



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Camila Maria Longo Machado

“CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, IMUNOFENOTÍPICA, CITOGENÉTICA E DE SENSIBILIDADE AO QUIMIOTERÁPICO CISPLATINA DA LINHAGEM NG97”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Liana", written over a horizontal line.

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Liana Cardoso Verinaud

**Campinas
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M180c Machado, Camila Maria Longo
Caracterização morfológica, imunofenotípica,
citogenética e de sensibilidade ao quimioterápico cisplatina
de linhagem NG97 / Camila Maria Longo Machado. –
Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadora: Liana Maria Cardoso Verinaud.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

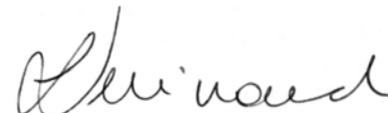
1. Cultivo celular. 2. NG97. 3. Glioblastoma. 4.
Instabilidade cromossômica. 5. Câncer. I. Verinaud,
Liana Maria Cardoso, 1959-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Campinas, 28 de novembro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

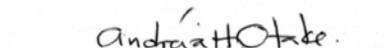
Profª. Dra. Liana Cardoso Verinaud (Orientadora)


Assinatura

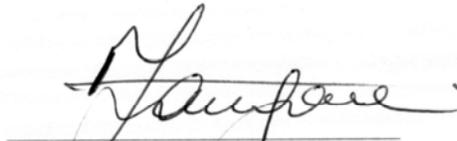
Prof. Dr. Roger Chammas

Assinatura

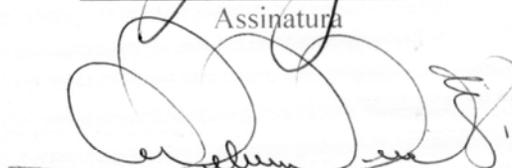
Profª. Dra. Andréia Hanada Otake


Assinatura

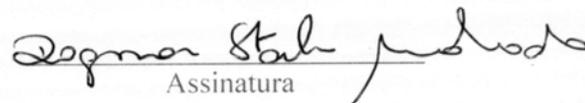
Prof. Dr. Francesco Langone


Assinatura

Profª. Dra. Selma Candelária Genari


Assinatura

Profª. Dra. Dagmar Ruth Stach Machado


Assinatura

Profª. Dra. Estela Maria Gonçalves

Assinatura

Profª. Dra. Luciana Nogueira de Sousa Andrade

Assinatura

*Somente com perseverança e
determinação seremos capazes de
atingir nossos objetivos.*

DEDICATÓRIA

Dedico à minha querida avó Mabel Lengo Hataka que me auxiliou com suas energias positivas mesmo não estando mais presente entre nós.

O presente trabalho foi desenvolvido principalmente no Laboratório de Imunopatologias do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil porém com a colaboração e parcerias científicas do Laboratório de Pesquisa e Patologia Molecular (CIPED) da Faculdade de Medicina (FCM) – UNICAMP; Laboratório de Pesquisas Sobre o Timo – Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-RJ; Laboratório Clínico e Especializado do Centro de Atendimento Especializado a Saúde da Mulher, CAISM - UNICAMP; Departamento de Tocoginecologia da FCM – UNICAMP; Departamento de Radiologia – Disciplina de Oncologia – FM-USP-SP e com o Departamento de Medicina e Patologia, Divisão de Endocrinologia e Oncologia, Universidade do Colorado, Denver - USA

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que participaram diretamente ou indiretamente para que o trabalho de tese fosse realizado e ganhasse qualidade científica ou estética. Muito Obrigada!

Aos meus pais, irmãos e parentes queridos. Muito obrigada por toda a força nos momentos em que mais precisei.

À minha orientadora Profa. Dra. Liana Verinaud pela orientação e por ter contribuído imensamente para o meu crescimento profissional. Também agradeço por ter sempre compreendido todas as intempéries com paciência e muita sabedoria. Muito obrigada também pelos inúmeros conselhos, sempre em hora correta. Além disso, foram muito importantes os ensinamentos de docência, pois somente com você aprendi a dar aulas.

Aos Professores do Departamento de Imunologia da Universidade Estadual de Campinas que sempre proporcionaram um ambiente propício ao trabalho.

Aos funcionários e alunos do Departamento de Imunologia por dividirem o espaço, as questões, muitas vezes reagentes e almoços descontraídos.

Às minhas amigas de laboratório, Jacy Gameiro e Patrícia A. Nagib por apoiarem-me e auxiliarem-me em diversas questões, à vocês duas um grande e especial obrigada.

À Profa. Dra. Fátima Bötcher-Luiz por me ensinar muito mais do que citogenética, mas sobre a vida e questões científicas diversas.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas pelas discussões científicas elucidativas e cheias de questões que nunca terminam.

À pesquisadora e coordenadora do Laboratório Clínico Especializado, Dra. Juliana Heinrich pelos auxílios em citogenética e principalmente pelo contato com a Profa. Dra. Marileila Varella-García. Aliás especialmente a Senhora Marileila, meu MUITÍSSIMO Obrigada.

Aos meus “inimigos” que muito fizeram para que eu crescesse e enxergasse a vida de outra maneira, mas principalmente aos meus amigos que concentraram sua energia positiva para auxiliar-me a superar a cada obstáculo encontrado. Citarei alguns muito importantes: Analia Cherñavisky & Gabriel Rezende, Thais Cavallari & Família Cavallari, Ilma Guiderolli & Antonio Machado, Fabiana Biachini & André García, Arthur & Gisele Keppler, Vera Chercciaro & Seu Antônio, Marcos César Meneguetti, Meliane Koike e o pessoal da BSGI-SP, Andréia H. Otake, Rafael Y. Ikemori, Tatiane Q. Zorzeto, Mara Verônica & Prog´nest, Julio Oliveira e HÉLVIA Nascimento, dentre alguns outros.

Ao meu namorado e querido companheiro Marco Roberto Cavallari (além de minha admiração dedico também meu trabalho a você).

À Minha tia Wanda e tio Daguzan Longo Cardoso Dias que me proporcionaram maravilhosamente a estada em 2006 em sua casa. Sem vocês dois minhas pesquisas nunca teriam continuado com sucesso. MUITÍSSIMO obrigada, nunca conseguirei agradecê-los devidamente.

À minha estimada e queridíssima Avó Mabel Longo Hataka que faleceu no meio do curso de minhas pesquisas, porém continuou a guiar-me carinhosamente com seu espírito de luta e capacidade. Muito Obrigada, vovó.

RESUMO

MACHADO,C.M.L. “Caracterização morfológica, imunofenotípica, citogenética e de sensibilidade do quimioterápico da linhagem NG97”, **Tese de Doutorado, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP**

Gliomas malignos são tumores de Sistema Nervoso Central extremamente freqüentes, correspondendo a 46% dos casos diagnosticados de Neoplasias Cerebrais. Segundo a Organização Mundial de saúde o glioblastoma multiforme representa aproximadamente 3,9% dos óbitos a cada 100.000 habitantes nos Estados Unidos da América e Europa. Este tipo tumoral é extremamente agressivo e os pacientes acometidos apresentam média de vida de apenas um a dois anos após ressecção cirúrgica. Os tratamentos posteriores à retirada da massa tumoral são a quimioterapia e radioterapia. Assim, há um grande interesse na busca por novas estratégias terapêuticas que se mostrem eficazes no tratamento de pacientes acometidos por glioblastomas. Neste sentido, a utilização de linhagens celulares, estabelecidas à partir de tumores brutos extraídos de pacientes, tem-se mostrado uma ferramenta útil tanto ao avanço nos conhecimentos biológicos sobre tumores primários; quanto ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Foi estabelecida em nosso laboratório uma nova linhagem derivada de glioma humano, denominada NG97. Estudos preliminares confirmaram a origem astrocitária das células e a preservação de malignização, demonstrada pelo desenvolvimento de massa tumoral a partir do xenotransplante de células cultivadas *in vitro* em camundongos atímicos.

O presente trabalho teve como objetivo ampliar os conhecimentos biológicos acerca desta linhagem tumoral. Assim foram atribuídas as células da linhagem ultraestruturas típicas de células indiferenciadas e tumores astrocíticos. Também, elucidaram-se

características morfológicas atribuídas a linhagens tumorais astrocíticas como a expressão de proteínas GFAP, vimentina, integrina $\alpha 5\beta 1$, fibronectina, laminina e CD44. Combinada a expressão destas moléculas responsáveis pela adesão célula ao substrato, foi demonstrado que as células uma vez desprovidas do contato adesivo desenvolvem uma estrutura tridimensional organotípica. Quanto a expressão de moléculas envolvidas no processo de resposta imune das células *in vivo*, não foram detectadas nas células NG97: HLA I,HLAII, B7 (CD80), TGF- β e Fas (CD95). Em cultura, as células NG97 apresentam variadas aberrações numéricas com cariótipo hiperplóide e inúmeros cromossomos aneuploides classificados como um de lote cromossomos murinos associados. Este último, pode ser representado por um lote próximo ao triploide murino (*neartriploid*, i.e.; 30 cromossomos murinos mais ou menos 11 cromossomos murinos). Finalmente demonstrou-se a sensibilidade das células NG97 ao quimioterápico Cisplatina tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Portanto a caracterização da linhagem NG97 aqui realizada fundamenta a sua utilização como modelo biológico aos mais diversos estudos.

ABSTRACT

MACHADO,C.M.L. “Morphological, Immunophenotypical, Cytogenetical characterization and sensibility to cisplatin of the cell line NG97”, 2008, **Thesis (PhD in Genetics and Molecular Biology (Immunology area), Department Microbiology and Immunology, Institute of Biology, State University of Campinas - UNICAMP**

Astrocytomas are extremely aggressive malignancies of the Central Nervous System (CNS) and account for 46% of all primary malignant brain tumors. The perspective for patients with malignant gliomas is poor and the average survival expectancy is less than a year. Progression to a worsened prognosis occurs in 85% of the cases due to changes in cell tumor microenvironment and through biological pathways that are still unclear. These neoplasias grow rapidly and contain high cellularity with marked hyperchromatism and pleomorphism. The histopathological identity of glioblastoma is the prominent vascularity as well as the area of necrosis surrounded by neoplastic pseudopalisading cells, as a result of microenvironment hypoxic conditions. In order to clarify those issues, cultured cell lines are valuable tools to be employed on tumor related assays as long as they are established and well characterized.

Our laboratory set up the NG97 cell line derived from a human astrocytoma grade III, which was injected in the athymic nude mice flank and turned to develop and express phenotypic characteristics of an astrocytoma grade IV. This study aimed to expand the biological knowledge about this tumor cell line. In this way, clarified morphological, immunophenotypic, and cytogenetic characteristics as well as confirmed sensitivity to cisplatin chemotherapeutic agent in cells NG97.

These features attributed to NG97 cell line are unique qualities that make them an important model for the study of biology and therapeutic strategies in astrocytomas.

I. ÍNDICE	
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Um breve histórico e definição de linhagens celulares contínuas.....	1
1.2 Linhagens celulares de longa duração derivadas de tumores astrocíticos.....	3
1.3 Estabelecimento e caracterização parcial da linhagem NG97.....	9
1.4 Caracterização de linhagens contínuas derivadas de tumores astrocíticos...11	
1.4.1 O arranjo ultraestrutural de células <i>in vitro</i>	12
1.4.2 A citomorfologia e a diminuição da adesão e de dependência da ancoragem celular ao substrato.....	13
1.4.3 Moléculas de interação com o sistema imune.....	17
1.4.4 As anormalidades citogenéticas.....	19
1.4.5 A sensibilidade a drogas.....	20
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Manutenção de linhagens celulares.....	23
3.1.1.Células derivadas do glioma humano NG97	23
3.1.2. Células humanas intra-epiteliais tímicas pós-natal (TPHN).....	23
3.1.3. Cultivo de células NG97 em meio ágar semi-sólido.....	24
3.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	25
3.3. Investigação imunocitoquímica.....	25
3.3.1.Imunofluorescência para fibronectina e laminina.....	25
3.3.2. Imunodeteção de GFAP,vimentina,HLA I e II, B7, TGFβ, CD95 e CD44.....	26
3.4. Citometria de fluxo.....	27

3.5. Técnicas de citogenética.....	28
3.5.1. Preparo das lâminas.....	28
3.5.2. Coloração de Banda G.....	29
3.5.3. Coloração de Banda C.....	29
3.5.4. Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	29
3.5.5. Análise e Captura de imagens.....	30
3.6. Ensaio de sensibilidade à cisplatina.....	30
3.6.1. Ensaio <i>in vitro</i>	30
3.6.2. Ensaio <i>in vivo</i> em transplante heterotópico das células NG97 em camundongos CB17SCID/SCID.....	30
3.6.3. Procedimento experimental de tratamento.....	32
3.6.3.1. Análises histológicas.....	32
3.7. Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1. O arranjo ultraestrutural das células NG97 <i>in vitro</i>	33
4.2. A citomorfologia e a diminuição da dependência de ancoragem das células ao substrato.....	41
4.2.1. Expressão de filamentos intermediários: GFAP, Vimentina e Neurofilamento.....	41
4.2.2. A Expressão de fibronectina e laminina e respectivos receptores de adesão.....	47
4.2.3. Desenvolvimento e formação da estrutura organotípica.....	51
4.3. Ausência de moléculas de interação com o sistema imune.....	55

4.4. As anormalidades citogenéticas.....	56
4.4.1. Análise do gene Her-2/neu.....	61
4.5. A sensibilidade a drogas	65
4.5.1. Tratamento das células NG97 com cisplatina <i>in vitro</i>	64
4.5.2. Análise <i>in vivo</i>	64
4.5.2.1. Avaliação histopatológica dos tecidos tumorais, fígado e rim dos grupos de animais tratado e controle.....	68
5. DISCUSSÃO.....	77
5.1. As células NG97 possuem ultraestruturas típicas de células indiferenciadas e tumores astrocíticos.....	77
5.2. As células NG97 possuem características morfológicas atribuídas a linhagens tumorais astrocíticas pois expressam proteínas GFAP e vimentina, integrina $\alpha 5\beta 1$, fibronectina, Laminina, CD44 com perda de aderência ao substrato.....	79
5.3. As células NG97 não expressam moléculas relacionadas às possíveis interações das células com o sistema imune no microambiente tumoral como: HLA I,HLAII, B7 (CD80), TGF- β e Fas (CD95).....	84
5.4. Em cultura, as células NG97 apresentam variadas aberrações numéricas com cariótipo hiperplóide e presença de um componente murino associado.....	86
5.5. As células NG97 são sensíveis à Cisplatina.....	88
6. CONCLUSÕES	91
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
8. ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS

AA = Astrocitoma Anaplásico

AOLIDG = Astro-oligodendroglioma

ATCC = *American Type Culture Collection*

DSMZ = *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*

ECACC = *European Collection of Cell Cultures*

EGFR = receptores do fator de crescimento epidermal

F = Fêmea/Feminino

GFAP = proteína glial fibrilar ácida

G = Glioma

GB = glioblastoma

GBM = Glioblastoma Multiforme

HLA = *Human Leucocyte Antigen* – termo equivalente a complexo principal de histocompatibilidade ou MHC

Hs = *Homo sapiens*

INF γ = Interferon Gama

leu-2 = Antígeno de diferenciação celular de leucócitos T

M = Macho/Masculino

MGI = Glioma indiferenciado quimicamente induzido

Mm = *Mus Musculus*

ND = Não declarado/Não divulgado

NF = neurofilamento

NSE = *Neuron-enolase specific*

NT = Não tumorigênico

OMS = Organização Mundial de Saúde

QRS = Quimioresistente

Rs = *Rattus norvegicus*

Smad = Família de proteínas que podem funcionar com fatores de transcrição no núcleo que participam como moduladores de sinalização e ativação por TGF- β

SNC = Sistema Nervoso Central

SBF = Soro Fetal Bovino

S-100 = Filamento intermediário S100, Proteína ácida S100

SPF = *Specific Pathogen Free*

T = tumorigênico

TGF- β = fator de crescimento e transformação beta

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Um breve histórico e definição de linhagens celulares contínuas

Em meados de 1904, os neurocientistas deparavam-se com uma intrigante questão sobre como as células do Sistema Nervoso Central eram capazes de desenvolver-se com a habilidade de crescer e estender-se por longas distâncias. Assim, também envolvido em responder esta questão e financiado pelo Grupo Rockefeller, o biologista Americano Ross Harrison, em 1907, resolveu tal problema através de um experimento simples. Explantes de medula espinal de um embrião de sapo eram retirados e colocados em uma gota de soro do mesmo animal sobre uma lamínula de vidro, que vedada permitia a observação ao microscópio de extensas fibras nervosas após algumas horas (Fell, 1972). Tal experimento não só respondeu a pergunta, mas convenceu muitos cientistas como Alex Carrel, Nobel de Fisiologia e Medicina em 1912, ao estudo dos efeitos do ambiente no crescimento de tecidos e populações celulares isoladas; *in vitro* (Carrel, 1931). O Procedimento descrito por Harrison inaugurava então, um amplo campo de pesquisas futuras, o cultivo de células.

Em 1910 surgiam as primeiras discussões sobre este novo campo de técnica experimental que despontaria na ciência como ferramenta e com a finalidade de resolver questões de ordem biológica ou médica (Witkowski, 1983). As culturas celulares foram divididas em culturas celulares primárias e de linhagem estabelecidas, ou linhagens celulares de longa duração.

As culturas primárias são originadas a partir de um órgão complexo em estágio embrionário ou a partir de um fragmento tecidual, isto é, uma mistura definida e purificada de células isoladas de um organismo. Quando originárias de células normais podem apresentar o bloqueio de características do tecido original, com perda de adesão ao substrato,

retardo ou ausência de crescimento, sofrimento de senescência e assim não sobreviver *in vitro* (Freshney, 1994).

Entretanto, após o longo subcultivo das células da cultura primária, pode ocorrer a seleção de células que possuam a característica de crescer infinitamente, e estas são denominadas de linhagens celulares de longa duração ou contínuas. O processo biológico que leva a seleção de um fenótipo que se multiplica infinitamente não é bem conhecido, porém é postulado que eventos de mutação e deleções de um ou mais genes podem ser responsáveis pelos eventos de imortalização celular. Em adição, é possível desenvolver tais linhagens a partir de vetores bacterianos, virais, em um processo definido como transformação celular. Posteriormente acrescentou-se a esta definição o processo de linhagens derivadas a partir de tumores sólidos desvincilhando o termo da necessidade de inserção de vetores.

Portanto, com o processo de transformação celular, têm-se como resultado a aparição de uma linhagem celular contínua e é geralmente marcado por mudanças na citomorfologia (diminuição do tamanho das células, morfologia mais arredondada, alta relação núcleo/citoplasma), no aumento da taxa de crescimento (diminuição de tempo de duplicação da população, de 36-48 para 12-24h), na redução de dependência ao suplemento de Soro Fetal, aumento de eficiência de clonagem, diminuição de aderência celular ao substrato, redução de ancoragem dependente (aumento de habilidade das células crescerem em suspensão ou em meio ágar), um aumento de heteroploidia (variação cromossomal entre células) e aneuploidia (divergência numérica do cariótipo doador euplóide) e aumento na tumorigenicidade. Embora existam muitas semelhanças entre as linhagens celulares de longa duração originária da transformação espontânea e de transformações malignizantes, ambas apresentam características distintas que as valorizam independentemente da utilização de um

ou outro modelo. As linhagens estabelecidas a partir de tumores podem ser utilizadas como ferramentas de estudo *in vitro*, uma vez que mantêm características dos tumores das quais foram originadas (Freshney , 1994).

Portanto, é importante a realização de pesquisas de tal maneira a assegurar que em estudos que utilizam linhagens celulares como modelos biológicos, os resultados obtidos com as aplicações das células em experimentação sejam provenientes do ensaio e não uma mera aparição de mudanças ocorridas durante o processo de transformação e adequação celular da linhagem contínua durante o subcultivo. Dentre algumas aplicações para o cultivo celular podemos listar: os estudos de diferenciação e morfologia de células em tecidos, bacteriologia, virologia, radiobiologia, toxicologia, bioquímica, genética molecular e câncer.

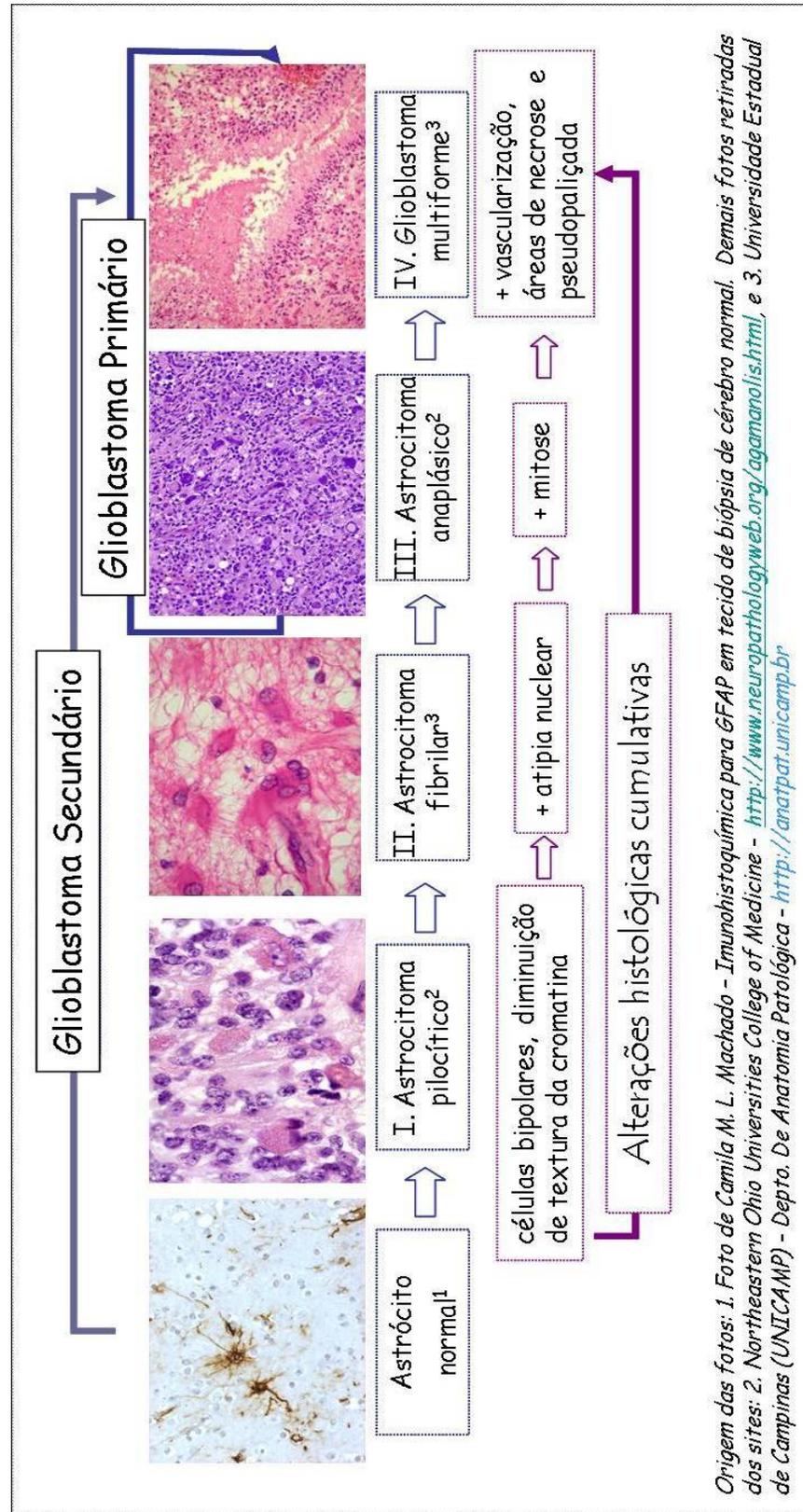
1.2 Linhagens celulares de longa duração derivadas de tumores astrocíticos

Embora os neurocientistas tenham tentado o estabelecimento de linhagens celulares contínuas a partir de biópsias ou tecidos nervosos humanos normais *pós-mortem*, as linhagens de longa duração estabelecidas e de maior utilização são as derivadas de tumores de origem neuroglial do tipo astrocitomas. Ponten e Macintyre (1968) e Manuelidis, (1965,1969) provaram de forma pioneira que células provenientes do processamento de massas tumorais do tipo Glioblastoma Multiforme (GBM) poderiam crescer como culturas permanentes. Estes autores foram responsáveis pelo estabelecimento da primeira linhagem celular contínua humana derivada de glioblastoma (GB), denominada de U-87MG. Este tumor é a manifestação de maior agressividade e mais alto grau dentre os astrocitomas.

Os astrocitomas representam metade das neoplasias de Sistema Nervoso Central (SNC) com altíssima taxa de óbitos e baixa média de vida (Kleihues,et al 1992). A designação do tipo tumoral é determinada a partir da anamnese do paciente combinada as

características histopatológicas onde são observadas as alterações teciduais que definem a gradação de malignidade indicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Fig. 1).

Figura 1: Diagrama representativo da progressão tumoral, segundo caracteres histopatológicos postulados por Kruse e colaboradores (1992), adotado pela OMS para determinação da gradação tumoral em glioblastomas.



Os Glioblastomas podem ocorrer em pacientes jovens ou idosos, e algumas alterações genéticas já conhecidas os dividem em primários e secundários (Fig. 2). Os primários (*de novo*) manifestam-se rapidamente, sem evidências prévias ou lesões anteriores diagnosticadas e ocorrem em indivíduos de idade mais avançada. Os glioblastomas secundários desenvolvem-se a partir da progressão tumoral de um astrocitoma de baixo grau ao alto (Oghaki et al, 2007) e tende a acometer indivíduos mais jovens. Cerca de 85% dos casos diagnosticados como astrocitomas grau I (OMS) tem progressão tumoral espontânea ao pior prognóstico, o grau IV. São tumores extremamente agressivos e comprometem grande parte das funções neurológicas dos pacientes na medida em que a massa tumoral se desenvolve. O tratamento indicado pela organização mundial prescreve a excisão cirúrgica seguida de tratamento quimioterápico com temozolamida intravenoso ou intratumoral (Chang et al, 2005) acompanhado ou não de radioterapia. Entretanto em muitos pacientes ocorre recidiva , com presença de células resistentes ao tratamento.

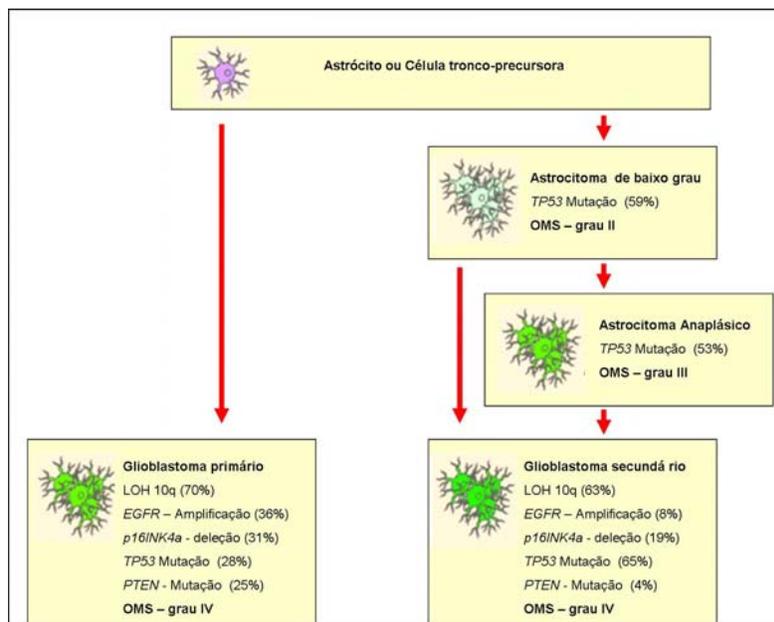


Figura 2: Diagrama representativo das alterações genéticas conhecidas que ocorrem durante o processo de progressão tumoral a partir de astrócitos normais precursores dos Glioblastomas primários ou secundários. (Adaptado e traduzido de Ohgaki, et al 2007)

Portanto, uma grande quantidade de laboratórios no mundo voltou suas linhas de pesquisa ao estabelecimento e caracterização de linhagens celulares de longa duração a partir de tumores astrocíticos brutos ou induzidos quimicamente, com a finalidade de entender os fenômenos envolvidos no processo de progressão tumoral e nos mecanismos de resistência a drogas. O conhecimento agregado, além de permitir a melhora do diagnóstico e tratamento dos pacientes, pode melhorar o conhecimento acerca da fisiologia tumoral e o desenvolvimento de modelos biológicos para o entendimento da fisiologia dos órgãos e sistemas envolvidos no processo de resposta do organismo frente aos tumores. Uma vez estabelecidas e caracterizadas, estas linhagens celulares podem ser depositadas em bancos de células, isto é, organizações responsáveis por autenticar, estocar, manter, produzir e distribuir as linhagens celulares de longa duração ao meio científico. Alguns exemplos de linhagens de longa duração de gliomas são apresentados na tabela 1. Dentre os exemplos há linhagens derivadas de astrocitomas humanos e células obtidas a partir da inoculação de agentes químicos no SNC de animais, que foram publicadas em periódicos de alcance internacional e depositadas em bancos de células, como: o Norte Americano (ATCC - *American Type Culture Collection*), a coleção de cultivos celulares Européia (ECACC - *European Collection of Cell Cultures*) e a coleção alemã de microrganismos e cultivos celulares (DSMZ - *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*). Há ainda outras linhagens de células derivadas de gliomas publicadas em periódicos internacionais e que não serão relacionadas aqui, pois não se encontram depositadas em bancos celulares ou cujo registro ainda não aparece disponível na rede internacional de computadores.

Tabela 1: Exemplos de linhagens derivadas de gliomas humanos, de gliomas induzidos quimicamente em animais e originadas a partir de duas linhagens diferentes estabelecidas gerando um híbrido. Estão representadas as linhagens de glioma depositadas nos bancos de células Norte Americano (ATCC), Europeu (ECACC) e Alemão (DMZ).

Designação	Tumor original, sexo, idade	Origem	Morfologia	# Modal cariótipo	Caracterização	Banco de Células	Referência
U87MG	GB,F,	Hs	epitelial	2n=46	T, GFAP+, Vim, Nestina+	ECACC	Ponten et al, 1968
U 373 MG	GB,M,61	Hs	epitelial	2n=46	T,GFAP+,Vim+,Nestina+ HLAA2+,HLADP+	ECACC/ATCC	
T98G	GB,M,61	Hs	fib	128-132	NT,PrP+GFAP+, Vim+,	ECACC/ ATCC	Stein, 1979
NG108-15	Hybrid (NB+glioma)	(Mm (NB); Rn (glioma))	Fib.	ND	T	ATCC	Hamprecht et al,1977.
A-172	GB,M,53	Hs	fib	ND	NT,GFAP+,HLAA2	ATCC / ECACC	Giard et al, 1973
DBTRG-05MG	GB,F,59	Hs	glial	87-91	T,GFAP+, Vim+,S100+,NSE,- RPDGF,-NCAM,-NF-,Cyt-, EGFR+,	ECACC / DSMZ	Kruse et al,1992.
Hs 683	Glioma,M,76	Hs	Fib	74-87, 3n±11,XY	NT,ND	ATCC	Owens et al, 1976
M059K	GB, M,33	Hs	fib.	65-79	T,Ad,-GFAP,QRS ¹	ATCC	Allalunis-Turner et al, 1993.
M059J	GB, M,33	Hs	fib.	Aneuploide, Y	T,Ad; -GFAP,QRS ¹		
F98	MGI, feto 20d	Rn	Glial	ND	T	ATCC	Koestner et al, 1980.
R62 (D74)							
LN-18	GB,M,65	Hs	epitelial	62,XY	T,Ad,HLAA2,A9,B5,BW35,D RW3, CD95, TP53 mutado, del p16 e p14ARF,,-GFAP,- S100, CD95+	ATCC	Diserens et al, 1981
LN-229	GB,60,F	Hs	epitelial	ND	T, CD95+		
C6	MGI	Rn	Fib	40-44<2n>	T,S100+, CD95+	ATCC/DSMZ	Benda et al, 1968

Continua na página seguinte.

Tabela 1: continuação.

