FÁBIO FEITOZA

ESTUDO *IN VITRO* DO EFEITO DA PROSTAGLANDINA E_2 NA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS U87MG E U251MG, EVIDENCIANDO A MATRIZ EXTRACELULAR E AS MOLÉCULAS DE ADESÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

FÁBIO FEITOZA

ESTUDO *IN VITRO* DO EFEITO DA PROSTAGLANDINA E_2 NA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS U87MG E U251MG, EVIDENCIANDO A MATRIZ EXTRACELULAR E AS MOLÉCULAS DE ADESÃO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual.

Orientador: Profa. Dra. Alison Colquhoun

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Feitoza, Fábio.
Estudo in vitro do efeito da prostaglandina E2 na migração das células U87MG e U251MG, evidenciando a matriz extracelular e as moléculas de adesão / Fábio Feitoza. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Alison Colquhoun.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Invasão e migração dos tumores cerebrais humanos.

Versão do título para o inglês: In vitro study of the effect of prostaglandin E2 on cell migration of U87MG and U251MG, highlighting the extracellular matrix and adhesion molecules.

1. Gliomas 2. Elicosanoides 3. Matriz extracelular 4. Moléculas de adesão 5. Prostaglandinas 6. Neoplasias I. Colquhoun, Prof. Dr. Alison II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0203/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fábio Feitoza.

Título da Dissertação: Estudo in vitro do efeito da prostaglandina E2 na migração das células U87MG e U251MG, evidenciando a matriz extracelular e as moléculas de adesão.

Orientador(a): Prof. Dr. Alison Colquhoun.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 474/11 referente ao projeto intitulado: "*Estudo in vitro do efeito da prostaglandinas E2 na migração das células T98G evidenciando a matriz extracelular e as moléculas de adesão*" sob a responsabilidade de **Fábio Feitoza,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 17 de agosto de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

“Sei que meu trabalho é uma gota no oceano, mas sem ele o oceano seria menor.”

Madre Teresa de Calcutá

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado, nos momentos bons ou ruins. Principalmente a minha mãe Maria Helena Feitoza, que sempre depositou todo seu amor a mim. Te amo sempre e para toda eternidade.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço primeiramente a Deus e seus mensageiros de luz, por mesmo desacreditado o meu PAI CELESTIAL cobria-me com sua misericórdia e amor. Aos meus familiares Mãe e Pai, pessoas humildes que conseguiu formar um filho numa universidade pública e mesmo no aperto, nunca me disse para desistir e sempre me incentivava. Pai te amo muito, obrigado pela educação que me ensinaste, você é o verdadeiro “mestre”. Aos meus irmãos Luiz Carlos, Maria Aparecida, Sergio e Carlos Alberto, obrigado pela ajuda tanto financeira e sempre me incentivando a continuar e continuar a crescer.... Obrigado.

A minha querida “Chefa”, Alison Colquhoun, te considero com uma verdadeira mãe. Aceitou ser minha orientadora e sei que construímos grandes laços de amizade e carinho. O seu “Feitozinho” te admira muito, tanto como profissional como pessoal. Obrigado pelas oportunidades, pelas lições, pelo aprendizado e principalmente por todos esses dias que convivemos no laboratório.

Muito Obrigado, Chefa!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda equipe do Laboratório Metabolismo da Célula Tumoral: Marloquinha, obrigado por me ensinar desde pipetar até os experimentos que você domina, obrigado pela sua ajuda, pelos ensinamentos, a amizade, broncas e conselhos... Obrigado mesmo sua linda... Essa dupla inesquecível Renata e Fernanda que com muita paciência me ensinou a maioria das técnicas do laboratório, além das risadas e os diversos momentos de lazer... Obrigado amigas vocês são maravilhosas... Obrigado Rezinha. Ao Felipe que considero um verdadeiro amigo e irmão... Você é muito iluminado amigo. A dupla Matt e Tatiana Freitas... Queridos agradeço a companhia, preocupação, a ajuda e ainda teremos muitos dias... Marina, Pollyana, Andrinho e Marcel, obrigado amigos pela companhia no cotidiano do laboratório, amizade e principalmente pela experiência na rotina da pesquisa.

Luciane Candeloro, que sempre me ajudou e acreditou no meu potencial. Você sabe que somos amigos eternos, dessa e de outras vidas. Agradeço a Lourdinha que me acolheu amorosamente na sua casa por dias.

Aos companheiros da casa 62: Christiane, Diogo e Polly... Diversos momentos de alegria, dureza, paz e muitas risadas, vocês são meus irmãos de Sampa.

Aos meus familiares Janaina, Sandra, Simone, Tia Pinha, Tia Nega, Luciane Nantes (por vários momentos de risos) e a Dona Eni que me ajudou nos momentos mais difíceis.

Aos meus verdadeiros amigos de São Paulo que aguardo no meu coração: Aline Olivé, Luciana Dizk, Andrews Krupinsk, Mineiro, Rodrigo Barbano, Emilia Ribeiro, Regina Valbom e Natalia Mazini.

Aos professores queridos que admiro muito: Marilia Sheelaender, Marinilce Santos, Estela Bevilacqua, Emer Ferro, Glaucia Santelli, Telma Zorn, Fabio Siviero, Vanessa Freitas... e o maior de todos os professores TIO BAUER.....as queridas Celi, Virginia e Ana Mota...

Aos demais professores do departamento: Patrícia Gama, Eugenia, Irene, Nataly, Marilene, Rui Jaeger, José Roberto, Edna Kimura, Dania, Fernanda, Zeca, Sergio e Telma.

A minha querida Maria Rosangela Sigrist todo meu carinho, amor e respeito....

Aos meus queridos amigos de Campo Grande: Marci Sanabria, Anderson Fernandes. Laura Verão, Suzy Wider, Karina Dias, Ricardo Vieira, Jayson Farias, Simone Bertozi, Iraceles, Edith, Maria Helena Tinoco, Suelly Faeque, Dalva Barbosa, Rosa Magoga, Bruno Sagatt, Isabele Sierra, Tayra Sato e tantos que posso ter esquecido.

A minha querida e eterna irmã que me ajudou no inicio aqui em Sampa, Ana Eduarda Zulim, a ordi.... Obrigado por me ajudar naqueles momentos foram decisivos.

E aos diversos amigos que fiz por todo departamento e ICB: Renata Santos (obrigado amiga), Lívia Caires, Deborah e Douglas, Cilene (Obrigado pelas dicas), Karina, Cesinha, Kelly Saito, Elizabeth Rodrigues (e a Mel), Eloisa, Tati Donato, Lilian Russo, Andrea e Magma, Rodrigão, Emidio, Joana Ccrola, Raquel Galvão, Joana Mona....

Aos amigos de São Paulo: Alessandro de Castro, Rodrigo Barros, Jairo Leonel, Rosa Antunes e tantos outros....

Valeu a pena!!

Obrigado

RESUMO

Feitoza F. Estudo *in vitro* do efeito da prostaglandina e_2 na migração das células U87MG e U251MG, evidenciando a matriz extracelular e as moléculas de adesão. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

O glioblastoma (GBM) é uma neoplasia do sistema nervoso central (SNC), caracterizada por uma elevada capacidade proliferativa e migratória. O desenvolvimento do tumor provoca uma remodelação da matriz extracelular (MEC) que facilita a migração tumoral. Eicosanoides são moléculas lipídicas importantes na carcinogênese e a sua síntese está correlacionada com o grau de desenvolvimento do tumor. As prostaglandinas são eicosanoides envolvidas na estimulação da angiogênese, na adesão celular e proliferação celular. Este estudo tem por objetivo avaliar *in vitro* o efeito da PGE_2 na expressão moléculas da MEC e das moléculas de adesão envolvidas na migração, em células U87MG e U251MG. As células U251MG e U87MG foram tratadas com PGE_2 (10µM) e Ibuprofeno (25µM), por um período 48hs. As proteínas da MEC foram analisadas por RT-qPCR após o tratamento. Foram realizadas reações de imunohistoquímica para as moléculas da MEC. As alterações foram encontradas na expressão de laminina, fibronectina, colágeno tipo IV e as integrinas α_v, α_3 e α_5 para células U87MG . Observamos imunomarcação nas linhas celulares para colágeno tipo IV, laminina e fibronectina. Concluímos que o tratamento com Ibuprofeno e PGE_2, afeta a expressão gênica de moléculas de MEC.

Palavras-chave: Glioma. Eicosanoides. Matriz Extracelular. Migração. Moléculas de Adesão.

ABSTRACT

Feitoza F. *In vitro* study of the effect of prostaglandin E_2 on cell migration of U87MG and U251MG, highlighting the extracellular matrix and adhesion molecules. [Masters thesis (Tissue and Celular Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Glioblastoma (GBM) is a neoplasm of the central nervous system (CNS), characterized by a high proliferative and migratory capacity. Tumor development leads to extracellular matrix (ECM) remodeling and which facilitates the migration of these cells. Eicosanoids are important lipid molecules in carcinogenesis, and their synthesis often correlates with the degree of tumor development. Prostaglandins are eicosanoids involved in the stimulation of angiogenesis, cell adhesion and cell proliferation. This study is aimed to evaluate the expression of several ECM molecules involved in migration after altering the concentration of prostaglandins, using human glioma cell lines as an in vitro model. The cell lines U87MG and U251MG were treated with PGE_2 (10µM) and Ibuprofen (25µM), for a predetermined period of 48hs. Proteins involved in extracellular matrix were analyzed by RT-qPCR after treatment *in vitro*. Immunohistochemical reactions were also performed for the ECM molecules. Changes were found in the expression of laminin, fibronectin, type IV collagen and α_v, α_3 and α_5 integrins in cells U87MG. We observed immunolabelling in cell lines for type IV collagen, laminin and fibronectin. In conclusion, Ibuprofen and PGE_2, affects gene expression of ECM molecules.

Keywords: Glioblastoma Multiforme. Eicosanoids. Extracellular matrix. Cell migration. Adhesion molecules.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido araquidônico

AINEs – Antiinflamatórios não esteroidais

AMPc – Monofosfato de adenosina cíclico

AKT – Proteína quinase B

AS – Antisense (*primer*)

ºC – Graus Celsius

cDNA – DNA complementar

cm - centímetros

COLIV - Colágeno tipo IV

CO_2- Gás carbônico

COX-1 – Ciclooxigenase – 1

COX-2 – Ciclooxigenase – 2

DMEM - *Dulbecco's modified Eagle´s medium*

DEPC – Dietilpirocarbonato

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF – Fator de crescimento epidermal

FN – Fibronectina

GAGs – Glicosaminaglicanas

GAPDH - Gliceraldeído 3´ fosfato desidrogenase

GBM – Glioblastoma multiforme

HETEs – Ácidos hidroxieicosatetraenóicos

IBP - Ibuprofeno

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IP3 – Trifosfato de inositol

KDa – Kilodalton

LN – Laminina

LOX – Lipooxigenase

LPS – Lipopolissacarídeo

M – Molar

mL – Mililitros

mM – Milimolar

MMPs – Metaloproteinases de matriz

µM – Micromolar

NF-KB – Fator nuclear kappa B

OMS – Organização mundial da saúde

P.A. – Para análise

pb – Pares de bases

PBS – Tampão fosfato salino

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PKC – Proteína quinase C

PGs – Prostaglandinas

PGE_2 – Prostaglandina E_2

PGG_2 – Prostaglandina G_2

PUFAs – Ácidos graxos poliinsaturados

RNA – Ácido ribonucleico

RNAm – RNA mensageiro

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RPM – Rotações por minuto

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase pela transcriptase reversa

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SFB – Soro fetal bovino

SNC – Sistema Nervoso Central

TBS – Tampão tris salino

TXA_2 – Tromboxano A_2

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

VN – Vitronectina

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema de evolução da malignidade dos gliomas.....23
Figura 2 – Esquema estrutural da interação célula com MEC.....25
Figura 3 – Esquema das estrutura das integrinas e as interações com as moléculas da MEC e o citoesqueleto.....29
Figura 4 – Teste de Temperatura 38
Figura 5 – Curva padrão de diferentes concentrações de cDNA.....40
Figura 6 – Curva de crescimento da linhagem U87MG.....44
Figura 7 – Curva de crescimento da linhagem U251MG.....44
Figura 8 – Curva de Dose-Resposta do tratamento com PGE_2 após 24, 48 e 72 horas, em células de glioma U87MG.....46
Figura 9 - Curva de Dose-Resposta do tratamento com PGE_2 após 24, 48 e 72 horas, em células de glioma U251MG.....47
Figura 10 - Curva de Dose-Resposta do tratamento com Ibuprofeno após 24, 48 e 72 horas, em células de gliomas U87MG.....49
Figura 11 - Curva de Dose-Resposta do tratamento com Ibuprofeno após 24, 48 e 72 horas, em células de gliomas U251MG.....50
Figura 12 - Analise da expressão gênica após o tratamento com PGE_2 em linhagem celular de U251MG.....52
Figura 13 - Analise da expressão gênica após o tratamento com Ibuprofeno em linhagem celular de U251MG.....53
Figura 14 - Analise da expressão gênica após o tratamento com PGE_2 em linhagem celular de U87MG.....55
Figura 15 - Analise da expressão gênica após o tratamento com Ibuprofeno em linhagem celular de U87MG.....56
Figura 16 - PCR – Real Time. U87MG tratadas com PGE_2 exógeno. Moléculas da Matriz Extracelular.....58

Figura 17 -. PCR – Real Time. U87MG tratadas com PGE_2 exógeno. Moléculas de Adesão (Integrinas).....59

Figura 18 - PCR – Real Time. U87MG tratadas com Ibuprofeno. Moléculas da Matriz Extracelular.....60

Figura 19 - PCR – Real Time. U87MG tratadas com Ibuprofeno. Moléculas de Adesão (Integrinas).....61

Figura 20 - PCR – Real Time. U251MG tratadas com PGE_2 exógeno. Moléculas da Matriz Extracelular.....63

Figura 21 -. PCR – Real Time. U251MG tratadas com PGE_2 exógeno. Moléculas de Adesão (Integrinas).....64

Figura 22 - PCR – Real TimeU251MG tratadas com Ibuprofeno. Moléculas da Matriz extracelular 65

Figura 23 - PCR – Real Time. U251MG tratadas com Ibuprofeno. Moléculas de Adesão (Integrinas).....66

Figura 24 - Imunohistoquímica para Colágeno tipo IV e Laminina nas U251MG e U87MG, revelado com DAB.....69

Figura 25 - Imunohistoquimica para Fibronectina e Vitronectina para U251MG e U87MG, reveladas por DAB.....70

Figura 26 - Imunohistoquimica para COX-1, COX-2 e cPGS em U251MG e U87MG, revelados por DAB.....71

Figura 27 - Imunohistoquimica para mPGS-1 e mPGS-2 em U251MG e U87MG, revelado por DAB.....72

Figura 28 - Imunohistoquimica controle (camundongo e coelho) para U251MG e U87MG, revelado por DAB.....73

Figura 29 - Imunofluorescência para Colágeno Tipo IV e Fibronectina para U87MG e U251MG 74

Figura 30 - Imunofluorescência para Laminina e controles negativos para U87MG e U251MG 75

Figura 31 - Análise da expressão proteica em moléculas da MEC, nas linhagens U87MG e U251MG.....77

Figura 32 - Análise da expressão proteica das moléculas de adesão, nas linhagens U87MG e U251MG.....78

Figura 33 - Efeito da PGE_2 na migração em transwell em celulas U87MG.....80

Figura 34 - Número de células que migraram sob o efeito da PGE_2 exógeno (U87MG) 80

Figura 35 - Efeito da PGE_2 na migração em transwell em celulas U251MG.....81

Figura 36 - Número de células que migraram sob o efeito da PGE_2 exógeno (U251MG).....81

Figura 37 - Efeito da Ibuprofeno na migração em transwell em celulas U87MG.....83

Figura 38 - Número de células que migraram sob o efeito do Ibuprofeno (U87MG).....83

Figura 39 - Efeito da Ibuprofeno na migração em transwell em celulas U251MG....84

Figura 40 - Número de células que migraram sob o efeito do Ibuprofeno (U251MG) 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos *primers* utilizados para análise da expressão gênica.....29

Tabela 2 – Sequência dos *primers* utilizados para análise da expressão gênica.....36

Tabela 3 – Padronização das concentrações dos *primers* para PCR em tempo real.....40

Tabela 4 – Resultados siginificativos da expressão gênica por PCR em tempo real U87MG.....67

Tabela 5 – Resultados siginificativos da expressão gênica por PCR em tempo real U251MG.....67

Tabela 6 – Descrição dos anticorpos utilizados em Western Blot e suas concentrações.....76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....21
1.1 Gliomas.....21
1.2 Matriz extracelular (MEC) e as moléculas envolvidas na adesão.....23
1*.2.1 Colágeno tipo IV*.....25
1.2.2 Laminina.....26
1.2.3 Fibronectina.....27
1.2.4 Vitronectina......28
1.2.5 Moléculas de adesão: integrinas.....28
1.3 Eicosanoides.....30
1.4 Justificativa.....31
2 OBJETIVOS.....33
MATERIAIS E MÉTODOS.....34
3.1 **Linhagens celulares escolhidas: U87MG e U251MG**.....34
3.2 Cultivo de células.....34
3.3 Curva de crescimento.....34
3.4 Curvas de dose resposta para os tratamentos com PGE_2 e Ibuprofeno........35
3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR).....36
3.5.1 Desenho dos primers.....36
3.5.2 Extração do RNA total.....´.....36
3.5.3 Preparação do DNA complementar.....37
3.5.4 PCR Convencional.....,,37
3.5.5 Padronização dos primers para RT-PCR (PCR Convencional).....38
3.6 Análise da expressão gênica através de RT-qPCR em tempo real.....39
3.7 Ensaio de Migração em *Transwell*......40
3.8 *Western blot*.....41
3.9 Imunohistoquímica.....42
3.9.1 Cultivo das células para Reação de Imunohistoquímica in vitro.....,.....42
3.9.2 Reação de Imunohistoquímica.....42
3.10 Análise dos Dados.....43
4 RESULTADOS.....44
4.1 Curva de Crescimento.....44

4.2 Curva de dose-resposta para PGE_2 45
4.3 Curva de dose-resposta de Ibuprofeno (Inibidor não específico para ciclooxigenases COX-1 e COX-2).....48
4.4 RT-PCR Convencional.....51
4.4.1 RT-PCR: U251MG.....51
4.4.2 RT-PCR: U87MG.....54
4.5 PCR em tempo Real (RT- qPCR).....57
4.5.1 PCR em tempo real: U87MG.....57
4.5.2 PCR em tempo real: U251MG.....61
4.6 Reação de Imunoshistoquímica.....69
4.7 *Western blot*......76
4.8 Migração em *Transwell*.....79
4.8.1 Migração em transwell tratadas com PGE_2 (U87MG e U251MG).....79
4.8.2 Migração em transwell tratadas com Ibuprofeno (U87MG e U251MG).....82
5 DISCUSSÃO.....85
6 CONCLUSÃO.....92
REFERÊNCIAS.....94

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gliomas

Os tecidos biológicos se organizam em células, que apresentam funções específicas de acordo com a necessidade do seu microambiente. O controle adequado na organização, função, sobrevivência e multiplicação dessas células provem da ação de uma maquinaria celular composta por proteínas, receptores e mediadores químicos.

No Sistema Nervoso Central (SNC), todo esse equilíbrio ou homeostase é de responsabilidade de dois grupos celulares: os neurônios e as células da glia ou neuroglia. As células da glia são de grande importância para o tecido cerebral, compondo ~65% do tecido nervoso em humanos. A glia é responsável por diversas funções importantes na manutenção da homeostase neuronal.

O desequilíbrio da homeostasia celular pode ser influenciado por fatores externos, ou por alguma mutação gênica, ocasionando um descontrole na divisão celular e alterando todo o funcionamento da célula normal. Essa anormalidade é caracterizada por um “crescimento novo”, ou seja, um surgimento de tecido repleto de células que crescem desordenadamente. A interrupção da divisão celular e o continuo crescimento descontrolado são características peculiares de células tumorais.

O termo glioma é utilizado para designar os tumores intracranianos originados das células da glia. As células gliais fornecem um microambiente adequado para a sobrevivência dos neurônios, como por exemplo, na formação da bainha de mielina, na nutrição neuronal e participando das transmissões sinápticas. Dentre os tipos de glia do Sistema Nervoso Central encontramos os astrócitos, oligodendrócitos, microglia e células ependimárias (Hatton, 2004).

Os gliomas são classificados conforme sua origem, em astrocitomas (astrocítica), oligodendrogliomas (oligodendrocítica) e oligoastrocitomas (misto = astrócitos/oligodendrócitos). Esses tumores de origem glial apresentam características típicas, que incluem a capacidade de proliferação e migração, semelhantes às células embrionárias.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os astrocitomas estão classificados quanto ao grau de malignidade, variando de I até IV (Louis et al.,

2001). Considerando os quatro graus de malignidade os astrocitomas podem se divididos nos seguintes grupos: astrocitoma pilocíticos, considerada a forma mais branda do tumor (grau I), astrocitoma de baixo grau (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III) e glioblastoma multiforme ou glioblastoma (grau IV) caracterizado como o mais agressivo e infiltrativo (Louis et al., 2001; Louis et al., 2007).

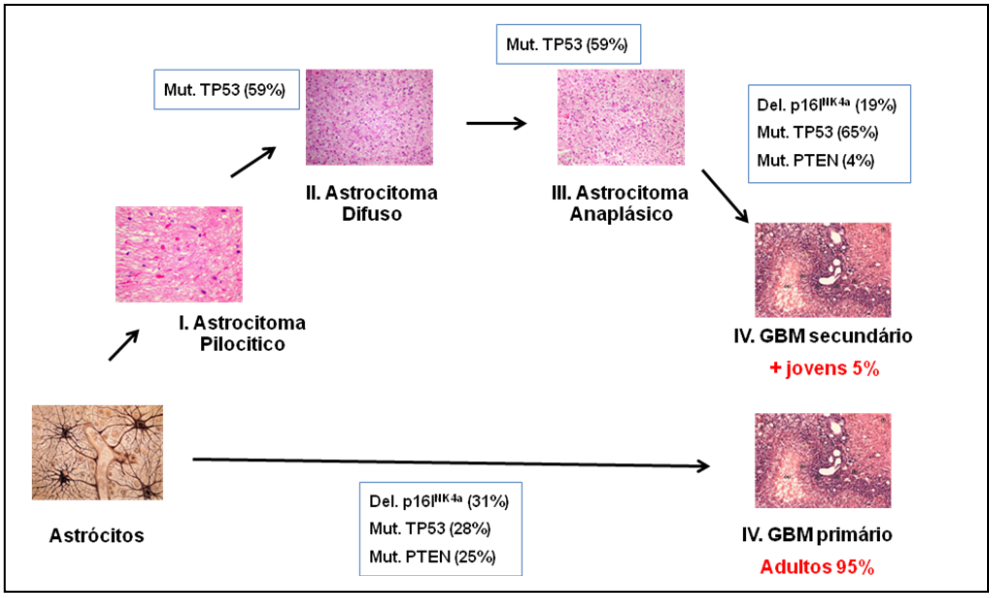
Existem duas formas de glioblastoma (GBM): primário e secundário. O primário é mais agressivo e origina-se diretamente das células astrocíticas. O GBM secundário é originado de astrocitomas de graus inferiores e pré-existentes (Figura 1), desenvolvendo uma evolução clinica mais prolongada (Miller, Perry, 2007; Ohgaki, Kleihues, 2007).

O GBM é caracterizado pela alta capacidade proliferativa e mitótica, apresentando células poucas diferenciadas do tipo fusiforme ou pleomórfica. Além disso, observa-se uma hipercelularidade, com grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso. A histopatologia do GBM é bastante variada e heterogênea, apresentando células gigantes multinucleadas, regiões vascularizadas, hemorragias e áreas de necrose (Daí et al., 2001).

Entre os principais sintomas dos GBMs estão cefaléia e papiledema, causado pelo aumento da pressão intracraniana. Contudo são diagnosticados outros sintomas nos pacientes como: náuseas, epilepsias e distúrbio de personalidade (Brandes et al., 2008).

Os tratamentos indicados para o GBM incluem: cirurgia, quimioterapia e radioterapia. A cirurgia é a modalidade terapêutica mais indicada, objetivando a remoção completa do tumor. No entanto, a total recessão cirúrgica nem sempre é possível, já que o tumor pode estar localizado em uma área vital ou de funções neurológicas fundamentais, portanto nesse caso é realizado apenas a cito-redução do tumor ou biópsia da lesão (Rich, Bigner, 2004). A quimioterapia e a radioterapia convencional também sofrem resistência das células tumorais * As células tumorais podem exibir uma existência aos tratamentos quimioterápicos e radioterápicos convencionais, essas terapias são inerentes às propriedades intrínsecas das células deste tumor, que são altamente infiltrativas, o que evita a sua recessão total, (Alpuente et al., 2011; Brandes et al., 2008; Kirkpatrick et al., 2013).

Figura 1. Esquema de evolução de malignidade dos gliomas. Fotos: Ramos, 2007; UNICAMP.



A metástase extracraniana apresenta-se rara, sendo relata em apenas 0,4-0,5%· dos casos de GBMs. A baixa taxa de metástase está correlacionada com o pouco tempo de sobrevida dos pacientes, e, na maioria dos casos, é consequência do processo cirúrgico (Blume et al., 2013; Lun et al., 2011).

Estudos epidemiológicos envolvendo o glioma têm relacionado a exposição radioativa com o desenvolvimento tumoral no SNC. Cerca de 30% a 40% de todos os tumores intracranianos apresentam origem glial, e a sua incidência ocorre principalmente em adultos de 40 à 65 anos (Schneider et al., 2010).

Apesar de todos os avanços cirúrgicos, radio e quimioterápicos, e do desenvolvimento de novos fármacos, ainda não existe uma terapia efetiva para o tratamento desses gliomas.

1.2 Matriz extracelular (MEC) do Sistema Nervoso Central e dos gliomas

A matriz extracelular é uma rede complexa de macromoléculas, que envolve as células nos mais diversos tecidos, proporcionando condições adequadas para o crescimento e o desenvolvimento celular. A MEC é constituída por diversas proteínas (colágenos e elastinas), e glicoproteínas (lamininas e fibronectina). Este arcabouço de macromoléculas (Figura 2) está imerso em um gel de

glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos, controlando a morfologia, a diferenciação celular e o equilíbrio homeostático dos tecidos (Alberts et al., 2002; Marastoni et al., 2008; Tanzer, 2006).

A MEC deixou de ser estudada apenas como um substrato celular mecânico, e passou a ser analisada como uma fonte de informações, repleta de fatores de crescimento responsáveis pela regulação de diversos processos celulares, como a progressão, migração e desenvolvimento celular (Ramirez, Rifikin, 2003).

O SNC difere dos demais tecidos por apresentar pouca MEC, seu espaço extracelular é caracterizado por uma substancia amorfa e escassez de proteínas fibrilares (Bonneh-Bark, Wiley, 2009). A presença de colágenos no SNC está restrita a regiões próximas a barreira hematoencefálica e a pia-máter, das meninges. As outras proteínas fibrilares e glicoproteínas adesivas encontram-se presentes em regiões como as membranas basais vasculares, glia limitante externa e nas redes perineuronais (Gritsenko et al*.,* 2012; Rutka et al*.,* 1988).

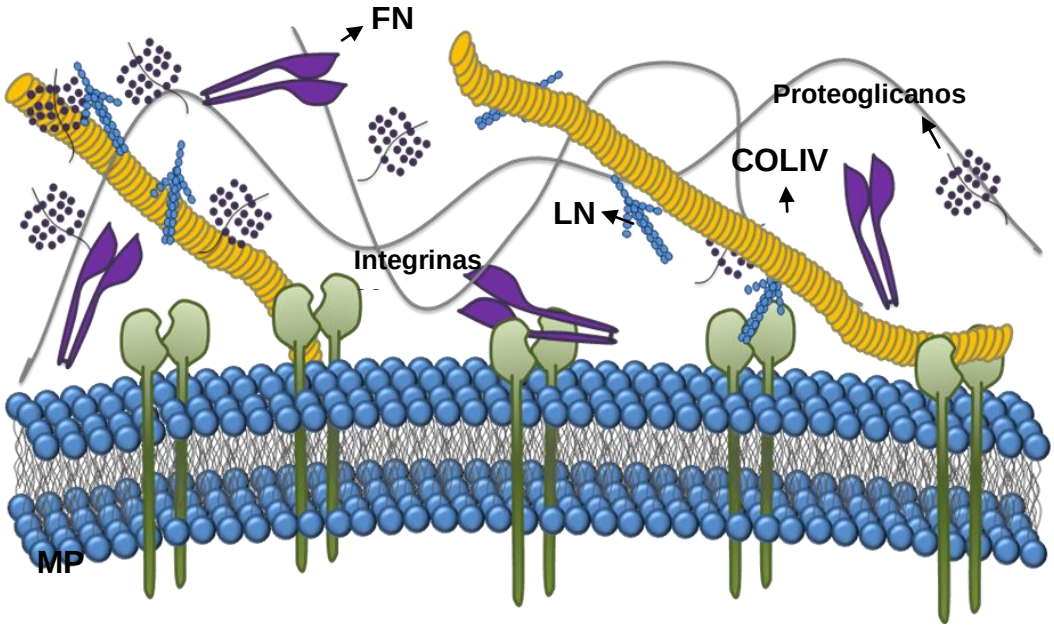
A MEC influencia em muitos aspectos o desenvolvimento do tecido nervoso central, principalmente na diferenciação de algumas células e no direcionamento axonal. Após um trauma ou qualquer outra injuria, a composição da matriz extracelular do SNC aumenta significativamente (Goldbrunner et al*.,* 1999).

