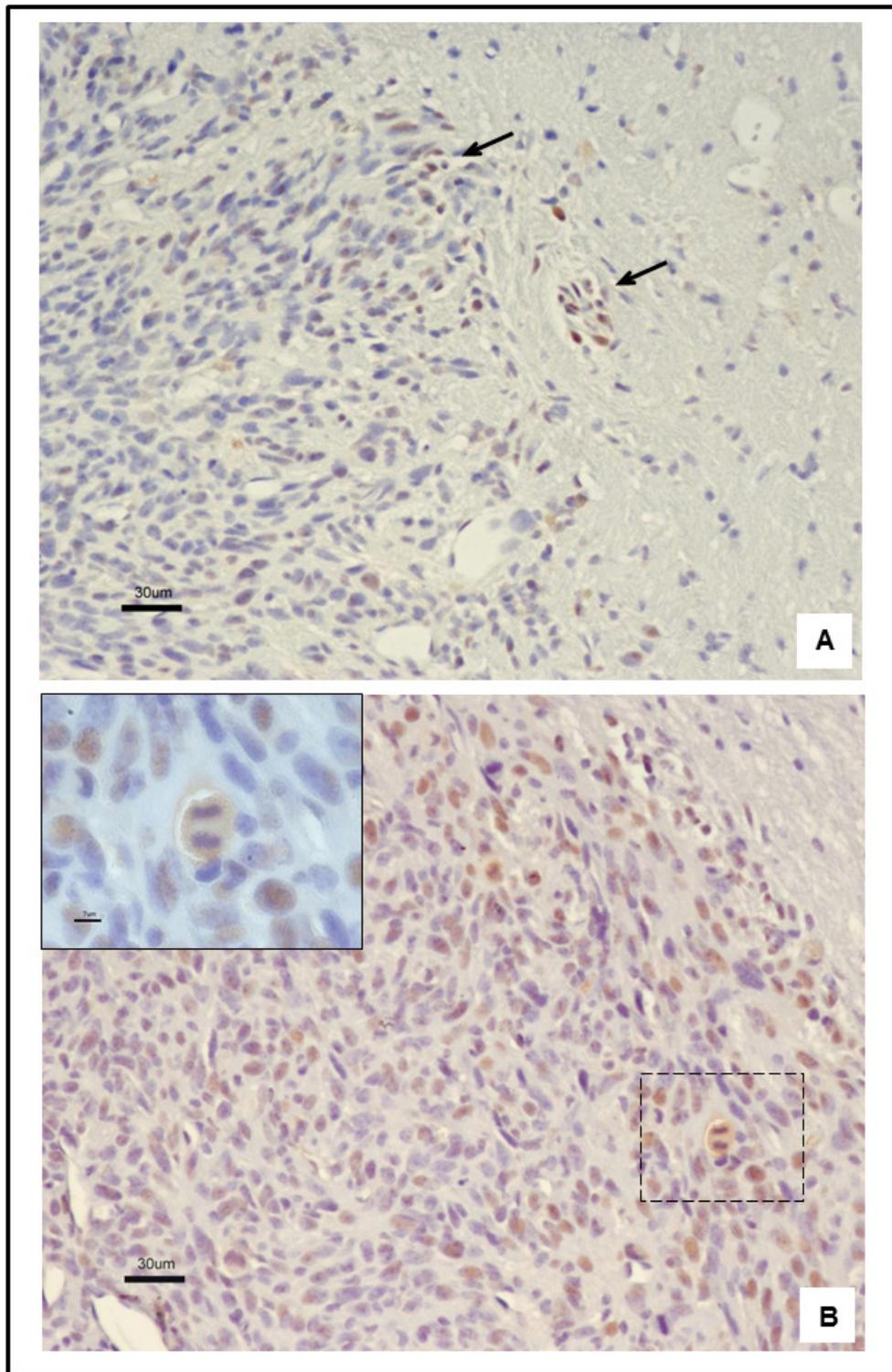
**Figura 14.** Imunomarcagem para CD56/NCAM em cérebro com tumor derivado de implante ortotópico analisado quatro semanas após inoculação em camundongos *nude*. Notar células marcadas predominantemente na região central da lesão (A) com positividade variando de leve a intensa. O detalhe é uma ampliação da região tracejada (aumento de 1000x; barra = 7 μm). Contra-coloração com hematoxilina de Harris. Aumento de 40x (A) e 200x (B). Barra = 150 μm (A), 30 μm (B).



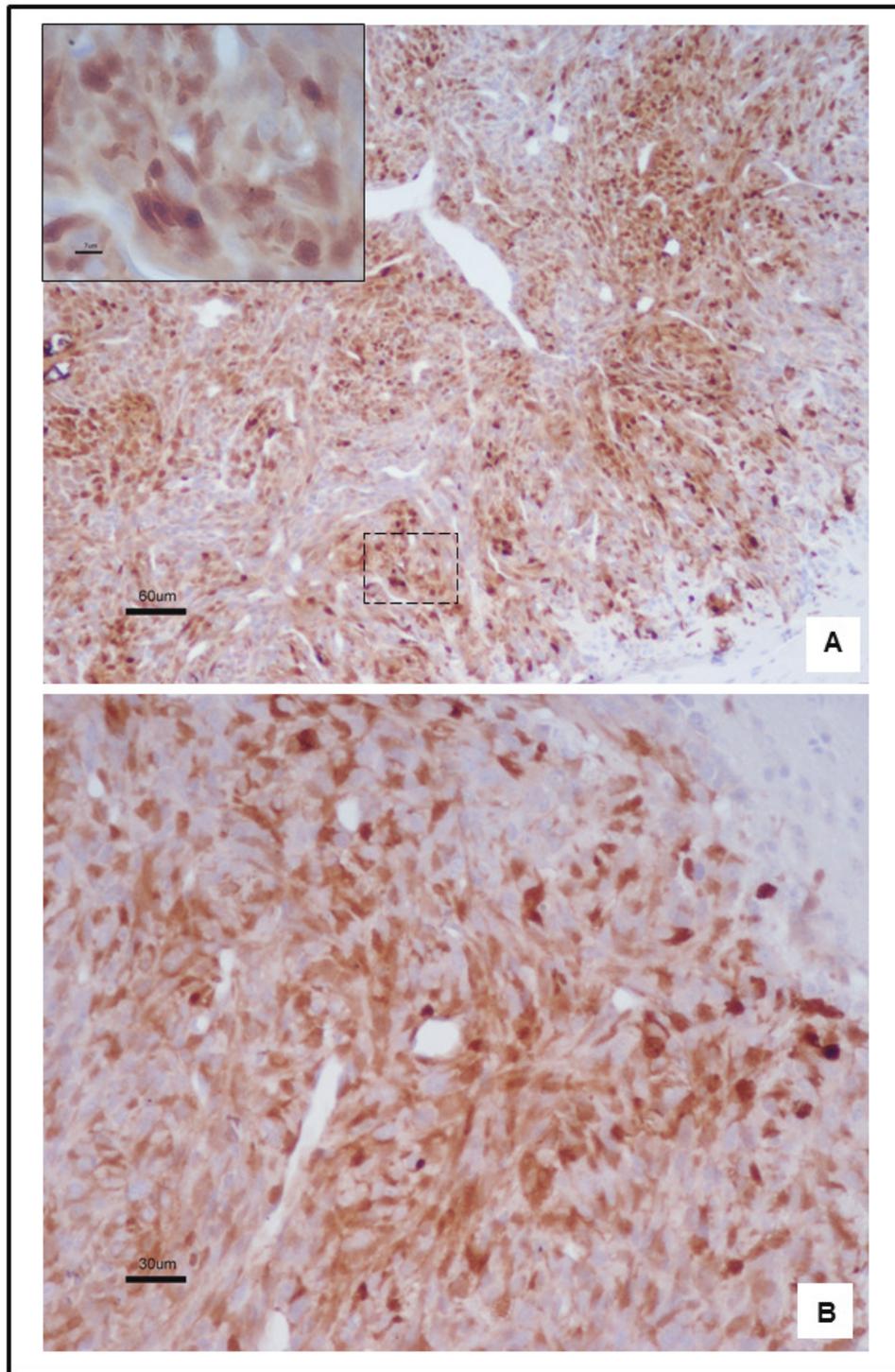
**Figura 15.** Imunopositividade para  $\alpha$ -actina de músculo liso (1A4) em cérebro com tumor derivado de implante ortotópico analisado quatro semanas após inoculação em camundongos *nude*. Notar células marcadas predominantemente na região central da lesão (A) com positividade variando de leve a intensa. O detalhe é uma ampliação da região tracejada (aumento de 1000x; barra = 7  $\mu$ m). Contra-coloração com hematoxilina de Harris. Aumento de 40x (A) e 200x (B). Barra = 150  $\mu$ m (A), 30  $\mu$ m (B).



**Figura 16.** Expressão de CD34 em cérebro com tumor derivado de implante ortotópico analisado duas (A) ou quatro (B) semanas após inoculação em camundongos *nude*. Notar presença de capilares irregularmente distribuídos (setas). Contra-coloração com hematoxilina de Harris. Aumento de 200x. Barra (A, B) = 30 µm.



**Figura 17.** Imunoistoquímica para PCNA em cérebro com tumor derivado de implante ortotópico analisado duas (A) ou quatro (B) semanas após inoculação em camundongos *nude*. Observar marcações nucleares, mais intensas, sobretudo, na região limítrofe do tumor (setas). Contra-coloração com hematoxilina de Harris. Aumento de 200x. Barra (A, B) = 30 µm. O detalhe é uma ampliação de células positivas na área tracejada, destacando-se uma célula mitótica positiva (aumento de 1000x; barra = 7 µm).



**Figura 18.** Expressão de galectina-3 em cérebro com tumor derivado de implante ortotópico analisado duas (A) ou quatro (B) semanas após inoculação em camundongos *nude*. As lesões apresentam imunomarcagem variável, tanto nuclear quanto citoplasmática. Muitas vezes, observam-se marcações nucleares mais intensas na região limite entre o tumor e o tecido adjacente. Contra-coloração com hematoxilina de Harris. Aumento de 100x (A) e 200x (B). Barras = 60 µm (A), 30 µm (B). O detalhe é uma ampliação das células positivas na área tracejada (aumento de 1000x; barra = 7 µm).