Designação	Tumor original, sexo e idade do paciente	Origem	Morfologia	# Modal, cariótipo	Caracterização	Banco de Células	Referência
GMS-10	GB,F,49	Hs	fib.	69-76 3n>XXYY	Cyt-,desmina-,endotelial-,GFAP-,NF-,Viment+	DSMZ	Dr. H. Halfter, Universidade de Münster, NP
U-138 MG	GB,M,47	Hs	fib	57-63 3n>XXY	T,Cyt-,desmina-,endotelio-,GFAP-,NF-,Vim+	DSMZ	Ponten et al, 1968
SNB-19	GB,M,47	Hs	Fib.	58-63 3n>XXY	T,Cyt-,Cyt7-,Cyt8,Cyt17-,Cyt11-,desmina-,endotel-,GFAP+,NF-,Vim+	DSMZ	Gross et al,1988
GOS-3	AOLDG	Hs	Fib.	40-45 2n>XXY/XXYY	T-,Cyt-,desmina-,endotel-,GFAP+-,NF-,Vim+	DSMZ	Halfter et al,1998
LN-405	GB,F,62	Hs	Fib.	102-108 4n>XXXX	NT,Cyt-,Cyt7-,Cyt17-,Cyt18-,Desmina-,endotelio-,GFAP-,NF-,Vim+	DSMZ	Bodmer et al, 1989
GAMG	GB,F,42	Hs	fusiforme	61-67 3n>XXX	T,Cyt-,Cyt7-,Cyt8-,Cyt17-,Cyt18-,desmina-,endotelial-,GFAP-,NF-,Vim+	DSMZ	Tysnes et al, 1993
42-MG-BA	GB,M,63	Hs	epitelial, poligonal	85-95 XX-,Y	T,Cytok-,desmina-,endotelial-,GFAP+,NF-,Viment+,	DSMZ	Perzelová et al, 1998
8-MG-BA	GB,F,54		epitelial	47-52 2n>X	T,Cytk+,Cyt7+,Cyt8+,cyto17-,Cyt18-,Desmin-,endotelial-,GFAP-,NF-,Vim+		
DK-MG	GB,F,67	Hs	Fib.	42-44<2n>XX	T-,Cyt-,desmina-,endotel-,GFAP-,NF-,Vim+	DSMZ	Kruise et al,1998

GB= Glioblastoma, AA= Astrocitoma anaplásico; MGI = Glioma maligno indiferenciado induzido quimicamente; G= Glioma e AOLDG= astro-oligodendrogloma; M e F = macho e fêmea respectivamente, Hs, Rn e Mm = Derivadas de tecido Humano (Homo sapiens), Rato (Rattus norvegicus) e camundongo (Mus musculus); ND = Não declarado; NT e T = Não tumorigênica e tumorigênica respectivamente; Ad= Aderentes; ATCC = American Type Culture Collection, ECACC = Coleção européia de cultura de células; QRS1 = Células M059J são aproximadamente 30 vezes mais sensíveis a radiação ionizante do que as M059K cells. AS M059J são mais sensíveis que as M059K aos efeitos citotóxicos da bleomicina (N,N-bis(2-choroethyl)-N-nitrosourea e nitrogênio mostarda);

Deste modo, com mesmo objetivo de desenvolver um modelo biológico para o estudo de gliomas e visando o desenvolvimento de uma nova linhagem derivada de glioma humano, o laboratório de Imunopatologias coordenado pela Professora Liana Verinaud desenvolveu e estabeleceu uma linhagem celular de longa duração, derivada de glioma e que foi denominada NG97 (Grippio et al, 2001).

1.3 Estabelecimento e caracterização parcial da linhagem NG97

A linhagem NG97 foi estabelecida a partir de células provenientes de tumor bruto obtido de um paciente, cujo diagnóstico da biópsia foi astrocitoma de grau III. As células foram processadas, isoladas por tratamento enzimático e adaptadas ao cultivo *in vitro* inicialmente em meio seletivo a fibroblastos (meio essencial Eagle contendo D-valina) e subcultivadas posteriormente em meio RPMI suplementado (20% de Soro Fetal Bovino e antibiótico) por aproximadamente 120 passagens. Inicialmente duas populações morfológicamente distintas foram observadas; uma de células pequenas e arredondadas, e outra de células maiores do tipo fusiforme (Grippio et al, 2001).

A inoculação subcutânea das células NG97 no dorso de camundongos congenitamente atímicos (*nu/nu*) induziu o desenvolvimento de massa tumoral sólida, demonstrando sua tumorigenicidade e malignidade. As análises histológicas destas massas tumorais produzidas em camundongos *nude* demonstrou características celulares compatíveis à descrição de glioblastoma multiforme, denotando a progressão tumoral espontânea a partir do tumor original. Uma vez recuperadas da massa tumoral dos animais, processadas e digeridas enzimaticamente estas células foram colocadas em cultura e apresentaram características morfológicas da cultura original com duas populações distintas (Grippio et al, 2001). Também semelhante a cultura original as células aderiam ao frasco de cultivo e foram cultivadas sem apresentarem sinais de senescência ou morte celular em longos subcultivos.

Nos primeiros experimentos de caracterização da linhagem idealizados com finalidade de clonagem e com células de partidas próximas ao tumor original, foi descrita grande diferença no tempo de duplicação relacionado ao aparecimento de uma morfotipia celular do tipo dendrítica gigante (Machado et al, 2005). O tempo de duplicação descrito durante o processo de estabelecimento das células NG97 foi de 72 horas com monocamada constituída de dois tipos distintos. Com o experimento de caracterização inicial o tempo de duplicação apresentava-se diminuído (24h) e este correlacionado ao aparecimento de uma nova morfotipia de tamanho aumentado e morfologia achatada, a qual recebeu a denominação de célula do tipo dendrítica gigante. A partir do surgimento de tal célula, observou-se acréscimo ao ritmo de crescimento celular e o desenvolvimento das demais morfotipias arredondadas e fusiforme, representando ambas quase 90% da monocamada celular. Através destes experimentos iniciais de caracterização foi demonstrado então que estas células NG97 possuíam três subtipos morfológicos dependentes entre si para a conformação da monocamada (Machado et al, 2005).

Em conseqüente, a caracterização ultraestrutural da superfície dos diferentes subtipos celulares das células NG97 foi evidenciada através de microscopia eletrônica de varredura. Cada morfotipia da linhagem apresentava diferentes padrões morfológicos na superfície da membrana celular, tais como: (i) bolhas e filopódios nas células de formato arredondado, (ii) extensos prolongamentos e vesículas de secreção nas células do tipo dendrítica gigante e (iii) microvilosidades nas células do tipo fusiforme (Machado et al, 2005).

Schenka e colaboradores (2005), dando continuidade aos estudos com a linhagem NG97, demonstraram a organização ultraestrutural das células no heteroenxerto realizado em camundongos atímicos. Dentre as observações encontraram-se estruturas similares a desmossomas, núcleos com reentrâncias e nucléolos proeminentes, processos

citoplasmáticos, filamentos intermediários, cromossomos desespiralizados e dois tipos celulares distintos. Nestes mesmos estudos, marcadores genéricos para superfície celular de leucócitos (leu-2) foram avaliados, não sendo, contudo, evidenciados. Em contrapartida, a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), presente exclusivamente em células de origem astrocitária, foi detectada nas células do heteroenxerto. Além deste filamento intermediário, os mesmos autores caracterizaram a origem neuroectodermal da linhagem NG97 através da presença das proteínas a S-100 e a Enolase Específica de Neurônio (*Neuron-enolase specific* - NSE). Ambas definem a origem neuroglial às células NG97, a proteína S-100 por estar presente principalmente nos astrócitos, oligodendrócitos, células de Schwann, neurônios, células dendríticas em gânglios linfáticos (Moore, 1965). A NSE é uma glicoenzima presente em células do sistema nervoso central com expressão aumentada em processos de injúria aguda ao SNC (Vos et al, 2008).

Embora alguns trabalhos anteriores tenham iniciado o processo de caracterização da linhagem NG97 levando em conta aspectos morfológicos e histopatológicos, há necessidade da continuidade no processo de caracterização para que esta linhagem seja utilizada como modelo biológico e depositada em banco celular.

1.4 Caracterização de linhagens contínuas derivadas de tumores astrocíticos

O processo de caracterização de linhagens celulares tumorais é uma coleção de dados relacionados: (i) ao arranjo estrutural celular e (ii) da citomorfologia com determinação da dependência de ancoragem das células ao substrato, (iii) a manutenção ao longo do subcultivo de receptores e fatores de interação com o sistema imune que podem ser herdados do tumor original, (iv) avaliação de anormalidades citogenéticas e (v) determinação da sensibilidade celular a agentes quimioterápicos (Wünsch filho et al, 2001).

1.4.1 O arranjo ultraestrutural de células *in vitro*

As análises morfológicas de linhagens incluem conhecimentos acerca das relações intracelulares, elucidadas através da microscopia eletrônica de transmissão que permite a caracterização da ultra-estrutura celular representada pela disposição do citoesqueleto, organelas e morfologia de membrana (Olsen et al, 2003). As células normais apresentam diferenças ultra-estruturais em relação as células de origem neoplásicas, principalmente relacionadas as alterações metabólicas que estas sofrem, ou seja, modificações no sistema de organelas, que as tornam mais aptas no microambiente tumoral. Algumas modificações ultra-estruturais associadas a linhagens celulares provenientes de tumores, são: (i) uma menor dispersão da cromatina, (ii) aumento no número de nucléolos por núcleo, (iii) perda relativa de retículo endoplasmático rugoso, (iv) diminuição ou anormalidades nas mitocôndrias e aumento na formação de microfilamentos e microtúbulos (Smith et al, 1979; Livesey et al, 1985).

Na linhagem LN-18 derivada de glioblastoma humano foram verificadas estruturas como uma grande quantidade de microfilamentos citoplasmáticos próximos à superfície celular disposto entre os microtúbulos, grande quantidade de lisossomos perinucleares, numerosas mitocôndrias de tamanhos variados e microvilosidades em toda extensão da membrana (Diserens et al, 1981).

Wang e colaboradores (2007) descreveram a ultra-estrutura da linhagem derivada de glioblastoma Humano WJI células polinucleadas, pouco diferenciadas e com núcleos deformados de tamanho aumentado e com nucléolos proeminentes. Em outro estudo, Arai e colaboradores (1991) também demonstraram em linhagem de astrocitoma humano uma grande quantidade de filamentos perinucleares.

Em adição, a caracterização das linhagens através de informações relacionadas com

alterações nas mitocôndrias pode auxiliar os patologistas no entendimento da progressão tumoral em astrocitomas (Carew et al, 2002). Em observações de astrocitomas em diferentes graus, Arismendi-Morillo e colaboradores (2008) demonstraram diferenças na ultra-estrutura mitocondrial. Os astrocitomas pilocíticos (grau I) caracterizaram-se por apresentarem diminuição de eletron-densidade e espessura das cristas mitocondriais, que aparecem associadas ao retículo endoplasmático rugoso e ao núcleo. Em grau mais avançado, no astrocitoma fibrilar há grande quantidade de mitocôndrias com aspecto de inchadas e em forma semelhante a letra “Y”. Já em último grau (grau IV,GBM) foi demonstrado a presença de mitocôndrias inchadas, com cristólise, fusionadas e com diminuição de densidade elétrica da matriz intra-cisternal e modificação na aparência piramidal.

Estas alterações observadas em organelas como as mitocôndrias podem sinalizar morfologicamente, que há modificações ultra-estruturais ocorrendo no citoesqueleto das células. Assim podem ser tomadas como representação visual de alterações metabólicas e fisiológicas pelas quais as células estão passando, como a alta taxa de divisão ou apoptose e também podem vir a representar a perda da adesão celular e aquisição de capacidade migratória (Rappaport et al, 1998).

1.4.2 A citomorfologia e a diminuição da adesão e de dependência da ancoragem celular ao substrato

A citomorfologia é resultado da organização do citoesqueleto, de interações da membrana celular com o substrato e composição bioquímica do microambiente onde a célula está inserida.

O termo citoesqueleto é considerado um sinônimo para a organização estrutural de microfilamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários. Os constituintes

principais do citoesqueleto são os microfilamentos de actina que estão associados aos microtúbulos de tubulina num equilíbrio dinâmico entre estados de polimerização e despolimerização. O terceiro constituinte de citoesqueleto, os filamentos intermediários representam a menor parte do citoesqueleto (10 - 15%) da cito-arquitetura e também constituem um marcador da origem ontogênica do tumor ao qual a célula da linhagem foi originada (Penman, 1995).

As células de origem astrocitária têm como característica embrionária, a expressão única de filamentos de citoesqueleto do tipo vimentina no período anterior a maturação e migração dos progenitores celulares para a glia radial (Chisholm & Houlinston, 1987, Bignami et al, 1982). Com a diferenciação e o amadurecimento da célula, vimentina e GFAP são expressas concomitantemente (Dahl, 1981) e finalmente quando as células estão no seu mais alto grau de diferenciação apenas a GFAP (Lofton et al, 1989) é expressa no citoplasma astrocitário. No cérebro adulto majoritariamente encontra-se a expressão de GFAP em células da glia (He & Sun, 2007). Em células de linhagens contínuas derivadas de astrocitomas a expressão destes filamentos intermediários é variável, ou seja, as células podem expressar vimentina, GFAP ou ambas proteínas ao longo do subcultivo (tabela 1).

Outro filamento intermediário representativo de células do sistema nervoso central, o neurofilamento (NF) é determinante ontogênico de células de origem neuronal. Eventualmente, há a possibilidade da existência de células positivas para tal filamento intermediário em linhagens derivadas de astrocitomas uma vez que em astrocitomas mistos do tipo oligodendrogliomas e em GBM de células gigantes a expressão desta molécula ocorre no citoesqueleto (Wharton et al, 1998; Martinez-Dias et al, 2003).

Além de determinada por interações da membrana celular com o substrato por microfilamentos de actina em filopodias e filamentos intermediários, a citomorfologia pode ser modificada através de receptores de membrana com seus respectivos ligantes na matriz extracelular. Esta interação permite a modificação morfológica para que ocorra a migração celular através do substrato ou através do estroma no microambiente tumoral *in vivo*. A habilidade infiltrativa em tumores é orientada por inúmeras moléculas, dentre elas, um conjunto de proteínas de adesão denominadas integrinas e seus ligantes na matriz extracelular (Brinkerhoff et al, 2001).

Em tumores e em linhagens astrocíticas, as subunidades $\beta 1$ podem ser combinadas às subunidades $\alpha 4$ e $\alpha 5$ formando as integrinas e, assim, capazes de interagirem tanto com a fibronectina presente na matriz extracelular ou a expressa pelas linhagens celulares tumorais (Paulus et al, 1994). Entretanto, alguns autores demonstraram que a interação entre a $\alpha 5\beta 1$ e seu ligante é capaz também de iniciar uma sinalização para que a célula aumente sua taxa de divisão, resultando no aumento da massa tumoral (Giese et al, 1996). Estas integrinas interagem então com moléculas do substrato ou da matriz que possuam na sua constituição molecular, grupos com resíduos do tipo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico). Dentre as moléculas que possuem tal motivo, a fibronectina pode ser secretada na matriz extracelular por células de linhagens transformadas em maiores quantidades que tecidos normais adjacentes ao tumor no microambiente tumoral (Castellani et al, 1986).

Outra integrina expressa em gliomas com papel na migração celular é a $\alpha 6 \beta 1$, porém o papel desta integrina está principalmente ligado à implantação das células das linhagens derivadas de astrocitoma no microambiente do xenoinxerto em animais atímicos (Pedersen et al, 1993). Estas integrinas possuem como ligantes as moléculas de laminina presentes na

matriz e, esta, é o substrato preferencial das integrinas de células *in vitro* (Koochekpour et al, 1995).

Além das integrinas, Fibronectina e Laminina; outra glicoproteína de adesão e receptoras de ácido hialurônico, a CD44, também é importante no processo de adesão, migração de gliomas *in vitro* e *in vivo* (Merzak. et al, 1994; Wiranowska et al, 2006). Knüpfner e colaboradores (1999) postularam através de ensaios de inibição da ligação do CD44 ao ácido hialurônico nas linhagens T98G, A172, 9L, 86HG39, U87MG e 85HG66, a participação desta glicoproteína de adesão no processo de metástase.

Assim, as interações entre ligantes e matriz estão envolvidas no processo de dinâmica celular promovendo através das integrinas e CD44 a adesão e desadesão, que podem desencadear sinais intracelulares que levam ao aumento de duplicação celular, transformação oncogênica e metástase. Estas características relacionadas à perda de adesão demonstram a adaptação e a diminuição de dependência do substrato que as linhagens celulares transformadas possuem. Como causa desta independência é possível o desenvolvimento *in vitro* de estruturas hiper-celulares tridimensionais organizadas, os organóides ou estruturas organotípicas. Hayward e colaboradores (1995) demonstraram organóides funcionais formados a partir do cultivo de células de linhagem de carcinoma de cólon em base de ágar. Em adição, Khaitan e colaboradores (2006) demonstraram diferenças de estresse oxidativo em diferentes regiões de esferóides da linhagem celular derivada do glioma humano BMG-1, validando assim a utilização destas estruturas como modelos verossímeis *in vitro* para o desenvolvimento de novas terapias anti-tumorais. Para tal, é importante estabelecer um perfil de moléculas expressas na superfície ou interior das células da linhagem que possam estar ligadas ao sucesso de terapias, como os receptores de

fatores ligados aos fenômenos de interação imunológica das células quando em microambiente tumoral.

1.4.3 Moléculas de interação com o sistema imune

A expressão de moléculas relacionadas a inter-relações imunes em astrocitomas são descritas de forma variada dentre as linhagens celulares estabelecidas, até mesmo dentre as passagens celulares (Saito et al,1988; Miyagi, et al, 1990). Em geral a resposta imune mediada por células apresenta-se diminuída e a resposta imune humoral apresenta-se normal ou aumentada nos diversos tipos de câncer. Assim é importante a análise de algumas moléculas com possível papel nas interações imune em gliomas, como: (i) moléculas do complexo de histocompatibilidade principal humano tipo I (HLA ABC) e tipo II (HLA DR), (ii) molécula co-estimulatória B7 (CD80) e (iii) imunossupressores como o fator de crescimento e transformação beta (TGF- β) e moléculas Fas (CD95).

A expressão variada de HLA classe I pelos gliomas, é relatada como superexpressas, hipoexpressas, e até mesmo insignificante, tanto nos gliomas mantidos *in vitro* como *in situ* (Lampson, 1998). Entretanto algumas evidências sugerem que pelo menos alguns tipos de gliomas são capazes de expressar certo grau de HLA I *in vitro* e que, esta expressão pode ser regulada em condições apropriadas.

Diferentemente das moléculas de HLA classe I, que podem ser expressas em todas as células nucleadas, as moléculas da classe II do Complexo de Histocompatibilidade estão expressas principalmente em células apresentadoras de antígeno profissionais (APCs) cuja função é apresentar antígenos para as células T auxiliares. Entretanto, astrócitos normais e neoplásicos são capazes de expressar HLA II quando estimulados por Interferon Gama (INF γ) (Miyagi et al 1990), citocina freqüentemente aumentada em microambiente tumoral

produzida pelas células do estroma.

Também é notável o achado histológico de grande quantidade de macrófagos em gliomas humanos (Liberski & Kordek, 1997; Roggendorf et al,1996; Rossi et al, 1987) demonstrando a existência de algum antígeno tumoral desencadeador de resposta imunológica. Entretanto, clinicamente o que se observa é a ausência de imunidade contra o glioma sugerindo ausência de mecanismos de resposta microglial.

Zou e colaboradores (1999) encontraram na análise hematológica de pacientes acometidos por glioma, acréscimo de expressão de interleucina-10 (IL-10) e decréscimo da expressão de IL-12, MHC de classe II e de moléculas co-estimulatórias B7 (CD80/86). Estes achados são representativos de uma disfunção imunológica associada ao glioma. Os mesmos autores demonstraram que de fato os pacientes com gliomas malignos apresentavam uma resposta imune celular deprimida quando comparada com indivíduos não acometidos por este tipo tumoral.

Wintterle e colaboradores (2003) evidenciaram diminuições de expressão da molécula co-estimulatória B7 em células de glioma humano levando a inibição das funções e apoptose tanto de células TCD4+ quanto de células TCD8+. Aliado a este mecanismo de escape apresentado pelos astrocitomas, há ainda a secreção de citocinas potencialmente responsáveis por inibir as células do sistema imune, como o Fator de Crescimento e Transformação beta (TGF- β), que suprime a proliferação e induz a morte linfócitos ativados.

Além de efeitos supressores, Bodmer e colaboradores (1989) apresentaram estudos em que o TGF- β como fator autócrino estaria envolvido na ativação e elevação da expressão de receptores do fator de crescimento epidermal (EGFR), e conseqüente neovascularização, conferindo sucesso adaptativo aos astrocitomas. Ainda, a ativação de sinalização intracelular

produzida por TGF- β pode desencadear cascatas que em última instância, levam a desregulação do comportamento das células no microambiente e a apresentarem progressão do ciclo celular, apoptose, mobilidade e deposição da matriz extracelular (Rich & Bigner, 2004).

Também relacionada à supressão imune, as células de gliomas possuem um mecanismo de secreção de moléculas da superfamília do fator de necrose tumoral/fator de crescimento neural (Streffer et al, 1998), o Fas (CD95) que induzem a morte linfócitos T ativados e células *Natural Killer* (NK) (Riffkin et al, 2001). Embora alguns tipos celulares possam morrer por apoptose, via ciclo de Fas-FasL (ligante de Fas), os gliomas *in vivo* e em algumas linhagens celulares *in vitro* expressam altas quantidades de CD95 (Roth et al, 1997), porém, com resistência à morte por esta via por apresentarem o mecanismo de p53 defeituoso que inibe a atividade da caspase-8 e conseqüentemente a apoptose (Cerrato et al, 2004). Os defeitos destes mecanismos intracelulares podem, e são muitas vezes, gerados pela alta instabilidade cromossômicas presentes nas células tumorais.

1.4.4 As anormalidades citogenéticas

As alterações genéticas moleculares e citogenéticas, freqüentemente relatadas em tumores, são mudanças em proto-oncogenes ou genes supressores de tumores (Kruse et al, 1992 e 1998). Alterações de toda sorte demonstrando alta heterogeneidade em linhagens celulares estabelecidas a partir de glioma têm sido documentadas (Bigner et al, 1981). Dentre as alterações cariotípicas mais freqüentes temos as perdas de 9p, 10, 13q, 17p,19 (Osborne et al, 2001).

A atribuição destes desbalanços cromossomais, freqüentemente encontrados em linhagens derivadas de gliomas e em tumores, vêm novamente sendo atribuída por alguns

autores como resultado de fusões de células do estroma com células tumorais (Pawelek, 2000). Em meados de 1929, a partir de experimentos com ouriço do mar, Theodor Boveri demonstrou que a múltipla fecundação promovia desbalanços cromossômicos e divisão desenfreada de células postulando a participação destes desbalanços com o fenótipo tumoral. Posteriormente, Nowell (1996) propôs que a progressão tumoral seria resultado de instabilidade genética adquirida dentro de um clone que se tornaria mais agressivo após sucessivas divisões mitóticas. Assim, foi recapitulado aos dias atuais o postulado de que a fusão celular *in vivo* no câncer poderia ser responsável pelas anormalidades cromossômicas, pela aquisição de maior malignidade e pela capacidade em realizar metástase (Pawelek, 2000).

Ainda, em gliomas estes desbalanços também são referidos como a trissomia do cromossomo 7 (Shapiro & Shapiro, 1992) e esta aparece em algumas linhagens celulares correlacionada a superexpressão do oncogene *erbB* (*Her-2neu*) e conseqüentemente do seu transcrito, o receptor de fator de crescimento epidermal, EGFR (Steck et al, 1986). Em contrapartida, células normais do cérebro não superexpressam o mesmo gene para EGFR (Kruse et al, 1998, Maxwell et al, 1991). Como resultado das anormalidades cromossômicas e conseqüentes desbalanços são relacionados que a superexpressão do *ErbB* (*Her2-neu*) confira às células resistência a algumas drogas, como a Cisplatina.

1.4.5 A sensibilidade a drogas

É crescente o número de trabalhos em oncologia que utilizam linhagens celulares tumorais derivadas de tumores humanos para o desenvolvimento ou testes de novas terapias, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Sabe-se, atualmente, que a cisplatina é capaz de agir em algumas linhagens celulares

transformadas e derivadas de tumores, induzindo morte celular por apoptose. Duan e colaboradores (2004), em experimentos com as linhagens de glioma T98G e U87MG, demonstraram que este agente sensibiliza as linhagens ao fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$), induzindo-as à morte por apoptose. Entretanto, no mesmo trabalho, os autores encontraram que as linhagens U373MG e A172 não eram sensíveis à cisplatina demonstrando a variabilidade de perfil de sensibilidade quimioterapêutica em linhagens celulares derivadas de astrocitomas.

Dropcho e colaboradores (1992) demonstraram que pacientes portadores de astrocitoma e glioblastoma submetidos à radioterapia apresentavam uma diminuição significativamente mais acentuada, da massa tumoral quando previamente tratados com cisplatina.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O presente trabalho de tese teve como objetivo geral a caracterização da linhagem derivada de glioma humano NG97 com a finalidade futura de depósito em banco de células.

Para tal foram analisados:

1. o arranjo ultra-estrutural das células *in vitro*,
2. a citomorfologia e a diminuição da dependência de ancoragem das células ao substrato,
3. a expressão *in vitro* de moléculas relacionadas a possíveis interações imunológicas das células NG97 quando no microambiente tumoral,
4. alterações cromossômicas, em específico na seqüência do ErbB (Her2/neu); e
5. a sensibilidade *in vitro* e *in vivo* das células NG97 ao quimioterápico cisplatina.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Manutenção de linhagens celulares

3.1.1. Células derivadas do glioma humano NG97

Células da linhagem NG97 foram descongeladas em meio RPMI 1640 para total remoção do Dimetil Sufóxido conforme descrito anteriormente por Grippo, et al (2001). Em seguida, foram cultivadas utilizando-se meio de crescimento (RPMI 1640) (cultilab, Campinas-SP, Brasil) suplementado com 13% de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell, Campinas-SP, Brasil) e 25µg/l de gamicina (Sigma-Adrich), em placas de 24 poços com lâminulas redondas para ensaios de coloração diferencial e em garrafas de cultura de células (75 cm²) (TPP) para os demais procedimentos. Todas as culturas foram incubadas em estufa 37°C, em atmosfera úmida de ar e 5% de CO₂ até o momento de formação de camada confluenta. Após a formação da monocamada, as lâminas foram fixadas em paraformaldeído 2% tamponado e as garrafas de cultura repicadas utilizando ATV Tripsina-Versene (0,05%) (Instituto Adolf Lutz, São Paulo, Brasil).

3.1.2. Células humanas intra-epiteliais tímicas pós-natal (TPHN)

Para controle positivo da citometria de fluxo, a linhagem de células humanas intra-epiteliais tímicas pós-natal, (TPHN) foi disponibilizada pelo Prof. Dr. Wilson Savino, tendo seu estabelecimento previamente descrito por Fernandez et al (1994).

As células TPHN foram cultivadas em meio MEM (cultilab, Campinas-SP, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell, Campinas-SP, Brasil) e antibióticos (100µg/l de penicilina e 100µg/l de guamicina) (Sigma-Adrich), em lâminas de oito nichos (Labtek, Nunc) e em garrafas de cultura de células (75 cm²) (TPP). As culturas foram incubadas em estufa 37°C, em atmosfera úmida de ar e 5% de CO₂ e

examinadas até o momento de formação da camada confluenta. As lâminas foram retiradas para utilização na imunocitoquímica e as garrafas foram tripsinizadas com ATV Tripsina-Versene (0,05%) (Instituto Adolf Lutz, São Paulo, Brasil) e repassadas a outras garrafas de cultura.

3.1.3. Cultivo de células NG97 em meio ágar semi-sólido

Para formação de camada fina de meio semi-sólido em microplacas de 24 poços, foram depositados 1mL de meio 2,5 % ágar (ágar Base-Difco,USA) estéril e deixados em fluxo à temperatura ambiente para solidificação. Após solidificação e verificação da ausência de contaminantes bacterianos, células NG97 das passagens 21, 61 e 89 cultivadas nas condições descritas (3.1.1.) foram depositadas em triplicatas em diferentes poços devidamente identificados e com meio semi-sólido. O crescimento e desenvolvimento morfológico das células foram acompanhados dia a dia e fotografados. A documentação microscópica foi realizada com o auxílio de um microscópio invertido acoplado com uma câmera digital Nikon. A documentação macroscópica foi realizada com mesma câmera digital desprovida do microscópio.

3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Células da linhagem NG97 foram ressuspensas com tripsina e centrifugadas. O “pellet” obtido foi então ressuspendido em PBS-BSA 1% e centrifugado novamente, sendo essa lavagem repetida por duas vezes. Em seguida, as células foram fixadas por imersão em solução contendo 2% de paraformaldeído e 1,5% de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio 0,2M e pH 7,4 a 4°C durante toda a noite. Após lavagem com PBS 0,05M, as células foram incluídas em agarose 2% e pós-fixadas em solução aquosa de tetróxido de ósmio 1% a 4°C, ficando imersas nesta solução por uma hora e 30 minutos. Em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS e desidratadas em gradiente crescente de etanol,

ficando posteriormente em solução de acetona e álcool absoluto (v/v) por 30 minutos. A seguir, foram expostas, por duas vezes de 15 minutos cada, à acetona pura e, em seguida, a uma mistura de acetona e resina Epon (v/v) por uma hora, até serem incluídas em resina pura. Por fim, foram realizados cortes semifinos e ultrafinos e a contrastação, para tal gotejou-se acetato de uranila 2% em tampão maleato 0,5M e pH5,0 sobre as telinhas de microscopia eletrônica de transmissão contendo o material. Após 20 minutos, o material foi lavado em água ultrapura e colocado sobre papel filtro para secar. Finalmente, os cortes foram corados com chumbo e lavados novamente. As células foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão MET - LEO 906 (40-100 KV) acoplado a um sistema de captura e análise de imagens Kontron KS 300.

3.3. Investigação imunocitoquímica

3.3.1. Imunofluorescência para fibronectina e laminina: As lâminas Labtek (Nunc) tanto nas células derivadas do glioma humano quanto o controle positivo TPHN foram previamente lavadas em PBS e fixadas em metanol. Em seguida, foram lavadas em PBS 1% (BSA) por 3 vezes de 5 minutos cada. Em etapa conseguinte, as lâminas foram incubadas com os anticorpos conjugados com FITC: anti-fibronectina (DakoCytomation, Califórnia, USA) e anti-laminina (DakoCytomation, Califórnia, USA), gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Wilson Savino (Laboratório de pesquisas do Timo – FIOCRUZ - RJ). Lâminas foram encubadas por 60 minutos em câmara úmida com o anticorpo primário e a seguir por 120 minutos com o anticorpo policlonal secundário antiovelho conjugado a FITC (BD, Biosciences). Controles negativos incluíam a reação completa com a presença de um anticorpo inespecífico de mesmo isotipo conjugado a FITC.

3.3.2. Imunodeteção de GFAP, vimentina, HLA I e II, B7, TGF β , CD95 e CD44:

As lâminas, previamente fixadas, foram lavadas em PBS 1% (BSA) e em seguida incubadas com os anticorpos primários. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-GFAP (DakoCytomation, Califórnia, USA), anti-vimentina humana clone V9 (DakoCytomation, Califórnia, USA), anti-HLA ABC (DakoCytomation, Califórnia, USA), anti-HLA-DR (DakoCytomation, Califórnia, USA), anti-B7 (CD80) humana (Santa Cruz Biotechnology, Europe), anti-CD44 humana (DakoCytomation, Califórnia, USA), anti-CD95 humana (DakoCytomation, Califórnia, USA), anti-TGF β 1 humano (Serotec, Kidlington, Oxford, U.K). Após lavagens consecutivas as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário específico para cada primário (tabela 1, anexo I). Após período de incubação, as lâminas foram lavadas, por 3 vezes em salina tamponada com fosfato (PBS-BSA 1%) e, em seguida, tratadas com o “kit” DAKO EN VISION SYSTEM HRP (DakoCytomation, Califórnia, USA) conforme instruções do fabricante. A revelação da reação foi feita utilizando-se o substrato da peroxidase (H₂O₂) e 3,3-diaminobenzidina (DAB). Após lavagem em água corrente e destilada, as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris e montadas em resina permount. Controles negativos incluíram a reação completa com ausência do anticorpo primário. Controles positivos foram devidamente realizados seguindo-se a mesma metodologia aplicadas às amostras, conforme descrito anteriormente.

A observação e documentação das lâminas foram realizadas com auxílio de um microscópio óptico acoplado a um sistema fotográfico Nikon AT-C 1.

3.4. Citometria de fluxo

As células NG97 e TPHN foram previamente cultivadas como descrito no item 1 em frascos de cultura. Uma vez atingida a camada confluyente em ambas culturas as células foram tripsinizadas separadamente, como descrito anteriormente, e preparadas para determinação da concentração celular. Logo que a densidade de células foi determinada, aferia-se o acerto para uma concentração de 1×10^6 células por mL de tampão PBS-BSA 1% numa solução final de 3 mL para cada tipo celular.

Linfócitos e monócitos de sangue periférico de um doador saudável foram selecionados pela centrifugação do sangue total em gradiente de Ficoll-Hypaque, para confrontarmos a positividade de alguns marcadores presentes em células sangue periférico às células NG97. A concentração celular desta amostra foi acertada para $0,5 \times 10^6$ células por mL num total de 3 mL.

Brevemente, 100 μ L de cada amostra de células foram adicionados à poços em uma placa de 96 poços com fundo em V, totalizando em 24 poços por tipo celular. A placa foi então centrifugada em 150xg por 4 minutos à 4°C. Finalizado este período adicionou-se a cada poço com exceção do primeiro, os anticorpos conjugados à compostos fluorescentes, para cada marcador de superfície celular a ser analisado relacionados abaixo. Os controles de isotipos incluíam amostras com imunoglobulinas de mesma origem idiotípica e fluoróforos iguais aos anticorpos primários utilizados. Finalizadas as incubações necessárias, as amostras foram então guardadas em ambiente protegido da luz e levadas à análise no citômetro de fluxo FACScalibur - BD biosciences® (Fluorescent Cell sorter). Posteriormente, os dados adquiridos junto ao citômetro, foram analisados com o programa Flow Cell Express (FCS®).