Durante o desenvolvimento tumoral, as células neoplásicas direcionam uma remodelação da matriz, alterando o microambiente e proporcionando adequações favoráveis para sobrevivência e proliferação do câncer (Aguiar et al., 2005).

Os gliomas sintetizam sua própria matriz extracelular quando necessário, contudo oportunamente fazem uso da matriz circundante no local, ou então estimulam células gliais vizinhas a produzir uma MEC adequada para seu desenvolvimento (Goldbrunner et al*.,* 1999). A interação MEC – glioma apresenta um papel importante na regulação da progressão e migração tumoral.

Pesquisas recentes envolvendo os gliomas em ratos relatam imunolocalização das moléculas da MEC, como os colágenos (tipos I, III e IV), glicoproteínas (laminina, vitronectina, fibronectina) e alguns proteoglicanos, na região do parênquima cerebral. Contudo, essa imunomarcação é acentuada na borda infiltrativa do tumor, sugerindo que esses elementos da matriz extracelular apresentam um papel importante na migração das células tumorais (Ramos, 2007).

Figura 2. Esquema estrutural da interação célula-matriz extracelular. FN (fibronectina). LN (Laminina). COLIV (Colágeno tipo IV). MP (Membrana Plasmática).



1.2.1 Colágeno tipo IV

Os colágenos apresentam uma família heterogênea composta por diversos tipos como os fibrilares, de ancoragem ou associados a fibrilas. São encontrados preponderadamente fora das células e constituídos por uma série de repetições de aminoácidos Glicina-X-Y, no qual frequentemente X é uma prolina e Y uma hidroxiprolina.

A biossíntese da molécula de colágeno se inicia com a formação de cadeias repetidas de Gly-X-Y não hidroxiladas, no reticulo endoplasmático rugoso (RER). A ligação destas cadeias por pontes de hidrogênio, e forças de Van der Walls, formam o pró-colágeno. Posteriormente ocorre a hidroxilação da prolina do pró-colágeno, por enzimas hidroxilases, e a molécula é encaminhada para exocitose. Durante o transporte, a molécula de pró-colágeno é processada pela enzima pró-colágeno peptidase, originando uma molécula inativa de colágeno, denominada o tropocolágeno. A remoção das duas grandes terminações propeptídicas, amino (NH_2) e carboxi (COOH), por enzimas hidrolíticas, acarreta em um processo de fibrilogênese, formando as fibrilas de colágeno.

No SNC, os colágenos estão presentes basicamente na membrana basal dos vasos sanguíneos, sendo que o principal colágeno encontrado é do tipo de

ancoragem, como colágeno tipo IV. O COLIV é encontrado em regiões da glia limitante externa que envolve o encéfalo, região que representa o limite externo da superfície cerebral (Bellail et al., 2004; Novak, Kaye, 2000).

O colágeno tipo IV (COLIV) pode estar relacionado com progressão e a invasão tumoral (Paulus et al., 1994). Esta proteína forma uma tripla hélice de aproximadamente 400nm de comprimento, formada por duas cadeias α1 e uma α2 (Trueb et al*.,* 1982).

O colágeno tipo IV participa de diversos processos celulares, dentre os quais destaca-se o controle do ciclo celular, influenciando na proliferação e morte celular. Contudo, fragmentos de COLIV ativa algumas colagenases que degradam a MEC, favorecendo a migração e a invasão celular em alguns processos patológicos e tumorais (Eyden, Tzaphlidou, 2001).

Estudos relatam que substratos composto por COLIV apresentam um aumento do número de células U87MG, de glioma humano, aderidas sem alterar a morfologia tumoral (Giese et al*.,* 1998). Em tumores gliais de ratos, a molécula de colágeno tipo IV está localizada em regiões de alta capacidade migratória e invasiva, como a borda infiltrativa do tumor (Ramos, 2007). Em humanos, trabalhos recentes demonstram a presença de colágeno tipo IV, por imunomarcação nas membranas basais e principalmente em torno de locais infiltrativos e migratórios do glioma humano (Payne, Huang, 2013).

1.2.2 Laminina

A laminina (LN) é a glicoproteína adesiva e filamentosa mais abundante na membrana basal e exerce funções estruturais. Adicionalmente, esta proteína participa de processos biológicos como regulação de fatores do ciclo celular (Martin, Timpl, 1987; Sasaki et al*.,* 2004).

A laminina é formada por uma cadeia heterotrimérica, composta por cadeias α, β e γ. Essas cadeias se organizam formando um aspecto cruciforme e conectando a membrana basal com os hemidesmossomos das células (Villanova et al., 1997). No cérebro, a laminina apresenta uma imunomarcação na região da membrana basal vascular, sendo expressa por células da glia e neurônios (Hagg et al*.,* 1997).

Atualmente a LN apresenta uma superfamília composta por 16 isoformas, mas provalvemente existem outras que ainda não foram isoladas. As isoformas da laminina são sintetizadas por diversas células do nosso organismo: como

fibroblastos, células musculares, endoteliais e as células da glia (Bosman, Stamenkovic, 2003; Miner, Yurchenco, 2004).

A laminina, assim como outras moléculas da MEC, é capaz de regular diversos processos celulares, destacando-se a proliferação, adesão celular, espraiamento, desenvolvimento de neuritos e migração, além de metástase tumoral e secreção de proteases (Bosman, Stamenkovic, 2003; Ponce et al., 2003).

Os gliomas sintetizam sua própria laminina e, além disso, os tumores também podem modular a expressão de LN de forma autócrina, produzindo um ambiente extracelular propício para o seu desenvolvimento (Günther et al., 2003). Tysnes e colaboradores (1999) observaram uma elevada expressão de laminina nas regiões peritumorais em gliomas humanos e em ratos, realizando transplantes heterotópicos observaram que a laminina estava sendo produzida pelos astrócitos reativos do tecido hospedeiro.

Alguns pesquisadores testaram a laminina γ_1 como substrato para migração e adesão celular de linhagens de gliomas como U87MG, U183MG, A172, T98G e U373MG, e verificaram que na linhagem U87MG houve um aumento na migração celular por *transwell* (Ishibashi et al., 2005).

1.2.3 Fibronectina

Outra glicoproteína importante e muito abundante na membrana basal é a fibronectina (FN). A FN é composta por duas subunidades ligadas por pontes de dissulfeto, cada uma com aproximadamente 220 kDa. Esta proteína apresenta domínios específicos para outras proteínas da MEC, como as para GAG´s e para receptores de superfície celular (integrinas).

No cérebro, esta proteína é expressa na região da glia limitante externa e na membrana basal (Pankov, Yamanda, 2002). Contudo, estudos demonstram uma aumentada expressão desta glicoproteína em tumores cerebrais (Ohnishi et al., 1997).

A FN tem um papel muito importante na progressão tumoral. Em carcinomas de pulmão, estudos revelam que a fibronectina estimula a síntese de moléculas como ciclooxigenase 2 (COX- 2) e que está intimamente relacionada com a malignidade tumoral (Han et al., 2004). Em gliomas, diversos estudos relacionam o uso do substrato de FN com aumento da migração celular, principalmente em estudos *in vitro* (Sabari et al., 2011).

Estudo *in vitro* com linhagem C6, gliomas de ratos, propõe uma forte imunomarcação de fibronectina, apresentando de uma forma filamentosa e uniforme, principalmente em células proliferativas (Ramos, 2007).

1.2.4 Vitronectina

Outra macromolécula importante da MEC é a vitronectina (VN), um substrato adesivo para diversos de tipos celulares, através das integrinas (Wechsler-Reya, 2001). No SNC, esta molécula é expressa durante o desenvolvimento neural e participa na diferenciação dos neurônios motores da medula espinhal.

Estudos com gliomas sugerem que a vitronectina pode facilitar o comportamento invasivo do tumor, fornecendo um excelente substrato. (Gladson, Cheresh, 1991). Outros pesquisadores demonstraram uma expressiva imunomarcação para vitronectina em gliomas malignos, auxiliando na adesão tumoral e favorecendo a proliferação do GBM (Gladson, Cheresh, 1991).

1.2.5 Moléculas de Adesão: as integrinas

As integrinas formam uma família de receptores transmembrânicos e heterodiméricos composto por duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalentes α e β, dependentes de cátions divalentes como o Ca^{++} e Mg^{++}. (Azuma et al., 1998). As subunidades alfa (α) variam o peso molecular entre 120 a 200 kDa e as cadeias betas (β) de 90 a 100 kDa.

Os domínios extracelulares das duas cadeias interagem com diversos ligantes, incluindo glicoproteínas de matriz extracelular e proteínas de superfície de outras células. Os domínios intracelulares das integrinas interagem com diversas proteínas do citoesqueleto (Figura 3), participando da reorganização e coordenação de mudanças morfológicas e fenotípicas das células (Horwitz et al., 1996; Mohri, 1996).

As macromoléculas da MEC, aqui apresentadas, fornecem um substrato adequado para as células tumorais executarem processos obrigatórios para a migração celular. As integrinas são importantes receptores de superfície responsáveis pela interação do glioma com a MEC, ligando o citoesqueleto das células tumorais com a matriz extracelular circundante (Guo, Giancotti, 2004).

Figura 3. Esquema das estruturas das integrinas e a interação com as moléculas da MEC e o citoesqueleto. FN (fibronectina), FAK (proteína quinase de adesão focal). Fonte: D'Abaco, Kaye, 2007

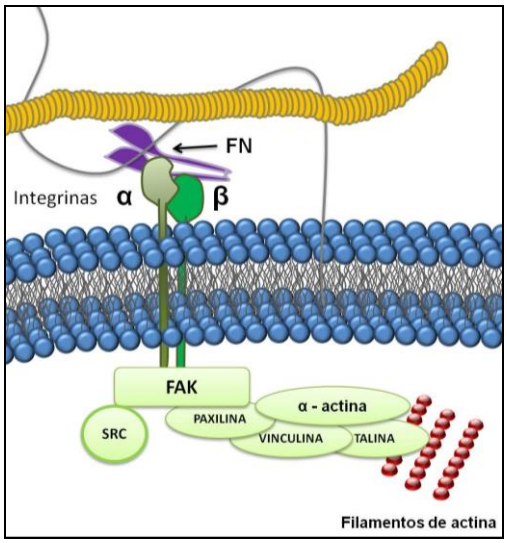


Tabela 1. Principais ligantes das integrinas. (Jones, Walker, 1999)

Receptores (Integrinas)	Ligantes (Moléculas da MEC)
$\alpha_1\ \beta_1$	Laminina e Colágenos
$\alpha_2\ \beta_1$	Laminina e Colágenos
$\alpha_3\ \beta_1$	Laminina, Colágenos e Fibronectina
$\alpha_4\ \beta_1$	Fibronectina
$\alpha_5\ \beta_1$	Fibronectina
$\alpha_6\ \beta_1$	Laminina
$\alpha_V\ \beta_3$	Fibronectina e Vitronectina
$\alpha_V\ \beta_3$	Vitronectina
$\alpha_6\ \beta_4$	Laminina

As integrinas está representada por um grande grupo que ligam diversas as células com as moléculas de matriz.

Estudos com glioma de ratos evidenciam que a subunidade β_1 e α_v das integrinas foram fortemente expressas nas bordas infiltrativas do tumor, na região do parênquima cerebral (Ramos, 2007). Alguns estudos evidenciaram o papel da integrina β_1 em todos os aspectos de invasão (motilidade, adesão e migração) (Rooprai et al., 1999).

1.3. Eicosanoides

Os eicosanoides são moléculas lipídicas compostas por 20 carbonos, oriundas da metabolização dos ácidos graxos, como ácido araquidônico, ácido dihomo – gama – linolênico e outros ácidos graxos poliinsaturado (PUFAs). Estas moléculas desempenham funções que auxiliam proliferação, motilidade e sobrevivência celular. Adicionalmente, os eicosanoides exercem um complexo controle da angiogênese, adesão celular e inflamação, e podem estar relacionados com mutação celular e promoção do câncer (Nathoo et al., 2004).

Existem três famílias dos eicosanoides derivadas do ácido araquidônico (AA): as prostaglandinas, os tromboxanos (pela ação das ciclooxigenases) e os leucotrienos (pela a ação das lipooxigenases) (Brambilla, 2006). A via das ciclooxigenases (COX) apresenta duas isoformas principais: a COX-1 e a COX-2, codificadas por diferentes genes. Contudo, ambas apresentam sítios ativos semelhantes, e são inibidas por antiinflamatórios não esteroidais – AINEs (Garavito, Mulichak, 2003; Smith et al., 2000).

A primeira isoforma, a COX-1, é responsável pela produção de prostaglandinas envolvidas em diversas funções fisiológicas, como na citoproteção de mucosas gástricas, equilíbrio renal e nas reações plaquetárias. A COX-2, por sua vez, é uma importante proteína, expressa em alguns órgãos e no SNC. Esta expressão se restringe a algumas partes do SNC, como no córtex, hipotálamo, hipocampo e medula espinhal (Vane, Bakhle, Botting, 1998).

Durante a carcinogênese, a COX-2 é expressa em diversas neoplasias. O grau de diferenciação do tumor está relacionado com o aumento da expressão da COX-2. Alguns tumores, como mama e cólon, apresentaram um aumento da síntese de produtos derivados da COX, como as prostaglandinas (Sheehan et al., 1999).

A prostaglandina E_2 (PGE_2) é um eicosanoide derivado do ácido araquidônico (AA), metabolizado pelas COXs. A síntese desse prostanoide inicia-se com a

hidrólise dos fosfolipídios de membrana plasmática, produzindo o AA, uma reação catalisada pela enzima fosfolipase A2. Em seguida, o AA livre é oxidado pelas ciclooxigenases (COX-1 ou COX-2), produzindo uma substância instável intermediária: a prostaglandina G_2 (PGG_2), convertida rapidamente em prostaglandina H_2 (PGH_2). A PGH_2 servirá de substrato para as enzimas PG sintases produzirem as prostaglandinas (PGD_2, PGE_2, $PGF_{2\alpha}$) e prostaciclina (PGI_2), que serão liberadas pelas células (Hinz, Brune, 2002; Khan et al**.,** 2011; Wang et al., 2007).

Trabalhos mostram que a PGE_2 participa da progressão de diversas neoplasias, como o câncer de pele, cólon, mama e entre outros (Kundu, Shur,. 2008). São encontrados altos níveis da PGE_2 em tumores humanos, promovendo a proliferação, a angiogênese e a inibição do apoptose tumoral. Desta forma, a PGE_2 estimula o crescimento tumoral, contribuindo para o processo de metástase do tumor (Camacho et al., 2008; Jain et al., 2008).

Estudos com inibidores seletivos para COX-2 em câncer do cólon e de pâncreas demonstraram uma diminuição na adesão das células tumorais nas moléculas da MEC, como os colágenos tipos I, III e IV, laminina, fibronectina e vitronectina. O efeito inibidor da COX-2 pode ser potente para a aplicação terapêutica aos tumores, afeta divervos aspectos biológicos, tais como a invasão e metástase (Okami et al., 2003; Yazawa et al., 2005).

Alem disso, trabalhos com adenocarcinomas de pulmão correlacionam a expressão de PGE_2 com laminina, facilitando a angiogênese e a migração tumoral (Niki et al., 2002). Adicionalmente, em tumores de pulmão, a fibronectina induz a síntese de PGE_2, favorecendo o crescimento e a proliferação neoplásica (Han et al., 2004). Alguns autores propõem uma remodelação da MEC em adenocarcinoma endometrial, expressando vitronectina, após a síntese de $PGF_{2\alpha}$ (Sales et al., 2009).

1.4 Justificativa

O GBM é uma neoplasia que ainda não há cura. Conforme foi demonstrado na introdução, os tratamentos ainda são ineficazes para a total eliminação do tumor. O GBM é caracterizado por apresentar células altamente migratórias e proliferativas, de difícil visualização durante o tratamento cirúrgico e também são resistentes aos outros tratamentos como a quimioterapia e radioterapia convencionais. Essas

células tumorais são as principais responsáveis pela reincidência do tumor. Para ocorrer a migração, essas células alteram o microambiente do parênquima cerebral e produzem os seus próprios substratos, formando assim uma MEC especifica para sua progressão tumoral.

A matriz extracelular é formada de macromoléculas que facilitam a migração celular e está associada com a membrana basal vascular, regiões preferenciais de proliferação tumoral. Estudos relatam o envolvimento de moléculas da MEC (colágeno tipo IV, laminina, fibronectina e vitronectina) na migração de células gliomas *in vitro* (Ohnishi et al., 1997). Alguns autores relatam o aumento da expressão de integrinas em diversos carcinomas, relacionando com os altos níveis de prostaglandinas (Nystrom et al., 2006; Rooprai et al., 1999)

Outro fato importante, relatado em trabalhos com tumores de pâncreas e cólon, é a diminuição da expressão das moléculas da MEC, mediante a inibição da produção da COX-2 (Yazawa et al., 2005). Essa inibição da COX-2 é promovida por antinflamatórios não-esteroidais (AINEs). Em contrapartida a adição de PGE_2 exógena, em adenocarcinoma endometrial, apresentou uma remodelação da MEC, havendo um aumento na expressão de moléculas como a vitronectina (Sales et al., 2009).

Desta forma, o foco desse trabalho foi elucidar a expressão das moléculas da MEC e de adesão em linhagens celulares U251MG e U87MG de gliomas humanos, após dois tratamentos:

1. Inibidor não seletivo de COX, o Ibuprofeno;
2. Adição da PGE_2 exógena nas células de gliomas.

2 OBJETIVOS

O principal objetivo desse estudo foi a análise *in vitro,* da expressão das moléculas da MEC envolvidas na migração celular, de duas linhagens tumorais U87MG e U251MG de gliomas humanos, na presença de um inibidor da produção de prostaglandina E_2, o Ibuprofeno, e assim como, para adição de PGE_2 exógena. Evidenciando os seguintes tópicos;

- Avaliar o caráter migratório das células U87MG e U251MG após a inibição de COX-1 e COX-2 com Ibuprofeno na concentração 25 µM (Colquhoun et al.,1998, Gomes, Colquhoun, 2012);

- Avaliar o caráter migratório das células U87MG e U251MG após a adição de PGE_2 exógeno na concentração de 10 µM;

- Analisar a expressão das moléculas de adesão: as integrinas α_v, α_3, α_5, β_1 e β_3;

- Analisar a expressão das moléculas da MEC: colágeno tipo IV, laminina, vitronectina e fibronectina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares escolhidas: U87MG e U251MG

O presente trabalho utilizou duas linhagens, U87MG e U251MG, derivadas de GBM, para estudos de migração celular e análise da expressão das moléculas da matriz extracelular. A linhagem celular U87MG foi isolada a partir de um astrocitoma de grau IV (classificação segundo OMS) de uma mulher caucasiana de 44 anos de idade (Poten, Macintyre, 1968). A linhagem U87MG tem se mostrado capaz de formar tumores altamente invasivos quando inoculada em camundongos atímicos (Martuza et al., 1991). U87MG é selvagem para o gene p53 e apresenta mutação para PTEN (Ianzini et al., 2007). A linhagem U251MG foi isolada a partir de um GBM de um homem caucasiano de 47 anos de idade (Poten, Macintyre, 1968) e apresenta mutação nos genes p53 e p21. A U251MG é tumorigênico para camundongos atímicos. A escolha das linhagens foi baseado no fato que ambas são tumorigênicos em camundongos atímicos. As linhagens foram gentilmente cedidas pelos professores Menck (U87MG) e Costanzi-Strauss (U251MG) do ICB, USP.

3.2 Cultivo de células

As linhagens celulares U87MG e U251MG de glioma humano foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle´s Medium* (DMEM) *(Invitrogen, CA – EUA)* suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico (penicilina - 50 µ/mL / estreptomicina -50 µg/mL). Os frascos foram mantidos em estufas de incubação com atmosfera de 37 ^{o}C contendo 5% de CO_2 e 95% de ar até atingirem a fase exponencial de crescimento. O congelamento das células foi feito em meio suplementado com 10% de soro e com 10% DMSO.

3.3 Curva de crescimento

As células foram semeadas em uma placa de 24 poços, contendo 4 diferentes concentrações celulares, sendo: $1x10^{4}$, $3x10^{4}$, $5x10^{4}$ e $7x10^{4}$ cél/poço**.** A contagem das células foi feita após os períodos de 24, 48 e 72 horas. Para a contagem retirou-se o meio e adicionou-se solução de PBS (solução tampão de fosfato) contendo Tripsina 0,025%/EDTA 0,02% para soltar as células da placa. As

trocas de meio foram realizada diariamente. Para cada amostra e tempo diferente, foram feitas 3 repetições deste procedimento em triplicata. As células foram retiradas da placa e colocadas na Câmara de Neubauer para contagem. Esse procedimento foi realizado para ambas as linhagens U87MG e U251MG. As concentrações escolhidas para a utilização no tratamento foram de $2x10^4$ cél/poço (U251MG) e $3x10^4$ cél/poço (U87MG).

3.4 Curva de dose resposta para os tratamentos com PGE_2 e Ibuprofeno

Para testar a influência do tratamento sobre a cultura, analisaram-se os efeitos dos mesmos sobre o crescimento celular das linhagens U87MG e U251MG. As células foram semeadas em uma placa de 24 poços, contendo 4 diferentes concentrações dos tratamentos, prostaglandina E_2 e Ibuprofeno (inibidor não específico de COX-1 e COX-2), em cada poço foi colocada a concentração escolhida de $2x10^4$ cél/poço + 500 µL de meio de cultura para U251MG e $3x10^4$ cél/poço + 500 µL de meio para linhagem U87MG.

Para o tratamento com PGE_2 foram investigadas as seguintes concentrações: 0,01 uM, 0,1 uM, 1 uM e 10 uM, tratadas por 24, 48 e 72 horas. Utilizou-se como controle, o veículo da droga: DMSO, no mesmo volume utilizado na concentração máxima da droga (0,27%). Além disso, também se utilizou um controle que não recebeu nenhum tratamento. Em cada período, as células foram tripsinizadas (Tripsina 0,025% em EDTA 0,02%) e contadas em câmara de Neubauer. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e repetidas 3 vezes.

Foram semeadas $2x10^4$ cél/poço para U251MG e $3x10^4$ cél/poço para U87MG, por poço, em placas de 24 poços e tratadas por 24, 48 e 72 horas com as seguintes concentrações de Ibuprofeno: 25 µM, 50 µM, 75 µM e 100 µM. Utilizou-se como controle o veículo da droga, etanol P.A. no mesmo volume utilizado na concentração máxima da droga (1%). Além disso, também se utilizou um controle que não recebeu nenhum tratamento. Em cada período, as células foram tripsinizadas (Tripsina 0,025% em EDTA 0,02%) e contadas em câmara de Neubauer. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

3.5 Reação da Cadeia Polimerase (RT-PCR)

3.5.1 Desenho dos primers

Todos os primers utilizados foram desenhados com base em sequências disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e com o auxilio do programa Primer 3 (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primr/primer3_www.cgi). A especificidade de cada *primer* foi verificada através do BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen®*(Invitrogen, CA – EUA)*.

Tabela 2. Sequência dos *primers* utilizados para quantificação da expressão gênica

Molécula	Forward *primer*	Reverse *primer*	Amplificação
Vitronectina	CTCTGGATGGGTTCACAGGT	GCCGCATCTACATCTCAGG	250
Colágeno tipo IV	AGGCCTAGTGGTCCGAATCT	CCTGGCTTGAAAAACAGCTC	285
Laminina	ACATCGTGTGAGCCCATGTATG	TGAGGGATTCTGGAAGATGG	239
Fibronectina	CAAGTATGAGAAGCCTGGGTCT	TGAAGATTGGGGTGTGGAAG	213
Integrina α5	CATTTCCGAGTCTGGGCCAA	TGGAGGCTTGAGCTGAGCTT	211
Integrina αv	GAAAAGAATGACACGGTTGC	AGTGATGAGATGGTCCCGCT	51
Integrina α3	CCTGCATCTCTGTGAAGCCTC	CCAGAATTGGTCCCCTCCTC	155
Integrina ß3	GGGGACTGCCTGTGTGACTC	CTTTTCGGTCGTGGATGGTG	123
Integrina ß1	GTGGTTGCTGGAATTGTTCTTATT	TTTTCCCTCATACTTCGGATTGAC	189
GAPDH	ATGACATCAAGAAGGTGGTG	CATACCAGGAAATGAGCTTG	177
18s	CGGCGACGACCCATTCGAAC	GAATCGAACCCTGATTCCCCGTC	187

3.5.2 Extração de RNA total

Ao término do tratamento as células foram coletadas, mantidas em gelo e homogeneizadas em equipamento Politron PT – 3100 (*Kinematica Dispersing and Mixing Technology, Luzern - Suíça*) com 1 mL de Trizol® (*Invitrogen*) e deixado à temperatura ambiente por 5 minutos (min). Após esse tempo foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio e deixado á temperatura ambiente por 3 min. Em seguida, foi

centrifugado a 10600 rpm (rotações por minuto) durante 15 min a 4 ºC. A fase aquosa foi retirada e colocada em tubos limpos. A esta foi adicionada 0,5 mL de isopropanol, por 10 min. Após esse período a amostra foi novamente centrifugada, por 10 min. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* (precipitado) foi adicionado 1 mL de etanol 95% para ser centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 75% livre de RNAse, e centrifugado a 7500 RPM por 5 minutos a 4 ºC. Essa etapa de lavagem foi realizada duas vezes. Por fim, o sobrenadante foi removido, o precipitado de RNA foi ressuspendido em 100 µL de água DEPC (dimetil pirocarbonato) inativa.

O RNA foi quantificado em equipamento Nano-Drop, utilizando a relação A260/A280 ≥ 1,8. O RNA foi mantido a -80 ºC. E a integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio.

3.5.3 Preparação do DNA complementar

A metodologia básica de RT-PCR foi realizada a partir da extração total do RNA na presença de Trizol®, clorofórmio e álcool isopropílico, com a pureza do RNA sendo confirmada pela razão de absorbância no espectrofotômetro A260 nm/A280 nm, entre 1,8 - 2,0. A transcrição reversa (RT) foi feita com MMLV® – transcriptase reversa usando 2 µg de RNA de interesse.

O cDNA (DNA complementar) foi obtido através da técnica de RT-PCR utilizando MMLV – trancriptase reversa (Invitrogen®). Para tal, foram adicionados 1 µL Inibidor de RNAse, 2 µL Random Primer®, 2 µL dNTP mix, 2 µL Ditiotreitol (DTT), 4 µL Tampão RT, 2 µL MMLV® e 1 µg de cDNA de interesse. Para a amplificação do cDNA foi utilizado um termociclador com as seguintes temperaturas e tempos previamente determinados: 21 ºC por 10’, 42 ºC por 50’ e, 99 ºC por 10’. A amplificação foi confirmada pela eletroforese em gel de 1% de agarose contendo brometo de etídio sendo o produto visualizado no equipamento de revelação de imagens quimioluminescente G-Box.

3.5.4 PCR Convencional

O método de PCR foi feito com Platinum *Taq*® DNA polimerase (*Invitrogen*) e oligonucleotídeos sense e antisense de interesse, além de um gene controle que não modifica sua expressão nas condições do experimento, a Gliceraldeído 3-

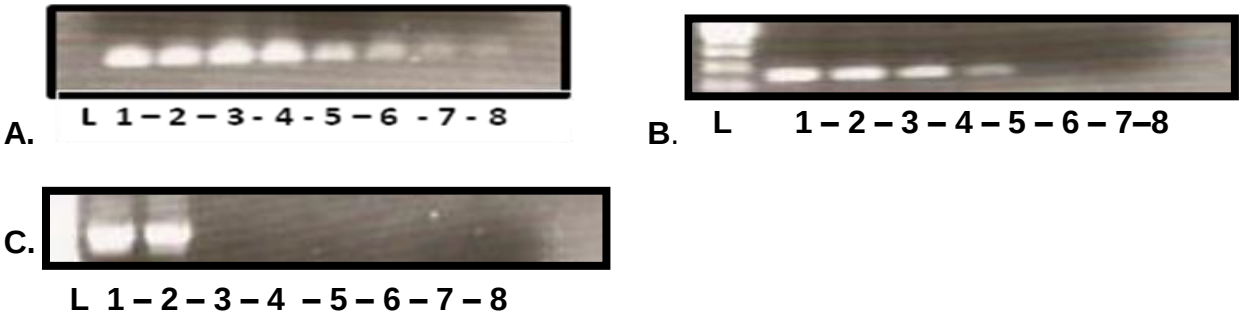
Fosfato Desidrogenase (GAPDH), que produz um fragmento de 306 pares de bases (pb). O protocolo de PCR foi padronizado para cada gene de interesse, sendo que utilizamos 94 ºC por 1' (para liberação da enzima *Taq*® do seu inibidor) para posterior entrada no ciclo: 94 ºC por 1', 1' na temperatura de anelamento calculado para os oligonucleotídeos usados e 72 ºC por 1'. Foram feitos 46 ciclos para determinar a faixa linear de produção do produto de amplificação confirmada pelo gel de agarose com amostras retiradas a cada dois ciclos. A análise semiquantitativa do produto foi feita usando o sistema de domínio público de imagem *Image J* http://rsb.info.nih.gov/ij/.

Todos os dados obtidos estão apresentados como média ± erro padrão (SE). Os resultados foram submetidos analise estatística por ANOVA seguida de Teste t de Student não pareado, para comparar a expressão gênica entre células tratadas e não tratadas. As diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$.