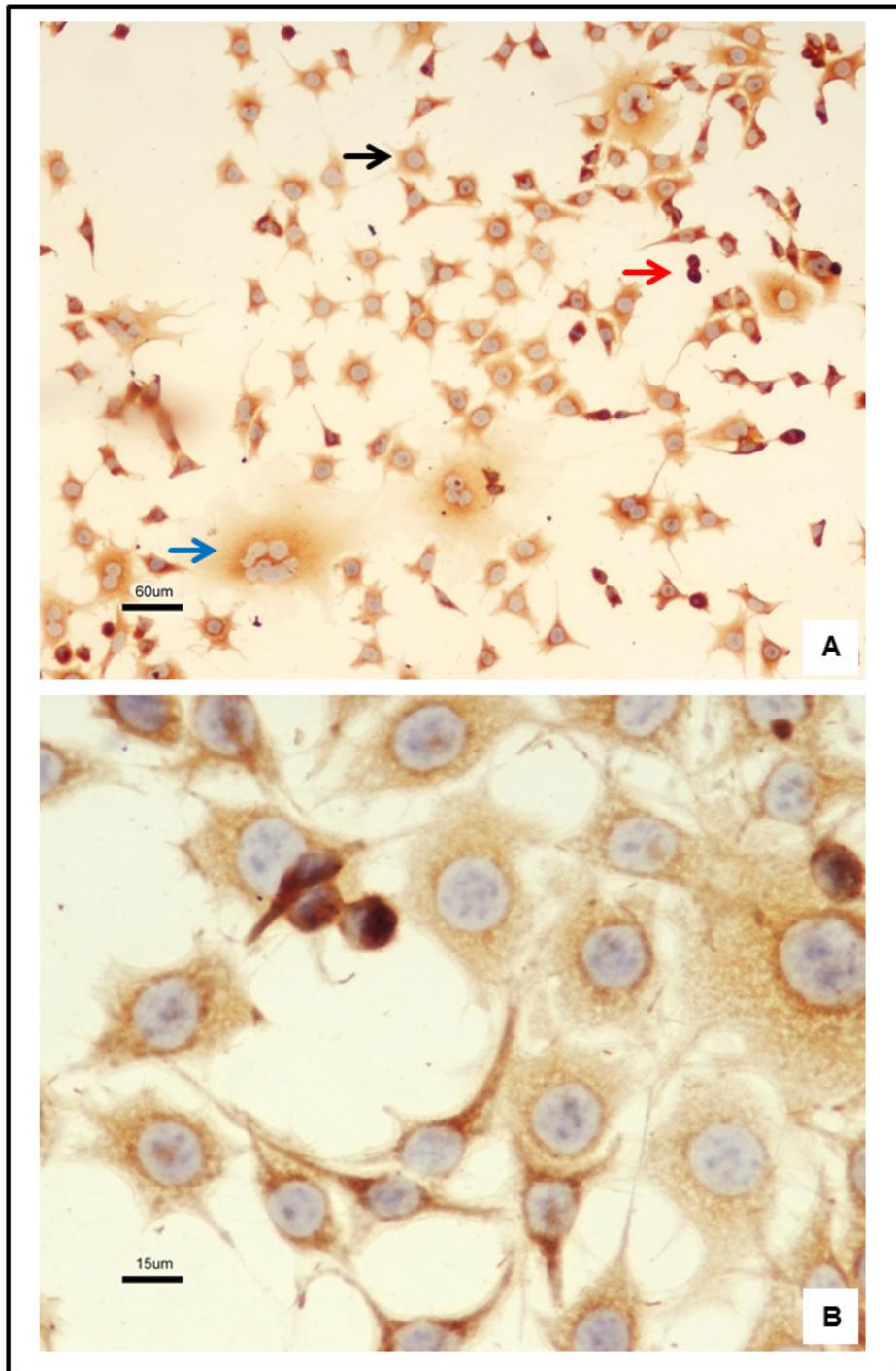
#### **4.5. Expressão de GFAP *in vitro***

Células NG97ht em cultura (passagem 60) foram fixadas e submetidas a reação imunocitoquímica para o marcador astrocitário GFAP. Foram identificados basicamente três diferentes tipos celulares ou populações: uma composta de células fusiformes/dendrítico-símiles com extensões citoplasmáticas, outra constituída por células mais arredondadas e com citoplasma mais compacto e uma terceira população, mais rara, de células maiores multinucleadas e com extensos prolongamentos citoplasmáticos. Detectou-se expressão de GFAP nos três tipos celulares descritos. O padrão observado foi citoplasmático e homogêneo, em alguns casos mostrando predominância perinuclear. Especificamente, na população celular mais arredondada observou-se imunomarcação mais intensa que nas demais populações (Figura 19).

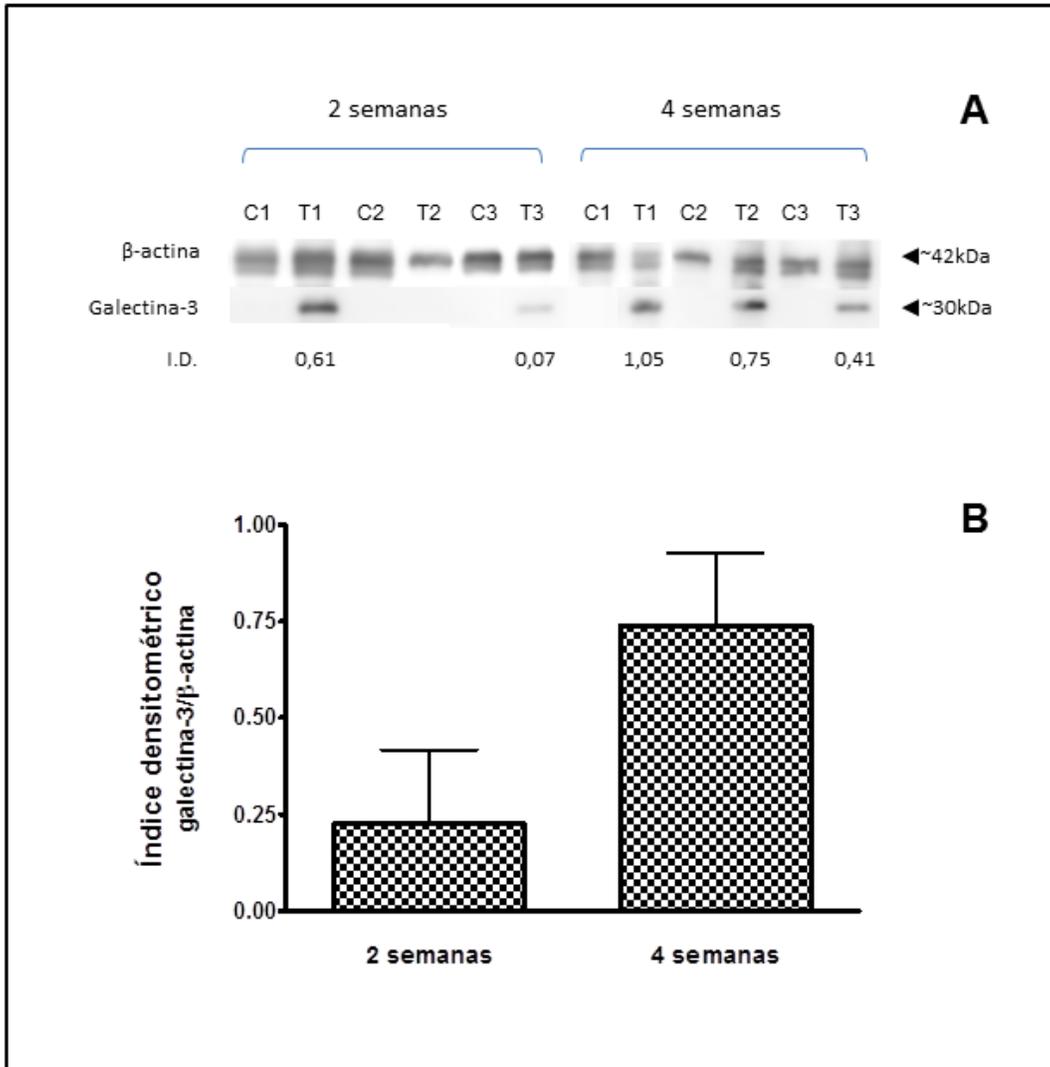
#### **4.6. Detecção de galectina-3 por *Western Blotting***

Tumores derivados de inoculação ortotópica de células NG97ht em camundongos *nude* e respectivas amostras contralaterais de tecido cerebral normal foram analisados quanto à expressão de galectina-3, duas ou quatro semanas após o implante. Esta análise, realizada através de *Western Blotting*, revelou produção de galectina-3 em todos os tumores obtidos quatro semanas após a inoculação das células. Com relação às amostras obtidas duas semanas pós-implante, apenas uma das amostras não apresentou expressão desta proteína. Não foi detectada expressão de galectina-3 no tecido cerebral normal (Figura 20A).

Finalmente, não se observou diferença significativa entre os índices densitométricos dos espécimes obtidos duas ou quatro semanas após inoculação de células NG97ht (Figura 20B).



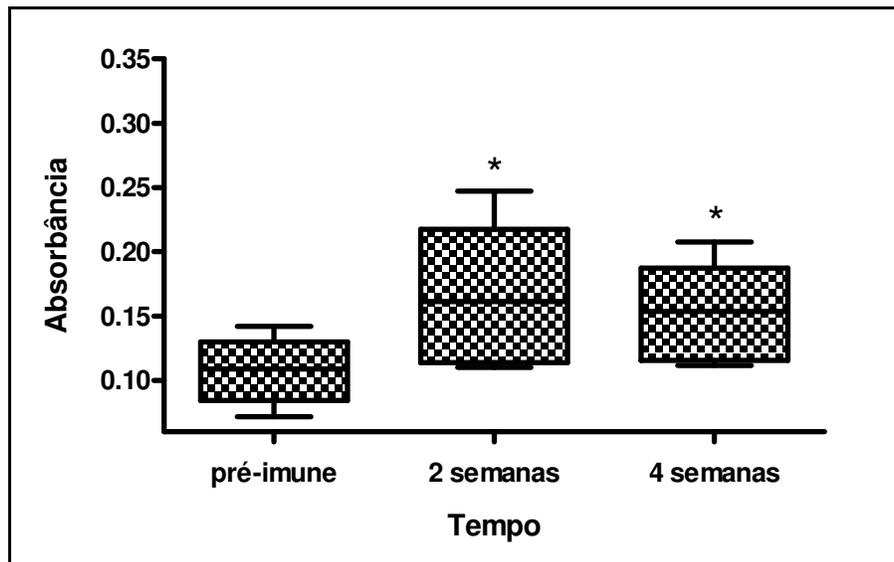
**Figura 19.** Imunomarcção para GFAP em células da linhagem NG97ht (passagem 60) cultivadas em lamínulas e fixadas em álcool 70%. Em A, observar três populações distintas: uma composta por células dendrítico-símile com extensões citoplasmáticas (seta preta), outra de células mais arredondadas e com citoplasma mais compacto (seta vermelha) e uma terceira população de células multinucleadas e com extensos prolongamentos (seta azul). Notar marcação citoplasmática predominantemente mais intensa na população celular mais arredondada. Contra-coloração com hematoxilina de Harris. Aumento de 100x (A) e 400x (B). Barras = 60  $\mu$ m (A), 15  $\mu$ m (B).



**Figura 20.** *Western Blotting* para caracterização da expressão de galectina-3 em extratos protéicos de tumores duas (n=3) ou quatro semanas (n=3) após inoculação de células NG97ht no córtex de camundongos *nude*. Em A, C1 a C3 e T1 a T3 correspondem a amostras controle (C) e respectivas massas tumorais (T). Os valores correspondem ao índice densitométrico (I.D.), utilizando-se a proteína β-actina como controle endógeno. Foi detectada produção de galectina-3 com cerca de 30 kDa em cinco dos seis tumores analisados. As amostras controle não apresentaram produção desta proteína. Em B, representação gráfica da média dos índices densitométricos dos tumores duas ou quatro semanas pós-implante. Não foi observada diferença significativa na produção de galectina-3 entre os dois tempos analisados. Valores expressos como média ± e.p.m. (Teste de Mann-Whitney;  $p > 0,05$ ).

#### 4.7. Avaliação de anticorpos séricos contra o implante ortotópico em camundongos BALB/c

Nenhum dos camundongos BALB/c submetidos à inoculação ortotópica de células NG97ht apresentou crescimento tumoral quatro semanas após implante. O grupo de camundongos BALB/c (n=6) inoculado com  $5 \times 10^5$  células no córtex frontal teve o soro coletado uma semana antes da inoculação (pré-imune) e duas e quatro semanas após a inoculação de células NG97ht (pós-imune). Estes soros foram utilizados como anticorpos primários em reação de ELISA realizada com células NG97ht cultivadas em microplaca. Houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na leitura de absorvância quando comparados os soros pré-ímenes com os soros pós-ímenes de duas e quatro semanas (Figura 21). Este aumento indica que houve, após a inoculação de células NG97ht, reconhecimento de antígenos presentes nestas células por componentes séricos dos camundongos BALB/c.