Os anticorpos utilizados durante as reações foram: anti-CD29 ($\beta 1$ integrina)-PE Cy5, anti-CD49d ($\alpha 4$ integrina)-PE, anti-CD49e ($\alpha 5$ integrina) -PE, anti-CD49f ($\alpha 6$ integrina) -PE, anti-CD44 (mouse), IgG1 de camundongo-PE e IgG1 de camundongo-FITC (BD biosciences®-Pharmingen).

3.5. Técnicas de citogenética

Os procedimentos de citogenética foram realizados em colaboração com o laboratório de Tocoginecologia-CAISM UNICAMP, sob a supervisão da Profa. Dra. Fátima Boetcher Luiz e Dra. Juliana Heinrich. Estudos especializados em cariótipo humano e murino e os estudos de citogenética molecular foram desenvolvidos em colaboração com a Profa. Marileila Varella Garcia, PhD do Departamento de Medicina e Oncologia da Universidade do Colorado, Denver – EUA.

3.5.1. Preparo das lâminas: As células foram previamente cultivadas segundo condições descritas anteriormente, em frascos de cultivo de 75 cm². Posterior a verificação de aderência das células e formação da camada semiconfluente, 100µL de solução de colchicina foi aplicada totalizando um período de ação de 6 horas, promovendo então o bloqueio das células em metáfases. Finalizado este período, as células foram desaderidas do frasco de cultivo com o auxílio de ATV, coletadas em tubos cônicos e centrifugadas a 150xg por 10 minutos como procedimento de lavagem. Com a formação do agregado de células no fundo cônico do tubo, o sobrenatante foi desprezado e acrescentava-se então solução de KCl (0,075M/37°C) para hipotonia das células por um período total de 8 minutos, quando então foram fixadas em solução de metanol-ácido acético (3:1). Nova lavagem foi realizada, em mesmo fixador seguida de outra lavagem conseguinte com

fixador em proporção 1:1 e novamente no fixador inicial (3:1). A concentração das células conservava-se em fixador no volume final de 1 mL de fixador. Para realização das técnicas de coloração subseqüentes de banda G e C, lâminas previamente aquecidas em forno Pasteur, foram colocadas em suportes no banho a 37 °C e, assim que o filme de vapor foi formado, o concentrado de células foi gotejado para uso posterior.

3.5.2. Coloração de Banda G: Para realização da técnica de coloração por corante de banda G, as lâminas previamente preparadas foram envelhecidas em microondas em 3 ciclos de 2min10seg cada. Em seguida, as lâminas foram imersas em tampão 2XSSC (pH 7,0) e coradas com corante Giemsa-Wrights (MERCK, Darmstadt, Germany) diluído em tampão 2XSSC, pH 7,0 (1:4) por 5 minutos. Totalizado este período, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas a temperatura ambiente para posterior observação.

3.5.3. Coloração de Banda C: O procedimento de bandeamento de heterocromatina foi realizado com lâminas previamente preparadas. Em seguida, foram incubadas em solução ácido acético 45% (60°C) durante 15 minutos, seguida de imersão em água gelada e solução de hidróxido de bário (0,35M) por 5 minutos a temperatura ambiente e posteriormente lavadas em água corrente. Brevemente, foram incubadas em tampão 2XSSC(pH 7,0/60 °C) por 30 minutos, lavadas em água gelada e reservadas por um dia. Finalizado este período de incubação, as lâminas foram coradas na solução de corante para banda C diluído em tampão 2XSSC (pH 7,0) por 1 hora e 10 minutos. Em etapa seguinte, as lâminas foram lavadas em água corrente, deixadas em temperatura ambiente para secarem e finalmente analisadas.

3.5.4. Hibridização fluorescente *in situ* (FISH): Células previamente fixadas foram concentradas em tubo cônico com o auxílio de uma centrífuga por 15 minutos a 150xg, de maneira que o volume total com as células no tubo totalizasse 500µL. Posteriormente, a

suspensão de células foi adicionada a uma lâmina e envelhecida pelo período de uma noite, à temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em tampão 2XSSC (pH 7,0) desidratadas em gradiente de álcool (70%,85% e 100%) e secas à temperatura ambiente. Em seguida a sonda (mix de sondas centroméricas do cromossomo 17 e Her-2/neu) (DakoCytomation, Califórnia, USA) foi aplicada seguida da co-desnaturação por 2 minutos em placa a 75 °C, e encubada por 16 horas em incubadora úmida à 37 °C. No dia seguinte as lâminas foram lavadas em tampão 1,5M uréia/0,1XSSC/aquoso a 45 oC por 30 minutos seguida por um banho em tampão 2XSSC por 2 segundos. Em etapa conseguinte a desidratação em banhos de 2 minutos cada em gradiente de álcoois (100%, 90%, 85% e 70%) foi realizada, seguida de secagem por 20 minutos. Finalizado o processo de secagem foi aplicado 20µL DAPI-antifade, as lâminas foram seladas com selante especial e visualizadas em microscópio.

3.5.5. Análise e Captura de imagens: Os resultados de citogenética foram observados em microscópio Zeiss Axioplan 2® acoplado ao sistema de captura Axiophot®, e analisadas com o auxílio do software Applied Spectral Imaging - Case Data Manager Expo Version 4.5.0.28® Digimat.

3.6. Ensaio de sensibilidade à cisplatina

3.6.1. Ensaio *in vitro* : A concentração de 1×10^4 células/mL da linhagem foram cultivadas em triplicatas em microplacas de 24 poços. Após formação de camada confluyente, foram expostas a 100 µg/mL, 50 µg/mL, 10µg/mL e 0µg/mL concentrações de cisplatina por 24h. Finalizado o período de exposição o sobrenadante era recolhido, reservado, unido as células que foram soltas com o auxílio de tripsina, coradas com corante

vital Azul de Trypan (1:10) e contadas diferencialmente para azul tripan negativas e azul de tripan positivas (viáveis e inviáveis, respectivamente).

3.6.2. Ensaio *in vivo* em transplante heterotópico das células derivadas NG97 em camundongos CB17SCID/SCID: Foram utilizadas 20 camundongas com imunodeficiência combinada severa (do inglês, *severe combined immunodeficiency*, SCID), as quais não possuem linfócitos T e B, entretanto, preservam células do tipo NK, macrófagos e apresentadoras profissionais de antígeno e sistema complemento (The Jackson laboratory communication, 2000). Os animais *Specific Pathogen Free* (SPF) foram fornecidos pelo CEMIB e mantidos grupos de mesma idade de no máximo 5 animais por unidades do tipo micro-isoladoras, mantidas em “racks” cuja temperatura controlada variava de 20°C a 25°C, e com ciclo de fotoperíodo de 12/12 horas, todo aparato alocado no Departamento de Imunologia. Os animais recebiam água e ração estéreis *ad libitum* trocadas três vezes por semana para manutenção da qualidade SPF. Dez dias antes ao início do tratamento com cisplatina, 1×10^6 células derivadas de NG97 foram inoculadas subcutaneamente no dorso dos animais, que foram então acompanhados, dia a dia para verificação do aparecimento de massa tumoral. Após aparecimento do tumor com volume em médio de $1,6 \text{ cm}^3$, o crescimento do tumor foi registrado diariamente. O volume foi determinado através da equação descrita por Lung, et al (2005) representada por $V = \pi/6(d_1 \times d_2)^{3/2} \times k$, onde k é constante empírica = 0.67, d_1 é o diâmetro tumoral menor e d_2 o diâmetro tumoral maior e o resultado do volume é apresentado em cm^3 . Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética

em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da Unicamp (conforme certificado anexado ao documento de tese - Anexo I).

3.6.3. Procedimento experimental de tratamento: Dezenove animais desenvolveram massa tumoral e foram utilizados para o procedimento. Os grupos foram divididos em 9 animais controles e 10 tratados, em duplas cujos volumes tumorais apresentavam-se similares para o início do tratamento. Uma vez atingido o volume médio, um dia após foi inicializada a administração das doses de tecnoplatine® 10mg/10mL (princípio ativo, Cisplatina, marca zodiac) via intra-peritoneal conforme descrito em literatura (Hyppolito, et al 2005). Conforme mesmos autores a dose indicada utilizada foi de 8µg/g de peso do animal/dia para cada animal tratado, totalizando 3 doses por animal sendo recomendado o intervalo de um dia entre uma dose e outra. Seguindo-se o mesmo protocolo de experimentação os animais controle recebiam a mesma quantidade em volume de solução fisiológica injetável, por mesma via.

3.6.3.1. Análises histológicas: Finalizada a exposição à droga ou ao soro fisiológico, as massas tumorais, o fígado e o rim direito dos animais tratados e controles foram fixadas em tampão formalina por 24 horas, lavados, desidratados em gradientes alcoólicos 70%, 80%, 90% e 100%, seguindo-se por três banhos de xilol, xilol/parafina (v/v) e finalmente incluídos e emblocadas em parafina para secção em micrótomo, coloração Hematoxilina/Eosina e análise histológica.

3.7. Análise estatística: Os resultados de volume tumoral e peso dos animais tratados ou controle, receberam tratamento estatístico realizado através dos programas: Graph prism 4.0 (Mackiev,software 1999-2000) e OriginPro 7.5 para avaliação por análise de regressão linear simples e teste “t” não pareado.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. O arranjo ultraestrutural das células NG97 *in vitro*

O perfil morfológico foi descrito a partir da observação de diferentes passagens das células NG97 em cultivo, revelando que estas células mantêm a uniformidade ultraestrutural ao longo do subcultivo celular. As principais observações foram definidas por células indiferenciadas com anormalidades que designam à célula um perfil maligno. As características ultraestruturais encontradas e relacionadas a tumores foram: presença de citoplasma denso com organelas alteradas, polirribossomos, núcleos bizarros com invaginações e nucléolos proeminentes localizados próximos a membrana nuclear. Em adição, as passagens celulares apresentaram um citoplasma com grande quantidade de extensões do tipo vilosidades com filamentos de actina e filopodias, corroborando os estudos anteriores de descrição morfológica da linhagem por microscopia eletrônica de varredura.

Para exemplificar algumas das características ultraestruturais observadas em todas as passagens de células NG97, na passagem 19 (fig. 3) a representação típica das características morfológicas observadas. A imagem da superfície celular mostrou numerosos microvilos com filamentos de actina no seu interior, e grande quantidade de mitocôndrias anômalas e inchadas, endossomos multivesiculares, complexo de golgi distendidos próximos ao retículo endoplasmático e alguns vacúolos no citoplasma (fig. 3).

Em passagens mais tardias (micrografias das passagens 80 e 89, figura 4) da linhagem NG97 foram demonstradas a disposição ultraestrutural do tecido, com as células e suas inter-relações de membranas.

Figura 3: Micrografia de células na passagem 19 representativa de algumas alterações comuns encontradas na linhagem NG97. Estas imagens mostram (A) microvilos (vv), (B) filamentos de actina (seta), (C) Reticulo endoplasmático rugoso distendido (ERD), mitocôndrias anômalas e inchadas (M). Em maior nível de detalhamento podem ser observados nos detalhes (D) endossomos multivesiculares (seta) e (E) complexo de Golgi distendido (seta). Barra: (A) 1,21 μ m, (B) 201nm, (C) 2,01 μ m, (D) 201nm e (E) 435nm.

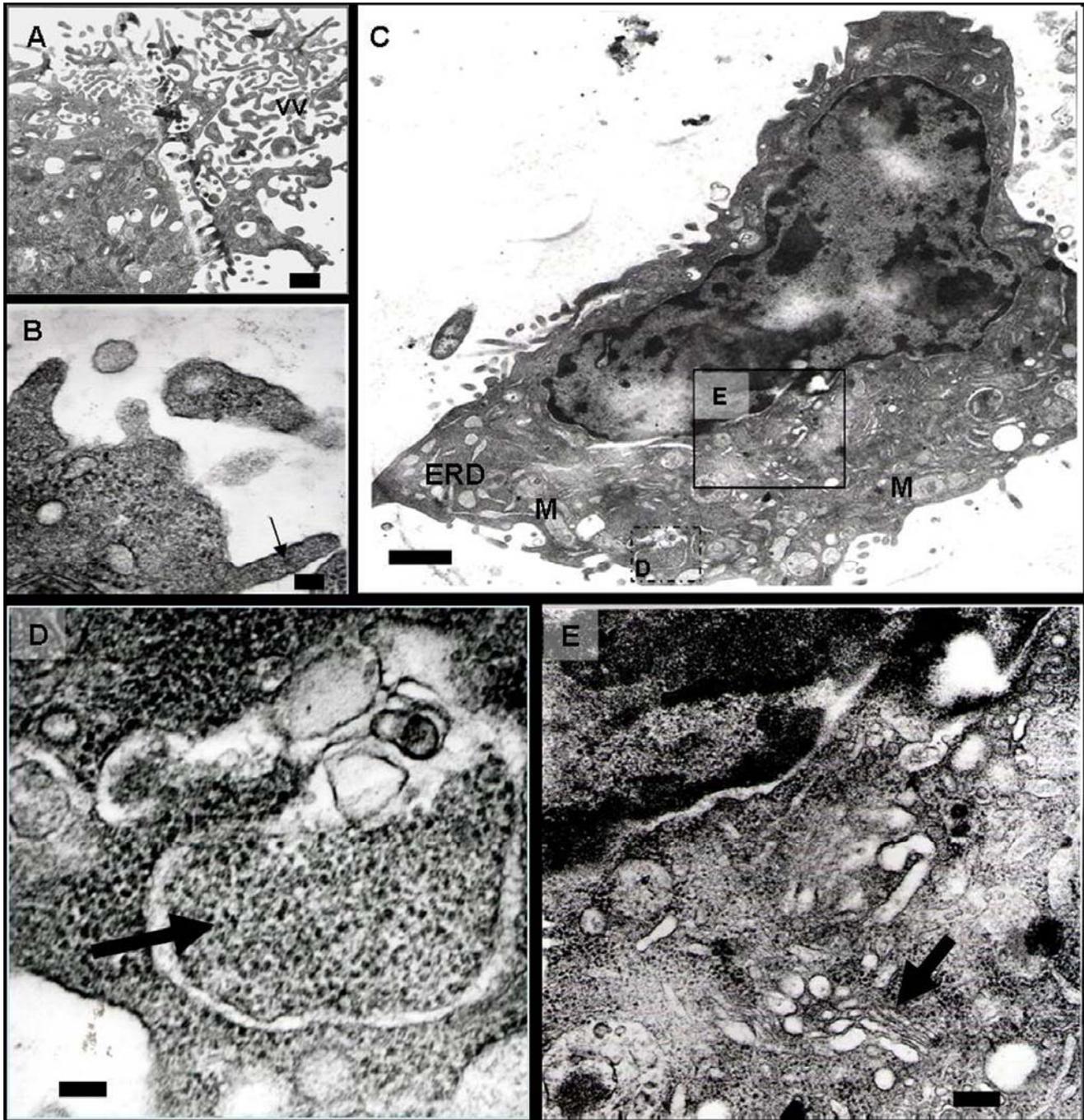


Figura 3

Figura 4: (A e B) Imagens das células NG97 na passagem 80 revelando as heterogeneidades nucleares, representadas por núcleos de diferentes tamanhos e diferenças na proporção núcleo-citoplasma de uma célula a outra e, além de células apresentando polimorfismo nuclear com nucléolos proeminentes (n) localizados em região próxima a carioteca. Em “A” é possível notar a presença de um micronúcleo (μ N) e em (B) invaginações de membrana (MI) e alguns filopodias desprovidos de arranjo tridimensional perdido durante o processamento (F) com grande quantidade de vacúolos elétrons lúcidos (*). (C) Imagem da passagem 89 ressaltando as extensões do tipo filopodia com arranjo tridimensional preservado e corpúsculos multivesiculares (#). (D) Em algumas micrografias é possível demonstrar conteúdo elétron-lúcido em vacúolos (*) próximos a membrana citoplasmática de células com núcleo de padrão migratório. Barra: (A) 10 μ m, (B) 6 μ m (C) e (D) 2 μ m .

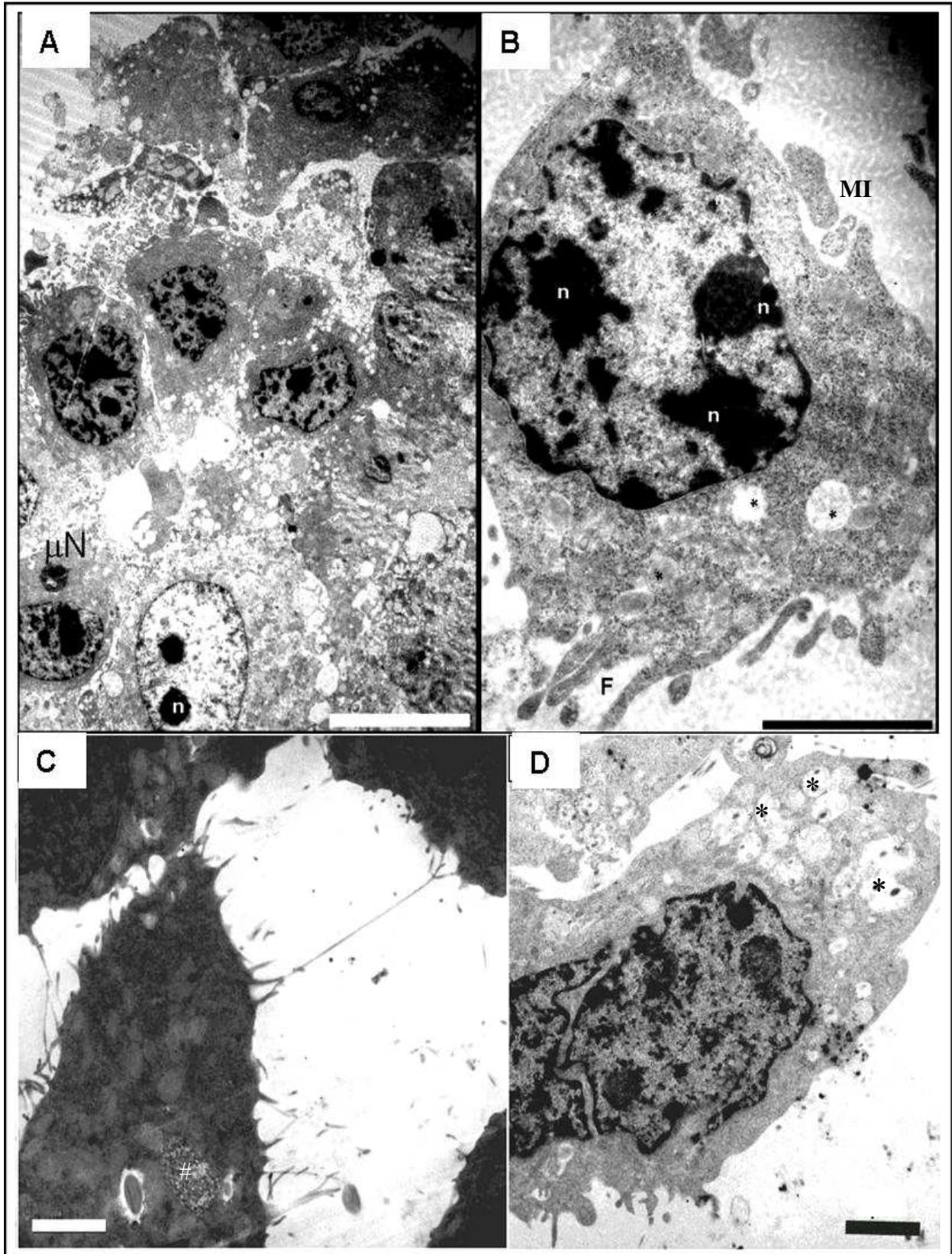


Figura 4

Dentre estas ultraestruturas observadas nas células NG97 em monocamada podemos descrever: heterogeneidades nucleares relacionadas à forma, tamanho e quantidade por célula com presença de micronúcleos, combinada a uma relação núcleo/citoplasma anormal. Os micronúcleos e núcleos extras observados podem ser originados a partir de eventos de instabilidades do tipo perdas cromossomais onde são gerados fragmentos que ao final da divisão celular são desigualmente arrastados por fibras em fusos multipolares, seguidos de recuperação da membrana nuclear, mas sem integração com o núcleo da célula filha (fig. 4A). Eventualmente células vacuolizadas gigantes eram observadas com conteúdo vacuolar amorfo elétron lúcido no interior dos processos celulares. Esta grande quantidade de vacúolos observada corresponde a lipídeos que foram removidos pelo processamento de desidratação alcoólica durante o processamento das amostras. Além disso, nas amostras algumas estruturas de extensões de membrana do tipo filopodia são visualizadas (fig. 4B e 4C). Ainda, as micrografias da ultraestrutura da monocamada da passagem 89 exemplificam os corpos multivesiculares (fig. 4C) geralmente observados na NG97. Além disso, é possível evidenciar um núcleo com ultraestrutura de distensão e alongamento compatível com um padrão de núcleo compatível com o de uma célula em processo migratório (fig. 4D).

Por último, uma estrutura elipsoidal distinta foi observada apenas na monocamada das células de diferentes passagens submetidas ao segundo processamento (fig. 5). Estrutura idêntica foi evidenciada no artigo publicado por Rutka *et al.*, (1986) *figura 5*, quando os autores caracterizavam a linhagem celular SF-539 BT derivada de gliosarcoma humano. O elipsóide flexível elétron-denso mede 0,5 µm por 1µm em seus diâmetros, menor e maior com uma estrutura central de concreção (fig. 5A). Algumas destas estruturas são evidenciadas livres no espaço intercelular e na membrana basal (fig. 5B).

Figura 5: Imagens representativas da estrutura elipsóide vista em passagens diversas das células NG97. **(A)** Células da passagem 23 mostrando exuberantes extensões de membrana (seta) e a estrutura elipsóide dentro do citoplasma (cabeças de seta brancas) e **(B)** livres no espaço intercelular (seta). **(C)** Imagens do elipsóide (passagem 61) com concreções possivelmente de cálcio na região central (seta) e em diferentes regiões da célula: (1) próxima ao núcleo, (2) no espaço pericitoplasmático e (3) perto da membrana (seta). **(D)** Notar extensões citoplasmáticas do tipo pseudopodos e vesículas interagindo com os mesmos em células da passagem 89 (seta). Barra: (A) 5 μm , (B) 5 μm , (C) 2 μm e (D) 2 μm

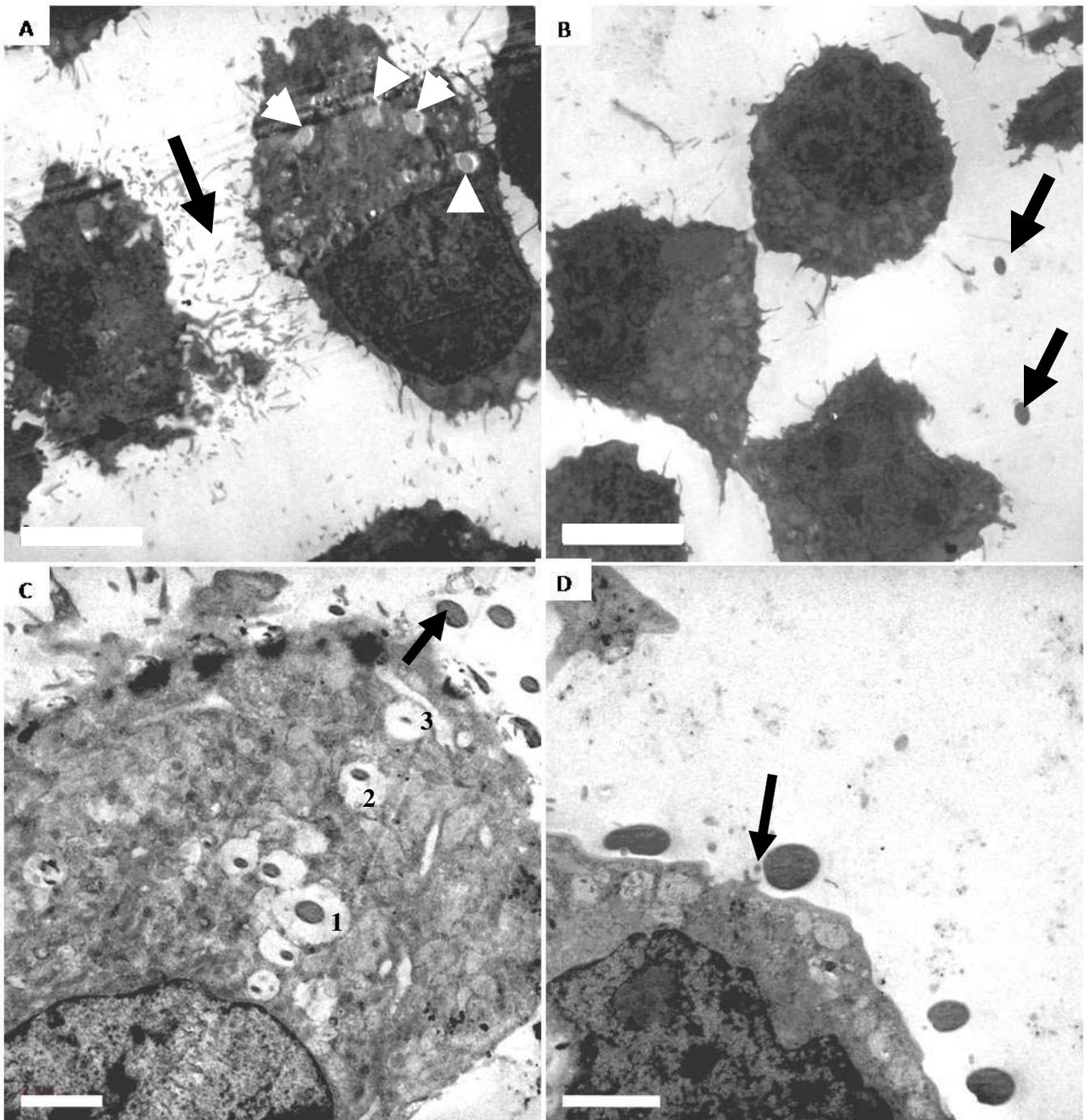


Figura 5

Ainda, esta estrutura elipsoidal aparece envolvida por uma fina camada monolipídica, dentro de espaços citoplasmáticos e em diferentes regiões da célula: próximas ao núcleo, no espaço pericitoplasmático e próximas a membrana plasmática (fig. 5C). É importante ressaltar que algumas estruturas de extensões citoplasmáticas como pseudopodos que poderiam interagir com o elipsóide através de vesículas possivelmente liberadas das células (fig. 5D).

4.2. A citomorfologia e a diminuição da dependência de ancoragem das células ao substrato

4.2.1. Expressão de filamentos intermediários: GFAP, Vimentina e Neurofilamento

Para avaliar o padrão de expressão dos filamentos intermediários de citoesqueleto ao longo do subcultivo das células NG97 passagens baixas (até a passagem 50), intermediárias (intervalo entre 51 a 79) e altas (da passagem 80 em diante) foram selecionadas para a experimentação.

Através da análise imunocitoquímica, demonstrou-se que as expressões de conformação funcionais de GFAP e vimentina seguem um padrão modulatório ao longo do subcultivo. A GFAP aparece intensamente marcada no citoplasma de 100% das passagens baixas (19) (Fig. 6A), apresentando-se positiva no citoplasma de 85% das células da passagem 30 (Fig. 6B). Em passagens intermediárias, como a passagem 51 (Fig. 6C) foi observada ausência de células positivas para GFAP em 100% das células, permanecendo o mesmo padrão em passagens altas (passagem 80) (Fig. 6D).

Em contrapartida, com relação à expressão de vimentina é visto inicialmente total ausência de marcação citoplasmática para a vimentina nas passagens baixas (21) (Fig. 6E) progredindo a fraca marcação em passagens intermediárias (40) (Fig. 6F). Aproximadamente em 54% das células de passagens intermediárias, como a passagem 59, apresentaram marcação moderada (Fig. 6G) e por último nota-se hipermarcação em 100% na passagem 83 (Fig. 6H).

Além dos filamentos intermediários descritos anteriormente, a expressão do Neurofilamento não foi observada ao longo das passagens, embora algumas células possuíssem morfologia semelhante ao corpo celular de neurônios multipolares (Fig 7).

Figura 6: Imunocitoquímica para detecção de perfil modulatório de expressão negativa do filamento intermediário de citoesqueleto GFAP (A,B,C e D) e positividade para vimentina (E,F,G e H) nas células NG97 ao longo do subcultivo celular. (*Aumentos originais: A – C e E - G= 200x; e D e H = 1000x*) (*Controles positivo e negativo foram realizados entretanto não estão aqui representados*).

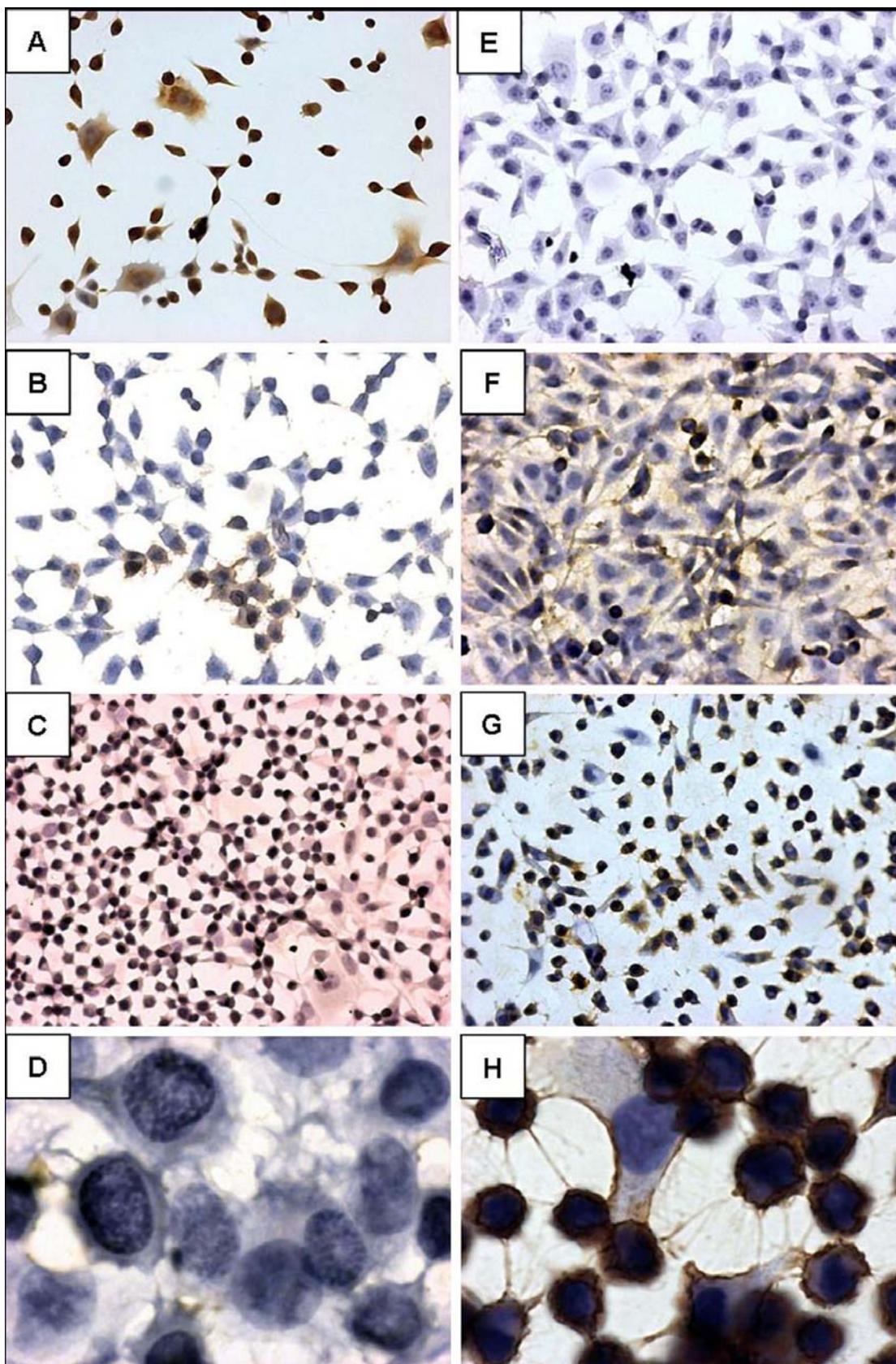


Figura 6

Figura 7: (A e B) Imagens representativas de ausência do NF em células NG97 da passagem 26, embora algumas células possuam uma morfologia de neurônio multipolar. (C) Biópsia de cérebro normal como controle positivo da reação e (D) células NG97 como controle negativo (*aumento original: A e B=200X, C= 600X e D=200X*).