3.5.5 Padronização dos primers para RT-PCR (PCR convencional)

A padronização dos *primers* é um passo importante para realização dos procedimentos e para assegurar a confiabilidade dos resultados. No primeiro momento todos os *primers* (Vitronectina, Fibronectina, Laminina, Colágeno Tipo IV e as integrinas α_v, α_3, α_5, β_1 e β_3, além dos gene GAPDH e 18S), foram analisados em oito diferentes temperaturas (56,5 ºC; 59,1 ºC; 61,8 ºC; 64,5 ºC; 67 ºC; 69,1 ºC; 70,6 ºC e 71,5 ºC). Assim foi possível verificar em qual temperatura o anelamento mostrou-se mais eficiente para ser usado na reação e esse procedimento foi feito para todos os *primers* (Tabela 2 e Figura 4).

Figura 4 (A-C). Teste de Temperatura. A) Teste de temperatura do gene constitutivo 18s. B) Teste de temperatura do gene Vitronectina. C) Teste de temperatura Laminina,



3.6 Análise da expressão gênica através de RT – qPCR em tempo real.

Para o método de PCR em Tempo Real, a padronização da quantidade adequada de cDNA foi realizada através de reações utilizando diferentes concentrações de cDNA.

As concentrações testadas foram: 25.000 pg/µL, 12.500 pg/µL, 6.250 pg/µL, 3.125 pg/µL, 1.265,5 pg/µL e 781,5 pg/µL. Com isso, obtivemos uma curva padrão mostrando a melhor concentração de cDNA para se utilizar nos experimentos realizados. Foi realizado uma curva de concentração dos *primers*, utilizando 3 concentrações diferentes, sendo 200 nM, 400 nM e 800 nM. Esse teste foi feito com cada um dos *primers,* e a partir daí escolheu-se a concentração adequada para cada um, visando uma melhor eficiência da reação do mesmo (Tabela 3).

As reações foram preparadas com um volume final de 25 µL para cada concentração, contendo: 12,5 µL de Syber Green®, 5µL de cDNA, 5µL primer (dependendo de cada primer) e completando com água ultrapura MilliQ® autoclavada.

As amplificações foram realizadas através do aparelho 7300 REAL TIME PCR system® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Além das curvas de amplificação, foram realizadas também curvas de dissociação para verificar a especificidade da amplificação (Figura 5 A-B).

Para a escolha da concentração mais adequada, foi utilizado o critério de menor variação entre as duplicatas, confirmando a ausência de dímeros dos *primers* ou qualquer outro produto inespecífico, confirmando a confiabilidade dos resultados. Para todas as concentrações foram realizadas duplicatas.

A concentração escolhida de cDNA foi de 6.250 pg/µL para todos os *primers.* Abaixo temos exemplo de como ocorreu a tal padronização.

Para avaliar a expressão diferencial dos grupos tratados foi utilizado o método de quantificação relativa. O gene 18s, que codifica uma proteína ribossomal, foi utilizado como normalizador (controle endógeno) nas reações qPCR para análise de RNAm. O cálculo da expressão relativa entre as amostra foi realizado de acordo com a fórmula descria por Pfaffl (2001).

Figuras 5(A-B). A) Curva padrão de diferentes concentrações de cDNA em duplicata. B) Curva de dissociação. O gene 18s foi utilizado como controle interno, linhagem U87MG.

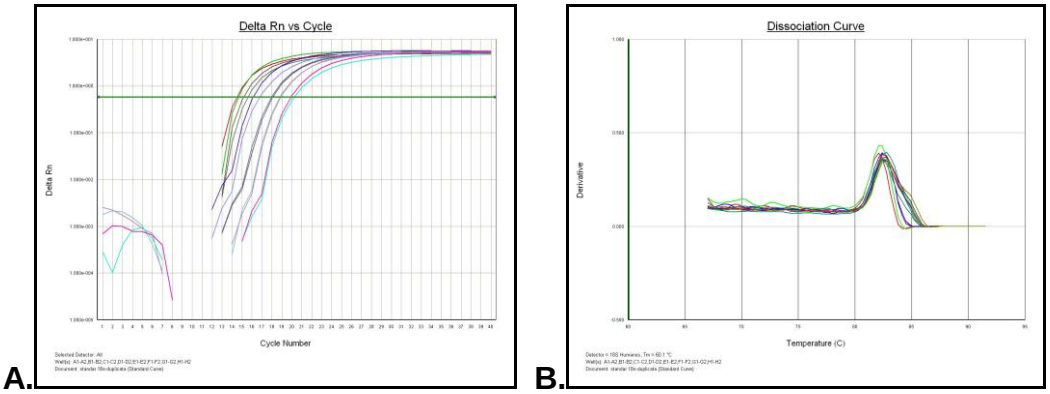


Tabela 3. Padronização das concentrações dos *primers* para PCR em tempo real.

Moléculas	Concentração de *primers*	Concentração de cDNA
Colágeno tipo IV	400 nM	6,25 ng/µL
Fibronectina	400 nM	6,25 ng/µL
Vitronectina	400 nM	6,25 ng/µL
Laminina	400 nM	6,25 ng/µL
Integrina α_V	800 nM	6,25 ng/µL
Integrina α_3	400 nM	6,25 ng/µL
Integrina α_5	400 nM	6,25 ng/µL
Integrina β_1	400 nM	6,25 ng/µL
Integrina β_3	400 nM	6,25 ng/µL
18s	200 nM	6,25 ng/µL
GAPDH	200 nM	6,25 ng/µL

3.7 Ensaio de Migração em *Transwell*

Para obter os resultados de migração celular, foi realizada a técnica de migração em *Transwell*, utilizando filtros com poros de 8 µM em placas de 24 poços (BD- Biosciences San Jose, CA, USA).

Células U87MG e U251MG foram tripsinizadas, contadas e no total de 2 x 10^4 e 3 x 10^4 cél/poço, respectivamente, e foram colocadas na porção superior de cada membrana porosa na quantidade contadas e no total de 2 x 10^4 e 3 x 10^4 cél/poço,

junto com o tratamento. No compartimento inferior da placa de *Transwell* foi adicionado 0,5 mL de meio de cultura contendo 10% de SFB com tratamento. O meio de cultura junto com o tratamento (Ibuprofeno ou PGE_2 exógena) foi trocado diariamente.

Depois de 48 h de tratamento, as células foram coradas com cristal de violeta (cristal de violeta 0,05% e 70% de etanol) por 30 minutos e lavadas com PBS (3 vezes). As células da porção superior do filtro (células que não migraram) foram removidas com cotonetes. As membranas contendo as células coradas que migraram foram secas e suas imagens capturadas aleatoriamente em 5 campos de cada membrana num aumento final de 100x.

3.8 Western Blot

Para a extração das proteínas, as células foram lisadas com tampão lise (0,21g/mL de Tris base, 0,584 g/ 100 mL de NaCl, 0,037 g/100 µL de EDTA e 1% de Triton 1 mL/100 mL pH 7,6), inibidor de protease e inibidor de fosfatase por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 2 minutos, e o sobrenadante transferido para um novo tubo, onde foi armazenado a -80 ºC. A concentração proteica foi determinada através do método de Lowry.

Após a quantificação os extratos proteicos foram diluídos em tampão de amostra (1,51 g de Tris-HCl pH 6,8, 40 mL de SDS 10%, 10 mL de mercaptoetanol, 20 mL de glicerol e 0,004 g de azul de bromofenol) incubados à 100 ºC por 3 minutos. Para o processo de separação foi feito um gel de SDS-PAGE com 4 % de acrilamida, seguido de um gel de 8% acrilamida. Em cada poço foram adicionados 40µg de extrato proteico total (diluído no tampão de amostra) e 3 µl de marcador de peso molecular em cada gel. A corrida foi feita a 100 V pelo período de ~2 horas.

Em seguida, foram realizadas as transferências das proteínas para uma membrana de nitrocelulose utilizando o tampão (57,6 g de glicina, 12 g de Trisbase e 4 g de SDS pH 8,3) a 4 ºC / 200 mA/ 2 h. Terminada a transferência das proteínas as membranas foram lavadas 1x com TBS 1X (5min) e 3x com TBS Tween 0,1% (5min) para a retirada do metanol. A fim de bloquear as possíveis ligações não especificas, as membranas foram incubadas à solução de PBS 1x + Albumina de soro bovino 1% por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação constante.

Passada uma hora da incubação, a membrana foi exposta ao anticorpo primário na diluição recomendada pelo fabricante (Tabela 6), *overnight* em agitação.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TBS 1X por 10 minutos e com TBS Tween 0,1% (3x) por 10 min. Após as lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário na diluição de 1:1000, por 2 horas. Após esse período de incubação, as membranas foram lavadas com TBS 1x por 10 minutos e TBS Tween (3x) por 10 minutos. As membranas foram incubadas por 2 minutos com ECL e reveladas no equipamento de revelação de imagens quimioluminescente G-Box.

3.9 Imunohistoquímica

3.9.1 Cultivo das células para Reações de Imunohistoquímica in vitro

Para realizar as reações de imunohistoquímicas *in vitro,* as células U87MG e U251mg foram cultivadas em placa de cultivo de 12 poços. Foram semeadas $2x10^4$ cél/poço (U87MG) e $3x10^4$ cél/poço (U251MG) de células e os experimentos foram realizados com as células semiconfluentes. Após o crescimento o meio de cultivo foi retirado e as células lavadas delicadamente com PBS. As monocamadas de células foram fixadas com 4% formaldeído em fosfato tampão (0,1 M – pH 7,2 a 7,4) por 30 minutos em geladeira, e depois foram lavadas com PBS.

3.9.2 Reações de Imunohistoquímica

As células foram fixadas em 4% formaldeído e depois lavadas três vezes em PBS. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por 30 min com H_2O_2 (2%) metanol/ H_2O (1:1) seguido por diversas lavagens (3 vezes H_2O destilada + 3 vezes PBS). O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com uma solução de BSA/2% do soro do animal, onde foi feito o anticorpo secundário em PBS – Triton X – 100 (0,2%). As laminas foram incubadas *overnight* com os respectivos anticorpos primários diluídos em PBS-Triton 0,2% à temperatura ambiente. Os controles negativos experimentais receberam apenas PBS – Triton X – 100. Após este tempo as lâminas foram lavadas 3 vezes (PBS / PBS – Triton 0,2% / PBS), incubadas por 90 min com anticorpo secundário biotinilado (concentrações entre 1:500 e 1:1000) e então novamente lavadas com PBS e PBS-Triton 0,2%. Seguiu-se a incubação com um complexo streptavidina-biotinilada horseradish peroxidase (numa concentração

entre 1:100 e 1:200 por 60 minutos) e novas lavagens antes da revelação das lâminas com 3,3'-diaminobenzidina (40 mg/100 mL + 1 mL H_2O_2 3%). As lâminas foram deixadas na solução de revelação entre 2 e 10 minutos e os núcleos foram contra-corados com hematoxilina de Harris. Depois de desidratadas em um gradiente crescente de etanol, as lâminas foram montadas com Permount®. Em alguns casos streptavidina-Alexa488 foi usada e os núcleos foram contra-corados com Hoescht 33342 antes das células serem montadas com Vectashield®. As imagens foram visualizadas e capturadas em microscópio de fluorescência Zeiss.

3.10 Análise dos Dados

Todos os dados obtidos estão apresentados como média ± erro padrão (SE). As análises foram realizadas utilizando o programa *Graph Pad Instat* e *Graph Pad Prism*, por ANOVA e Test-t Student para comparação das amostras. As diferenças foram consideradas significantes com $p<0,05$ e $p<0,001$.

4 RESULTADOS

4.1 Curva de Crescimento

Foi realizada uma curva de crescimento para as linhagens celulares (U87MG e U251MG). Foram obtidas as curvas de crescimento de quatro diferentes concentrações ($1x10^4$, $3x10^4$, $5x10^4$ e $7x10^4$ cél/poço) de células para a linhagem de U87MG (Figura 6) e U251MG (Figura 7) . A concentração que melhor atendeu as necessidades do projeto foi $2x10^4$ cél/poço (U251MG) e $3x10^4$ cél/poço (U87MG). Os experimentos foram feitos em triplicatas para garantir a confiabilidade dos resultados.

Figura 6.. Curva de crescimento da linhagem U87MG.

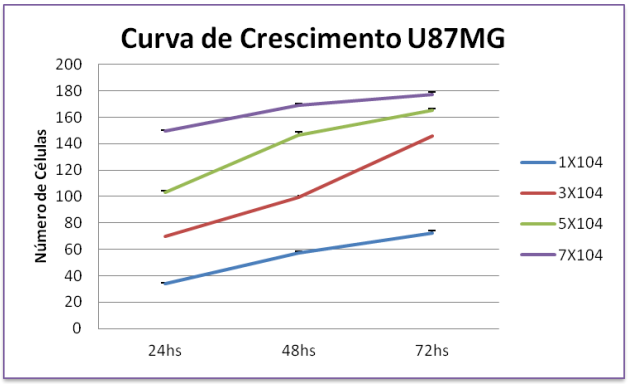
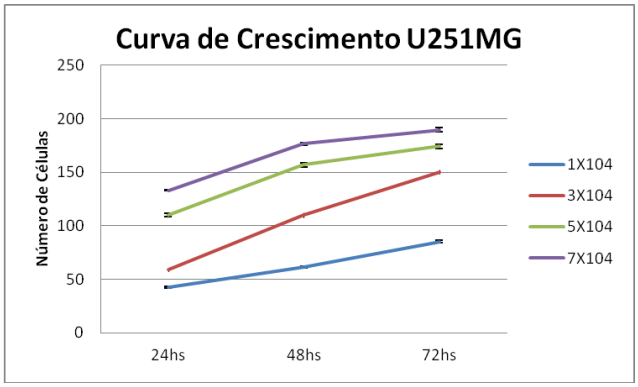


Figura 7. Curva de crescimento da linhagem U251MG.



4.2 Curva Dose – Resposta para PGE_2.

Foram semeadas $2x10^4$ cél/poço para U251MG e $3x10^4$ cél/poço para U87MG, em placas de 24 poços e tratadas por 24, 48 e 72 horas com as seguintes concentrações de PGE_2: 0,01µM, 0,1 µM, 1 µM e 10 µM. Utilizou-se como controle o veículo da droga, DMSO no mesmo volume utilizado na concentração máxima da droga (0,27%).

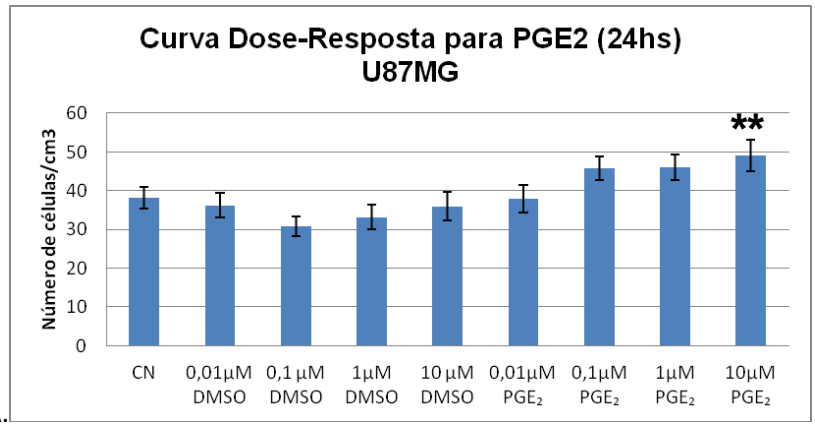
Além disso, também se utilizou um controle que não recebeu nenhum tratamento. A concentração de 10µM foi escolhida para ambas as linhagens, por apresentar um aumento no número de células de 47,4% (U87MG) e 52,5% (U251MG), no período de 48 h (Figura 8B e Figura 9B).

A análise da significância dos tratamentos foi feita por ANOVA, onde foi comparado cada tratamento ao seu respectivo controle. Os dados de significância estão presentes nas legendas de cada gráfico. Entre os controles (DMSO e CN) não apresentaram uma diferença significativa e comparamos os controles com os tratamentos nas 4 diferentes concentrações (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM e 10 µM).

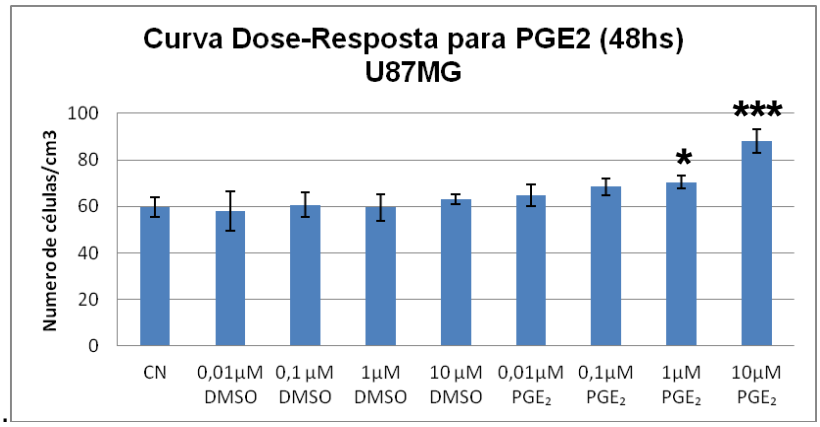
Todas as concentrações tanto dos tratados como dos controles foram feitas com n=3 (número de placas) em triplicata (3 poços de cada concentração) e foi feito um gráfico final contendo os valores de 24, 48 e 72 horas.

A concentração adotada para o tratamento de PGE_2 foi de 10 µM, no período de 48 h, para avaliar a expressão gênica das moléculas estudadas e a migração celular nas linhagens U87MG e U251MG.

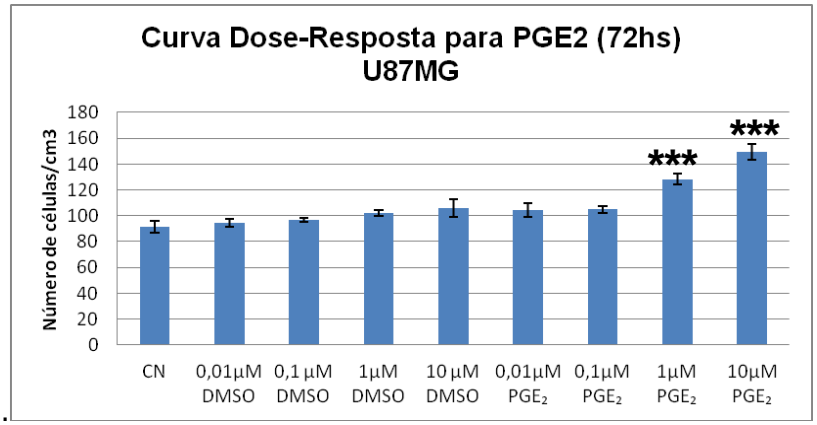
Figura 8. Curva de Dose-Resposta do tratamento com PGE_2 após 24, 48 e 72 horas, em células de glioma U87MG.



A.



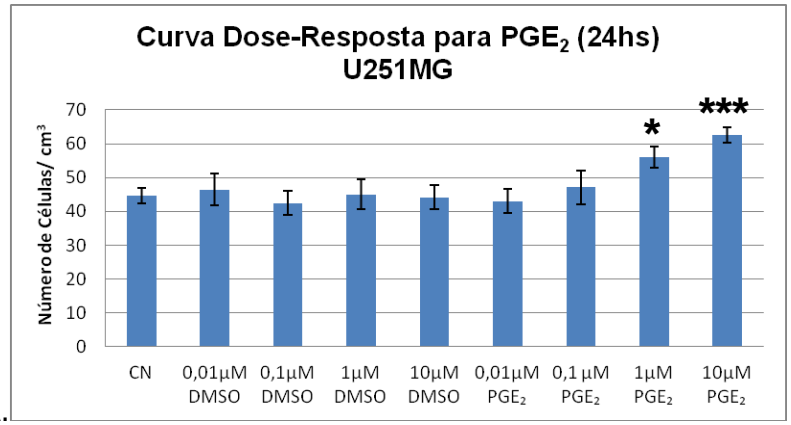
B.



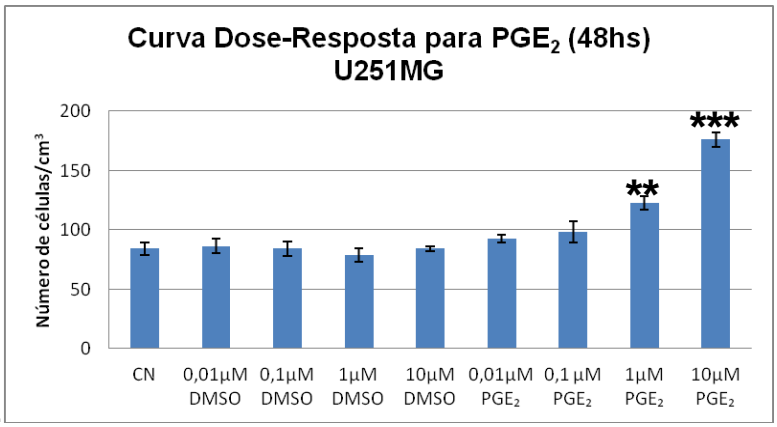
C.

Todos os períodos (24, 48 e 72 h) o tratamento a com concentração de 10 µM apresentaram um aumento significativo de número de células, em comparação aos grupos controles DMSO e CN (controle sem tratamento). Não houve diferença significativa entre os controles (CN). Todas as amostras apresentam o n=3. * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) e ***($p<0,001$).

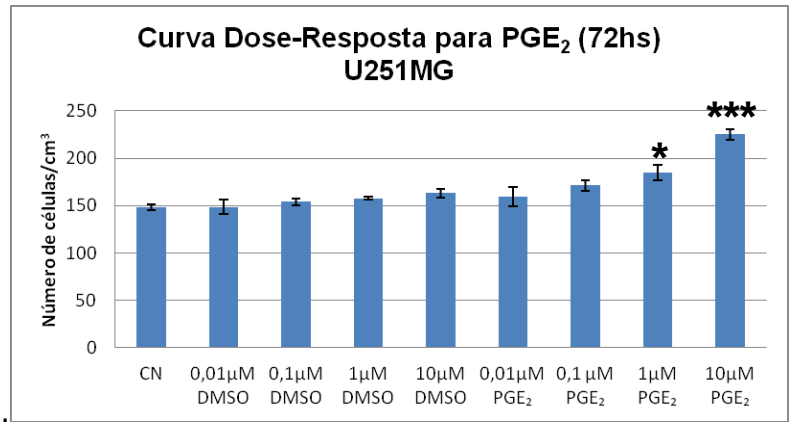
Figura 9. Curva de Dose-Resposta do tratamento com PGE_2 após 24, 48 e 72 horas, em células de glioma U251MG.



A.



B.



C.

Todos os períodos (24, 48 e 72 h) o tratamento na concentração de 10 µM de PGE_2 aumentaram significativamente o número de células em comparação aos seus respectivos controles (DMSO e CN). Não houve diferença significativa entre os controles (CN e DMSO). Todas as amostras apresentam o n=3. * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) e ***($p<0,001$).

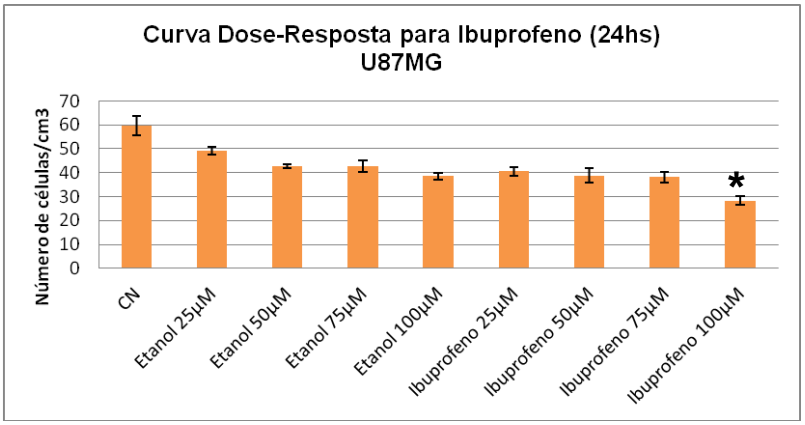
4.3 Curva dose resposta para Ibuprofeno (inibidor não específico de ciclooxigenases COX-1, COX-2)

Foram semeadas $2x10^4$ cél/poço para U251MG e $3x10^4$ cél/poço para U87MG, em placas de 24 poços e tratadas por 24, 48 e 72 horas com as seguintes concentrações de Ibuprofeno: 25 µM, 50 µM, 75 µM e 100 µM. Utilizou-se como controle o veículo da droga, etanol P.A. no mesmo volume utilizado na concentração máxima da droga (1%). Além disso, também se utilizou um controle que não recebeu nenhum tratamento. A concentração de 25 µM foi escolhida para os ensaios futuros, ela reduziu o número de células em 37,5% (U87MG) e 38,9% (U251MG), no período de 48 horas (Figura 10B e Figura 11B).

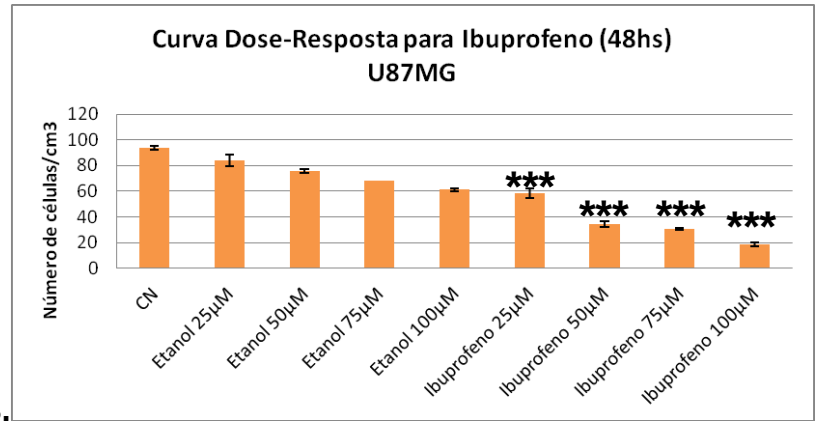
Os tratamentos na concentração 50 µM, 75 µM e 100 µM foram altamente prejudiciais para U251MG por reduzirem o número de células em 48,3%, 54,3% e 72,5%, respectativamente, no periodo de 48 h. Para linhagem U87MG, não foi diferente, as concentrações 50 µM, 75 µM e 100 µM reduziram o número de células em 66,5%, 70,3% e 81,5% respectivamente, no período de 48 h.

A análise da significância dos tratamentos foi realizada pelo teste ANOVA, onde foi comparado cada tratamento ao seu respectivo controle. Os dados de significância estão presentes nas legendas de cada gráfico. Todas as concentrações tanto dos tratados como dos controles foram feitas com n=3 (número de placas) em triplicata (3 poços de cada concentração) e foi feito um gráfico final contendo os valores de 24, 48 e 72 horas.

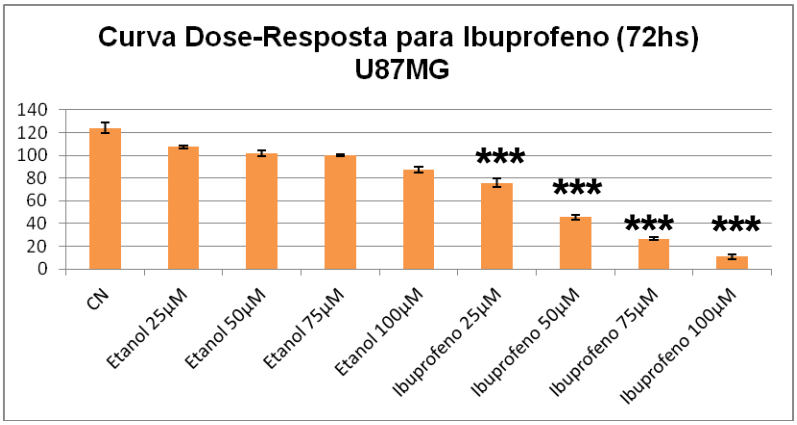
Figura 10. Curva de Dose-Resposta do tratamento com Ibuprofeno após 24, 48 e 72 horas, em células de gliomas U87MG.



A.



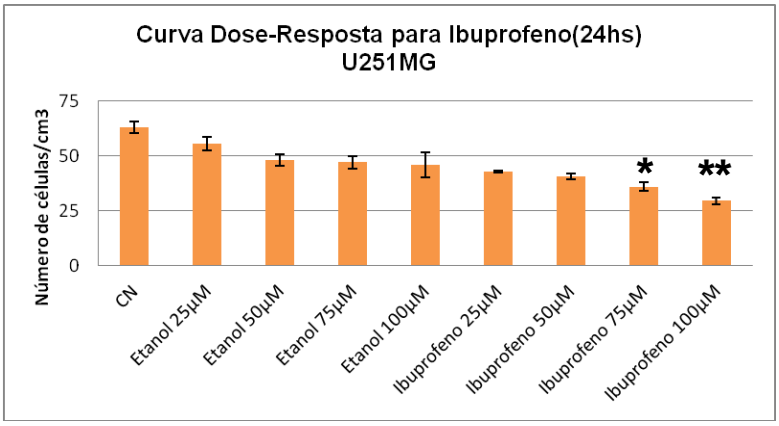
B.