**Figura 21.** Absorvâncias medidas em reação de ELISA realizada em microplaca contendo células NG97ht em cultura, utilizando como anticorpo primário o soro coletado de camundongos BALB/c (n=6) antes da inoculação das células NG97ht (pré-imune), duas semanas e quatro semanas após a inoculação. Os valores são expressos como mediana  $\pm$  IQR. Notar aumento significativo da produção de anticorpos no soro dos animais duas e quatro semanas após a inoculação de células comparativamente aos valores pré-ímenes (Teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney;  $p < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Achados morfológicos e imunoistoquímicos observados nos tumores derivados do implante ortotópico de células NG97ht em cérebro de camundongos *nude*, duas e quatro semanas após inoculação das células.

	<b>Tempo de análise após implante</b>	
	<b>Duas semanas</b>	<b>Quatro semanas</b>
<b>Tamanho (cm)</b>	1,1 – 2,6	5,6 – 7,4
<b>Índice mitótico (nº mitoses/10 CGA)</b>	20,3	14,3
<b>Necrose</b>	Ausente	Presente (focal, em um espécime)
<b>GFAP</b>	Forte marcação citoplasmática com distribuição variável.	
<b>S-100</b>	Positividade citoplasmática e/ou nuclear leve a moderada em raras células.	
<b>Vimentina</b>	Marcação citoplasmática moderada a intensa com distribuição homogênea.	
<b>CD56</b>	Positividade citoplasmática moderada a intensa predominando na região central da neoplasia.	
<b><math>\alpha</math>-actina de músculo liso</b>	Marcação citoplasmática moderada a intensa principalmente nas áreas centrais do tumor.	
<b>CD34</b>	Marcação ausente em células tumorais. Expressão em abundantes vasos capilares intratumorais irregularmente distribuídos.	
<b>PCNA</b>	Marcação nuclear forte e frequente, predominando na região limítrofe do tumor com o tecido cerebral normal adjacente.	
<b>Galectina-3</b>	Intensa positividade citoplasmática e/ou nuclear irregularmente distribuída.	

## 5. Discussão

A classificação de gliomas é realizada baseando-se em suas características histológicas, imunoistoquímicas e aspectos clínicos. Os gliomas compõem um grupo heterogêneo de neoplasias originadas a partir de células gliais, como os astrócitos, no caso dos astrocitomas. Destes, o tipo mais comum e agressivo é o glioblastoma (GBM; OMS grau IV), o qual apresenta intensa proliferação celular, infiltração difusa, resistência à apoptose e extrema instabilidade genômica. Sua classificação, de acordo com os critérios diagnósticos da OMS, baseia-se na presença dos seguintes achados morfológicos: atipia nuclear, mitose, proliferação vascular e/ou necrose. GBMs apresentam ampla heterogeneidade intratumoral em níveis celulares, transcricionais e genômicos. Esta complexidade dificulta o entendimento desta neoplasia e seu tratamento. Apesar da implementação de estratégias terapêuticas durante a última década, o tempo de sobrevida médio de pacientes com GBM é inferior a um ano (Furnari e cols, 2007; Louis e cols., 2007). Assim, destaca-se no presente trabalho a importância da busca por modelos ortotópicos experimentais para melhor compreensão do comportamento biológico dos gliomas, uma vez que processos como iniciação, progressão e invasão tumoral são influenciados por um microambiente complexo e dinâmico, o qual dependente do hospedeiro e do local onde se desenvolve o tumor (Sautès-Fridman e cols., 2011).

O microambiente tecidual adjacente às neoplasias tem sido investigado quanto à sua possível contribuição para a progressão de diversos tumores. Estudos mostraram que células neoplásicas recrutam ativamente células não-tumorais inflamatórias, vasculares e fibroblastos, processo que contribuiria para o crescimento da neoplasia (Cunha e cols., 2003; Bhowmick e cols., 2004). Descrita em alguns tumores, a “ativação” do tecido adjacente seria caracterizada pela reativação de propriedades fenotípicas embrionárias, envolvendo reexpressão de citocinas, fatores de crescimento e seus receptores (Dvorak, 1986; Walker, 2001; Cukierman, 2004).

Análises *in vitro* e *in vivo* utilizando linhagens celulares tumorais têm mostrado que estas alterações contribuem para migração celular mais acentuada, remodelamento da matriz extracelular e angiogênese (Hanahan & Weinberg, 2000; Schor & Schor, 2001; Orimo e cols., 2005).

No presente trabalho, foi utilizado como modelo experimental para o estudo da fisiopatogênese de gliomas, a linhagem celular NG97ht, a qual foi estabelecida no laboratório de Imunopatologias da Unicamp, a partir de heterotransplante dorsal de células neoplásicas em camundongos imunodeprimidos (*nude*). Estas células implantadas foram derivadas de astrocitoma anaplásico (OMS grau III) ressecado de paciente do sexo masculino com 66 anos de idade. Os tumores que se desenvolveram no dorso de camundongos *nude* foram diagnosticados como GBM (Schenka e cols., 2005). No presente estudo, as neoplasias derivadas do implante ortotópico de células NG97ht foram predominantemente fusocelulares, apresentaram alta celularidade, pleomorfismo e irregularidade nuclear, além de focos de necrose, por vezes com arranjo em pseudopaliçada, e elevado índice mitótico (realçado pela imunomarcação para PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular). Tais neoplasias foram diagnosticadas como astrocitoma de alto grau (GBM), pois, além de positividade para GFAP (marcador de linhagem astrocitária), apresentaram três critérios histopatológicos estabelecidos pela OMS para o diagnóstico de GBM: atipia nuclear, mitoses e necrose. Além disso, a arquitetura da lesão foi salientada por extensa rede de fibras reticulínicas intercelulares, homogeneamente distribuídas, às vezes delimitando discretamente agrupamentos de células tumorais.

Particularmente, nos tumores ortotópicos, houve expressão de GFAP em células neoplásicas isoladas ou em pequenos agrupamentos, com distribuição variável. Por sua vez, as células neoplásicas *in vitro* apresentaram imunopositividade para GFAP. No entanto, tal marcação não foi homogênea entre os diferentes tipos celulares observados. De fato, foram

identificados *in vitro* três diferentes tipos celulares: células fusiformes/dendrítico-símiles, células mais arredondadas e com citoplasma mais compacto e um terceiro tipo celular, mais raro, de células maiores multinucleadas e com extensos prolongamentos citoplasmáticos. Nas células mais arredondadas, a imunomarcação para GFAP foi mais intensa que nos demais tipos celulares, mas todos apresentaram expressão desta proteína, o que demonstra sua origem glial.

Também foi observada *in vivo* nos tumores ortotópicos, além da imunopositividade para GFAP, expressão citoplasmática de vimentina (proteína de filamentos intermediários), CD56/NCAM (proteína de adesão presente em células de origem neuroectodérmica) e 1A4 ( $\alpha$ -actina de músculo liso), evidenciando diferenciação divergente da neoplasia, isto é, expressão de antígenos derivados de diferentes folhetos embrionários. A fim de se identificar outros marcadores que poderiam indicar diferenciação divergente, foram realizadas reações imunoistoquímicas para AE1/AE3 (*pool* de citoqueratinas), desmina (proteína de filamento intermediário de músculo esquelético) e sinaptofisina (glicoproteína de vesícula sináptica), as quais foram negativas.

Em conjunto, as características morfológicas da neoplasia derivada do implante ortotópico, o arcabouço estabelecido pela rede de finas fibras reticulínicas intercelulares e a identificação imunoistoquímica de componentes celulares gliais e mesenquimais conduziram ao diagnóstico de gliossarcoma. Esta variante de GBM apresenta padrão tecidual peculiar bifásico, isto é, com regiões com características gliais e outras exibindo diferenciação mesenquimal com elementos fenotípicos diversos (Louis e cols., 2007). A expressão citoplasmática de vimentina, detectada nos tumores ortotópicos, tem sido descrita em GBMs, gliossarcomas e em células mesenquimais (Grant e cols., 1989; Colin e cols., 2007; Ivaska e cols., 2007).

Em estudos anteriores, visando melhor caracterização das células NG97ht em cultura, foi demonstrada através de microscopia eletrônica de transmissão, presença de nucléolo proeminente

e invaginações na membrana nuclear, descritos para a linhagem humana derivada de GBM, WJ1 (Wang e cols., 2007). Além disso, foram observadas peculiares estruturas elipsóides elétrondensas nos espaços intercelulares ou delimitadas por fina membrana lipídica em diferentes regiões intracitoplasmáticas. Estruturas semelhantes foram descritas por Rutka e cols. (1986) em linhagem celular humana derivada de gliossarcoma, o que teria sugerido possível diferenciação sarcomatosa da linhagem NG97ht (Machado e cols., 2009). Ao analisarem o heterotransplante de células NG97ht em camundongos *nude*, Schenka e cols. (2005) descreveram algumas características comuns em gliossarcoma, como células fusiformes e expressão focal de GFAP, mas não foi observada expressão de marcadores que indicariam diferenciação mesenquimal, como desmina e  $\alpha$ -actina de músculo liso.

Ainda, em estudos *in vitro* prévios visando a análise genética das células NG97ht, Machado e cols. (2008) evidenciaram células desta linhagem derivadas de implante heterotópico apresentando diversas anormalidades cromossômicas, como hiperplóidia, além de presença de cromossomos murinos, o que indicou a fusão das células neoplásicas com células estromais murinas (Machado e cols., 2008). Neste sentido, Jacobsen e cols. (2006) já relataram fenômeno semelhante ao demonstrar que a inoculação de células de adenocarcinoma mamário humano em camundongos *nude* acarretou na fusão destas com células estromais murinas, originando células híbridas fusiformes que apresentaram alto grau de malignidade. Especificamente, com relação à formação de células neoplásicas híbridas, alguns autores propuseram que o estroma tumoral ativado poderia sofrer alterações genéticas que aumentassem o potencial metastático e agressividade, devido à presença de subpopulações celulares híbridas com propriedades diferentes daquelas das células neoplásicas originais (Larizza & Schirmacher, 1984; Duelli & Lazebnik, 2003). Chakraborty e cols. (2000) demonstraram que células metastáticas derivadas de implante de melanoma murino em camundongos *nude* eram compostas principalmente por

híbridos entre a linhagem de melanoma e o hospedeiro, provavelmente macrófagos. Sugeriu-se que uma possível causa da fusão entre células tumorais e do hospedeiro seria a fagocitose de células neoplásicas em apoptose por macrófagos. As células em apoptose são geralmente identificadas e englobadas ainda íntegras pelos fagócitos, evitando a exposição do material intracelular ao tecido adjacente (Rachkovsky e cols., 1998). Neste sentido, estudos *in vitro* sugeriram que poderia haver troca de informações genéticas entre células em processo de apoptose e fagócitos do hospedeiro (de la Taille e cols., 1999; Holmgren e cols., 1999). Powell e cols. (2011) demonstraram a fusão espontânea de células de origem hematopoiética, macrófagos em especial, e células de tumores intestinais. Seus dados basearam a hipótese de que a fusão dos macrófagos com células tumorais poderia transmitir propriedades das células fagocitárias migratórias às células neoplásicas, favorecendo a formação de metástases.