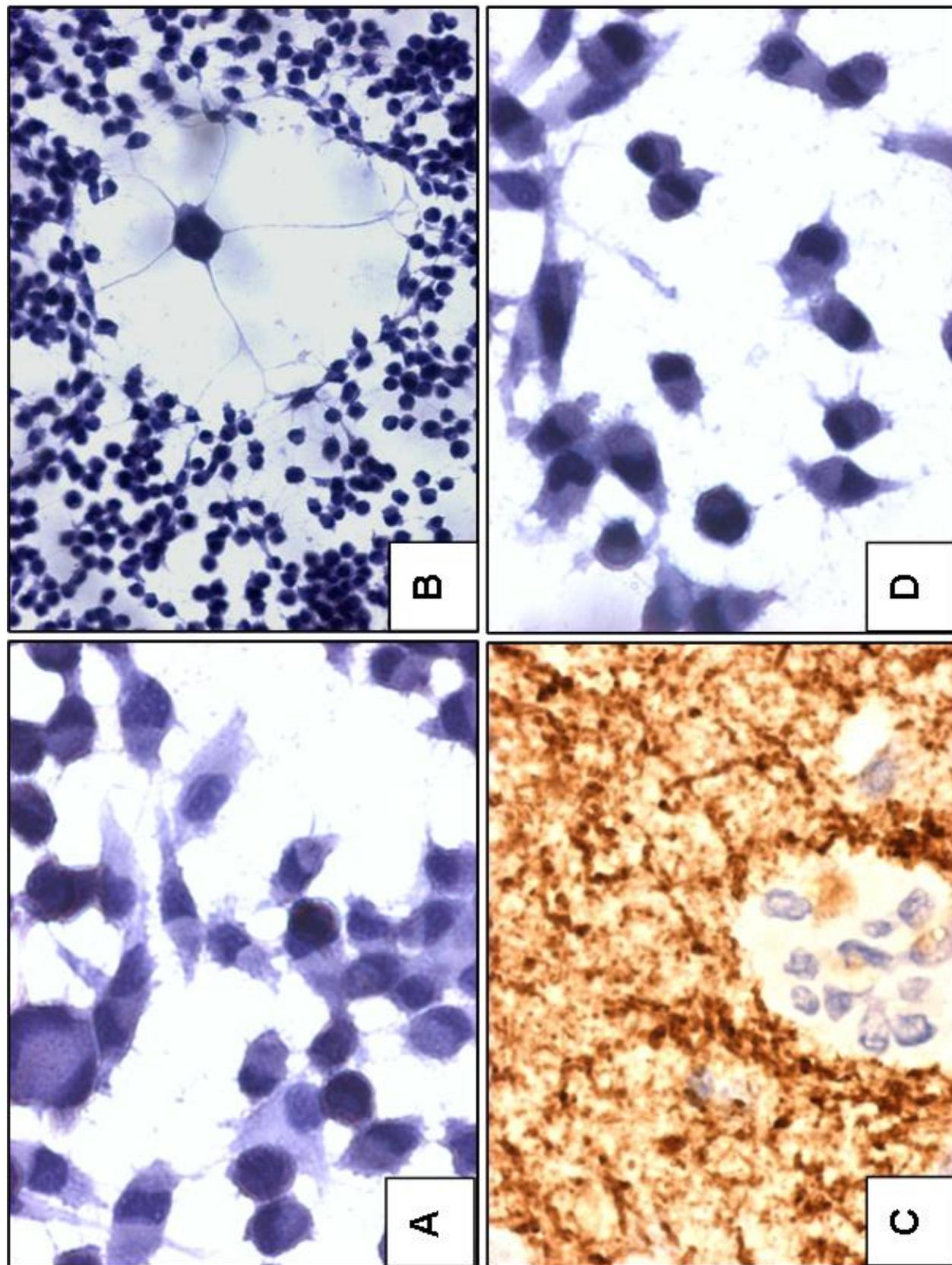


Figura 7

4.2.2. A Expressão de fibronectina e laminina e respectivos receptores de adesão

As moléculas relacionadas a interação de adesão e desadesão são capazes de desencadear sinalização e disparar diferentes processos em células de gliomas. Aqui foram examinadas nas células NG97: as subunidades $\beta 1$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ e $\alpha 6$ formadoras de integrinas, fibronectina, laminina e CD44.

Através de citometria de fluxo foi demonstrado que o perfil de expressão das subunidades $\beta 1$ e $\alpha 5$ apresentam-se moderado e alto, respectivamente. Entretanto, as subunidades $\alpha 4$ e $\alpha 6$ de integrinas não foram detectadas nas células NG97 (tabela 2).

Os ligantes de integrinas foram demonstrados por imunofluorescência (fig. 8) e caracterizaram-se por estarem expressos na matriz ou no citoplasma das células NG97. Assim foram demonstradas baixas quantidades de fibronectina e laminina como depósitos pontuais ou dispersos na de matriz extracelular. Em adição, demonstrou-se grande quantidade de fluorescência para tais proteínas na região intracelular citoplasmática, sobretudo em células que apresentavam padrão migratório. Esta positividade é mais intensa em regiões celulares onde ocorrem extensões de membrana do tipo filopodia e lamelipodia direcionadas para migração das células, onde é evidenciada intensa marcação para fibronectina (Fig. 8A) e, em nível maior para laminina (Fig. 8B). Os controles positivos, aqui representados pelas células de linhagem TPHN (Fernandez et al, 1994) apresentaram padrão de intensidade de fluorescência semelhante ao das células NG97, como demonstrados na figura 8C e 8D.

Tabela 2: Média da porcentagem de células marcadas por citometria de fluxo das subunidades de integrinas em passagens baixa (22), intermediária (54) e alta (92) de células da passagem NG97.

Subunidades de integrinas	NG97*
α 4 (CD49d)	0,0
α 5 (CD49e)	95,0
α 6 (CD49f)	0,0
β 1 (CD29)	54,0

**Valores representativos da porcentagem de marcação em 10^4 células NG97 em análises de passagens baixas, intermediárias e altas. Controles positivos com células de linhagem TPHN foram realizados, porém os dados não estão aqui representados.*

Figura 8: Imunofluorescência para fibronectina e laminina nas células NG97. Células da passagem 20 em cultivo com expressão de (A) fibronectina e (B) laminina. A fibronectina caracteriza-se por intensa deposição na matriz extracelular (*). Ambas caracterizam-se por apresentarem padrão citoplasmático difuso com áreas de deposição pontual na matriz (#) e aumento de polimerização em extensões citoplasmáticas do tipo lamelipodia e filopodia (seta). Imagens representativas do controle negativo (C) e controles positivos para fibronectina (D) e laminina (E) em células da linhagem estabelecida TPHN (Aumento original: 400X).

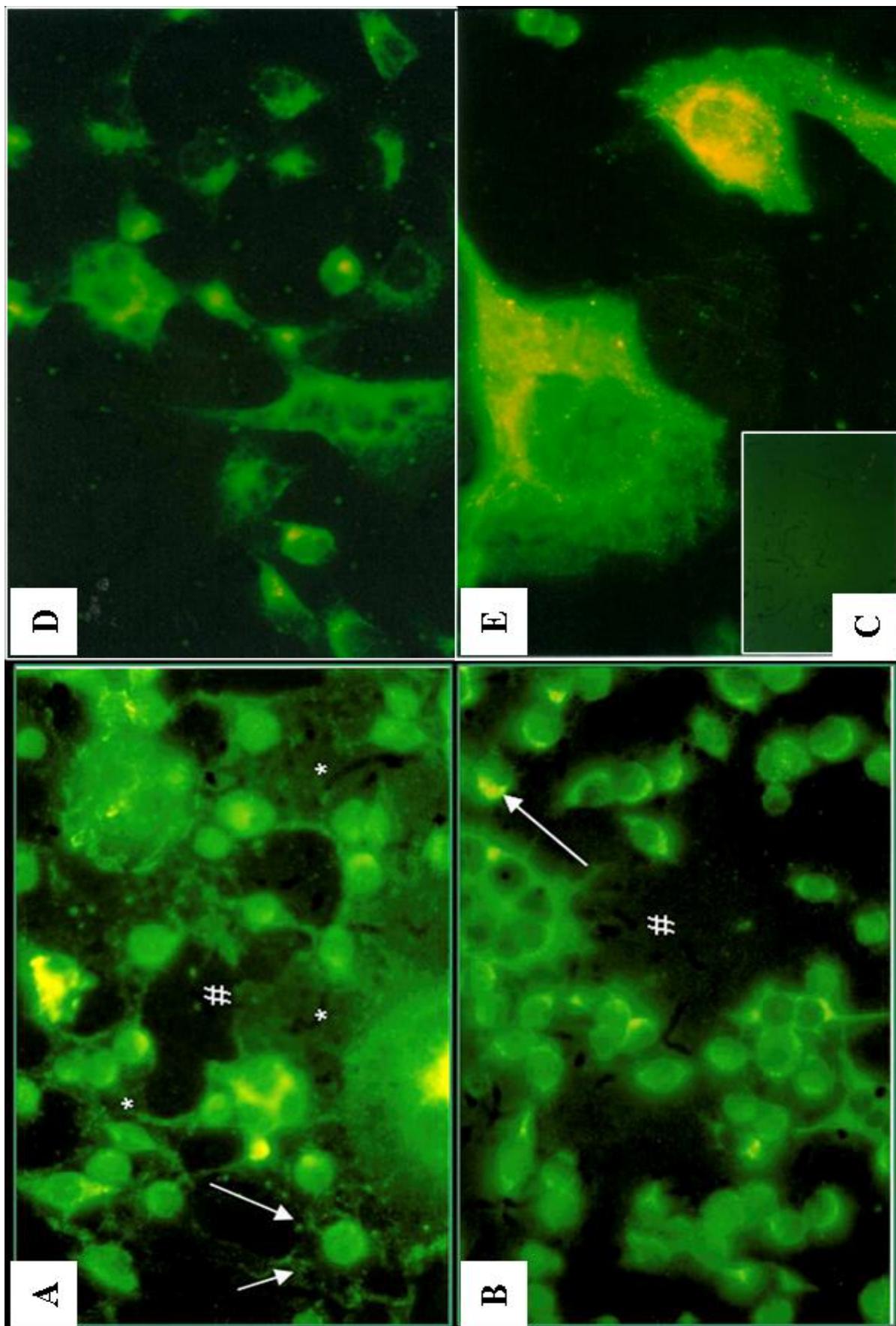


Figura 8

E finalmente, quanto a expressão da glicoproteína de adesão CD44 (humana) não foram detectadas células da linhagem NG97 com marcação imunocitoquímica apesar de as células apresentarem coloração diferencial positiva para componentes glicoprotéicos na superfície celular (dados não mostrados). Assim, quando as amostras foram testadas para anticorpos que reconhecessem CD44 murino, por citometria de fluxo, encontrou-se positividade em 100% das células (tabela 3).

4.2.3. Desenvolvimento e formação da estrutura organotípica

Ao serem cultivadas em filme de ágar 2% as células de passagens baixas da NG97 (21) demonstravam-se independentes de adesão ao substrato e capazes de desenvolver agregados hipercelulares esferóides (Fig.9A e 9B). Em mesma situação de cultivo, passagens de subcultivo intermediário e alto (61 e 89) desenvolveram os mesmos agregados esferóides hipercelulares além de estruturas organizadas que seriam uma espécie de suporte para tais agregados (Fig 9C), que finalmente organizavam-se acima (Fig. 9D) das mesmas e desenvolver uma estrutura dotada de cavidade (Fig 9E). Em alguns destes organóides na interface da região cavitada as células apresentam morfologia epitelióide cúbica semelhante a estrutura celular ependimal presente nos ventrículos cerebrais (Fig. 9F).

Tabela 3: Resultados de porcentagem de células marcadas por imunistoquímica e citometria de fluxo para CD44 em diversas passagens das células NG97.

Marcadores	Baixa	Intermediária	Alta
CD44 (IHQ¹)	0	0	0
CD44 (CF²)	100	100	100

¹Valores representativos da porcentagem de marcação por imunistoquímica com anticorpo anti-CD44 humano em células NG97 da passagem 20, 60 e 80.

²Valore de porcentagem de fluorescência em 10^4 células por citometria de fluxo com anticorpos anti-CD44 murina em células da passagem 22, 48 e 73.

Figura 9: (A) Imagem macroscópica de estruturas organotípicas desenvolvidas em passagens baixa (21), intermediária (61) e alta (89) nas células NG97. (B) Células da passagem 20 onde são evidenciados agregados hipercelulares esferóides. (C) e (D) Células de passagem 61 e 89 respectivamente, ilustrando a organização de células de suporte (seta) a formação de um conjunto de esferóides. (E) e (F) Imagens da passagem 61 ilustrativas de formação de estrutura cavitária com região de encontro de pólos opostos (cabeça de seta) e células de morfologia epitelial cubóide.(Aumento original: de B-D, 80x e em E e F de 32X).

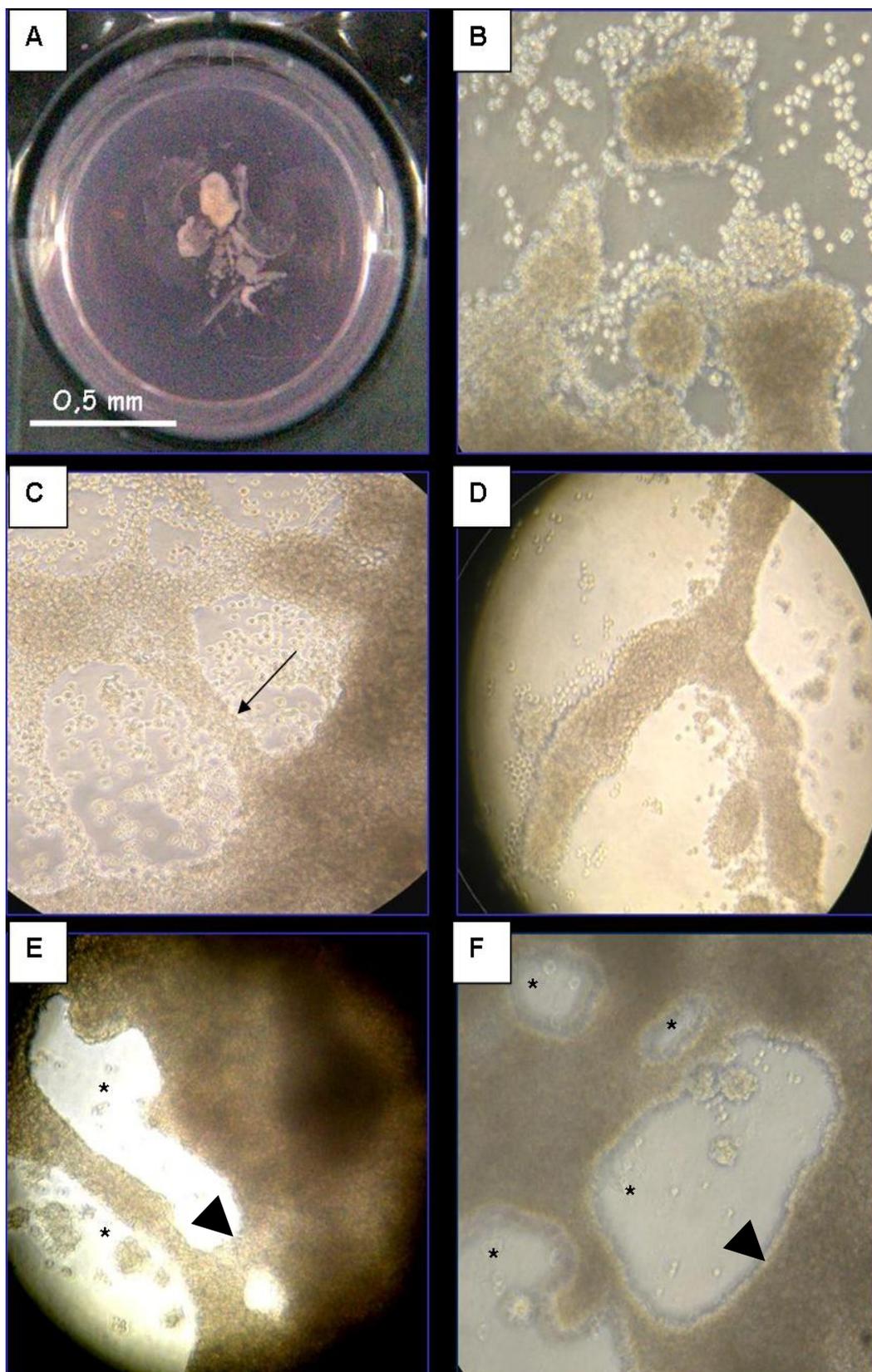


Figura 9

4.3. Ausência de moléculas de interação com o sistema imune

Não foi detectada a expressão de moléculas HLA I, II, CD95, TGF β e B7 (CD80) nas células NG97 por reação imunoistoquímica para passagens baixas, intermediárias ou altas (Tabela 4).

Tabela 4: Reações imuncitoquímicas de diferentes passagens celulares da linhagem NG97.

Marcador	NG97			Controle Negativo	Controle positivo*
	baixa	intermediária	alta		
HLA-ABC	-	-	-	-	++
HLA-DR	-	-	-	-	+++
B7	-	-	-	-	+
TGF β	-	-	-	-	++
CD95	-	-	-	-	NR

* Os resultados são demonstrativos de diferentes padrões de positividade das células . O *score* determinado foi: ++ (positivo em até 50%) ou +++ (positivo em 100% das células). NR= não realizado. As passagens utilizadas foram: P27 (baixa), P52 (intermediária) e P80 (alta).

4.4. As anormalidades citogenéticas

As células NG97 demonstraram-se extremamente instáveis cromossomicamente. Inúmeras alterações do tipo quebras, figuras de fusão entre cromossomos e figuras de ponte intercromátides foram demonstradas pela coloração de banda G (Fig. 10A). Além disso, várias regiões de heterocromatina, cromossomos acrocêntricos e dicêntricos foram visualizados (Fig 10B). A análise de 100 metáfases da passagem P20 evidenciou mais de 50 aberrações numéricas e estruturais.

O número modal de cromossomos atribuído a estas células foi de 63, com 91% das células apresentando hiperdiploidia, e em 90% das metáfases foi observada uma variação de 20 a 49 cromossomos acrocêntricos. A avaliação e emparelhamento destes cromossomos acrocêntricos demonstrou a presença de cromossomos com estrutura e padrão de coloração GTG compatíveis com origem murina (Fig. 11).

Figura 10: Imagens digitalizadas de metáfases da linhagem celular NG97. Cromossomos em banda G (A e B) na resolução de 400pb demonstrando instabilidades cromossômicas como: figuras fusão (setas brancas), (B) de ponte (seta preta) e cariótipo humano. Notar a grande quantidade de cromossomos acrocêntricos e marcadores. (C) Metáfase com padrão de banda CGC demonstrando cromossomos acêntricos (Φ), dicêntricos (cabeça de seta) com regiões de coloração homogêneas (*). (D) Padrões de banda CGC com as mesmas alterações descritas em “C” porém com regiões de heterocromatinas melhores evidenciadas (*). Micrografia obtida pelo negativo de imagens de cromossomos metafásicos corados por DAPI (Aumento original: 1200X)

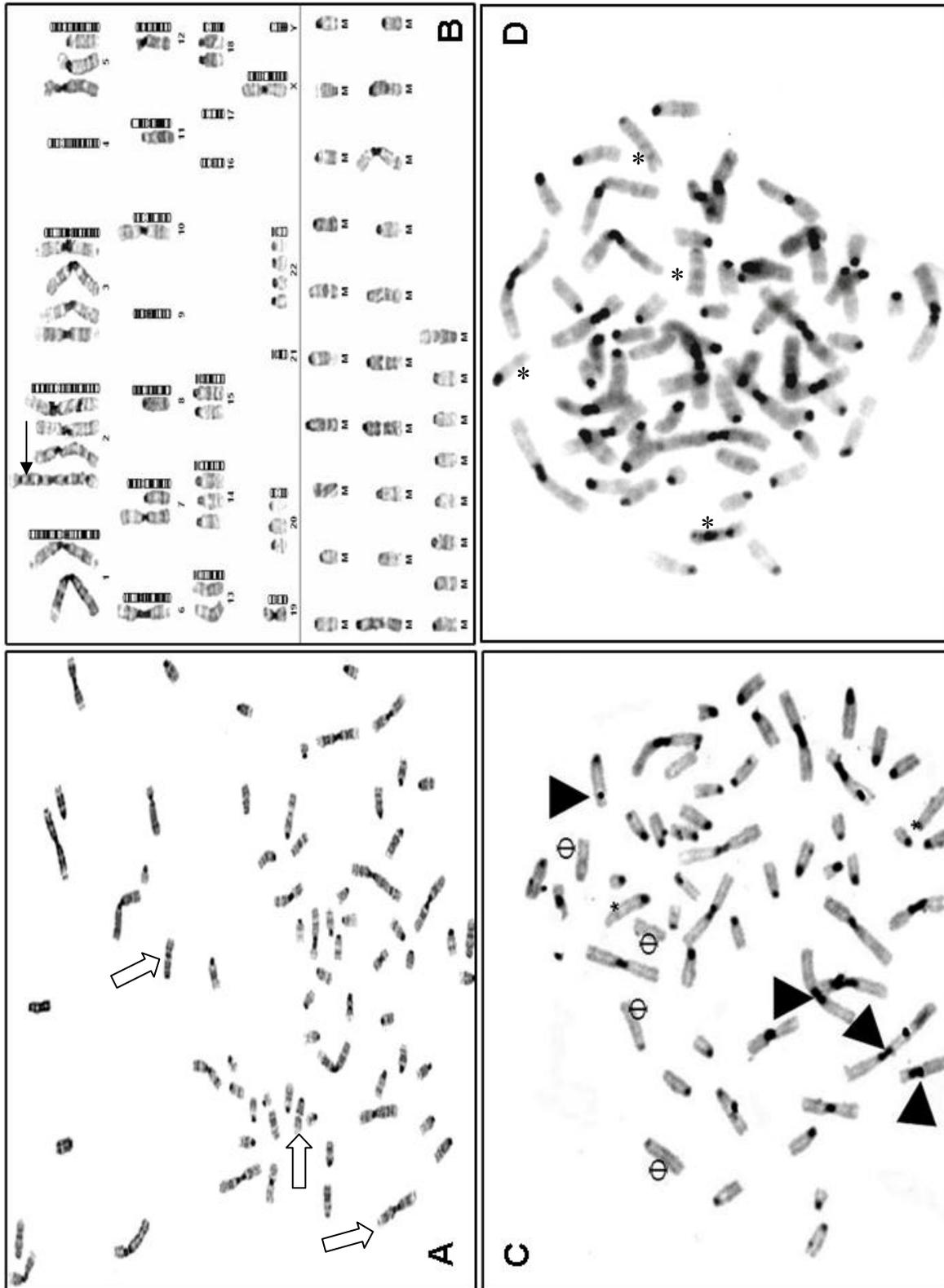


Figura 10

Figura 11: Representação do cariótipo de cromossomos murinos presentes nas células NG97. Notar a presença de alterações originadas a partir de translocação: fusões (fus) intercromossomais, isocromossomos (i), trissomias, tetrassomias e inversões (inv) pericêntricas

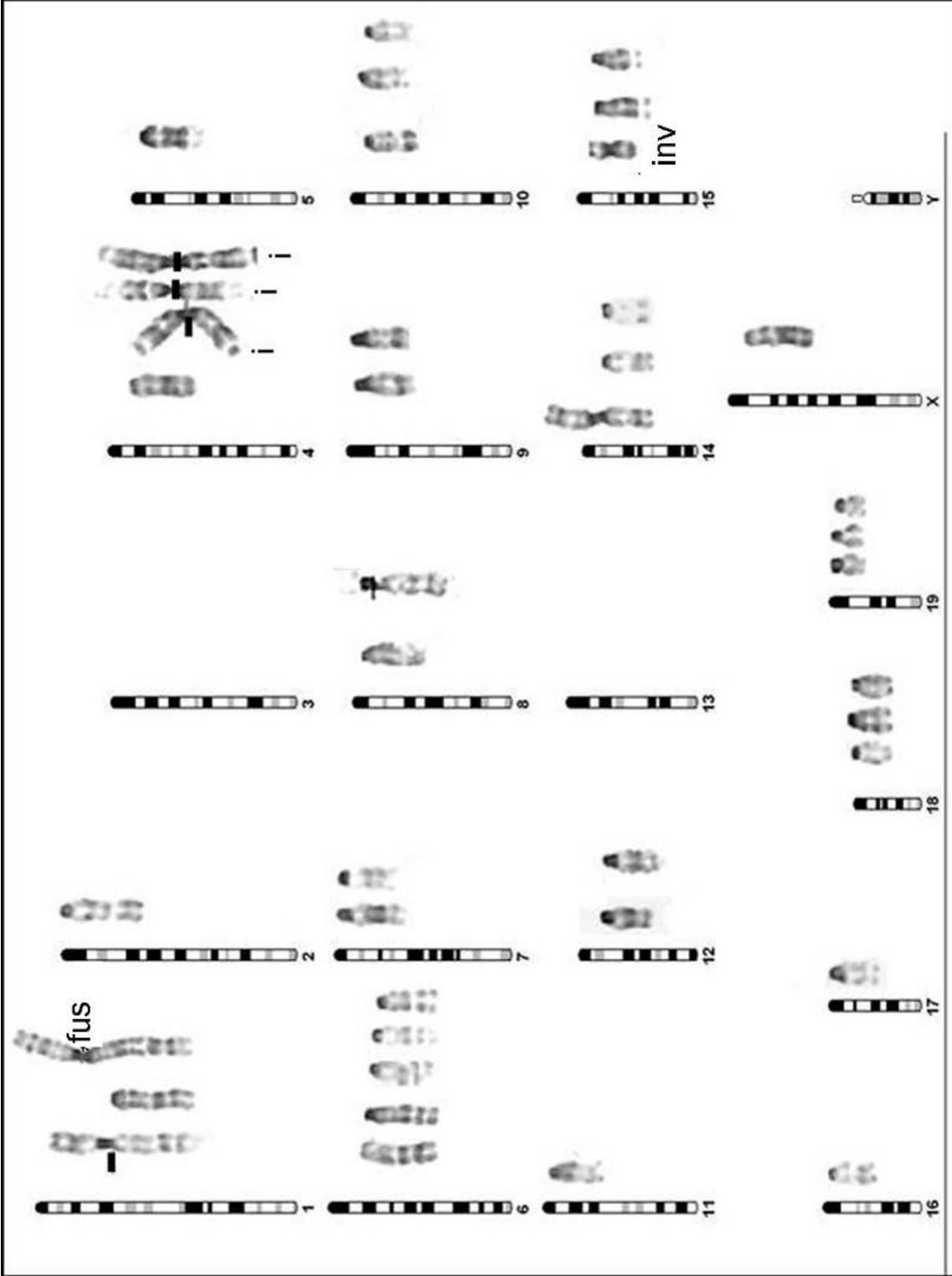


Figura 11

4.4.1. Análise do gene Her-2/neu

A linhagem NG97 foi classificada como negativa para expressão do gene codificante do receptor de fator de crescimento epidermal Her-2/neu, uma vez que, apesar da existência de células interfásicas com sinal amplificado, estas representam menos de 1% do conjunto de células (Fig. 12).

Figura 12: Núcleos interfásicos corados com DAPI e representativos de reação de FISH Her2/neu . (A) Notar a presença de amplificação do sinal de Her2/neu (rosa) (detalhe em 1000x de aumento à direita) em quase 4 vezes e ausência de marcação de núcleos de células da linhagem NG97. O sinal representado em verde corresponde ao controle de centrômetro do cromossomo 17 onde há a seqüência de Her-2neu. (B) Alguns núcleos de células NG97 com sinais positivos porém com ausência de sinal controle verde. (Aumentos 600x em A e B respectivamente)

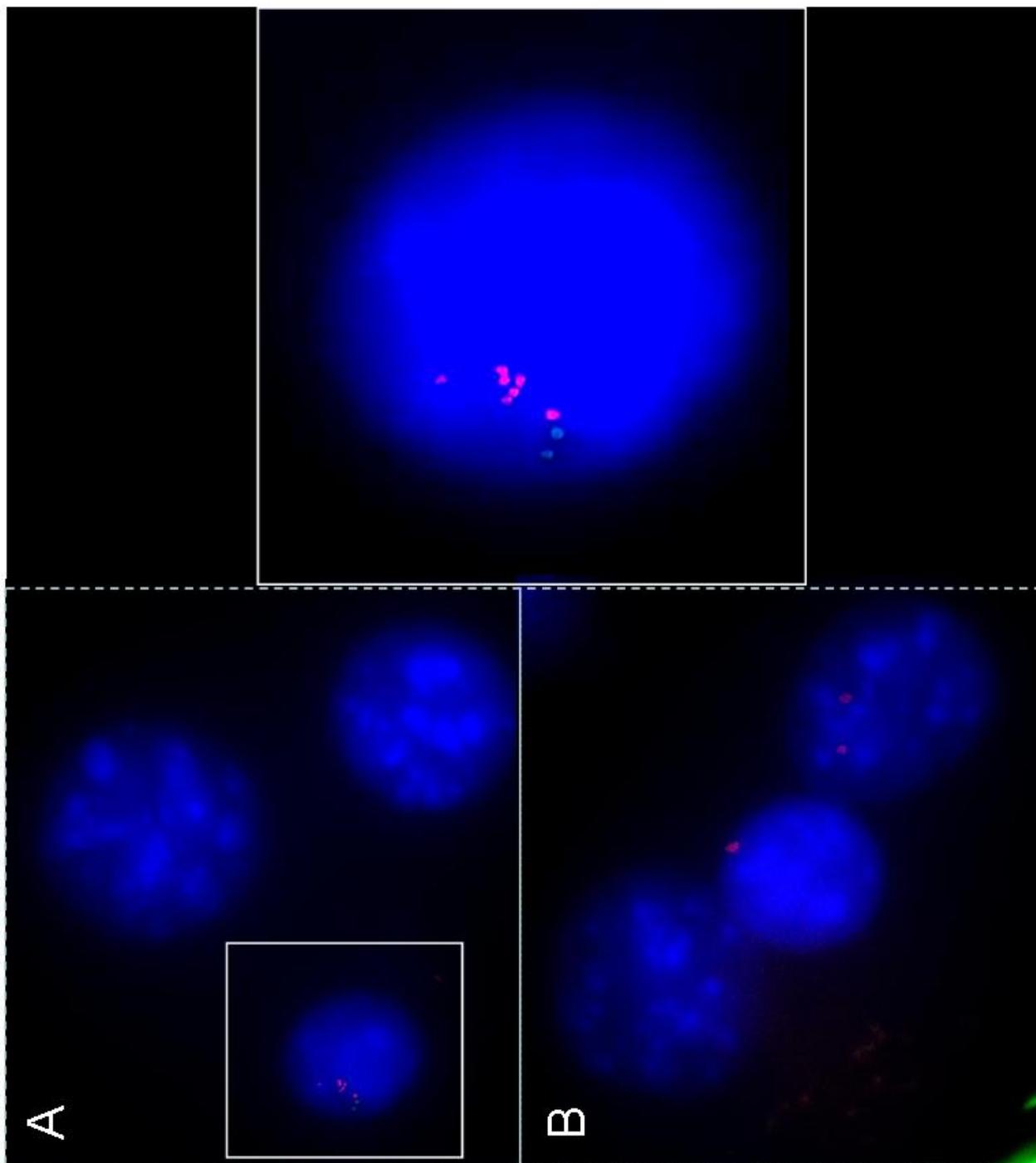


Figura 12

4.5. A sensibilidade a drogas

4.5.1. Tratamento das células NG97 com cisplatina *in vitro*

As células da linhagem NG97 quando expostas ao tratamento de Cisplatina *in vitro* demonstraram-se sensíveis ao agente quimioterápico na medida em que uma diminuição de viabilidade foi detectada quando estas células eram expostas a diferentes concentrações e o padrão de interferência no crescimento das células é demonstrado no gráfico 1, correspondendo a um padrão dose-resposta em concentrações superiores a 100 μ g/mL correspondentes a um limite de 250 μ g/mL (dado não mostrado).



Gráfico 1: Quantidades de células azul de tripan negativas (viáveis) e positivas (inviáveis) obtidas a partir de contagem de viabilidade celular por azul de tripan após a exposição a diferentes concentrações de cisplatina.

4.5.2. Análise *in vivo*

As observações da ação biológica de cisplatina nas células da linhagem NG97 foram realizadas através da inoculação das células, subcutaneamente no dorso camundongos CB17/ SCID com diferentes idades. O grupo apresentava animais com idades de 15 (n=7),

10 (n=10), 7 (n=1) e 5(n=2) semanas com peso inicial médio de 19,29g ($\pm 0,8$ de desvio padrão médio). À exceção de um animal com idade de 10 semanas, todos os demais desenvolveram tumor, demonstrando que a diferença de idade não interfere no desenvolvimento e aparecimento da massa tumoral. É importante descrever que as células da linhagem quando inoculadas nos animais desenvolveu massa tumoral com vascularização tal, que alguns vasos adjacentes à derme acabara rompendo-se e desenvolvendo escarificação. Também foram observadas exuberante vascularização, com a presença de um vaso central de grande calibre (por alta pressão vascular no microambiente) e vasos anastomosados como componentes do sistema vasculatório tumoral. Contudo, a massa tumoral formada não demonstrou invasão nos tecidos adjacentes, apresentando uma matriz própria com conexão à derme do animal.