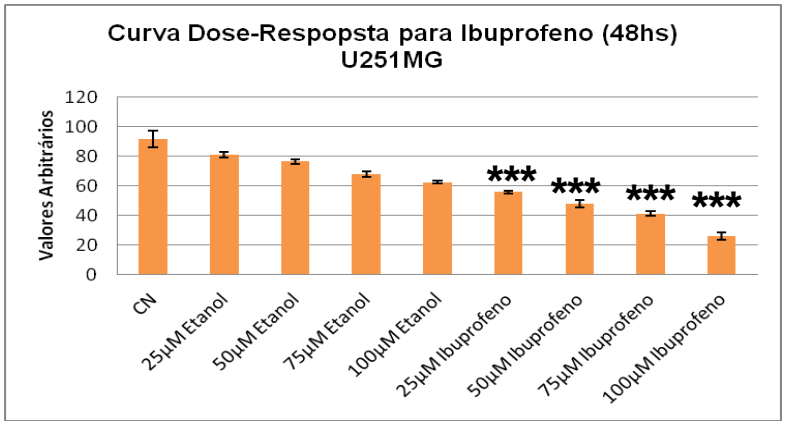
C.

Todos os periodos de tratamentos apresentaram redução significativa do número de células (U87MG) na concentração 100 µM. Nos periodos de 48 e 72 h apresentaram diferença significativas nas concentrações de 25 µM, 50 µM e 75 µM, em relação aos controles etanol e CN. Todas as amostras apresentam o n=3, repetidas três vezes. * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) e ***($p<0,001$).

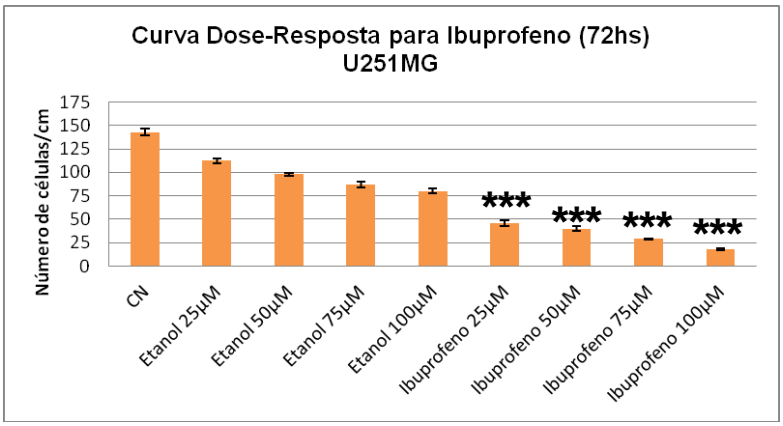
Figura 11. Curva de Dose-Resposta do tratamento com Ibuprofeno após 24, 48 e 72 horas, em células de gliomas U251MG.



A.



B.



C.

Todos os periodos de tratamentos apresentaram redução significativa do número de células (U87MG) nas concentração 75 µM e 100 µM. Nos periodos de 48 e 72 h apresentaram diferença significativas nas concentrações de 25 µM e 50 µM, em relação aos controles etanol e CN. Todas as amostras apresentam o n=3, repetidas três vezes. * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) e ***($p<0,001$).

4.4 RT- PCR CONVENCIONAL

4.4.1 RT-PCR: U251MG

As células U251MG foram cultivadas em frasco de 25 cm^2 por 48hs. Essas receberam tratamento com prostaglandina E_2 (PGE_2), na concentração de 10 µM. Utilizou-se como controle o veículo da droga, DMSO no mesmo volume utilizado na concentração máxima da droga (0,27%). Além disso, também se utilizou um controle que não recebeu nenhum tratamento.

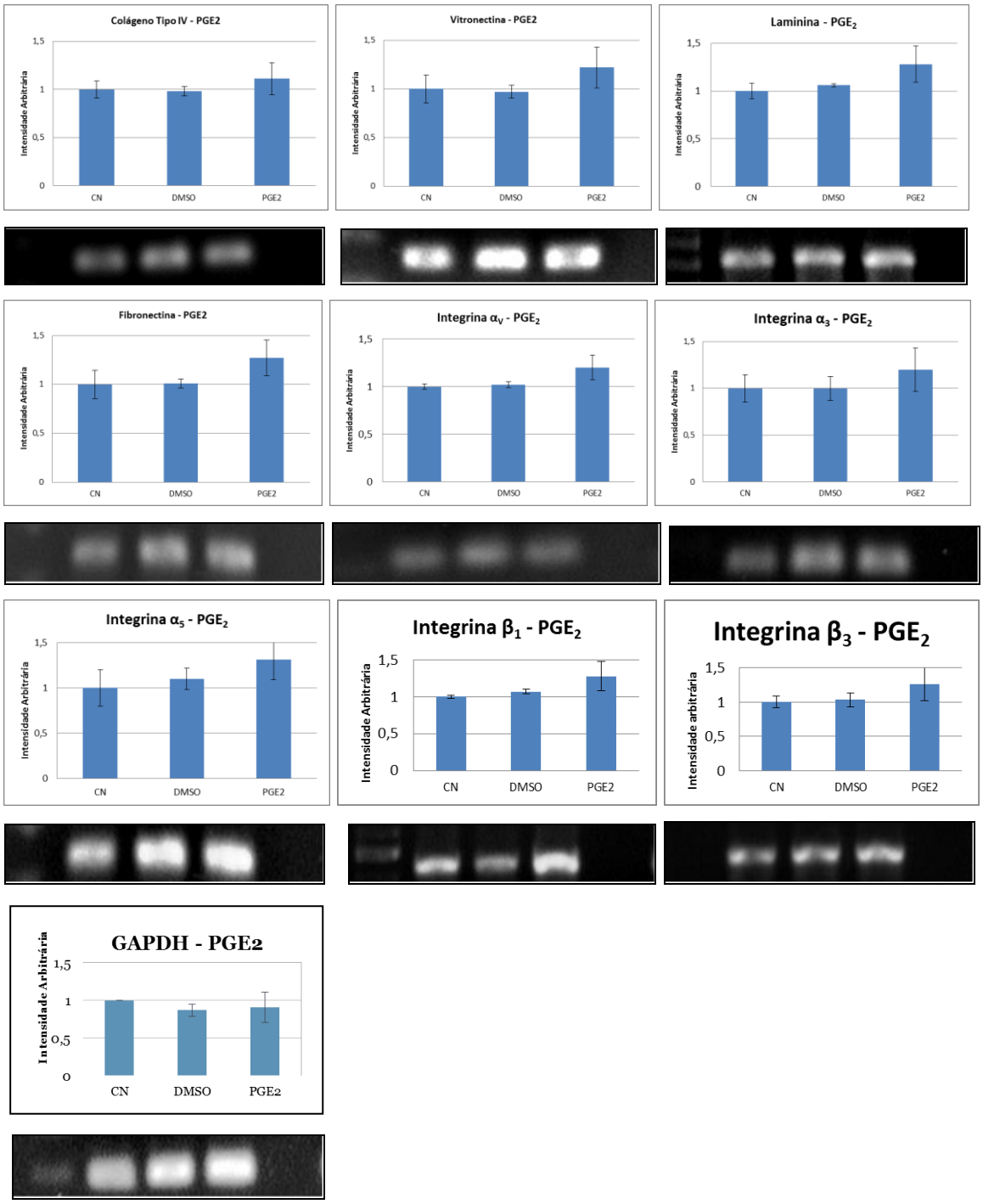
Um outro grupo de células U251MG recebeu tratamento com Ibuprofeno, na concentração de 25 µM. Utilizou-se como controle o veículo da droga, Etanol P.A. no mesmo volume utilizado na concentração máxima da droga (1%). Além disso, também se utilizou um controle (CN) que não recebeu nenhum tratamento.

Em seguida as células foram tripsinizadas e coletadas para extração de RNA, utilizando os protocolos utilizados no laboratório. Foi realizada a síntese de cDNA utilizando a técnica de RT-PCR pela enzima MMLV- transcriptase reversa.

Para a amplificação do cDNA foi utilizado o termociclador com as temperaturas encontradas na padronização dos primers, citado em dados anteriores. A amplificação foi confirmada pela eletroforese em gel de 1% de agarose contendo brometo de etídio sendo o produto visualizado pelo sistema de ultravioleta (UV).

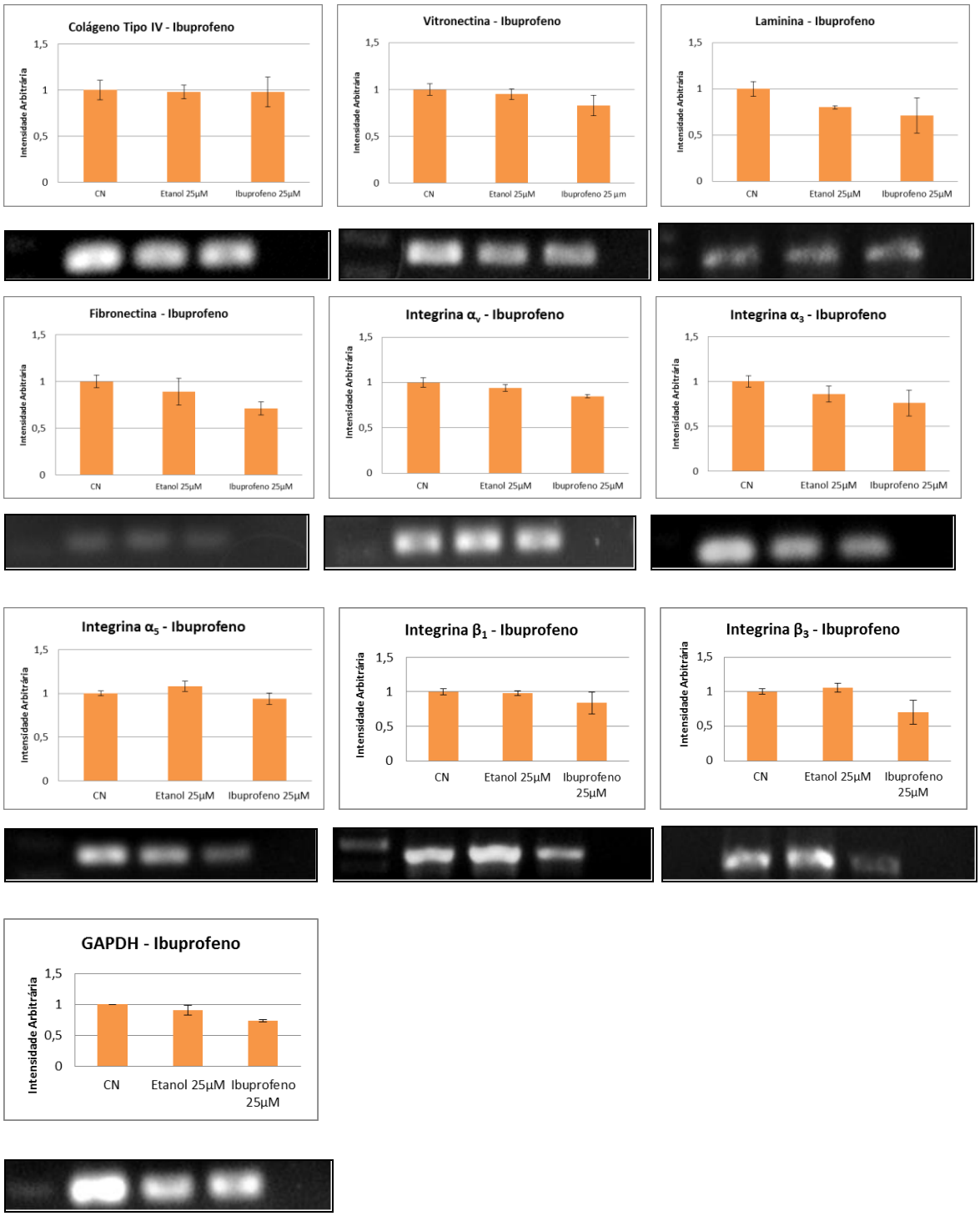
A analise semiquantitativa do produto foi realizada pelo sistema de *ImageJ*. O gene GAPDH foi considerado como gene controle endógeno de expressão constitutiva. Não houve diferença significativa entre o grupo tratado com o grupo controle (Figuras 12-13). Porém houve uma tendência de um aumento da expressão do RNAm em todas as proteínas em estudo.

Figura 12. Analise da expressão gênica após o tratamento com PGE_2 em linhagem celular de U251MG



Todos os grupos foram normalizados com o gene endógeno GAPDH. A expressão gênica foi quantificada no programa *ImageJ.* Os resultados foram analisados por ANOVA e amostra em triplicata, repetidas 3 vezes.

Figura 13. Analise da expressão gênica após o tratamento com Ibuprofeno em linhagem celular de U251MG



Analise da expressão gênica após o tratamento com Ibuprofeno, em linhagem celular de U251MG. Todos os grupos foram normalizados com o gene endógeno GAPDH. A expressão gênica foi quantificada no programa *ImageJ*. Os resultados foram analisados por ANOVA e amostra em triplicata, repetidas 3 vezes.

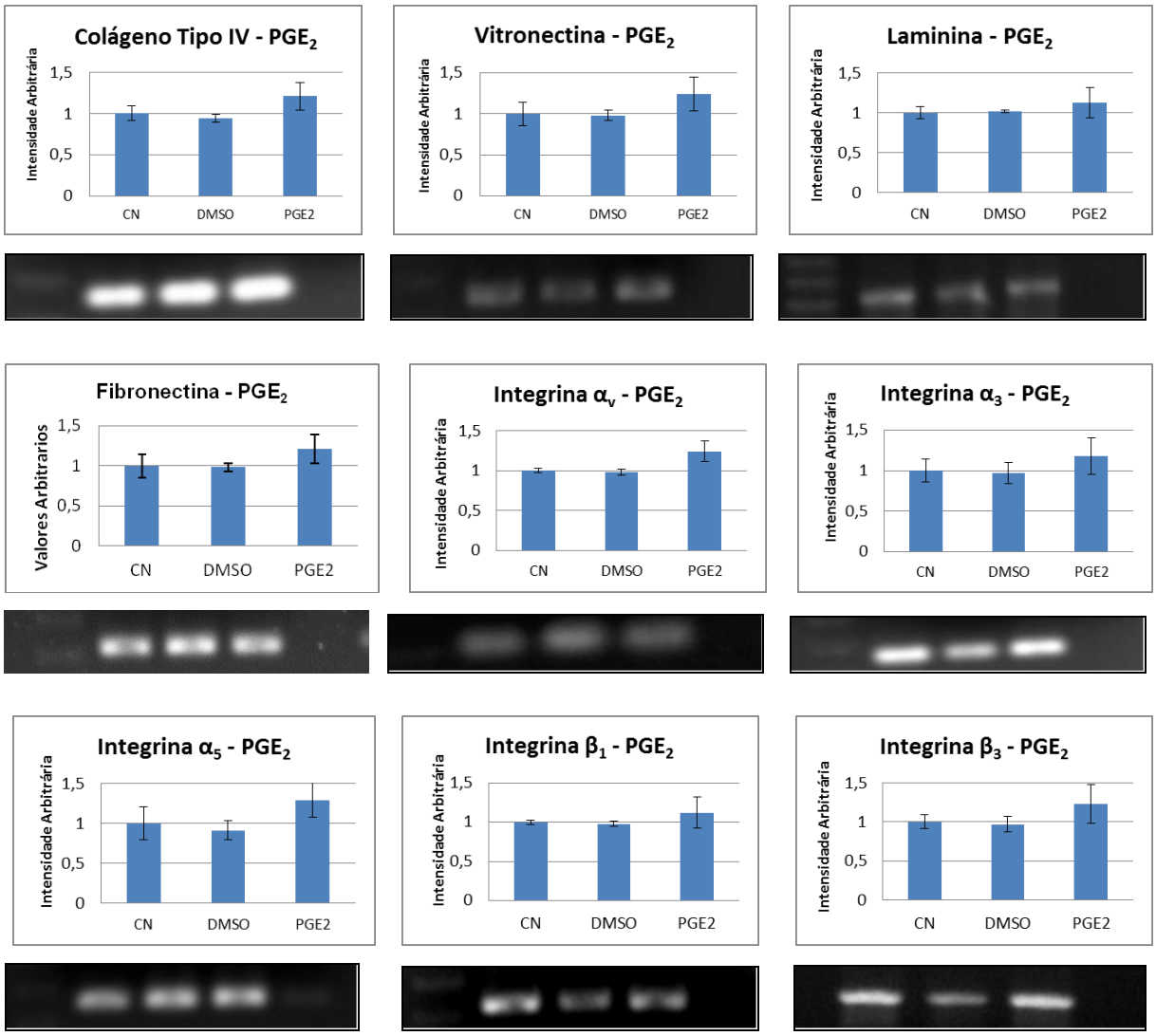
4.4.2 RT- PCR: U87MG

O procedimento realizado foi a mesma descrita para a linhagem U251MG, as células foram semeadas em 25 cm^2, recebendo tratamento de PGE_2 e Ibuprofeno em 48 h. Utilizamos também um grupo controle com veiculo da droga (DMSO e Etanol). E também utilizamos um controle que não recebeu nenhum tratamento.

Foram realizadas as mesmas etapas citadas anteriormente para elaboração da técnica de RT-PCR. Não houve diferença significativa entre o grupo tratado com seus respectivos grupos controles. Porém houve uma tendência de uma redução da expressão do RNAm em algumas as proteínas em estudo, tratadas com Ibuprofeno. As células que receberam o tratamento com PGE_2, não apresentou diferença significativa entre os grupos tratados e controles, mas houve uma tendência de aumento da expressão de RNAm, em algumas moléculas estudadas (Figuras 14-15).

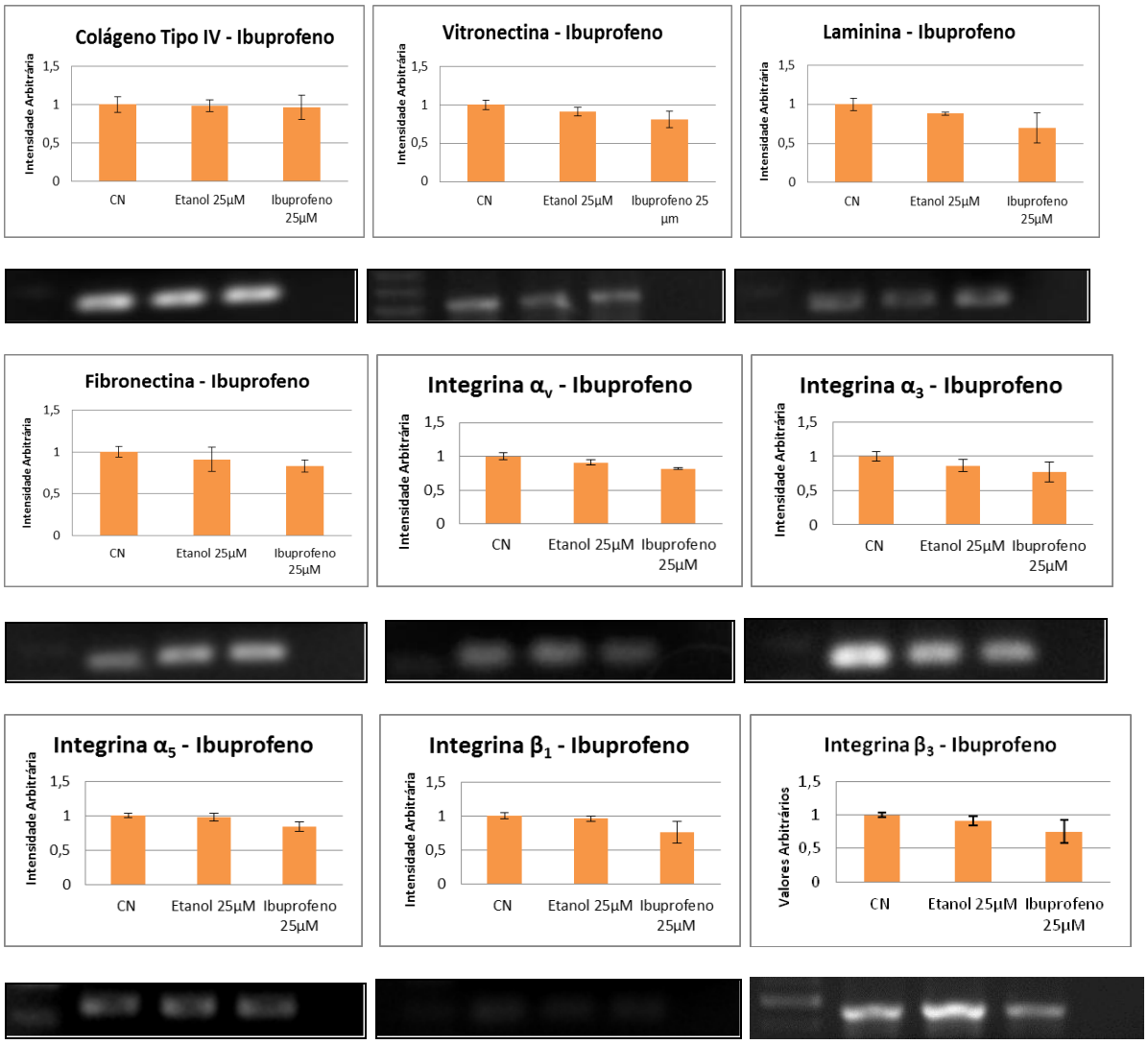
Foi necessário a realização da técnica de PCR em tempo real, com os mesmos tratamentos, tanto para U87MG e U251MG. A técnica e a padronização dos *primers* foram descrito anteriormente.

Figura 13. Analise da expressão gênica após o tratamento com PGE_2 em linhagem celular de U87MG.



Analise da expressão gênica após o tratamento com PGE_2 em linhagem celular de U87MG. Todos os grupos foram normalizados com o gene endógeno GAPDH. A expressão gênica foi quantificada no programa *ImageJ*. Os resultados foram analisados por ANOVA e amostra em triplicata, repetidas 3 vezes.

Figura 14. Analise da expressão gênica após o tratamento com Ibuprofeno em linhagem celular de U87MG.



Analise da expressão gênica após o tratamento com Ibuprofeno em linhagem celular de U87MG. Todos os grupos foram normalizados com o gene endógeno GAPDH. A expressão gênica foi quantificada no programa *ImageJ*. Os resultados foram analisados por ANOVA e amostra em triplicata, repetidas 3 vezes.

4.5 PCR – REAL TIME

4.5.1 PCR - REALTIME U87MG

O procedimento realizado para o tratamento das células U87MG foi o mesmo realizado para PCR-RT. As células foram semeadas em placas de 25 cm^2, recebendo separadamente o tratamento de PGE_2 e Ibuprofeno em 48 h. Utilizamos também um grupo controle com veiculo da droga (DMSO e Etanol). E também utilizamos um controle que não recebeu nenhum tratamento.

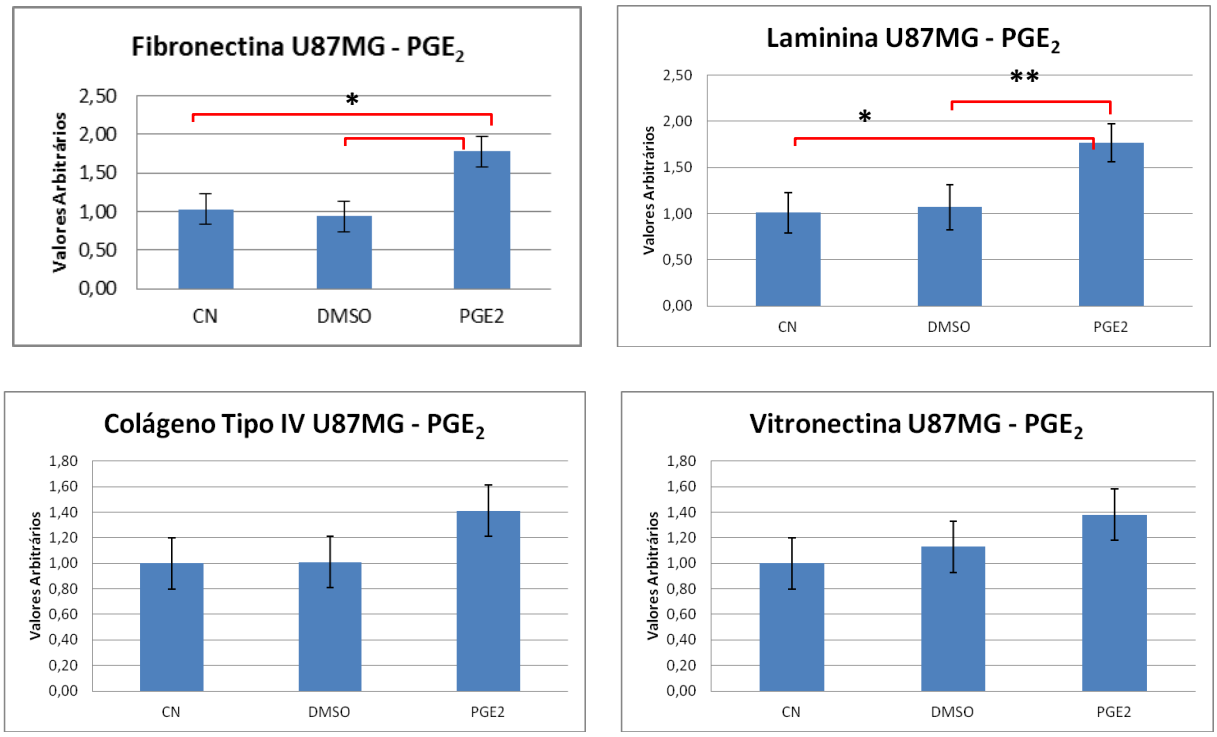
Após o tratamento com as drogas (PGE_2 e Ibuprofeno) foi extraido o RNAm para realização do PCR em tempo real, conrforme descrito anteriormente em materiais e métodos. Observamos em nossos resultados um padrão muito parecido com o que encontramos pelos resultados extraídos da técnica de PCR convencional (RT-PCR), confirmando os resultados obtidos. Contudo a técnica de PCR em tempo real (qPCR-RT) por ser uma técnica mais precisa e quantitativa, observamos que os resultados obtidos apresentaram uma diferença significativa entre algumas moléculas estudadas.

Por exemplo o tratamento com a prostaglandina E_2 exógena observamos um aumento de 76% na expressão de fibronectina na linhagem U87MG comparado com o controle normal (CN) e comparado ao controle DMSO foi num total de 83% (Figura 16). Foi observado um aumento na expressão de RNAm de laminina γ_1 na linhagem U87MG de 77%, quando tratada com prostaglandina E_2 em relação ao grupo controle normal (CN) e comparado ao controle DMSO foi um aumento de 70%. As demais moléculas da MEC, colágeno Tipo IV e vitronectina, observou-se uma tendência no aumento da expressão do RNAm, contudo não foi significativo.

O tratamento com inibidor não especifico de COX-1 e COX-2 (Ibuprofeno) reduziu significativamente o perfil transcricional das moléculas de fibronectina e laminina γ_1, uma redução da expressão de 62% e 53% respectivamente (Figura 18).

As moléculas de adesão, as integrinas α_v, α_3 e α_5 apresentaram um aumento significativo na expressão de RNAm de 61%(α_v), 66% (α_3) e 93% (α_5) após as células U87MG receberam o tratamento com PGE_2 (Figura 17). Os tratamento com Ibuprofeno causaram uma redução significativa para as integrinas α_v de 47% e α_3 de 68% (Figura 19). As demais moléculas de adesão analisadas não apresentaram diferença significativas para ambos tratamentos.

Figura 16. PCR – Real Time. U87MG tratadas com PGE_2 exógeno. Moléculas da Matriz Extracelular

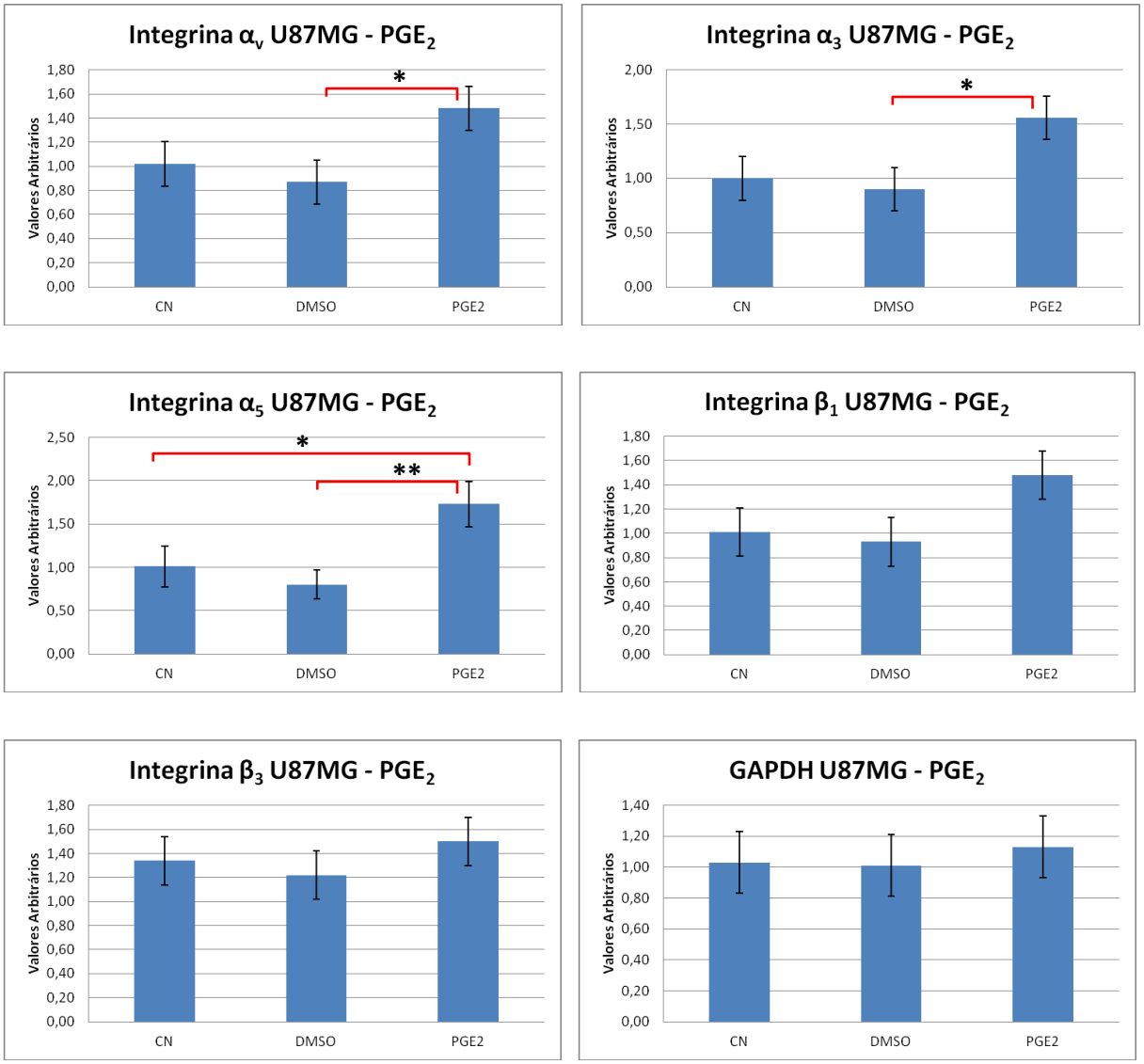


Foi observado um aumento na expressão de RNAm de fibronectina na linhagem U87MG de 76%, quando tratada com prostaglandina E_2 (25 µM) em relação ao grupo controle normal (CN) e comparado ao controle DMSO (25 µM) o aumento foi de 83%. Para a expressão do RNAm de Laminina γ_1 na linhagem U87MG o aumento foi de 77%, quando tratada com prostaglandina E_2 em relação ao grupo controle normal (CN) e em relação ao grupo controle DMSO foi de 70%. Dados significativos *$p<0,05$ e **$p<0,01$. n=3.