No caso da linhagem NG97ht, propõe-se a hipótese de que a fusão com células estromais murinas (do tecido subcutâneo dorsal) e, principalmente, a manutenção da linhagem ao longo de muitas passagens possam ter acarretado na aquisição de um perfil mesenquimal após implante ortotópico. É importante ressaltar que tal aquisição pode ter sido influenciada por fatores do microambiente *in vivo*, visto que as células positivas para GFAP foram observadas em menor frequência nos tumores ortotópicos, comparando-se com as células NG97ht *in vitro*. Esta redução da expressão de GFAP *in vivo* também foi observada em trabalho anterior com a linhagem NG97ht nos heterotransplantes dorsais, quando comparados às células em cultura (Schenka e cols., 2005). Em alguns GBMs, células-tronco multipotentes passam a ser tumorigênicas quando submetidas a condições ambientais apropriadas e podem expressar seu potencial mesenquimal (Ricci-Vitiani e cols., 2008). Freije e cols. (2004) analisaram a expressão gênica completa de 85 gliomas de alto grau e identificaram em GBMs a expressão de transcritos de componentes da matriz extracelular que correspondem a uma série de genes tipicamente expressos em tecidos de

origem mesenquimal. Tso e cols. (2006) identificaram características celulares e moleculares de células-tronco mesenquimais em biópsias de GBMs primários. Muitos fatores associados a ossos e cartilagens tem sido relacionados à angiogênese, proliferação celular, mecanismos anti-apoptóticos, transição epitélio-mesenquimal e migração celular, portanto, estes fatores mesenquimais poderiam participar da tumorigênese e progressão maligna.

Ainda assim, é discutível se células de GBM possuiriam propriedades mesenquimais intrínsecas ou se são adquiridas sob influência do microambiente durante a progressão tumoral. Lee e cols. (2006) observaram que linhagens de GBM, propagadas *in vitro* por tempo prolongado em meio de crescimento contendo soro, perderam as populações de células-tronco tumorais e passaram a apresentar características genéticas e biológicas diferentes dos tumores originais. Constatou-se que estas linhagens perderam a capacidade de auto-renovação e diferenciação, além de passarem por alterações nos perfis gênicos. Neste sentido, foi descrito que a maioria dos gliomas primários é diplóide, enquanto que linhagens de glioma estabelecidas são predominantemente poliplóides (Wiltshire e cols., 2000; Kubota e cols., 2001). Estudo realizado em gliomas mostrou que a expressão de GFAP encontrou-se reduzida em linhagens celulares em passagens baixas quando comparadas aos tumores iniciais (Mehrian e cols., 2005). Propôs-se que a população de células-tronco tumorais de GBMs primários seria rapidamente perdida sob condições típicas de cultura celular e que células submetidas a muitas passagens *in vitro* seriam produtos de clones que passaram por diversas alterações genéticas e/ou epigenéticas *de novo* (Lee e cols., 2006).

A capacidade de linhagens estabelecidas de GBM exibirem características mesenquimais *in vitro*, sobretudo após longo período em cultura, é conhecida e geralmente considerada consequência de aberrações genéticas adquiridas após cultivo em meio contendo soro por tempo prolongado (McKeever e cols., 1991; McKeever e cols., 1995; Tso e cols., 2006; Ricci-Vitiani e

cols., 2008). Há evidências de que condições de cultivo celular influenciam 30 a 35% da expressão gênica global em linhagens astrocitárias estabelecidas e em culturas de baixas passagens. Entretanto, foi observado que é possível distinguir astrocitoma pilocítico (OMS grau I) de GBM (OMS grau IV) pelo perfil molecular, ao se comparar tecidos derivados de biópsia e correspondentes culturas em passagens baixas, o que indica que estas condições *in vitro* possibilitam a manutenção de similaridade com os astrocitomas *in vivo* quanto à expressão gênica (Potter e cols., 2009). Em estudo anterior com a linhagem NG97ht, Machado e cols. (2008) demonstraram *in vitro* que, ao longo dos subcultivos, a população celular positiva para GFAP diminuía, ao passo que a imunomarcação para vimentina, ausente em passagens mais baixas, era aumentada. Tal observação, somada à perda de expressão de GFAP observada *in vivo* em alguns astrocitomas de alto grau, poderia sugerir desdiferenciação celular ao longo do subcultivo das células NG97ht (Wilhelmsson e cols., 2003).

Na presente investigação, observamos que as lesões originadas a partir do implante ortotópico de células NG97ht mostraram imunomarcação variável para GFAP, em células isoladas ou em agrupamentos celulares. Em contrapartida, a expressão de galectina-3 foi citoplasmática e/ou nuclear predominantemente intensa e distribuída de maneira irregular. A galectina-3, proteína com 29 a 35 kDa, tem uma estrutura única dentre as galectinas, com uma cadeia polipeptídica que possui um conservado domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), o qual tem afinidade específica para  $\beta$ -galactosídeos, e um longo domínio N-terminal rico em prolina e glicina (Perillo e cols., 1998). Em humanos, a expressão de galectina-3 durante a embriogênese, especificamente no primeiro trimestre de gestação, está restrita a epitélios (como a epiderme e do revestimento mucoso dos tratos respiratório e digestório), às células miocárdicas, condrócitos, notocorda e fígado. Apesar de ser encontrada em diversos tecidos normais, a galectina-3 está associada principalmente a células epiteliais e mielóides. Sua expressão também

foi descrita em muitos tipos celulares maduros, como fibroblastos, condrócitos, osteoblastos, osteoclastos, queratinócitos, células de Schwann e da mucosa gástrica, bem como em células epiteliais de diversos órgãos e do sistema imune, como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos, células dendríticas, macrófagos (Dumic e cols., 2006).

A galectina-3 possui uma variedade de funções biológicas, as quais são definidas por sua localização intracelular ou extracelular. O envolvimento da galectina-3 citosólica na regulação da proliferação celular, diferenciação, sobrevivência e morte foi demonstrado pelas evidências de sua interação com as proteínas K-Ras e Akt (Dumic e cols., 2006). Shalom-Feuerstein e cols. (2005) mostraram que a galectina-3 confere a células de carcinoma mamário humano funções oncogênicas através da ligação e ativação da proteína K-Ras. Além disso, foi observado que a galectina-3 liga-se seletivamente à K-Ras ativada e promove a ativação da PI3K (Elad-Sfadia e cols, 2004). Por sua vez, a localização nuclear de galectina-3 parece estar relacionada à modulação da atividade de fatores de transcrição. Lin e cols. (2002) mostraram que através da regulação da ligação de fatores de transcrição nos sítios CRE (elemento responsivo a cAMP) e Sp1 (proteína de especificidade-1) da região promotora do gene da ciclina D1, a galectina-3 promove transativação dos fatores de transcrição CREB (proteína ligadora ao elemento responsivo a cAMP) e Sp1 e induz a atividade do promotor da ciclina D1. Além dos elementos CRE e Sp1, presentes na região promotora de diversos genes, observou-se regulação pela galectina-3 de outros promotores gênicos. De fato, Kim e cols. (1999), ao estudarem células epiteliais mamárias humanas, descreveram tal regulação com relação aos genes da ciclina A, ciclina E, p21 e p27, todas proteínas controladoras do ciclo celular. A participação da galectina-3 na regulação da transcrição gênica também foi evidenciada pelos achados em células de carcinoma papilífero da tireóide, nas quais esta proteína interage diretamente com o fator de

transcrição da tireóide-1 (TTF-1). Dessa maneira, a atividade deste fator de transcrição é estimulada, contribuindo para a proliferação das células tumorais (Paron e cols., 2003).

No que diz respeito à localização intracelular, foi proposto que a galectina-3 permanece no núcleo ou no citoplasma, dependendo de sua interação com importinas e exportina-1 (Sundblad e cols., 2011). Em meio extracelular, esta proteína contribui para adesão e ativação celular, através da ligação com glicoproteínas de membrana e componentes glicosilados da matriz extracelular. Entre seus ligantes, estão a laminina, fibronectina, elastina e colágeno IV. Desta forma, a galectina-3 participaria de diferentes processos biológicos, como homeostase celular, reações imunológicas, invasão tumoral e metástase (Takenaka e cols., 2004; van den Brule e cols., 2004; Liu & Rabinovich, 2005). Iurisci e cols. (2000) relataram que níveis séricos de galectina-3 em pacientes com câncer de mama, ovário, pulmão, gastrintestinal, melanoma e linfoma de Hodgkin encontravam-se elevados, e que o nível circulante desta proteína refletia aspectos do comportamento biológico tumoral associados ao fenótipo metastático. Neste sentido, sabe-se que as galectinas reconhecem uma das mais estudadas famílias de moléculas de adesão celular, as integrinas. Especificamente, a galectina-3 se liga à integrina  $\alpha 1\beta 1$ , podendo aumentar sua expressão e, desta forma, facilitar a ocorrência de metástases tumorais (Liu & Rabinovich, 2005). Além disto, Le Marer & Hughes (1996) demonstraram que galectina-3 exógena promoveria a migração de células de carcinoma mamário em barreira de Matrigel.

O componente nuclear da galectina-3 tem sido predominantemente relacionado a efeitos anti-tumorais, enquanto que a localização citoplasmática desta proteína parece correlacionar-se com progressão neoplásica (Sundblad e cols., 2011). Os possíveis efeitos anti-apoptóticos da galectina-3 contribuiriam para sobrevivência celular em diversos tipos tumores. Quando presente no meio intracelular, a galectina-3 apresenta uma sequência estrutural similar ao domínio BH1 da família Bcl-2, o qual está relacionado à sobrevivência. Dessa maneira, a galectina-3 inibiria a

apoptose induzida por quimioterápicos, como a cisplatina, em alguns tipos de câncer (Fukumori e cols., 2007). Além disso, a galectina-3 desponta como um possível marcador diagnóstico de neoplasias no futuro (Dumic e cols., 2006; Sundblad e cols., 2011). De fato, indicou-se esta proteína como potencial marcador diagnóstico em neoplasias renais e câncer pulmonar. A galectina-3 mostrou-se intensamente expressa em neoplasias renais com diferenciação de túbulos distais, diferentemente de tumores oncocíticos e de células granulares (Dancer e cols., 2010), e apresentou alta expressão em câncer de pulmão do tipo não pequenas células e pouca positividade em câncer de pulmão do tipo pequenas células (Buttery e cols., 2004). Por sua vez, Jones e cols. (2004) sugeriram a galectina-3 como potencial marcador prognóstico em câncer de mama, pois a expressão nuclear desta proteína em células luminais epiteliais desta neoplasia mostrou estar relacionada a menor sobrevida dos pacientes.

A expressão de galectina-3 em tumores cerebrais é variável e, em alguns casos, poderia servir como um marcador prognóstico (Sundblad e cols., 2011). Em tumores astrocitários humanos, foram detectadas diferenças na expressão de galectina-3 conforme o grau histológico. Em particular, sua expressão em astrocitomas pilocíticos (OMS grau I) mostrou-se consideravelmente maior que em astrocitomas difusos (OMS graus II, III e IV) (Camby e cols., 2001; Neder e cols., 2004). Além disso, Camby e cols. (2001) observaram *in vitro* que a galectina-3 estimula a migração celular em linhagens de GBM, tais como Hs683, T98G e U373. Estes mesmos autores também mostraram correlação negativa entre a expressão desta proteína e a média de sobrevida de pacientes com astrocitoma de alto grau. O prognóstico destes pacientes, por sua vez, está intimamente relacionado com o grau histológico da neoplasia. Outro estudo relatou que a expressão de galectina-3 encontrou-se significativamente maior em GBMs do que em oligodendrogliomas anaplásicos (Neder e cols., 2004). Além disto, Bresalier e cols. (1997) ao compararem diferentes tipos de gliomas, não observaram expressão de galectina-3 em

oligodendrogliomas e ependimomas, mas indicaram que, em astrocitomas, esta proteína parece estar correlacionada ao grau de malignidade. Em conjunto, os estudos mencionados sugerem que, em astrocitomas, conforme maior o grau histológico da neoplasia, maior tendência a apresentar alta expressão de galectina-3. O presente estudo corrobora esta observação, pois a neoplasia analisada *in vivo*, diagnosticada como um glioma de alto grau (GBM), apresentou imunopositividade predominantemente intensa para galectina-3, irregularmente distribuída por toda massa tumoral.