Este padrão é demonstrado em todos os animais inicialmente, entretanto, a partir da primeira dose nos animais tratados com a cisplatina ocorre a diminuição macroscópica estimada em 10% do tamanho da massa tumoral. Quando consideramos as medidas de volume e comparamos o intervalo entre a primeira e a última dose nos animais tratados podemos dizer que há uma redução média de 86% no volume tumoral. Em contrapartida nos animais controle ocorre um aumento macroscopicamente visível, muitas vezes com desenvolvimento de outras massas tumorais adjacentes orientadas em grande parte dos casos aos membros dianteiros dos animais. A comparação entre o primeiro e último dia de dose placebo (soro fisiológico) demonstra um acréscimo médio de 39,7% no volume tumoral. Através da análise estatística é possível confirmar que o tratameto com a cisplatina diminui o tamanho da massa tumoral com relação direta ao parâmetro tempo, e a mesma aparece reduzida em animais controle (grafico 2). Estes animais controle apresentam crescimento tumoral progressivo quase exponencial e em alguns animais,

entretanto, a condição geral de saúde dos animais controle apresentava-se melhor do que os animais tratados. Alguns sinais de acometimento fisiológico foram observados no grupo tratado como diarreia, com presença de sangue nas fezes, pelo arrepiado (temperatura corpórea elevada) e diminuição de agilidade. Um total de quatro animais foram a óbito antes do término do tempo experimental, dentre eles um foi a óbito após a primeira dose e os demais após a inoculação da terceira dose. Nenhum animal do grupo controle apresentou os efeitos observados no grupo tratado ou morreram durante o tempo experimental. Dois animais apresentaram desenvolvimento inicial do tumor mais lento e por este motivo o início da experimentação e administração de doses ocorreu após aos demais animais, assim no gráfico *volume tumoral versus tempo* (gráfico 2) de tratamento o dia “7” é representativo de apenas dois animais (tratado e controle).

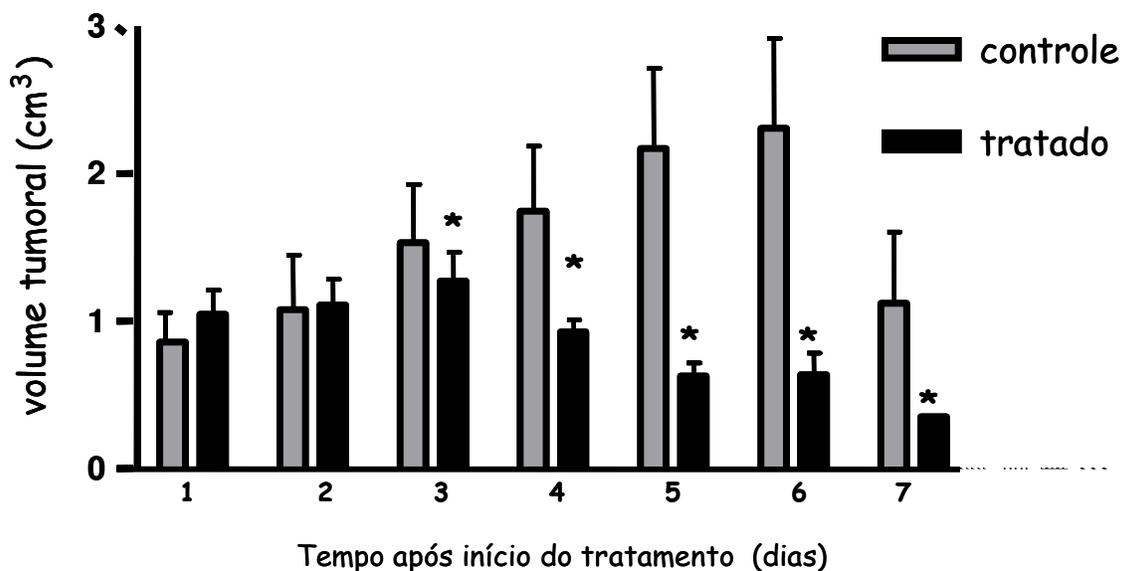


Gráfico 2 : Diagramas correspondentes as medidas de volume por dia. Grupo de animais tratados com cisplatina, com diminuição no volume tumoral. Animais controle demonstrando o crescimento aumentado das massas tumorais. A exceção de 2 animais, todos foram sacrificados no dia 6. As doses foram inoculadas via i.p. e na maioria dos

animais nos dias 1, 3 e 5. (o dia “7” é representado apenas por dois animais, um de cada grupo experimental e que recebe) (No eixo “y” temos representado o volume em cm^3 da massa tumoral, enquanto em “x” temos o tempo em dias. Para as análises foi considerado o valor de $p < 0,01$).

Em adição ao quadro descrito de reação fisiológica adversa à cisplatina, os animais tratados tiveram uma redução do peso médio significativo indicado por até $-4,6\text{g}$, em relação aos animais controles que apresentaram um acréscimo médio ao peso de até $1,15\text{g}$. É importante notar que em um animal do grupo controle que não desenvolveu massa tumoral apresentou uma variação de peso de $\pm 0,1\text{g}$. Assim é possível dizer que a droga causou a diminuição do peso do animal com comprometimento fisiológico dos animais tratados em relação aos controles. O ganho de peso dos animais controle pode estar relacionado também ao aumento do volume da massa tumoral. Através da avaliação estatística por teste de regressão linear, nota-se clara diferença entre o peso dos animais tratados em comparação aos controles (gráfico 3).

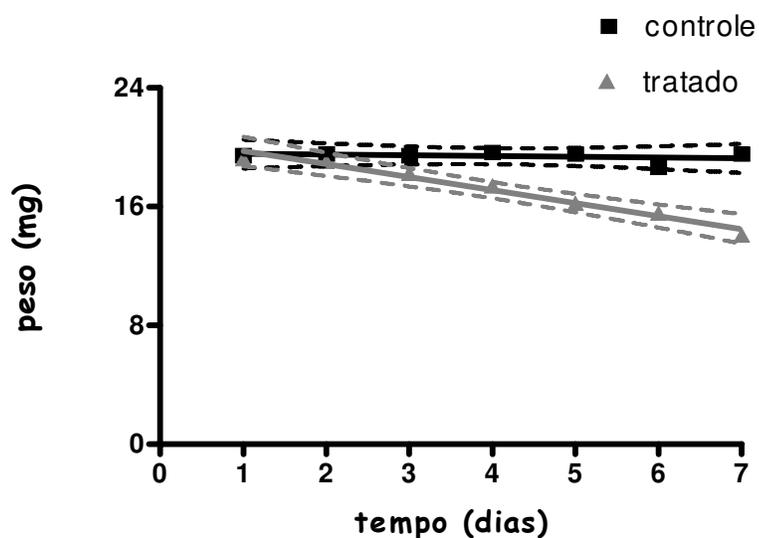


Gráfico 3 : Diagramas correspondentes ao peso por dia. (!) Animais tratados com cisplatina, demonstrando a diminuição significativa do peso cada traçado sinalizado corresponde a uma animal. (7) Animais controle demonstrando um “ganho” de peso (No eixo “y” temos o peso em mg, enquanto em “x” temos o tempo em dias) ($p < 0,01$).

4.5.2.1. Avaliação histopatológica dos tecidos tumorais, fígado e rim dos grupos de animais tratado e controle.

O efeito citotóxico da cisplatina nas células NG97 foi realizado através de observações da histologia dos tecidos tumorais. A observação de tecidos como rim e fígado dos grupos tratados e controle também foi realizada para investigação de efeito citotóxico da Cisplatina nesses tecidos.

Levando em conta a caracterização histopatológica de astrocitomas, os espécimes observados apresentaram formações histológicas compatíveis com o fenótipo astrocitoma grau IV, como a presença de alta taxa de mitose, glomerulização, discreta camada pseudopaliçada, vascularização e áreas de necrose com células em apoptose.

Em relação à organização e estrutura matricial dos tecidos tumorais, os tecidos dos animais tratados em relação aos controles demonstraram extensos processos de hialinização tecidual, evidenciada pela intensa coloração eosinofílica (extensas áreas róseas) (Fig 13A e 13B). Esta descrição histológica corrobora a observação macroscópica de que os tumores dos animais tratados indicavam arquitetura tecidual comprometida (tumores mais “moles”) em relação aos controles.

O perfil vasculatório apresentado em ambos tecidos tumorais seguiu-se às descrições compatíveis com astrocitomas grau IV, entretanto, algumas alterações nos núcleos das células associadas a vasos foram observadas. Em relação ao grupo controle, as células

tumorais adjacentes aos vasos nos tecidos tumorais tratados apresentam núcleos com perda de textura dos cromossomos e citoplasma com diminuição de coloração por Hematoxilina. Esta perda de coloração nas células adjacentes ao vaso indica diminuição do metabolismo das células, indicando uma possível ação direta no ciclo celular das células tumorais, ou seja a ação citotóxica da cisplatina.

Figura 13 : Histologia dos gliomas originados a partir da inoculação das células NG97 no dorso dos animais CB17/SCID. (A) Visão geral do tecido tumoral do animal controle, com menor hialinização e com características de astrocitoma IV. (B) Visão geral de um tecido tumoral de um animal tratado com cisplatina demonstrando a grande hialinização central (H) e periférica (áreas eosinofílicas) e diminuição células viáveis (núcleos e citoplasma pouco corados em azul). Notar necrose central circundada por células de perfil apoptótico e viáveis. (C e D) Em aumento maior é possível demonstrar áreas de glomerulização (G) e nos animais tratados e em regiões (D) adjacentes a vasos onde há ação citotóxica da cisplatina (retângulos, detalhe), há diminuição de impregnação por corante e diminuição de textura da cromatina (setas). (aumento original: A e B = 40x; C e D = 200x e detalhe=400x).

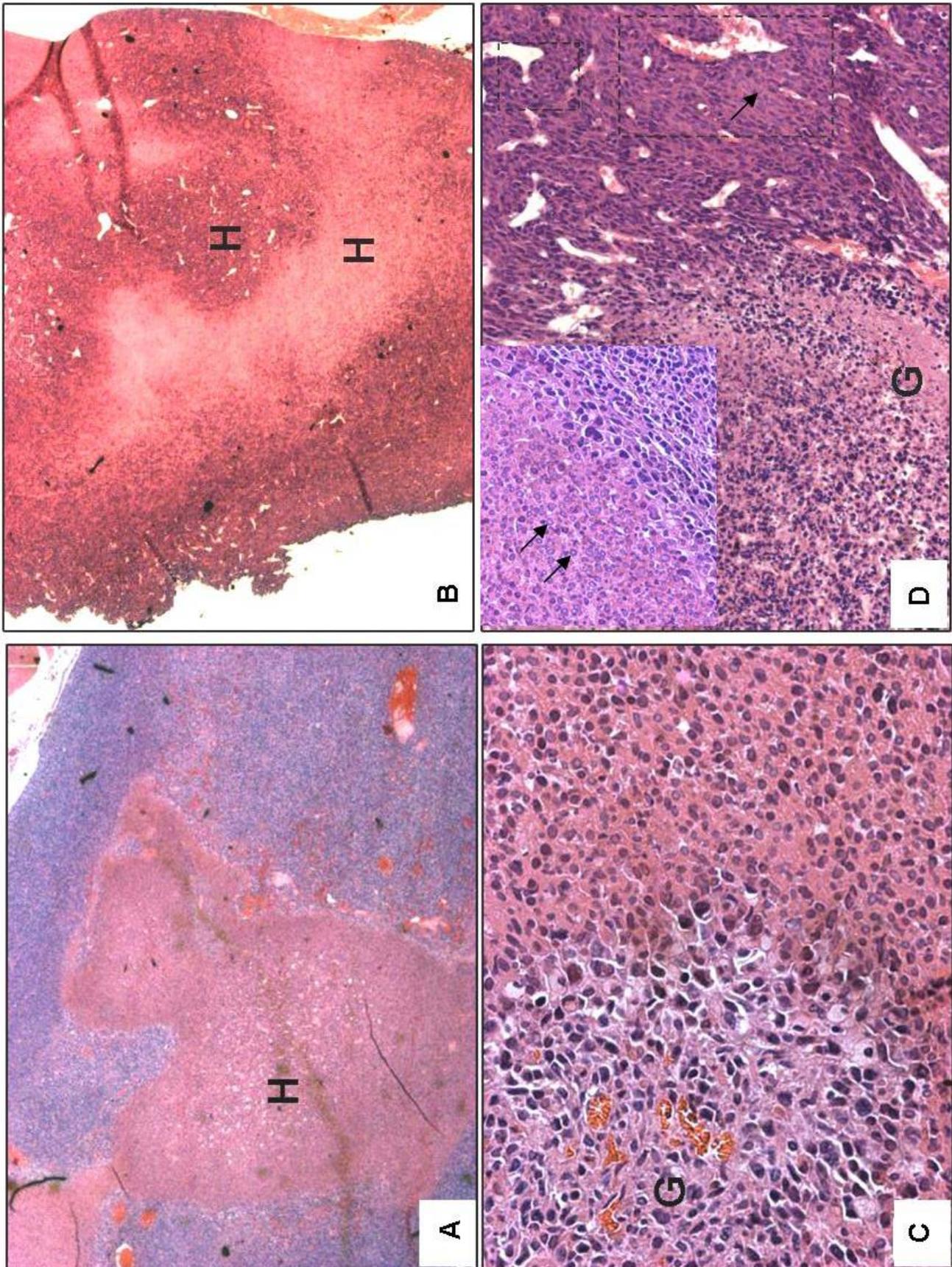


Figura 13

Também é notável que vasos de maior calibre e extensão são circundados por um halo maior onde há perda de coloração das células. Esta característica confere a droga uma ação citotóxica maior, pelo fato de ocorrer uma maior perfusão da droga (devido a maior pressão sanguínea) em relação aos vasos de menor calibre. Esta característica é conferida pelo fato do sistema vascular intratumoral possuir um endotélio especial, com diferenças de pressão entre as regiões centrais e periféricas do tecido.

Ao avaliarmos os tecidos do fígado não foram observadas diferenças histológicas entre o tratado e controle, entretanto, alguns reticulócitos na circulação dos animais tratados (figura 14) foram evidenciados.

Ainda, relacionando-se ao perfil de efeitos citotóxicos da cisplatina, foram avaliados histopatologicamente os tecidos renais de animais tratados e controles. Nos túbulos e glomérulos renais de animais tratados há ausência de alterações quando comparamos aos controles, entretanto, foi observado nos glomérulos dos animais controle baixa quantidade de agregação eritrócitária em relação aos animais tratados (figura 15), fato este que pode ser gerado como artefato da técnica.

Figura 14: Análise histológica do fígado de animal tratado com cisplatina. Hepatócitos e circulação sem alterações. Notar a presença de reticulócitos no sistema porta-hepático (seta) (aumento original: 400x).

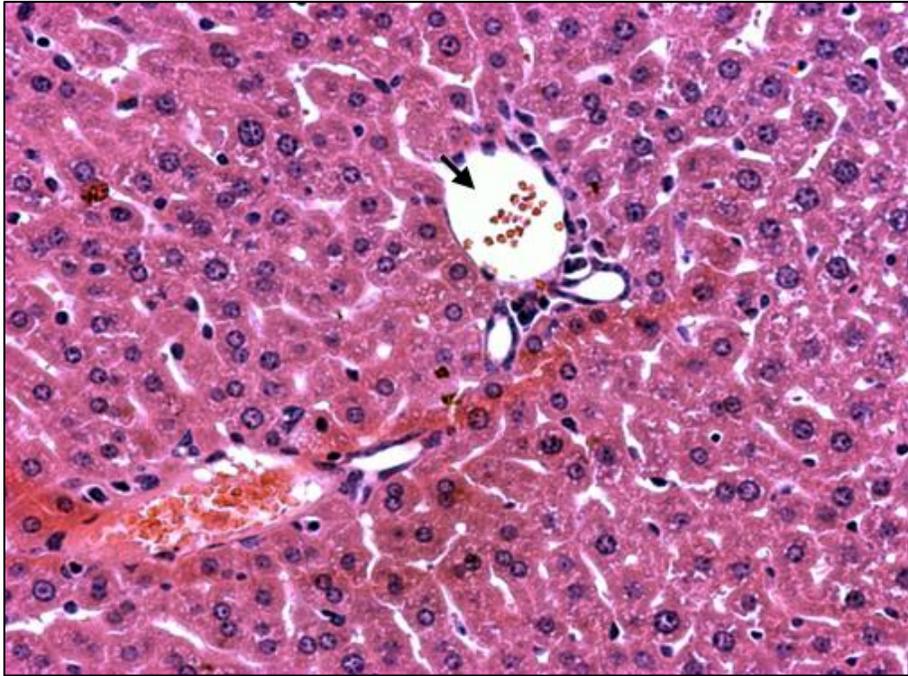


Figura 14

Figura 15: Histologia do rim de animais tratado (A) e controle (B) demonstrando a ausência de alterações. Notar a presença de agregação eritrocitária nos glomérulos no rim do animal tratado com cisplatina (aumento original: 200x).

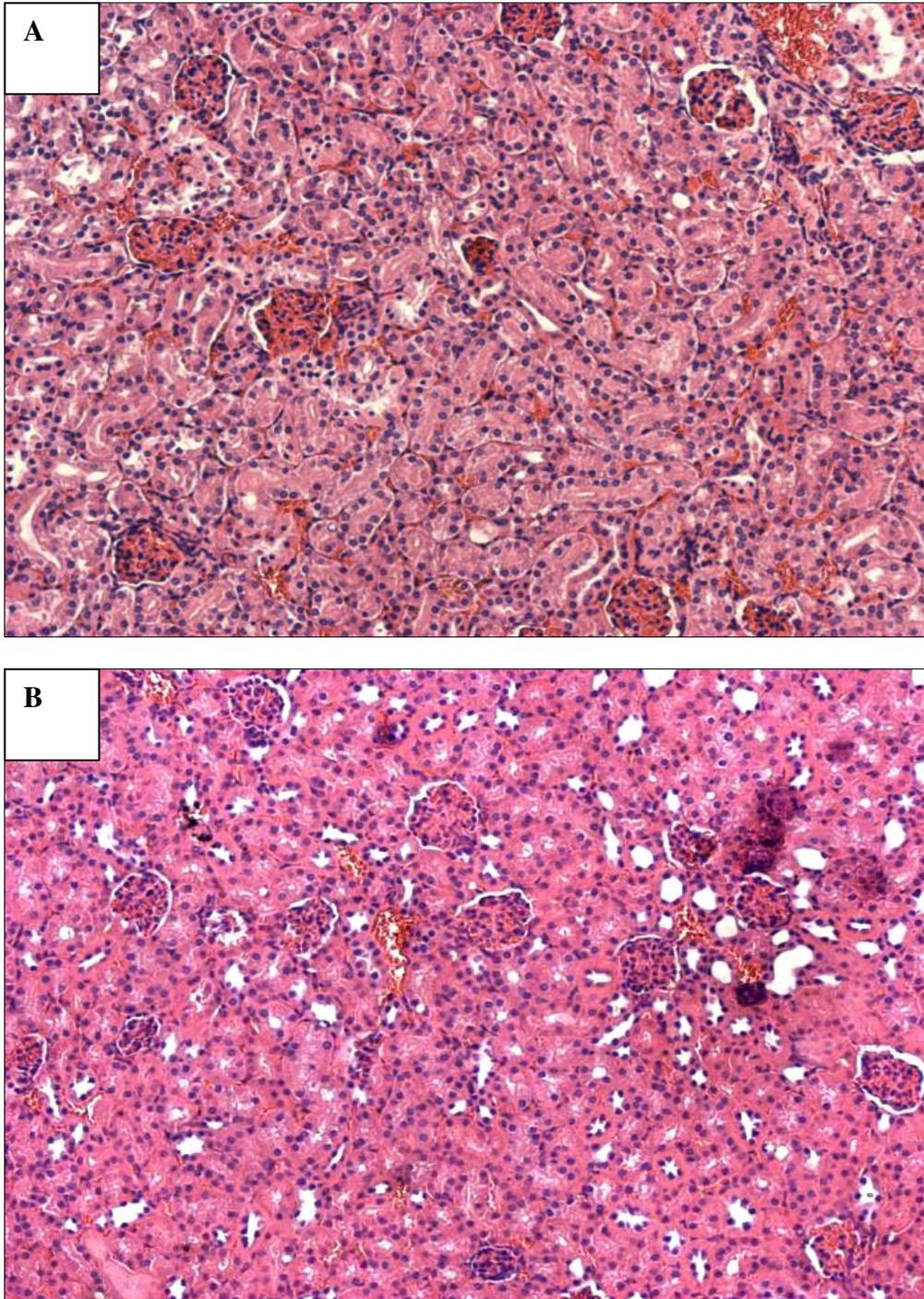


Figura 15

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Há cerca de 100 anos eram iniciadas experimentações que posteriormente abririam um amplo campo de pesquisa, o cultivo de células. Desenvolvido inicialmente para o entendimento da biologia de células neuronais, mostrou-se com amplo espectro de aplicação dentre as ciências biológicas, biomédicas e até mesmo na engenharia. Porém, para utilização de células *in vitro* para finalidade de experimentação é necessário o amplo conhecimento das características presentes nas linhagens celulares utilizadas. Assim, posteriormente ao estabelecimento da linhagem celular NG97 pelo nosso laboratório, fez-se necessária a ampla caracterização destas células, objetivo do projeto de tese aqui apresentado. Deste modo, seguiu-se a elucidação de aspectos relacionados a morfologia, imunofenotipagem, citogenética e teste de sensibilidade ao quimioterápico Cisplatina. É importante ressaltar que o trabalho de caracterização da linhagem NG97 visa determinar numerosas características relacionadas as células para futuro depósito destas em banco de células.

5.1. As células NG97 possuem ultraestruturas típicas de células indiferenciadas e tumores astrocíticos

Os trabalhos prévios com a linhagem celular NG97 determinaram o estabelecimento da cultura (Grippio et al., 2001), demonstrando também a capacidade tumorigênica das mesmas quando injetadas em camundongos nude. Em adição, a ultraestrutura do xenotransplante foi descrita por Schencka e colaboradores (2005) como um tecido com células altamente indiferenciadas, com núcleo pleomórfico, portador de invaginações e classificado histologicamente como glioblastoma secundário. O presente trabalho, assim como os trabalhos anteriores descrevem na cultura como um todo, células indiferenciadas

porém com ultraestruturas similares a glioblastomas do tipo secundário e primário. Dentre as características descritas nas células NG97, aquelas que designam o fenótipo glioblastoma secundário à linhagem segundo classificação de Liberski & Kordek (1997), foram: citoplasma denso, com numerosos microvilos portadores de filamentos de actina, grande quantidade de mitocôndrias inchadas, corpúsculos multivesiculares, complexos de golgi distendidos e polirribossomos. Tais características podem representar uma exacerbação de organização ultraestrutural, uma vez que astrócitos do tipo fibrilares normais apresentam estruturas semelhantes, porém em menor quantidade ou desprovidas de alterações (Karasek et al, 2004).

Quanto à expressão das características compatíveis ao fenótipo glioblastoma primário e que foram inicialmente postuladas por alguns autores (Kepes et al 1981; Liberski & Kordek, 1997), a linhagem NG97 apresenta grande quantidade de células gigantes polinucleadas, células primitivas com organelas subcelulares, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi distendidos, mitocôndrias anômalas e células vacuolizadas com componentes elétricos correspondentes a conteúdo lipídico intracelular.

Os caracteres ambíguos observados nas células NG97 podem ser atribuídos ao fato de células derivadas de astrocitoma humano conservarem a extensa plasticidade funcional dos astrócitos de se re-adaptarem ao microambiente sendo capazes de alterar até mesmo seu próprio ciclo celular (Kubota et al, 2006). De fato, Aristemi-Morillo e colaboradores (2008) demonstraram que células viáveis de glioblastomas respondem às baixas tensões de oxigênio no meio ambiente com alterações como o inchamento de mitocôndrias nas regiões hipóxicas.

Em adição aos caracteres de glioblastomas observados nas células NG97, uma estrutura elipsoidal única, descrita apenas em outra linhagem de gliosarcoma (Rutka et al,

1986), foi observada. Ultraestruturas similares foram observadas em células da glândula pineal humana, sendo estas denominadas de areia cerebral (Bacconnier et al, 2002). A partir da organização estrutural apresentada por tais estruturas, e dada a existência de aparente sistema de interação por pseudopodos entre estas estruturas elipsoidais e as células, postula-se que as mesmas possam ser resultado da combinação de cálcio com componentes polifosfatados que são liberados por algumas células e recebidas por outras na monocamada. Entretanto, para determinação de composição, endereçamento e natureza fisiológica de tais estruturas é necessária a combinação de métodos de microscopia eletrônica de transmissão e sondas capazes de interagir com o conteúdo químico das concreções nos elipsóides.

5.2. As células NG97 possuem características morfológicas atribuídas a linhagens tumorais astrocíticas pois expressam proteínas GFAP e vimentina, integrina $\alpha 5\beta 1$, fibronectina, Laminina e CD44 com perda de aderência ao substrato

O padrão de expressão das NG97 evidenciou que, ao longo do subcultivo das células NG97, há diminuição de GFAP associada ao aumento de expressão de vimentina. Este padrão modulatório encontrado pode estar associado à recuperação de características embrionárias, fenômeno comum em células tumorais, uma vez que durante o desenvolvimento embrionário de astrocitomas o padrão de modulação observado é inverso ao apresentado. Ao longo do subcultivo, os determinantes de diferenciação astrocitária são as proteínas de citoesqueleto GFAP, que em células embrionárias são expressas nas células após a migração dos progenitores gliais para a glia radial durante o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central. Esta migração tem como consequência final a diferenciação das células que constituirão o cérebro adulto e são determinadas pelo *pool*

de mediadores químicos presentes no ambiente (Mehler et al, 1995). Esta fase migratória inicial das células é acompanhada por alta expressão de vimentina como herança ectodérmica do progenitor glial que, associada em paralelo a microtúbulos e outros filamentos do citoesqueleto, participam de um equilíbrio dinâmico de polimerização e despolimerização, de modo a permitir a locomoção celular (Lodish et al, 2000). Além disso, alguns tipos de progenitores gliais do tipo astrócitos I passam por uma fase transitória onde expressam ambos filamentos intermediários de citoesqueleto, que na fase adulta podem originar oligodendrócitos (Mehler et al, 1995).

Ainda, o aumento detectado de expressão de vimentina e diminuição de GFAP nas células da linhagem NG97 pode indicar a seleção de um fenótipo sarcomatoso uma vez que este componente de citoesqueleto está associado a diferenciação histopatológica de células mesenquimais, como células endoteliais, linfócitos, macrófagos e fibroblastos (Cochran et al, 1986).

Uma hipótese mais recente, entretanto, afirma que a perda da expressão de GFAP *in vivo*, freqüentemente encontrada em astrocitomas de alto grau, não constitui um passo no desenvolvimento do tumor, mas representa apenas a evolução das células para um estado indiferenciado (Wilhelmsson et al, 2003). Além disso, o padrão modulatório apresentado coincide com uma diminuição do tempo de duplicação das células (Tatiane Q. Zorzeto, comunicação pessoal) *in vitro* sugerindo um aumento da capacidade de divisão celular, compatível com o fenótipo de células malignizadas. Ao longo das últimas três décadas, vários experimentos sugeriram uma forte correlação negativa entre o nível de expressão de GFAP e o grau de transformação maligna de astrócitos, contribuindo para o desenvolvimento e progressão dos astrocitomas.

Esse mesmo padrão de expressão de GFAP foi observado com a linhagem SA146 (Gomes et al, 1997). Nesse estudo, as células inicialmente se apresentaram positivas para o marcador, mas apenas 30-50% dessas continuaram a expressar GFAP após 25 passagens *in vitro*. Outros relatos da literatura também demonstraram que linhagens de astrocitoma podem perder a capacidade de sintetizar GFAP ao longo da cultura e corroboram nossos resultados (Kruse et al, 1992; Perzelova et al, 1998).

Embora as células NG97 apresentem a modulação de expressão negativa para GFAP ao longo do subcultivo, as NG97 não expressam NF como foi demonstrado nas linhagens derivadas de astrocitoma U138 e HS683 (Takashi et al, 1993). Os mesmos autores demonstraram que algumas linhagens derivadas de astrocitomas (U251 e U373) podem deixar expressar ambos filamentos de citoesqueleto, como foi visto em altas passagens das células NG97.

É provável que exista um mecanismo de regulação coordenada da expressão de tais filamentos intermediários e estes estão relacionados ao aumento ou diminuição de agressividade e invasividade dos astrocitomas dependendo das condições do microambiente. De fato, Rutka e colaboradores (1999) demonstraram em células transfectadas (asU251 MG), cuja expressão de Vimentina e Nestina estavam aumentadas e a de GFAP diminuída, alta taxa de mobilidade e invasividade. Além disso, uma vez que ocorre eliminação de expressão de GFAP por terapia *antisense*, em células que expressam GFAP (U251MG) ocorre redução da adesão das células e aumento de invasividade. Estes caracteres são acompanhados pelo aumento de regulação positiva para a expressão de β 1 integrina, redistribuição de actinas, e aumento de regulação positiva para CD44 na superfície das células derivadas de linhagens de astrocitomas (Rutka et al, 1994 e 1999).

Este aumento da agressividade em astrocitomas também é acompanhado pela aquisição do potencial migratório celular, a partir da diminuição de expressão de moléculas de integrinas e o aumento de extensões citoplasmáticas do tipo lamelipodia com diminuição de adesão focal à matriz extracelular (Uhm et al, 1999). É descrito também que as integrinas em células de astrocitoma podem desempenhar o papel de sinalização intracelular tendo como consequência o aumento da proliferação e sobrevivência das células tumorais (Uhm et al, 1999). As moléculas $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ agregam-se à subunidade $\beta 1$ na superfície celular, para formar as moléculas de integrinas. As moléculas homodiméricas do tipo α estão organizadas nas membranas das células em ilhas independentes, que se agregam à ilhas de subunidades $\beta 1$ para formar heterodímeros e consequente formação das integrinas funcionais. Este fenômeno de organização pode ser modulado pela concentração de polipeptídeos do tipo RGD, presentes na seqüência polipeptídica dos respectivos ligantes das integrinas (Brinkerhoff & Linderman, 2001). A ausência de expressão $\alpha 4\beta 1$ demonstrada nas células NG97 foi documentada anteriormente em astrocitomas, em contrapartida alguns estudos demonstram a expressão de $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ integrinas e seus ligantes tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O ligante de fibronectina, a $\alpha 5\beta 1$ integrina em astrocitomas aparece descrito na literatura como aumentado ou diminuído no fenótipo invasivo. As células NG97 apresentaram alta expressão do monômero $\alpha 5$ concomitante a expressão intermediária de $\beta 1$ integrina pode significar a existência de poucas moléculas de integrina $\alpha 5\beta 1$ afuncionais. Tal fato foi descrito por alguns autores como resultado de interação diferencial das moléculas em diferentes regiões da massa tumoral. No centro do tumor a $\alpha 5\beta 1$ é expressa funcionalmente para modular sinal para divisão celular, enquanto a ligação da $\alpha 5\beta 1$ a fibronectina da matriz induz diminuição da

expressão funcional da integrina para que as células migrem (Uhm et al, 1999). Outra hipótese aventada é o fato de a diminuição na detecção das subunidades $\beta 1$ integrina em contrapartida a alta expressão da subunidade $\alpha 5$ corresponderem a um aumento de expressão da seqüência Mgat5 durante a transformação maligna resultando no aumento de ramificações do tipo $\beta 1,6$ na subunidade $\beta 1$ das integrinas $\alpha 5\beta 1$ de células tumorais, diminuindo a habilidade das integrinas a agregarem-se na superfície das células (Gao et al, 2005). As células NG97 possuem baixíssima expressão $\alpha 6\beta 1$ integrinas, embora haja expressão de seu ligante, a laminina na matriz extracelular. É possível que a baixa expressão de $\alpha 6$ na superfície das células seja resultado da ausência de estímulos do ambiente uma vez que a laminina detectada nas células NG97 estão prioritariamente expressas no citoplasma celular. Assim, experimentos visando o teste de funcionalidade das integrinas nas células NG97 estão em desenvolvimento em nosso laboratório para elucidar estas questões.

Também como característica relacionada ao potencial migratório e redução de adesão das células NG97 foi demonstrada concomitante a expressão de moléculas de superfície CD44. A expressão deste marcador está diretamente relacionada com o perfil metastático de algumas células derivadas de astrocitomas tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Foi demonstrado que a transfecção de seqüências que determinam a expressão de CD44 em células de astrocitoma que antes não expressavam tal proteína de membrana, tem seu potencial de adesão diminuído e migratório e metastático ampliado (Merzak et al, 1994). De fato, as células NG97 semeadas em meio agar demonstraram-se independentes de ancoragem e capazes de formarem estruturas tridimensionais conhecidas como organóides.