Não houve diferença significativa entre as demais moléculas da MEC estudadas (Colágeno Tipo IV e Vitronectina) na linhagem U87MG, contudo é evidente uma tendência no aumento da expressão dessas moléculas quando tratadas com PGE_2 exogeno.

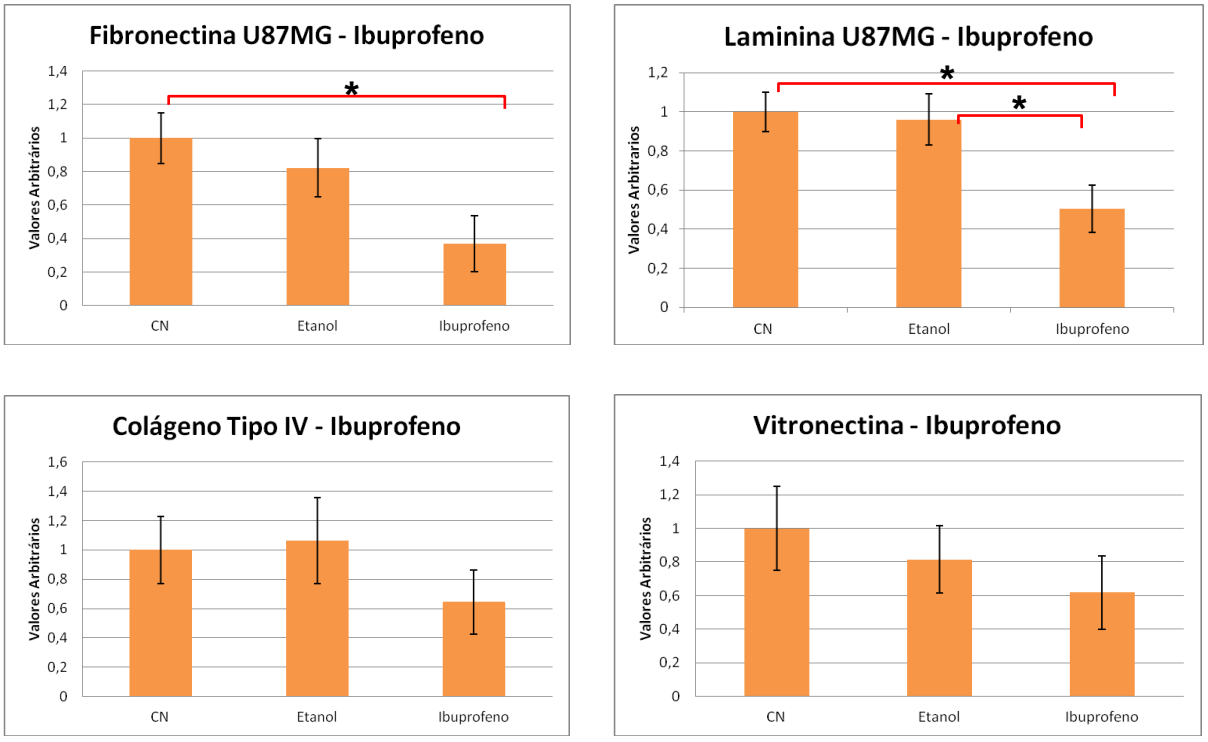
Na tabela 4 verificamos uma comparação com todos os resultados significativos da linhagem U87MG.

Figura 17. PCR – Real Time. U87MG tratadas com PGE_2 exógeno. Moléculas de Adesão (Integrinas).



Foi observado um aumento na expressão de RNAm de integrina α_v na linhagem U87MG de 61%, quando tratada com prostaglandina E_2 em relação ao grupo controle normal (CN). Também foi observado um aumento na expressão de RNAm de Integrina α_3 na linhagem U87MG de 66% comparado ao grupo CN e para a integrina α_5 o aumento da expressão de RNAm foi de 72%, quando tratada com prostaglandina E_2 em relação ao grupo controle normal (CN) e 93% comparado ao grupo DMSO. As demais integrinas (β_1 e β_3) não apresentaram um aumento significativo *$p<0,05$ e **$p<0,01$ n=3.

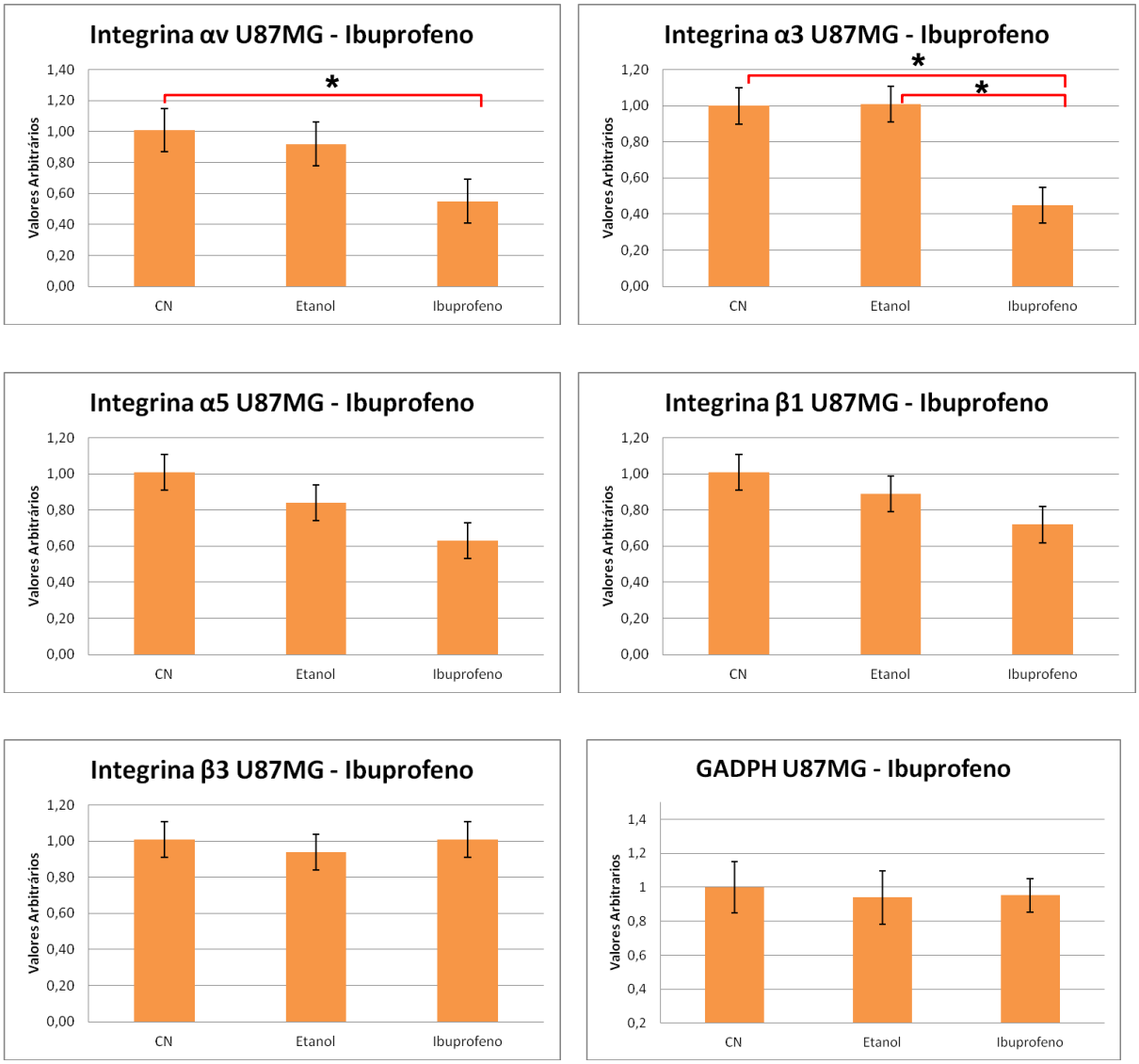
Figura 18. PCR – Real Time. U87MG tratadas com Ibuprofeno. Moléculas da Matriz Extracelular.



Foi observado uma redução na expressão de RNAm de Fibronectina na linhagem U87MG de 62%, quando tratadas com Ibuprofeno. A expressão de RNAm para Laminina γ_1 rediziu em 52% na linhagem U87MG após o tratamento com Ibuprofeno, em relação aos seus respectivos controles (CN) e de 54% de redução em relação ao grupo etanol. Não houve diferença entre os controles (CN e Etanol). Dados significativos *$p<0,05$ e **$p<0,01$ n=3.

Para os demais moléculas estudadas (Vitronectina e Colágeno Tipo IV) não houve diferença significativa.

Figura 19. PCR – Real Time. U87MG tratadas com Ibuprofeno. Moléculas de Adesão (Integrinas).



Foi observado uma redução na expressão de RNAm de integrina α_v na linhagem U87MG de 47%, quando tratada com Ibuprofeno em relação ao grupo controle normal (CN). Também foi observado uma redução na expressão de RNAm de Integrina α_3 na linhagem U87MG de 68% quando tratada com Ibuprofeno em relação ao grupo controle normal (CN). As demais integrinas (α_5, β_1 e β_3) não apresentaram um aumento significativo.

4.5.2 PCR-REAL TIME: U251MG

O procedimento realizado para o tratamento das células U251MG foi o mesmo realizado para PCR-RT. As células foram semeadas em placas de 24 cm^3,

recebendo separadamente o tratamento de PGE_2 (10 µM) e Ibuprofeno (25 µM) em 48 h. Utilizamos também um grupo controle com veiculo da droga (DMSO e Etanol). E também utilizamos um controle que não recebeu nenhum tratamento (CN).

Após o tratamento com as drogas (PGE_2 e Ibuprofeno) foi extraido o RNAm para realização do PCR em tempo real, conrforme descrito anteriormente em materiais e métodos. Observamos em nossos resultados um padrão muito parecido com o que foi encontrado nos dados extraídos pela técnica de PCR convencional (RT-PCR), o que confirma os resultados obtidos. Contudo a técnica de PCR em tempo real (qPCR-RT) por ser uma técnica mais precisa e quantitativa, observamos que os resultados obtidos apresentaram uma diferença significativa entre algumas moléculas estudadas

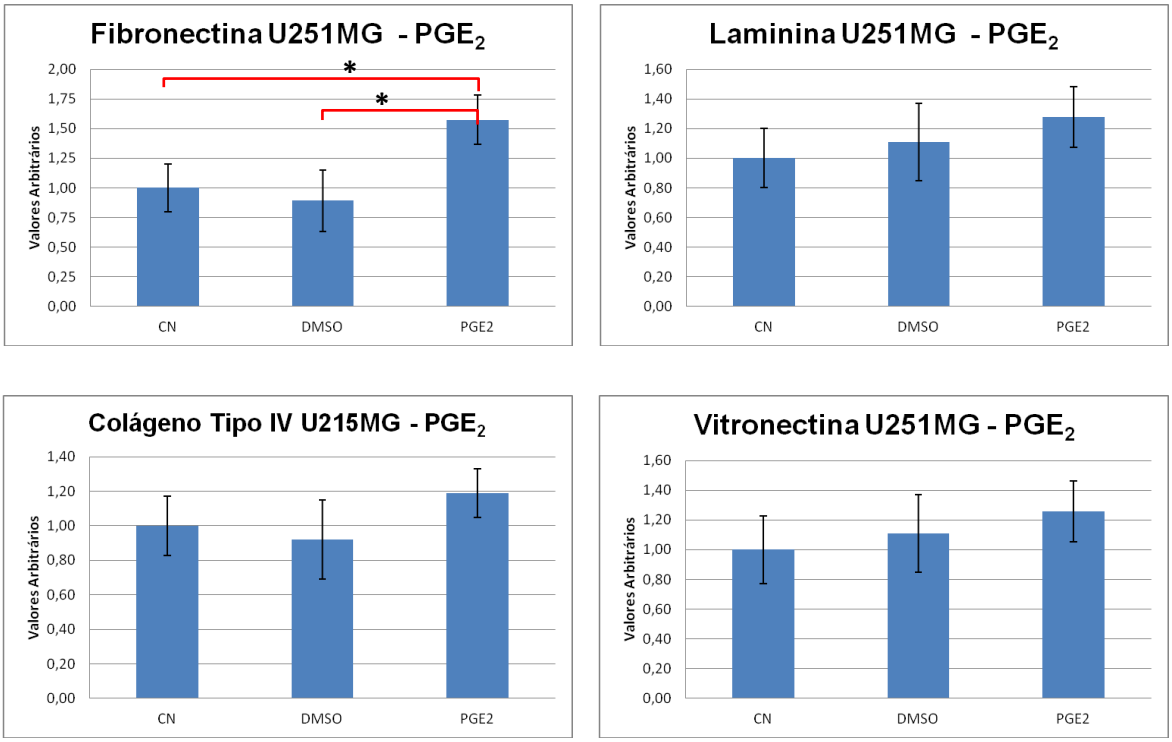
Após tratamento com a prostaglandina E_2 exógena, as células U251MG expressaram um aumento de 68% no perfil transcricional de fibronectina (Figura 20). As demais moléculas da MEC, colágeno Tipo IV, laminina e vitronectina, observou-se uma tendência no aumento da expressão do RNAm, contudo não sendo significativo.

O tratamento com inibidor não especifico de COX-1 e COX-2 (Ibuprofeno) mostrou diminuição significativa para colágeno Tipo IV em uma redução da expressão de 54% respectivamente (Figura 22). Para vitronectina, fibronectina e laminina γ_1 observou-se uma tendência de redução, porém não sendo significativo.

Para as moléculas de adesão, as integrinas α_v, α_3 e β_1 sofreram um aumento de 61% (α_v), 66% (α_3) e 93% (β1) na expressão de RNAm após o tratamento de 48 h com PGE_2 (Figura 21). Os resultados com o tratamento de Ibuprofeno houve uma redução significativa para as integrinas $\alpha_{v,}$ α_3 e β1 de 50%, 41% e 54% respectivamente (Figura 23). As demais moléculas de adesão analisadas não apresentaram diferença significativas para ambos tratamentos.

Na tabela 5 verificamos uma comparação com todos os resultados significativos da linhagem U251MG.

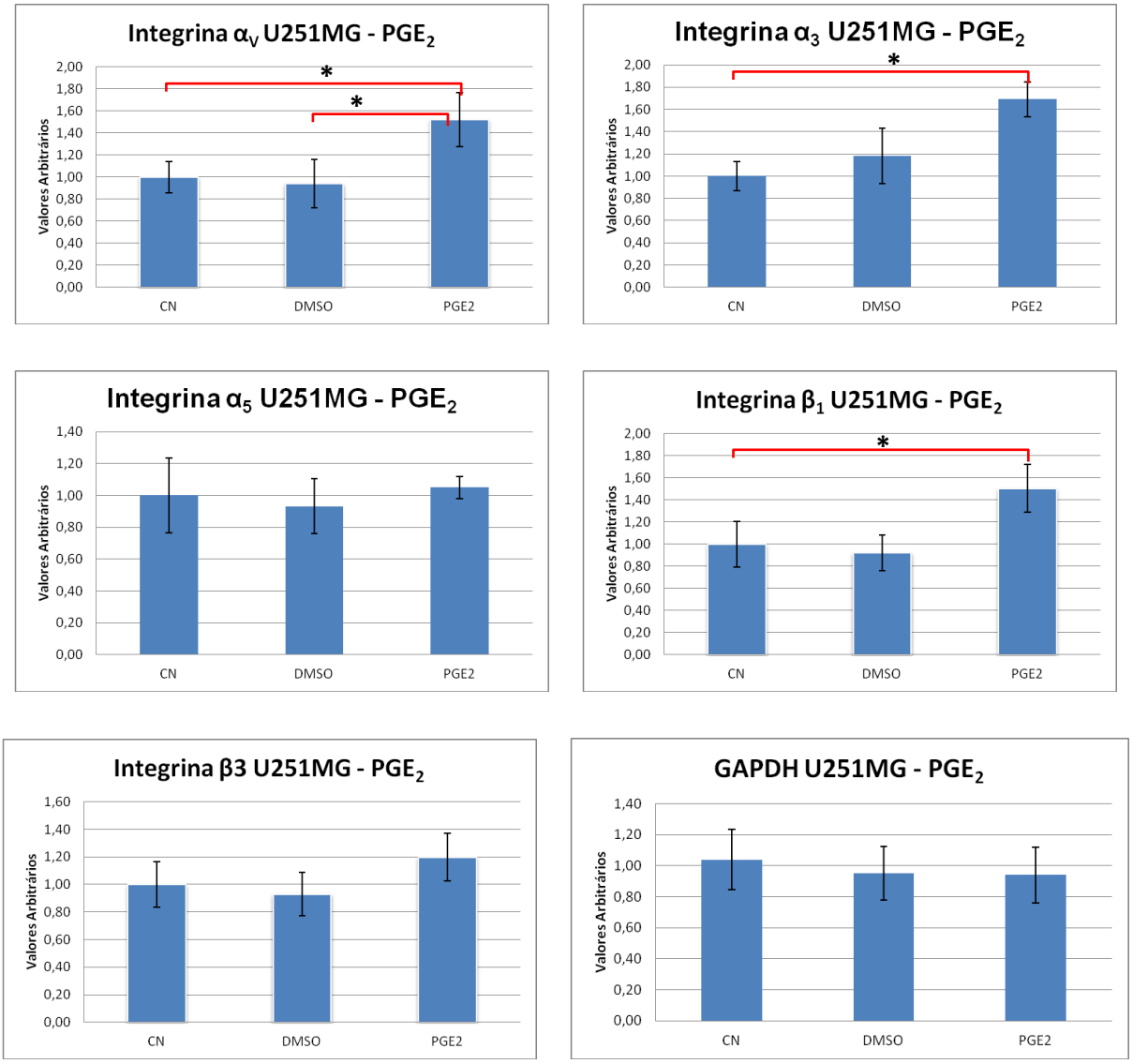
Figura 20. PCR – Real Time. U251MG tratadas com PGE_2 exógeno. Moléculas da Matriz Extracelular.



Dentre as moléculas da matriz extracelular analisadas verificamos um aumento de 68% da expressão gênica de FN, na linhagem U251MG tratadas com PGE_2 quando comparadas com o grupo DMSO e o aumento de 58% quando comparado ao grupo CN. Na tabela 5 verificamos uma comparação com todos os resultados significativos da linhagem U251MG.

Não houve diferença siginificativa entre os grupos LN, VN e colágeno tipo IV. E não houve diferença entre os grupos controles (CN) e DMSO. *$p<0,05$ e amostragem n=3.

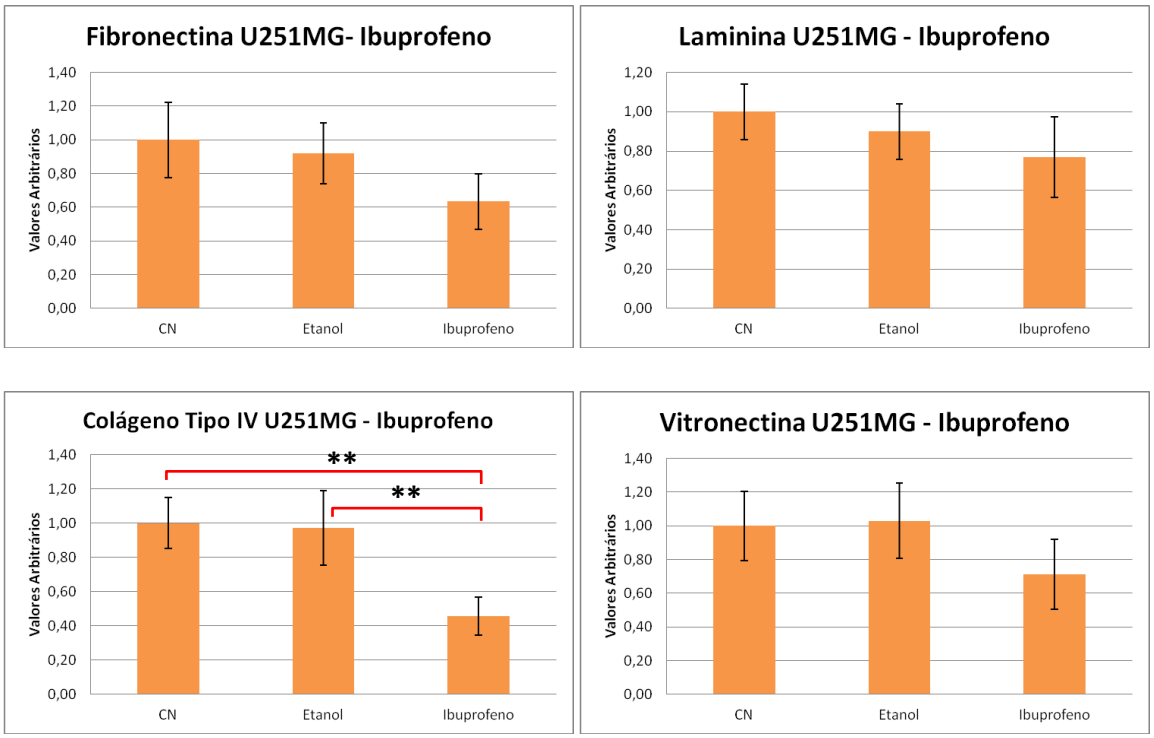
Figura 21. PCR – Real Time. U251MG tratadas com PGE_2 exógeno. Moléculas de Adesão (Integrinas).



Foi observado um aumento significativo da expressão gênica das seguintes moléculas de adesão, as integrinas α_v, α_3 e β_1. A expressão do RNAm da integrina α_v apresentou aumento de 58% quando tratadas com PGE_2 em comparação ao grupo controle DMSO e de 52% comparado ao grupo CN. Para integrina α_3 esse aumento foi de 69% comparado ao grupo CN. A integrina β_1 houve um aumento de 58% em comparação ao grupo controle DMSO. Não houve diferença entre os grupo controles (DMSO e CN) Análise Estatística * $p<0,05$.

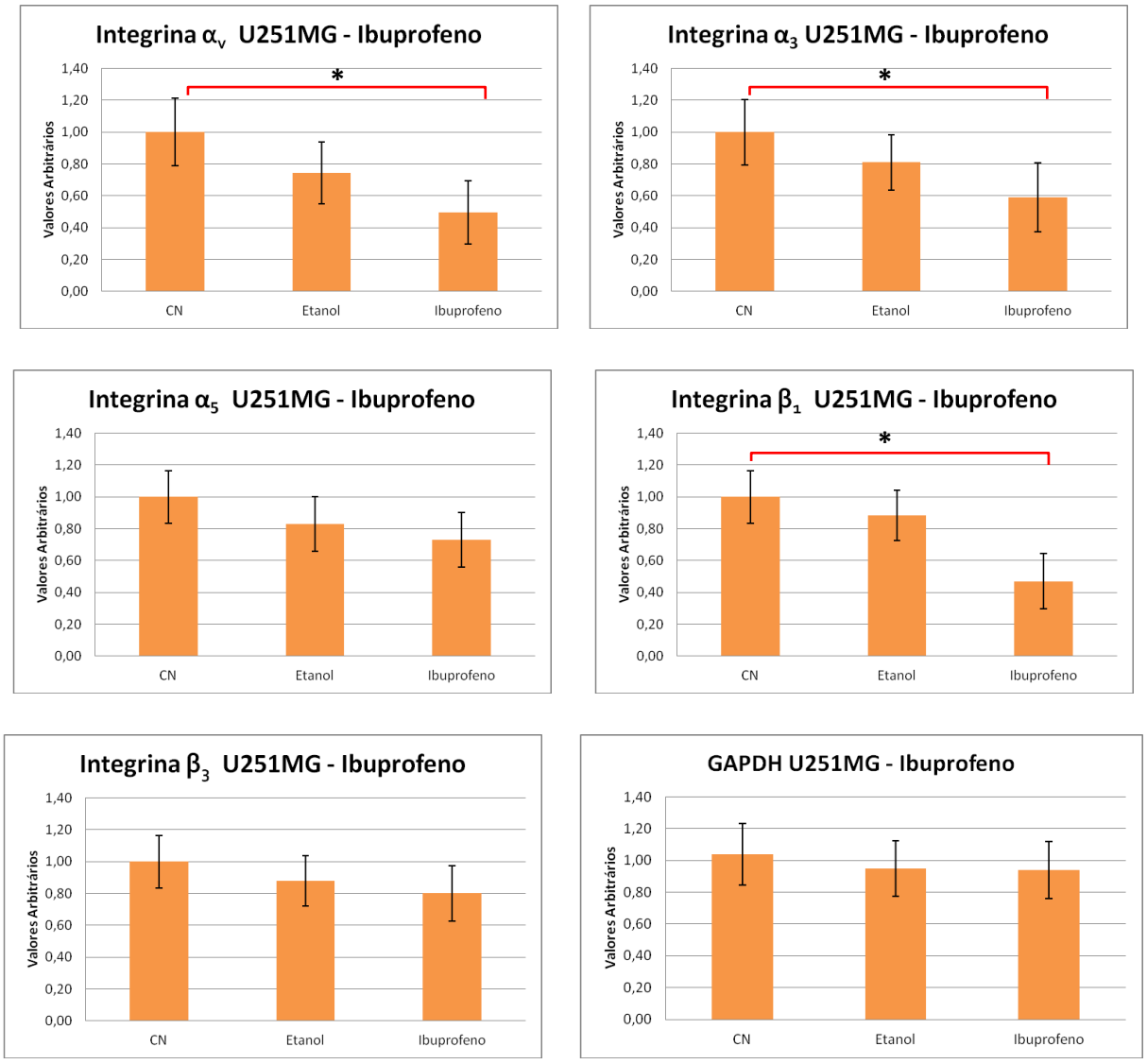
As demias moléculas de adesão estudadas não sofreram direfenças siginificativas e foi utilizado GAPDH como gene controle.

Figura 22. PCR – Real Time. U251MG tratadas com Ibuprofeno. Moléculas da Matriz Extracelular.



Foi observado uma redução na expressão gênica em todas as moléculas da matriz extracelular do estudo. Contudo foi significativo para a molécula de colágeno tipo IV, havendo uma redução de 58% após as células U251MG receberem o tratamento com Ibuprofeno em comparação ao grupo CN e uma redução de 68% comparados ao grupo etanol. Análise Estatística *$p<0,05$ e **$p<0,01$, $n=3$.

Figura 23. PCR – Real Time. U251MG tratadas com Ibuprofeno. Moléculas de Adesão (Integrinas).



Foi observado uma redução significativas no perfil transcricional das seguintes moléculas de adesão, as integrinas α_v α_3 e β_1, após as células U251MG receberem o tratamento com Ibuprofeno (25 µM) em comparação aos seus controles, etanol e CN (sem tratamento).

Houve uma redução de 50% da expressão de RNAm para integrina α_v comparada com o grupo controle CN. Para integrina α_3 a redução foi de 41% e de 54% para a expressão de RNAm da integrina β_1 comparada ao grupo CN.

As demais integrinas não apresentaram resultados significativos. Foi usado GAPDH como gene controle. Todas as amostras apresentam o n=3, repetidas três vezes. * ($p<0,05$)

Tabela 4. Resultados siginificativos da expressão gênica por PCR em tempo real.

U87MG				
Tratamentos / Moléculas	**CN x PGE_2**	**DMSO x PGE_2**	**CN x Ibuprofeno**	**Etanol x Ibuprofeno**
Fibronectina	* ↑ 76%	* ↑ 83%	* ↓ 62%	
Laminina γ_1	** ↑ 77%	* ↑ 70%	* ↓ 53%	* ↓ 52%
Integrina α_v		* ↑ 61%	* ↓ 47%	
Integrina α_3		* ↑ 66%	* ↓ 68%	
Integrina α_5	* ↑ 72%	** ↑ 93%		

Resumo dos resultados siginicativos para a analise da expressão genica do RNAm da linhagem U87MG e suas porcentagens consecultivas. ↑ aumento. ↓ redução. **p<0,01. *p<0,05.