A verificação de uma distribuição irregular de células positivas para galectina-3 em uma neoplasia astrocitária de alto grau também foi feita por Gordower e cols. (1999), os quais afirmaram que o grau de expressão desta proteína em tumores astrocitários humanos é muito heterogêneo. Além disto, tais autores sugeriram que a elevada expressão de galectina-3 fortaleceria o potencial invasivo da célula tumoral. Neste sentido, dentro de uma neoplasia heterogênea, mesmo com pequeno número de células ativamente proliferativas, a co-expressão de galectina-3 em altos níveis por estas células poderia facilitar a invasão tumoral. Ainda com relação à distribuição de células positivas para galectina-3, observamos em alguns dos tumores derivados do implante ortotópico, marcação mais frequente e intensa nas regiões limítrofes com o tecido normal adjacente, em comparação à área central da lesão. De forma similar, Camby e cols. (2001), ao descreverem expressão mais elevada de galectina-3 nas porções mais infiltrativas de tumores astrocitários, propuseram a participação desta proteína no mecanismo de invasão destes tumores.

Detectamos através de análise semi-quantitativa pela técnica de *Western Blotting*, expressão de galectina-3 em todos os tumores analisados, exceto em um, retirado duas semanas após inoculação de células NG97ht. Pelo fato de todas as lesões terem mostrado expressão de galectina-3 através de reações imunoistoquímicas (vide item 4.4), é possível que a não detecção desta proteína em um dos

tumores tenha sido decorrente de uma amostragem não representativa da neoplasia. Especificamente, devido à dificuldade de se identificar macroscopicamente todas as lesões obtidas duas semanas pós-implante, pode ter sido retirado predominantemente tecido cerebral normal próximo à região da inoculação, ao invés de amostra abrangendo majoritariamente o tecido neoplásico. Outra possibilidade para a não detecção de galectina-3 nesta única amostra poderia ser a ausência de crescimento neoplásico ortotópico neste animal, decorrente de problemas técnicos, como refluxo das células tumorais após a inoculação.

Por fim, nenhum dos camundongos imunocompetentes (BALB/c) submetidos à inoculação ortotópica de células NG97ht apresentou crescimento tumoral quatro semanas após implante. Reação de ELISA utilizando soro dos camundongos e as células em cultura mostrou que houve, após a inoculação ortotópica, reconhecimento de antígenos presentes nas células por componentes séricos dos animais. Portanto, este dado permite concluir que, no caso dos animais imunocompetentes, uma das possíveis razões para o não crescimento tumoral tenha sido a produção de anticorpos contra as células inoculadas. De maneira análoga, Fan e cols. (2005) observaram em camundongos imunocompetentes C3H/He, que receberam fragmento de enxerto cardíaco heterotópico de camundongo C57BL/6, níveis séricos elevados de anticorpos IgG e IgM contra o doador.

A resposta imune em geral é determinada pela disparidade antigênica existente entre o enxerto e o hospedeiro e pela expressão, no enxerto, de citocinas pró-inflamatórias logo após o transplante, ou no caso do presente modelo experimental, após a inoculação das células neoplásicas. A rejeição celular aguda é iniciada por linfócitos T do hospedeiro que reconhecem antígenos do enxerto (Sánchez-Fueyo & Strom, 2010). Desta forma, camundongos *nude* são amplamente utilizados em estudos sobre câncer. Particularmente, por não possuírem linfócitos T e B, estes animais apresentam probabilidade reduzida de desenvolver reação enxerto *versus* hospedeiro, independente da espécie de origem do enxerto. Por outro lado, a utilização de ratos

imunocompetentes, Wistar e Fischer 344, não é rara em modelos que envolvem a inoculação de células das linhagens C6 e 9L, ambas derivadas de gliomas de ratos. Tal fato, ao menos teoricamente, favoreceria o crescimento celular tumoral *in vivo*, dada a maior compatibilidade imunológica entre as células injetadas e o hospedeiro. Saini e cols. (1999) descreveram que os tumores originados da inoculação das células neoplásicas de ratos em ratos imunocompetentes são, macroscopicamente, bem delimitados. Já trabalhos que relatem implante de células tumorais em camundongos imunocompetentes, ou seja, uma das condições experimentais analisadas no presente trabalho, não são frequentes. Dentre estes, Weiner e cols. (1999) observaram que a injeção intracraniana de células de GBM de camundongo (4C8), em camundongos imunocompetentes B6D2F1 resultou no crescimento de tumores com alta densidade celular e necrose em pseudopaliçada. Ao contrário, Abernathey e cols. (1988) não detectaram crescimento tumoral em camundongos imunocompetentes após a inoculação intratecal de células humanas de GBM (U87MG). É provável que os diferentes resultados apresentados por estes dois trabalhos, em relação ao crescimento tumoral pós-implante, sejam decorrentes da inoculação de células tumorais em organismos da mesma ou de outra espécie, respectivamente. Assim, o implante de células da mesma espécie do hospedeiro implicaria menor chance de rejeição.

É importante ressaltar que, em nosso trabalho, foram utilizadas células tumorais híbridas, isto é, com características genéticas humanas e murinas. Ainda que a presença do componente murino favorecesse menor chance de rejeição, não verificamos crescimento tumoral nos camundongos imunocompetentes. Poder-se-ia propor que as características humanas das células inoculadas tenham tido maior capacidade de indução de resposta imunológica por parte do hospedeiro, levando à ausência de crescimento neoplásico detectável através das técnicas que utilizamos. Até o presente, não temos conhecimento de outros trabalhos que tenham avaliado a resposta imunológica em

camundongos imunocompetentes após o implante ortotópico de células neoplásicas astrocitárias híbridas.

Em conclusão, o modelo experimental caracterizado no presente trabalho, empregando o implante ortotópico de células NG97ht, representa uma interessante alternativa para investigações *in vivo* de gliossarcoma em camundongos *nude*. Considerando-se a escassez de estudos sobre galectina-3 em gliossarcomas e seu possível envolvimento com migração celular, angiogênese e quimiorresistência, a galectina-3 pode ser um potencial alvo para futuros estudos sobre a fisiopatogênese de gliomas e novas estratégias terapêuticas para este grupo de neoplasias.

## 6. Conclusões

1. O presente estudo levou ao estabelecimento de um modelo experimental de glioma empregando o implante ortotópico de células da linhagem glial maligna NG97ht. A inoculação das células no córtex frontal de camundongos *nude* (imunodeprimidos) resultou no crescimento de tumor macroscopicamente identificável após quatro semanas.
2. As características morfológicas e imunofenotípicas apresentadas pelos tumores que se desenvolveram nos animais *nude* foram de um astrocitoma de alto grau, especificamente, gliossarcoma.
3. A imunomarcção predominantemente intensa para galectina-3 nos tumores ortotópicos está provavelmente relacionada ao alto grau histológico desta neoplasia. Tendo em vista a participação da galectina-3 em processos como migração, invasão tumoral e angiogênese, esta proteína representa um potencial alvo para novas estratégias terapêuticas.
4. O implante ortotópico de células da linhagem NG97ht no córtex frontal de camundongos BALB/c (imunocompetentes) não resultou em crescimento tumoral quatro semanas após a injeção das células. A produção de anticorpos séricos contra as células neoplásicas justifica, ao menos em parte, a ausência de tumor nestes animais.

## 7. Referências bibliográficas

- ABBAS AK; LICHTMAN AH. **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2003.
- ABERNATHEY CD, KOOISTRA KL, WILCOX GL, LAWS ER Jr. New xenograft model for assessing experimental therapy of central nervous system tumors: human glioblastoma in the intrathecal compartment of the nude mouse. **Neurosurgery**. 1988 May;22(5):877-81.
- ALVES VAF. Garantia de Qualidade em imuno-histoquímica. In: Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J (eds.). **Manual de Imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.
- BALIK V, MIROSSAY P, BOHUS P, SULLA I, MIROSSAY L, SARISSKY M. Flow cytometry analysis of neural differentiation markers expression in human glioblastomas may predict their response to chemotherapy. **Cell Mol Neurobiol**. 2009 Sep; 29(6-7):845-58.
- BANSAL A, SHUYAN W, HARA T, HARRIS RA, DEGRADO TR. Biodisposition and metabolism of [(18)F]fluorocholine in 9L glioma cells and 9L glioma-bearing fisher rats. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**. 2008 Jun;35(6):1192-203.
- BARCELLOS-HOFF MH, LINFOOT PA, MARTON LJ, DEEN DF. Production of stable phenotypes from 9L rat brain tumor multicellular spheroids treated with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. **Int J Cancer**. 1992 Sep 30;52(3):409-13.
- BARKER M, HOSHINO T, GURCAY O, WILSON CB, NIELSEN SL, DOWNIE R, ELIASON J. Development of an animal brain tumor model and its response to therapy with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. **Cancer Res**. 1973 May;33(5):976-86.
- BARTH RF, KAUR B. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. **J Neurooncol**. 2009 Sep;94(3):299-312.
- BENCOKOVA Z, PAURON L, DEVIC C, JOUBERT A, GASTALDO J, MASSART C, BALOSSO J, FORAY N. Molecular and cellular response of the most extensively used rodent glioma models to radiation and/or cisplatin. **J Neurooncol**. 2008 Jan;86(1):13-21.
- BENDA P, SOMEDA K, MESSER J, SWEET WH. Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. **J Neurosurg**. 1971 Mar;34(3):310-23.
- BHOWMICK NA, NEILSON EG, MOSES HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**. 2004 Nov 18;432(7015):332-7.

- BIERNAT W, AGUZZI A, SURE U, GRANT JW, KLEIHUES P, HEGI ME. Identical mutations of the p53 tumor suppressor gene in the gliomatous and the sarcomatous components of gliosarcomas suggest a common origin from glial cells. **J Neuropathol Exp Neurol.** 1995 Sep;54(5):651-6.
- BIGNAMI A; RAJU T; DAHL D. Localization of vimentin, the nonspecific intermediate filament protein, in embryonal glia and in early differentiating neurons. **Dev Biol** 91: 286-295, 1982.
- BILLIS A; ALTEMANI AM; ANDRADE LALA. In: QUEIROZ, L.S.; ROGÉRIO, F.; ZANARDI, V.; de MENEZES, J.R. (eds.). **Patologia Diagnóstica de Tumores.** Campinas: Impressão Digital do Brasil Gráfica e Editora, 2010.
- BLACK KL, YIN D, KONDA BM, WANG X, HU J, KO MK, BAYAN JA, SACAPANO MR, ESPINOZA AJ, ONG JM, IRVIN D, SHU Y. Different effects of KCa and KATP agonists on brain tumor permeability between syngeneic and allogeneic rat models. **Brain Res.** 2008 Aug 28;1227:198-206.
- 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,** 1991; 265:73-81.
- BOERMAN RH, ANDERL K, HERATH J, BORELL T, JOHNSON N, SCHAEFFER-KLEIN J, KIRCHHOF A, RAAP AK, SCHEITHAUER BW, JENKINS RB. The glial and mesenchymal elements of gliosarcomas share similar genetic alterations. **J Neuropathol Exp Neurol.** 1996 Sep;55(9):973-81.
- BONNIN JM; RUBINSTEIN LJ. Immunohistochemistry of the central nervous system tumors: Its contributions to neurosurgical diagnosis. **J Neurosurg,** 1984; 60:1121-1133.
- BRANDES AA, TOSONI A, FRANCESCHI E, RENI M, GATTA G, VECHT C. Glioblastoma in adults. **Crit Rev Oncol Hematol.** 2008 Aug;67(2):139-52.
- BRAT DJ; CASTELLANO-SANCHEZ AA; HUNTER SB; PECOT M; COHEN C; HAMMOND EH DEVI SN; KAUR B; VAN MEIR EG. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. **Cancer Res,** 2004; 64(3):920-7.
- BRESALIER RS, YAN PS, BYRD JC, LOTAN R, RAZ A. Expression of the endogenous galactose-binding protein galectin-3 correlates with the malignant potential of tumors in the central nervous system. **Cancer.** 1997 Aug 15;80(4):776-87.
- BUTTERY R, MONAGHAN H, SALTER DM, SETHI T. Galectin-3: differential expression between small-cell and non-small-cell lung cancer. **Histopathology.** 2004 Apr;44(4):339-44.