Estas estruturas organotípicas são importantes na medida em que mimetizam a estrutura dos tumores *in vivo* e permite uma aproximação da realidade no estudo de perfusão de drogas e mediadores que estejam presentes no microambiente. Assim como as células NG97, outras células derivadas de astrocitoma, como as SNB19, U87, U251, GaMg (ver tabela 1) dentre outras, também desenvolvem estruturas tridimensionais (Nirmala et al, 2001; Kolchinsky & Roninson, 1997 e Foehr et al, 2005). Entretanto, a organização morfológica apresentada pelas células NG97 não possui semelhanças com as descrições de outras linhagens. É provável que as luzes das estruturas cavitadas sejam originadas a partir da grande deposição de glicosídeos no meio exterior a célula e interior a cavidade (dado não mostrado), dada intensa coloração de PAS. Entretanto, há a necessidade de desenvolvimento de outros experimentos para demonstrar a natureza química dos componentes presentes na luz destas estruturas.

5.3. As células NG97 não expressam moléculas relacionadas às possíveis interações das células com o sistema imune no microambiente tumoral como: HLA I,HLAII, B7 (CD80), TGF- β e Fas (CD95)

Em muitos tumores com frequência é relatada a diminuição ou até mesmo ausência de expressão de moléculas I e II do complexo de histocompatibilidade principal, bem como co-estimulatórias e produção de mediadores de imunossupressão, como mecanismo de escape à vigilância imunológica. Entretanto no ambiente *in vitro* estas características podem vir a serem alteradas.

Na célula NG97, bem como na linhagem LN229 (Zagzag et al, 2005) foi demonstrada ausência de expressão moléculas HLA I, HLA II e da molécula co-estimulatória B7 (CD80) em sua superfície celular. Também como as células da linhagem LN229, cuja baixa expressão gênica de MHC I estavam correlacionadas a um baixo

potencial metastático, as células NG97 quando injetadas no dorso de camundongos atímicos não invadem os tecidos adjacentes, como descrito por Grippo e colaboradores (2001). Embora Anderson e colaboradores (2002) tenham demonstrado que em células recuperadas de astrocitomas malignos ocorre modulação positiva de expressão de moléculas de HLA e co-estimulatórias (B7/CD80) após subcultivo *in vitro*, as células NG97 mantêm a ausência de expressão destas moléculas mesmo após 80 passagens.

Estes mesmos autores (Anderson et al, 2002) demonstraram que as células são capazes de produzir e secretar no meio TGF- β , aumentando progressivamente a quantidade ao longo das passagens. Entretanto nas células NG97 não foram detectados níveis de expressão celular para TGF- β ao longo de todo subcultivo. Visto que a produção de TGF- β em células U251 de astrocitomas podem ser ativadas por sinalizações do meio externo (Olofsson et al, 1992) na cultura, é provável que quando estimuladas as NG97 possam expressar tal mediador. De fato, foi demonstrado que estímulos de hipóxia ativam a via de sinalização de proteínas Smad aumentando a expressão de citocinas da família TGF- β (Zhang et al, 2003). Não obstante a alta taxa de expressão, detectada por imunohistoquímica em biópsias de glioblastomas, confere também importante participação destes mediadores no sucesso adaptativo dos tumores *in vivo* (Tsuzuki et al, 1998).

Ainda relacionada ao perfil imunossupressor de astrocitomas, nas células NG97 foi demonstrada a ausência de expressão das moléculas Fas (CD95) em todas as passagens analisadas. A CD95 é uma molécula pró-apoptótica e aparece envolvida no mecanismo de morte celular em tumores, disparados por células do sistema imune e drogas anti-tumorais (Konstantinidou et al, 2005). Entretanto, como foi enunciada na introdução esta expressão de CD95 em astrocitomas *in vivo* é corrente uma vez que além de não desencadear a morte das células tumorais *in vivo* (Cerrato et al, 2004), determina a morte de células T ativadas

no microambiente tumoral, porque estas células imunes expressam ligantes de Fas (CD95-L) como parte de seu mecanismo regulatório (Abbas, 2003). Sendo assim é provável que as células NG97 quando inoculadas em camundongos imunocompetentes, e se atingido o desenvolvimento de massa tumoral, a expressão de CD95 pode ser modulada positivamente.

5.4. Em cultura, as células NG97 apresentam variadas aberrações numéricas com cariótipo hiperplóide e presença de um componente murino associado

Também associadas a transformação maligna, as alterações cromossômicas em linhagens de astrocitoma são esparsamente descritas na literatura. Entretanto inúmeras avaliações citogenéticas em pacientes são relatadas, porém sem uniformidade quanto às alterações estruturais encontradas. Contudo, quanto a aneuploidia ou hiperploídia, e a quantidade de alterações numéricas há uma similaridade entre os dados relacionados aos astrocitomas, apontando para uma possível correlação com o fenótipo tumoral. Segundo alguns autores a aneuploidia não seria a causa, mas a consequência de alterações cumulativas proporcionadas pelo microambiente tumoral que em última instância causariam o fenótipo tumoral (Nowell, 1976; Duesberg, 2007). A instabilidade cromossômica que resulta na heterogeneidade citogenética seria responsável pela progressão maligna, porém por fenômenos ainda não elucidados (Gao et al, 2005). Jacobsen e colaboradores (2006) demonstraram que células de estroma de camundongos inoculados fusionam com células de linhagem de câncer de mama humano, levando ao aumento de agressividade. Pawlek, em sua revisão sobre melanomas (2000), mostrou evidências consistentes de que os híbridos, obtidos de células tumorais e células do estroma ou células do sistema imune, resultam, não somente em aneuploidias, mas também no aumento de características de malignidade como padrão aberrante de

glicosilação e metástase. Os resultados relacionados a NG97 concordam com os fenômenos de fusão celular, uma vez que cromossomos murinos foram observados nas células NG97 após a heterotransplantação, e com aumento de agressividade dado pela diminuição no tempo de duplicação para em média de 25h, quando comparados ao de 72h horas apresentado no estabelecimento da linhagem (Grippe et al, 2001). Este componente fusionado provavelmente foi incorporado a cultura NG97 a partir da mistura das células cultivadas, e células do estroma do animal no momento em que o heterotransplante era realizado para verificação de malignidade durante as experimentações relacionadas ao estabelecimento da linhagem (Grippe et al, 2001).

É importante ressaltar que embora o componente murino fusionado represente 90% dos cromossomos aneuplóides detectados na linhagem, os determinantes do fenótipo histopatológico de glioblastoma *in vivo* (Ikemori, R.Y comunicação pessoal), bem como a expressão de marcadores associados com o mesmo diagnóstico, aparecem preservados (Schenka et al, 2005). Em adição, o cariótipo apresentado nas células demonstra alterações estruturais e numéricas em mesmas proporções que as observadas especificamente em astrocitomas grau III e IV em pacientes (Krupp et al, 2004). Entretanto, a avaliação da porcentagem de cromossomos murinos translocados nos cromossomos humanos, e vice versa, bem como os possíveis quimerismos envolvidos, devem ser objetivo de trabalhos futuros.

Quanto a expressão de seqüências cromossômicas humanas codificadoras do receptor de fator de crescimento epidermal o Her2-neu ou Erbb, as células NG97 demonstraram baixíssima quantidade de núcleos com super-expressão de tais seqüências através da análise de FISH. Assim, é esperado que as células NG97 na monocamada possuam em consequência disto baixa quantidade de EGFR expresso, entretanto

experimentos para determinação desta característica não foram realizados e podem ser objetivo de novos estudos. Como foi relatado em diversos trabalhos de literatura, células que tem a expressão de Her2-neu/ErbB bloqueadas são capazes de apresentar sensibilidade a quimioterápicos, como a Cisplatina (Macleod et al, 2005).

5.5. As células NG97 são sensíveis à Cisplatina

Como foi visto através de ensaios *in vitro* as células NG97 são sensíveis à diferentes concentrações de cisplatina, corroborando as hipóteses de que células cuja expressão do Her2-neu/ErbB esteja suprimida ocorre sensibilização das células à cisplatina. É interessante notar que após o tratamento das células *in vitro* algumas células viáveis ainda permanecem na monocamada (dado não mostrado). Como há uma pequena parcela de células da linhagem NG97 que ainda permanecem em fase de ciclo celular estacionário após o tratamento com a cisplatina, é provável que esta subpopulação represente as células que expressam o Her2-neu/erbB e tenham potencial ao desenvolvimento de uma cepa de células NG97 resistentes ao tratamento com a cisplatina. Não tendo sido objeto deste trabalho, a avaliação da presente hipótese é importante, uma vez que linhagens caracterizadas de astrocitoma (ver tabela I, M059J e M059K) de mesma origem parental desenvolvem *in vitro* subpopulações com diferentes níveis de resistência (Allalunis-Turner et al, 1993) e podem ser utilizadas como modelo biológico ao estudo de mecanismos moleculares ligados à resistência a quimioterápicos.

A mesma sensibilidade das células NG97 à cisplatina foi demonstrada *in vivo* através da experimentação em animais atímicos. É interessante ressaltar que de mesma forma, através da experimentação por FISH *in situ*, o Her2-neu/ErbB não estava expresso em cortes histológicos em parafina das massas tumorais provenientes da inoculação de células NG97 no dorso de camundongos *CB17-SCID/SCID* (dado não mostrado). Ainda os

tumores de animais tratados com a cisplatina apresentaram intensa redução em volume a partir do primeiro dia de exposição ao quimioterapêutico. Reforçando ainda mais a hipótese de que a diminuição do EGFR está ligado diretamente ao aumento de sensibilidade a Cisplatina em glioblastomas (Zhan et al, 2004).

Outro dado importante relacionado ao tratamento dos glioblastomas originados pela inoculação de NG97 no dorso de camundongos *CB17-SCID/SCID* é a alta toxicidade da droga demonstrada pelas alterações de citotoxicidade nos animais do grupo tratado. Assim é postulado que a dose máxima suportada estimada para animais de mesma linhagem genética com glioblastomas foi extrapolada e a dose segura de administração deve corresponder a um valor inferior ao de 8mg/Kg do animal utilizados no presente trabalho. É necessária então nova experimentação para escalonamento da dose e com a redução da dose de tratamento é esperado que os efeitos colaterais relacionados a seguir diminuam, ou até mesmo desapareçam.

Estes efeitos colaterais já estão descritos na literatura (Hippolito et al, 2005), entretanto análises em linhagens celulares derivadas de astrocitoma e híbridas inoculadas em animais *CB17-SCID/SCID* as descrições não são freqüentes. Aparentemente como pior efeito colateral observado nos animais tratados com a cisplatina foi a perda de peso ligada a sinais de caquexia. Dentre os efeitos colaterais observados histopatologicamente como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, não se determinou alteração importante tanto nos grupos tratados e controle de animais que desenvolveram tumores a partir das células NG97. Assim como a ausência de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade relatadas aos tumores induzidos por NG97, Warnick e colaboradores (1994) também demonstraram que em pacientes tratados com cisplatina intravenosa após radioterapia não apresentavam sintomatologia no fígado ou rim. Em contrapartida, os mesmos autores demonstraram que

os pacientes com glioblastomas e tratados com a Carboplatina desenvolviam após 6 semanas de tratamento hematotoxicidade, tendo como expoente a trombocitopenia.

De mesma forma identificado no tecido hepático de animais do grupo tratado a existência de figuras de reticulócitos. Estes efeitos colaterais do quimioterápico ao sistema hematopoiético são relatados como a capacidade da cisplatina em promover morte das células-tronco hematopoéticas (mielo-supressão de longa duração) e comprometimento das progenitoras (mielo-supressão de curta duração). Além disso, a cisplatina promove o bloqueio ou atraso do ciclo celular dos precursores hematopoéticos, redução dos níveis de fatores de crescimento hematopoéticos, dano oxidante às células hematopoéticas maduras, mielodisplasia de longa duração, destruição das células hematopoéticas mediada por mecanismos imunológicos, micro-angiopatia, retenção fluídica e extensão do volume plasmático (anemia dilucional) (Nogueira-Costa et al, 1999).

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

❖ O presente trabalho identificou na linhagem NG97 *in vitro* derivada de astrocitoma humano, características de células malignas e compatíveis ao fenótipo de classificação de astrocitoma grau IV através da descrição de ultraestruturas características de GBM, expressão de marcadores ontogênicos de SNC e perda de aderência ao substrato, anormalidades citogenéticas e sensibilidade das células ao quimioterápico cisplatina.

❖ Dentre as inúmeras alterações cromossômicas caracterizadas, demonstrou-se à existência de um lote hiperplóide de cromossomos murinos combinados aos cromossomos humanos, sugerindo que o conjunto do estoque de criotubos de células denominadas NG97 é constituído de células Híbridas (Humanas/Murinas). Provavelmente, a formação do híbrido surgiu com fusão das células NG97 com células do estroma murino durante o estabelecimento da linhagem, quando as células “originais” foram injetadas no dorso de camundongos *nude* para avaliação de tumorigenicidade.

❖ Após identificação do componente murino é sugerido que a linhagem, objeto do presente trabalho, seja classificada como um híbrido e identificada como NG97ht (células NG97 fusionadas no heteroenxerto) para depósito em banco de células.

❖ Uma vez que as células mantêm características de astrocitomas, sua utilização como modelo biológico é válida, desde que características descritas no presente trabalho sejam levadas em consideração.

❖ A células NG97 possuem translocações e quimerismos ainda não identificados, justificando-a como modelo ao estudo citogenético desta ordem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A K and Lichtman AH Cellular and Molecular Immunology 3.ed. Elsevier 2003.562p.

Akslen LA, Andersen KJ, Bjerkvig R. Characteristics of human and rat glioma cells grown in a defined medium. **Anticancer Res.** 1988; 8: 797-803.

Allalunis-Turner MJ, Barron GM, Day RS, Dobler KD, Mirzayans R. Isolation of two cell lines from a human malignant glioma specimen differing in sensitivity to radiation and chemotherapeutic drugs. **Radiat Res.** 1993;134(3):349-54.

Anderson RC, Elder JB, Brown MD, Mandigo CE, Parsa AT, Kim PD, Senatus P, Anderson DE, BruceJN. Changes in the immunologic phenotype of human malignant glioma cells after passaging *in vitro*. **Clin Immunol.** 2002;102: 84-95.

Arai K, Horie Y, Kurimoto M, Endoh S, Hiraga K, Takaku A. A cell line of human malignant astrocytoma producing autocrine growth factor. **In Vitro Cell Dev Biol.**1991; 27: 606-614.

Arismendi-Morillo GJ, Castellano-Ramirez V. Ultrastructural mitochondrial pathology in human astrocytic tumors: potential implications for therapeutic strategies **Journal of Electron Microscopy.** 2008; 57(1):33-39.

Baconnier S, Lang SB, Polomska M, Hilczner B, Berkovic G, Meshulam G. Calcite microcrystals in the pineal gland of the human brain: first physical and chemical studies. **Bioelectromagnetics.** 2002;23(7):488-95.

Beckman G, Beckman L, Pontén J, Westermark B. G-6-PD and PGM phenotypes of 16 continuous human tumor cell lines. Evidence against cross-contamination and contamination by HeLa cells. **Hum Hered.** 1971; 21: 238-241.

Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. **Science.** 1968; 161: 370-371.

Bignami A, Raju T, Dahl D. Localization of vimentin, the nonspecific intermediate filament protein, in embryonal glia and in early differentiating neurons. **Dev Biol.** 1982; 91: 286-295.

Bigner DD, Bigner SH, Pontén J, Westermark B, Mahaley MS, Ruoslahti E, Herschman H, Eng LF, Wikstrand CJ. Heterogeneity of genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas **J. Neurological.** 1981; 47:201-229.

Bodmer S, Strommer K, Frei K, Siepl C, de Tribolet N, Heid I, Fontana A. Immunosuppression and transforming growth factor- β in glioblastoma. **The Journal of Immunology.** 1989;143:3222-3229.

Boveri T. The Origin of Malignant Tumors. Baltimore: Williams and Wilkins, Co./Waverly Press, 1929.

Brinkerhoff CJ, And Linderman JJ. Integrin dimerization and ligand organization: key components in integrin clustering for cell adhesion. **Tissue engineering.** 2001;11(5): 865-876.

Carrel, A. The new cytology. **Science.** 1931,73:297-303.

Carew JS, Huang P. Mitochondrial defects in cancer. **Mol Cancer.** 2002; 9:1-9.

Castellani P, Siri A, Rosellini C, Infusini E, Borsi L, Zardi L. Transformed human cells release different fibronectin variants than do normal cells. **J Cell Biol.** 1986; 103(5):1671-7.

Cerrato JA, Khan T, Koul D, Lang FF, Conrad CA, Yung WK, Liu TJ.: Differential activation of the Fas/CD95 pathway by Ad-p53 in human gliomas. **Int J Oncol.** 2004;24(2):409-17.

Chang Sm, Parney IF, Huang W, Anderson FA JR, Asher AL, Bernstein M, Lillehei KO, Brem H, Berger MS, Laws ER. Patterns of care for adults with newly diagnosed malignant glioma. **Jama.** 2005;293(20):2469-70.

Chisholm JC & Houlinston E. Cytokeratin filament assembly in the pre-implantation mouse embryo. **Development.** 1987; 101:565-582.

Dahl D: The vimetin-GFA protein transition in rat neuroglia cytoskeleton occurs at the time of myelination. **J Neurosci Res.** 1981; 6:741-748.

Diserens AC, de Tribolet N, Martin-Achard A, Gaide AC, Schnegg JF, Carrel S.: Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18. **Acta Neuropathol.** 1988; 53(1):21-28.

Dropcho EJ, Rosenfeld SS, Morawetz RB, Vitek J, Brothers M, Gorum T, Bell S, Gillespie GY, Glantz M, Mahaley MS Jr. Preradiation intracarotid cisplatin treatment of newly diagnosed anaplastic gliomas. The CNS cancer consortium. **Journal of Clinical Oncology.** 1992;10:452-458.

Duan L, Aoyagi M, Tamaki M, Yoshino Y, Morimoto T, Wakimoto H, Nagasaka Y, Hirakawa K, Ohno K, Yamamoto K. Impairment of both apoptotic and cytoprotective signalings in glioma cells resistant to the combined use of cisplatin and tumor necrosis factor α . **Clin Can Research.** 2004;10:234-243.

-
- Duesberg P: Chromosomal chaos and cancer. **Scientific American**. 2007;296: 52-59.
- Fell HFB. Tissue culture and its contribution to biology and medicine. **J Exp Biol**. 1972;57:1-13.
- Fernandez E, Vicente A, Zapata A, Brera B, Lozano JJ, Martinez C, And Toribio MI. Establishment and characterization of cloned human thymic epithelial cell lines. Analysis of adhesion molecule expression and cytokine production. **Blood**. 1994; 83: 3245-3254.
- Foehr ED, Lorente G, Vincent V, Nikolich K, Urfer R. Fas associated phosphatase (fap-1) blocks apoptosis of astrocytomas through dephosphorylation of Fas. **J Neurooncol**. 2005; 74(3):241-248.
- Freshney, R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 3. ed. Wiley-Liss, 1994. 486 p.
- Gao CF, Xie Q, Su YL, Koeman J, Khoo SK, Gustafson M, Knudsen BS, Hay R, Shinomiya N, Vande Woude GF. Proliferation and invasion: plasticity in tumor cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2005; 102(30):10528-33.
- Gershwin ME, Ikeda RM, Kawakami TG, Owens RB. Immunobiology of heterotransplanted human tumors in nude mice. **J. Natl. Cancer Inst**. 1977; 58:1455-1463.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. **J Natl** : In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. **Cancer Inst**. 1973; 51(5):1417-23.
- Giese A, LOO MA, Tran N, Haskett D, Coons SW, Berens ME: Dichotomy of astrocytoma migration and proliferation. **Int J Cancer**. 1996; 67: 275-282.
- Gomes D, Nechaud, B, Maunoury R, Moura Neto V, Brigadeau C, Labrousse F, Dupouey P. Glial fibrillary acidic protein expression in a new human glioma cell line in

culture before and after xenogenic transplantation into nude mice. **Acta neuropathol. (berl)** 1997; 94 (4): 376-384.

Grippo MC, Penteadó PF, Carelli EF, Cruz-Höfling MA, Verinaud L. Establishment and partial characterization of a continuous human malignant glioma cell line- NG97. **Cell Mol. Neurobiol.** 2001; 4: 421-428.

Guo HB, Lee I, Kamar M, Akiyama SK, and Pierce M: Aberrant n-glycosylation of beta1 integrin causes reduced $\alpha 5\beta 1$ integrin clustering and stimulates cell migration. **Cancer Res.** 2001; 62: 6837-6845.

Harrison, RG. Observations on the living developing nerve fibre. **Anat. Rec.** 1907;1: 116–118.

Hamprecht B. Structural, electrophysiological, biochemical, and pharmacological properties of neuroblastoma-glioma cell hybrids in cell culture. **Int. Rev. Cytol.** 1977; 49: 99-170.

Hayward IP, Whitehead RH, Ward L, Gianello R, Dempsey P, Bates R, Burns GF. Effect of TGF- β on differentiated organoids of the colon carcinoma cell line LIM-1863. **Immunol Cell Biol.** 1995; 73(3):249-57.

He F and Sun YE. Glial cells more than support cells? **The Int J of Biochemistry and Cell Biol.** 2007; 39:661-665.

Hypolito MA, Oliveira JA, Lessa RM, Rossato, M. Otoproteção da amifostina aos efeitos ototóxicos da cisplatina : estudo em cobaias albinas por emissões otoacústicas produzidas por distorção e microscopia eletrônica de varredura. **Rborl.** 2005; 71(3): 168-273.

Jacobsen BM, Harrell JC, Jedlicka P, Borges VF, Varella-Garcia M, Horwitz KB. Spontaneous fusion and transformation of mouse stroma by, malignant human breast cancer epithelium. **Cancer Res.** 2006;66 (16):8274-8279.

Kepes JJ, Rubinstein LJ. Malignant gliomas with heavily lipidized (foamy) tumor cells: a report of three cases with immunoperoxidase study. **Cancer.** 1981;47: 2451-2459.

Khaitan D, Chandna S, Arya MB, Dwarakanath BS. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; implications for tumor therapy. **J Transl Med.** 2006; 2(4):12-16.

Kleihues P, Cavenee WK. WHO classification of tumours of the nervous system. In: pathology and genetics of tumours of the nervous system by Kleihues P, Cavenee WK (Eds), Lyon: Iarc, 2000: 6-7

Knüpfer Mm, Poppenborg H, Hotfilder M, Kühnel K, Wolff JEA, Domula M. CD44 expression and hyaluronic acid binding of malignant glioma cells. **Clinical and Experimental Metastasis.** 1999; 17(1): 81-86.

Koestner A, Ko L, Wechsler W : Morphological characterization of nitrosourea-induced glioma cell lines and clones. **Acta Neuropathol.** 1980; 51(1):23-31.

Kolchinsky A, Roninson IB. Drug resistance conferred by MDR1 expression in spheroids formed by glioblastoma cell lines. **Anticancer Res.** 1997; 17:3321–3327.

Koochekpour S, Pilkington GJ, & Merzak A. Hyaluronic Acid/CD44H interaction induces cell detachment and stimulates migration and invasion of human glioma cells in vitro. **International Journal of Cancer.** 1995; 63, 450–454.

Krupp W, Geiser K, Schober R, Siegert G, Ffroster UG. Cytogenetic and molecular cytogenetic analyses in diffuse astrocytomas. **Cancer cell and cytogenet.** 2004; 153, 32-38.

Kruse CA, Mitchell DH, Kleinschmidt-Demasters BK, Franklin WA, Morse HG, Spector EB, Lillehei KO. Characterization of a continuous human glioma cell line DBTRG-05MG: growth kinetics, karyotype, receptor expression, and tumor suppressor gene analyses. **In vitro cell. Dev. Biol.**1992; 28: 609-614.

Kruse CA, Varella-Garcia M, Kleinschmidt-Demasters BK, Owens GC, Spector EB, Fakhrai H, Savelieva E, Liang B. Receptor expression, cytogenetic and molecular analysis of six continuous human glioma cell lines. **In vitro cell. Dev. Biol.** 1998; 34: 455-462.

Kubota T, Sato K, Arishima H, Takeuchi H, Kitai R, Nakagawa T. Astroblastoma: immunohistochemical and ultrastructural study of distinctive epithelial and probable tanycytic differentiation. **Neuropathology.** 2006; 26: 72-81.

Lampson, LA: Beyond the inflammation: site direct immunotherapy. **Immunology Today.** 1998; 19(1):17-22.

Liberski PP, Kordek R. Ultrastructural pathology of glial brain tumors revisited: a review. **Ultrastructural Pathology.** 1997; 21: 1-31.

Livesey SA, Collier F, Gummer P.R. & Martin TJ. Effect of retinoids on the growth, ultrastructure, and cytoskeletal structures of malignant rat osteoblasts. **Cancer Res.** 1985;45: 5106 – 5113.

Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JF. Molecular Cell Biology by W. H. Freeman and Company, New York, 4ed, 2000.

Lofton SA, Gown AM, Vogel AM, Krieger JN. Differential diagnosis of genitourinary tumors using monoclonal antibodies to intermediate filament proteins. **Urology.** 1989; (5):433-9.

Lund EL, Hansen LT, Kristjansen PE. Augmenting tumor sensitivity to topotecan by transient hypoxia. **Cancer Chemother Pharmacol.** 2005; 56(5):473-80.

Machado CM, Schenka A, Vassalo J, Tamashiro WM, Gonçalves EM, Genari SC, Verinaud L. Morphological characterization of a human glioma cell line. **Cancer Cell Int.** 2005; 5 (1): 13.

Macleod K, Mullen P, Sewell J, Rabiasz G, Lawrie S, Miller E, Smyth JF, Langdon SP. Altered ErbB Receptor Signaling and Gene Expression in Cisplatin-Resistant Ovarian **Cancer Cancer Res.** 2005;65(15):6789-6800.

Manuelidis, EE Long-term lines of tissue cultures of intracranial tumors. **J. Neurosurg.** 1965; 22: 368– 373.

Manuelidis, EE. Experiments with tissue culture and heterologous transplantation of tumors. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1969; 159: 409– 443.

Martinez-Diaz H, Kleinschmidt-DeMasters BK, Powell SZ, Yachnis AT. Giant cell glioblastoma and pleomorphic xanthoastrocytoma show different immunohistochemical profiles for neuronal antigens and p53 but are reactivity for class III beta-tubulin. **Arch Pathol Lab Med.** 2003;127(9):1187-91.

Mather JP and Roberts PE. Introduction to cell and tissue culture plenum press, New York, N.Y. 10013 1ed. 1998

Maxwell M, Naber SP, Wolfe HJ, Hedley-Whyte ET, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Antoniades HN. Expression of angiogenic growth factor genes in primary human astrocytomas may contribute to their growth and progression. **Cancer Res.** 1991, 51:1345-1351.

-
- Mehler MF, Marmur R, Gross R, Mabie PC, Zang Z, Papavasiliou A, Kessler JA. Cytokines regulate the cellular phenotype of developing neural lineage species. **Int. J. Dev. Neurosci.** 1995;13:213-240.
- Merzak A, Koocheckpour S, Pilkington GJ. CD44 mediates human glioma cell adhesion and invasion in vitro. **Cancer Res.** 1994;(54):3988-3992.
- Miyagi K, Ingram M, Techy GB, Jacques DB, Freshwater DB, Sheldon H. Immunohistochemical detection and correlation between MHC antigen and cell-mediated immune system in recurrent glioma by APAAP method. **Neurol. Med. Cir.** 1990,(30), 649-653.
- Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. **Chem Biophys Res Commun.** 1965, 19: 739-44.
- Nirmala C, Rao JS, Ruifrok AC, Langford LA, Obeyesekere M. Growth characteristics of glioblastoma spheroids. **Int J Oncol.** 2001, 147, 72-74.
- Nogueira-Costa R, Duarte RC, Sousa CC. Anemia no paciente oncológico: causas, diagnósticos e tratamento. **RSBC.** 1999; II(06)38.
- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science.** 1996;194: 23-28.
- Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **Am J Pathol.** 2007;170(5):1445-53.
- Olofsson A, Miyazono K, Kanzaki T, Colosetti P, Engström U, Heldin CH. Transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 secreted by a human glioblastoma cell line. Identification of small and different forms of large latent complexes. **J Biol Chem.** 1992;25, 267 (27): 19482-8.
- Olsen ML, Schade S, Lyons AS, Amaral MD, Sontheimer H. Expression of voltage-gated chloride in human glioma cells. **J. Neurosci.** 2003; 23: 5572-5582.

Osborne RH, Houben MP, Tijssen CC, Coebergh JW, van Duijn CM. The genetic epidemiology of glioma. **Neurology**. 2001;57(2) : 1751-1755.

Owens RB, Smith HS, Nelson-Rees WA, Springer EL. Epithelial cell cultures from normal and cancerous human tissues. **J. Natl. Cancer Inst.** 1976;56: 843-849.

Olopade OI, Jenkins RB, Ransom DT, Malik K, Pomykala H, Nobori T, Cowan JM, Rowley JD, Diaz MO. Molecular analysis of deletions of the short arm of chromosome 9 in human gliomas. **Cancer Res.** 1992; 52: 2523-2529.

Paulus, W. And Tonn, J. Basement membrane invasion of glioma cells mediated by integrin receptors. **J Neurosurg.** 1994;80, 515-519.

Pawelek JM: Cell hybridization and metastasis revisited. **Melanoma Research.** 2000;10: 507-514.

Pederse PH, Marienhagen K, Mrk S, Bjerkgvig R. Migratory pattern of fetal rat brain cells and human glioma cells in the adult rat brain. **Cancer Res.** 1993;53, 5158-5165.

Penman S. Rethinking cell structure proc. **Natl. Acad. Sci. USA.**1995;92, 5251-5257.

Perzelová A, Máciková I, Mráz P, Bízík I, Steno J. Characterization of two new permanent glioma cell lines 8-MG-BA and 42-MG-BA. **Neoplasma.**1998; 45(1):25-29.

Ponten J and Macintyre EH. Long term culture of normal and neoplastic human glia. **Acta pathol. Microbiol. Scand.** 1968;74, 465-486.

Rappaport L, Oliviero P, Samuel JL. Cytoskeleton and mitochondrial morphology and function. **Mol Cell Biochem.** 1998; 184:(1-2),101-105.

Rich JN, Bigner DD. Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant glioma. **Nat Rev Drug Discov.** 2004; 3(5):430-46.

Riffkin CD, Gray AZ, Hawkins CJ, Chow CW, Ashley DM. Ex vivo pediatric brain tumours express FAS and FASL and are resistant to apoptosis induction. **Neuro Oncol.** 2001; 3(4):229-40.

Roggendorf W, Strupp S, Paulus W. Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors. **Acta Neuropathol.** 1996;(92). 288-293.

Rossi ML, Hughes JT, Esiri MM, Coakham HB, Brownell DB. Immunohistological study of mononuclear cell infiltrate in malignant gliomas. **Acta Neuropathol.** 1987;(74): 269-277.

Roth W, Fontana A, Trepel M, Reed JC, Dichgans J, Weller M. Immunochemotherapy of malignant glioma: synergistic activity of CD95 ligand and chemotherapeutics. **Cancer Immunol Immunother.** 1997; 44(1):55-63.

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.Nov.** 1986; 46(11):5893-902.

Rutka J T, Hubbard SL, Fukuyama K, Matsizawa K, Dirks PB, Becker LE. Effects of antisense glial fibrillary acidic protein complementary DNA on the growth, invasion and adhesion of human astrocytoma cells. **Cancer Res.** 1994; 54: 3267-3272.

Rutka JT, Matsuzawa K, Hubbard SL, Fukuyama K, Becker LE, Stetler-Stevenson W, Edwards DR, Dirks PB. Expression of timp-1, timp-2, 72- and 92-kda type IV collagenase transcripts in human astrocytoma cell lines: correlation with astrocytoma invasiveness. **Int. J. Oncol.** 1995; 6: 877-884.

Rutka J T, Muller M, Hubbard SL, Forsdyke J, Dirks PB, Jung S, Tsugu A, Becker LE, Costello P. Astrocytoma adhesion to extracellular matrix: functional significance of integrin and focal adhesion kinase ex-pression. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 1999; 58:198-209.

Saito T, Tanaka R, Yoshida S, Washiyama K, Kumanishi T. Immunohistochemical analysis of tumor-infiltrating lymphocytes and major histocompatibility antigens in human gliomas and metastatic brain tumors. **Surg. Neurol.**1988;(29):435-442.

Schenka AA, Machado CM, Grippo MC, Queiroz LS, Schenka NG, Chagas CA, Verinaud L, Brousset P, Vassallo J. Immunophenotypic and ultra structural characterization of a recently established human malignant glioma cell line: NG-97. **Cell. Mol. Neurobiol.** 2005;5:929-941.

Shapiro JR, Shapiro WR. Therapy modifies cellular heterogeneity in human malignant gliomas. **Adv. Oncol.**1992; 8 : 21-29.

Smith HS, Springer EL, Hackett AJ. Nuclear ultrastructure of epithelial cell lines derived from human carcinomas and nonmalignant tissues. **Cancer Res.** 1979; 39: 332 – 344.

Steck PA, Gallick GE, Maxwell SA, Kloetzer WS, Arlinghaus RB, Moser RP, Gutterman JU, Yung WK. Expression of epidermal growth factor receptor and associated glycoprotein on cultured human brain tumor cells. **J Cell biochem.** 1986; 32 : 1-10.