Tabela 5. Resultados siginificativos da expressão gênica por PCR em tempo real.

U251MG				
Tratamento / Moléculas	**PGE_2 x CN**	**PGE_2 x DMSO**	**Ibuprofeno x CN**	**Ibuprofeno x Etanol**
Fibronectina	* ↑ 58%	* ↑ 68%		
Colágeno Tipo IV			** ↓ 54%	** ↓ 52%
Integrina α_v	* ↑ 52%	* ↑ 58%	* ↓ 50%	
Integrina α_3	* ↑ 63%		* ↓ 41%	
Integrina β_1			** ↓ 54%	** ↓ 52%

Resumo dos resultados siginicativos para a analise da expressão genica do RNAm da linhagem U87MG e suas porcentagens consecultivas. ↑ aumento. ↓ redução. **p<0,01. *p<0,05.

4.6 Reação de Imunohistoquímica

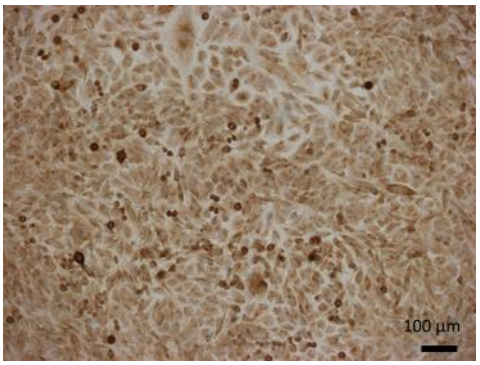
As células foram semeadas na concentração de $3x10^4$ cél/poço (U87MG) e $2x10^4$ cél/poço (U251MG) em placas de 12 poços e foram cultivadas por 3 dias, No terceiro dia as células foram ficadas com formaldeído 4%. Após a fixação, as células foram lavadas 3x em PBS e feito todo procedimento do protocolo para imunohistoquímica.

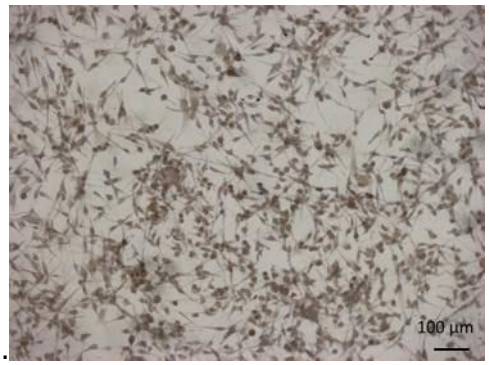
Para a algumas moléculas realizamos a técnica de imunofluorescência, as células foram semeadas na concentração de $3x10^4$ cél/poço (U87MG) e $2x10^4$ cél/poço (U251MG) em placas de Petri de 35mm e foram cultivadas por 3 dias. No terceiro dia as células foram ficadas com formaldeído 4%. Após a fixação, as células foram lavadas 3x em PBS e feito todo procedimento do protocolo para imunofluorescência. Nas figuras abaixo observamos a expressão de moléculas da matriz extracelular estudadas como o colágeno tipo IV, laminina, fibronectina e vitronectina.

Figura 24. Imunohistoquímica para colágeno tipo IV e laminina para U251MG e U87MG, revelado com DAB. **(A-B)** Imunodetecção para colágeno tipo IV. **(C-D)** Imunodetecção para LN.

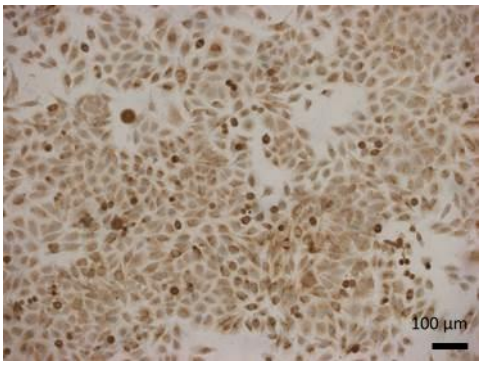
U251MG **U87MG**

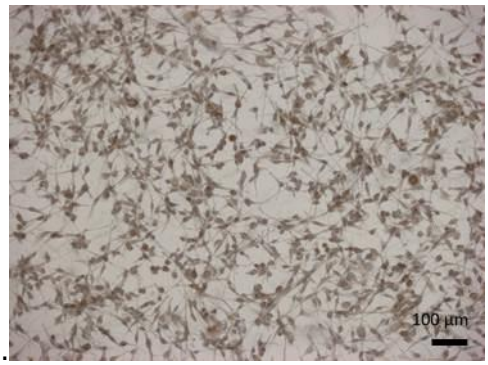
Colágeno tipo IV

A. 

B. 

Laminina

C. 

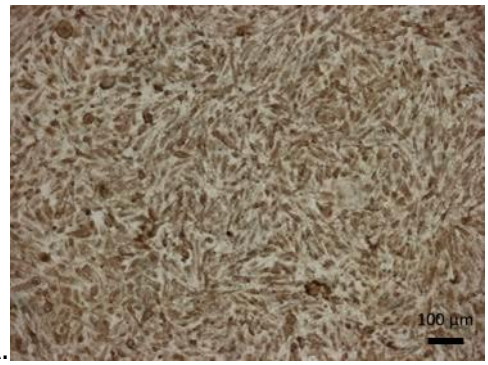
D. 

Observa-se uma imunomarcação para colágeno tipo IV ambas linhagens, sendo mais expressivo nas células de U251MG. Em laminina é possível notar que há uma imunomarção para ambas linhagens, mas na linhagem U251MG é visível notar uma forte marcação em comparação a linhagem U87MG (Figuras 24 C-D).

Figura 25. Imunohistoquimica para Fibronectina e Vitronectina para U251MG e U87MG, reveladas por DAB. **(A-B)** Imunodetecção para FN. **(C-D)** Imunodetecção para VN.

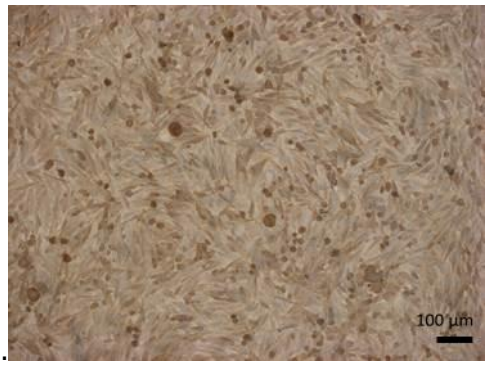
U251MG **U87MG**

Fibronectina

A. 

B.

Vitronectina

C. 

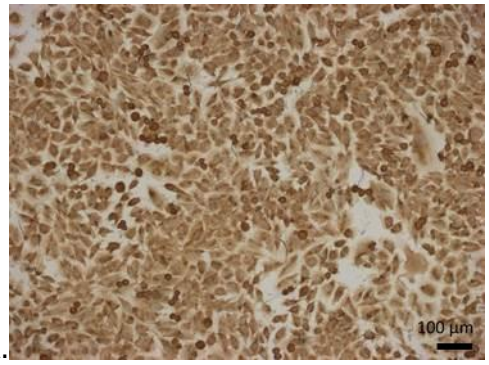
D.

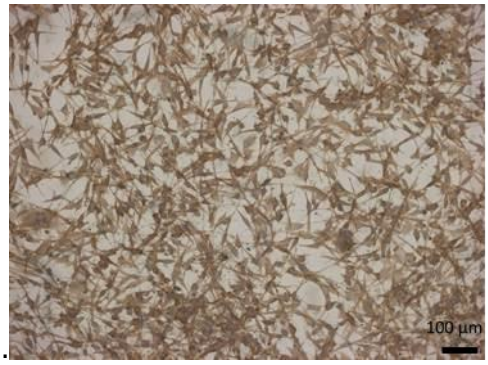
A imunomarcação para fibronectina em ambas linhagens, contudo é possível notar que a deposição de FN é intensa nas células de U251MG (Figura 25 A). Em vitronectina a imunomarcação é observada para ambas linhagens estudadas.

Figura 25. Imunohistoquimica para COX-1, COX-2 e cPGES para U251MG e U87MG, revelados por DAB. **(A-B)** Imunomarcação para ciclooxigenase-1 (COX-1). **(C-D)** Imunodetecção para ciclooxigenase-2 (COX-2). **(E-F)** Imunodetecção para prostaglandina sintase citosólica (cPGES).

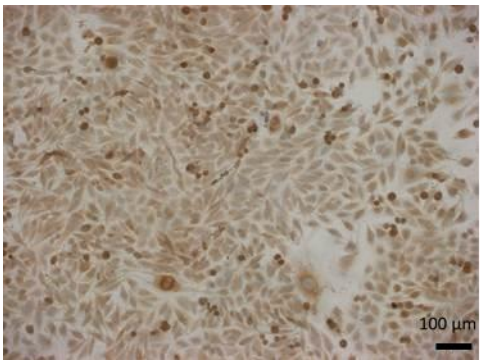
U251MG **U87MG**

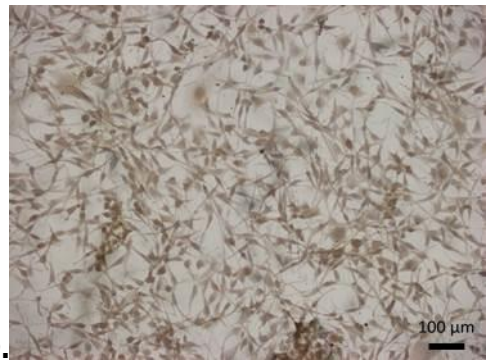
Ciclooxigenase-1 (COX-1)

A. 

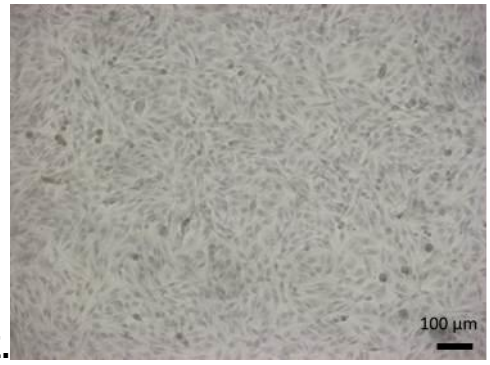
B. 

Ciclooxigenase-2 (COX-2)

C 

D. 

Prostaglandina E_2 Sintase Citosólica (cPGES)

E. 

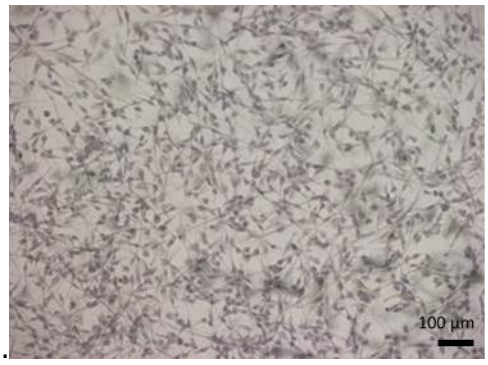
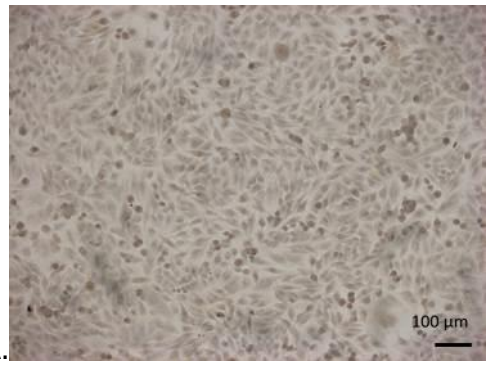
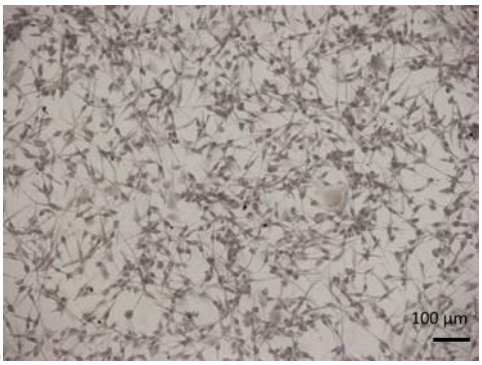
F. 

Figura 27. Imunohistoquimica para mPGES-1, mPGES-2 para U251MG e U87MG, revelado por DAB. **(A-B)** Imunodetecção para mPGES-1. **(C-D)** Imunodetecção para mPGES-2.

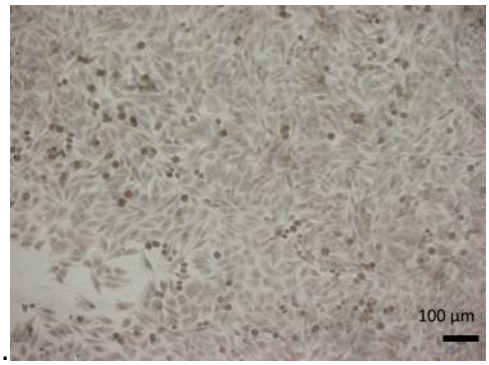
U251MG **U87MG**

Prostaglandina E_2 Sintase 1 microssomal.

A. 

B. 

Prostaglandina E_2 Sintase 2 microssomal.

C. 

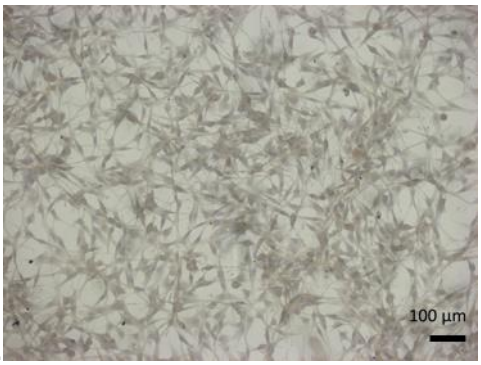
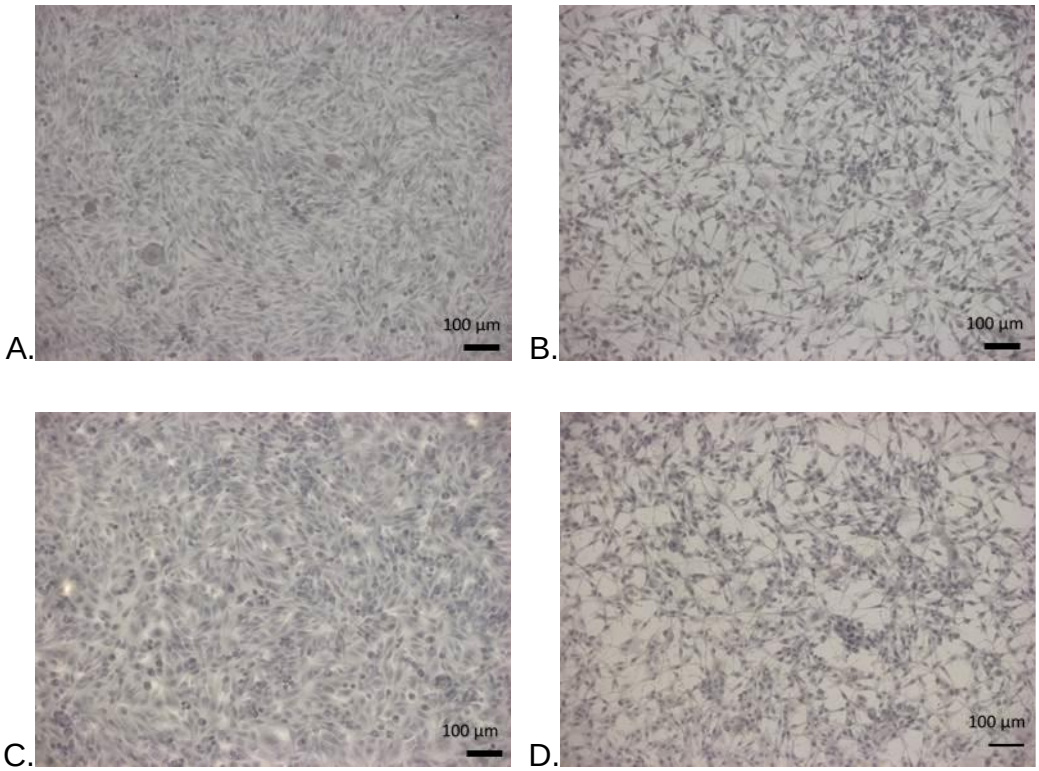
D. 

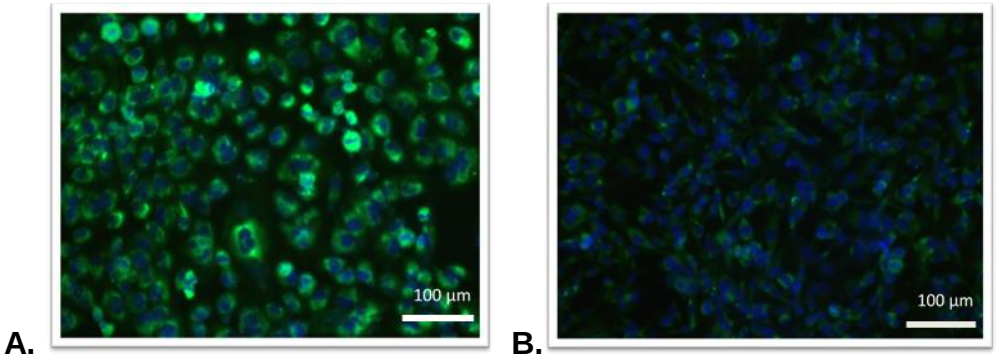
Figura 28. Imunohistoquimica controles negativos para U251MG e U87MG, revelado por DAB. **(A-B)** Controle negativo anti- camundongo. **(C-D)** Controle negativo anti-coelho.



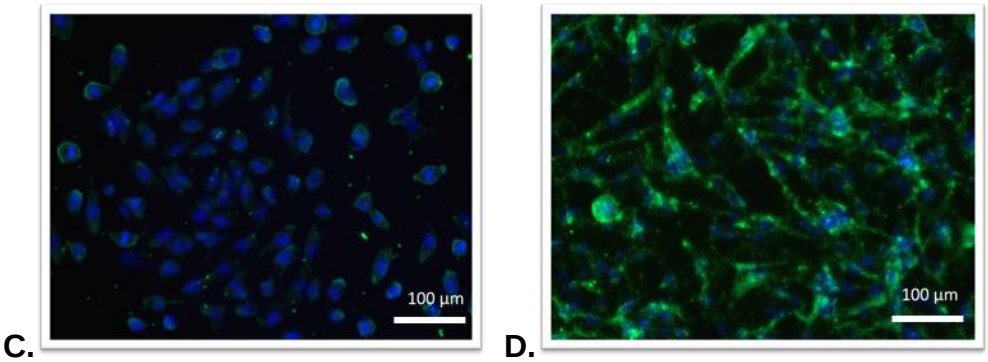
Figuras 29. Imunofluorescência para Colágeno Tipo IV, Fibronectina para U87MG e U251MG. (A-B) Imunodetecção para colágeno tipo IV. (C-D) Imunodetecção para FN.

U251MG **U87MG**

Colágeno Tipo IV



Fibronectina

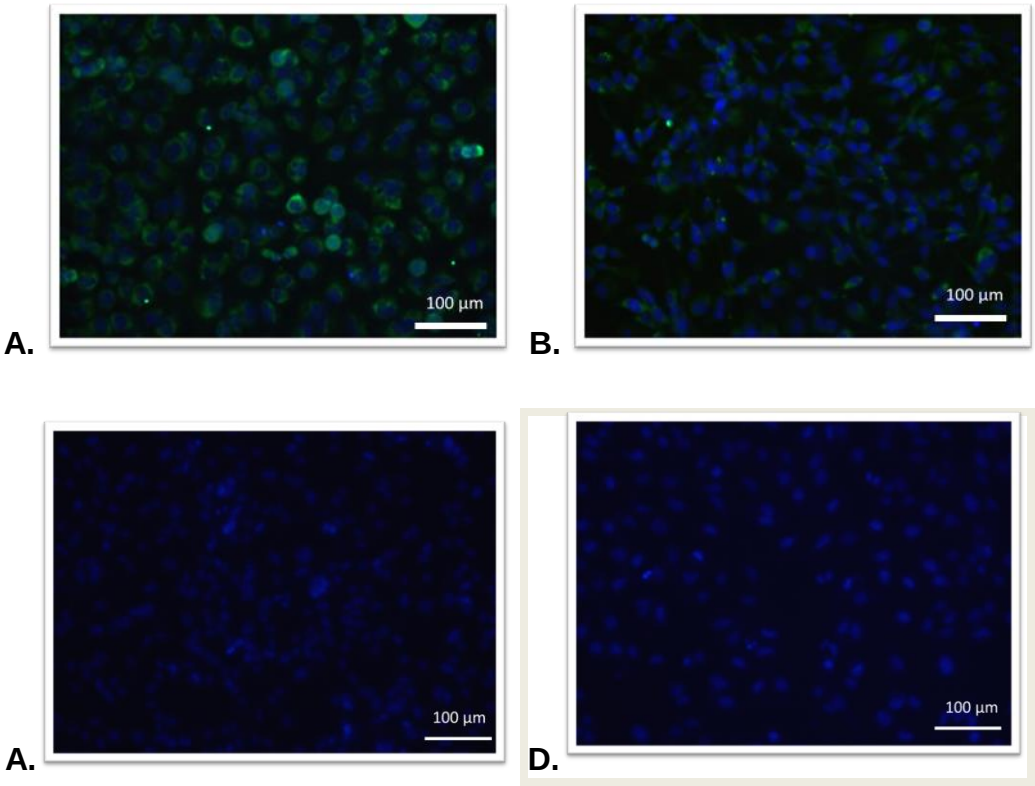


Imunofluorescência para Colágeno tipo IV em verde (Alexa 488) para U87MG e U251MG. Uma imunomarcação mais intensa para U251MG. Imunofluorescência para fibronectina em verde (Alexa 488) para U87MG e U251MG. Uma imunomarcação mais intensa para U87MG e com núcleos marcados em azul (Hoechst 33342).

Figuras 30. Imunofluorescência para Laminina. **(A-B)** Imunodetecção para laminina. **(C-D)** controle negativo.

U251MG **U87MG**

Laminina



Imunofluorescência para Laminina (Alexa 488) para U87MG e U251MG. Em comparação entre duas linhagens é possível notar uma intensidade na expressão de laminina nas células de U251MG. Os controles negativos com núcleos marcados em azul (Hoechst 33342).

4.7 Western Blot

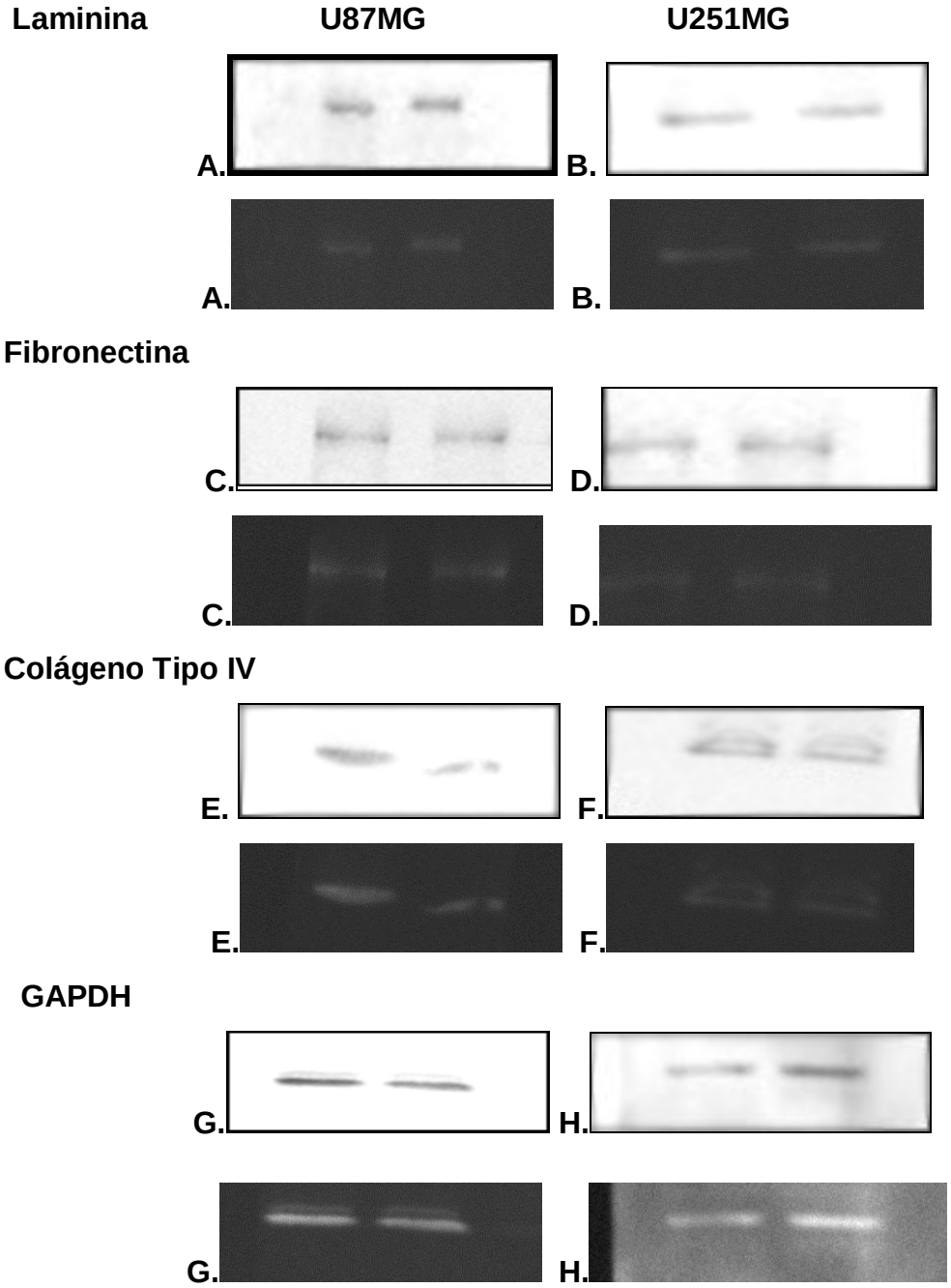
Os experimentos de *Western Blot* (WB) foram realizados com as células de U87MG e U251MG e observamos a expressão proteica das moléculas analisadas tanto da MEC como para as moléculas de adesão.

As células foram semeadas em garrafas de 75cm^2 contendo 2x10^4 cél/poço para U251MG e 3x10^4 cél/poço para U87MG separadamente e foram cultivadas por 3 dias. No terceiro dia as células foram tripsinizadas e prosseguiu- se para extração proteica e feito todo procedimento do protocolo para WB, conforme explicado anteriormente em materiais e métodos.

Tabela 6. Decrição dos anticorpos utilizados em *Western Blot* e suas concentrações padronizadas.

Anticorpo Primário	Concentração	Anticorpo Secundário
Anti – Colageno tipo IV	1:1000	Anti coelho
Anti – laminina	1:1000	Anti coelho
Anti – Vitronectina	1:2000	Anti camundongo
Anti – Fibronectina	1:1000	Anti coelho
Anti – integrina αv	1:1500	Anti coelho
Anti – integrina α3	1:1000	Anti camundongo
Anti – integrina α5	1: 2000	Anti camundongo
Anti – Integrina β1	1:5000	Anti coelho
Anti – Integrina β3	1:1000	Anti coelho
GAPDH	1:1000	Anti cabra

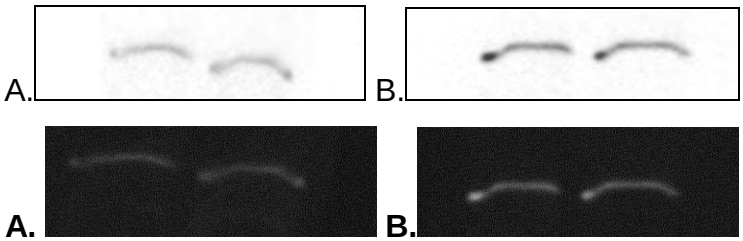
Figura 31. Análise da expressão proteica das moléculas da MEC, nas linhagens U87MG e U251MG.



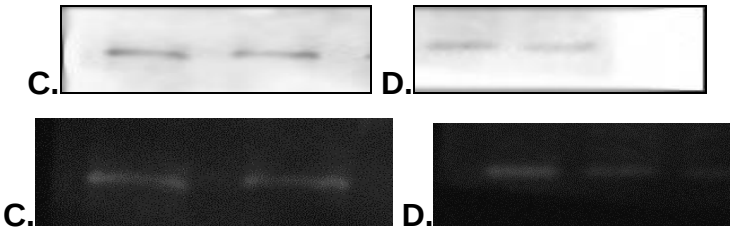
Imagens com fundo branco é o padronizado para analise de WB. Imagens capturadas com quimioluminescente G-Box, com fundo preto.

Figura 32. Análise da expressão proteica das moléculas de adesão, nas linhagens U87MG e U251MG.