- CALIFICE S, CASTRONOVO V, BRACKE M, VAN DEN BRÛLE F. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. **Oncogene**. 2004, 23(45):7527-36.
- CAMBY I, BELOT N, RORIVE S, LEFRANC F, MAURAGE CA, LAHM H e cols. Galectins are differentially expressed in supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas, and significantly modulate tumor astrocyte migration. **Brain Pathol** 2001, 11:12–26.
- CHAKRABORTY AK, SODI S, RACHKOVSKY M, KOLESNIKOVA N, PLATT JT, BOLOGNIA JL, PAWELEK JM. A spontaneous murine melanoma lung metastasis comprised of host x tumor hybrids. **Cancer Res**. 2000 May 1;60(9):2512-9.
- CHO M, CUMMINGS RD: Galectin-1, a beta-galactosidebinding lectin in Chinese hamster ovary cells. II. Localization and biosynthesis. **J Biol Chem** 1995, 270: 5207-5212.
- COLIN C, VIRARD I, BAEZA N, TCHOGHANDJIAN A, FERNANDEZ C, BOUVIER C, CALISTI A, TONG S, DURBEC P, FIGARELLA-BRANGER D. Relevance of combinatorial profiles of intermediate filaments and transcription factors for glioma histogenesis. **Neuropathol Appl Neurobiol**. 2007 Aug;33(4):431-9.
- COLMAN H, ALDAPE K. Molecular predictors in glioblastoma: toward personalized therapy. **Arch Neurol**. 2008 Jul;65(7):877-83.
- COOPER DN. Galectinomics: finding themes in complexity. **Biochim Biophys Acta**. 2002, 1572:209-231.
- CUKIERMAN E. A visual-quantitative analysis of fibroblastic stromagenesis in breast cancer progression. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**. 2004 Oct;9(4):311-24.
- CUNHA GR, HAYWARD SW, WANG YZ, RICKE WA. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. **Int J Cancer**. 2003 Oct 20;107(1):1-10.
- DAHL D. The vimentin-GFA protein transition in rat neuroglia cytoskeleton occurs at the time of myelination. **J Neurosci Res**, 1981;6:741-748.
- DAI C; HOLLAND EC. Glioma models. **Biochim Biophys Acta**. 2001;1551(1):M19-27.
- DANCER JY, TRUONG LD, ZHAI Q, SHEN SS. Expression of Galectin-3 in renal neoplasms: a diagnostic, possible prognostic marker. **Arch Pathol Lab Med**. 2010 Jan;134(1):90-4.
- de la TAILLE A, CHEN MW, BURCHARDT M, CHOPIN DK, BUTTYAN R. Apoptotic conversion: evidence for exchange of genetic information between prostate cancer cells mediated by apoptosis. **Cancer Res**. 1999 Nov 1;59(21):5461-3.

DONAWHO CK et al. ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models. **Clin Cancer Res.** 2007 May 1;13(9):2728-37.

DUELLI D, LAZEBNIK Y. Cell fusion: a hidden enemy? **Cancer Cell.** 2003 May;3(5):445-8.

DUMIC J, DABELIC S, FLOGEL M. Galectin-3: an open-ended story. **Biochim. Biophys. Acta** 2006, 1760, 616-635.

DVORAK HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. **N Engl J Med.** 1986 Dec 25;315(26):1650-9.

ELAD-SFADIA G, HAKLAI R, BALAN E, KLOOG Y. Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. **J Biol Chem.** 2004 Aug 13;279(33):34922-30.

ELLISON D; LOVE S; CHIMELLI L; HARDING B; LOWE J; ROBERTS GW; VINTERS HV. **Neuropathology - A reference text of the CNS pathology.** London: Mosby, 1998.

ELOLA MT, CHIESA ME, ALBERTI AF, MORDOCH J, FINK NE. Galectin-1 receptors in different cell types. **J Biomed Sci.** 2005, 12:13-29.

FAN X, TYERMAN K, ANG A, KOO K, PARAMESWARAN K, TAO K, MAI L, LANG H, WEST LJ. A novel tool for B-cell tolerance research: characterization of mouse alloantibody development using a simple and reliable cellular ELISA technique. **Transplant Proc.** 2005 Jan-Feb;37(1):29-31.

FRANKLIN KBJ; PAXINOS G. **The mouse brain in stereotaxic coordinates.** London: Academic Press, 1997.

FREIJE WA, CASTRO-VARGAS FE, FANG Z, HORVATH S, CLOUGHESY T, LIAU LM, MISHEL PS, NELSON SF. Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival. **Cancer Res.** 2004 Sep 15;64(18):6503-10.

FUKUMORI T, KANAYAMA HO, RAZ A. The role of galectin-3 in cancer drug resistance. **Drug Resist Updat.** 2007 Jun;10(3):101-8.

FUKUMORI T, TAKENAKA Y, OKA N, YOSHII T, HOGAN V, INOHARA H, KANAYAMA HO, KIM HR, RAZ A. Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways. **Cancer Res.** 2004, 64, 3376-3379.

FUKUMORI T, TAKENAKA Y, YOSHII T, KIM HR, HOGAN V, INOHARA H, KAGAWA S, RAZ A. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. **Cancer Res.** 2003 Dec 1;63(23):8302-11.

- FURNARI FB, FENTON T, BACHOO RM, MUKASA A, STOMMEL JM, STEGH A, HAHN WC, LIGON KL, LOUIS DN, BRENNAN C, CHIN L, DEPINHO RA, CAVENEE WK. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Dev.** 2007 Nov 1;21(21):2683-710.
- GALANIS E, BUCKNER JC, DINAPOLI RP, SCHEITHAUER BW, JENKINS RB, WANG CH, O'FALLON JR, FARR G Jr. Clinical outcome of gliosarcoma compared with glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group results. **J Neurosurg.** 1998 Sep;89(3):425-30.
- GHODS AJ, IRVIN D, LIU G, YUAN X, ABDULKADIR IR, TUNICI P, KONDA B, WACHSMANN-HOGIU S, BLACK KL, YU JS. Spheres isolated from 9L gliosarcoma rat cell line possess chemoresistant and aggressive cancer stem-like cells. **Stem Cells.** 2007 Jul;25(7):1645-53.
- GOMES FC, PAULIN D, MOURA NETO V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. **Braz J Med Biol Res.** 1999 May;32(5):619-31.
- GORDOWER L, DECAESTECKER C, KACEM Y, LEMMERS A, GUSMAN J, BURCHERT M, DANGUY A, GABIUS H, SALMON I, KISS R, CAMBY I. Galectin-3 and galectin-3-binding site expression in human adult astrocytic tumours and related angiogenesis. **Neuropathol Appl Neurobiol.** 1999 Aug;25(4):319-30.
- GRANT JW, STEART PV, AGUZZI A, JONES DB, GALLAGHER PJ. Gliosarcoma: an immunohistochemical study. **Acta Neuropathol.** 1989;79(3):305-9.
- GRIPPO MC; PENTEADO PF; CARELLI EF; CRUZ-HOFLING MA; VERINAUD L. Establishment and partial characterization of a continuous human malignant glioma cell line: NG97. **Cell Mol Neurobiol,** 2001. 21:421-428.
- GROBBEN B, DE DEYN PP, SLEGERS H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. **Cell Tissue Res.** 2002 Dec;310(3):257-70.
- HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. **Cell.** 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- HAUDEK KC, SPRONK KJ, VOSS PG, PATTERSON RJ, WANG JL, ARNOYS EJ. Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm. **Biochim. Biophys. Acta.** 2010, 1800, 181-189.
- HAYASHI T, KUSHIDA Y, KADOTA K, KATSUKI N, BANDO K, MIYAI Y, FUNAMOTO Y, HABA R. Cytopathologic features of gliosarcoma with areas of primitive neuroepithelial differentiation of the brain in squash smears. **Diagn Cytopathol.** 2009 Dec;37(12):906-9.
- HE F; SUN YE. Glial cells more than support cells? **The Int J of Biochemistry and Cell Biol,** 2007;39:661-665.

- HENRICKS WH; CHU YC; GOLDBLUM JR; WEISS SW. Dedifferentiated liposarcoma: a clinicopathological analysis of 155 cases with a proposal for an expanded definition of dedifferentiation. **Am J Surg Pathol**, 1997;21:271-81.
- HOLMGREN L, SZELES A, RAJNAVÖLGYI E, FOLKMAN J, KLEIN G, ERNBERG I, FALK KI. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. **Blood**. 1999 Jun 1;93(11):3956-63.
- IKEMORI RY. **Análise de possíveis mecanismos e consequências funcionais da expressão de galectina-3 em células de glioma expostas a condições hipoxicas**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Genética e Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Unicamp. Campinas, SP: [s.n], 2009.
- INGRASSIA L, CAMBY I, LEFRANC F, MATHIEU V, NSHIMYUMUKIZA P, DARRO F, KISS R. Anti-galectin compounds as potential anti-cancer drugs. **Curr Med Chem**. 2006;13(29):3513-27.
- IURISCI I, TINARI N, NATOLI C, ANGELUCCI D, CIANCHETTI E, IACOBELLI S. Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. **Clin Cancer Res**. 2000 Apr;6(4):1389-93.
- IVASKA J, PALLARI HM, NEVO J, ERIKSSON JE. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. **Exp Cell Res**. 2007 Jun 10;313(10):2050-62.
- JACOBSEN BM, HARRELL JC, JEDLICKA P, BORGES VF, VARELLA-GARCIA M, HORWITZ KB. Spontaneous fusion with, and transformation of mouse stroma by, malignant human breast cancer epithelium. **Cancer Res**. 2006 Aug 15;66(16):8274-9.
- JENNINGS MT; PIETENPOL JA. The role of transforming growth factor beta in glioma progression. **J Neurooncol**, 1998;36:123-40.
- JONES C, MACKAY A, GRIGORIADIS A, COSSU A, REIS-FILHO JS, FULFORD L, DEXTER T, DAVIES S, BULMER K, FORD E, PARRY S, BUDRONI M, PALMIERI G, NEVILLE AM, O'HARE MJ, LAKHANI SR. Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. **Cancer Res**. 2004 May 1;64(9):3037-45.
- JONES H, STEART PV, WELLER RO. Spindle-cell glioblastoma or gliosarcoma? **Neuropathol Appl Neurobiol**. 1991 Jun;17(3):177-87.
- KHAN A, JALLO GI, LIU YJ, CARSON BS Sr, Guarnieri M. Infusion rates and drug distribution in brain tumor models in rats. **J Neurosurg**. 2005 Jan;102(1 Suppl):53-8.
- KIM HR, LIN HM, BILIRAN H, RAZ A. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. **Cancer Res**. 1999 Aug 15;59(16):4148-54.