Stein GH. T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro. **J Cell Physiol.** 1979;99(1):43-54.

Tohyama T, Lee VM, Trojanowski JQ. Co-Expression of Low Molecular Weight Neurofilament Protein and Glial fibrillary Acidic Protein in Established Human Glioma Cell Lines. **Am J Pathol.** 1993;142(3):883-92.

Tsuzuki T, Izumoto S, Ohnishi T, Hiraga S, Arita N, Hayakawa T. Neural cell adhesion molecule L1 in gliomas: correlation with TGF-beta and p53. **J Clin Pathol.** 1998;51(1):13-7.

Tysnes OB, Laerum OD. Differential effects of 12-O-tetradecanoyl-13-phorbol acetate (TPA) on growth, migration and invasion of a human glioma cell line. **Anticancer Res.** 1993;13: 1325-1330.

Uhm JH, Gladson CL & Rao JS. The Role of Integrin in the malignant phenotype of gliomas. **Frontiers in Biosc.** 1999; 4 (15): 188-199.

Vos PE, Lamers KJ, Hendriks JC, van Haaren M, Beems T, Zimmerman C, van Geel W, de Reus H, Biert J, Verbeek MM. Glial and neuronal proteins in serum predict outcome after severe traumatic brain injury. **Neurology.** 2004 ;62(8):1303-10.

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; 27(7):831-43.

Wharton SB, Chan KK, Hamilton FA, Anderson JR. Expression of neuronal markers in oligodendrogliomas : an immunohistochemical study. **Neuroph appl neurobiol.** 1998;24 : 302-308.

Wintterle S, Schreiner B, Mitsdoerffer M, Schneider D, Chen L, Meyermann R, Weller M, Wiendl H. Expression of the B7-Related Molecule B7-H1 by Glioma Cells. **Cancer Res.** 2003;63:7462-7467.

Wiranowska M, Ladd S, Smith SR, Gottschall PE. CD44 adhesion molecule and neuro-glial proteoglycan NG2 as invasive markers of gliomas. **Brain Cell Biol.** 2006;35(2-3):159-72.

Witkowski JA. Experimental pathology and the origins of tissue culture Leo Loeb'S contribution. **Medical Hystory.** 1983; 27:269-288.

Wünsch Filho V & Gattás GJF. Molecular biomarkers in cancer: implications for epidemiological research and public health. **Cad. Saúde pública do Rio de Janeiro.** 2001; 17(3): 467-480.

Zagzag D, Salnikow K, Chiriboga L. Downregulation of major histocompatibility antigens in invading glioma cells: stealth invasion of the brain. **Lab Invest.** 2005; 85: 328–41.

Zhan Y, O'Rourke DM. SHP-2-dependent mitogen-activated protein kinase activation regulates EGFRvIII but not wild-type epidermal growth factor receptor phosphorylation and glioblastoma cell survival. **Cancer Res.** 2004;15;64(22):8292-8.

Zhang H, Akman HO, Smith EL, Zhao J, Murphy-Ullrich JE, Batuman OA.: Cellular response to hypoxia involves signaling via Smad proteins. **Blood.** 2003;15;101(6):2253-60.

Zou JP, Morford LA, Chougnet C, Dix AR, Brooks AG, Torres N, Shuman JD, Coligan JE, Brooks WH, Roszman TL, Shearer GM. Human glioma-induced immunosuppression involves soluble factor(s) that alters monocyte cytokine profile and surface markers. **Journal of Immunology.** 1999;162 : 4882-4892.

ANEXOS



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 739-1, sobre "**AMPLIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E IMUNOFENOTÍPICA DA LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA HUMANO -NG-97 E OBSERVAÇÃO DAS CÉLULAS FRENTE À EXPOSIÇÃO AO ANTI-TUMORAL CISPLATINA**" sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Liana Verinaud / Camila Maria Longo Machado** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 04 de novembro de 2004.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 739-1, entitled "**MORPHOLOGICAL, CYTOGENETIC AND IMMUNOCYTOCHEMISTRY CHARACTERIZATION OF A HUMAN GLIOMA CELL LINE. AN OVERLOOK AFTER CISPLATIN TREATMENT**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on November 4, 2004.

Campinas, 04 de novembro de 2004.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

Research article

Open Access

Characterization of cells recovered from the xenotransplanted NG97 human-derived glioma cell line subcultured in a long-term *in vitro*

Camila ML Machado*¹, Rafael Y Ikemori¹, Tatiana Q Zorzeto¹, Ana CMA Nogueira⁵, Suse DS Barbosa⁶, Wilson Savino⁶, André A Schenka², José Vassallo², Juliana K Heinrich³, Fátima Boetcher-Luiz⁴ and Liana Verinaud¹

Address: ¹Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biology, UNICAMP – Campinas, São Paulo, Brazil, ²Laboratory of Investigative and Molecular Pathology-CIPEP, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP – Campinas, São Paulo, Brazil, ³Clinical Specialized Laboratories, Centre of Integral Service to the Health of the Woman-CAISM, UNICAMP – Campinas, São Paulo, Brazil, ⁴Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP – Campinas, São Paulo, Brazil, ⁵Department of Immunology, National Institute of Quality Control and Health, INCQS, FIOCRUZ – Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil and ⁶Laboratory on Thymus Research – FIOCRUZ – Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Email: Camila ML Machado* - camilalongomachado@gmail.com; Rafael Y Ikemori - rafaelikemori@gmail.com; Tatiana Q Zorzeto - tatiqz@yahoo.com; Ana CMA Nogueira - tininhanog@hotmail.com; Suse DS Barbosa - suse@fiocruz.br; Wilson Savino - savino@fiocruz.br; André A Schenka - schenka@hotmail.com; José Vassallo - glaujv@fcm.unicamp.br; Juliana K Heinrich - julianah@unicamp.br; Fátima Boetcher-Luiz - fattimaluiz@gmail.com; Liana Verinaud - verinaud@unicamp.br

* Corresponding author

Published: 8 October 2008

Received: 24 May 2008

BMC Cancer 2008, 8:291 doi:10.1186/1471-2407-8-291

Accepted: 8 October 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/8/291>

© 2008 Machado et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: In order to elucidate tumoral progression and drug resistance, cultured cell lines are valuable tools applied on tumor related assays provided they are well established and characterized. Our laboratory settled the NG97 cell line derived from a human astrocytoma grade III, which started to develop and express important phenotypical characteristics of an astrocytoma grade IV after injection in the flank of nude mice. Astrocytomas are extremely aggressive malignancies of the Central Nervous System (CNS) and account for 46% of all primary malignant brain tumors. Progression to worse prognosis occurs in 85% of the cases possibly due to changes in cell tumor microenvironment and through biological pathways that are still unclear.

Methods: This work focused on characterizing the NG97 cell line specifically after being recovered from the xenotransplant, who maintained their undifferentiated characteristics along the following 60th passages *in vitro*. These cells were subcultivated to evaluate the possible contribution of these undifferentiated characteristics to the malignant progression phenotype. These characteristics were the expression of molecules involved in the processes of migration, dedifferentiation and chromosomal instability.

Results: Results showed that NG97(ht) had an decrease in doubling time through sub cultivation, which was characterized by a converse modulation between the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin. In addition, $\beta 1$ integrins were present in intermediate levels while $\alpha 5$ integrins had a high expression profile as well as fibronectin and laminin.

Cytogenetic analysis of NG97(ht) revealed several chromosomal abnormalities, 89% of the cells showed to be hyperdiploid and the modal number was assigned to be 63. Several acrocentric chromosomes were visualized and at least 30 figures were attributed to be murine. These findings suggest a possible fusion between the original NG97 cells with stromal murine cells in the xenotransplant.

Conclusion: In this study the NG97(ht) cells were characterized to embryonic recovery patterns of intermediate filaments, adhesion molecules expression, chromosomal imbalances and murine chromosomes. In the latter case, these presumably chromosomes were originated as fusions between murine stroma cells and NG97 cell lineage in the xenotransplant. Our results emphasize important queries about astrocytomas tumor progression.

Background

Astrocytomas are highly aggressive tumors that account for around 46% of all the primary malignancies of the Central Nervous System (CNS), demonstrate poor prognosis and statistics show a 5-year survival ranging from 22% for astrocytomas-grade III to only 2% for astrocytomas-grade IV after diagnosis [1]. The treatment is surgical excision followed by adjuvant chemotherapy [2] and radiotherapy; however, many patients exhibit recurrences due to intrinsic drug resistance within 2 years following the removal of the tumoral mass, leading to death [3].

A better understanding of tumor dynamics and progression pathways will improve both diagnosis and therapeutics. For this regard, many laboratories have established cell lines from tumors [4-7]. In the same way, the NG97 glioma cell line was recently established in our laboratory after the removal of a tumor mass from a patient who had been diagnosed with an astrocytoma grade III [8]. The subcutaneous inoculation of NG97 cells in the flank of athymic mice (nu/nu) resulted in the development of solid tumor masses, demonstrating its tumorigenicity [8]. When the tumor mass was excised and examined, a spontaneous tumor progression was confirmed by the presence of prominent vascularity, presence of pseudopalisading cells and increase of GFAP which were compatible with a grade IV astrocytoma or glioblastoma multiforme [9]. Cells from the tumor mass were then processed and cultivated *in vitro* as an adherent monolayer and had the same morphological characteristics of the original culture, before the xenotransplant [8].

Many authors report the tumor progression phenotype as a result of expression of dedifferentiated characteristics of the cells. During the embryonic development of the CNS, astrocytes hypothetically are originated from progenitors that solely express vimentin as a cytoskeleton filament [10,11]. These cells have a migratory pattern and before they migrate to the glia radial, they express vimentin and GFAP during cell maturation period [12]. By the end of this process, mature cells express mainly GFAP [13] as a cytoskeleton protein. In the adult brain, most of glial cells

express GFAP and this expression can be modified in the course of many diseases such as Alzheimer's when they become positive or even negative as in astrocytomas [14]. For these tumors, a GFAP and vimentin proteomics modulatory pattern was described in patients who progressed from grade III to IV [15,16].

The migration pattern presented by glioma cells can be associated to the progenitor and embryonic CNS cell migration [17]. The transformed cells that reach a malignant progression, acquire the ability to migrate through tissues in the tumor microenvironment, consequently resulting in tumor mass growth. This infiltration ability is driven by a set of molecules called integrins and their receptors in the extracellular matrix [18]. In gliomas, the most representatives of this group are a quite a few forms of α and β 1 integrins, laminin and fibronectin. [19-21].

Considering the tumor progression, since 70's decade, there is a consensus about the genetic instability resulting in clones that would become more aggressive after successive mitotic divisions [22]. About five decades earlier, Boveri (1929) [23] observed that sea urchin eggs experimentally fertilized with two (rather than one) sets of spermatozoa underwent abnormal mitosis and proposed that the deregulated growth of cancer cells might also be a result of chromosomal imbalance. These findings have led some researchers to postulate that *in vivo* cell fusion in cancer [24] would not only be responsible for chromosomal abnormalities, but also for the acquisition of the malignant phenotype and metastasis promotion [25,26].

In this study, we investigated the expression of astrocytic molecules of embryonic origin, adhesion and deadhesion molecules and the cytogenetic patterns of the NG97(ht); and its characterization may clarify the tumor spontaneous progression into astrocytoma.

Methods

Cell culture

The NG97(ht) xenotransplanted cultures were derived from the NG97 cell line. It was firstly described in 2001

[4] and obtained through the excision, cutting and enzymatic digestion of the tumor mass of the xenotransplant and *in vitro* cultivation of the small pieces, according to the explant technique. Subcultures were carried out in D-valine-containing Eagle's minimal Essential Medium (GIBCO) supplemented with 2 mmol/L L-glutamine, 10 mmol/L HEPES, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 10% heat-inactivated fetal calf serum (Nutricell, Campinas-SP-Brazil) and stocked as described before [4]. After being defrost and adapted to the cultivation for five passages, cells were cultivated by more than a hundred passages in RPMI-1640, supplemented with 13% heat-inactivated fetal calf serum (Nutricell, Campinas, SP, Brazil) and 25 µg/mL streptomycin. Cultures were maintained in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂. The medium was changed after intervals of 24 h when the culture almost reached confluence. Sub culturing was performed after treatment with trypsin and versene (Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil). In this moment, the NG97(ht) cell line was underwent about 120 passages.

Subcultivations growths curves and cells passages doubling time

The amount of 1×10^4 cells of NG97 cells was cultivated in triplicates on 24-well plate for 11 days to determine the growth curve. After processing the cultures with the routine TVS solution treatment (trypsin-versene solution), aliquots of the cell suspension obtained was diluted daily in 1% trypan blue in RPMI medium and counted in a Neubauer chamber.

The number of cells duplications in culture was calculated according to the formula: (1.1) $N = N_0 \times 2^n$, where "N" is the final number of cells after 11 days of culture, N_0 the number at the beginning of the exponential growth phase of culture and "n" the number of duplications in the amount of cells.

For the determination of the doubling time (T), the following formulas were used: (1.2) $g = t - t_0$, where "t" represents the final time in hours when "n" was determined (as described and determined above in (1.1) equation) and "t₀" the initial time when N_0 was studied. Each final cell doubling time was obtained by the mathematical formula: $T = g/n$ [27].

Western blotting reaction

total protein extraction was carried out after cells being homogenized in 1% Triton X-100, 50 mM PB pH 7.4, 1 mM sodium pirophosphate, 1 mM sodium fluoride, 5 mM EDTA, 1 mM sodium vanadate, 1% protease inhibitor cocktail (P8340 Sigma), 7 M Urea, 2 M Thiourea. Sample homogenization was carried out at 4°C using a Politron 20 s generator (Brinkmann) set at maximum speed for 30 seconds. To remove insoluble materials, cen-

trifugation (12,000 g centrifugation, 4°C for 15 minutes) was performed. Protein concentration was determined using the Bradford method [28]. Total protein extracts from each cell sample were electrophoretically separated in SDS-PAGE and electro blotted to a nitrocellulose membrane according to standard procedures [29]. Membranes were blocked with PBS-tween® containing 5% non-fat dry milk and then incubated with an anti-GFAP (polyclonal antibody, rabbit anti-bovine GFAP) (cat. no. Z0334 from DakoCytomation, California, USA) and anti vimentin (mouse monoclonal antibody, Vim clone 3B4) (DakoCytomation, California, USA) diluted (1:1,000) in PBS-tween containing 3% BSA for 12 h at 4°C. Membranes were washed with PBS-tween® and incubated with HRP labeled secondary antibody (Zymed, 1:10,000). Reactive bands were detected with the SuperSignal West Pico chemiluminescent kit (Pierce).

Immunocytochemistry

NG97(ht) cells from the 19th to 83rd passages were grown on 13 mm sterile rounded cover slips which were rinsed three times in phosphate saline buffer (PBS), pH 7.4 at RT, and treated with 3% H₂O₂ in methanol to suppress endogenous peroxidase activity. After being washed in PBS, slides were treated with 1% normal mouse serum at RT for 1 hour. The slides were washed again in PBS, and then incubated overnight at 4°C with the following antibodies for GFAP (anti-rabbit polyclonal anti-GFAP, cat. no. Z0334 from DakoCytomation, California, USA) and anti-vimentin (mouse monoclonal antibody, clone V9, DakoCytomation, California, USA). All incubations were carried out in a darkened, humidified chamber at RT. After being washed in PBS, the slides were incubated with labeled polymer horseradish peroxidase anti-mouse/anti-rabbit (EnVysion plus® System, DakoCytomation; Carpinteria, CA, USA) for 1 hour at RT. Peroxidase enzyme activity was visualized by DAB solution (DAKO liquid DAB substrate-chromogen solution). To stop the reaction distilled water was applied. The slides were then weakly counter-stained with Harris' Haematoxylin, dehydrated in an ethanol series and mounted in Permount® medium. The images were captured with a Nikon microscope connected to an image acquiring system (Leyca® system). Positive cells were counted using specific software (Pro-plus 4.3 software®). For each batch positive and negative controls were used.

Flow Cytometry

Cells from the 22nd, 54th and 92nd passages were harvested from culture flasks, washed and re-suspended in cold PBS supplemented with 0.5% BSA. Then, cells were incubated for 30 minutes at RT in the dark with monoclonal mouse antibodies such as: anti-β1-PECy5, anti-α4-PE, anti-α5-PE, anti-α6-PE and isotypes controls such as mouse IgG-PECy5 and IgG-PE (BD biosciences®-Pharmingen, Moun-

tain View, CA, USA). The expression of these surface molecules were analyzed by flow cytometry (FACSCalibur®, BD Biosciences, Mountain View, CA, USA) and quantified by WinMdi® shareware software. The cloned human thymic epithelial cell line described by Fernandez and co-workers [30] was included as a positive control for the flow cytometry reaction.

Immunofluorescence

the slides containing NG97(ht) were rinsed in PBS and incubated for 1 h at 37°C with mouse anti-human fibronectin and anti-human laminin antibodies (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA). For detection, slides were incubated for 2 hours at RT with FITC-conjugated rabbit anti-mouse serum (Santa Cruz Biotechnology Inc., California, CA, and USA). Slides were mounted using the ProLong Antifade Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) according to the manufacturer's instructions, and immunoreactions were viewed using an Olympus fluorescent microscopic coupled to a Kodak camera. Negative controls in which normal mouse immunoglobulin was substituted by the primary antibody were included as well as positive controls with the cloned human thymic epithelial cell line described elsewhere [30].

Cytogenetics

The analysis of the 20th passage was obtained after routine cell culture for karyotype. Briefly metaphase spreads were obtained after 6-hour incubation with 100 µl of Karyomax 10 µg/ml (GIBCO). GTG and C-banding were assessed through standard banding protocols. Image analysis and acquisition were performed in a Zeiss Axioplan microscope 2 * equipped with the BandView software (Applied Spectral Imaging). The results of the several analyses were compared at the same passage or, when it is impossible, in a representing of a near passage for analysis.

Statistical analysis

A linear regression was calculated to verify a relation between the duplication time and the progression of cell passages in culture, with the software SYSTAT 10, 2 for Windows (SYSTAT Software Incorporation, 2002). For the validation of the described model, the analysis of residues was also assessed.

Results

Cell Growth Kinetics

The NG97(ht) cell growth was observed in the 19th, 24th, 32nd, 43rd, 59th, 65th and 73rd cell passages. This study of several passages in culture improves the knowledge about the maintenance or lack of all features observed in these cells from *in vivo* tumoral mass to cells in long-term subcultivation *in vitro*.

All curves revealed a typical pattern of cell kinetics and growth including four distinct phases: an initial phase which is represented by slight cells divisions (i), followed by an exponential growth (ii) and a stationary phase (iii). An end phase represented by a growth decline as well as cell death (iv) is shown in figure 1. The doubling time was calculated for each cell passage (Table 1) assayed and the statistical analysis showed a negative linear correlation between the NG97(ht) doubling time through the subcultivation passages, which demonstrates a significant doubling time decrease (fig. 2A). This linear model regression was validated by residual analysis ($R^2 = 715,415$; $F_{1,25} = 30,597$ e $P < 0,001$) as represented in fig. 2B.

GFAP and vimentin patterns

In order to assess the ontogenic protein patterns and their stability through cell subcultivation: early (until 50th), middle (from 51st to 79th) and later (after 80th) NG97(ht) cell passages were analyzed.

Western Blot (WB) reactions showed that cells expressed basal amounts of GFAP (fig. 3A) and Vimentin (fig. 3B) cytoskeleton proteins in the cytoplasm fraction containing 5 µg and 30 µg amounts of proteins, respectively. In particular, another molecular weight (approximately 41,8 kDa) for vimentin was also registered from protein degradation during 33rd cell passage protein extraction by sonication.

This observed GFAP detection did not represent the functional molecular polymerized expression. These GFAP and vimentin cytoskeletons conformational arrangements were demonstrated by immunocytochemistry and suggested a modulation pattern through cell subcultivation. An intense cytoplasmatic staining for GFAP was observed in 100% of cells in the 19th cell passage (fig. 4A). The same pattern was present in approximately 85% of the NG97(ht) cells in the 30th (fig. 4B) and, finally, totally absent in 51st (fig. 4C) and 80th (fig. 4D) cell passages. Nevertheless, it was shown an absence of staining for cyto-

Table 1: Increase of cell proliferation by doubling culture time decreased calculated to NG97(ht) trough cell subcultivation

Cell passages	Doubling time (hours)
19	30
24	32
32	36
37	29
43	23
51	23
59	17
65	21
73	19

* Approximated values.

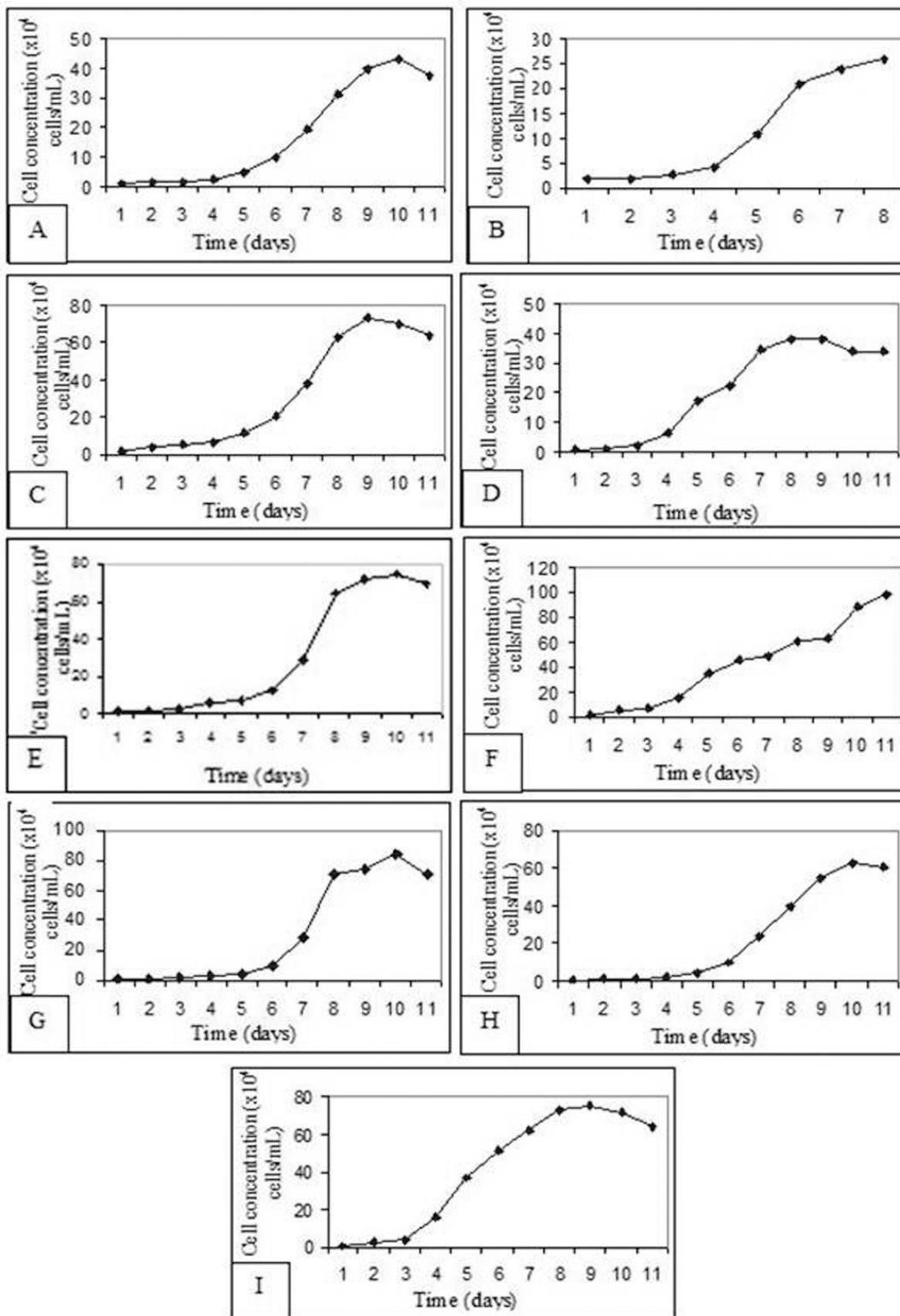


Figure 1
Representative cell growth graphics of different NG97(ht) cells passage through subcultivation: 19th (A), 24th (B), 32nd (C), 37th (D), 43rd (E), 51st (F), 59th (G), 65th (H) e 73rd (I).

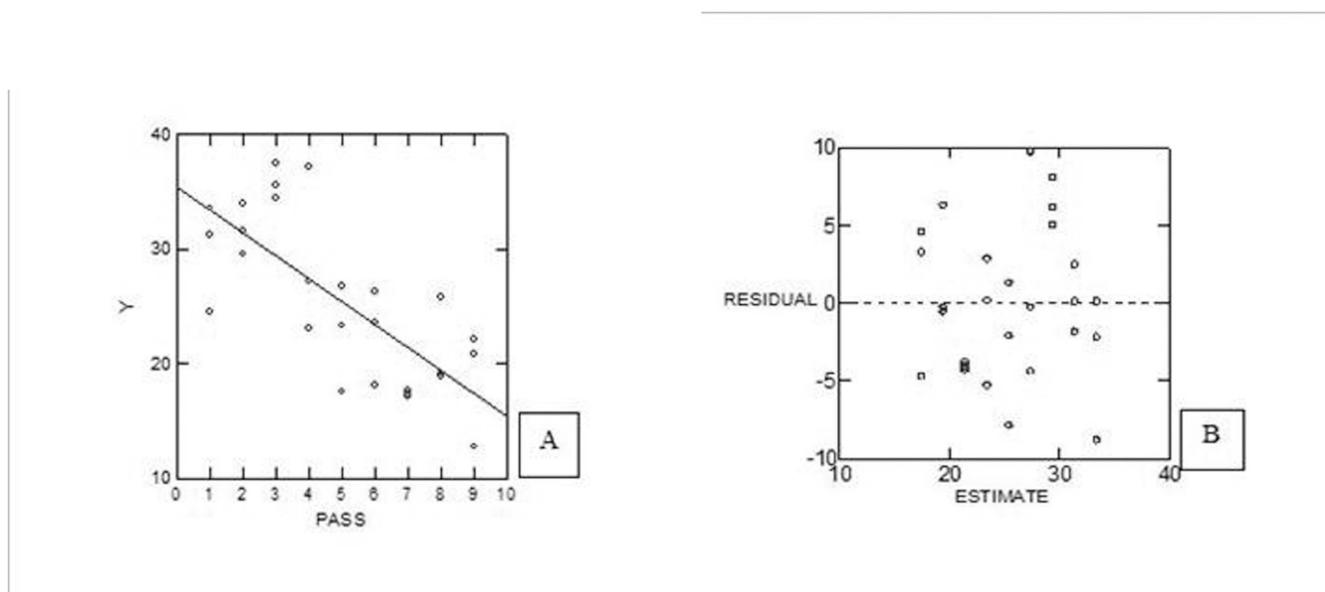


Figure 2

Statistical analysis to validate the significance of the NG97(ht) doubling time decrease. The simple linear regression was used and show the correlation between cell doubling time (plotted in "Y" axis) and the cell passages at subculture, which was represented by ordinal values (plotted in "X" axis). The equation that describes the linear regression mathematical model was $y = 35.379 - 1.994x$ (A). (B) This graphic represents the residual analysis to validate the mathematic model ($R^2 = 715,415$; $F_{1,25} = 30,597$ and $P < 0,001$).

plasmatic vimentin in the 21st cell passage (fig. 4E), followed by weakly stained areas in the 40th NG97(ht) cell passage (fig. 4F). Approximately 54% of NG97(ht) cells in the 59th passage (fig. 4G) and, finally, a markedly positive staining in the 83rd cell passage (fig. 4H).

Expression of integrins and their receptors

Flow cytometry was applied on passages 22nd, 54th and 92nd for the assay of $\beta 1$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ and $\alpha 6$ subunits (Table 2).

The table 2 shows a low average expression of the $\beta 1$ chain (52,72%) through cell subcultivation, when compared to the $\alpha 5$ subunit that presented an average of 98,32% of positive cells through subcultivation. The $\alpha 4$ and $\alpha 6$ integrins were not detected. The positive control, a cloned human thymic epithelial cell line established by Fernandez and co-workers [30], showed a 95–99% range of expression through flow cytometry for $\beta 1$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ and $\alpha 6$ subunits (not shown).

Fibronectin and laminin staining was performed on fixed cells, which may illustrate the intracellular and extracellular presence of proteins on living cells. A punctate fibronectin and laminin immunoreactivity mainly located in the perinuclear area was observed (fig. 5A and 5B), whereas a fibronectin labelled network and immunoreactive intercellular fibrils were clearly detected in NG97(ht)

cells (fig. 5A). In some cells with a known migratory pattern, it was evidenced the accumulation of fibronectin in the lamellipodia cytoplasm extensions. The same pattern was observed for laminin and seems to be more intense in polynucleated cells (fig. 5B). The positive control, the cloned human thymic epithelial cell line [30], presented both intracellular and extracellular fibronectin and laminin expressions (not shown).

Structural and Numerical Chromosomal Abnormalities

GTG-band staining applied to the 20th passage of the NG97(ht) cells revealed remarkably fused, translocated segments and acentric fragments (fig. 6A), while several regions of heterochromatin, dicentrics and acrocentric chromosomes were visualized by C-banding (fig. 6B).

The analysis of 100 metaphases showed more than 50 numerical and structural abnormalities, with a modal number of 63 chromosomes. In addition, 89% of metaphases exhibit a range of 20 to 49 acrocentric chromosomes showing a strong correlation with murine banding pattern (fig. 7). The most frequent numerical abnormalities were the monosomies (2, 5, 11, 16, 17 and X), trisomies (1, 10, 14, 15, 16 and 19), the tetrasomies (4 and 6), as well as structural alterations like isochromosome formations (murine chr 4 and chr 14), disbalanced fusion (murine: ? → chr 1) and pericentric inversion (chr 15).

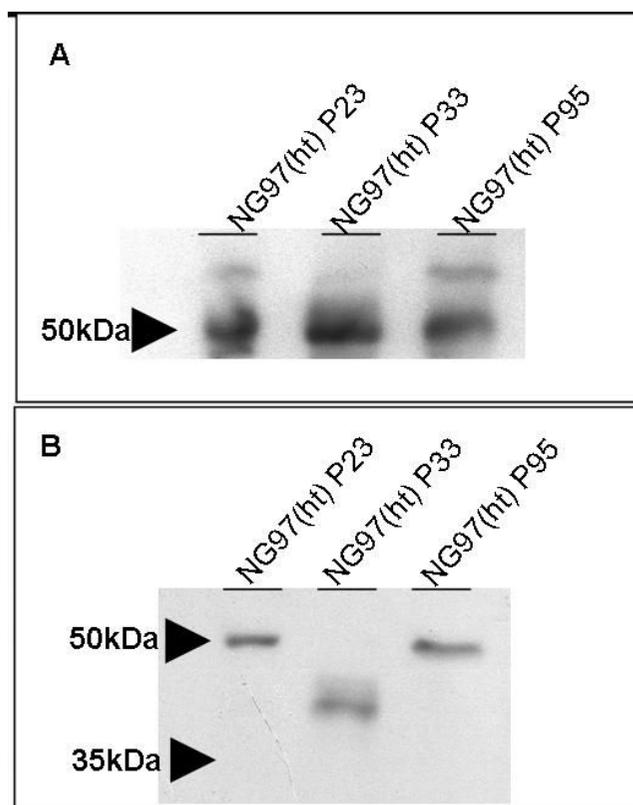


Figure 3
Western Blot of NG97(ht) from different cell passages subcultivation to (A) GFAP and (B) vimentin, which contained approximately 5 μ g and 30 μ g of protein cytoplasm fraction, respectively. Lines 1, 2 and 3 show 23rd, 33rd e 95th cell passages, respectively. (A) Note the GFAP basal linear conformational protein expression banded at approximated 50 kDa molecular weight in all passages. (B) Note the vimentin linear conformational basal expression banded at approximated 50 kDa molecular weight at earlier and later passages, though a 41,8 kDa molecular weight banded the 33rd cell passage resulted from a partial vimentin degradation by the protein sonication extraction procedure. (Positive and negative controls were assayed but were omitted here).

Discussion

Several studies have associated astrocytomas malignant progression with amplification, over expression or mutation of specific gene sequences [31]. Considering that morphological alterations of the neoplastic tissue are directly linked to these genetic changes, researches have tried to establish which chromosome alterations are directly linked to astrocytomas progression [32,33]. The absence of this correlation is partially due to the fact that astrocytomas present an intrinsic chromosomal instability pattern even in different intra-tumoral regions, disabling this direct correlation.

In vivo xenograph tumor models developed by subcutaneous implantation of glioma cell lines in mice are extensively used [6,7] to test therapeutical approaches that target angiogenesis, local invasion and secretion of immune suppressive molecules. These models have the advantages that they are highly tumorigenic, show reproducible growth rates and because their superficial location allows an easily access to tumoral masses. Besides, tumoral mass volume in these dorsal models would mimic the original astrocytoma volume [34] and reproduce the hypothetical "vicious cycle of thrombosis, necrosis, hypoxia, enhanced tumor and metabolic demand" to the development of GBM [35]. Moreover, stable cell cultures derived from these tumors are important tools to therapeutical and biological analysis. However, for immunotherapeutical approaches, the flank microenvironment cells in culture represents a limitation to these models once the inflammatory cytokines and infiltrating cells profile have must be considered for data analysis [36].