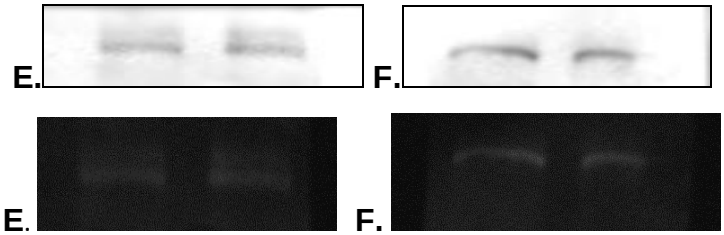
Integrina α_v **U87MG** **U251MG**



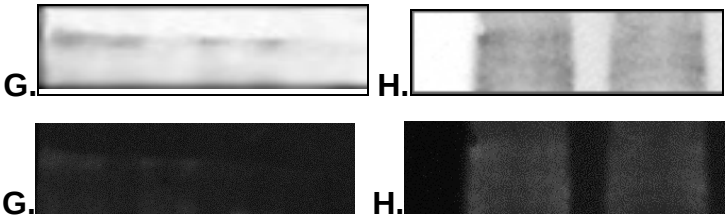
Integrina α_3



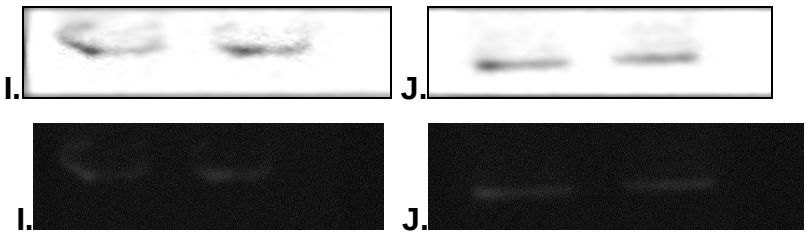
Integrina α_5



Integrina β_1



Integrina β_3



Imagens com fundo branco é o padronizado para analise de WB. Imagens capturadas com quimioluminescente G-Box, com fundo preto

4.8 Migração em *Transwell*

Para avaliar a influência de PGE_2 e Ibuprofeno sobre a migração celular utilizamos o ensaio de migração em transwell.

As células foram semeadas com os respectivos valores $2x10^4$ cél/poço para U251MG e $3x10^4$ cél/poço para U87MG, em placas de 24 poços e tratadas por 48 horas com as respectivas drogas estudadas (PGE_2 e Ibuprofeno). As células receberam as doses estipuladas anteriormente, na concentração de 10µM para prostaglandina E_2 e 25 µM de Ibuprofeno, em 48 h.

No grupo tratado com PGE_2 os resultados em migração de *transwell* mostraram um aumento da migração, em ambas as linhagens comparadas aos seus respectivos grupos controles (DMSO e CN).

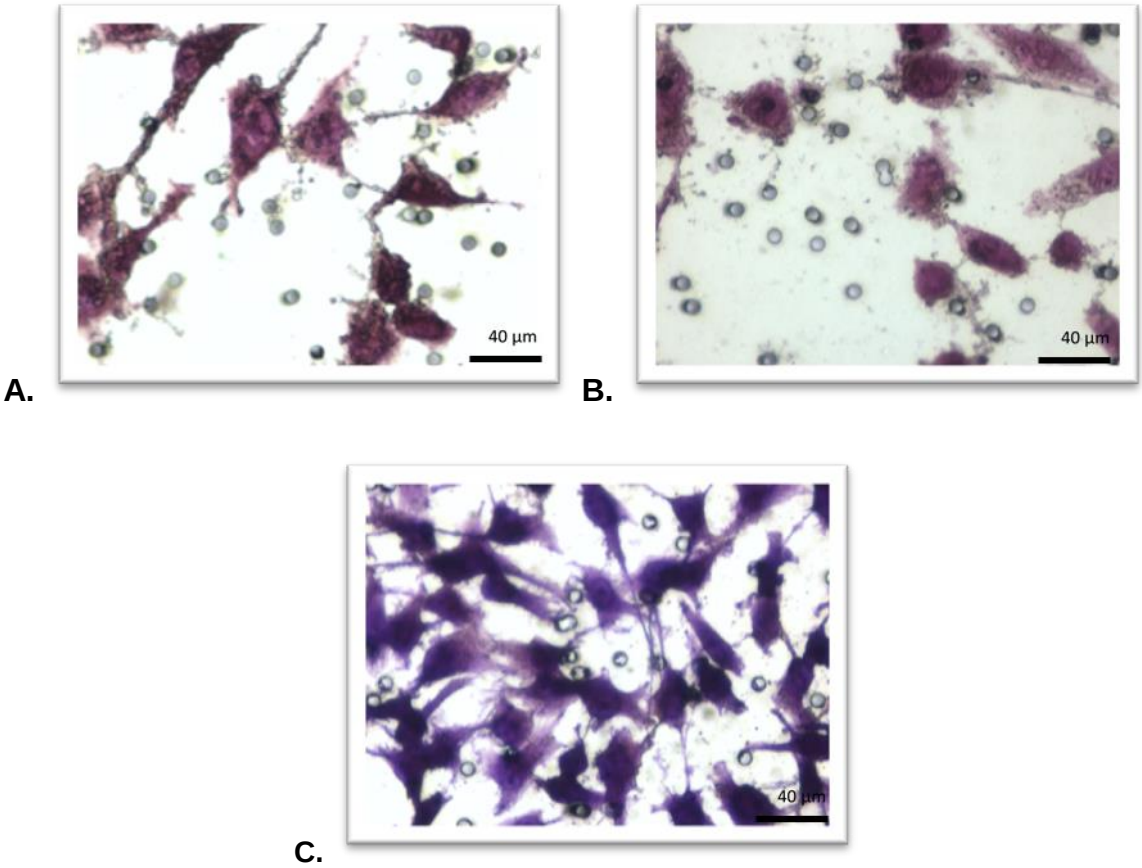
Para o grupo tratado com Ibuprofeno houve uma redução da migração nas linhagens de gliomas estudadas, em comparação aos seus respectivos grupos controles (Etanol e CN).

4.8.1 Migração em Transwell tratadas com PGE_2 (U87MG e U251MG)

As células U87MG que receberam tratamento com PGE_2 na concentração de 10 µM (Figura 33C) sofreram um aumento na migração celular de 49% em comparação ao grupo controle CN (Figura 33A) e de 52% em comparação ao grupo controle tratado com DMSO (Figura 33B).

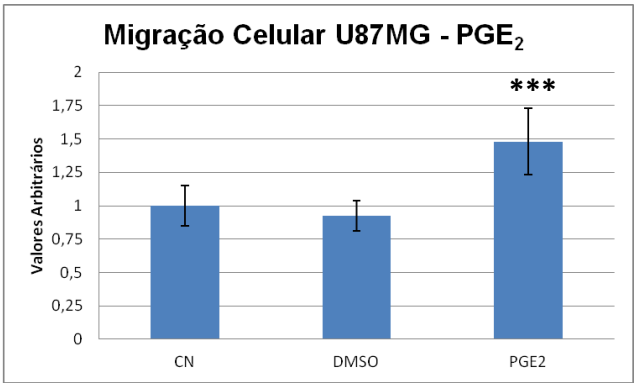
As células U251MG que receberam o tratamento de PGE_2 exógeno (Figura 35C) sofreram um aumento na migração celular de 63% em comparação ao grupo controle sem tratamento (CN) (Figura 35A) e de 67% em comparação ao grupo controle de DMSO (Figura 35B). Para ambas as linhagens os resultados foram significativos onde ***$p<0,001$ (Figuras 34 e 36).

Figura 33. Efeito da PGE_2 na migração em transwell em celulas U87MG A) Migração sem tratamento (CN). B) Migração tratada com DSMO C) Migração tratada com PGE_2.



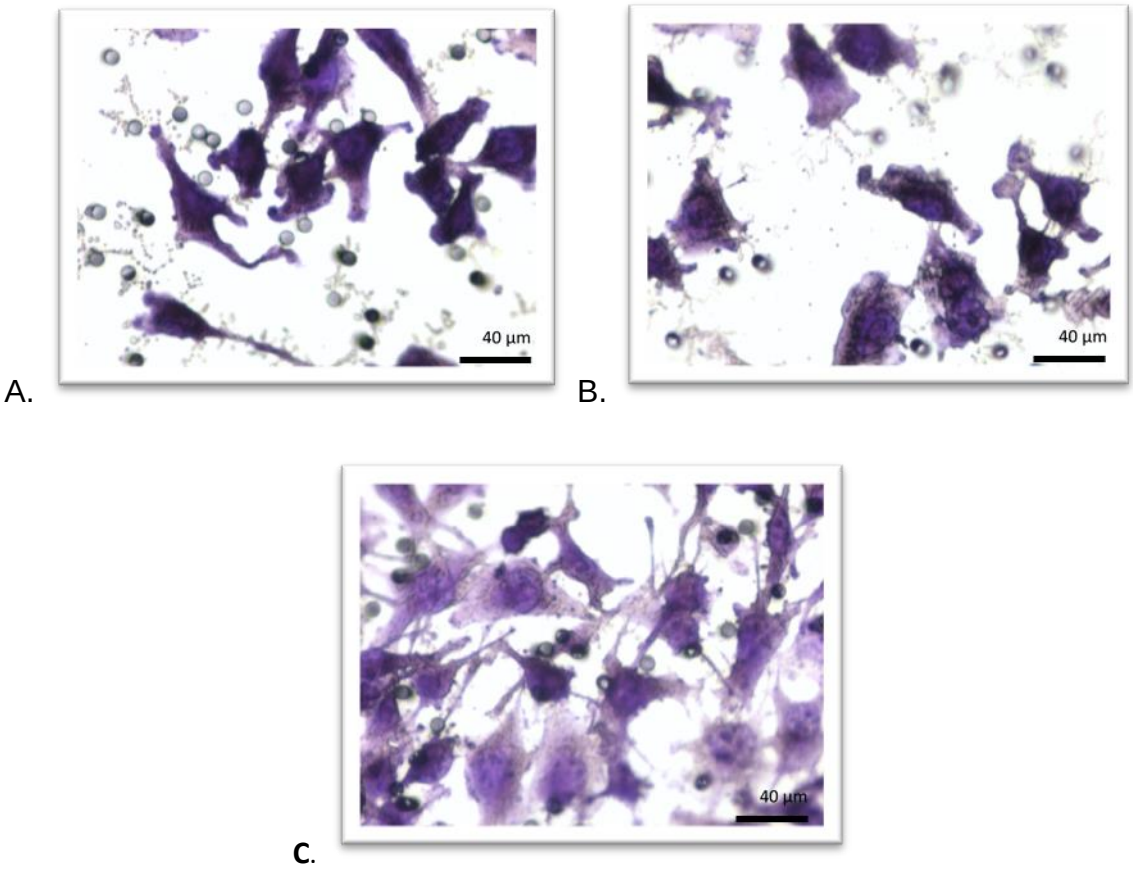
A migração foi corada com Cristal de Violeta em celulas sem tratamento (CN) e tratadas com DMSO (10 µM) e PGE_2 (10 µM) por 48 h. Escala 20 µm.

Figura 34. Número de células que migraram recebendo o tratamento com PGE_2



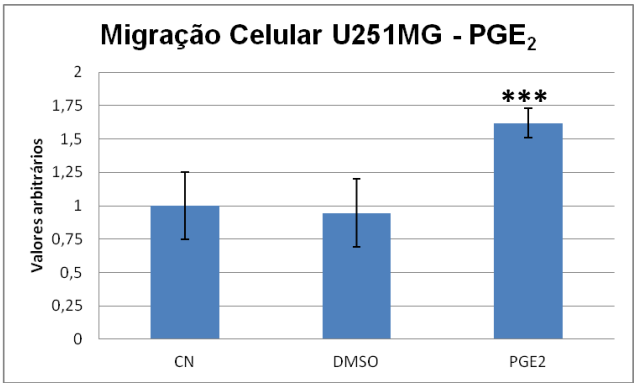
*** p<0,001 em relação ao grupo controle n=3 e cada experimento realizado em quadruplicata

Figura 35. Efeito da PGE_2 na migração em transwell em celulas U251MG. A) Migração sem tratamento (CN). B) Migração tratada com DMSO. C) Migração tratada com PGE_2.



Migração corada com Cristal Violeta em celulas sem tratamento (CN) e tratadas com DMSO (10 µM) e PGE_2 (10 µM) por 48 h.

Figura 36. Número de células que migraram recebendo o tratamento de PGE_2 ,



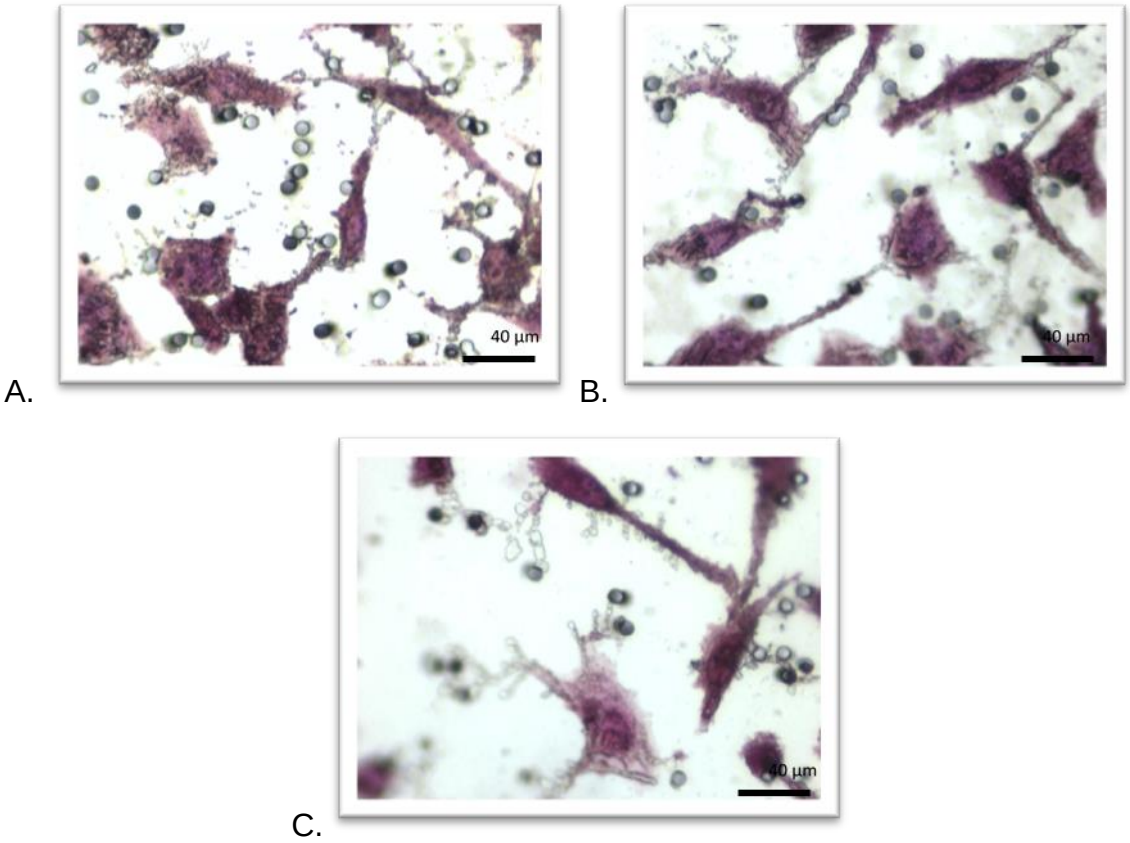
. ***p<0,001 em relação ao grupo controle n=3 e cada experimento realizado em quadruplicata.

4.8.2 Migração em Transwell tratadas com Ibuprofeno (U87MG e U251MG)

As células U87MG (Figura 37C) que receberam tratamento com Ibuprofeno na concentração de 25 µM apresentaram uma redução na migração celular de 43% em comparação ao grupo controle CN (Figura 37A) e de 41% em comparação ao grupo do etanol (Figura 37B).

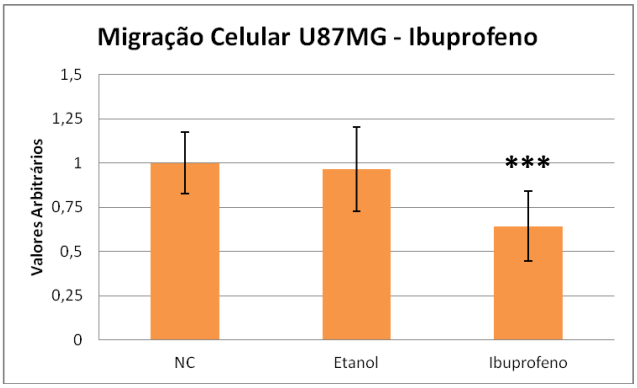
As células U251MG que receberam o tratamento com Ibuprofeno (Figura 39C) sofreram uma redução 46% na migração celular em comparação ao grupo controle sem tratamento (CN) (Figura 39A) e de 47% em comparação ao grupo controle de etanol (Figura 39B). Para ambas as linhagens os resultados foram significativos onde ***$p<0,001$ (Figuras 38 e 40).

Figura 37. Efeito da Ibuprofeno na migração em transwell em celulas U87MG. A) Migração sem tratamento (CN). B) Migração tratada com etanol. C) Migração tratada com Ibuprofeno.



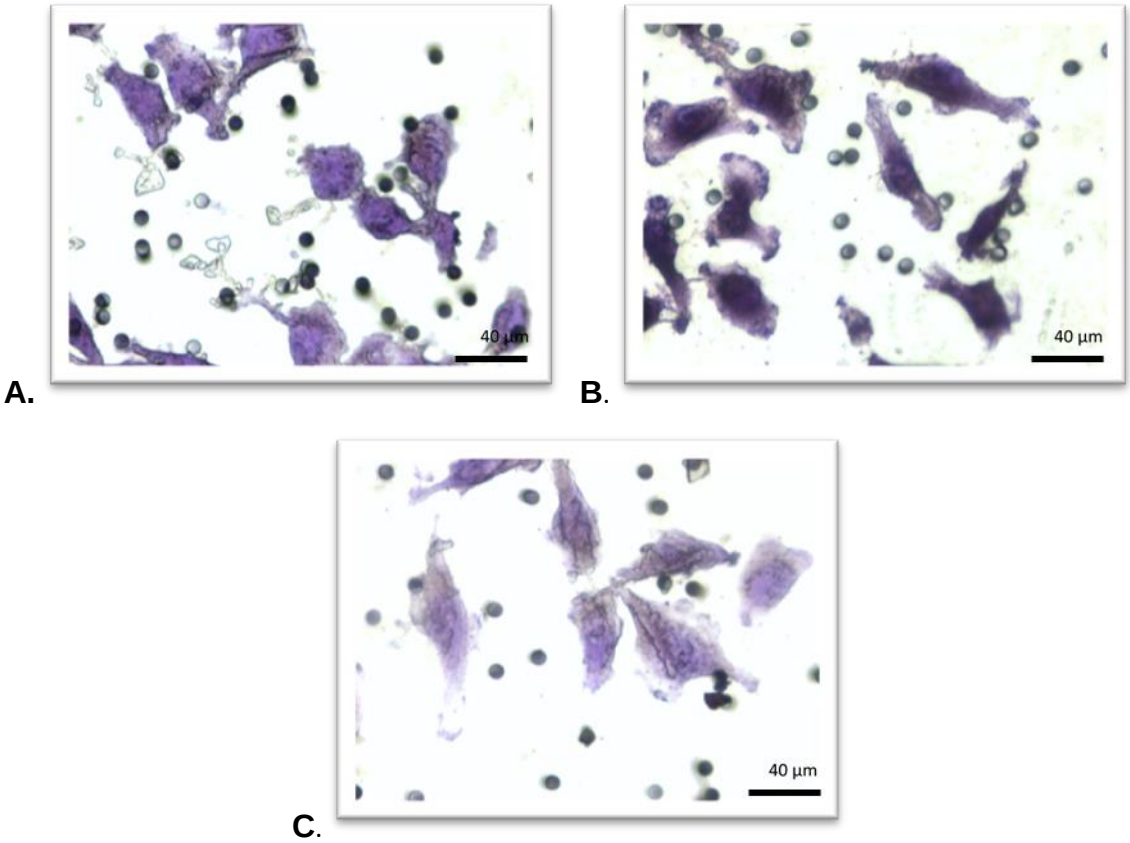
Migração corada com Cristal Violeta em celulas sem tratamento (CN) e tratadas com etano (25 µM) e Ibuprofeno (25 µM). Escala 20 µm.

Figura 38. Número de células que migraram recebendo o tratamento com Ibuprofeno.



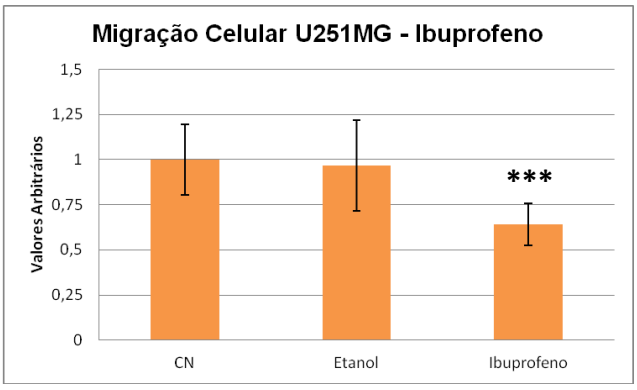
***p<0,001 em relação ao grupo controle n=3 e cada experimento realizado em quadruplicata.

Figura 39.. Efeito da Ibuprofeno na migração em transwell em celulas U251MG. A) Migração sem tratamento (CN). B) Migração tratada com etanol. C) Migração tratada com Ibuprofeno.



Migração corada com Cristal Violeta em celulas sem tratamento (CN) e tratadas com etanol (25 µM) e Ibuprofeno (25 µM). Escala 20 µm.

Figura 40. Número de células que migraram recebendo o tratamento com Ibuprofeno



***p<0,005 em relação ao grupo controle n=3 e cada experimento realizado em quadruplicata.

5 DISCUSSÃO

O glioblastoma multiforme é um dos tumores mais agressivos e apresenta os piores prognósticos devido a sua alta mortalidade. Os pacientes portadores desse tumor possuem uma sobrevida de doze a quinze meses, após o diagnóstico. A terapêutica convencional direciona esses pacientes a ressecção cirúrgica e quimioterapia, mas a eficiência desses tratamentos é marcadamente reduzida. Portanto, novas terapias fazem-se necessárias (Wen, Kesari, 2008; Westphal, Lamszus, 2011).

Os astrocitomas malignos e GBM apresentam uma nítida preferência para migrar ao longo dos vasos sanguíneos, devido a presença de MEC (composta por colágenos tipo IV e glicoproteínas adesivas), levando a proliferação tumoral e o crescimento invasivo no interior do cérebro. Sua ressecção cirúrgica completa é quase impossível devido à disseminação de suas células por todo o encéfalo, porém as metástases extracranianas são extremamente raras em torno de ~0,1-0,5% (Brandes et al., 2008; Lun et al., 2010; Omuro, DeAngelis, 2013).

Estudos anteriores demonstraram que alguns antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) são capazes de inibir a migração e a proliferação tumoral em gliomas (Kardosh et al., 2004; Sheng et al., 2001). Trabalhos com células T98G de glioma humano têm mostrado que alguns AINEs (Aspirina, Indometacina e Ibuprofeno) reduziram de forma significativa a proliferação tumoral e a capacidade invasiva dessas células (Amim et al., 2003; Gomes, Colquhoun, 2012). Essa capacidade que os AINEs possuem de estimular a apoptose e de inibir a angiogênese faz desses fármacos importantes candidatos para suprimir transformações malignas e diminuir o crescimento de tumores.

Nossos resultados mostram que células da linhagem U251MG tratadas com Ibuprofeno inibiu numa concentração de 25 µM em 48 h de tratamento reduzem o crescimento celular em 38,5%. Nas concentrações de 50 µM, 75 µM e 100 µM, as taxas de inibição foram 48,3%, 54,9% e 72,5% respectivamente. Isso é explicado pelo fato que o Ibuprofeno é um inibidor não seletivo para COX-1 e/ou COX-2 que reduz a produção de prostaglandina E_2, a qual está relacionada com a proliferação, migração e invasão tumoral (Scheurer et al., 2008; Sivak-Sears et al., 2004).

Para as células U87MG tratadas com Ibuprofeno, nossos resultados mostram uma redução no crescimento celular de 37,5% na concentração de 25 µM em 48 h

de tratamento. Nas concentrações de 50 µM, 75 µM e 100 µM, as taxas de inibição foram de 66,4%, 70,3% e 81,5%. Outros AINE´S como indometacina e naproxeno apresentaram uma redução na proliferação celular, contudo o Ibuprofeno foi que apresentou a melhor resposta da inibição do crescimento celular em U87MG (Onguru et al., 2008).

A utilização de medicamentos de fácil acessibilidade em pesquisa experimental é bastante animadora, por apresentar uma resposta positiva inibindo a progressão tumoral. Contudo pouco se conhece dos efeitos desse fármaco em tumores do SNC.

Como mencionado antes a PGE_2 está relacionada ao desenvolvimento tumoral, auxiliando na migração, invasão e proliferação. Estudos recentes relacionam a presença de altos níveis de PGE_2 em tumores malignos, por exemplo em colón retal, próstata e gliomas (Brandes et al., 2008; Jain et al., 2008; Wang et al., 2007).

Nossos resultados mostram que U87MG e U251MG, tratadas com PGE_2 exógeno, apresentam um aumento do crescimento celular, reforçando a ideia de que esse prostanoide influencia as células tumorais. Pesquisas recentes mostram que diversos processos importantes para a progressão tumoral, como a migração, apoptose e proliferação, foram afetados positivamente nas células T98G tratadas com PGE_2 exógeno (Gomes, Colquhoun, 2012).

A prostaglandina E_2 é um importante eicosanoide que está diretamente envolvida no desenvolvimento do tumor. Um fato importante é compreender como a PGE_2 afeta esses mecanismos. A migração celular, por exemplo, necessita de uma matriz extracelular para que ocorra essa locomoção. Desse modo é importante verificar se a adição de PGE_2 ou a inibição das ciclooxigenases afetam a produção de moléculas da MEC em tumores, principalmente nos gliomas.

Diversos pesquisadores têm tentado explicar a falta de disseminação de gliomas fora do cérebro, porém nenhum deles ainda identificou a deficiência do mecanismo molecular subjacente. Alguns estudiosos relatam que as diferenças no meio extracelular entre o cérebro e outros tecidos podem desempenhar um papel neste processo biológico. Algumas hipóteses são levantadas, afirmando que é a especificidade das interações entre os receptores de superfície de células tumorais e com os componentes da matriz extracelular são importantes para viabilidade tumroral (Öz et al., 2000).

A matriz extracelular é de uma importância fundamental na migração e invasão celular, em gliomas apresenta um papel importante no desenvolvimento do tumor (Zamecnik, 2005). O GBM sintetiza sua própria MEC, contudo por sinais tumorais pode induzir outras células do estroma do cérebro a produzir essas macromoléculas, induzindo uma remodelação do microambiente local adequada para sua sobrevivência (Chintala et al., 1996, Zamecnik, 2005).

No presente estudo mostramos à expressão gênica das moléculas envolvidas na migração celular. Foram analisadas a expressão RNAm de moléculas da MEC e as moléculas de adesão em ambas as linhagens celulares sob dois tratamentos, com PGE_2 e Ibuprofeno. Não foi observada diferença significativa entre os controles e seus respectivos tratamentos pela técnica da reação em cadeia da polimerase convencional.

Contudo observamos uma tendência de aumento da expressão das moléculas da MEC quando tratadas com PGE_2, em ambas as linhagens celulares. O tratamento com Ibuprofeno apresentou uma diminuição da expressão dos RNAms estudados. Por isso foi repetido com as mesmas amostras a técnica de PCR em tempo real e algumas moléculas apresentaram resultados mais significativos.

A expressão gênica das moléculas da MEC e de adesão celular por PCR em tempo real revelou que os tratamentos influenciaram algumas das proteínas estudadas. Reafirmando o que foi mostrado por PCR convencional, todas as moléculas foram expressas e na maioria dos casos apresentaram diferenças significativas em comparação com seus respectivos controles.

Para o tratamento com prostaglandina E_2 (10 µM), as células U87MG obtiveram um aumento na expressão gênica de algumas moléculas como fibronectina, laminina γ_1 e as integrinas α_v, α_3 e α_5. Essas macromoléculas de matriz representam, *in vivo,* um substrato adequado para migração e proliferação de diversas células tumorais (gliomas e meningiomas) e astrócitos reativos (Caffo et al., 2004; Sheppard et al., 1996).

Nossos estudos apontam que a PGE_2 aumentou significativamente a expressão de FN e LN, importantes moléculas envolvidas na migração e invasão tumoral. Outros trabalhos apontam que a expressão de FN e LN é aumentada em gliomas malignos e que nesses tumores sintetizam uma grande quantidade de PGE_2 (Wang, DuBois, 2010; de Groot, Sontheimer, 2011; Öz et al., 2000; Seres et al., 2013; Ulrich et al., 2009).

A fibronectina e a laminina interagem com as células através dos receptores de matriz, as integrinas, principalmente as subunidades $\alpha_v\beta_1$ (FN) e $\alpha_3\beta_1$ (LN). Verificamos um aumento na expressão das subunidades α_v e α_3 quando tratadas com PGE_2, correlacionando com nossos resultados de expressão gênica das moléculas da MEC.

O tratamento com Ibuprofeno (25 µM) nas células U87MG causou uma redução na expressão gênica de algumas moléculas da MEC: em 62% para FN e 54% para laminina γ_1, e também para as moléculas de adesão como as integrinas α_v (48%) e α_3 (68%).

Como foi dito anteriormente o Ibuprofeno é um inibidor não seletivo de COX, que reduz a produção de PGE_2. Sugerimos que nas células U87MG a produção de algumas moléculas da MEC, está relacionada com o nível de prostaglandina E_2 nas células tumorais.