- KLEIHUES P, OHGAKI H. Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. **Toxicol. Pathol.** 2000, 28: 164-170.
- KOBAYASHI N, ALLEN N, CLENDENON NR, KO LW. An improved rat brain-tumor model. **J Neurosurg.** 1980 Dec;53(6):808-15.
- KUBOTA H, NISHIZAKI T, HARADA K, HARADA K, OGA A, ITO H, SUZUKI M, SASAKI K. Identification of recurrent chromosomal rearrangements and the unique relationship between low-level amplification and translocation in glioblastoma. **Genes Chromosomes Cancer.** 2001 Jun;31(2):125-33.
- KUKLINSKI S, PESHEVA P, HEIMANN C, URSCHEL S, GLOOR S, GRAEBER S, HERZOG V, PIETSCH T, WIESTLER OD, PROBSTMEIER R. Expression pattern of galectin-3 in neural tumor cell lines. **J Neurosci Res.** 2000 Apr 1;60(1):45-57.
- KUO Y; EDGAR M; LUTHER N; SCHWARTZ T. Novel low-grade glioneuronal neoplasm presenting in an octogenarian: Case report and review of the literature. **Clinical Neurology and Neurosurgery,** 2006; 108(4):426-432.
- LAHM H, ANDRÉ S, HOEFLICH A, KALTNER H, SIEBERT HC, SORDAT B, VON DER LIETH CW, WOLF E, GABIUS HJ. Tumor galectinology: insights into the complex network of a family of endogenous lectins. **Glycoconj J.** 2004;20(4):227-38.
- LAL S, LACROIX M, TOFILON P, FULLER GN, SAWAYA R, LANG FF. An implantable guide-screw system for brain tumor studies in small animals. **J Neurosurg.** 2000 Feb;92(2):326-33.
- LARIZZA L, SCHIRRMACHER V. Somatic cell fusion as a source of genetic rearrangement leading to metastatic variants. **Cancer Metastasis Rev.** 1984;3(3):193-222.
- LE MARER N, HUGHES RC. Effects of the carbohydrate-binding protein galectin-3 on the invasiveness of human breast carcinoma cells. **J Cell Physiol.** 1996 Jul;168(1):51-8.
- LEE J, KOTLIAROVA S, KOTLIAROV Y, LI A, SU Q, DONIN NM, PASTORINO S, PUROW BW, CHRISTOPHER N, ZHANG W, PARK JK, FINE HA. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. **Cancer Cell.** 2006 May;9(5):391-403.
- LEFRANC F; BROTCHE J; KISS R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: Special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. **J. of Clinical Oncology.** 2005;10:2411-2422.

- LIN HM, PESTELL RG, RAZ A, KIM HR. Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. **Oncogene**. 2002 Nov 14;21(52):8001-10.
- LIU FT, PATTERSON RJ, WANG JL. Intracellular functions of galectins. **Biochim. Biophys. Acta** 2002, 1572, 263-273.
- LIU FT & RABINOVICH G.A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nat. Rev. Cancer** 2005, 5, 29-41.
- LIU L, SAKAI T, SANO N, FUKUI K. Nucling mediates apoptosis by inhibiting expression of galectin-3 through interference with nuclear factor kappaB signalling. **Biochem J**. 2004, 380, 31-41.
- LOUIS DN. Molecular pathology of malignant gliomas. **Annu Rev Pathol**. 2006; 1:97-117.
- LOUIS DN; OHGAKI H; WIESTLER OD; CAVENEE WK. **World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System**. Lyon: IARC Press, 2007.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**. 1951 Nov;193(1):265-75.
- LUTTERBACH J, GUTTENBERGER R, PAGENSTECHER A. Gliosarcoma: a clinical study. **Radiother Oncol**. 2001 Oct;61(1):57-64.
- MA HI; GUO P; LI J; LIN SZ; CHIANG YH; XIAO X; CHENG SH. Supression of intracranial human glioma growth after intra muscular administration of na adeno-associated viral vector expressing angiostatin. **Cancer Research**. 2002; 62:756-763.
- MACHADO CML. **Caracterização morfológica, imunofenotípica, citogenética e de sensibilidade ao quimioterápico cisplatina da linhagem NG97**. Tese de Doutorado, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Unicamp. Campinas, SP: [s.n], 2008.
- MACHADO CM; IKEMORI RY; ZORZETO TQ; NOGUEIRA AC; BARBOSA SD; SAVINO W; SCHENKA AA; VASSALLO J; HEINRICH JK; BOETCHER-LUIZ F; VERINAUD L. Characterization of cells recovered from the xenotransplanted NG97 human-derived glioma cell line subcultured in a long-term in vitro. **BMC Cancer**, 2008; 8:291.
- MACHADO CM, SCHENKA A, VASSALLO J, TAMASHIRO WM, GONÇALVES EM, GENARI SC, VERINAUD L. Morphological characterization of a human glioma cell line. **Cancer Cell Int**. 2005 May 10;5(1):13.
- MACHADO CM, ZORZETO TQ, BIANCO JE, ROSA RG, GENARI SC, JOAZEIRO PP, VERINAUD L. Ultrastructural characterization of the new NG97ht human-derived glioma cell line using two different electron microscopy technical procedures. **Microsc Res Tech**. 2009 Apr;72(4):310-6.

- MATHIEU D, LECOMTE R, TSANACLIS AM, LAROUCHE A, FORTIN D. Standardization and detailed characterization of the syngeneic Fischer/F98 glioma model. **Can J Neurol Sci.** 2007 Aug;34(3):296-306.
- McKEEVER PE, DAVENPORT RD, SHAKUI P. Patterns of antigenic expression of human glioma cells. **Crit Rev Neurobiol**, 1991;6:119-47.
- McKEEVER PE, VARANI J, PAPADOPOULOS SM, WANG M, MCCOY JP. Products of cells from gliomas: IX. Evidence that two fundamentally different mechanisms change extracellular matrix expression by gliomas. **J Neurooncol.** 1995;24(3):267-80.
- MEHLER MF; MARMUR R; GROSS R; MABIE PC; ZANG Z; PAPAVALIIOU A; KESSLER JA. Cytokines regulate the cellular phenotype of developing neural lineage species. **Int J Dev Neurosci**, 1995;13:213-240.
- MEHRIAN SHAI R, REICHARDT JK, YA-HSUAN H, KREMEN TJ, LIAU LM, CLOUGHESY TF, MISCHEL PS, NELSON SF. Robustness of gene expression profiling in glioma specimen samplings and derived cell lines. **Brain Res Mol Brain Res.** 2005 May 20;136(1-2):99-103.
- MEIS JM, HO KL, NELSON JS. Gliosarcoma: a histologic and immunohistochemical reaffirmation. **Mod Pathol.** 1990 Jan;3(1):19-24.
- MEIS JM, MARTZ KL, NELSON JS. Mixed glioblastoma multiforme and sarcoma. A clinicopathologic study of 26 radiation therapy oncology group cases. **Cancer.** 1991 May 1;67(9):2342-9.
- MICHAJLOWSKY C; NIURA FK; do VALLE AC; SONOHARA S; MENEGUIN TD; TSANACLIS AM. Experimental tumors of the central nervous system: standardization of a model in rats using the 9L glioma cells. **Arquivos de Neuropsiquiatria.** 2003; 61(2A):234-240.
- MILLER CR, PERRY A. Glioblastoma: morphologic and molecular genetic diversity. **Arch Pathol Lab Med.** 2007 Mar;131(3):397-406.
- MILLS CD; KINCAID K; ALT JM; HEILMAN MJ; HILL AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **J Immunol**, 2000; 164(12):6166-73.
- MIURA FK, ALVES MJ, ROCHA MC, DA SILVA R, OBA-SHINJO SM, MARIE SK. Xenograft transplantation of human malignant astrocytoma cells into immunodeficient rats: an experimental model of glioblastoma. **Clinics (Sao Paulo).** 2010 Mar;65(3):305-9.
- NANGIA-MAKKER P, HONJO Y, SARVIS R, AKAHANI S, HOGAN V, PIENTA KJ, RAZ A. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. **Am J Pathol.** 2000 Mar;156(3):899-909.

- NEDER L; MARIE SK; CARLOTTI CG JR; GABBAI AA; ROSEMBERG S; MALHEIROS SM; SIQUEIRA RP; OBA-SHINJO SM; UNO M; AGUIAR PH; MIURA F; CHAMMAS R; COLLI BO; SILVA WA JR; ZAGO MA. Galectin-3 as an immunohistochemical tool to distinguish pilocytic astrocytomas from diffuse astrocytomas, and glioblastomas from anaplastic oligodendrogliomas. **Brain Pathol**, 2004;14(4):399-405.
- NOZAKI M, TADA M, KOBAYASHI H, ZHANG CL, SAWAMURA Y, ABE H, ISHII N, VAN MEIR EG. Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression. **Neuro Oncol**. 1999 Apr;1(2):124-37.
- OCHIENG J, FRIDMAN R, NANGIA-MAKKER P, KLEINER DE, LIOTTA LA, STETLER-STEVENSON WG, RAZ A. Galectin-3 is a novel substrate for human matrix metalloproteinases-2 and -9. **Biochem** 1994, 33:14109–14114.
- OCHIENG J, LEITE-BROWNING ML, WARFIELD P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. **Biochem Biophys Res Commun** 1998, 246:788–791.
- OCHIENG J, FURTAK V, LUKYANOV P. Extracellular functions of galectin-3. **Glycoconj. J**. 2004, 19, 527-53.
- ORIMO A, GUPTA PB, SGROI DC, ARENZANA-SEISDEDOS F, DELAUNAY T, NAEEM R, CAREY VJ, RICHARDSON AL, WEINBERG RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. **Cell**. 2005 May 6;121(3):335-48.
- OZEKI Y, MATSUI T, YAMAMOTO Y, FUNAHASHI M, HAMAKO J, TITANI K. Tissue fibronectin is an endogenous ligand for galectin-1. **Glycobiology** 1995, 5: 255-261.
- PARON I, SCALONI A, PINES A, BACHI A, LIU FT, PUPPIN C, PANDOLFI M, LEDDA L, DI LORETO C, DAMANTE G, TELL G. Nuclear localization of Galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation. **Biochem Biophys Res Commun**. 2003 Mar 14;302(3):545-53.
- PERILLO NL, MARCUS ME, BAUM LG: Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. **J Mol Med** 1998, 76: 402-412.
- PERRY JR, ANG LC, BILBAO JM, MULLER PJ. Clinicopathologic features of primary and postirradiation cerebral gliosarcoma. **Cancer**. 1995 Jun 15;75(12):2910-8.
- POTTER NE, PHIPPS K, HARKNESS W, HAYWARD R, THOMPSON D, JACQUES TS, HARDING B, THOMAS DG, REES J, DARLING JL, WARR TJ. Astrocytoma derived short-term cell cultures retain molecular signatures characteristic of the tumour in situ. **Exp Cell Res**. 2009 Oct 1;315(16):2835-46.