The modulatory pattern of intermediate filaments GFAP and vimentin microarchitectural arrangement in NG97(ht) cells

The astrocytes embryogenic origins can be evaluated by the expression of GFAP, in particular after migration of the progenitor to the radial glia during the CNS development; which is dependent of chemical mediators present in the brain microenvironment [37]. This migratory phase is accompanied by an early vimentin expression, an indicative of the neuroectodermal glial precursor origin. Vimentin establishes a link with microtubules or cytoskeleton filaments to form a dynamic polymerization and depolymerization balance that allows cellular motility [38]. Besides, some glial precursors have a transitory phase named astrocytes type I, where vimentin and GFAP are expressed, which in adulthood originates oligodendrocytes [37]. Thus, the modulatory GFAP and vimentin expression pattern presented by the NG97(ht) cells showed that through cell subcultivation, the reduced immunocytochemistry detection of GFAP is associated to an increased detection of vimentin which may account for the recovery of embryonic characteristics. This feature is observed in other glioma cells [39] and patients diagnosed with astrocytoma grade III and IV [15,16]. Together with GFAP immunodetection decrease and vimentin enhance patterns; there is an increase on cell mitosis concomitant to a decline in cell doubling time. This may be associated with loss of GFAP expression *in vivo*, frequently found in high grade astrocytomas, although this event does not constitute a mandatory step in tumor development and it only represents the cell evolution towards an undifferentiated state. In this sense, some kinases related to cell cycle regulation, like kinases C and cdc2, also may participate of phosphorylation and depolymerization processes of cytoskeleton intermediary filaments at the

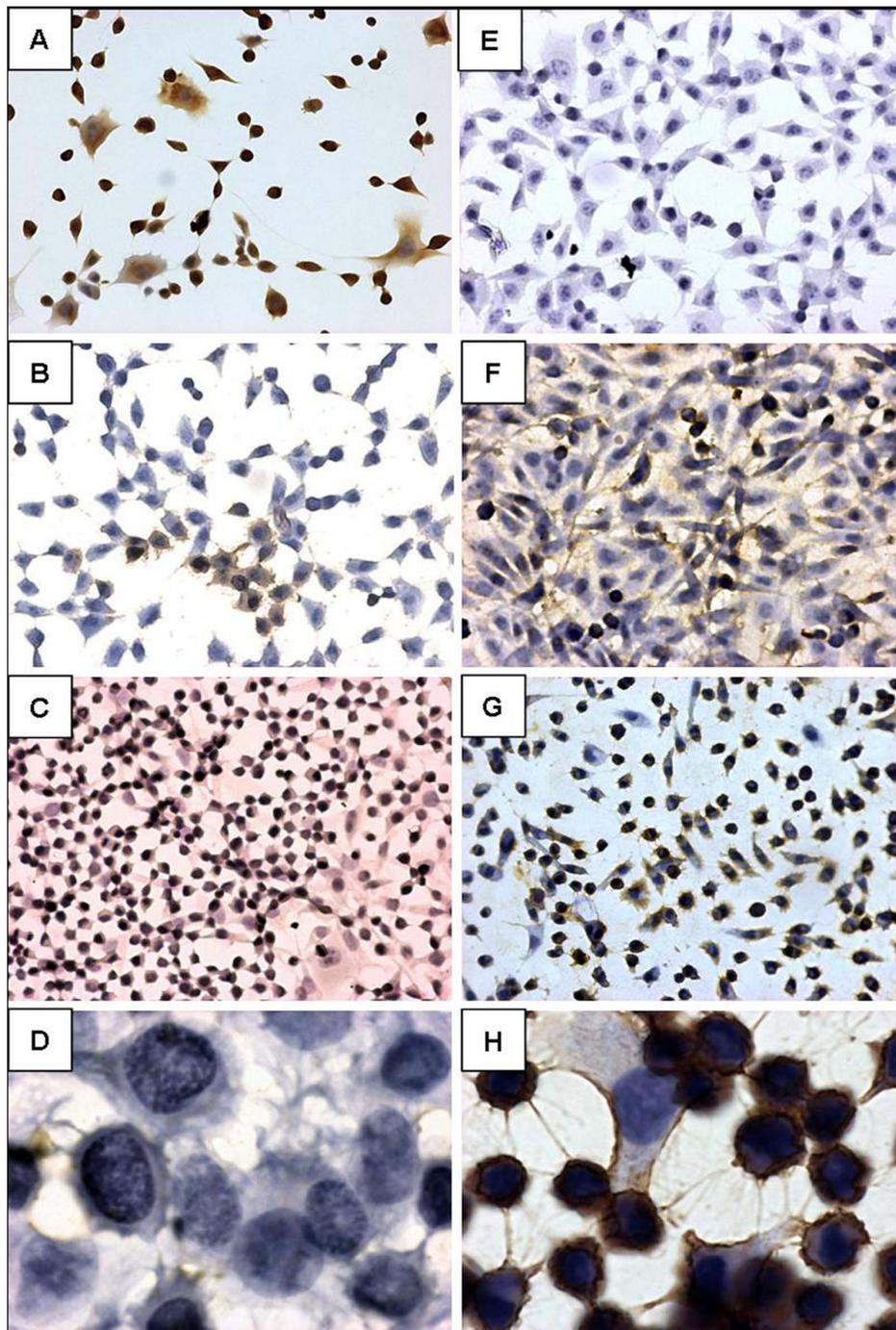


Figure 4

GFAP and vimentin immunocytochemistry through cell subcultivation. Notice the negative modulatory expression pattern to GFAP (A – D) concomitant to the positive modulatory pattern to vimentin (E-H) in NG97(ht). The GFAP appears intensely marked in 100% of the 19th cell passage cytoplasm (A), being presented in approximately 85% of the 30th (B) and, finally, totally absent in 51st (C) and 80th (D) cell passages. Nonetheless, the vimentin were absent at 21st (E) cell passage, presented in weakly areas in the 40th (F) and in 54% of the 59th (G) cell passage and, finally, markedly positive at 83rd (H) cell passage (Original magnification: A – C and E – G = 200× and D and H = 1000×) (Positive and negative controls were assayed but were not displayed here).

Table 2: Absence of $\alpha 4$ and $\alpha 6$ integrin subunits.

Markers	NG97(ht)				
	early	middle	Later	average	SD
$\beta 1$ (CD29)	49,0	58,47	50,70	52,72	5,04
$\alpha 4$ (CD49d)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
$\alpha 5$ (CD49e)	98,03	98,72	98,21	98,32	0,35
$\alpha 6$ (CD49f)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Intermediate $\beta 1$ and high $\alpha 5$ integrin expression levels in: earlier (22nd), middle (54th) and later (92nd) NG97(ht) cell passages by flow cytometry. The results showed the percentage of positive cells, the average of positivity for each marker and the standard deviation (SD). *Representative values of 10^4 cells NG97(ht) analyzed. (Positive controls with the cloned human thymic epithelial cell line was assayed but was not displayed here).

beginning of cell division. So, the absence of the main component of astrocytes cytoskeleton, GFAP, would increase enzyme accessibility to substrates, resulting in progressive cell cycle acceleration [40]. It is also important to note that the increase of positive vimentin cells cannot be attributed to the possible NG97 cell fusion with the murine stroma in the xenotransplant, because the monoclonal antibodies anti-vimentin clone V9 used in the immunocytochemistry recognizes specifically the human vimentin [41]. However, the monoclonal antibodies anti-vimentin 3B4 clone used in Western Blot reaction recognizes both human and murine proteins. Thus, Ciesielski-Treska and colleagues documented before the $\sim 41,8$ kDa vimentin sub band as an artifact resulted from protein extraction [42].

High migratory and malignant potential driven by the NG97(ht) expression of $\alpha 5\beta 1$, fibronectin and laminin

The increased aggressiveness of astrocytomas is accompanied by the acquisition of cellular migratory potential [18], from the modulation of integrins and their receptors expression with an increase of lamellipodia cytoplasm extensions and diminution of focal adhesion to the extracellular matrix [43].

Integrins are composed of two non covalently associated subunits (α and β) that form a binding pocket for specific sequences or domains in extracellular matrix (ECM) molecules; the most well known is the tripeptide RGD (arginin-glycin-aspartic acid) domain found in fibronectin and laminin ECM molecules. In gliomas, the $\alpha 4$, $\alpha 5$ and $\alpha 6$ molecules combined with $\beta 1$ subunit in cellular membrane form the integrin adhesion molecules that can also play a role in intracellular cell signaling that leads, at last, to promote an increase in proliferation rates [44].

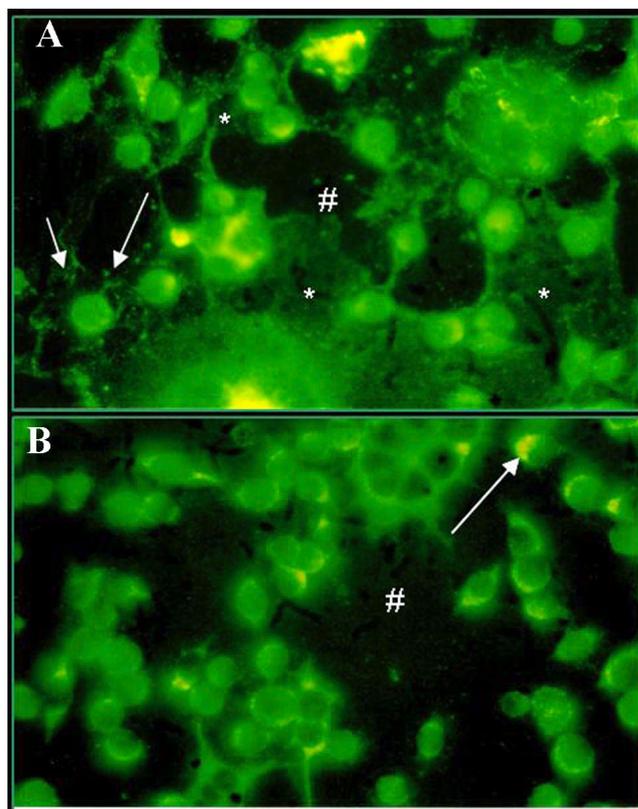


Figure 5
Immunofluorescence in the NG97(ht) 20th cell passage for (A) fibronectin and (B) laminin expression which were represented by a diffusely cytoplasmatic pattern, hot spot areas (#) and some fibrils (*) deposition in the ECM and increase of polymerization in the lamellipodia cytoplasmatic extensions (arrow) (original magnification: 400 \times). (Positive controls with cells of cloned human thymic epithelial lineage were assayed; however the data are not displayed here).

This integrin molecule heterodimerization and clustering can be modulated by RGD polypeptides concentration [44]. The absence of $\alpha 4\beta 1$ expression observed in NG97(ht) was also documented previously in gliomas cell lines [44]. Besides, some studies only demonstrated the expression of $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ and their ligands both *in vivo* and *in vitro*. The fibronectin ligand for the $\alpha 5\beta 1$ integrin was described by some authors to be increased or decreased in gliomas influencing its invasive patterns. A high-level expression of $\alpha 5$ monomeric integrin concomitant to the $\beta 1$ intermediate expression was observed, suggesting an unfunctional $\alpha 5\beta 1$ integrin expression. Indeed, some authors describe this fact as a result of differential interaction of integrin molecules in different tumoral mass regions. Specifically in the tumor core, $\alpha 5\beta 1$ is functionally expressed to modulate cell divisions, while $\alpha 5\beta 1$ interaction with fibronectin in the ECM induces cell

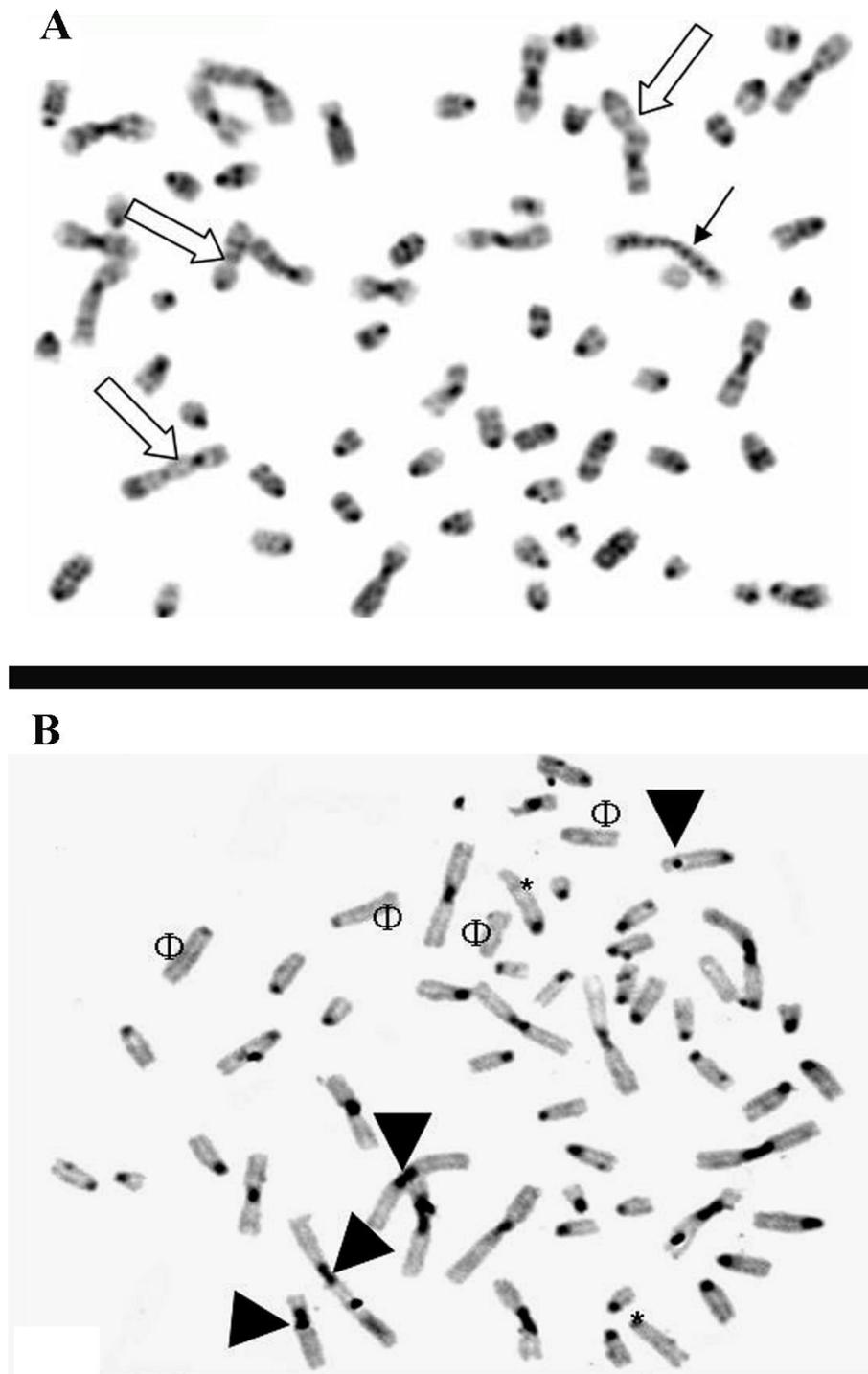


Figure 6
Digitalized images from NG97(ht) cells spread metaphases. (A) G-banded chromosomes with 400 bp resolution showing a large amount of chromosomal imbalances represented by figures of bridge (black arrow) and fused chromosomes (white arrows). (B) These breakages formed acrocentric (*) and acentric (Φ) chromosomes which are evidenced by C-band technique. Notice the dicentrics (arrow head) chromosomes and heterochromatin regions.

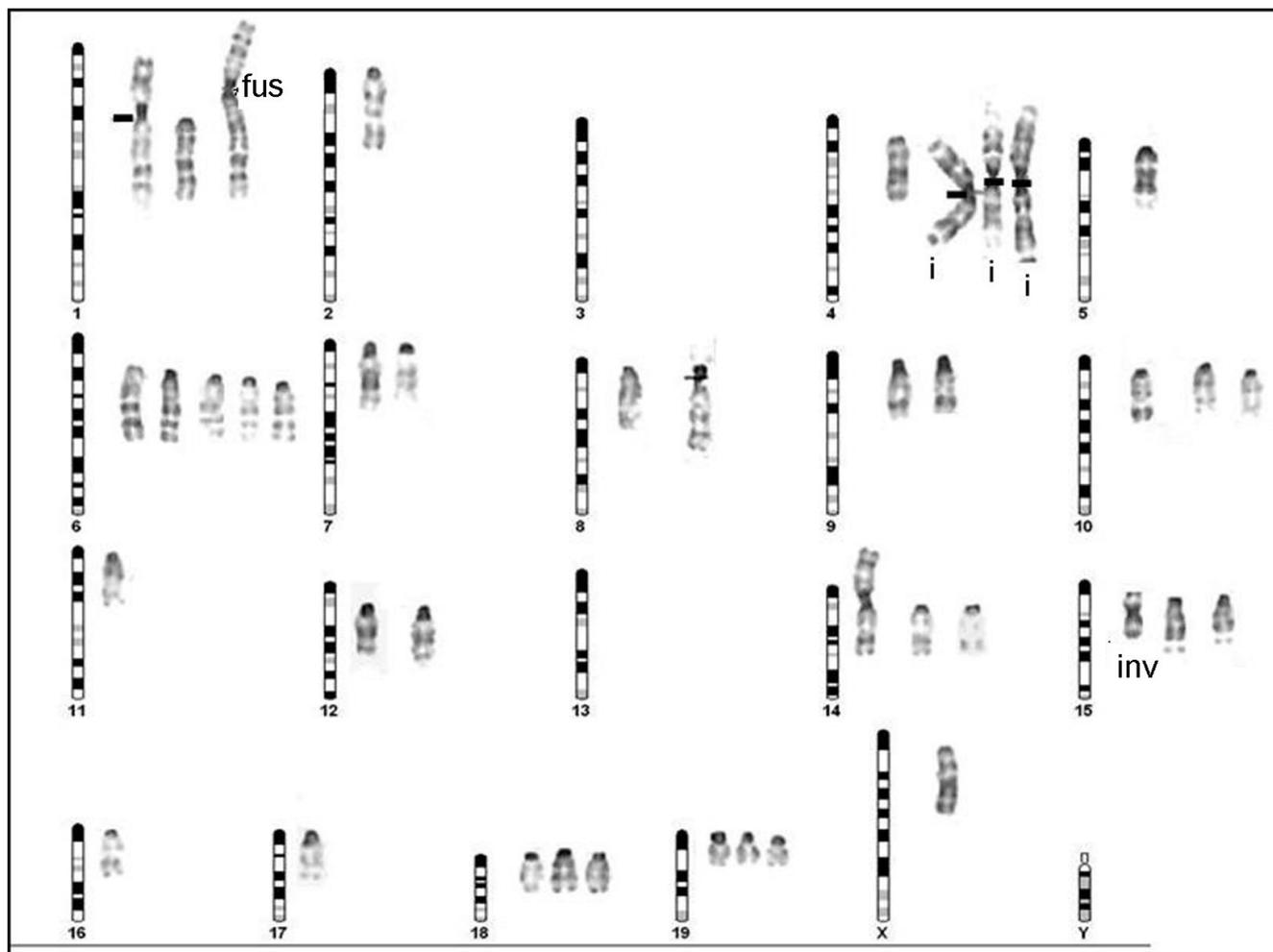


Figure 7
Mouse representative diagram and the corresponding NG97(ht) murine karyotype. Note the murine acrocentric chromosomes associated with the cell line composed of isochromosomes (i), fusion (fusion), absences (3 and 13), monosomies (2,5,11,16 and X), trisomies (1,10,14,15,16 and 19), tetrasomies (4 and 6) and chromosomes with pericentric inversion (inv).

migration [45]. It is hypothesized that the reduced $\beta 1$ integrin and the high expression of $\alpha 5$ would correspond to an increased expression of the Mgat5 enzyme during malignant transformation resulting in an increase of $\beta 1,6$ glycosides ramifications at the $\beta 1$ subunit. This process could reduce integrin dimerization and clusterization of $\beta 1$ and $\alpha 5$ [46], once the fibronectin is synthesized and released to the extracellular compartment of the NG97(ht) cells, this would be a high stimuli to $\alpha 5\beta 1$ expression. In the NG97(ht) cells, no expression of $\alpha 6\beta 1$ integrin was observed, although its laminin ligand was present in the cytoplasm. It is reasonable to ponder that the $\alpha 6\beta 1$ expression absence is a result of a lack of stimuli from the microenvironment once laminins were detected in the NG97(ht) mainly in the cytoplasm. Further experiments aiming to assess the integrins functionalities in the

cells NG97(ht) will be developed in our laboratory to elucidate these questions.

The chromosomal abnormalities as a possible explanation for the spontaneous tumoral progression

Also associated to malignant transformation, chromosomal alterations in glioma lineages are poorly described in the literature, while many cytogenetical evaluations in patients were reported. Nevertheless, aneuploidy, hyperploidy or numerical abnormalities documentations presented similarities between literature data in gliomas, pointing to a correlation with the tumoral phenotype [47]. Accordingly to some authors, the aneuploid phenotype would not be the cause, but the consequence of cumulative alterations provided by the tumoral microenvironment [22,26]. The chromosomal instability caused

by cytogenetical heterogeneity is responsible for the malignant progression but is still to be fully elucidated [47]. Jacobsen and colleagues [25] demonstrated that mice inoculated with human-derived breast cancer cell lines (BC6) presented cell fusion with murine stroma (BJ3Z), leading to an increased aggressiveness. Pawlek [24], in his review on melanomas, showed solid evidences that stroma immune system cells from tumoral host fused with tumoral cells, not only causing aneuploidy but contributing for other mechanisms related to the malignant phenotype including aberrant glycosylation and metastasis. The NG97(ht) karyotyping and immunophenotyping are in agreement with the cell fusion phenomena, once murine chromosomes were observed in the NG97(ht) cells as well CD86 and CD44 murine proteins detected by flow cytometry (data not shown). Also, a possible increase of aggressiveness, given by the reduction of the doubling time from 72 h at NG97 cell establishment [8] to currently 25 h was noticed to occur within the NG97(ht) cells. Nevertheless, the evaluation of these murine chromosomes translocated fragments with human chromosomes or *vice* and *versa* by concomitant human/murine Spectral Karyotyping, as well as the possible chimerisms, must be an objective of future studies. In addition, the evaluation of human cryptic chromosomes analysis by Fluorescent Hybridization could be an important target for further researches.

Conclusion

The NG97(ht) cells possesses embryonic recovery patterns of intermediate filaments and adhesion molecules expression that corroborate the astrocytoma grade IV diagnosis after NG97 inoculation in nude mice. Furthermore, the chromosomal imbalances and a tumoral cell fusion with the murine stroma cells in the xenotransplant give clues to the spontaneous *in vitro* cell progression to the most aggressive astrocytoma phenotype. However, further studies are necessary to address unanswered questions regarding the *in vitro* tumoral progression of the NG97(ht) cells, aiming to translate these events to the clinical practice and management of astrocytoma tumors.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

This work is part of a Doctor's Dissertation by CMLM. All authors intensely discussed these results.

Acknowledgements

The authors would like to thank Marileila Varella-Garcia, PhD for the critical discussion on karyotype issues and Roger Chammas, PhD for the extended discussion of the results. This work was partially supported with grants from CAPES (Coordenação para o Aperfeiçoamento de Pessoal em Nível Superior-Brazil), FAPESP (#04/13069-0) and FAEPEX-UNICAMP (#1282/06).

References

1. Fremgen AM, Bland KI, McGinnis LS Jr, Eyre HJ, McDonald CJ, Menck HR, Murphy GP: **Clinical highlights from the national cancer data base, 1999.** *CA Cancer J Clin* 1999, **49**:145-58.
2. Kleihues P, Cavenee WK: **WHO classification of tumours of the nervous system.** In *Pathology and genetics of tumours of the nervous system* Edited by: Kleihues P, Cavenee WK. Lyon: IARC; 2000:6-7.
3. Chang SM, Parney IF, Huang W, Anderson FA Jr, Asher AL, Bernstein M, Lillehei KO, Brem H, Berger MS, Laws ER: **Patterns of care for adults with newly diagnosed malignant glioma.** *JAMA* 2005, **293**(20):2469-70.
4. 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, **27**(7):831-43.
5. Bigner DD, Bigner SH, Pontén J, Westermarck B, Mahaley MS, Ruoslahti E, Herschman H, Eng LF, Wikstrand CJ: **Heterogeneity of genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas.** *J Neuropathol Exp Neurol* 1981, **40**(3):201-229.
6. Manuelidis EE: **Long-term lines of tissue cultures of intracranial tumors.** *J Neurosurg* 1965, **22**:368-373.
7. Magnani I, Gueneri S, Pollo B, Cirenei N, Colombo BM, Broggi G, Galli C, Bugiani O, DiDonato S, Finocchiaro G, Conti AMF: **Increasing complexity of the karyotype in 50 human gliomas. Progressive evolution and de novo occurrence of cytogenetic alterations.** *Cancer Genet Cytogenet* 1994, **15**:75(2):77-89.
8. Grippo MC, Pentado PF, Carelli EF, Cruz-Höfling MA, Verinaud L: **Establishment and partial characterization of a continuous Human Malignant Glioma cell Line-NG-97.** *Cell Mol Neurobiol* 2001, **4**:421-428.
9. Schenka AA, Machado CM, Grippo MC, Queiroz LS, Schenka NG, Chagas CA, Verinaud L, Brousset P, Vassallo J: **Immunophenotypic And Ultra Structural Characterization Of A Recently Established Human Malignant Glioma Cell Line: NG-97.** *Cell Mol Neurobiol* 2005, **5**:929-941.
10. Chisholm JC, Houlinston E: **Cytokeratin filament assembly in the pre-implantation mouse embryo.** *Development* 1987, **101**:565-582.
11. Bigami A, Raju T, Dahl D: **Localization of vimentin, the nonspecific intermediate filament protein, in embryonal glia and in early differentiating neurons.** *Dev Biol* 1982, **91**:286-295.
12. Dahl D: **The vimentin-GFA protein transition in rat neuroglia cytoskeleton occurs at the time of myelination.** *J Neurosci Res* 1981, **6**:741-748.
13. Sun YE, Martinowich K, Ge W: **Making and repairing the mammalian brain – signaling toward neurogenesis and gliogenesis.** *Semin Cell Dev Biol* 2003, **14**:161-168.
14. He F, Sun YE: **Glial cells more than support cells? The Int J of Biochemistry and Cell Biol 2007, **39**:661-665.**
15. Chumbalkar VC, Subhashini C, Dhople VM, Sundaram CS, Jagannadham MV, Kumar KN, Srinivas PN, Mythili R, Rao MK, Kulkarni MJ, Hegde S, Hegde AS, Samual C, Santosh V, Singh L, Sirdeshmukh R: **Differential protein expression in human gliomas and molecular insights.** *Proteomics* 2005, **5**(4):1167-77.
16. Sallinen SL, Sallinen PK, Haapasalo HK, Helin HJ, Schraml P, Kallioniemi OP, Kononen J: **Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques.** *Cancer Res* 2000, **60**(23):6617-6622.
17. Dirks PB: **Glioma migration: clues from the biology of neural progenitor cells and embryonic CNS cell migration.** *Journal of Neuro-Oncology* 2001, **53**:203-121.
18. Guo W, Giaccotti FG: **Integrin signalling during tumour progression.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, **5**(10):816-26.
19. Paulus W, Tonn J: **Basement membrane invasion of glioma cells mediated by integrin receptors.** *J Neurosurg* 1994, **80**:515-519.
20. Giese A, Loo MA, Tran N, Haskett D, Coons SW, Berens ME: **Dichotomy of astrocytoma migration and proliferation.** *Int J Cancer* 1996, **67**:275-282.
21. Pederse PH, Marienhagen K, Mork S, Bjerkvig R: **Migratory pattern of fetal rat brain cells and human glioma cells in the adult rat brain.** *Cancer Res* 1993, **53**:5158-5165.
22. Nowell PC: **The clonal evolution of tumor cell populations.** *Science* 1996, **194**:23-28.

23. Boveri T: **The Origin of Malignant Tumors**. Baltimore: Williams and Wilkins, Co./Waverly Press; 1929.
24. Pawelek JM: **Cell Hybridization and metastasis revisited**. *Melanoma research* 2000, **10**:507-514.
25. 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, **66(16)**:8274-8279.
26. Duesberg P: **Chromosomal Chaos and Cancer**. *Scientific American* 2007, **296**:52-59.
27. Freshney RI: **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 3rd edition. Wiley-Liss; 1994:486.
28. Bradford M: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding**. *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
29. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature* 1970, **227**:680-685.
30. Fernandez E, Vicente A, Zapata A, Brera B, Lozano JJ, Martinez C, Toribio ML: **Establishment and characterization of cloned Human Thymic epithelial cell lines. Analysis of adhesion molecule expression and cytokine production**. *Blood* 1994, **83**:3245-3254.
31. Fujisawa H, Kurrer M, Reis RM, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H: **Acquisition of the glioblastoma phenotype during astrocytoma progression is associated with loss of heterozygosity on 10q25-qter**. *Am J Pathol* 1999, **155(2)**:387-94.
32. Beghini A, Magnani I, Roversi G, Piepoli T, Di Terlizzi S, Moroni RF, Pollo B, Fuhrman Conti AM, Cowell JK, Finocchiaro G, Larizza L: **The neural progenitor-restricted isoform of the MARK4 gene in 19q13.2 is upregulated in human gliomas and overexpressed in a subset of glioblastoma cell lines**. *Oncogene* 2003, **22(17)**:2581-2591.
33. Kruse CA, Varella-Garcia M, Kleinschmidt-Demasters BK, Owens GC, Spector EB, Fakhrai H, Savelieva E, Liang B: **Receptor expression, cytogenetic and molecular analysis of six continuous human glioma cell lines**. *In vitro cell Dev Biol* 1998, **34**:455-462.
34. Jung CS, Foerch C, Schänzer A, Heck A, Plate KH, Seifert V, Steinmetz H, Raabe A, Sitzer M: **Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme**. *Brain* 2007, **130**:3336-41.
35. Louis DN: **A molecular genetic model of astrocytoma histopathology**. *Brain Pathol* 1997, **7(2)**:755-64.
36. Candolfi M, Curtin JF, Nichols WS, Muhammad AG, King GD, Pluhar GE, McNiel EA, Ohlfest JR, Freese AB, Moore PF, Lerner J, Lowenstein PR, Castro MG: **Intracranial glioblastoma models in pre-clinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression**. *J Neurooncol* 2007, **85(2)**:133-48.
37. Mehler MF, Marmur R, Gross R, Mabie PC, Zang Z, Papavasiliou A, Kessler JA: **Cytokines regulate the cellular phenotype of developing neural lineage species**. *Int J Dev Neurosci* 1995, **13**:213-240.
38. Yoon M, Moir RD, Prahlad V, Goldman RD: **Motile Properties of Vimentin Intermediate Filament Networks in Living Cells**. *J Cell Biol* 1998, **143(1)**:5147-157.
39. Rutka JT, Smith SL: **Transfection of Human Astrocytoma Cells with Glial Fibrillary Acidic Protein Complementary DNA: Analysis of Expression, Proliferation, and tumorigenicity**. *Cancer Res* 1993, **53(15)**:3624-3631.
40. 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, **29;22(22)**:3407-11.
41. Bohn W, Wiggers W, Beuttenmüller M, Traub P: **Species-specific recognition patterns of monoclonal antibodies directed against vimentin**. *Exp Cell Res* 1992, **201**:1-7.
42. Ciesielski-Treska J, Goetschy JF, Aunis D: **Proteolytic degradation of vimentin and glial fibrillary acidic protein in rat astrocytes in primary culture**. *Eur J Biochem* 1984, **138(3)**:465-71.
43. Planchenaul T, Costab S, Fagesb C, Richeb D, Charrière-Bertranda C, Perzelovac A, Barlovatz-Meimona G, Tardy M: **Differential expression of laminin and fibronectin and of their related metalloproteinases in human glioma cell lines: relation to invasion**. *Neuroscience Letters* 2001, **299**:140-144.
44. Uhm JH, Gladson CL, Rao JS: **The role of integrin in the malignant phenotype of gliomas**. *Frontiers in Biosciences* 1999, **4(15)**:188-199.
45. Brinkerhoff CJ, Linderman JJ: **Integrin Dimerization and Ligand Organization: Key Components in Integrin Clustering for Cell Adhesion**. *Tissue Eng* 2005, **11(5-6)**:865-876.
46. Guo HB, Lee I, Kamar M, Akiyama SK, Pierce M: **Aberrant N-glycosylation of beta1 integrin causes reduced alpha5beta1 integrin clustering and stimulates cell migration**. *Cancer Res* 2002, **62(23)**:6837-6845.
47. Gao CF, Furge K, Koeman J, Dykema K, Su Y, Cutler ML, Werts A, Haak P, Woude GFV: **Chromosome instability, chromosome transcriptome, and clonal evolution of tumor cell populations**. *PNAS* 2007, **22(104)**:8995-9000.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:

<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/8/291/prepub>

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