Estudos com células tumorais de colón retal têm mostrado que a expressão da COX-2 contribui para o potencial tumorigênico, por aumentar sua adesão à matriz extracelular e adquirindo resistência à apoptose, aumentando a viabilidade tumoral. Tais alterações foram reversíveis com a associação de inibidores COX-2 (Dubois et al., 1998; Dubois et al., 1996).

A laminina γ_1 tratada com Indometacina (AINEs) reduziu a expressão dessa proteína em linhagens de gliomas como A172, T98G, U87MG e U373MG. Além disso, na linhagem U87MG tratada com indometacina reduziu a capacidade invasiva tumoral (Ishibashi et al., 2005). Nossos resultados com Ibuprofeno mostraram que o perfil transcricional da laminina γ_1 foi reduzido nas células U87MG após o tratamento de 48 h. Assim observamos que o Ibuprofeno foi capaz de causar uma modificação tempo-dependente na expressão gênica das moléculas da MEC, como por exemplo na LN, nas células U87MG.

As células U251MG que receberam os tratamentos de Ibuprofeno e PGE_2 observaram uma alteração na expressão gênica das moléculas da MEC, principalmente para FN e colágeno tipo IV. Houve também alterações nas moléculas de adesão como as integrinas α_v, α_3 e β_1.

Observamos um aumento de 68% na expressão de RNAm de FN, quando tratadas com PGE_2 exógena em comparação ao grupo controle DMSO. Estudos recentes indicam que a FN é fundamental na progressão tumoral em esferoides

formados de células U87MG e observaram que a inibição do RNAm de FN reduziu a migração e invasão tumoral (Seres et al., 2013).

A fibronectina é uma importante glicoproteína adesiva que tem um importante papel no processo de invasão nos gliomas. Alguns autores reforçam a ideia de que em substrato de FN linhagens de glioma apresentam altos índices de invasão e migração celular. Outros estudos mostraram que a redução de FN permite a redução da progressão tumoral, em gliomas (Bouterfa et al., 1999; Mahesparan et al., 2003; Sengupta et al., 2010; Wang et al., 2005).

Nossos dados demonstram que a FN está presente em ambas as linhagens de gliomas estudadas e o tratamento com Ibuprofeno reduziu significadamente o nível de RNAm.

Para colágeno tipo IV observamos uma redução na expressão de RNAm para as células tratadas com Ibuprofeno, em relação ao grupo controle com etanol (52%) e CN (54%). Em nossos estudos, tanto em imunofluorescência como para WB, o colágeno tipo IV foi expresso na linhagem U251MG. Alguns autores correlacionam a presença de COLIV em gliomas com aumento na migração e invasão tumoral (Payne, Huang, 2013).

O atual estudo revelou por imunohistoquímica, que células de glioma humano U87MG e U251MG, sintetizam alguns componentes da MEC como a fibronectina, laminina, colágeno tipo IV e vitronectina. Foram relatados por diversos autores que *in vivo* esses componentes da MEC, estão localizados na região da borda infiltrativa do tumor e ao redor de vasos sanguíneos.

Como relatado anteriormente a matriz extracelular desempenha um papel importante em diversas funções celulares, seja em processos patológicos ou na homeostasia celular. Em gliomas a MEC é responsável por fornecer um microambiente adequado para a invasão e a migração tumoral. Algumas moléculas da matriz extracelular são encontradas em grande quantidade nas linhagens celulares estabelecidas de gliomas e também em modelos *in vivo*.

A fibronectina é uma glicoproteína adesiva encontrada na membrana basal dos tecidos, a imunodetecção em gliomas foi estabelecida no inicio da década de 80. Diversos autores afirma que células de glioma humano imersas em um substrato de FN, aumenta a velocidade migratória e de dispersão tumoral (Sabari et al., 2011).

Nossos estudos indicam que a FN está presente em ambas às linhagens celulares estudadas e por imunofluorescência (Figura 29C-D) observamos uma

maior deposição da proteína nas células U87MG. Confirmamos a presença de FN através da técnica de biologia molecular *Western Blot* (Figuras 31C-D).

Para colágeno tipo IV, observamos uma imunomarcação para as células U251MG e *U87MG*. Contudo, observamos por imunofluorescência que na linhagem U251MG a deposição de COLIV é intensa e sendo confirmada a expressão proteica das ambas linhagens por *Western Blot* (Figura 31E-F). Diversos estudos evidenciam a expressão de colágeno tipo IV em esferoides de células de gliomas e em estudo *in vitro* com linhagens estabelicidas (Bellon et al., 1985; Chintala et al., 1996, Chintala, Rao, 1996).

A molécula de vitronectina (VN) expressou RNAm em ambas linhagens contudo não apresentou uma imunomarcação quando utilizada a técnica de Imunoflorescência. Em trabalhos realizados no nosso grupo de pesquisa com células C6, a vitronectina expressou fracamente no citoplasma e não houve marcação na região extracelular (Ramos, 2007). E outros autores citam que as células U251MG não expressam VN quando injetadas em camundongos e as celulas A172 e T98G apresentaram resultados positivos na migração quando semeadas no substrato de VN (Fukushima et al., 2007; Gladson, Cheresh, 1991). Porém estudos anteriores do laboratório relatam que em *in vivo*, essa molécula é expressada na borda infiltrativa do tumor(Ramos, 2007).

A expressão proteica para as moléculas de adesão, as integrinas foram todas confirmadas pela técnica de biologia molecular *Western Blot*. Todas as moléculas de adesão estudadas foram confirmadas, nas ambas linhagens U87MG e U251MG (Figuras 32 A-H).

Nossos dados por imunohistoquimica confirma a expressão proteica das moléculas percussoras de PGE_2, uma forte imunomarcação para COX-1 (Figuras 26A-B), COX-2 (Figuras 26C-D) e as enzimas sintases cPGES, mPGES-1 e mPGES-2.

A migração celular é um evento presente em diversas funções celulares como no desenvolvimento embrionário, na homeostase celular, na cicatrização de feridas, e em outros estados patológicos, como o processo de invasão celular e formação de metástase em câncer (Hurd et al., 2011). A agressividade dos gliomas está associada à rápida proliferação celular e alta capacidade de invasão de suas células, processo no qual a migração é crucial (Huse et al., 2013).

Estudos clínicos apontam que o uso de AINEs, inibidores não seletivos de COX-1 e COX-2, podem diminuir os riscos de tumores em gerais, incluindo os gliomas (Scheurer et al., 2008; Sivak-Sears et al., 2004). Em níveis elevados, as prostaglandinas, particularmente PGE_2, estão associadas ao avanço do grau de malignidade do tumor e a pobre taxa de sobrevivência dos pacientes (Perdiki et al., 2007; Shono et al., 2001).

Estudos *in vitro* mostram que o tratamento com Ibuprofeno foi capaz de inibir significativamente a migração celular em T98G de gliomas humanos (Gomes, Colquhoun, 2012). Assim como, o tratamento com Ibuprofeno também foi capaz de reduzir a migração celular em células de melanoma (Redpath et al., 2009). Em gliomas o uso do AINE indometacina, também inibiu o processo de migração nas linhagens celulares de glioma humano A172, U87MG, U251MG e U373MG (Wang et al., 2005).

Tais estudos dão suporte aos resultados dessa pesquisa, os tratamentos na linhagem de GBM U87MG inibiram a migração celular em 43% quando tratadas em *transwell* por 48 horas com Ibuprofeno e para as células U251MG foi de 46% quando tratadas com Ibuprofeno, inibidor não específico de COX.

O tratamento com PGE_2 exógeno, as células U87MG responderam com um aumento, na migração celular, de 49% quando comparada ao controle normal (CN), de 52% quando comparado ao grupo DMSO . As células U251MG o aumento na migração foi de 63%, comparando ao grupo CN e de 67% comparado ao grupo DMSO.

Esses dados corroboram com os estudos apresentados acima, e apontam que a inibição das enzimas COX-1 e COX-2, responsáveis pela síntese das prostaglandinas, inibem significativamente a migração celular nas linhagens de glioma humano U251MG e U87MG.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão nossos resultados mostraram que após o tratamento com PGE_2 e com Ibuprofeno as células U87MG e U251MG expressaram modificações nas moléculas da matriz extracelular e de adesão. Além disso os tratamentos aplicados no estudo alterou a migração celular das células de gliomas.

As prinicipais conclusões extraídas desse estudo foram:

- Observamos por imunohistoquimica a expressão das moléculas da MEC: colágeno tipo IV, laminina γ_1, fibronectina e vitronectina em linhagens U87MG e U251MG;

- Foi confirmada o perfil transcricional por PCR em tempo real das moléculas da MEC (FN, LN, COL4 e VN) e de adesão, as integrinas α_v, α_3, α_5, β_1 e β_3, confirmada a expressão proteica por *Western Blot* em células U87MG e U251MG de gliomas humanos.

- Foi observada na curva de dose-resposta para PGE_2, diferença significativa na quantidade de células entre os grupos que receberam tratamentos com prostaglandina E_2 e seus respectivos controles DMSO e controle sem tratamento (CN), para as linhagens U87MG e U251MG;

- Foi observada na curva de dose-resposta para Ibuprofeno, diferença significativa na quantidade de células entre os grupos que receberam tratamentos com IBU e seus respectivos controles etanol e controle sem tratamento (CN), para as linhagens U87MG e U251MG;

- Nas células U87MG, obsevamos uma redução da expressão do RNAm das móleculas da MEC e de adesão: fibronectina, laminina γ_1 e as integrinas α_V, α_3 e α_5, após o tratamento de 48 h com Ibuprofeno. E também um aumento expressão do RNAm para laminina γ_1, FN e as integrinas α_V, α_3 e α_5, após o tratamento com PGE_2 exógeno em 48 h.

- Nas células U251MG observamos uma redução no perfil transcricional por PCR em tempo real uma redução na expressão das moléculas de colágeno tipo IV e as integrinas α_v, α_3 e β_1, após o tratamento de Ibuprofeno em 48 h. E

um aumento na expressão de RNAm nas moléculas de fibronectina e as integrinas α_v e α_3, após o tratamento com PGE_2 exógeno em 48 h.

- Nossos resultados observamos um aumento na migração celular após tratamento com PGE_2 exógeno em ambas linhagens, U87MG e U251MG. E uma redução da migração celular após o tratamento com Ibuprofeno em 48 h.

REFERÊNCIAS*

Aguiar CBNM, Lobão-Soares B, Alvarez-Silva M, Trentin AG. Glycosaminoglycans modulate C6 glioma cell adhesion to extracellular matrix components and alter cell proliferation and cell migration. BMC Cell Biology. 2005;6:31.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts T, Walter P. Mol. Biol. Cell. 4th ed. New York: Garland Publishing; 2002.

Amin R, Kamitani H, Sultana H, Taniura S, Islam A, Sho A, Ishibashi M, Eling TE, Watanabe T. Aspirin and indomethacin exhibit antiproliferative effects and induce apoptosis in T98G human glioblastoma cells. Neurol Res. 2003;25(4):370-6.

Alpuente LA, López AM, Tur RY. Glioblastoma: changing expectations? Clin Transl Oncol.2011;13:240-8.

Azuma, T., W. Witke, T.P. Stossel, J.H. Hartwig, and D.J. Kwiatkowski. Gelsolin is a downstream effector of rac for fibroblast motility. EMBO J. 1998.;17:1362–70.

Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, van Meir EG. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. Int. J. Biochem. Cell Biol.2004;36:1046–1069

Bellon G, Caulet T, Cam Y, Pluot M, Poulin G, Pytlinska M, Bernard MH. Immunohistochemical localization of macromolecules of the basement membrane and extracellular matrix of human gliomas and meningiomas. Acta Neuropathol 1985;66:245–252

Blume C, von Lehe M, van Landeghem F, Greschus S, Boström J. Extracranial glioblastoma with synchronous metastases in the lung, pulmonary lymph nodes, vertebrae, cervical muscles and epidural space in a young patient - case report and review of literature. BMC Res Notes. 2013; 25;6:290.

Bonneh-Barkay D, Wiley CA. Brain extracellular matrix in neurodegeneration. Brain Pathol. 2009;19:573-585

Bosman, FT, Stamenkovic I. Funcional structure and composition of the extracellular matrix. J. Pathol. 2003;200:423-8.

Bouterfa H, Darlapp AR, Klein E, Pietsch T, Roosen K, Tonn JC. Expression of different extracellular matrix components in human brain tumor and melanoma cells in respect to variant culture conditions. J Neurooncol. 1999;44(1):23-33.

Brambilla E. Expressão Imunohistoquimica da proteína ciclooxigenase-2 nas neoplasias colorretais. [dissertação (Mestrado)]. Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006. 86 f.

---

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org

Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Reni M, Gatta G, Vecht C, Glioblastoma in adults. Critical Reviews in Oncology/Hematology**.** 2008;67:139–52.

Caffo M, Germanò A, Caruso G, Meli F, Galatioto S, Sciacca MP, Tomasello F. An immunohistochemical study of extracellular matrix proteins laminin, fibronectin and type IV collagen in paediatric glioblastoma multiforme. Acta Neurochir (Wien). 2004;146(10):1113-8

Camacho M, León X, Fernández-Figueras MT, Quer M, Vila L. Prostaglandin E2 pathway in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Head Neck. 2008; 30:1175–81.

Célio MR, Spreafico R, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L. Perineuronal nets: past and present. Trends Neurosci. 1998; 21:510-5.

Chintala SK, Sawaya R, Gokaslan ZL, Rao JS. Modulation of matrix metalloproteinase-2 and invasion in human glioma cells by alpha 3 beta 1 integrin. Cancer Lett. 1996;103:201-8.

Chintala SK, Rao JK. Invasion of human glioma: role of extracellular matrix proteins. Front Biosci. 1996;1:d324-39.

Colquhoun A, Mello FEP, Curi R. Regulation of tumor cell fatty acid oxidation by n-6 polyunsaturated fatty acids. Biochimistry and Molecular Biology International.1998; 44:143-50.

D'Abaco GM, Kaye AH. Integrins: Molecular determinants of glioma invasion. Journal of Clinical Neuroscience. 2007;14:1041–8.

Dai C, Holland EC. Glioma Models. Biochimica et Biophysica Acta. 2001;1551:19-27.

de Groot J, Sontheimer H. Glutamate and the biology of gliomas. Glia. 2011 Aug;59(8):1181-9.

Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB J. 1998 Sep;12(12):1063-73.

Dubois RN, Giardiello FM, Smalley WE. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, eicosanoids, and colorectal cancer prevention. Gastroenterol. Clin. North. Am. 1996; 25:773-91.

DuBois RN, Gupta R, Brockman JA, Reddy BS, Karakow SL. The nuclear eicosanoid receptor, PPARg, is man bFGF-binding protein; GenBank/EMBL accession number aberrantly expressed in colonic cancers. Carcinogenesis.1998;19:49–53.

Eyden B, Tzaphlidou M. Structural variations of collagen in normal and pathological issues: role of electron microscopy. Micron. 2001;32:287-300.

Fukushima Y, Tamura M, Nakagawa H, Itoh K. Induction of glioma cell migration by vitronectin in human serum and cerebrospinal fluid. J Neurosurg. 2007;107(3):578-85.

Garavito RM, Mulichak AM. The structure of mammalian cyclooxygenases. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 2003; 32:183-206.

Giese A, Laube B, Zapf S, Mangold U, Westphal M. Glioma cell adhesion and migration on human brain sections. Anticancer Res. 1998;18:2435-48.

Gladson CL, Cheresht DA. Glioblastoma Expression of Vitronectin and the αv/ß3 Integrin. Adhesion Mechanism for Transformed Glial Cells. J. Clin. Invest**.** 1991; 88:1924-32.

Goldbrunner RH, Bernstein JJ, Plate KH, Vince GH, Roosen K, Tonn JC. Vascularization of human glioma spheroids implanted into rat cortex is conferred by two distinct mechanisms. Journal of Neuroscience Research. 1999;55:s 486–95.

Gomes RN, Colquhoun A. E series prostaglandins alter the proliferative, apoptotic and migratory properties of T98G human glioma cells in vitro. Lipids Health Dis. 2012;11:171.

Gritsenko PG, Ilina O, Friedl P. Interstitial guidance of cancer invasion. J Pathol. 2012;226:185–99.

Günther W, Skaftnesmo KO, Arnold H, Terzis AJA. Molecular approaches to brain tumour invasion. Acta Neurol. 2003;145**:**1029-36.

Guo W, Giancotti FG**.** Integrin signalling during tumour progression. Nat. Rev**.** Mol. Cell Biol*.* 2004;5:816-26.

Hagg T, Portera-Cailliau C, Jucker M, Engvall E. Laminins of the adult mammalian CNS; laminin-alpha2 (merosin M-) chain immunoreactivity is associated with neuronal processes**.** Brain Res. 1997;764:17–27.

Han S, Sidell N, Roser-Pager S, Roman J. Fibronectin stimulates human lung carcinoma cell growth by inducing cyclooxygenase-2 (COX-2) expression. Int J Cancer. 2004; 111:322–31.

Hatton GI. Dynamic neuronal-glial interactions: an overview 20 years later. Peptides. 2004;25:403-411

Hinz B, Brune K. Cyclooxygenase-2--10 years later. J Pharmacol Exp Ther. 2002; 300:367-75.

Horwitz A, Duggan K, Buck C, Beckerle MC, Burridge K. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talina transmembrane linkage. Nature. 1986;320:531-3.

Hurd TR, Degennaro M, Lehmann R. Redox regulation of cell migration and adhesion. Trends Cell Biol. 2011;22:107-15.

Huse JT, Holland E, DeAngelis ML. Glioblastoma: Molecular Analysis and Clinical Implications. Annu Rev Med. 2013;64:17.1–12.

Ianzini F, Domann FE, Kosmacek EA, Phillips SL, Mackey MA: Human glioblastoma U87MG cells transduced with a dominant negative p53 (TP53) adenovirus construct undergo radiation-induced mitotic catastrophe**.** Radiat Res 2007;168(2)**:**183-192.

Ishibashi M, Bottone JGF, Taniura S, Kamitani H, Waranable T, Eling ET. The cyclooxygenase inhibitor indomethacin modulates gene expression and represses the extracellular matrix protein laminin γ1 in human glioblastoma cells. 2005;302(2):244-52.

Jain S, Chakraborty G, Raja R, Kale S, Kundu GC. Prostaglandin E2 regulates tumor angiogenesis in prostate cancer. Cancer Res. 2008;68:7750-9.

Jones JL, Walker RA. Integrins: a role as cell signaling molecules. Mol Pathol 1999;52(4):208-13.

Kardosh A, Blumenthal M, Wang WJ, Chen TC, Schönthal AH. Differential effects of selective COX-2 inhibitors on cell cycle regulation and proliferation of glioblastoma cell lines. Cancer Biol Ther. 2004;3(1):55-62.

Khan Z, Khan N, Tiwari R P, Sah NK, Prasad GB, Bisen PS. Biology of Cox-2: an application in cancer therapeutics. Curr Drug Targets. 2011:12-7:1082-93.

Kirkpatrick JP, Yin FF, Sampson JH. Radiotherapy and radiosurgery for tumors of the central nervous system. Surg Oncol Clin N Am. 2013;22(3):445-6.

Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. Mutat_Res. 2008. 659(1-2):15-30.

Louis DN, Holland EC, Cairncross GJ. Glioma Classification: A Molecular Reappraisal American Journal of Pathology. 2001;159:3.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P.; eds The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol. 2007;114:97–109.

Lun M, Lok E, Gautam S, Wu E, Wong ET. The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme. J Neurooncol. 2011; 105(2):261-73.

Mahesparan R, Read TA, Lund-Johansen M, Skaftnesmo KO, Bjerkvig R, Engebraaten O. Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. Acta Neuropathol.2003;105:49–57.

Mao Y, Schwarbauer J. Extracellular matrix: a mather of life and death. Connect Tissue Res. 2008; 49: 203-9.

Marastoni S, Ligresti G, Lorenzon E, Colombatti A, Mongiat M. Extracellular matrix: a matter of life and death. Connect Tissue Res. 2008;49(3):203-6.

Martin GR, Timpl R. Laminin and oher basement membrane components. Annu Renv Cell Biol. 1987; 3:57-85.

Martuza RL, Malick A, Makert JM, Ruffner C. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. Science. 1991;252:854-6.

Miller CR, Perry A. Glioblastoma. Arch Pathol Lab Med. 2007; 131:397-406.

Miner JH, Yurchenco PD. Laminin functions in tissue morphogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol. 2004;20:255-84.

Mohri, H. Fibronectin and integrins interactions. J Investig Med. 1996;44:429-41.

Nathoo N, Barnett GH, Golubic M. The eicosanoid cascade: possible role in gliomas and meningiomas. J Clin Pathol. 2004;57:6-13.

Niki T, Kohno T, Iba S, Moriya Y, Takahashi Y, Saito M, Maeshima A, Fukayama M, Yokota J, Hirohashi S. Frequent co-localization of Cox-2 and laminin-5 gamma2 chain at the invasive front of early-stage lung adenocarcinomas. Am J Pathol. 2002; 160:1129–41.

Novak U, Kaye AH. Extracellular matrix and the brain: components and function. J Clin Neurosci. 2000;7:280–90.

Nystrom ML, McCulloch D, Weinreb PH, Violette SM, Speight PM, Marshall JF, Hart IR, Thomas GJ. Cyclooxygenase-2 Inhibition Suppresses αvβ6 Integrin–Dependent Oral Squamous Carcinoma Invasion. Cancer Res. 2006;66:22.

Ohgaki H, Kleihues P, Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. Am J Pathol. 2007: 170:1445-53.

Ohnishi T, Arita N, Hiraga S, Taki T, Izumoto S, Fukushima Y, Hayakawa T, Fibronectin-mediated cell migration promotes glioma cell invasion through chemokinetic activity. Clin Exp Metastasis. 1997;15(5):538-46.

Okami J, Nakamori S, Hiraoka N, Tsujie M, Hayashi N, Yamamoto H, Fujiwara Y, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M. Suppression of pancreatic cancer cell invasion by a cyclooxygenase-2- specific inhibitor. Clin Exp Metastasis . 2003;20:577–84.

Onguru O, Gamsizkan M, Ulutin C, Gunhan O. Cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression and angiogenesis in glioblastoma. Neuropathology. 2008;28(1):29-34.

Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas. A clinical review. JAMA. 2013;310(17):1842-50.

Oz B, Karayel FA, Gazio NL, Ozlen F, Balci K. The distribution of extracellular matrix proteins and CD44S expression in human astrocytomas. Pathol Oncol Res.2000;6(2):118-24.

Paulus W, Huettner C, Tonn JC. Collagens, integrins and the mesenchymal drift in glioblastomas: a comparison of biopsy specimens, spheroid and early monolayer cultures. Int J Cancer. 1994;58(6):841-6.

Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. J Cell Sci. 2002;115:3861–3.

Payne LS, Huang PH. The pathobiology of collagens in glioma. Molecular Cancer Research; 2013:1129-40.

Perdiki M, Korkolopoulou P, Thymara I, Agrogiannis G, Piperi C, Boviatsis E, et al. Cyclooxygenase-2 expression in astrocytomas. Relationship with microvascular parameters, angiogenic factors expression and survival. Mol Cell Biochem. 2007;295:75–83.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001;1:29(9):e45.

Ponce ML, Kleinman HK, et al. Identification of a potent peptide anatagonist to na active lamnin-1 sequence that blocks angiogenesis and tumor growth. Cancer Res. 2003;63:5060-64.

Poten J, Macintyre EH. Long term culture of neuronal and neoplasic human glial. Acta Pathol Microbiol Scand 1968;74: 465-486.

Ramirez F, Rifkin DB. Cell signaling events: a view from the matrix. Matrix Biol. 2003 ;22(2):101-7.

Ramos KL. Análise comparativa das distribuições espaciais de moléculas envolvidas na migração e invasão de um tumor cerebral de rato *in vivo.* Tese (Doutorado). São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007. 123 f.

Redpath M, Marques CM, Dibden C, Waddon A, Lalla R, Macneil S. Ibuprofen and hydrogel-released ibuprofen in the reduction of inflammation-indiced migration in melanoma cells. Br J Dermatol. 2009;161(1):25-33.

Rich JN, Bigner DD. Development of Novel Targeted Therapies in the Treatment of Malignant Glioma. Nature. 2004;3:430-46.

Rooprai HK, Vanmeter T, Panou C, Schnüll S, Trillo-Pazos G, Davies D, Pilkington GJ. The role of integrin receptors in aspects of glioma invasion in vitro. Int J Dev Neurosci. 1999;17:613-23.

Rutka JT, Apodaca G, Stern R, Rosenblum M. The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. J. Neurosurg. 1988;69:155-70.

Sabari J, Lax D, Connors D, Brotman I, Mindrebo E, Butler C, Entersz I, Jia D, Foty RA. Fibronectin matrix assembly suppresses dispersal of Glioblastoma cells. PLoS One.2011;6(9):e24810.

Sales KJ, Boddy SC, Jabbour HN. F-prostanoid receptor alters adhesion, morphology and migration of endometrial adenocarcinoma cells. Oncogene. 2008; 27:2466–77.

Sasaki T, Fässler R, Hohenester E. Laminin: the crux of basement membrane assembly. J Cell Biol.2004;164(7):959-63.

Scheurer ME, El-Zein R, Thompson PA, Aldape KD, Levin VA, Gilbert MR, et al. Long-term anti-inflammatory and antihistamine medication use and adult glioma risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008;17:1277–81

Seres E, Debarbieux F, Stanchi F, Maggiorella L, Grall D, Turchi L, Burel-Vandenbos F, Figarella-Branger D, Virolle T, Rougon G, Van Obberghen-Schilling E. Fibronectin expression in glioblastomas promotes cell cohesion, collective invasion of basement membrane in vitro and orthotopic tumor growth in mice. Oncogene. 2013; 315: 1023.

Sivak-Sears NR, Schwartzbaum JA, Miike R, Moghadassi M, Wrensch M. Case-control study of use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and glioblastoma multiforme. Am J Epidemiol. 2004;159:1131–9.

Sengupta S, Suvobroto N, Hindi ES, Wainwright DA, Han Y, Lasniak MS. Short Hairpin RNA–Mediated Fibronectin Knockdown Delays Tumor Growth in a Mouse Glioma Model1. Neoplasia. 2010;12:837-47.

Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, Fitzgerald DK, Murray FE. The relationship between cyclooxygenae-2 expression and colorectal cancer. JAMA. 1999;282:1254.

Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells.2001. J Biol Chem., 276(21):18075-81

Schneider T, Mawrin C, Scherlach C, Skalej M, Firsching R. Gliomas in adults. Dtsch Arztebl Int. 2010;107(45):799-807.

Sheppard AM, Brunstrom JE, Thornton TN, Gerfen RW, Broekelmann TJ, McDonald JA, Pearlman AL. Neuronal production of fibronectin in the cerebral during migration and layer formation is unique to specific cortical domains. Dev Biol. 1995;172:504–518.

Shono T, Tofilon PJ, Bruner JM, Owolabi O, Lang FF. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. Cancer Res. 2001;61:4375–81

Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. Annu. Rev. Biochem. 2000;69:145-82.

Stamenkovic, I. Extracelular matrix remodeling: the role of matrix metalloproteinases, J. Pathol. 2003;200:448-68.

Tanzer LM. Current concepts of extracellular matrix. J. Orthop. Sci. 2006;11:326-31.

Timpl R, Brown JC. The laminins. Matrix Biol.1994;14(4):275-81.

Trueb B, Groboli B, Spiess M, ODERMATT BF, Winterhalter KH. Basement membrane collagen type IV is a heteropolimer. J. Biol. Chem.1982;257:5239-45.

Tysnes BB, Mahesparan R, Thorsen F, Haugland HK, Porwol T, Enger PO, Lund-Johansen M, BJerkvig R. Laminin expression by glial fibrillary acidic protein positive cells in human gliomas. Int. J. Dev. Neurosci.1999;17:531-39.

Ulrich TA, de Juan Pardo EM, Kumar S. The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. Cancer Res. 2009;15;69(10):4167-74

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1998;38:97-120.

Villanova M, Sewry C, Malandrini A, Toti P, Muntoni F, Merlini L, Torelli S, Tosi P, Maraldi NM, Guazzi GC. Immunolocalization of several laminin chains in the normal human central and peripheral nervous system. J Submicrosc Cytol Pathol. 1997; 29:409–413.

Wang D, DuBois R. Eicosanoids and cancer. Nat Rev Cancer. 2010;10(3):181–93

Wang M, Yoshida D, Liu S, Teramoto A. Inhibition of cell invasion by indomethacin in gliomas cell lines: in vitro study. J Neurooncol. 2005;72(1):1-9.

Wang MT, Honn KV, Nie D. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. Cancer Metastasis Rev. 2007;26:525-34.

Wechsler-Reya RJ, Caught in the matrix: How vitronectin controls neuronal differentiation. Trends Neurosci. 2001;24:680-2.

Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. N Engl J Med. 2008;359:492–507.

Westphal M, Lamszus K. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. Nat Rev Neurosci. 2011;12(9):495-508.

Yazawa K, Tsuno NH, Kitayama J, Kawai K, Okaji Y, Asakage M, Sunami E, Kaisaki S, Hori N, Watanabe T, Takahashi K, Nagawa H. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 inhibits colon cancer cell adhesion to extracellular matrix by decreased expression of β1 integrin. Cancer Science. 2005; 96:2.

Zamecnik J. The extracellular space and matrix of gliomas. Acta Neuropathol. 2005;110(5):435-42.

Zamecník J, Vargová L, Homola A, Kodet R, Syková E. Extracellular matrix glycoproteins and diffusion barriers in human astrocytic tumours. Neuropathol Appl Neurobiol. 2003;30(4):338-50.