- POWELL AE, ANDERSON EC, DAVIES PS, SILK AD, PELZ C, IMPEY S, WONG MH. Fusion between intestinal epithelial cells and macrophages in a cancer context results in nuclear reprogramming. **Cancer Res.** 2011 Feb 15;71(4):1497-505.
- PUT-TI-NOI S, PETMITR S, CHANYAVANICH V, SANGRUJI T, THEERAPUNCHAROEN V, HAYASHI K, THANGNIPON W. Chromosome 10 and 17 deletions and p53 gene mutations in Thai patients with astrocytomas. **Oncol Rep.** 2004 Jan;11(1):207-11.
- RACHKOVSKY M, SODI S, CHAKRABORTY A, AVISSAR Y, BOLOGNIA J, MCNIFF JM, PLATT J, BERMUDEZ D, PAWELEK J. Melanoma x macrophage hybrids with enhanced metastatic potential. **Clin Exp Metastasis.** 1998 May;16(4):299-312.
- REIFENBERGER G, COLLINS VP. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. **J Mol Med.** 2004 Oct;82(10):656-70.
- REIS RM, KÖNÜ-LEBLEBLICIOGLU D, LOPES JM, KLEIHUES P, OHGAKI H. Genetic profile of gliosarcomas. **Am J Pathol.** 2000 Feb;156(2):425-32.
- RICCI-VITIANI L, PALLINI R, LAROCCA LM, LOMBARDI DG, SIGNORE M, PIERCONTI F, PETRUCCI G, MONTANO N, MAIRA G, DE MARIA R. Mesenchymal differentiation of glioblastoma stem cells. **Cell Death Differ.** 2008 Sep;15(9):1491-8.
- RICH JN; REARDON DA; PEERY T; DOWELL JM; QUINN JA; PENNE KL; et al. Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, 2004; 22(13):2755-6.
- RONG Y, BELOZEROV VE, TUCKER-BURDEN C, CHEN G, DURDEN DL, OLSON JJ, VAN MEIR EG, MACKMAN N, BRAT DJ. Epidermal growth factor receptor and PTEN modulate tissue factor expression in glioblastoma through JunD/activator protein-1 transcriptional activity. **Cancer Res.** 2009 Mar 15;69(6):2540-9.
- RUTKA JT, GIBLIN JR, HØIFØDT HK, DOUGHERTY DV, BELL CW, MCCULLOCH JR, DAVIS RL, WILSON CB, ROSENBLUM ML. Establishment and characterization of a cell line from a human gliosarcoma. **Cancer Res.** 1986 Nov;46(11):5893-902.
- SAINI M, BELLINZONA M, MEYER F, CALI G, SAMII M. Morphometrical characterization of two glioma models in the brain of immunocompetent and immunodeficient rats. **J Neurooncol.** 1999 Mar;42(1):59-67.
- SAINI M, ROSER F, SAMII M, BELLINZONA M. A model for intratumoural chemotherapy in the rat brain. **Acta Neurochir (Wien).** 2004 Jul;146(7):731-4.
- SÁNCHEZ-FUEYO A, STROM TB. Immunologic basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs. **Gastroenterology.** 2011 Jan;140(1):51-64.

SARKAR C, RALTE AM, SHARMA MC, MEHTA VS. Recurrent astrocytic tumours - a study of p53 immunoreactivity and malignant progression. **Br J Neurosurg**. 2002 Aug;16(4):335-42.

SATELLI A, RAO PS, GUPTA PK, LOCKMAN PR, SRIVENUGOPAL KS, RAO US. Varied expression and localization of multiple galectins in different cancer cell lines. **Oncol Rep**. 2008 Mar;19(3):587-94.

SATHORNSUMETEE S, RICH JN. Designer therapies for glioblastoma multiforme. **Ann N Y Acad Sci**. 2008 Oct;1142:108-32.

SAUTÈS-FRIDMAN C, CHERFILS-VICINI J, DAMOTTE D, FISSON S, FRIDMAN WH, CREMER I, DIEU-NOSJEAN MC. Tumor microenvironment is multifaceted. **Cancer Metastasis Rev**. 2011 Mar;30(1):13-25.

SCHENKA AA; MACHADO CML; GRIPPO MC; QUEIROZ LS; SCHENKA NGM; CHAGAS CA; VERINAUD L; BROUSSET P; VASSALO J. Immunophenotypic and ultrastructural validation of a new human glioblastoma cell line. **Cell Mol Neurobiol**, 2005 Aug; 25(5):929-941.

SCHEPKIN VD, LEE KC, KUSZPIT K, MUTHUSWAMI M, JOHNSON TD, CHENEVERT TL, REHEMTULLA A, ROSS BD. Proton and sodium MRI assessment of emerging tumor chemotherapeutic resistance. **NMR Biomed**. 2006 Dec;19(8):1035-42.

SCHMIDEK HH, NIELSEN SL, SCHILLER AL, MESSER J. Morphological studies of rat brain tumors induced by N-nitrosomethylurea. **J Neurosurg**. 1971 Mar;34(3):335-40.

SCHOR SL, SCHOR AM. Phenotypic and genetic alterations in mammary stroma: implications for tumour progression. **Breast Cancer Res**. 2001;3(6):373-9.

SHALOM-FEUERSTEIN R, COOKS T, RAZ A, KLOOG Y. Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells. **Cancer Res**. 2005 Aug 15;65(16):7292-300.

SREENAN JJ, PRAYSON RA. Gliosarcoma. A study of 13 tumors, including p53 and CD34 immunohistochemistry. **Arch Pathol Lab Med**. 1997 Feb;121(2):129-33.

STROEBE H. Über Entstehung und Bau der Hirngliome. **Beitr Pathol Anat**. 1895;18:405-486.

STUPP R, MASON WP, VAN DEN BENT MJ, WELLER M, FISHER B, TAPHOORN MJ, BELANGER K, BRANDES AA, MAROSI C, BOGDahn U, CURSCHMANN J, JANZER RC, LUDWIN SK, GORLIA T, ALLGEIER A, LACOMBE D, CAIRNCROSS JG, EISENHauer E, MIRIMANOFF RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med**. 2005 Mar 10;352(10):987-96.

- SUNDBLAD V, CROCI DO, RABINOVICH GA. Regulated expression of galectin-3, a multifunctional glycan-binding protein, in haematopoietic and non-haematopoietic tissues. **Histol Histopathol.** 2011 Feb;26(2):247-65.
- SZENTIRMAI OMD; BAKER CH; LIN NBS; SZUCS, SMD; TAKAHASHI M; et al. Noninvasive Bioluminescence Imaging of Luciferase Expressing Intracranial U87 Xenografts: Correlation with Magnetic Resonance Imaging Determined Tumor Volume and Longitudinal Use in Assessing Tumor Growth and Antiangiogenic Treatment Effect. **Neurosurgery.** 2006; 58(2):365-372.
- TAKENAKA Y, FUKUMORI T, RAZ A. Galectin-3 and metastasis. **Glycoconj. J.** 2004, 19, 543-549.
- TSO CL, SHINTAKU P, CHEN J, LIU Q, LIU J, CHEN Z, YOSHIMOTO K, MISCHEL PS, CLOUGHESY TF, LIAU LM, NELSON SF. Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties. **Mol Cancer Res.** 2006 Sep;4(9):607-19.
- van den BRULE F, CALIFICE S, CASTRONOVO V. Expression of galectins in cancer: a critical review. **Glycoconj. J.** 2004, 19, 537-542.
- VINCE GH; BENDSZUS M; SCHWEITZER T; GOLDBRUNNER RH; et al. Spontaneous regression of experimental gliomas-an immunohistochemical and MRI study of the C6 glioma spheroid implantation model. **Exp Neurology.** 2004; 190:478-485.
- VOGELHUBER W; SPRUB T; BERNHARDT G; BUSCHAUER A; GOPFERICH A. Efficacy of BCNU and paclitaxel loaded subcutaneous implants in the interstitial chemotherapy of U-87MG human glioblastoma xenografts. **International Journal of Pharmaceutics,** 2002; 238:111-121.
- VON DEIMLING, A; LOUIS, D.N; WIESTLER, O.D. Molecular pathways in the formation of gliomas. **Glia,** 1995;15:328-38.
- WALKER RA. The complexities of breast cancer desmoplasia. **Breast Cancer Res.** 2001;3(3):143-5.
- WANG J, WANG X, JIANG S, LIN P, ZHANG J, WU Y, XIONG Z, REN JJ, YANG H. Establishment of a new human glioblastoma multiforme cell line (WJ1) and its partial characterization. **Cell Mol Neurobiol.** 2007 Nov;27(7):831-43.
- WATANABE K, SATO K, BIERNAT W, TACHIBANA O, VON AMMON K, OGATA N, YONEKAWA Y, KLEIHUES P, OHGAKI H. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. **Clin Cancer Res.** 1997 Apr;3(4):523-30.
- WEINER NE, PYLES RB, CHALK CL, BALKO MG, MILLER MA, DYER CA, WARNICK RE, PARYSEK LM. A syngeneic mouse glioma model for study of glioblastoma therapy. **J Neuropathol Exp Neurol.** 1999 Jan;58(1):54-60.

- WESTPHAL M; HANSEL M; NAUSCH H; ROHDE E; KOPPEN J; FIOLA M; HOLZEL F; HERRMANN HD. Glioma biology in vitro: goals and concepts. **Acta Neurochir Suppl.** 1988; 43:107-13.
- WIKSTRAND CJ, BIGNER DD. Immunobiologic aspects of the brain and human gliomas. A review. **Am J Pathol.** 1980 Feb;98(2):517-68.
- WILHELMSSON U, ELIASSON C, BJERKVIG R, PEKNY M. Loss of GFAP expression in high-grade astrocytomas does not contribute to tumor development or progression. **Oncogene.** 2003 May 29;22(22):3407-11.
- WILTSHIRE RN, RASHEED BK, FRIEDMAN HS, FRIEDMAN AH, BIGNER SH. Comparative genetic patterns of glioblastoma multiforme: potential diagnostic tool for tumor classification. **Neuro Oncol.** 2000 Jul;2(3):164-73.
- WOLFF JE, MÖLENKAMP G, HOTFILDER M, LATERRA J. Dexamethasone inhibits glioma-induced formation of capillary like structures in vitro and angiogenesis in vivo. **Klin Padiatr.** 1997 Jul-Aug;209(4):275-7.
- YANG H, CHOPP M, ZHANG X, JIANG F, ZHANG Z, KALKANIS S, SCHALLERT T. Using behavioral measurement to assess tumor progression and functional outcome after antiangiogenic treatment in mouse glioma models. **Behav Brain Res.** 2007 Aug 22;182(1):42-50.
- YANG HY, LIESKA N, SHAO D, KRIHO V, PAPPAS GD. Proteins of the intermediate filament cytoskeleton as markers for astrocytes and human astrocytomas. **Mol Chem Neuropathol.** 1994 Feb-Apr;21(2-3):155-76.
- YANG RY, HSU DK, LIU FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1996, 93, 6737-6742.
- YANG RY, RABINOVICH GA, LIU FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert Rev. Mol. Med.** 2008, 10:e17.
- YUAN H, SCHROEDER T, BOWSHER JE, HEDLUND LW, WONG T, DEWHIRST MW. Intertumoral differences in hypoxia selectivity of the PET imaging agent <sup>64</sup>Cu(II)-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone). **J Nucl Med.** 2006 Jun;47(6):989-98.

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada "Estabelecimento e caracterização de um modelo experimental de glioma empregando enxerto ortotópico de células híbridas da linhagem glial maligna NG97ht":

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

( ) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. \_\_\_\_\_, Instituição:

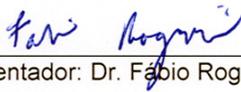
( x ) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 1792-1, Instituição: Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

( ) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. \_\_\_\_\_, Instituição:

*\* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



Aluno: Karina Mie Furuzawa



Orientador: Dr. Fábio Rogério

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura



Prof.ª. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura